



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115202025 A

(43) 申请公布日 2022.10.18

(21) 申请号 202210382469.0

(22) 申请日 2022.04.13

(30) 优先权数据

2105232.9 2021.04.13 GB

(71) 申请人 安多尔科技有限公司

地址 英国北爱尔兰

(72) 发明人 J·奥雷奥普洛斯 P·辛克莱

(74) 专利代理机构 深圳市百瑞专利商标事务所
(普通合伙) 44240

专利代理人 金辉

(51) Int.CI.

G02B 21/06 (2006.01)

G02B 21/00 (2006.01)

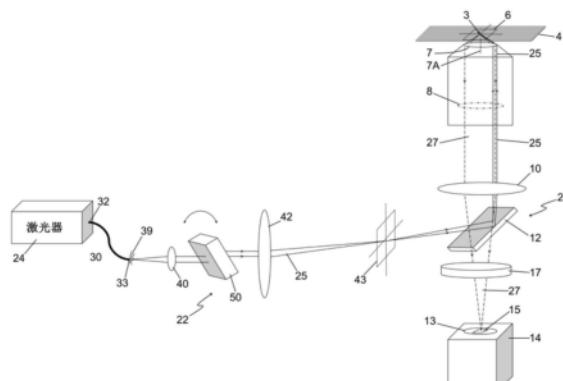
权利要求书2页 说明书9页 附图2页

(54) 发明名称

具有倾斜照明的显微镜系统

(57) 摘要

一种显微镜系统具有照明光学系统，该照明光学系统包括多模光纤，该多模光纤具有用于发射激光束的出口。出口位于与显微镜样品平面共轭的平面上。照明光学系统配置成使得激光束横向偏离于物镜的主光轴入射到物镜，以便物镜以与主光轴倾斜的角度将激光束传送到样品平面。在倾斜照明显微镜，如TIRF显微镜中利用多模光纤进行激光传输，解决了与使用单模光纤相关的问题，如照明的对准和均匀性。



1. 一种用于对位于样品平面中的样品成像的显微镜系统，所述系统包括：
显微镜物镜；
照明光学系统，其配置为用通过物镜的光束照亮样品平面，照明光学系统包括多模光纤，所述多模光纤具有用于发射所述光束的出口，
其中，照明光学系统配置为使得所述出口位于与样品平面共轭的光束出口平面中，
并且其中，照明光学系统配置为使得所述光束横向偏离于物镜的主光轴入射到物镜，以便所述物镜以与所述主光轴倾斜的角度将所述光束传送到所述样品平面。
2. 根据权利要求1所述的显微镜系统，其中所述照明光学系统配置为使得所述光束入射到所述物镜的外围。
3. 根据权利要求1或2所述的显微镜系统，其中所述照明光学系统配置为将所述光束出口平面成像到等效样品平面，所述等效样品平面位于所述光束出口平面和所述样品平面之间并与其共轭。
4. 根据权利要求3所述的显微镜系统，其中所述照明光学系统包括配置为将所述光束出口平面成像到所述等效样品平面的至少一个透镜。
5. 根据前述权利要求中任一项所述的显微镜系统，其中照明光学系统包括至少一个准直透镜，所述准直透镜的前焦平面与所述光束出口平面和后焦平面重合，并且其中所述照明光学系统配置为将所述至少一个准直透镜的后焦平面中继到所述物镜的后焦平面。
6. 根据从属于权利要求4的权利要求5所述的显微镜系统，其中所述至少一个透镜包括所述至少一个准直透镜和至少一个成像透镜，其中所述至少一个成像透镜配置为在所述等效样品平面上形成光束出口的图像。
7. 根据权利要求3、4或6中任一项权利要求所述的显微镜系统，其中所述照明光学系统包括位于所述等效样品平面和所述物镜之间的至少一个透镜，其配置为将来自所述等效样品平面的光准直到所述物镜的后焦平面。
8. 根据权利要求7所述的显微镜系统，其中所述至少一个透镜包括显微镜管透镜。
9. 根据前述权利要求中任一项所述的显微镜系统，其中所述照明光学系统包括定位装置，其用于定位所述光束，以使所述光束横向偏离于物镜的主光轴入射到物镜。
10. 根据权利要求9所述的显微镜系统，其中所述定位装置包括一个或多个光学组件，其配置为相对于显微镜系统的主光轴移动所述光束，可选地倾斜所述光束和/或相对于所述主轴横向移动所述光束。
11. 根据权利要求5所述的和其他从属于权利要求5的权利要求所述的显微镜系统，其中所述至少一个准直透镜定位成确保其光轴横向偏离于显微镜系统的主光轴。
12. 根据前述权利要求中任一项所述的显微镜系统，其中所述多模光纤耦合到用于产生所述光束的光源。
13. 根据权利要求12所述的显微镜系统，其中所述光源为激光光源，所述光束为激光束，优选为均化激光束。
14. 根据前述权利要求中任一项所述的显微镜系统，其中照明光学系统配置为使得所述角度在样品界面处引起全内反射。
15. 根据前述权利要求中任一项所述的显微镜系统，其中所述照明光学系统配置为将所述光束出口聚焦到所述样品平面上。

16. 根据前述权利要求中任一项所述的显微镜系统，其中所述照明光学系统包括至少一个准直透镜，其布置成用于准直来自所述光束出口的光，以及至少一个透镜，其布置成用于将所述至少一个准直透镜准直的光中继到物镜的后焦平面。

17. 根据权利要求16所述的显微镜系统，其中所述至少一个中继透镜配置为将光从所述至少一个准直透镜的后焦平面中继到物镜的后焦平面。

18. 根据前述权利要求中任一项所述的显微镜系统，其中所述照明光学系统配置为将所述光束出口成像到所述样品平面。

19. 根据前述权利要求中任一项所述的显微镜系统，其中所述多模光纤具有方形或矩形横截面形状。

20. 根据前述权利要求中任一项所述的显微镜系统，其中所述照明光学系统包括使所述光束均匀化的装置。

21. 一种用于显微镜系统的照明光学系统，所述显微镜系统用于对位于样品平面中的样品进行成像，所述照明光学系统配置为用通过显微镜系统的物镜的光束照亮样品平面，所述照明光学系统包括多模光纤，所述多模光纤具有用于发射所述光束的出口，其中，照明光学系统配置为使得所述出口位于与样品平面共轭的光束出口平面中，并且其中，照明光学系统配置为使得所述光束横向偏离于物镜的主光轴入射到物镜，以便所述物镜以与所述主光轴倾斜的角度将所述光束传送到所述样品平面。

22. 一种通过物镜照亮显微镜系统的样品平面的方法，所述方法包括：将多模光纤的光束出口定位在与样品平面共轭的光束出口平面中；使用来自多模光纤的光束照亮所述样品平面；以及使所述光束在入射到所述物镜上时横向偏离于所述物镜的主光轴。

23. 根据权利要求22所述的方法，还包括将所述光束出口聚焦和/或成像到所述样品平面上。

24. 根据权利要求22或23所述的方法，还包括对来自所述光束出口的光进行准直，并将准直的光中继到物镜的后焦平面，其中，优选地，所述中继包括将光从至少一个准直透镜的后焦平面中继到物镜的后焦平面。

具有倾斜照明的显微镜系统

技术领域

[0001] 本发明涉及倾斜照明显微镜,尤其是但不限于全内反射(TIR)显微镜。

背景技术

[0002] 在光学显微镜中,倾斜照明涉及从相对于显微镜光轴倾斜的角度照亮样品。与使用平行于光轴的亮场照明相比,倾斜照明可以使样品以更高的对比度进行观察,这可以提高样品的可见度。例如,倾斜照明特别适合用于透明或无色样品。

[0003] TIR显微镜,其包括全内反射荧光(TIRF)显微镜,被广泛认为是最好的表面检查成像方法之一,通常用于观察细胞膜界面的生物相互作用。大多数商用TIRF显微镜利用单模光纤以倾斜角度通过高数值孔径物镜传输激光。然而,单模光纤很难对准,并且受到波长和功率限制。此外,当用作TIRF照明光源时,单模光纤呈现非均匀(高斯(Gaussian))照明轮廓,并且从光纤发出的光的相干性质容易产生干涉条纹,从而扭曲和降低TIRF图像的质量。许多TIR显微镜应用,例如定量TIRF成像和相关的超分辨率成像应用,将受益于消除或缓解单模光纤激光传输相关的缺点。

发明内容

[0004] 从第一方面来看,本发明提供了一种用于对位于样品平面中的样品进行成像的显微镜系统,该系统包括:

[0005] 显微镜物镜;

[0006] 照明光学系统,其配置为用光束通过物镜照亮样品平面,照明光学系统包括多模光纤,该多模光纤具有用于发射所述光束的出口,

[0007] 其中,照明光学系统的配置使得所述出口位于与样品平面共轭的光束出口平面中,

[0008] 并且其中,照明光学系统的配置使得所述光束横向偏离于物镜的主光轴入射到物镜,以便所述物镜以与所述主光轴倾斜的角度将所述光束传送到所述样品平面。

[0009] 优选地,照明光学系统配置成使得所述光束入射到所述物镜的外围。

[0010] 优选地,照明光学系统配置成将光束出口平面成像到在所述光束出口平面和所述样品平面中间并与其共轭的等效样品平面。优选照明光学系统包括至少一个透镜,其配置成将所述光束出口平面成像到所述等效样品平面。

[0011] 在优选实施例中,照明光学系统包括至少一个准直透镜,该准直透镜的前焦平面与所述光束出口平面和后焦平面重合,其中所述照明光学系统配置为将所述至少一个准直透镜的后焦平面中继到所述物镜的后焦平面。优选地,所述至少一个透镜包括所述至少一个准直透镜和至少一个成像透镜,其中所述至少一个成像透镜配置成在所述等效样品平面上形成光束出口的图像。

[0012] 优选地,照明光学系统包括至少一个透镜,位于所述等效样品平面和所述物镜之间,并配置为将来自所述等效样品平面的光准直到物镜的后焦平面。可选地,所述至少一个

透镜包括显微镜管透镜。

[0013] 在优选实施例中,照明光学系统包括用于定位所述光束的定位装置,使得所述光束横向偏离于物镜的主光轴入射到所述物镜处。定位装置可包括一个或多个光学组件,其配置为相对于显微镜系统的主光轴移动所述光束,可选地倾斜所述光束和/或相对于所述主轴横向移动所述光束。所述至少一个准直透镜任选地定位,使得其光轴从显微镜系统的主光轴横向位移。

[0014] 在优选实施例中,所述多模光纤耦合到用于产生所述光束的光源。光源通常为激光光源,且所述光束为激光束,优选为均化激光束。

[0015] 在一些实施例中,照明光学系统配置成使得所述角度在样品界面处引起全内反射。

[0016] 有利地,所述照明光学系统配置成将所述光束出口聚焦到所述样品平面上。

[0017] 在优选实施例中,所述照明光学系统包括至少一个准直透镜,其布置成准直来自所述光束出口的光,以及至少一个透镜,其布置成将所述至少一个准直透镜准直的光中继到物镜的后焦面。所述至少一个中继透镜优选地配置为将来自所述至少一个准直透镜的后焦平面的光中继到物镜的后焦平面。

[0018] 有利地,所述照明光学系统配置成将所述光束出口成像到所述样品平面。

[0019] 优选地,所述多模光纤具有方形或矩形横截面形状。

[0020] 通常,所述照明光学系统包括使所述光束均匀化的装置。

[0021] 从第二方面来看,本发明提供了一种用于显微镜系统的照明光学系统,该显微镜系统用于成像位于样品平面中的样品,该照明光学系统配置为通过显微镜系统的物镜用光束照亮样品平面,照明光学系统包括多模光纤,该多模光纤具有用于发射所述光束的出口,其中照明光学系统的配置使得所述出口位于与样品平面共轭的光束出口平面中,其中,照明光学系统的配置使得所述光束横向偏离于物镜的主光轴入射到物镜处,以便所述物镜以与所述主光轴倾斜的角度将所述光束传送到所述样品平面。

[0022] 从第三方面来看,本发明提供了一种通过物镜照明显微镜系统的样品平面的方法,该方法包括:将多模光纤的光束出口定位在与样品平面共轭的光束出口平面中;使用来自多模光纤的光束照亮所述样品平面;以及使所述光束横向偏离于物镜的主光轴入射到物镜。优选地,该方法包括聚焦和/或将所述光束出口成像到所述样品平面上。优选地,该方法包括准直来自所述光束出口的光,并将准直光中继到物镜的后焦平面,其中,优选地,所述中继包括将光从至少一个准直透镜的后焦平面中继到物镜的后焦平面。

[0023] 从第四方面来看,本发明提供了一种用于对位于样品平面中的样品成像的显微镜系统,该系统包括:

[0024] 显微镜物镜;

[0025] 照明光学系统,其配置为用光束通过物镜照亮样品平面,照明光学系统包括多模光纤,该多模光纤具有用于发射所述光束的出口,

[0026] 其中,照明光学系统配置成将所述出口成像和/或聚焦到样品平面,

[0027] 并且其中,照明光学系统的配置使得所述光束横向偏离于物镜的主光轴入射到物镜,以便所述物镜以与所述主光轴倾斜的角度将所述光束传送到所述样品平面。

[0028] 从第五方面来看,本发明提供了一种用于显微镜系统的照明光学系统,用于对位

于样品平面中的样品进行成像，该照明光学系统配置为通过显微镜系统的物镜用光束照亮样品平面，照明光学系统包括多模光纤，该多模光纤具有用于发射所述光束的出口，其中照明光学系统配置成将所述出口成像和/或聚焦到样品平面，其中，照明光学系统的配置使得所述光束横向偏离于物镜的主光轴入射到物镜，以便所述物镜以与所述主光轴倾斜的角度将所述光束传送到所述样品平面。

[0029] 从第六方面来看，本发明提供了一种通过物镜照明显微镜系统样品平面的方法，该方法包括：使用来自多模光纤的光束照明所述样品平面；将多模光纤的光束出口成像和/或聚焦到样品平面；以及使所述光束横向偏离于物镜的主光轴入射到物镜。

[0030] 传统上，使用单模光纤时，激光轮廓为高斯分布，并且在样品平面、后焦平面和任何等效平面上保持这种状态（仅大小变化）。这是单模光纤和高斯光束的特殊性质（高斯光束的傅里叶变换是另一个高斯光束）。因此，在单模光纤的尖端成像到物镜的BPF的常规布置中，光纤尖端处的高斯照明轮廓成像到物镜的BPF，并且也在样品平面上再现。相比之下，多模光纤不具有相同的特性，因此，多模光纤的光束在何处以及如何成像更为重要，以便产生样品平面的所需照明，这有利地是非高斯的。在本发明的优选实施例中，多模光纤的尖端成像到样品平面。这与将单模光纤的尖端成像到物镜的BPF的传统布置形成对比。

[0031] 在优选实施例中，通过利用多模光纤的显微镜实现倾斜照明，可选地全内反射（TIR）照明。有利地，纤维出口或尖端布置成与显微镜样品平面共轭（例如，提供样品的临界照明）。优选的布置是，从光纤发出的光聚焦并定位在物镜的外围，优选具有1.4或更大的数值孔径，处于或超过在基板-样品界面处产生全内反射（TIR）的临界角，或者以相对于显微镜主轴倾斜的角度照射样品。

[0032] 在优选实施例中，来自一个或多个激光器的激光在包含均质器的激光引擎中产生和扰乱。激光耦合到多模光纤中，光纤的出口端位于第一透镜的焦点处，优选准直透镜。第二透镜（优选具有比第一透镜更大的焦距）在等效样品平面上创建光纤尖端的图像，优选放大图像。纤维尖端的图像通过显微镜物镜传递，通常通过分束器（例如，二向色镜），并投影或聚焦到样品平面上（目标物体或样品（例如，基板上的样本）上）。样品发出的光（例如荧光）由物镜捕获，并通过显微镜管透镜聚焦到光检测器的检测器元件上（通常通过分束器和发射过滤器）。有利的是，光纤尖端的平面、等效样品平面、样品平面和检测器元件的平面都彼此共轭。通常，一个或多个能够相对于显微镜光轴横向平移光束的光学元件用于将激光束定位在物镜后焦平面（BFP）的外围，优选地使得激光束在衬底-样品界面处经历全内反射。在一些实施例中，光束的这种横向平移运动是通过放置在第一和第二透镜之间的旋转平面光学元件（TO）实现的。在其他实施例中，光束的横向平移运动是通过相对于显微镜光轴横向平移位于第二透镜和物镜之间的第三透镜来实现的。

[0033] 在TIRF显微镜或斜照明显微镜中利用多模光纤进行激光传输，解决了上述与单模光纤相关的问题。当用作照明源时，多模光纤的扰频或均匀输出提供水平、均匀、无干涉条纹的照明轮廓。这有助于防止/消除当使用馈入传统TIRF照明系统的相干自由间隔发射激光束或相干激光束发射单模光纤时，叠加在生物样本荧光图像上的干涉条纹所产生的图像伪影。此外，多模光纤更容易对准，具有更宽的允许激光波长光谱（延伸至UV和NIR），并允许将更多激光功率输入样品。

[0034] 有利地，本发明的一些实施例有助于实现需要高激光功率TIR照明的成像应用（例

如,生物膜表面的超分辨率成像)。本发明不限于用于荧光应用。例如,本发明的实施例可通过物理科学的反射光成像用于计量。本发明的实施例可适于用作适合现有显微镜的独立照明模块,或可集成到显微镜或其他成像或分析系统中。

附图说明

- [0035] 现在通过示例并参考附图描述本发明的实施例,其中:
- [0036] 图1是体现本发明一个方面的显微镜系统的示意图,包括体现本发明另一个方面的照明系统;
- [0037] 图2A是第一示例性样品架的侧视图,该样品架用于固定显微镜系统成像的样品;
- [0038] 图2B是第二示例性样品架的侧视图,该样品架用于容纳将由显微镜系统成像的样品;
- [0039] 图3是适用于图1显微镜系统的光源模块的框图;
- [0040] 图4是图1照明系统的另一个示意图,包括说明光从光纤尖端到样品平面的光线。

具体实施方式

[0041] 现在参考附图中的图1、2A和2B,示出了体现本发明一个方面的显微镜系统,通常指示为100。显微镜系统100包括光学显微镜,在优选实施例中为宽视野显微镜,尽管可以使用其他类型的显微镜,这对技术人员来说是显而易见的。

[0042] 显微镜系统100包括用于接收待成像物体3的支架或保持架2。物体3通常包括样品,例如生物样本或化学物质。物体或样品3可位于基板4上,例如图2B示例中的载玻片4A上,或图2A示例的容器9中,其中至少一部分样品通常存在于容器9的底部。样品可浸入介质中,通常为液体介质,例如水或含水生物介质。在图2A的示例中,样品3设置在容器9的液体介质11中。根据需要,可将盖玻片5放置在样品或样本上,通常位于样品和显微镜系统的物镜之间。在图2B的示例中,样品3位于载玻片4A和盖玻片5之间,可以浸入任何合适的介质中。物体或样本3位于样品平面6中。

[0043] 显微镜系统100包括用于将样品3成像到光学检测器14的成像光学系统20,光学检测器14通常包括相机。成像光学系统20配置成将样品3的图像聚焦在检测器14的焦平面13处,例如在相机的图像传感器处。成像光学系统20可以采取多种配置,通常包括提供光学路径的一系列光学装置。该光具组通常包括至少一个透镜,其布置成将样品3成像到检测器14,即通过光具组在检测器焦平面处形成样品3的图像。根据需要,光具组可以包括一个或多个其他光学组件,例如一个或多个反射镜和/或一个或多个分束器和/或一个或多个滤波器。在优选实施例中,光学检测器14是具有数字图像传感器15(例如CCD传感器)的数字相机。成像光学系统20将样本3成像到图像传感器15。更具体地说,希望成像光学系统20将样品3的图像聚焦在传感器15上(其中传感器15的图像传感表面位于成像光学系统20的焦平面13)。

[0044] 成像光学系统20包括显微镜物镜7,通常是具有后焦平面(BFP)8的无限校正显微镜物镜。物镜7具有通常与物平面6垂直的光轴。

[0045] 成像光学系统20通常包括至少一个管透镜10,其配置成与物镜7一起在检测器14处形成样品3的放大图像。应当理解,成像光学系统20的光具组可以包括一个或多个附加光

学组件,具体取决于实施例。

[0046] 显微镜系统100包括用于照明样品3的照明光学系统22。照明光学系统22包括或可连接到光源24,在优选实施例中,光源24是包括一个或多个激光设备(未示出)的激光光源,但也可以包括任何其他合适的常规光源,例如一个或多个LED。光源24可配置为产生适合应用且对技术人员来说显而易见的一个或多个频带的光,优选激光。例如,如果样品3包含能够发出荧光的样本(或者是因为它本身能够发出荧光,即自体荧光,或者是因为一个或多个荧光标记物,例如蛋白质或染料已添加到样本中),光源24可配置为提供一个或多个频带的激发样本/标记物并引起荧光的光。

[0047] 在优选实施例中,照明光学系统22配置为通过物镜7将光束25(本示例中的激光束)定向到样品3来照明样品3,该光束25可包括与样本/标记的荧光特性相对应的多个波长中的任意一个或多个波长的光。优选地,存在单个光束25。光束25优选均匀化。优选地,光束25包括非相干光。照明光学系统22包括一系列光学组件,其中一个或多个在优选实施例中与成像光学系统20的光具组共用。因此,照明光25可以沿着或平行于成像光学系统20的光学路径的至少一部分。为了促进这一点,分束器12可以包括在成像光学系统20中,或者以其他方式提供在光学路径中。分束器12配置为使得来自光源24的光到达样品3,而来自样品3的光27到达光学检测器14。在所示实施例中,分束器12配置为反射或部分反射(即分开)一个或多个频带(对应于光源24产生的光)的光。光源24布置成将光束25引导至分束器12,然后光束25的至少一部分经由物镜7引导至样品3。在该示例中,分束器12配置为能够投射与从样品3反射或发射的光相对应的一个或多个频带的光,以允许反射/发射光27到达光学检测器14。可以说,分束器12具有一个或多个对应于从样品3发出的光的透射带,以及一个或多个对应于光源24产生的光的反射带。在所示实施例中,分束器12位于管透镜10和光学检测器14之间。通常,分束器12包括二向色镜。在替代实施例中,管透镜10可位于光学路径中的其他位置,例如分束器12和光学检测器14之间。

[0048] 在一些实施例中,样品3包括样品,当被来自照明光学系统22的光激发时,该样品发出荧光(通过自动荧光或通过样品中包含的荧光标记或标签)。因此,当显微镜100在成像模式下操作时,由成像光学系统20成像到相机14的是从样品发射的荧光。

[0049] 通常,在光学路径中提供发射滤波器17,用于过滤从样品3发出的光27,以便仅允许一个或多个目标波长带中的光到达光学检测器14。例如,发射滤光片17可配置为允许与使用期间从样品发射的荧光相对应的一个或多个波长带中的光。在可能关注的不止一个目标波长波段的情况下,可以提供多个不同的可互换发射滤波器,例如在滤波器选择器装置中,以允许根据在任何给定时间可能关注的目标波长波段在光学路径中定位合适的发射滤波器。在所示的实施例中,滤波器17位于光学检测器14附近,但它也可以位于光学路径中方便的其他位置。

[0050] 图3显示了可用作光源24的光源模块的示例。光源模块包括一个或多个用于产生和发光的主光源324。在典型实施例中,光处于紫外(UV)、可见或近红外(NIR)频段。在优选实施例中,光是激光,并且每个光源324包括激光设备。然而,每个光源可以包括能够产生和发射光的任何光源,包括但不限于发光二极管(LED)、激光二极管、固态器件、超发光二极管(SLD)或弧光灯。每个光源324配置为产生并发射一个或多个波长的光。在图3的示例中,示出了两个激光设备324,但是应当理解,在可选实施例中,可以有单个光源或两个以上的光

源。每个激光设备324可以是单模激光设备或多模激光设备。在优选实施例中，光源模块发射多个波长的光，优选激光。如图所示，这可以通过向模块24提供多个光源324来实现，每个光源324产生不同波长或不同频带的光。可选地，光源模块24可以发射单波长的光。

[0051] 在光源模块具有多于一个光源324的实施例中，光源模块可包括光组合单元326，光组合单元326包括以任何常规方式布置的一个或多个光学元件，以合并来自每个光源324的各自光束以产生输出光束25。光组合单元326例如可以包括一个或多个镜和/或分束器和/或二向色性分束器。

[0052] 可选地，光源模块包括用于操纵从模块24发射的光束25的横截面形状和/或尺寸的光控制和调节单元328。在存在多于一个光源324的实施例中，控制和调节单元328可以包括用于每个光源324的相应控制和调节子单元(未示出)。控制和调节单元328(或其每个子单元，如适用)可包括任何光学元件或光学元件的组合(未示出)，用于以任何期望的常规方式控制和调节发射的光束。例如，控制和调节单元328(或其每个子单元，如适用)可包括伽利略望远镜扩束器、变形棱镜或柱形光学元件、和/或任何其他常规光束成形装置、和/或声光可调谐滤波器(AOTF)或机械快门。

[0053] 在所示的实施例中，光组合单元326位于光调节单元328之前，使得来自激光源324的光在组合之后调节。在可选实施例(未示出)中，光组合单元326位于光调节单元328之后，使得来自激光源324的光在组合之前调节。

[0054] 光源模块24可以包括光耦合器329，通过该光耦合器，输出光束25从模块24发射。光耦合器329包括一个或多个光学元件(未示出)，用于将光束定向或光学耦合到光纤30(参见图1)。通常，光耦合器329包括一个或多个透镜(例如准直器透镜、聚光透镜和/或微物镜)，用于将输出光束聚焦到光纤30的端部。光纤30可以使用任何方便的耦合装置或装置(未示出)机械地耦合到模块24。可选地，该配置可以使得光耦合器26将光束25发射到自由空间中，然后将其定向到光纤30。

[0055] 光纤30具有用于接收来自光源24的光束25的入口端32。入口端32可以从自由空间接收光束25。在优选实施例中，光耦合器329配置成将光束25聚焦到光纤30的入口端32上。光束25和光纤30的光芯的相应横截面形状和尺寸相互兼容，以允许光束25沿光纤30传输。这种兼容性可以至少部分地通过控制和调节单元328实现。

[0056] 光纤30可以是常规光纤，通常包括用于传输光束25的光学透明芯部(未显示)，该芯部通常由折射率低于芯部的透明包层材料(未显示)包围。芯和包层可以由任何合适的材料形成，例如玻璃(二氧化硅)或塑料。光纤30可以描述为光波导，并且可以采用任何已知形式，例如称为光管的类型，其包括光学透明芯(例如，由玻璃或塑料形成)，但可以没有包层。

[0057] 有利地，光纤30是多模光纤。多模光纤是一种支持多种光传播路径或模式的光纤。多个光学路径或光模式可在宽波谱波长上同时支持。相比之下，单模光纤只支持单模。多模光纤通常比单模光纤具有更宽的芯部直径(通常为50微米至400微米)。多模光纤的芯部直径大于其所载光的波长。多模光纤30的纤芯优选具有方形横截面或矩形横截面，但也可以具有圆形横截面或任何其他合适形状的横截面，并且光束25可以相应地成形。举例来说，光纤30的芯部直径为 $50\mu\text{m}$ ，数值孔径(NA)为0.12。可以说，多模光纤30包括拓展光源，而不是点光源。这有助于样品平面的照明，因为拓展光源提供的照明范围比点光源大。

[0058] 光纤30在其端部或尖端具有光束出口33，光束25从该出口发射。光束25可以从出

口33发射到自由空间。

[0059] 在优选实施例中,从多模光纤30的出口33发射的光束25被均匀化或加扰,从而提供平的、均匀、无干涉条纹的照明轮廓。可为此目的提供任何常规光束均匀器或光学扩散器(未显示)。例如,光调节单元328可包括光束均衡器或光学扩散器,尽管任何此类装置可设置在照明系统中的任何其他合适位置。有利地,均匀化光束25包括非相干光。此外,与单模光纤相比,多模光纤30更容易对准,具有更宽的允许激光波长光谱(例如延伸到UV和NIR),并允许向样品3输送更多激光能量。

[0060] 参考图1和图4,照明光学系统22有利地配置成使得光纤30的出口或尖端33,或者更具体地说,出口33处的光束25成像到样品平面6。优选地,该布置使得纤维尖端33的图像(可选地放大图像)聚焦到样品平面6上。在优选实施例中,照明光学系统22配置成将光束出口33成像到中间光学平面,该中间光学平面可为等效样品平面(ESP)43。这样,在ESP 43处提供出口33的图像,可选地放大图像。照明光学系统22还配置为将ESP 43处的中间图像成像到样本平面6。ESP 43与样品平面6以及光纤尖端33或光束出口所在的平面39共轭。

[0061] 在优选实施例中,照明光学系统22包括第一透镜40,优选准直透镜。该布置使得光束出口33位于透镜40的前焦平面39处。第一透镜40具有后焦平面(BFP)41,并将光束25从出口33准直到BFP 41。注意,透镜40不在BFP 41处创建出口33的图像。这在图4中示出,从图4可以看出,来自出口33的光线LR不在BFP41处聚焦形成出口33的图像。相反,来自出口33的光优选地在BFP41处准直或基本准直。

[0062] 照明光学系统22配置为将BFP 41处的光中继到物镜7的BPF 8。在优选实施例中,这是使用第二透镜42和第三透镜10实现的,第二透镜42和第三透镜10布置成用作一组图像中继透镜。在图1的实施例中,第三透镜10是显微镜系统100的管透镜。然而,在其他实施例(未示出)中,第三透镜10不是管透镜,并且可以是设置在ESP 43和BPF 8之间的任何合适透镜(并且可以是管透镜之外的透镜)。

[0063] 在优选照明光学系统22中,可包括任何合适成像透镜的第二透镜42布置成使得第二透镜42在ESP 43处形成出口33或光纤尖端的中间图像。这通过聚焦在ESP 43处的来自出口33的光线LR来说明。优选地,第二透镜42的定位使得其前焦平面与BFP 41重合。优选布置使得透镜42在ESP 43处提供出口33处光束25的放大图像,放大率优选为使得放大光束25填充或基本填充检测器的视野。优选地,第二透镜42的焦距大于第一透镜40的焦距。第三透镜10将来自ESP 43的光束25准直到物镜的BPF 8,其优选地对应于第三透镜10的BPF。注意,第三透镜10不在BPF 8处创建出口33的图像。这如图4所示,从图中可以看出,光线LR不会在BPF 8处聚焦形成图像。相反,优选在BPF 8处对光进行准直或基本准直。

[0064] 物镜7在样品平面6处形成出口33的图像,或更具体地形成出口33处光束25的图像。在优选实施例中,物镜7将BPF 8处的准直光聚焦到样品平面6。

[0065] 优选照明光学系统22配置为将ESP 43处光束25的中间图像投影或成像到样品平面6上,在优选实施例中,这是通过第三透镜10和物镜7实现的。在图1的实施例中,光束25通过分束器12从ESP 43定向到物镜7。

[0066] 在优选实施例中,第一透镜40在BPF 41处提供准直光斑,并且正是该光斑中继到物镜7的BPF 8,在BPF 8处形成相应的光斑。物镜7将光斑聚焦在BPF 8处,以在样品平面6处形成光纤尖端33的图像。优选地,照明光学系统22配置成将最小的可用准直光斑中继到BPF

8,并且这可以通过布置透镜40和42来实现,使得透镜40的BPF 41与透镜42的前焦平面重合。还优选将BPF 8的最小可用准直光斑聚焦到样品平面6上,这可以通过排列透镜10和7来实现,使得透镜10的BPF 41与物镜7的BPF 8重合。在可选实施例中,各个焦平面不必重合,尽管这可能会对在样品平面6上形成的图像的清晰度产生负面影响。

[0067] 照明光学系统22,尤其是所示实施例中的透镜40和42的优选布置,使得布置有出口33的平面39(在所示示例中对应于透镜40的前焦平面)和等效样品平面(ESP) 43(在所示示例中对应于第二透镜42的BFP)彼此共轭。照明光学系统22,尤其是所示实施例中的透镜10和7的优选布置使得样品平面6和ESP 43彼此共轭。在优选实施例中,出口33的平面39、ESP 43和样品平面6相互共轭。进一步优选的是,探测器焦平面13与样品平面6、ESP43和出口平面39共轭。

[0068] 照明光学系统22配置成当照明光束25入射到物镜7上时横向偏离于物镜7的主光轴7A。根据照明光学系统22的布置,光束25可以平行于或基本平行于光轴7A(如图1所示),或者当其撞击物镜7时,可以倾斜于光轴7A。优选地,该配置使得光束25在透镜7外围入射到物镜7上。这种布置有助于物镜7以与光轴倾斜的角度将光束25投影到样品平面6。该配置可以实现样品平面6的倾斜照明,从而实现样品的倾斜照明。可选地,该配置使得光束25从物镜7以导致光束25全内反射(TIR)的角度投影到样品平面6,处于或超过相关临界角。为了便于TIR,优选物镜7具有相对较大的数值孔径,优选1.4或更大。TIR发生在样品界面处,该界面可能位于或基本上位于样品平面6内。例如,参考图2A,样品界面可包括容器9的内底面。可选地,在图2B的示例中,样品界面可以是面向样品3的盖玻片5的表面。例如,对于使用高数值孔径物镜的倒置显微镜,样品基板通常是具有所谓“盖玻片厚度”的玻璃表面。物镜设计成通过一块这样厚度的玻璃成像。TIR可能发生在基板(盖玻片)-样品或玻璃-水界面。整个样品可以是夹在厚玻片4和盖玻片5(其间有用于样品的水)之间的生物样本,并在倒置显微镜上倒置放置。可选地,它可以是“碟式”样品(图2A),由带盖层厚度底部的壁室组成。样本通常在室的玻璃盖玻片上培养,水或另一种含水液体充满碟,上方向空气开放。

[0069] 可以使用任何方便的定位手段来实现对光束25的期望定位。例如,在图1中,照明光学系统22包括第一和第二透镜40、42之间的转变光学装置50,其配置或可配置为相对于透镜40、42(尤其是第二透镜42)的主轴调整光束25的位置(例如,横向移动光束和/或调整倾斜角),以便在光束25到达分束器12时控制光束25的位置和/或角度,从而使光束25在到达物镜7时处于所需位置。转变光学装置50可以采用任何常规形式,例如可旋转的视觉或光学平移台或支架。可选地,或者另外地,可以通过定位出口33和第一透镜40中的一个或两个来实现光束25的期望定位,使得光束25沿着偏离于第二透镜42的主轴的轴从第一透镜40射出。这如图4所示,其中出口33和第一透镜40相对于第二透镜42横向位移,优选布置为第一透镜40的主轴与第二透镜42的主轴隔开并平行。更一般地,光束定位装置可以由一个或多个光学装置和/或光学配置来实现,该光学装置和/或光学配置使得光束25相对于主光轴或其他基准轴的横向位置和/或倾斜角度以期望的方式设置,任选地允许调整或调谐。例如,在替代实施例(未示出)中,照明光学系统22可包括一个或多个可横向移动(即在垂直于其主轴的方向上)的透镜,以根据需要定位光束25。

[0070] 在使用所示实施例时,由光源产生的光耦合到多模光纤30中,并且光纤30的出口33设置在第一透镜40的焦点处。第二透镜42在等效样品平面(ESP) 42处创建出口33的图像,

可选地放大图像。然后,通过物镜7以及本例中的分束器12,光束25和出口33的图像或放大图像中继通过显微镜100并投影到目标样品(通常是基板4上的显微镜样本)的样品平面6上。从样品3发出的光27(通常为荧光)由物镜7捕获,并由显微镜管透镜10聚焦在光学检测器14上(在所示实施例中通过分束器12和发射滤光片17)。有利地,出口平面39、ESP 43、样品平面6以及优选地检测器焦平面13都彼此共轭。

[0071] 优选照明光学系统22配置为将光束25定位在物镜后焦平面(BFP)8的外围,使得光束25在样品界面处经历全内反射,或者以其他方式倾斜地照明样品平面6。光束25的定位可通过一个或多个光学元件实现,该光学元件能够相对于显微镜光轴横向平移光束。有利地,照明光学系统22配置为将均匀或非相干光束25从光纤30引导至样品平面6。有利地,照明光学系统22配置成将光纤30的尖端或出口成像到样品平面6。

[0072] 在可选实施例(未示出)中,成像光学系统20和照明光学系统22中的一个或两个可以具有与图1和图4所示不同的光学组件和/或光学组件的不同布置。例如,分束器12可以位于管透镜10和物镜7之间。在ESP 43和物镜7之间(例如ESP 43和分束器12之间,或分束器12和物镜7之间)可以提供一个或多个附加透镜(未示出),以用作第三透镜(如上所述,并在图4中显示为透镜10),而不是图1示例中的管透镜10。可选地,或每个附加透镜可以如上所述相对于光轴横向移动,以根据需要定位光束25。

[0073] 在可选实施例(未示出)中,本文所述的任何一个或多个透镜可以实现为单个透镜或一列透镜,这对于技术人员来说是显而易见的。

[0074] 有利地,在优选实施例中,照明光学系统22配置成将均匀化光束25的无结构图案从多模光纤30投射到样品平面上,尤其是对其成像。因此,样品平面和样品在显微镜的整个视场上均匀照明,没有任何会降低图像质量的干涉图案。

[0075] 本发明不限于本文描述的实施例,但可以在不脱离本发明范围的情况下进行修改或修改。

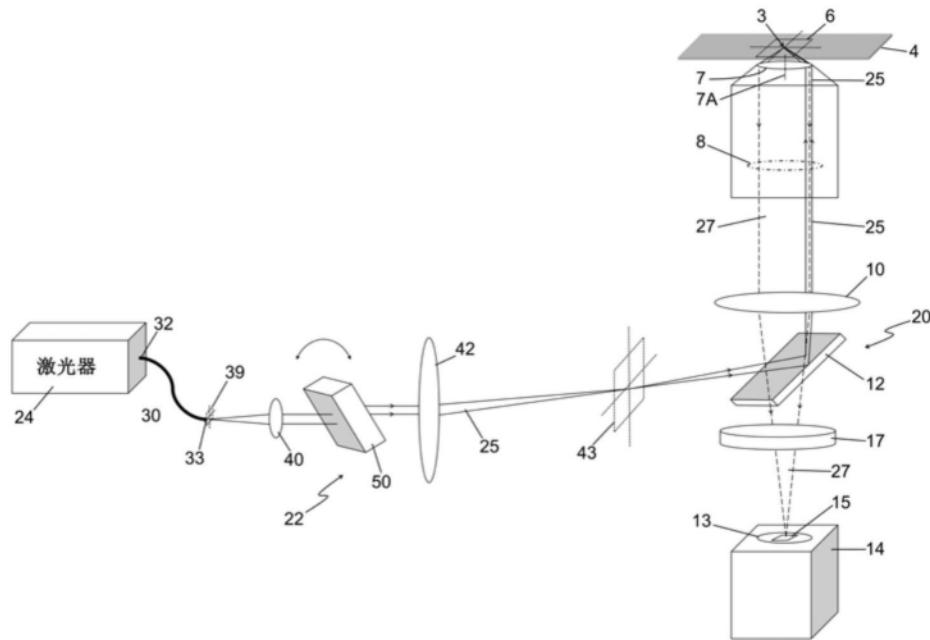


图1

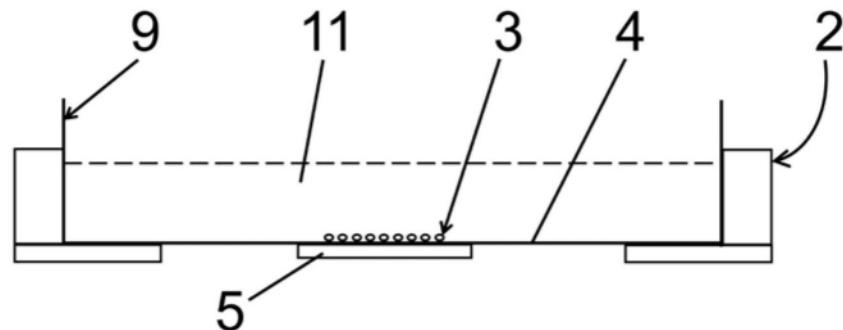


图2A

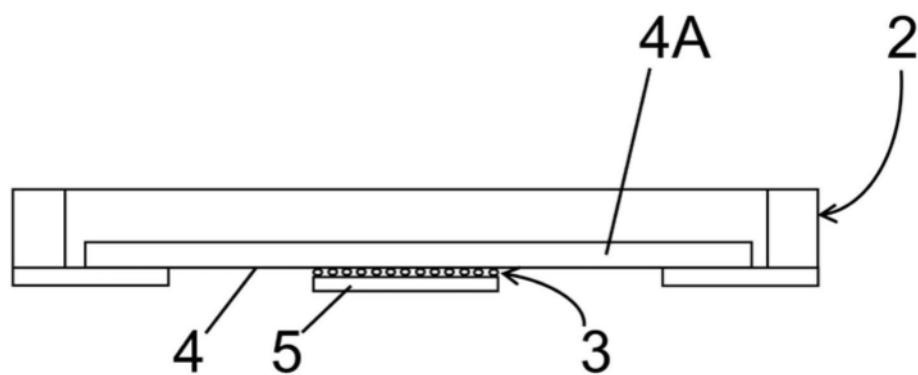


图2B

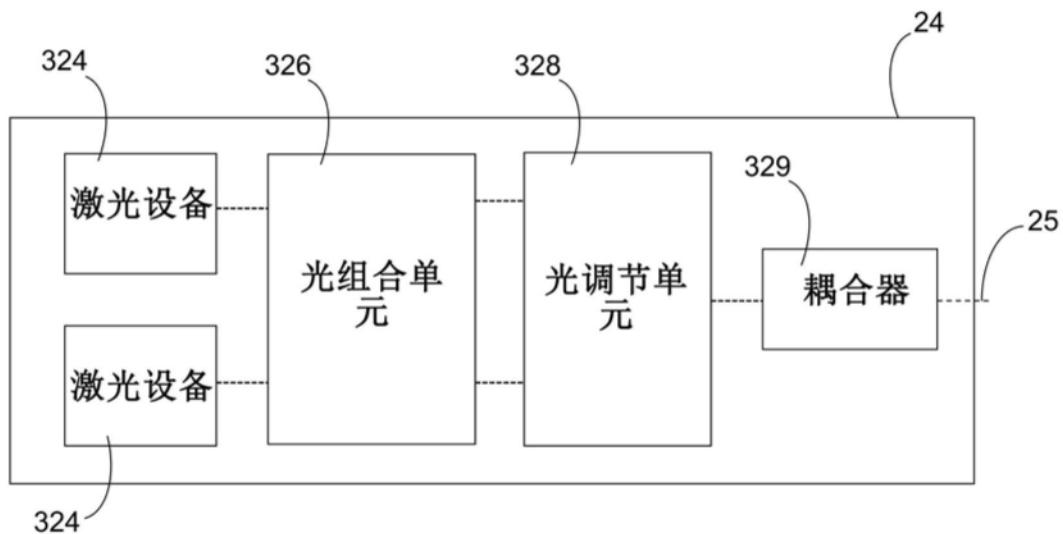


图3

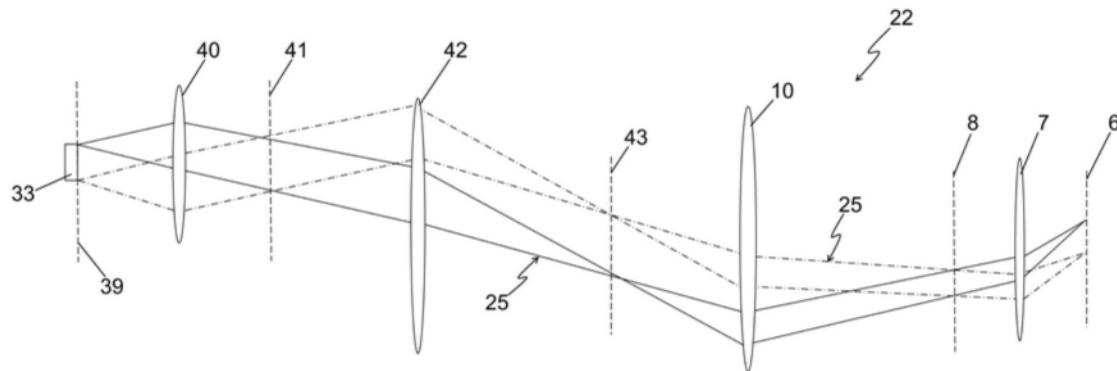


图4