



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107209110 B

(45)授权公告日 2020.01.17

(21)申请号 201580051188.5

(22)申请日 2015.08.27

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107209110 A

(43)申请公布日 2017.09.26

(30)优先权数据
1450997-0 2014.08.28 SE

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2017.03.22

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2015/069656 2015.08.27

(87)PCT国际申请的公布数据
W02016/030464 EN 2016.03.03

(73)专利权人 辛格科技公司
地址 瑞典斯德哥尔摩

(72)发明人 本特·萨尔格伦 拉乌尔·斯图伯
约翰·斯特罗姆奎斯特

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理
有限公司 11262

代理人 李慧慧 郑霞

(51)Int.Cl.
G01N 21/25(2006.01)
G01N 21/64(2006.01)

(56)对比文件
US 6278518 B1,2001.08.21,第7栏39行-第
8栏18行;图1-2.
US 6278518 B1,2001.08.21,第7栏39行-第
8栏18行;图1-2.
US 2012053068 A1,2012.03.01,图3、第
[0002]、[0032]、[0113]、[0117]、[0227]段.

审查员 张咏

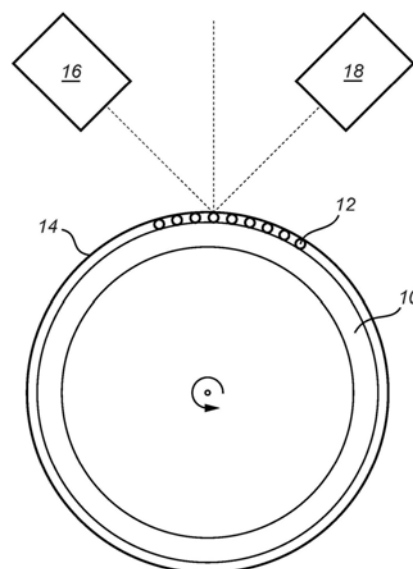
权利要求书2页 说明书8页 附图3页

(54)发明名称

高吞吐量生化筛查

(57)摘要

提供了方法和设备,其中,观察体积由其中来自照明装置(16)的光与检测装置(18)的视场重叠的体积限定。来自照明装置(16)的所述光的中心轴线和检测装置(18)的所述视场的中心轴线不平行,并且样本在成像期间优选地通过保持样本(12)的样本容器的旋转被传输穿过观察体积。



1. 一种用于对样本成像的设备,所述设备包括用于照射所述样本的照明装置、用于检测从所述样本发射或散射的光子的检测装置、样本容器保持装置以及用于保持所述样本的样本容器,其中,所述样本容器保持装置的外表面包括弯曲部分;其特征在于

光子在成像期间从其被发射或散射的、在所述样本容器中的观察体积是由来自所述照明装置的光和所述检测装置的视场重叠的空间中的体积限定的;以及

所述样本容器在成像期间被附接至所述样本容器保持装置的所述外表面的所述弯曲部分的至少部分,并且其中,所述样本容器保持装置被可旋转地布置,使得所述样本的至少部分在成像期间能够通过所述样本容器保持装置的旋转运动而被传输穿过所述观察体积。

2. 根据权利要求1所述的设备,其特征还在于,来自所述照明装置的所述光的中心轴线和所述检测装置的所述视场的中心轴线不平行。

3. 根据权利要求1所述的设备,其中,所述检测装置包括Geiger模式雪崩光电检测器。

4. 根据权利要求1所述的设备,还包括用于悬挂可旋转布置的样本容器的空气轴承。

5. 根据权利要求1所述的设备,还包括板状样本容器,所述板状样本容器能够弯曲至一半径以适配所述样本容器保持装置的外表面并附接到所述样本容器保持装置的外表面。

6. 根据权利要求1所述的设备,包括用于限定至少两个观察体积的至少两个照明和检测装置,其中,所述样本容器被可旋转地布置,使得所述样本的至少部分能够在单独的时间点处被传输穿过所述两个观察体积。

7. 根据权利要求1所述的设备,其中,所述样本容器包括配备有用于保持所述样本的凹槽、井或类似物的板状装置,以及以薄板或膜的形式覆盖所述凹槽、井或类似物以将所述样本包含在其中的盖子,所述盖子具有接近于水的折射率的折射率。

8. 根据权利要求7所述的设备,其被布置成使得在所述样本容器的旋转期间,由于将所述样本保持抵靠所述盖子的离心力,所述样本被固定在所述样本容器中。

9. 根据权利要求1-8中的任一项所述的设备,还包括耦合装置,所述耦合装置在第一侧与所述样本容器光接触,并在第二侧具有弯曲表面用于减少进入所述耦合装置或从所述耦合装置出来的光子的反射。

10. 根据权利要求9所述的设备,其中,所述照明装置和所述检测装置相对于所述耦合装置是静止的,并且其中,所述样本容器相对于所述耦合装置被可旋转地布置。

11. 根据权利要求10所述的设备,其中,所述耦合装置包括用于保持液体的腔体,并且其中,与所述样本容器光接触的所述第一侧具有开口,液体能够穿过所述开口从所述腔体泄漏以在所述耦合装置和所述样本容器之间提供润滑和/或改进的光接触。

12. 根据权利要求1-8和10-11中的任一项所述的设备,其中,所述检测装置包括耦合到公共检测器的不同长度的至少两个光纤,使得来自至少两个不同的体素的光子能够使用所述公共检测器被连续检测。

13. 根据权利要求1-8和10-11中的任一项所述的设备,其中,所述样本容器被可旋转地布置,使得每个样本在所述样本容器的旋转期间能够多次重复地被传输穿过所述观察体积。

14. 一种对样本成像的方法,其中,观察体积由其中来自照明装置的光和检测装置的视场重叠的体积限定,其特征在于,所述样本在成像期间通过保持所述样本的样本容器的旋转被传输穿过所述观察体积,所述方法还包括将所述样本保持在样本容器中,所述样本容

器被附接至样本容器保持装置的外表面的弯曲部分,其中,所述样本容器保持装置的外表面包括弯曲部分。

15. 根据权利要求14所述的方法,其特征还在于,来自所述照明装置的所述光的中心轴线和所述检测装置的所述视场的中心轴线不平行。

16. 根据权利要求14或15所述的方法,其中,检测是使用运行在Geiger模式中的雪崩光电检测器来实现的。

17. 根据权利要求14或15所述的方法,其中,所述样本容器由空气轴承悬挂。

18. 根据权利要求14或15所述的方法,还包括将所述样本保持在被弯曲至一半径以适应样本容器保持装置的外表面的板状样本容器中,以及将所述样本容器附接到所述样本容器保持装置。

19. 根据权利要求14所述的方法,其中,至少两个观察体积被限定,并且其中,所述样本被连续地传输穿过所述至少两个观察体积。

20. 根据权利要求14或15所述的方法,其中,所述样本通过旋转被传输穿过所述观察体积,从而所述样本在所述旋转期间被重复地成像。

21. 根据权利要求14或15所述的方法,其中,时间分辨成像通过比较来自所述样本穿过所述观察体积的至少两次通过的检测信号来执行。

22. 根据权利要求14或15所述的方法,其中,所述样本被使用荧光团标记,并且成像通过检测来自所述荧光团的荧光来执行。

23. 根据权利要求14或15所述的方法,其中,所述样本包含一个或多个活细胞。

高吞吐量生化筛查

技术领域

[0001] 本发明提供从主要有机物质但不排除无机物质以及从该物质中的化学、生物化学或生物反应、相互作用、途径或序列中检测、监测、成像和检索数据的方法和设备。特别地，本发明提供以高吞吐量和例如在活细胞中、在活组织中和在含有机物质的溶液中的每个样本的较低成本以在三维中的高空间分辨率来研究所述物质的方法和装备。特别针对的另一个应用是监测活细胞或溶液中DNA和RNA相关的活性的可能性。

[0002] 背景

[0003] 存在用于对生物样本成像的太多的方法和设备。主要地，这些是由Marvin Minsky在十九世纪五十年代后期获得专利的共聚焦显微镜的变型。共聚焦显微镜的普及性是由于其切片能力，其实现了比常规宽视场显微镜可以实现的三维上的相对高的分辨率和更好的对比度。通常，共聚焦显微镜与荧光光谱结合，其中特定的颗粒，例如，蛋白质，用荧光团标记，并因此可以从背景中辨别。

[0004] 在大多数共聚焦显微镜中，相同的光学器件（至少相同的物镜）用于照明/激发和用于观察/检测来自所研究的样本的光。这种配置的优点在于其模拟经典宽视场显微镜的设计，并因此可以使用或多或少的相同光学部件。另一个优点是照明和检测自动对准。另外的优点是通通过用垂直于样本表面的视场轴线照明和观察，N.A可以是大的，而不会遇到诸如全反射的问题。

[0005] 然而，常规共聚焦显微镜的这种几何结构引入限制可以被处理的应用的频谱的弱点和权衡。

[0006] 在共聚焦显微镜中，通过限制允许所发射的光到达检测器的体积（观察体积）来获得分辨率，即两个可区分的辐射点之间的距离。限制观察体积通过组合两种方法来实现：(i) 在与显微镜的照明（或等效的视场）轴线正交的维度中，观察体积的延伸由物镜的焦平面中的聚焦宽度确定；以及(ii) 在沿着物镜的照明轴线（视场轴线）的维度中，观察体积由放置在检测器前面的光学共轭平面中的针孔的宽度确定。该针孔做得足够小以阻挡从沿着照明轴线的方向距焦平面一定距离之外的点发出的所有光。这样，通过选择具有非常小的聚焦宽度和小且正确定位的针孔的物镜，可以获得所有三维的非常高的分辨率。使用针孔的另一个优点是它增强了对比度，因为从位于观察体积之外的样本的被照射部分发出的散射光或荧光不会到达检测器。

[0007] 尽管如此，在实践中，这意味着几种权衡：

[0008] 首先，聚焦宽度由物镜的数值孔径(N.A.)确定。因此，希望具有真正高的N.A.以获得高分辨率。然而，对于具有长工作距离（以能够穿透样本的整个深度）和在宽光谱内工作的高N.A.物镜，补偿出射光和检测光的色差（在荧光光谱中这可以是几百纳米）是非常昂贵的。

[0009] 其次，用于滤出从焦平面之外发出的光的针孔使得不可能在当时对在焦平面中的多于一个点进行成像。因此，为了获得图像，必须使样本和观察体积相对于彼此移动（扫描）。图像是逐点合成的，并且1024×1024帧可能花费超过一秒钟来获取。这使得并行化成

像并从而实现高吞吐量的可能性复杂化。

[0010] 如上所述,常规共聚焦显微镜中的观察体积通过将小聚焦宽度与针孔技术组合来确定。在三维空间中创建观察体积的另一种方法是使用所谓的共聚焦 θ 显微镜,参见 Stelzer, EHK 等人的“Fundamental reduction in the observation volume in far-field light microscopy by detection orthogonal to the illumination axis: confocal theta microscopy”, *Opt Commun.* 111, 536-547, (1994)。在该技术中,通过使用两个物镜来代替地确定观察体积,两个物镜被放置成使得它们的视场的轴线正交并且使得它们的焦平面相交。因此,观察体积由一个检测器在一个方向上的聚焦宽度和第二检测器在正交的第二方向上的聚焦宽度来限制。在这种情况下下的照明可以是任意的,只要它照亮感兴趣的观察体积即可。

[0011] 从观察体积的角度来看, θ 共聚焦显微镜消除了对针孔的需要。然而,从对比度的角度来看,需要针孔来抑制从到达任一检测器的观察体积之外发出的光。

[0012] 由于共聚焦显微镜基本上是逐点测量设备,通过相对于由显微镜的物镜和检测器前方的针孔限定的观察体积移动包含研究中的任何样本的样本体积并且测量每个点的强度值来形成样本的图像。该动作继续,直到已经获取整个二维(x-y)图像,过程可被重复以随时间生成一系列图像。可选地,观察体积也可沿着显微镜轴线步进以获取光学截面的三维(x、y和z)图像堆叠。利用这个值的向量,三维图像可被合成并通常在屏幕上以层析成像(tomographically)的方式被显示。

[0013] 在共聚焦显微镜的早先的版本中,样本被放置在高精度平移台上,该高精度平移台在三维中系统地移动样本,直到生成图像向量。为了产生高帧率,样本必须沿着其预编程路径高速移动,同时保持亚微米精度。由于样本保持器和台的质量的高的加速度,因此这是挑战性且昂贵的任务。跨越大面积保持聚焦也是困难的,并且已经为此目的实现了相比较而言复杂的自动聚焦系统。

[0014] Gratton 等人(专利号US 7973294)已经提出另一解决方案来将样本体积移动穿过观察体积。代替使x-y-z平移台围绕样本体积移动,样本被放置在旋转的容器中。因此,非常大的样本体积可以以最小所需的加速度通过共聚焦显微镜的观察体积。当处于稳态时,只有旋转台的摩擦力需要被克服,并且容器还可在其他方向上缓慢移动,以访问样本体积的所有部分。然而,这种设置不旨在成像,而是旨在光谱测量。

[0015] 获得高帧率的另一方法是激光扫描共聚焦显微镜。代替移动样品,激发光束被扩展并且被引导到一对振荡电流计扫描镜,所述振荡电流计扫描镜光栅扫描穿过样本体积的聚焦光束。来自样本的光通过相同的镜组被去扫描,并在到达检测器之前通过共轭(共焦)针孔。扫描速度被最快的镜子的机械规格限制,该最快的镜子通常以每图像点(有时称为像素或三维空间中的体素)约4至5微秒的速率扫描。因此,对于在单一秒内收集的512x512像素图像,扫描点在每个像素上停留大约4微秒。此外,由于以下事实:镜子将必须被快速地加速,保持在恒定速度同时扫描整个场,接着快速地减速并且行进的方向被反转,对于每个扫描线重复该循环,获得更高的速率是非常困难的,即使不是不可能的。

[0016] 尽管扫描速度的限制可通过采用谐振扫描方案来改进,但是这种高速采集遭受另一个问题:所谓的停留时间变得非常短。停留时间在此被定义为样本(样品)的相同部分在观察体积的被照射部分内“停留”的时间。尤其是如果涉及荧光成像,则快速扫描共聚焦显

微镜可能遭受不充足的信噪比。

[0017] 用于快速扫描样本的另一可选方案是(Nipkow)旋转盘方法。该共聚焦显微镜是基于圆形旋转的盘,该盘具有以螺旋图案布置的一个或多个针孔阵列,该螺旋图案被设计成在盘的一个旋转期间覆盖样本体积。由于除了旋转盘之外不需要加速,因此这个配置在稳定状态下在机械上是非常稳定的。这个方法的另一个优点是无论旋转盘的针孔,几个点(像素)可以被并行观看。通过使用超出每秒1000帧的这种技术,已经实现了结合高速和并行化非常高的帧率的能力。然而,旋转盘共聚焦显微镜不是没有它们的伪像。一个局限是从焦平面的外面散射或发射的光可通过行进穿过邻近的针孔到达检测器,所谓的针孔串扰。第二局限是穿过盘的针孔的光的低百分比(通常小于10%)。剩余的光被反射并且可以作为检测器中的背景噪声呈现。这两个副作用都限制信噪比。也许最大的缺点是这种仪器的复杂性,这使得基于这种方法的仪器的成本在许多应用中是过高的。

[0018] 因此,虽然现有技术已经采取了改进用于微成像的装置的步骤,但是在以商业上可行的成本达到高分辨率和高吞吐量中仍然存在相当大的困难。

[0019] 概述

[0020] 因此,本发明的重要目标是,利用三维中的高帧率和高空间分辨率,以允许基于本发明的方法和设备完成从资金充足的研究实验室到例如点护理应用中的更广泛的使用的转换的成本水平,实现主要对微生物相关物质的研究、测试等。

[0021] 根据本发明,上面的目标通过将样本体积如何通过观察体积被传输和所述观察体积如何被限定以及从观察体积发射或散射的光如何被检测的新颖的组合来满足。

[0022] 首先,在本发明的实施方式中,观察体积以类似于 θ 共聚焦显微镜的方式限定,但是具有非常重要的差异:观察体积由照明/出射光的聚焦宽度和检测装置的物镜的视场的聚焦宽度来确定。照明/出射光的焦平面和物镜的焦平面是相交的,并且照明/激发光的轴线和物镜的轴线被选择为优选地正交但是至少明显地不平行。这种配置消除了对针孔的需要,因为检测器仅接收来自检测装置的视场的被照射的区段的光。在检测器前方没有针孔的情况下,观察当时在由照明/激发装置照明的平面中的几个点是可能的。在优选的实施方式中,照明装置的光学器件被选择,使得照明是线聚焦的,从而形成具有法向量的照射平面,该法向量优选地平行于检测装置的视场的轴线。以这种方式,检测装置可被设计成使得其并行地观察照明平面中的许多个点(像素或三维空间中的体素)。这对应于常规共聚焦显微镜中的x-y帧。

[0023] 其次,调查研究中的样本或样品被放置在样本容器中,该样本容器附接到样本容器保持装置或与样本容器保持装置集成,样本容器保持装置接着耦合到旋转生成装置,使得样本旋转并使样本通过根据上面的段落定义的观察体积。这类似于由Gratton等人、Spaulding、Harufumi (US4940332A) 提出的旋转样本保持器,但是本发明的方法和设备在很多其它方面不同。除了将样本传递通过观察体积外,样本体积的旋转的另一个非常重要的功能是使样本受到足够的离心力,以将固定在机械平衡中的样本保持紧靠样本保持器中的内表面。

[0024] 第三,物镜的视场的轴线和样本体积的运动向量(由于旋转)被选择为非垂直的,优选地,它们具有45度角。如果检测装置包括用于观看被照射的体素的平面的装置,如上面所提到的,样本体积的运动将使样本移动通过体素的平面并且根据时间将样本进行分段以

使能够产生图像堆叠。这对应于早先描述的常规显微镜中的z方向上的步进。

[0025] 因此,本发明提供根据权利要求1所述的设备以及根据权利要求10所述的方法。本发明优选的实施方式被概括在从属权利要求中。

[0026] 附图简述

[0027] 在下面跟随的详细描述中,将对附图进行参考,其中

[0028] 图1示意性地示出根据本发明的实施方式的装置的一般设置;

[0029] 图2示意性地示出用于探测样本的发明性布置的放大视图;以及

[0030] 图3示意性地图示根据本发明的照明和检测如何协作地限定观察体积。

[0031] 详细描述

[0032] 如上面所概括的,通过旋转的方式使得样本通过观察体积。这个布置用于实现根据本发明的实施方式的几个便利的特性。一旦样本容器达到期望的转速并且该速率保持恒定,那么作用于样本的仅有的力是离心力和由样本容器的内壁作用于样本的法向力。样本还可通过化学结合或粘附保持到样本容器,使得不需要盖子。因此,样本在受控位置中被保持在机械平衡的状态中。此外,旋转作为运动的方式在精度方面是有利的,并且有助于达到本发明的全部潜力。通过使用现有技术的空气轴承技术并通过仔细平衡样本保持和样本容纳装置,可以实现样本的足够受控的轨迹。在稳态下,即在恒定转速处,在通过观察体积时样本容器保持装置的位置可以被很好地控制在单个体素的尺寸内,即,大约为所检测的光的波长的一半。

[0033] 图1示意性地示出根据本发明的设置,其中,样本被设置在可旋转的样本容器保持器上的样本容器中。在图1中,保持器10被示出为空心圆柱体,样本12存在于该空心圆柱体上。圆柱形盖子14被放置在保持器上方以限定样本容器,而由于离心力确保样本在与盖子14相对的位置保持稳定,所以样本在旋转期间被保持在适当位置。在图中,样本被示出为小的圆圈12,并且为了不使该图过于复杂,仅示出了一些样本;然而,应理解,样本容器保持器的整个外围一般将或可能被样本占据。为了探测样本,提供了照明装置16和检测装置18。照明装置16优选地可以是一个或多个激光器,诸如二极管激光器。检测装置18优选地可以是单光子计数检测器。

[0034] 在本发明的优选的实施方式中,样本容器保持装置的旋转通过以下装置实现:旋转生成装置,通常是电气无刷直流电动机,将其转子轴的角动量优选地通过感应力传输到样本容器保持装置,使所述样本容器保持装置以相同的速率旋转。样本容器保持装置,优选地由诸如铝或钢的金属或可能由塑料材料制成,理想地是空心或实心圆柱体,即管或杆。为了使能平滑且精确的旋转,优选的是,所述样本容器保持装置被设计和制造为使得它围绕轴线沿着其长度是对称的,并且使得质量在从轴线开始的所有径向方向上被均匀分布。还为了保证围绕其轴线的平滑且可重复的旋转,旋转的样本容器保持装置通过轴承优选地为空气轴承或电动力轴承被保持在适当位置,以实现无接触悬架,所述轴承被组装在所述旋转的样本容器保持装置和内部或外部的固定零件之间。样本容器保持装置的一部分延伸到零件的外部,使得对于样本容器的手动或自动附件同样是可接入的。

[0035] 样本容器可以以多种方式设计。然而,为了有利于本发明的目的,样本容器在理想情况下应该容易地与样本容器保持装置附接、以不显著地偏移组合的样本容器保持装置和样本容器的重心的方式成型、是光学透明的、在化学上是惰性的、提供对样本或样品的保护

以及与工业的测定的标准程序兼容。

[0036] 在下文中,一般将参考图2。在本发明的一个实施方式中,样本容器包括具有非常高的平坦度的玻璃、聚合物或二氧化硅的板状装置24。所述板状装置的厚度被选择为使得在没有冒着断裂的危险的情况下它可以弯曲到与样本容器保持装置的至少一部分的外表面相同的半径。板状装置24的一侧可以配备有能够装配样本或样品25的井、凹槽、脊或类似物的图案。在所述板状装置24上,优选惰性聚合物的光学透明薄板或膜22作为盖子附接在板状装置的图案化侧上,以封闭和保护已经放在同一侧上的样本或样品25。盖子的另一个功能是用作最外层,当样本由于旋转的离心力被向外推动时在样本上提供法向力。聚合物盖的第三功能是使样本或样品与样本保持装置之间的反射最小化。在优选实施方式中,盖子由折射率接近水的折射率($n \approx 1.33$)的材料制成,例如,Cytop。

[0037] 本发明的目的是获得高空间分辨率,以便能够研究非常细微的细节。在上面概括的实施方式中,两个因素决定了空间分辨率。在物镜的焦平面的维度中,该透镜的分辨能力决定了理论分辨率。分辨能力又根据 $R.P. = \lambda/2N.A$ 由数值孔径和光波长确定。只要检测装置能够区分这两个点,这也将是实际的分辨能力。在由照明限定的维度中,如果源是诸如单模激光器或单模光纤的点源,则相同的公式成立。因此,体素的最小体积大致由分辨能力的三次方确定。

[0038] 从上面明显的是,需要照明装置26和检测装置28两者的大数值孔径以获得高分辨率成像。大N.A的另一个优点是它增加了检测装置28捕获从调查研究中的样本25散射或发射的光的能力。考虑到可能需要被检测的低水平的光,特别是在荧光光谱学应用中,这是至关重要的。然而,高N.A引入了挑战,因为这必需的是从照明装置26进入样本体积25的光和从样本体积25散射或发射的光需要能够以相对于旋转的样本保持器的表面的法向量的大角度处这样做。这意味着,除非耦合以某种方式减轻,否则光将由于反射而损失。

[0039] 在本发明的一个实施方式中,装置因此被引入以便于以大角度将到达样本容器和来自样本容器的光耦合。这通过放置与旋转的样本容器保持装置光学接触的至少一个耦合装置来完成。耦合装置通常不与样本容器保持装置一起旋转,而是优选地固定到检测装置和/或照明装置。通过光学接触,在这方面意味着,耦合装置的表面或者足够接近样本容器的表面,以允许光在耦合装置和样本容器之间的短暂耦合,或其折射率至少与样本的折射率一样高(即,大约水的折射率)的足够量的液体被维持在样本容器和耦合装置之间并与样本容器和耦合装置接触。在耦合装置的相对侧上,表面被设计为大体凸起或者作为棱镜,使得光以尽可能靠近表面的法向量的方式通过该表面。在优选实施方式中,该耦合装置包括半球形耦合棱镜23。球形允许光在任何方向上进入棱镜,并因此检测装置28和照明装置26可以随意放置。棱镜23的内部充满流体,优选是微咸水。半球的平面23a在样本容器保持装置旋转通过耦合装置的同时相对于样本容器保持装置滑动。在棱镜23的底部,孔23b允许流体从半球内部受控地泄漏。来自半球内部的流体将用作润滑剂以减少耦合装置和样本容器保持装置之间的摩擦,同时实现光学接触。孔被制成足够大以便来自照明装置的光进入,并且便于由检测装置看到的光通过液体部分。

[0040] 现在将参考图3。本发明的另一个目的是降低装置的总成本,并且在这方面有利的是选择二极管激光器32作为照明装置中的源。在本发明的优选实施方式中,照明装置包括具有相关联的驱动器和脉冲发生器的大功率二极管激光器,以及被设计为生成线聚焦的聚

焦装置34。线聚焦用于照射优选地垂直于检测装置37的视场的轴线的平面并与相同检测装置的焦平面相交的平面。当这些条件满足时,检测装置37的焦平面与照明平面重合以限定观察平面35。这意味着最大数量的体素(在图中示为观察平面35的“盒”)在最佳条件下被照射和观察。为了简化的目的,将该平面定义为观察平面。线聚焦优选地使用圆柱形透镜或光纤34来实现。为了不使图过于复杂,并从而有降低其可理解性的风险,仅包括用于检测装置/观察平面中的一个的虚线轨迹线以及仅部分地用于照明装置。

[0041] 如上所述,从成本的角度来看,二极管激光器是优选的。然而,二极管激光器从空间相干性的观点来看不是理想的。特别是具有高输出功率的那些二极管激光器通常是空间多模的,并且这将影响由照明限定的维度中的可能的分辨率。在本发明的另一个实施方式中,第二检测装置37a被引入,其具有优选地垂直但至少显著不平行于第一检测装置的轴线的视场轴线。此外,第二照明装置32a被引入,优选地使用圆柱形透镜或光纤34a而具有线聚焦。所述第二照明/出射光的焦平面和物镜的焦平面是相交的,且所述第二照明/激发光的轴线和所述第二检测装置的轴线被优选地选择为正交但是至少明显地不平行。这实现了一种配置,其中,由于样本的运动(由图3中的向左箭头示意性地示出),样本39中的相同体积将首先通过由第一检测装置37和第一照明装置32、34限定的观察平面35,并然后在稍后的时间点通过由第二检测装置37a和第二照明装置32a、34a限定的观察平面35a。通过使由所述两个观察平面35和35a生成的图像相关,由于激光源的多模行为而在一个维度上的位置的不确定性可以通过在该相同维度上的另一个观察平面的更好的位置精度来补偿。因此,该实施方式使得能够使用低成本激光器,同时仍然获得接近衍射极限分辨能力。该实施方式的另一个优点是,它增加了照明平面的有效面积,因为放宽对窄聚焦宽度的要求能够实现更大的聚焦深度,从而实现更大的有用照射面积。

[0042] 在许多应用中,高吞吐量或帧率是非常合乎需要的,例如,在筛查应用中或当研究生物化学反应的动力学时。本发明为此至少以两种方式作出贡献。如上所述,由于本发明消除对针孔的需求,因此可以并行化对如上所限定的照明平面中的几个点的检测,即同时观看照明平面中的几个点(检测来自照明平面中的几个点的信号)。以每秒体素测量的所得到的吞吐量将是可并行观察的体素的数量测量的并行化程度乘以每秒通过照明平面的体素的数量。因此,吞吐量可以通过增加旋转速度或通过增加并行化来增加。

[0043] 本发明的一个目标应用是能够研究活细胞的生物化学。由于活细胞是极其复杂的系统,因此识别特定事件(例如特异性蛋白质-蛋白质相互作用)是非常具有挑战性的任务。为了使这样的事件可见,感兴趣的蛋白质用荧光团标记,当由另一波长的光激发时,荧光团发射特定波长的光。通过使用仅允许特定波长或多个特定波长到达检测器的滤波器,由显微镜产生的图像由荧光而不是原始激发光组成。因此,只有标记的蛋白质出现在图像中。

[0044] 理想地,荧光团应能够被激发并发出无限次的荧光。不幸的是,荧光团的激发不总是在发射期望的荧光时结束。有可能,被激发的分子反而以黑暗状态(例如所谓的三重态)结束,这使得分子不能返回到基态或者根本上减慢分子向基态的返回(所谓的光漂白)。到三重态的转变也使得分子对其环境有毒。为了避免光漂白和毒性,因此高度优选将荧光团的激发保持在最小。同时,实际应用中的荧光量通常非常低。这对检测装置的光学器件、检测器和信号处理提出了非常高的要求。在这方面的一个重要参数是所谓的停留时间。停留时间被限定为样本(样品)的相同部分在被照射的体素内“停留”的时间。为了得到高信噪比,期

望仪器的停留时间超过荧光团的寿命至少一个数量级。这样,在检测装置的积分时间期间,荧光团可被激发并发出多次荧光。

[0045] 本发明使得在最小化光漂白、具有足够大的停留时间以确保足够的信噪比和保持高吞吐量之间取得平衡是可能的。由于观察体积部分地由照明限定,因此荧光团仅在观察时被激发。这使光漂白最小化。通过调节旋转速度,停留时间可被调节以获得良好的信噪比。另外通过增加并行化(由检测装置并行观察的点的数量),高吞吐量可以维持在适度的转速下。

[0046] 在简化的描述中,在本发明的实施方式中使用的检测装置包括成像装置、可选的图像传输装置、可选的波长滤波装置、检测器(这里是检测光信号并将它们转换成电信号的装置的简称)、可选的放大装置以及最后是处理、呈现和存储与捕获的图像相对应的信号的装置。成像装置(反射或折射)在图像平面中产生焦平面的强度分布的图像。沿着通过成像装置的路径,可以引入滤波器以去除不需要的波长。可选的图像传输装置的一端(其可以是一束光纤)放置在图像平面中,并将所述平面的强度分布传送到放置检测器的图像传输装置的另一端。在将强度分布转换为电表示之后,如果必要,这些信号在被处理、显示或存储之前被放大。

[0047] 在检测装置的一个实现中,成像装置包括具有高数值孔径的物镜和在图像平面中创建观察平面的强度分布的镜像的第二透镜。作为图像传输装置,光纤束被优选地使用。光纤束的前端被放置在图像平面中并且被布置成使得观察平面中的每个体素被成像在光纤束中的单个光纤上。优选地,使用与其包层相比具有高N.A和大纤芯的光纤,以便使体素之间的串扰最小化并使损失最小化。然后束中的光纤被分离,并且每个光纤被连接到检测器。在优选实施方式中,这些检测器是以所谓的Geiger模式运行的雪崩光电检测器(APD),即以高于APD的击穿电压的反向电压操作的APD。这种类型的检测器的优点是它具有非常高的内部增益,并因此适合于涉及稀疏光子的应用。

[0048] 在另一个实施方式中,光纤束的后端在检测器阵列上成像。这降低了每体素的成本,但是具有以Geiger模式操作的APD的检测器阵列由于暗计数和后脉冲还不是成熟的技术。

[0049] 在又一个实施方式中,光纤束中的光纤全部具有不同的长度。然后几个光纤可以连接到同一单个检测器,同样优选地处于Geiger模式。来自两个不同的体素的同时发射的光因此在不同时间到达检测器。两个光纤之间的最小允许长度差由检测器的带宽和后续信号处理确定。最小长度差优选地被选择为使得检测器和相关联的信号处理仅能够在对应于最小长度差的两个体素之间进行区分。在该实施方式中,来自照明装置的激发光包括以超过任何两个光纤之间的最长延迟差的时间延迟发射的短脉冲。该实施方式的优点是检测器的数量可以被减少而不降低并行化程度,并从而不减少每秒的体素的数量。这又降低了该方法和设备的成本。

[0050] 如前所述,在优选实施方式中,检测器是以Geiger模式操作的APD。这是一个非常有意识的选择,并且当荧光标记物用于完成特异性(灵敏度)时尤其有用。在这种应用中,来自体素内的荧光团的光子被检测到的复合可能性相当小。增加这种可能性的方法是增加停留时间,即荧光团停留在照射的体素内的时间。这样,荧光团可以被激发并且以增加的次数发出荧光,并且因此检测到光子的可能性增加。然而,还如以上所讨论的,增加停留时间降

低了吞吐量,并且尽管这可以通过增加并行化程度来补偿,但是这种方法存在限制。增加停留时间还意味着增加检测装置的积分时间,这意味着我们增加包括放大器级的检测器的暗计数。事实上,噪声电平随积分时间线性增加。在Geiger模式中的APD具有非常大的内部放大(通常大于10到6的幂),并且这意味着即使单个光子也能产生强信号。在优选实施方式中,停留时间被选择为约100ns。在这个时间期间一个光子被发射的可能性约为一。由于当光子将到达时在小于100ns内是已知的,所以积分时间仅需要为该量级。因此,积分噪声将相对较低。在具有1kHz的帧率的旋转盘中,积分时间需要长10000倍,具有低得多的放大、针孔串扰等。因此,在针对高吞吐量和/或低光级优化的应用中,使用以在Geiger模式下运行的检测器的形式的用于检测的装置的方法是非常有用的。

[0051] 本发明的另一目的是在使用该方法或装置时保持工作流程简单。样本的成像通常仅是测定中的许多步骤中的一个步骤。在大多数测定中,在成像之前,样本已经通过了多种制备程序,例如扩增、沉淀、洗涤等。在工业应用中,这种测定是使用板、盘、微阵列或一些其它类型的样本容纳装置,以有效地限制和运输通过该过程的部分的样本的自动化程序。所述样本容器通常包括大量系统排列的井,以能够以多种组合测试许多目标(分析物)和试剂。在许多实验室中,存在满足测定的自动化的设备的大的安装基础,并因此如果在本发明的实施方式中使用的样本容器遵守这些标准程序,则是有利的。为此,在本发明的一个实施方式中,样本被放置在平面或板状装置上,所述装置由材料或材料的组合构成,并且具有适当的尺寸以足够柔性来附接在旋转生成装置上,使得其遵循样本容器保持装置的曲率或形状。以这种方式,样本容器可以在处于平面形式时与标准制备程序兼容,并且然后采取样本容器保持装置的形状以符合本发明的意图。

[0052] 本发明的另一个显著优点是其从观察体积中的体素或体素集获取强度的快照,即现场记录。与当前现有技术不同,当样本在观察体积中时,不需要记录强度的时间分布。这意味着样本通过观察体积的速度可以达到比迄今为止可能的量级高的数量级。通常,转速将约为每秒100转,并且样本通过观察体积的速度约为每秒几米至几十米。通过以高速(通常为10m/s)移动样本体积通过观察体积,与当前现有技术例如常规共聚焦显微镜相比较,本发明的实施方式因此能够筛选大的样本体积。

[0053] 本发明的实施方式的另外的优点是不需要模式识别算法来接收或分析检测到的信号。由于每个体素的位置被称为时间的函数,并且来自每个体素的光的强度被瞬时检测,所产生的数据表示已经通过观察体积的整个体积的高分辨率三维图。

[0054] 在相同体积可以被观察到的旋转的高精度在转弯之后转动实现了对细胞中或溶液中的颗粒的运动(至少统计上)的连续观察。由于向心力或由于施加的电场,运动可能是预期的随机行走。关于样本或样品的非常重要的信息可以从运动数据特别是从运动的缺乏中推断出。

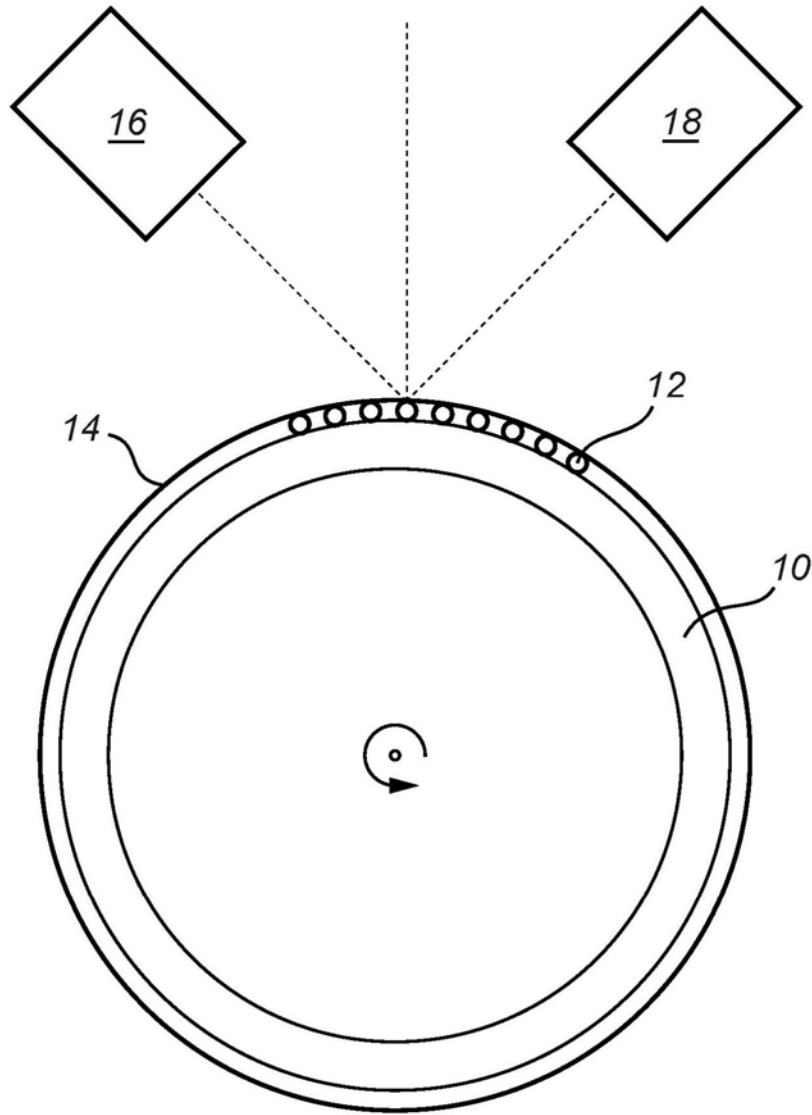


图1

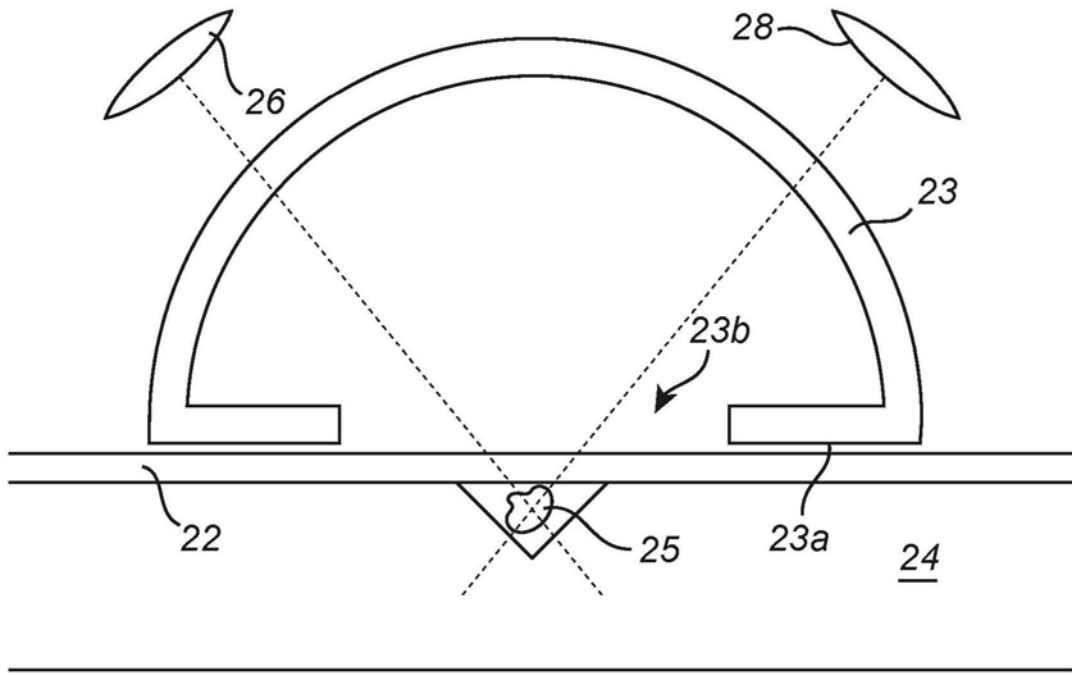


图2

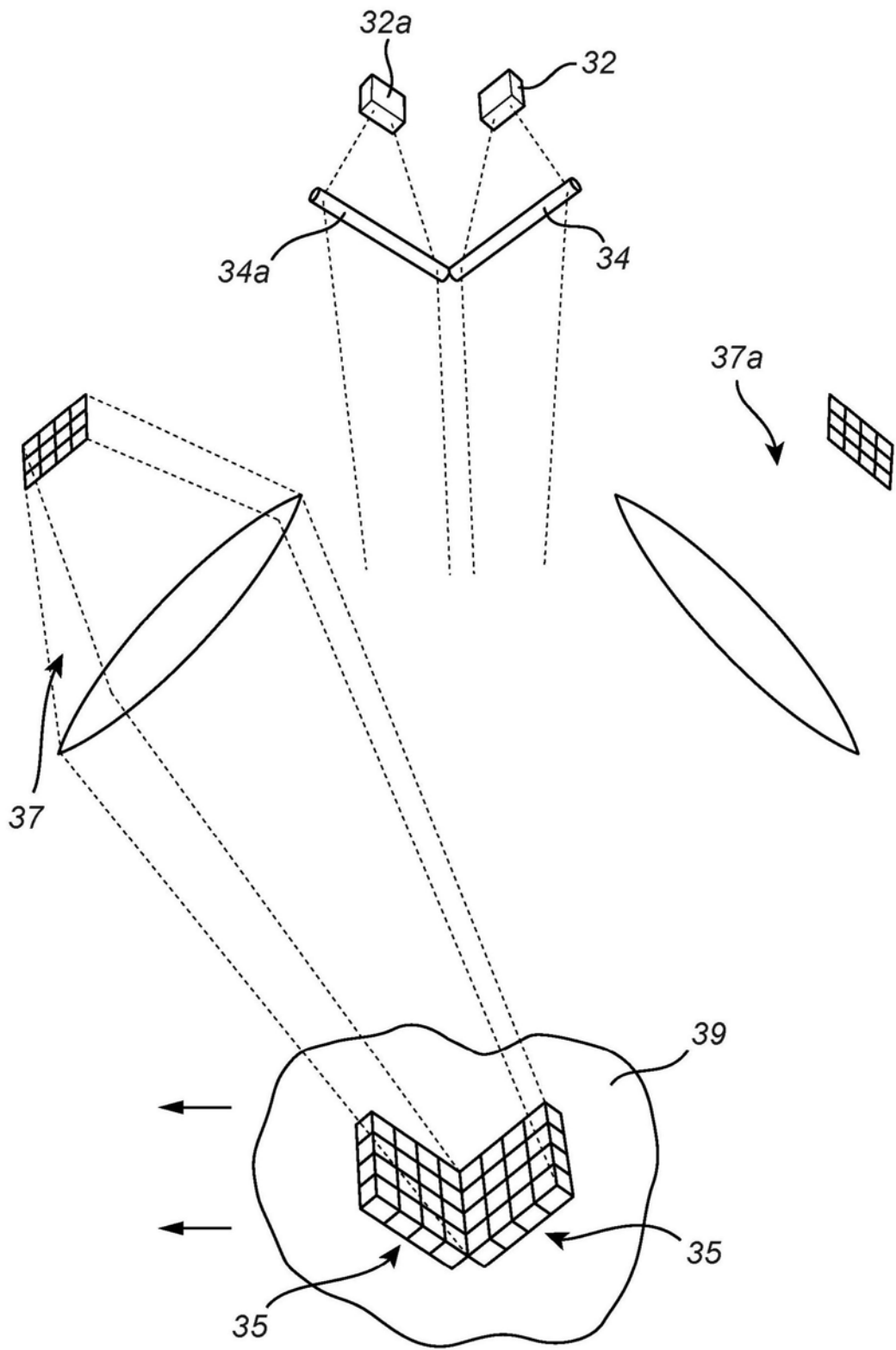


图3