



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101031837 B

(45) 授权公告日 2011.06.15

(21) 申请号 200580031498.7

(22) 申请日 2005.07.19

(30) 优先权数据

60/590,815 2004.07.23 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007.03.19

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2005/002067 2005.07.19

(87) PCT申请的公布数据

W02006/008637 EN 2006.01.26

(73) 专利权人 通用电气医疗集团尼亚加拉有限公司
地址 加拿大安大略省

(72) 发明人 P·东德斯 C·扎拉特
P·A·福米乔夫

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 张亚宁 张志醒

(51) Int. Cl.

G02B 21/00(2006.01)

(56) 对比文件

WO 2004/038461 A2, 2004.05.06, 说明书第

2 页第 21 行 - 第 3 页第 20 行, 第 4 页第 24 行 - 第 5 页第 26 行, 第 6 页第 1-19 行、图 2.

WO 2004/036898 A2, 2004.04.29, 全文.

US 2004/0031930 A1, 2004.02.19, 说明书第 0003 段, 第 0013 段, 第 0067 段、图 6A, 6B.

US 2003/0036855 A1, 2003.02.20, 说明书第 0002 段, 第 0027-0028 段, 第 0093 段、图 6.

杨广烈. 荧光与荧光显微镜. 光学仪器 23 2. 2001, 23(2), 18-29.

许险峰等. 共聚焦激光扫描显微镜技术. 激光光生物学报 12 2. 2003, 12(2), 156-159.

高万荣等. 共焦扫描荧光显微镜的信噪比与测量精度. 光学技术 28 4. 2002, 28(4), 315-316.

审查员 李琪

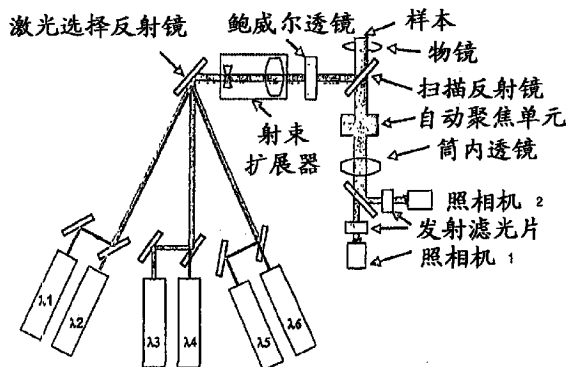
权利要求书 3 页 说明书 9 页 附图 2 页

(54) 发明名称

用于荧光共焦显微镜检查的方法和设备

(57) 摘要

本发明提出了一种新的改进的共焦荧光显微镜。相对于现有的显微镜共焦成像器的实际应用，新的显微镜具有明显的优势。和以前的共焦成像器一样，相对于常规宽视场和共焦荧光成像器，本发明具有若干优势。然而，本发明还在成本和复杂性方面解决了共焦技术的缺点，并且由于部件的简单化以及消除了对比如针孔或狭缝的空间滤光片的需求而在这两方面提供了明显的节省。



1. 一种用于荧光目标的共焦荧光显微镜检测扫描的设备,包含:
提供激发辐射的至少一个光源;
检测来自荧光目标的荧光发射的至少一个检测器;
其中所述至少一个光源包括行形成单元以照明所述荧光目标的行部分;以及
至少一个检测器能够随机访问所述荧光发射的读取;其中所述检测器被置于光学共轭至成像面积的位置,并且检测器内检测面积的形状和尺寸被调节至等于或小于光学共轭的照明范围的图像。
2. 如权利要求 1 所述的设备,其中所述至少一个光源选自下列项组成的组:激光器、激光二极管、发光二极管、灯以及其中的组合。
3. 如权利要求 2 所述的设备,其中所述光源包括两个或多个激光器。
4. 如权利要求 3 所述的设备,其中所述激光器以不同波长进行发射。
5. 如权利要求 1 所述的设备,其中所述至少一个检测器包括一个或多个二维的基于像素的光学接收器,所述光学接收器能够独立重置和读出这样的像素。
6. 如权利要求 5 所述的设备,其中所述至少一个检测器包括 CMOS 检测器。
7. 如权利要求 1 所述的设备,其中所述行形成单元选自下列项组成的组:鲍威尔透镜、柱面透镜、衍射光栅、全息元件以及其中的组合。
8. 如权利要求 1 所述的设备,其中所述行形成单元在所述目标上产生光线,所述光线通过一个或多个射束偏转装置移过所述目标。
9. 如权利要求 2 所述的设备,其中所述辐射来自至少一个光源,并且来自所述至少一个光源的所述辐射被耦合以通过光学选择装置提供所述目标的照明,所述光学选择装置选自具有光学快门的色散棱镜、具有光学快门的反射光栅、具有光学快门的分色镜、光纤开关和旋转反射镜组成的组。
10. 如权利要求 8 所述的设备,其中所述射束偏转装置包括一个或多个电流计。
11. 如权利要求 9 所述的设备,其中所述检测器是 CMOS 检测器,所述 CMOS 检测器还包含卷帘式快门单元。
12. 如权利要求 11 所述的设备,其中所述卷帘式快门单元具有小于或等于所述目标上所述行的图像的宽度的宽度。
13. 如权利要求 12 所述的设备,其中所述卷帘式快门单元光学共轭至所述目标上的所述行。
14. 如权利要求 11 所述的设备,其中所述荧光发射的读取与所述照明面积的扫描同步。
15. 如权利要求 1 所述的设备,其中所述荧光目标包括一个或多个荧光标记。
16. 如权利要求 1 所述的设备,其中所述目标位于显微镜载玻片上或微量滴定板上。
17. 如权利要求 11 所述的设备,还包含位于所述检测器前面的一个或多个光学滤光片,其传输所述荧光目标的所述荧光发射波长的光并且反射或衰减所述荧光目标的所述激发辐射波长的光。
18. 如权利要求 17 所述的设备,其中所述一个或多个滤光片是线性可变滤光片。
19. 一种获得荧光目标的图像的方法,包括:
提供光源,该光源提供对应于荧光目标的激发波长的波长的激发光,该光源包括行形

成单元以照明所述荧光目标的行部分；

利用所述激发光扫描所述目标；

在所述激发光越过所述目标移动时，收集荧光发射；

提供能够随机访问所述荧光发射的读取的一个或多个检测器；以及

其中检测器被置于光学共轭至成像面积的位置，并且检测器内检测面积的形状和尺寸被调节至等于或小于光学共轭的照明范围的图像。

20. 如权利要求 19 所述的方法，其中所述光源包括一个或多个激光器。

21. 如权利要求 19 所述的方法，其中所述一个或多个检测器包括一个或多个二维的基于像素的光学接收器，所述光学接收器能够独立重置和读出这样的像素。

22. 如权利要求 21 所述的方法，其中所述一个或多个检测器包括 CMOS 检测器。

23. 如权利要求 22 所述的方法，其中所述 CMOS 检测器还包含卷帘式快门单元。

24. 如权利要求 23 所述的方法，其中所述卷帘式快门单元具有小于或等于所述目标上行的图像的宽度的宽度。

25. 如权利要求 23 所述的方法，其中所述卷帘式快门单元光学共轭至所述目标上的行。

26. 如权利要求 19 所述的方法，其中所述行形成单元选自下列项组成的组：鲍威尔透镜、柱面透镜、衍射光栅、全息元件以及其中的组合。

27. 如权利要求 19 所述的方法，还包含位于所述检测器前面的一个或多个光学滤光片，其传输所述荧光目标的发射波长的光并且反射或衰减所述荧光目标的所述激发波长的光。

28. 如权利要求 27 所述的方法，其中所述一个或多个滤光片是线性可变滤光片。

29. 如权利要求 28 所述的方法，其中所述一个或多个滤光片被移动以跟踪越过所述目标的所述激发光的移动。

30. 如权利要求 19 所述的方法，其中所述目标位于显微镜载玻片上或微量滴定板上。

31. 一种被摄体的成像方法，所述被摄体包括利用一个或多个荧光标记所标记的一个或多个目标，所述方法包含：

a. 自具有与所述荧光标记的吸收带至少部分重叠的发射光谱的至少一个光源发射电磁辐射；

b. 通过照明光学系统照亮所述被摄体，形成覆盖所述被摄体的整个成像面积或其中一部分的照明范围，将射束成形光学系统用于控制所述被摄体上的照明范围的形状，其具有线、圆或矩形形状；

c. 利用可以与所述照明光学系统相同或不同的光收集系统，从位于所述被摄体上的照明范围内的所述荧光标记收集荧光发射；

d. 将能够独立重置和读出像素的一个或多个二维的基于像素的检测器置于光学共轭至成像面积的位置；

e. 将所述检测器内检测面积的形状和尺寸调节至等于或小于光学共轭的被摄体照明范围的图像；

f. 通过读取来自位于所述检测面积内的像素的信号，检测被传递至所述检测器的所述检测面积的荧光发射；

g. 重置位于所述检测器的所述检测面积之外并且不与所述照明范围光学共轭的所述检测器的像素；

h. 利用射束扫描系统在所述被摄体的成像面积内扫描所述照明范围；

i. 移动所述检测器的所述检测面积，以此利用对所述检测器的像素的随机访问来维持同所述照明范围的光学共轭；

j. 由越过所述成像面积的所述照明范围的扫描期间获得的、来自接收器的检测面积的信号，形成所述被摄体的成像面积的图像；以及

k. 针对多个光源的顺序图像采集，为多个光源从步骤 (a) 重复所述方法。

32. 如权利要求 31 所述的被摄体成像方法，所述方法还包含：

利用长通、带通或线性可变光学滤光片过滤所述荧光发射。

33. 如权利要求 31 所述的方法，其中所述至少一个光源选自下列项组成的组：激光器、激光二极管、发光二极管、灯以及其中的组合。

34. 如权利要求 31 所述的方法，其中所述检测器选自由 CMOS 检测器和 CCD 检测器组成的组。

35. 如权利要求 31 所述的方法，其中所述目标位于显微镜载玻片上或微量滴定板上。

用于荧光共焦显微镜检查的方法和设备

技术领域

[0001] 本发明涉及光学显微镜检查领域,具体涉及共焦荧光显微镜检查领域以及通过共焦荧光显微镜检查获得荧光标记的目标的图像的方法。

背景技术

[0002] 通常,根据如何俘获或处理荧光图像信息,可将大多数荧光显微镜归类为下列普通类别的其中之一:

[0003] 宽视场显微镜在这些显微镜中,利用如在任何标准显微镜中的常规宽视场策略并且收集荧光发射使目标成像。通常,荧光污染或标记的样本利用适当波长的激发光来照亮,并且发射光用来获得图像;光学滤光片和/或分色镜用来分离激发光和发射光。

[0004] 结构光显微镜这是对沿显微镜的光轴提供增强的空间分辨率的显微镜的修改。该特征考虑了成像标本的光学切片。结构光照明装置的主要部件是一维光栅。光栅图案被系统地投射到标本上并且被移进越过样本的物镜的焦平面;发射光被收集并被编辑以此产生图像。在对光栅上不同位置俘获的标本的三幅图像进行处理之后,生成一幅这样的“结构光”图像。

[0005] 通常,投射的光栅图像为物镜焦平面上的物提供了较强的强度的空间调制,同时焦平面上方和下方面积上的强度调制被明显减少。当发射辐射被收集时,图像处理算法消除来自自由光栅定义的原像平面上方或下方的较弱信号。由此生成的图像因此无任何杂散光或离焦数据。另外,因为结构光照明装置利用基质宽视场显微镜的照明光源,该显微镜的所有荧光能力被保持。

[0006] 真实共焦显微镜共焦显微镜使用专用的光学系统来成像。在最简单的系统中,在相关荧光团的激发波长下工作的激光器被聚焦至样本上的一点;同时,来自这个照明点的荧光发射在小面积检测器上成像。自样本的所有其他面积发射的任何光被位于检测器前方的较小的针孔抑制,所述检测器传输源自照明斑点的光。激发斑点和检测器以光栅图扫过样本以此形成完整的图像。存在有各种不同策略用来改进和优化本领域技术人员公知的速度和透光率。

[0007] 行-共焦显微镜这是对共焦显微镜的修改,其中荧光激发源是激光束;然而,射束在样本上聚焦成一窄行而不是单个点。荧光发射接着通过充当空间滤光片的狭缝在光学检测器上成像。自样本的任何其他面积发射的光保持离焦并且结果被狭缝所阻挡。为了形成二维图像,所述行扫过样本同时读取行照相机。该系统可以通过利用适当的光学布置被扩展成可同时使用若干激光器和若干照相机。

[0008] 然而,这样的行共焦显微镜通常是复杂且昂贵的,并且因此对于许多应用来说是不切合实际的。存在有对组合了共焦和行共焦显微镜的优点与其他系统的简单化及经济实惠的显微镜的实际需求。

发明内容

[0009] 本发明提出了一种新的改进的共焦荧光显微镜。相对于现有的显微镜共焦成像器的实际应用,新的显微镜具有明显的优势。和以前的共焦成像器一样,相对于常规宽视场和共焦荧光成像器,本发明具有若干优势。然而,本发明还在成本和复杂性方面解决了共焦技术的缺点,并且由于部件的简化以及消除了对比如物理空间滤光片(如针孔或狭缝)的需求而在这两方面提供了明显的节省。该系统还可与包括薄底 96, 386 和 1536-孔板、显微镜载玻片的许多微孔板相兼容,并且可支持各种荧光染料。

[0010] 该系统包含至少一个或多个(优选地为两个或多个)光源(优选地为激光器),所述光源将在与相应的荧光或荧光污染或标记的目标对准的不同激发波长下工作。利用带通光学滤光片过滤来自每个目标的荧光发射,并且通过至少一个成像装置(优选地为两个或多个成像装置)收集发射数据。与上述现有的宽视场荧光显微镜相比该系统提供了某些截然不同的优点,包括改进的图像质量和增加的敏感度。更具体地说,在普通的荧光显微镜中,自焦平面上方和下方的材料的荧光发射导致不想要的背景荧光。常规宽视场荧光显微镜未提供对这种背景的有效抑制,并且因此,这样的显微镜将由加在较大背景信号上并被这个背景信号影响的目标多孔材料产生相对较小的信号。例如,当带有生物样本的微量滴定板通过宽视场荧光显微镜成像时,来自孔板的清洁的塑料底部的背景和多孔材料上方的介质将通常基本上大于多孔材料的信号。这种图像的分析按照常规通过估计并且接着减去这种背景来实现。

[0011] 然而,这种估计引入了下列问题:

[0012] 1、所关注信号中的统计噪声作为背景的结果被增加。这降低了识别所关注特征的能力,因为这种背景荧光通常是形成图像中 > 90% 的噪声的原因并且必须通过估计背景噪声的影响进行校正。另外,因为这种估计涉及某些假定,这使得分析和解释变得复杂并且它降低了系统的敏感度。

[0013] 2、估计和去掉背景在计算上是昂贵的并且花费了大量的时间。通常,在这样的系统中 ~ 50% 的分析时间专用于估计背景。对于其中背景具有不规则和高对比结构的情形(如其中高荧光颗粒漂浮在介质中的化验),图像的显著部分实际上可能是难以分析的,因为不能构建背景的精确模式。

[0014] 共焦成像显微镜的使用将通常相对于来自焦平面的荧光信号将这种背景荧光抑制到原来的 1/20 或 1/100,从而允许获得更精确的图像。然而,共焦显微镜常常是昂贵的并且其操作和使用是复杂的。本发明系统通过引入简化的检测子系统降低了系统的成本和复杂性,所述简化的检测子系统包含能够随机访问用于检测荧光发射的一个或多个检测器。检测器优选地为低成本的 CMOS 光学传感器,所述 CMOS 光学传感器由于可以忽略的暗电流而使影响最小,即使当传感器是在室温下工作的,然而还可以使用其他基于像素的检测器(如适当的 CCD 照相机)。适当的检测装置在 Orly Yadid-Pecht 和 Ralph Etienne-Cummings(编辑者)、Springer(出版者)的第一版(2004年5月31日)的 CMOS Imagers: From Phototransduction to ImageProcessing 进行了描述,其内容通过引用而被结合在此。

[0015] 在优选实施例中,检测器还结合卷帘式快门单元来限制用于光检测的检测器的瞬时面积。这个面积的尺寸(如行共焦成像情形下的卷帘式快门的宽度)将通常小于或等于

光共轭至检测器的照明面积。

[0016] 另外,系统使用至少一个以及优选地为两个或多个光源来提供激发光。事实上,可以使用具有或不具有滤光片的、能够发射光的任何光源(如灯)。这种光源对本领域的技术人员来说将是易于理解的。优选的光源包括用于这种照明的更明亮的窄带光源,更优选地为激光器。

[0017] 在优选实施例中,激发光以行的形式而不是单个点的形式在目标上聚焦,并且所述行扫过目标的表面。如前面所讨论的,行共焦成像器在本领域中是已知的,并且优选的系统在没有复杂性和高成本的情形下赋予了常规行系统的好处。成像目标上的行形状的照明面积可以通过本领域技术人员已知的任何单元来产生,但是优选地通过鲍威尔透镜来产生。

[0018] 在另外的优选实施例中,行形成单元与 CMOS 检测器配对,所述 CMOS 检测器在卷帘式快门模式下工作以此产生低成本、简单并易于使用的行共焦扫描仪。

[0019] 检测器还可结合窄带的激光线专用的滤光片,其可用来抑制激发光。这些类型的滤光片可以与具有被调节至荧光团的发射光谱的光学带宽的其他滤光片一起组合使用。一种优选的组合是使用与 Schott Veril 线性可变滤光片串联的 Rugate 陷波滤光片。通过适当控制线性滤光片在光学检测器前面的位置,能够利用相同的激发激光器使若干荧光团成像。

[0020] 同样地,灵活性允许可在多种模式下工作的混合显微镜的构造。在这种混合装置的优选实施例中,在一种工作模式下,混合显微镜是以本发明的方式工作的行共焦显微镜;在第二种工作模式下,当照明系统被调节成可照亮显微镜的整个视场时,混合显微镜按照标准的宽视场显微镜工作。

附图说明

[0021] 图 1 示出了本发明的优选设备的示意图。

[0022] 图 2 示出了本发明的多波长设备的示意图。

具体实施方式

[0023] 图 1 示意性示出了前面描述的本发明的共焦成像系统,该系统包括如前面描述的用来激发荧光(或荧光污染或标记的)目标的一个或多个光源和用来检测荧光发射的一个或多个检测器。该系统可包含通常将在共焦和宽视场显微镜中发现的其他部件。下面的部分详细描述了这些和其他的部件。对于许多部件来说,存在有多个潜在的实施例。一般优选实施例取决于目标应用。对于该文件来说,优选的目标应用是具有使各种荧光团成像的能力的高透光率细胞筛选。

[0024] 部件的描述

[0025] 激光光源

[0026] 虽然如前面所描述的光源可以是能够将激发波长的光传递至目标的任何光源,但是优选地是将一个或多个激发激光器组合进系统。在优选实施例中,存在有覆盖了从近 IR 到近 UV 的光谱的 4+ 激光器。来自这些激光器的每一个的光可以通过传递作为适当直径、方向和准直度的自由空间射束的光或者经由光纤光传递系统耦合至光学系统的其余部分。在另外的优选实施例中,光作为具有特定射束直径的高度准直射束(标准方法可周来实现

这一点)或经由光纤(理论上使用单模偏振保留光纤)来传递。在优选实施例中,每个激发激光器在 TEM₁₀₀ 模式下工作,其中 $M^2 < 1.2$, RMS 噪声为 1Hz 至 10MHz $< 0.5\%$ 并且偏振处于已定义的状态。可使用任何实际数量的激光器。

[0027] 激光器选择模块

[0028] 激发激光器的光被传递至激光器选择模块(2)。该模块选择来自其中一个激光器的光并且将其引导进射束成形模块(3)。来自其他激光器的光被阻挡。激光器选择模块的可能的实施例包括但不限于:

[0029] 1、针对每个激光器的色散棱镜加光学快门。所期望的激光器通过关闭除一个以外的所有快门来选择。

[0030] 2、针对每个激光器的反射光栅加光学快门。所期望的激光器通过关闭除一个以外的所有快门来选择。

[0031] 3、针对每个激光器的分光镜叠层加光学快门。所期望的激光器通过关闭除一个以外的所有快门来选择。

[0032] 4、光纤开关。

[0033] 5、基于旋转反射镜的射束偏转器。旋转反射镜可用来将来自选择的激光器的光引导至射束成形模块。在这种情形下,所有激光束被(i)准直到垂直于反射镜的旋转轴的同一光学平面上以及(ii)指向反射镜至位于反射镜的旋转轴上的点。通过利用机械执行元件(如电流计)调节反射镜的旋转角度使所期望的激光器朝向射束成形模块。这是优选实施例,因为它简单、低成本并且在激光器的输出射束方向上提供了动态校正漂移的能力。

[0034] 射束成形模块

[0035] 激发激光器的光通过射束成形器(3)被优选地、适当地成形。射束成形器的可能的实施例包括但不限于激光束扩展器。在优选实施例中,使用了射束扩展器并且针对色差校正它的光学元件以便在激光器之间切换时对射束扩展器的焦距的调节最小。激光束的直径优先被扩展成等于物镜(7)的后光瞳的直径。在备选的实施例中,所使用的射束扩展器类型将取决于特定应用并且可包括变形棱镜,所述变形棱镜后面跟有激光束扩展器而没有任何射束成形器,以及包括基于无色差反射镜的射束扩展器。

[0036] 行形成模块

[0037] 对于行共焦模式下的操作,激发激光器的光穿过行形成元件(4),所述行形成元件(4)将激光的准直射束转换成只在一个方向上发散的聚焦光束。输出射束的全扩张角 $\Delta \theta$ 由下式给出:

$$[0038] \quad \Delta \theta = 2 * \arctan(D / (2 * f)) \quad (1)$$

[0039] 其中 f 是物镜(7)的焦距,并且 D 是在垂直于图 1 平面的方向上的目标(8)上成像面积的线性维数。

[0040] 行形成元件的优选实施例包括但不限于鲍威尔透镜(如美国专利 4,826,299 描述的,其内容通过引用而被结合在此)。

[0041] 第二锥筒表面的形状优选地被指定为可实现超过范围 $\Delta \theta$ 的 10% 以内的均匀照明和穿过物镜(7)的大于 80% 的激光传输。

[0042] 还可使用备选的行形成元件,如柱面透镜、衍射光栅和全息元件。

[0043] 扫描模块

[0044] 扫描模块提供了物镜的焦平面上越过显微镜视场的激发光的扫描。

[0045] 激发激光器的光优选地被反射镜 (5) 反射, 所述反射镜 (5) 可以绕图 1 平面中的轴倾斜。倾斜角度由执行元件 (6) 来设置。反射镜 (5) 可选地包括集中于或轴向偏离物镜 (7) 背面的窄反射镜。这是优选的实施例并且具有如下的优选的几何形状和反射特性:

[0046] 宽度~物镜的后孔径直径的 1/10 倍。

[0047] 长度~物镜的后孔径直径的 1.6 倍。

[0048] 光学平面。

[0049] 高度反射 300nm 至 800nm。

[0050] 反射镜的这些特定性质提供了若干关键优势:

[0051] (1) 使得能够将单反射镜用于所有激发波长。相对于多波段分色镜, 这大大地增加了使系统适应各种激光器的灵活性。

[0052] (2) 在其最宽的点处, 它利用了物镜的后孔径。这导致衍射的最低可达到的水平, 其又产生样本处激光照亮的行的最窄可达宽度。

[0053] 在利用简单的一个倾斜反射镜策略的情况下可以达到的视场尽可能得大。通过使用两个反射镜, 可同时改变射束方向并平移射束。

[0054] 该系统还可以和可选的分色镜一起使用。分射镜的设计将使得来自所有激发激光器的辐射被有效地反射, 并且使得与荧光发射相对应的波长范围内的光被有效传输。基于 Rugate 技术的多波段反射镜是优选实施例。

[0055] 扫描执行元件

[0056] 执行元件 (6) 的实施例包括但不限于具有用于检测角位置的积分传感器的电流计。电流计通过适当调谐的伺服系统来驱动。轴承系统以弯曲为基础以此有效地消除磨损和轴承中的摩擦问题。这是优选的实施例。

[0057] 显微镜物镜

[0058] 激发激光器的光优选地穿过物镜 (7)。在这个实施例中, 物镜:

[0059] • 针对所期望的视场上的几何和色差而被高度校正。

[0060] • 具有良好像场平直度。

[0061] • 传输自近 UV 至近 IR 的光。

[0062] • 具有最高的实际数值孔径以便于实现最好的实际光学分辨率以及以便于收集与实际同样多的荧光发射。

[0063] • 包括提供对由样本支架 (8) 的光学厚度随样本的变化引入的球面像差的校正。

[0064] • 具有至少 1.2mm 的工作距离以便于能够在没有使物镜与样本支架 (8) 接触的风险的情况下通过多至 1.5mm 厚度的样本支架 (8) 使样本成像。

[0065] 优选实施例包括具有球面像差环的 Plan-Fluor 物镜。对于优选实施例, 物镜具有范围为 15X 至 30X 的放大率和范围为 6.7mm 至 13.3mm 的焦距。

[0066] 在优选操作中, 激发激光器的光穿过支持样本的固体、透明光学材料 (8)。这个支持材料的厚度、曲率和光学性质可以随样本变化。激发激光器的光入射到样本 (9) 上。当系统被适当聚焦时, 样本被激光线照亮。样本中的荧光材料发射荧光, 作为结果被光线照亮。在优选实施例中, 照明光线上的距离是均匀的, 且将超过 0.8mm。

[0067] 荧光穿过支架 (8) 并且被物镜 (7) 收集。

[0068] 根据反射镜的实施例,荧光穿过或掠过反射镜(5)。当反射镜(5)是二向色时,激光照明的有效抑制通过这个反射镜来促成。这种抑制将减少光学滤光片(11)和(14)的阻挡要求。

[0069] 荧光穿过可选的分色镜(10)。该分色镜用来将来自自动聚焦系统(图中未示出)的射束插入光程。

[0070] 激光线抑制滤光片

[0071] 荧光穿过有效地传输荧光并阻挡激发激光的波长的适当滤光片(11)。滤光片可选地可绕垂直于图1平面的轴倾斜以使自滤光片的反射位于照相机(16)的视场外。

[0072] 如果使用多个滤光片,执行元件(12)可用于滤光片改变。执行元件(12)的优选实施例包括但不限于:

[0073] • 高速线性载玻片。当滤光片(11)是3至6个滤光片的其中之一时,这是优选实施例。

[0074] • 双态高速($< 25\text{msec}$)执行元件。当滤光片(11)是两个滤光片中之一时,这是优选实施例。

[0075] • 无执行元件。这个选项适用于其中存在有单个滤光片(11)的情形或者当所有光学滤光通过发射滤光片(14)来实施时。

[0076] 滤光片(11)的优选实施例包括但不限于 Rugate 陷波滤光片。可以将多个 Rugate 滤光片安装进系统。这些滤光片的每一个可具有与激发激光的波长相对应的多个狭窄并高度反射的波段。在安装进系统的滤光片当中,存在有至少一个滤光片,所述的至少一个滤光片将有效地反射被安装进系统的每一个激发激光器发射的光。其他优选实施例包括:

[0077] • 单波段 Rugate 滤光片组

[0078] • 多波长 Rugate 陷波滤光片。若干狭窄并高度反射的波段与安装到系统上的所有激发激光的波长相对应。

[0079] • 不同类型滤光片的组合。这样的组合对本领域技术人员来说是已知的。

[0080] • 无滤光片。当所有光学滤光通过滤光片(14)来实施时,这个选项是可适用的。

[0081] 在优选实施例中,滤光片(11)将不会使荧光发射晕光。

[0082] 筒内透镜

[0083] 荧光穿过图像形成透镜(13)。

[0084] 在优选实施例中:

[0085] • 透镜的几何变形在由照相机(16)成像的区域上是非常低的($< .2\%$)。

[0086] • 针对所有其他几何和色差校正透镜。

[0087] • 高质量的中距远摄照相透镜将可能是适合的。

[0088] 发射滤光片

[0089] 荧光穿过由可选的执行元件(15)控制的适当光学滤光片(14)。该滤光片有效地传输荧光并衰减其他波长的光。

[0090] 滤光片(14)的潜在实施例包括但不限于:

[0091] • 线性可变滤光片,如 Schott Veril 滤光片。恒定光学带通的行的取向平行于行形状的照明面积。这是优选的实施例。该滤光片可以与移动的激发射束同步移动以此在图像采集期间提供恒定的光学带宽。

[0092] • 标准的、染料专用的荧光滤光片。

[0093] • 无滤光片。当所有光学滤光通过激光线抑制滤光片 (11) 来实施时,这个选项是可适用的。

[0094] 在优选实施例中,滤光片 (14) 将不会使荧光发射晕光。

[0095] 光学检测器

[0096] 如前所述,优选的检测器包括能够检测荧光并生成图像的 CMOS 和 CCD 检测器。在本发明优选的实施例中,检测器能够独立重置和读出像素 (随机访问特征)。

[0097] 在优选实施例中,荧光发射在具有卷帘式快门 (还称为焦平面快门) 的 CMOS 检测器 (16) 上聚焦。对于这种类型照相机操作的描述参考 Eastman Kodak 公司出版的“Application Note MTD/PS-0259 Shutter Operations for CCD and CMOS Image Sensors”,其内容通过引用而被结合在此。

[0098] 在行扫描模式下,激光被聚焦到取向平行于若干行 CMOS 检测器的均匀照明的行上。在使该行精确地以于 CMOS 照相机的卷帘式快门上成像的样本的面积为中心的 (上述) 位置上存在有控制机构。该行随着卷帘式快门移过照相机而移动。这样,由照明行生成的荧光发射通过传感器来收集。

[0099] 本发明的成像器基本上在这两种模式下工作,即如下所述的顺序的和同时多波长成像。

[0100] 优选系统的操作

[0101] 在一般的操作中,包括一个或多个荧光标记的一个或多个目标将通过如下的成像设备来成像。

[0102] 1、使来自具有同荧光标记的吸收带至少部分重叠的发射光谱的一个或多个光源的电磁辐射指向目标,并且使用射束成形光学系统控制被摄体上照明范围的形状,其可具有点、线、圆和矩形的形状。该目标通过照明光学系统来照亮以此形成覆盖整个成像面积或其中一部分的照明范围。

[0103] 2、接着利用可以与照明系统相同或不同的光收集系统从位于荧光范围内的荧光标记上收集荧光发射,并且利用长通、带通或线性可变光学滤光片过滤荧光发射。

[0104] 3、能够独立重置和读出像素 (随机访问特征) 的一个或多个二维的基于像素的光学接收器 (检测器) 被置于光学共轭至成像面积的位置,并且光学检测器内检测面积的形状和尺寸被调节至等于或小于光学共轭的照明范围的图像。被传递至光学接收器的检测面积的荧光发射通过读取来自位于检测面积内像素的信号来检测。位于检测器的检测面积之外的光学检测器的像素被重置以便于 (i) 抑制照明面积之外和平面荧光之外接收的光学信号 (如杂散光); 以及 (ii) 减少在总图像采集时间期间另外将积累的内在的检测器噪声 (如热噪声)。

[0105] 4、利用射束扫描系统在被摄体的成像面积内扫描照明范围,并且移动光学接收器的检测面积以此利用对光学检测器的像素的随机访问来维持同照明范围的光学共轭。

[0106] 5、被摄体的成像面积的图像由越过成像面积的照明范围的扫描期间获得的来自接收器的检测面积的信号 (子图像) 构成,并且针对多个光源的顺序图像采集重复前述的步骤。

[0107] 顺序成像模式下成像器的操作

[0108] 在顺序模式下,利用一个荧光团在时间通路上顺序采集荧光图像。

[0109] 在顺序模式下,本发明的成像系统将如下操作:

[0110] 利用 X-Y 载物台将目标 (9) 移进成像位置。来自期望的光源的激发辐射接着在目标上聚焦以此产生荧光发射。

[0111] 接着针对最佳焦距手工和 / 或利用自动聚焦系统调节物镜 (7) 的位置。

[0112] 检测器 (16) 被驱动以起启动曝光。关键采集参数是卷帘式快门的宽度和卷帘式快门“移”过照相机的速度。

[0113] 当卷帘式快门移过照相机 (16) 时,反射镜 (5) 的倾斜被调节以使激发激光线的位置保持在卷帘式快门面积的中部。如果滤光片 (14) 是线性可变滤光片,则还必须在曝光期间改变这个滤光片的位置以此保持与照相机的卷帘式快门同步的滤光片的位置。

[0114] 同时多波长成像模式下成像器的操作

[0115] 在同时多波长成像模式下,成像系统被配置成可同时俘获多个荧光图像。

[0116] 设计同时多波长共焦显微镜的其中一个主要问题是显微镜物镜的色差校正的有限范围。其意味着:

[0117] 1、对于照明光程 - 物镜的色差校正的光谱范围内的激发行的照明面积 (点或线) 将是对焦的,并且位于校正的光谱范围之外的激发波长的照明面积 (通常在 UV 范围内) 将是散焦的。

[0118] 2、对于发射光程 - 在校正的范围内发射光的荧光目标的图像将是对焦的,但是远离校正的光谱范围的发射的荧光目标图像将是散焦的。

[0119] 这些问题是本领域公知的。

[0120] 为了利用多个激光器或其它光源实现同时成像,建议将所述波长进行分组。这些子组被选择成以使针对每个子组的激发波长的显微镜物镜的色差将在可接受的范围内。

[0121] 在优选实施例中,系统要求在 670、638、532、488、405 和 374nm 的激发波长下荧光成像。大约 300nm (从 670nm 至 357nm) 的总波长范围比典型的显微镜物镜的校正的光谱范围宽得多,并且因此,在所有这些波长下同时“对焦”成像是不可可能的。然而,这些波长可以分组为若干子组,比如:

[0122] - 红色组 (670 和 638nm, 32nm 范围)

[0123] - 蓝色 - 绿色组 (532 和 488nm, 44nm 范围)

[0124] -UV 组 (405 和 375nm, 30nm)

[0125] 每个子组内激发波长的光谱范围更窄 ($< 40\text{nm}$),并且在子组波长下同时“对焦”成像变为可能。

[0126] 在这种系统中光学检测器的数目应当等于子组中的波长数目。

[0127] 图 2 示出了演示这种利用三个子组在两个波长下同时成像方法的系统的光学配置。

[0128] 该系统利用六个激光器激发光源,所述的六个激发光源被分成每两个波长的三个子组。每个子组中激光器的激光束利用下列方法之一进行光学合并:

[0129] - 偏振射束组合器,

[0130] - 二向色光束组合器

[0131] - 光纤光束组合器

[0132] 该系统操作如下：

[0133] 1、基于激光选择反射镜的光学开关或任何其它适当的技术将来自选择的子组的组合光束耦合进光学系统。

[0134] 2、组合光束穿过射束成形光学部件（射束扩展器和鲍威尔透镜），自扫描反射镜被反射，穿过显微镜物镜并且在标本上聚焦。

[0135] 3、通过移动扫描反射镜使激发光扫过标本。

[0136] 4、通过显微镜物镜收集激发的荧光发射。

[0137] 5、荧光目标的图像通过筒内透镜形成。

[0138] 6、通过分色镜将荧光发射分成两个通道。

[0139] 7、每个通道的荧光发射穿过发射滤光片。可以在此添加激光线抑制滤光片以便于改进信噪比。

[0140] 8、每个通道的荧光图像通过光学检测器（如 CMOS 照相机）来俘获。

[0141] 9、两个检测器均与扫描反射镜同步。

[0142] 10、每个检测器以专利申请的其它部分（“卷帘式快门”模式）描述的方式采集图像。

[0143] 11、针对每个子组重复相同的过程。

[0144] 12、在每个子组成像之前，必须实施系统的下列调节：

[0145] a、应当针对子组的中心波长调节射束成形光学部件。

[0146] b、应当针对子组的中心波长调节显微镜物镜焦点位置。

[0147] c、应当将适当的分色镜插入光程中。

[0148] d、应当将适当的发射滤光片安装进每个成像通道。

[0149] 显然，在没有偏离本发明范围和精神的情况下，可以进行如上文提出的对本发明的修改和变更。在这里，仅仅通过举例给出了所描述的特定实施例，并且本发明仅仅受限于所附权利要求的限制。

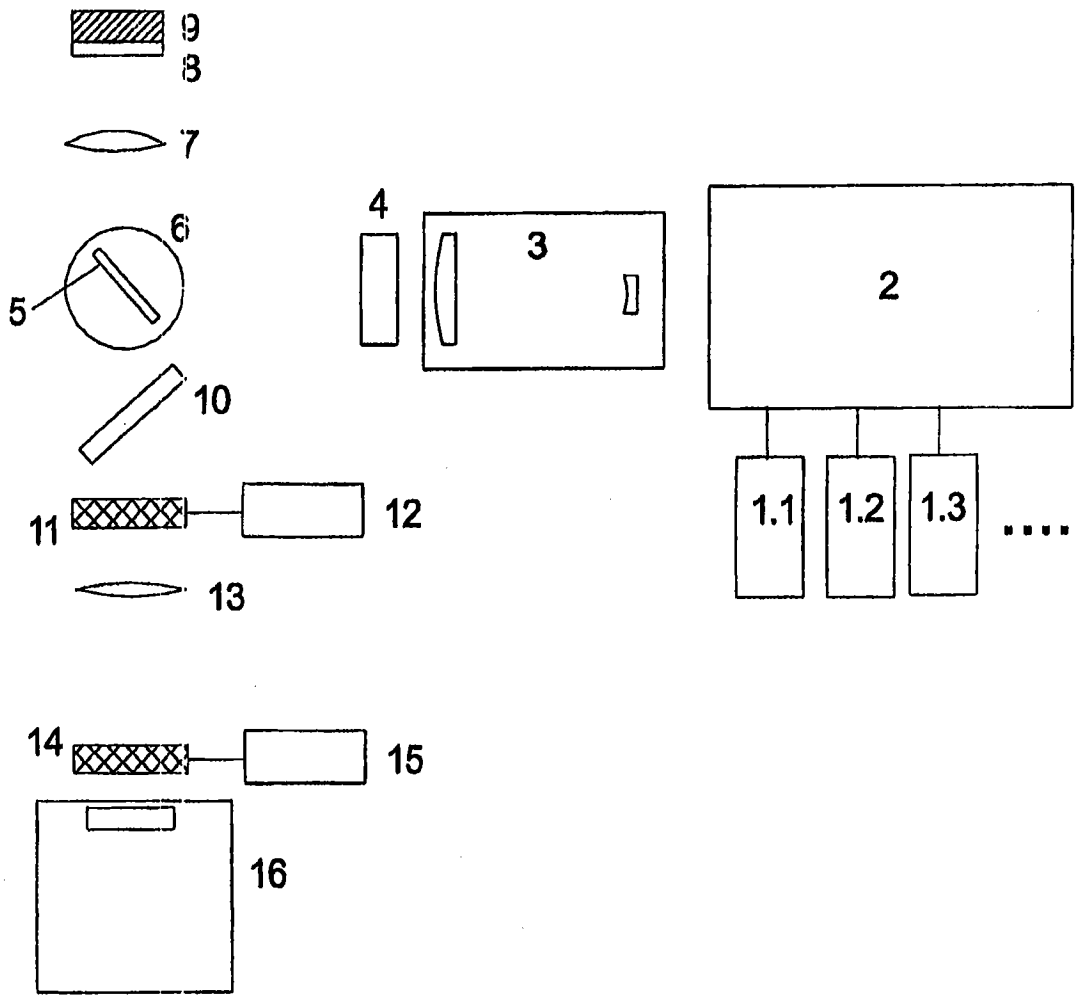


图 1

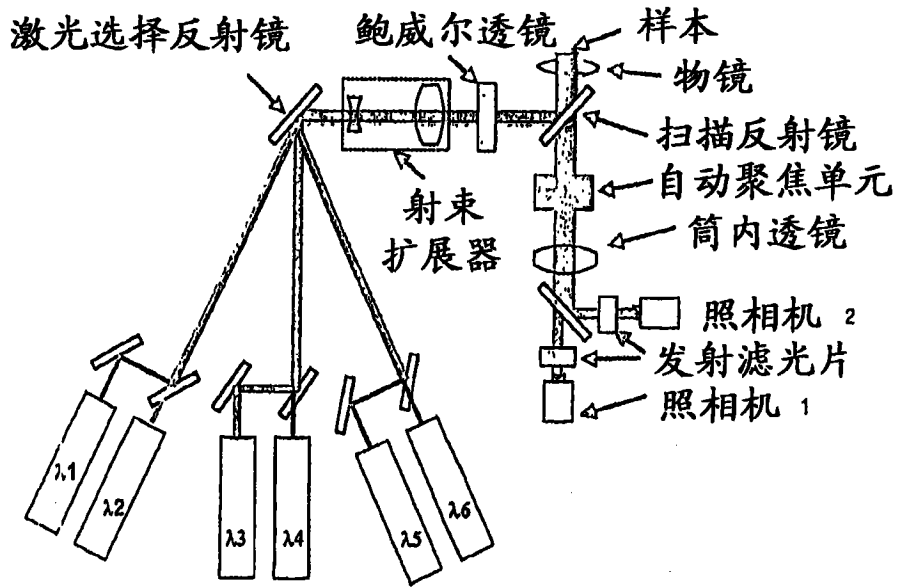


图 2