



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103308440 A

(43) 申请公布日 2013. 09. 18

(21) 申请号 201310202769. 7

(22) 申请日 2013. 05. 28

(71) 申请人 香港浸会大学深圳研究院

地址 518057 广东省深圳市高新区南区虚拟
大学园 A211 室

(72) 发明人 吴江来 陈启尧 李剑平

(51) Int. Cl.

G01N 15/14 (2006. 01)

G01N 21/64 (2006. 01)

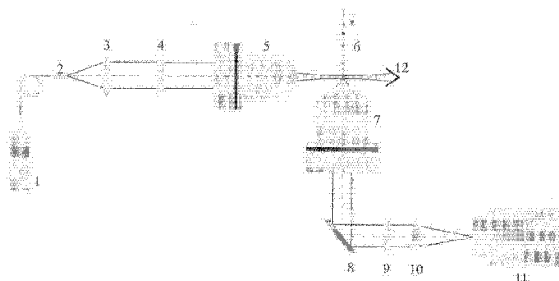
权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54) 发明名称

一种流式荧光显微成像装置及方法

(57) 摘要

本发明为一种流式荧光显微成像装置,能够解决成像流式细胞仪的焦深小及对运动物体成像时的拖尾问题。本发明的有益效果包括:1) 采用接近衍射极限厚度的片光源激发细胞的自发荧光或非自发荧光,可以克服荧光显微成像焦深小的问题;2) 仅有处在焦深范围内的细胞被激发,发射荧光,可以有效的降低荧光像的背景,因此能够有效的提高系统的灵敏度;3) 细胞垂直通过激发光源,采用成像方向与样品流动方向平行的方式对细胞进行荧光成像,可以很好地抑制拖尾现象;4) 该装置可以允许多个细胞同时被检测,从而可以提高系统的检测速度。



1. 一种流式荧光显微成像装置,包括光源、液体样品进样单元和荧光显微成像单元,其特征在于所述光源为激光片光源,液体样品的流动方向与所述荧光显微成像单元的光轴相互平行,与激光片光源激发单元的光轴相互垂直。

2. 如权利要求1所述的一种流式荧光显微成像装置,其特征在于所述激光形成的片光源厚度接近衍射极限厚度。

3. 如权利要求1所述的一种流式荧光显微成像装置,其特征在于所述激光形成的片光源由单模光纤输出激光器、准直透镜、柱透镜,显微物镜组成。

4. 如权利要求1所述的一种流式荧光显微成像装置,其特征在于液体样品进样单元由注射泵、连接软管和样品流动室组成,样品流通过鞘液流聚焦于毛细管的中心部分流动,进样毛细管可以是方形毛细管,也可以是圆形毛细管,优选为方形毛细管。

5. 如权利要求1所述的一种流式荧光显微成像装置,其特征在于荧光显微成像单元中成像物镜与光源区域之间充满液体进样单元流出的溶液,所述成像物镜为像差无限远矫正的浸水式物镜。

6. 一种流式荧光显微成像方法,其特征在于,激光片光源单元翻出的片光源在进样单元中心形成片光源照明,液体样品穿过激光片光源受到激发发射荧光,在荧光显微成像单元后焦面成像,液体样品的流动方向与所述荧光显微成像单元的光轴相互平行,与激光片光源激发单元的光轴相互垂直。

7. 如权利要求6所述的一种流式荧光显微成像方法,其特征在于所述激光形成的片光源厚度接近衍射极限厚度。

8. 如权利要求6所述的一种流式荧光显微成像方法,其特征在于所述激光形成的片光源由单模光纤输出激光器、准直透镜、柱透镜,显微物镜组成。

9. 如权利要求6所述的一种流式荧光显微成像方法,其特征在于液体样品进样单元由注射泵、连接软管和样品流动室组成,样品流通过鞘液流聚焦于毛细管的中心部分流动,进样毛细管可以是方形毛细管,也可以是圆形毛细管,优选为方形毛细管。

10. 如权利要求6所述的一种流式荧光显微成像方法,其特征在于荧光显微成像单元中成像物镜与光源区域之间充满液体进样单元流出的溶液,所述成像物镜为像差无限远矫正的浸水式物镜。

一种流式荧光显微成像装置及方法

技术领域

[0001] 本申请涉及一种流式荧光显微成像装置,更具体而言涉及将单层光激发荧光显微术及流式细胞术联用的荧光显微成像装置。

背景技术

[0002] 在生物学与医学领域,当需要对大量的细胞进行扫描时,流式细胞仪是主要的检测工具。传统的流式细胞仪将细胞视为点来观测,在完全牺牲空间分辨率的情况下,可以获得高的检测速度。当前其检测速度可达到数十万个细胞每秒。成像流式细胞仪不仅能够获得传统流式细胞仪所获的“点”的信息,同时能够对细胞进行显微成像,获得细胞的空间信息。当需要获得细胞的形态及内部结构信息时,相对于传统的流式细胞仪,成像流式细胞仪有着更大的优势。得益于探测器技术与计算机技术的发展,成像流式细胞仪的检测速度可以达到上千个细胞每秒,从而亦可以短时间内,对大量的细胞进行分析。成像流式细胞仪的应用也越来越为广泛。

[0003] 成像流式细胞仪需要对快速流动的细胞进行显微成像,通常需要克服两个主要问题。第一个主要问题是显微镜的焦深非常小。焦深主要取决于显微物镜的数值孔径,数值孔径越大,焦深则越小。如对于 20 倍,数值孔径为 0.4 的物镜,其焦深约为 6 微米。为了使细胞成像清晰,必须将流动的细胞约束在显微镜的焦深范围内。

[0004] 1) 采用扁平的样品流动室或将样品聚焦在一个相对扁平的区域。此种方法有一定的局限性。首先其将降低样品的通量。其次对于数值孔径很大的成像物镜,焦深非常小,很难将样品约束在焦深范围内。最后当待测细胞的大小大于焦深时,系统只能对细胞的局部成清晰像,处在焦深外的部分将得到离焦模糊像。

[0005] 2) 在成像光路中加入额外的光学器件,从而扩展焦深。此种方法能够虽然能够扩展焦深,但是额外光学器件的引入,将会增加系统的复杂性,降低系统的分辨率及灵敏度。通过去卷积的方法来改善成像质量和提高灵敏度。但是去卷积运算将会占用时间,影响了系统的实时性。

[0006] 第二个主要问题是流动样品带来的拖尾。对流动的细胞成像,由于细胞与相机之间存在相对运动,会造成虚像拖尾问题。通常可以通过瞬间曝光,使得细胞在曝光时间范围内运动的距离小于成像的空间分辨率,细胞近似为静止,从而可以克服拖尾问题。但是短的曝光时间将降低系统的灵敏度。采用时间延时积分(TDI)相机对流动的细胞进行拍摄,细胞像的流动方向与 TDI 相机的行扫描方向相同并且同步。相对于相机,整个过程细胞处于静止状态,从而亦可以克服拖尾问题。并且 TDI 相机的延时积分功能延长了成像的曝光时间,有效的提高了系统的灵敏度。然而采用 TDI 相机探测将会使得系统的成本增加,并且细胞的流速与 TDI 相机的行扫描稍微不同步,亦会造成拖尾。

[0007] 鉴于上述两个主要问题,本发明中叙述的流式荧光显微成像装置采用片光源照明,能够有效地克服显微成像时焦深小的局限性。并且不同于其它成像流式细胞仪的侧向成像方式,系统的成像方向与细胞的流动方向平行,从而可以抑制拖尾问题。

[0008] 本发明提出一种新的流式荧光显微成像装置和成像方法,能够很好地解决现有成像流式细胞仪中,焦深小以及对运动物体成像时产生的拖尾问题。使用片光源照明,可以降低背景影响,从而有效提高系统的灵敏度。采用成像方向与细胞流动方向平行的方式对细胞进行成像,能够很好的抑制成像拖尾现象。该成像装置和成像方法可以同时多个细胞进行检测,提高检测速度,实现高通量的特点。

发明内容

[0009] 一种流式荧光显微成像装置,包括光源、液体样品进样单元和荧光显微成像单元,其特征在于所述光源为激光片光源,液体样品的流动方向与所述荧光显微成像单元的光轴相互平行,与激光片光源激发单元的光轴相互垂直。

[0010] 一种流式荧光显微成像装置,其特征在于所述激光形成的片光源为接近衍射极限厚度。

[0011] 一种流式荧光显微成像装置,其特征在于所述激光形成的片光源由单模光纤输出激光器、准直透镜、柱透镜,显微物镜组成。

[0012] 一种流式荧光显微成像装置,其特征在于液体样品进样单元由注射泵,流动室组成,样品通过鞘液流聚焦于毛细管的中心部分流动,进样毛细管可以是方形毛细管,也可以是圆形毛细管,优选为方形毛细管。一种流式荧光显微成像装置,其特征在于荧光显微成像单元包括物镜与样品之前充满了液体进样单元流出的水,成像物镜为像差无限远矫正的浸水式物镜。

[0013] 一种流式荧光显微成像方法,其特征在于,激光片光源单元翻出的片光源在进样单元中心形成片光源照明,液体样品穿过激光片光源受到激发发射荧光,在荧光显微成像单元后焦面成像,液体样品的流动方向与所述荧光显微成像单元的光轴相互平行,与激光片光源激发单元的光轴相互垂直。

[0014] 一种流式荧光显微成像方法,其特征在于所述激光形成的片光源为接近衍射极限厚度。

[0015] 一种流式荧光显微成像方法,其特征在于所述激光形成的片光源由单模光纤输出激光器、准直透镜、柱透镜,显微物镜组成。

[0016] 一种流式荧光显微成像方法,其特征在于液体样品进样单元由注射泵,流动室组成,样品通过鞘液流聚焦于毛细管的中心部分流动,进样毛细管可以是方形毛细管,也可以是圆形毛细管,优选为方形毛细管。一种流式荧光显微成像方法,其特征在于荧光显微成像单元包括物镜与样品之前充满了液体进样单元流出的水,成像物镜为像差无限远矫正的浸水式物镜。

附图说明

[0017] 图 1 是流式显微成像系统结构示意图

[0018] 图 2 是激光片光源激发单元结构示意图

[0019] 图 3 是流式显微成像系统激光片光源侧视图

[0020] 图 4 是流式显微成像系统激光片光源俯视图

[0021] 图 5 是液体进样单元结构示意图

[0022] 图 6 是流式显微成像系统荧光显微成像单元结构示意图

[0023] 附图标记说明：

[0024] 1. 激光器 ;2. 单模光纤 ;3. 准直物镜 ;4. 柱透镜 ;5. 显微物镜 ;6. 进样毛细管 ;7. 成像物镜 ;8. 反射镜 ;9. 滤波片 ;10. 筒镜 ;11. 相机 ;12. 光束截止器 ;13. 鞘液流进样口 ;14. 样品进样口 ;15. 毛细管。

具体实施方式

[0025] 下面结合附图与实施例对本发明作进一步的说明。

[0026] 本发明为一种流式荧光显微成像装置,能够解决成像流式细胞仪的焦深小及对运动物体成像时的拖尾问题。本发明的有益效果包括:1)采用接近衍射极限厚度的片光源激发细胞的自发荧光或非自发荧光,可以克服荧光显微成像焦深小的问题;2)仅有处在焦深范围内的细胞被激发,发射荧光,可以有效的降低荧光像的背景,因此能够有效的提高系统的灵敏度;3)细胞垂直通过激发光源,采用成像方向与样品流动方向平行的方式对细胞进行荧光成像,可以很好地抑制拖尾现象;4)该装置可以允许多个细胞同时被检测,从而可以提高系统的检测速度。

[0027] 图 1 是本发明的系统结构图。该流式荧光显微成像装置包括激光片光源激发单元;液体样品进样单元;荧光显微成像单元。本发明中,液体样品的流动方向与荧光显微成像单元的光轴相互平行,与激光片光源激发单元的光轴相互垂直。

[0028] 单模光纤耦合输出激光器 1 通过准直透镜 3,柱透镜 4 及物镜 5 在进样毛细管中心形成片光源照明;当样品通过进样毛细管 6 平稳地穿过激光片光源时,受激发后发射荧光,通过物镜 7,反射镜 8,滤光片 9,筒镜 10,成像于荧光显微成像单元的后焦面上,亦即相机 11 的感光芯片上面。细胞的荧光图像最终由计算机显示,存储,分析。激光片光源由激光片光源激发单元产生,可以克服显微成像焦深小的问题。激光片光源激发单元。

[0029] 为了克服显微成像的焦深小的局限性,本发明采用激光形成的片光源进行荧光激发。该单元由单模光纤输出激光器、准直透镜、柱透镜,显微物镜组成。如图 2 所示,单模光纤输出激光器 1 输出的激光经过准直物镜 3,柱透镜 4,聚焦在显微物镜 5 的后焦面上,通过物镜 5 可形成厚度接近衍射极限的片光源,束腰位于物镜 5 的焦点附近。片光源垂直照射至进样毛细管出口附近位置上,束腰位置位于进样毛细管的中心。束腰的位置亦为荧光显微成像单元成像视场的中心。图 3 与图 4 分别给出了生成片光源的侧视图和俯视图。

[0030] 激光片光源的宽度 h 由准直后激光光束的直径,柱透镜 4 及显微物镜 5 的焦距来决定;激光片光源的厚度 $D \approx \lambda / NA$,其中 λ 为激光波长,NA 为物镜的数值孔径。与其对应的瑞利区域长度为 $W_r = \pi D^2 / 2 \lambda$ 。假设 D 为 $6 \mu m$,波长为 $450nm$, W_r 则约为 $126 \mu m$ 。当片光源厚度 D 小于或接近于荧光显微成像单元的焦深时,在激光片光源的瑞利区域内,片光源的厚度近似相等,样品都处在显微成像单元的焦深内,从而可以获得清晰的细胞荧光像。本发明中片光源的生成亦可以由单个柱透镜来完成。通常柱透镜的像差没有很好地矫正,因此一般情况下很难获得厚度接近衍射极限的片光源。

[0031] 激光器发出的激光波长可以是 $450nm$ 、 $473nm$ 、 $488nm$ 、 $532nm$ 等,对于激光器的选择并不限于此,所属技术领域技术人员根据检测对象不同可以合理选择激光器的波长。

[0032] 液体样品进样单元。

[0033] 该单元由注射泵,连接软管及样品流动室组成。样品流动室如图 5 所示。鞘液流通过注射泵由入口 13 导入,样品通过注射泵由入口 14 导入毛细管 15;样品流通过鞘液流聚焦于进样毛细管 6 的中心部分流动,从而确保各个细胞流过视场的速度近似相同,亦即与激光的作用时间相等。样品的流动方向与荧光显微成像的方向平行。通过控制鞘液及样品的进样速度,来完成对中心样品流的尺寸及其流速的控制。中心样品流的尺寸小于或等于片光源的瑞利区域长度,以保证所有的样品能够从激光片光源的瑞利区域内流过。进样流速可精密调节并且流速稳定,从而确保样品平稳地流过视场。样品流出毛细管后,直接流向荧光成像物镜,然后流至废液池。整个样品流动室固定在三维平移台上,三维平移台的移动精度在微米量级,有利于调节进样毛细管中心,片光源中心及视场中心三者的重合。进样毛细管选择方形毛细管,相对于圆形毛细管,可以减少管壁造成的片光源照射的影响。

[0034] 荧光显微成像单元。

[0035] 荧光显微成像单元的组成与标准的荧光显微镜类似。其结构如图 6 所示。成像物镜 7 为像差无限远矫正的浸水式物镜。物镜与片光源照明区域之间充满了液体进样单元流出的水,从而使得物镜为最佳工作条件,不会出现因折射率不匹配造成的像差问题。细胞通过经进样毛细管 6 垂直流过激光片光源,受激发后,经物镜 7,反射镜 8,滤光片 9,筒镜 10 最后成荧光像于相机 11 的靶面上,图像最后由计算机来显示并存储,以便进一步的处理。滤光片 9 的选择由所需要探测的荧光波长来决定。

[0036] 荧光成像的视场主要由激光片光源的瑞利区域长度和中心样品流的尺寸决定。在相机曝光过程中,细胞的荧光像将随机落在相机的不同位置上。细胞垂直流过视场时,在做主动的层析扫描,细胞将成清晰的像于成像的焦面,亦即相机的靶面上。当设置相机的曝光时间长于细胞穿过片光光源的时间时,将记录三维细胞的二维投影,可以获得清晰的二维荧光图像。采用瞬间曝光,当细胞激光片光源时,将获得一组逐层扫描的图像,可以用于三维图像的重建。相机的曝光时间可以通过计算机来控制。根据样品的浓度和流速,可以合理的控制曝光时间,以便使得每副图像上都能够捕获到一定的细胞荧光像。

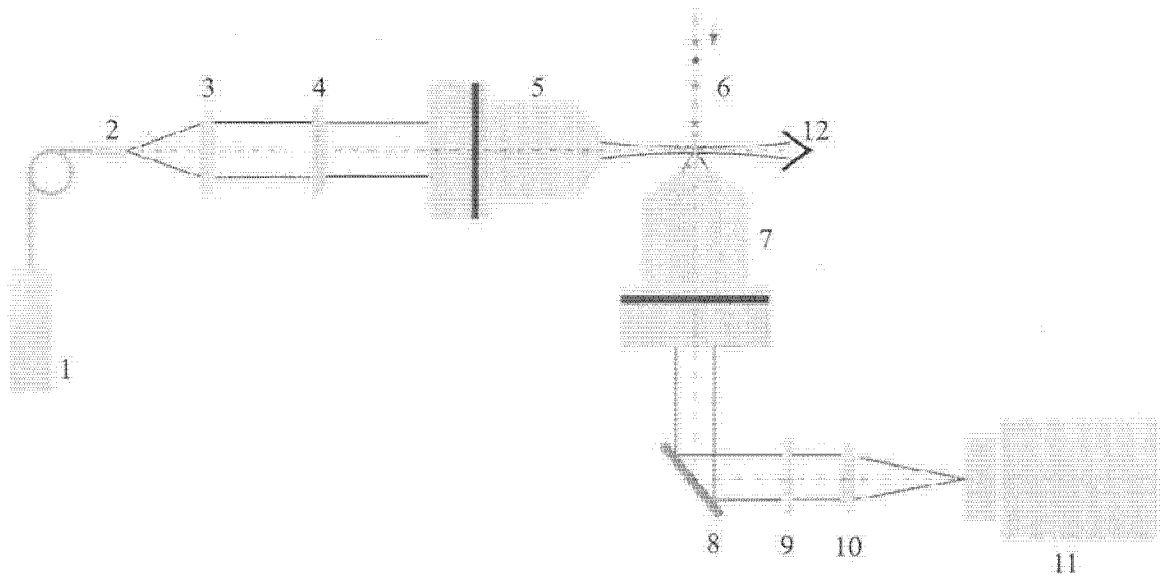


图 1

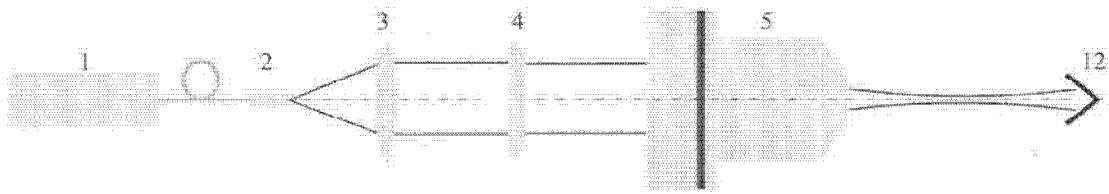


图 2

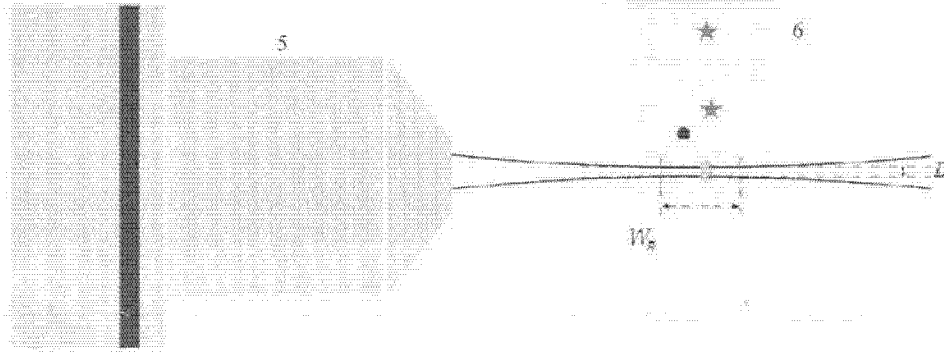


图 3

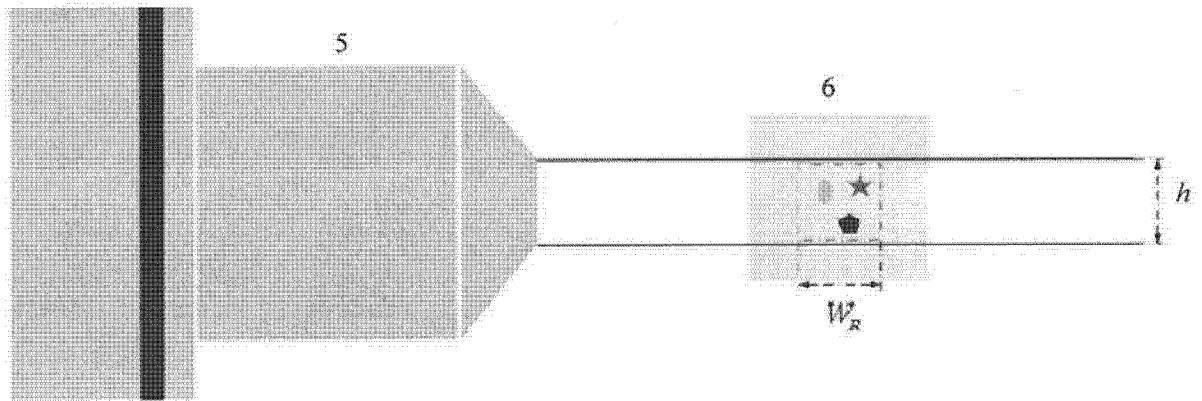


图 4

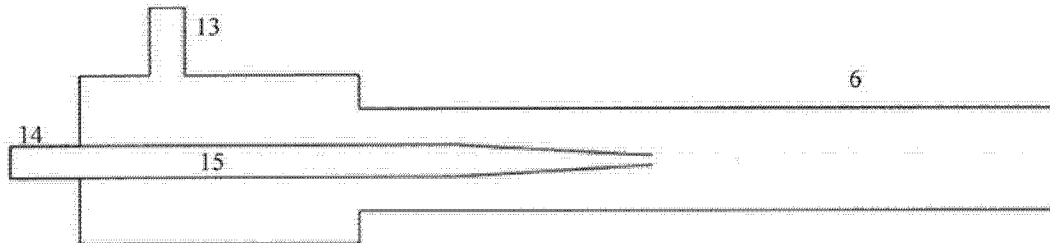


图 5

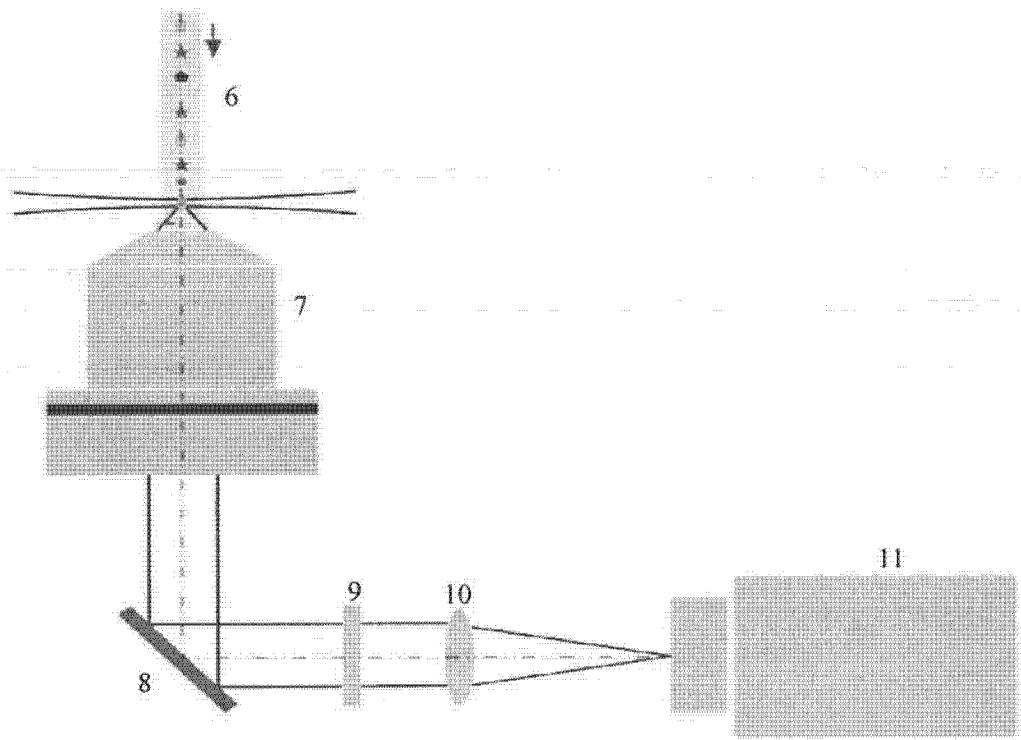


图 6