



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108291870 B

(45) 授权公告日 2021.06.18

(21) 申请号 201680064947.6

(22) 申请日 2016.10.11

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108291870 A

(43) 申请公布日 2018.07.17

(30) 优先权数据
102015119258.6 2015.11.09 DE

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.05.07

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2016/074313 2016.10.11

(87) PCT国际申请的公布数据
WO2017/080737 DE 2017.05.18

(73) 专利权人 卡尔蔡司显微镜有限责任公司
地址 德国耶拿

(72) 发明人 安妮特·贝格特
赫尔穆特·利珀特

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
责任公司 11219
代理人 鲁山 孙志湧

(51) Int.Cl.
G01N 21/41 (2006.01)
G02B 21/00 (2006.01)
G02B 21/24 (2006.01)
G02B 21/36 (2006.01)
G01N 21/27 (2006.01)
审查员 李步骤

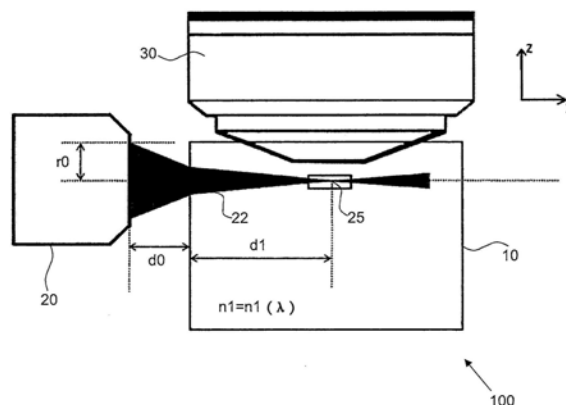
权利要求书3页 说明书9页 附图3页

(54) 发明名称

用于确定样本介质的波长相关折射率的光
显微镜和方法

(57) 摘要

通过使用根据本发明的方法,确定用光显微镜(100)检验的样本介质的波长相关折射率。使用所述光显微镜对具有未知折射率的样本介质进行样本测量。将照明光(22)照射到所述样本介质并且测量来自所述样本介质的检测光。借助所述样本测量来测量照明光和/或检测光的样本测量焦点位置。使用其中基于介质的折射率来表达照明光和/或检测光的焦点位置(25)的数学模型,从所述样本测量焦点位置导出所述样本介质的所述折射率。此外,描述了一种用于执行所述方法的光显微镜。



1. 一种确定用光显微镜检验的样本介质 (12) 的波长相关折射率 (n_1) 的方法, 所述方法包括:

利用所述光显微镜对具有未知折射率 (n_1) 的所述样本介质 (12) 执行样本测量, 其中, 将照明光 (22) 照射到所述样本介质 (12) 并且测量来自所述样本介质 (12) 的检测光;

借助于所述样本测量来测量在所述样本介质 (12) 中的所述照明光和/或检测光的样本测量焦点位置 (25);

使用其中与介质的折射率 (n_1) 相关地界定照明光 (22) 和/或检测光的在所述样本介质中的焦点位置 (25) (Z_{max} 、 X_{max}) 的数学模型, 其中从在所述样本介质 (12) 中的所述样本测量焦点位置 (25) 导出所述样本介质 (12) 的所述折射率 (n_1)。

2. 根据权利要求1所述的方法,

其特征在于, 通过其中焦点位置 (Z_{max} 、 X_{max}) 线性地取决于折射率 (n_1) 加上常数 (Offset) 的等式形成所述数学模型。

3. 根据权利要求1所述的方法,

其特征在于, 利用所述光显微镜执行至少一个校准测量以确定所述数学模型的至少一个参数 (c , Offset), 其中, 在所述校准测量中:

- 用照明光 (22) 照明具有已知折射率 (n_1) 的介质,
- 测量来自所述具有已知折射率 (n_1) 的介质的检测光以获得至少一个显微镜图像, 并且

- 根据所述至少一个显微镜图像确定所述照明光 (22) 和/或检测光的校准测量焦点位置 (27、28), 以及

基于所述已知折射率 (n_1) 和所确定的校准测量焦点位置 (27、28) 来计算所述数学模型的至少一个参数 (c , Offset)。

4. 根据权利要求1所述的方法,

其特征在于, 执行至少两个校准测量,

其中, 所述校准测量在以下方式的一个或多个中彼此不同:

- 使用分别具有已知折射率 (n_1) 的不同介质;
- 使用几何形状以已知方式彼此不同的不同样本容器 (10);
- 使用影响所述校准测量焦点位置 (27、28) 的不同显微镜设置。

5. 根据权利要求4所述的方法,

其特征在于, 用于所述至少两个校准测量的所述不同显微镜设置在以下方式的一个或多个中不同:

- 所述显微镜设置在分别发射的照明光 (22) 的波长上不同;
- 所述显微镜设置在记录的检测光的波长上不同;
- 所述显微镜设置在所述照明光 (22) 照射到所述介质中的数值孔径 (NA) 上不同;
- 所述显微镜设置在所述照明光 (22) 照射到所述介质中的照明方向上不同;
- 所述显微镜设置在检测光学器件的变焦设置上不同, 且因此在图像场大小上不同。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,

其特征在于, 在每个校准测量中记录若干显微镜图像, 其中针对所述若干显微镜图像, 所述光显微镜的检测光学器件对不同高度平面成像,

从所述显微镜图像中确定具有最大清晰度的显微镜图像，

使用与所述具有最大清晰度的显微镜图像对应的高度平面作为校准测量焦点位置 (27、28)。

7. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法，

其特征在在于，在所述样本测量中记录若干样本图像，所述光显微镜的检测光学器件针对所述若干样本图像对不同高度平面成像，

从所述样本图像中确定具有最大清晰度的样本图像，

使用与所述具有最大清晰度的显微镜图像对应的高度平面作为样本测量焦点位置 (25)。

8. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法，

其特征在在于：

在所述至少一个校准测量期间将所述照明光 (22) 作为结构化照明光 (22) 照射到所述具有已知折射率 (n_1) 的介质中，和/或在所述样本测量期间将所述照明光 (22) 作为结构化照明光 (22) 照射到所述样本介质 (12) 中，

其中，照明光束路径 (41) 横向于检测光束路径 (61)，并且所述结构化照明光 (22) 的横截面在所述结构化照明光 (22) 的行进方向上变化。

9. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法，

其特征在在于：

所述照明光 (22) 的照明光束路径 (41) 横向于所述检测光的检测光束路径 (61)，

将所述照明光 (22) 聚焦照射到所述样本介质 (12) 中，

在所述样本测量期间记录至少一个样本图像，并且确定在所述图像中所述照明光 (22) 具有最小横截面的位置，并且使用所述位置作为样本测量焦点位置 (25)。

10. 根据权利要求3所述的方法，

其特征在在于：

所述照明光 (22) 的照明光束路径 (41) 横向于所述检测光的检测光束路径 (61)，

将所述照明光 (22) 聚焦照射到所述具有已知折射率 (n_1) 的介质中，

在所述校准测量期间确定在所述至少一个显微镜图像中的位置，所述照明光 (22) 在所述位置具有最小横截面，并且使用所述位置作为所述校准测量焦点位置 (27、28)。

11. 根据权利要求10所述的方法，

其特征在在于

至少在所述照明光 (22) 的发射中执行至少两个彼此不同的校准测量，使得：

- 对于所述校准测量中的一个，所述照明光 (22) 的所述校准测量焦点位置 (28) 在图像场中心前方的行进方向上，并且

- 对于所述校准测量中的另一个，所述照明光 (22) 的所述校准测量焦点位置 (27) 在所述图像场中心后面的行进方向上。

12. 根据权利要求1至5、10和11中任一项所述的方法，

其特征在在于

输出所述样本介质 (12) 的所确定的折射率 (n_1) 或

与所述样本介质 (12) 的所确定的折射率 (n_1) 相关地，向用户或向控制和评估单元输出

一定的指令,用于自动或非自动调整显微镜设置。

13.一种光显微镜,包括:

照明光源(40、50),用于在待检验的样本介质(12)的方向上发射照明光(22),

检测物镜(44)和相机设备(60),用于测量来自所述样本介质(12)的检测光,

照明物镜(20,44),被配置为在所述样本介质(12)中产生照明光(22)的焦点,其中所述检测物镜(30,44)和所述照明物镜(20)是不同的物镜(20,30)或者是同一个物镜(44),以及

控制和评估单元,在所述控制和评估单元中包括数学模型,在所述数学模型中与介质的折射率(n_1)相关地表示照明光和/或检测光的在所述样本介质中的焦点位置(Z_{max} 、 X_{max}),

其中,所述控制和评估单元被配置为-确定所述照明和/或检测光的在所述样本介质中的所述焦点位置(Z_{max} , X_{max}),并且

-针对待检查的所述样本介质(12)并且借助于所述数学模型,根据在所述样本介质中的确定的所述焦点位置(Z_{max} 、 X_{max}),确定所述样本介质(12)的折射率(n_1)。

14.根据权利要求13所述的光显微镜,

其特征在于

所述控制和评估单元还被配置为:

-对具有未知折射率(n_1)的样本介质(12)执行样本测量,

-借助于所述样本测量来确定所述照明光和/或检测光的样本测量焦点位置(25);

-将所确定的样本测量焦点位置(25)用作待输入的焦点位置(Z_{max} 、 X_{max})以用于确定所述样本介质(12)的所述折射率(n_1)。

用于确定样本介质的波长相关折射率的光显微镜和方法

技术领域

[0001] 本发明在第一方面涉及一种用于根据权利要求1的前序部分来确定用光显微镜检验的样本介质的波长相关折射率的方法。

[0002] 在本公开中,术语“样本介质”可以指稍后添加待检验样本的介质,例如液体。当然,表述“样本介质”也可以指已经添加样本的介质。

[0003] 在第二方面,本发明涉及一种根据权利要求12的前序部分的光显微镜。

背景技术

[0004] 一般来说,存在用于检验样本的多种不同类型的光显微镜。通常,用照明光照射位于样本介质内的样本,并检测来自样本的检测光。

[0005] 因此,通用光显微镜包括照明光源,用于在待检验的样本介质的方向上发射照明光。此外,通用光显微镜包括用于测量来自样本介质的检测光的物镜和相机设备。

[0006] 照明光和检测光在样本介质中的传播基本上取决于样本介质的折射率。折射率也被称为折射数或折射系数。折射率也可能与波长有关。通常光显微镜被配置用于一定的折射率或用于折射率的分布/范围,其中也考虑采用的盖玻片的折射率。光显微镜也可以被配置用于与波长相关的折射率,即,光显微镜的光学性质根据波长而设计,使得不同波长的照明光和/或检测光具有相同或相似的光束路径。特别地,可以使用消色差物镜或复消色差物镜。

[0007] 如果使用具有光显微镜不被调整/配置到的折射率的样本介质,则测量质量受到负面影响。例如,由于在成像中可能出现像差或颜色错误,因此清晰度可能会恶化。

[0008] 为了避免这些问题,使用具有已知波长相关折射率的特定样本介质。但是,这可能导致高成本。此外,在实际样本加入到此介质中之前通常仅针对样本介质将折射率调节至期望值。通常不考虑样本本身是否对折射率有影响。

[0009] 通常有可能预先确定样本介质的折射率。但是,这涉及到关于设备的额外努力和用户所需的时间。因此,在实践中,测量通常使用光显微镜进行,其中样本介质的折射率未知并且偏离理想值,在所述理想值处将获得最佳可能的图像质量。

[0010] 在下文中,描述了其中上述问题尤其相关的情况。一组重要的光显微镜是光片荧光显微镜。在这些显微镜中,照明光束路径横向于(通常垂直于)检测光束路径。为此,照明物镜垂直于检测物镜。或者,照明光束路径和检测光束路径也可以通过单个物镜彼此横向地延伸。照明光作为薄片/平面被引导到样本介质中。这被称为光片。检测光束路径横向或垂直于光片。在被照亮的平面状区域中,样本中的荧光团被激发。这个示例中,待检测的检测光因此可以是荧光。通常,使用折射率 n 接近水的折射率即 $n=1.33$ 的水溶液用作样本介质。样本的理想折射率通常在相似的数量级上。通常针对这种情况调整照明物镜和检测物镜并生成清晰的样本图像。然而,如果样本例如经过化学处理/清理后使其对深层组织中的荧光测量透明,则会出现问题。因此,折射率 n 和折射率波长相关性 $n(\lambda)$,即色散,可能因此强烈地偏离水的折射率和色散。因此,为了避免折射率的变化,通常使用折射率已被调整为

样本的折射率的样本介质。例如,样本介质可以直接对应于使用的清洁介质。为此目的对检测和照明物镜进行光学调整。然而,波长相关折射率一般主要取决于样本介质的相应组成/配方。在实验室中单独制造样本介质时,波长相关折射率也可能在批次之间发生变化。这对照射和检测光束路径都有不利影响。一些光显微镜包括Corr环或其它校正装置,以将光显微镜调整为样本介质的另一折射率;然而,只有当暂时检验的样本介质的折射率是已知时这种措施才能有效地进行。通常情况并非如此。

发明内容

[0011] 可以认为本发明的一个目的是提供一种光显微镜和一种方法,其能够以特别简单的方式确定样本介质的波长相关折射率。

[0012] 通过包括权利要求1的特征的方法以及包括权利要求12的特征的光显微镜来实现这一目的。

[0013] 本发明的光显微镜和本发明的方法的有利变型是从属权利要求的主题,也在以下描述中进行解释。

[0014] 本发明用于确定用光显微镜检验的样本介质的波长相关折射率的方法包括:

[0015] -利用光显微镜对具有未知折射率的样本介质进行样本测量,其中对于样本测量,将照明光照射到样本介质,并且测量来自样本介质的检测光;其中检测光尤其是通过样本介质中的散射和/或荧光产生的;

[0016] -借助于样本测量来测量照明光和/或检测光的焦点位置(在下文中:样本测量焦点位置);

[0017] -使用数学模型,其中根据介质的折射率描述/界定照明光和/或检测光的焦点位置,以从样本测量焦点位置导出样本介质的折射率。

[0018] 根据本发明,上述类型的光显微镜包括控制和评估单元。在控制和评估单元中包括数学模型,其中根据介质的折射率来表示照明光和/或检测光的焦点位置。控制和评估单元被配置为针对待检验的样本介质并且借助于数学模型来确定来自待输入的焦点位置的样本介质的折射率。

[0019] 作为本发明方法的主旨,首先确定照明光和/或检测光的焦点位置。此样本测量焦点位置取决于样本介质的折射率。此外,此焦点位置取决于光显微镜的性质,所述性质可以预先确定,例如通过用已知的样本介质进行校准来预先确定。通过这种方式,了解样本测量焦点位置可以直接导出样本介质的折射率。

[0020] 类似地,本发明的光显微镜的控制和评估单元可以被配置为:

[0021] -对具有未知折射率的样本介质进行样本测量,

[0022] -借助于样本测量,确定样本介质中照明光和/或检测光的样本测量焦点位置,

[0023] -使用确定的样本测量焦点位置作为待输入的焦点位置,用于确定样本介质的折射率。

[0024] 所描述的方法也可以直接用于已经包括样本的样本介质的测量。

[0025] 作为一个重要的优点,用于进行实际样本检查的光显微镜因此可以用于确定或导出折射率。为此,不需要单独的或附加的测量单元。相反,根据本发明,直接在样本区域中确定折射率。

[0026] 可以看出另一个重要的优点在于,可以在光显微镜中使用时确定样本介质的折射率。被检介质因此也可以包括实际的样本,即,在样本尚未被添加到样本介质时在样本制备期间或之前不需要进行测量。或者,也可以在添加样本之前确定样本介质的折射率。特别是,为了确定折射率,可以在后续测量使用与光显微镜相同的样本容器。这是有利的,因为样本容器本身可能对折射有影响。因此,表述“样本介质的波长相关折射率”也可以被理解为样本介质和样本容器的组合的波长相关折射率。

[0027] 所确定的样本介质的折射率接着可以例如经由屏幕或数据接口输出到用户。替代地或另外,取决于所确定的样本介质的折射率,针对改变显微镜设置的动作的特定指令也可以被输出到用户或被输出到控制和评估单元。根据折射率的可能的动作指令可以保存在存储装置中。例如,动作指令可以指照明物镜的光学变焦的调整、检测物镜的光学变焦的调整、更换暂时使用的样本容器、或改变光显微镜的光学部件。替代地,控制和评估单元也可以被配置成自身自动地或自动地执行动作指令。通过这些动作,可以影响照明光和/或检测光的光束路径,从而尤其可能至少部分地补偿检验的样本介质的折射率与具有暂时使用的部件的光显微镜所设计用于的理想折射率的偏差的影响。

[0028] 原则上,可以使用任何合适的数学模型来从焦点位置导出折射率。例如,数学模型可由其中焦点位置线性地取决于折射率加上常数的等式形成。在下面的示例中也被称为 Z_{\max} 的样本测量焦点位置因此取决于折射率 n_1 和也被称为“offset (偏移量)”的常数,如下所示: $Z_{\max}=c*n_1+offset$ 。这里,“c”和“offset”是取决于光显微镜的常数,例如取决于所使用的物镜的变焦设置和数值孔径。如果常数c和offset是已知的,则可以根据焦点位置 Z_{\max} 计算暂时使用的光波长的折射率 n_1 。

[0029] 如果样本测量是在其它波长下进行的,则可以按类似的方式再次计算这些波长的折射率。

[0030] 一般而言,可以将进一步的表达式添加到上面指出的等式中,例如可以添加具有对折射率的平方相关性的表达式。原则上,以此方式,可能得到更准确的结果,然而,必须首先确定取决于光显微镜的其它常数。对于仅少量值待确定的情况,如果根据所述等式,校准测量焦点位置等于常数“Offset”加上折射率的线性相关性,则可能是有利的。为了进一步简化等式,Offset也可以被设置为零,然而,这对折射率的确定的准确性有不利影响。

[0031] 此数学模型的一个或多个参数,例如常数c或者还有Offset,可以通过校准测量来确定。这些参数取决于各自的光显微镜,特别是取决于光显微镜的暂时配置。

[0032] 在用于确定数学模型的至少一个参数的优选实施例,用光显微镜进行至少一个校准测量,其中:

[0033] -用照明光照明具有已知折射率的介质(而不是具有未知折射率的样本介质),

[0034] -测量来自具有已知折射率的介质的检测光以记录至少一个显微镜图像,并且

[0035] -利用至少一个显微镜图像,确定照明光和/或检测光的校准测量焦点位置(即,在校准测量中确定的照明光和/或检测光的焦点位置)。

[0036] 使用已知的折射率和确定的校准测量焦点位置,然后可以计算数学模型的至少一个参数。

[0037] 一般来说,利用每个校准测量可以计算一个参数。例如,如果使用上面提到的模型 $Z_{\max}=c*n_1+offset$,则在一个校准测量中测量或确定 Z_{\max} ,并且 n_1 是已知的,因为在校准

测量中使用具有已知折射率 n_1 的介质。如果最初还已知常数 $Offset$,例如如果由显微镜制造商提供或者通过其它测量确定,则可以通过一个校准测量来计算常数 c 。

[0038] 为了确定常数 c 和 $Offset$,还可以进行两个(或更多个)校准测量。

[0039] 如果进行至少两个校准测量,则这些测量优选地在以下方式的一个或多个中不同:

[0040] -使用分别具有已知折射率的不同介质;

[0041] -使用以已知方式彼此不同的几何形状的不同样本容器;

[0042] -使用影响校准测量焦点位置的不同显微镜设置。

[0043] 如果已知在校准测量影响照明和/或检测光束路径的方式之间的因子不同的方式,则不同的校准测量都具有意义。利用这些知识,然后可以使用已知的光学计算来确定此因子对使用的数学模型的参数的影响。例如,针对不同的校准测量可以使用不同的样本容器,其中不同的样本容器由于其不同的几何形状而折射或影响光。有可能计算这种影响。因此,在使用不同样本容器的两个校准测量中,模型的参数例如常数 c 和/或 $Offset$ 可能不同;然而,可以根据一个校准测量的参数导出另一个校准测量的参数。如果使用不同的显微镜设置,情况也是如此,这将在下文中更详细地描述。

[0044] 如果在具有已知折射率的所使用介质中校准测量有所不同,则这对模型的参数没有影响,即,在上面的示例中,对常数 c 和 $Offset$ 没有影响。相反,可以通过两个测量确定具有未知折射率的两种介质的两种折射率 n_1 和 n_2 的两个焦点位置 Z_{max1} 和 Z_{max2} 。对于第一个和第二个校准测量使用等式

[0045] $Z_{max1} = c \cdot n_1 + offset$ 和 $Z_{max2} = c \cdot n_2 + offset$

[0046] 可以计算常数 c 和 $Offset$ 。

[0047] 用于至少两个校准测量的不同显微镜设置可以尤其在以下方式的一个或多个中不同:

[0048] -显微镜设置在分别发射的照明光的波长上不同;

[0049] -显微镜设置在记录的检测光的波长上不同;

[0050] -显微镜设置在照明光照射到介质中的数值孔径上不同;

[0051] -显微镜设置在照明光照射到介质中的照明方向上不同;

[0052] -显微镜设置在检测光学器件的变焦设置上不同,因此尤其在图像场大小上不同。

[0053] 同样,它对于不同的显微镜设置是已知的(例如通过光学计算技术来模拟或计算),这种差异影响照射和检测光束路径,并因此影响这些测量的焦点位置。

[0054] 通常,表述“校准测量”可以理解为使得记录具有已知折射率的样本或介质的一个或多个显微镜图像。记录的显微镜图像的数量可以具体取决于待确定的焦点位置。

[0055] 焦点位置可以指照明光或检测光的焦点。

[0056] 在检测光的情况下,焦点位置指示哪个平面清晰地成像到采用的相机设备上。此平面横向或垂直于检测光束路径,其中检测光束路径朝向样本区域的方向也被称为 z 方向。为了确定焦点位置,现在可以记录多个显微镜图像,其中将结构化介质/结构化样本移到不同的 z 位置。将在此处相应的显微镜图像具有最高清晰度的 z 位置用作焦点位置(在上面指示的数学模型中: Z_{max})。

[0057] 然而,一般而言并且在上述等式中,表达式 Z_{max} 不应被视为限制确定焦点位置的

方向。例如,此方向也可以在照明光的行进方向上确定,所述行进方向可以横向于检测方向并且因此可以被描述为 x 方向。在这种情况下,焦点位置也被称为 X_{\max} ,其中对 Z_{\max} 的描述类似地适用于 X_{\max} 。

[0058] 介质/样本的结构是重要的,这样就可以确定显微镜图像中的任何对比度和清晰度。因此,一般来说,任何介质只要它导致具有亮度变化的显微镜图像就可以被认为是结构化介质。

[0059] 根据上述想法,可能优选的是在每个校准测量中记录多个显微镜图像,其中光显微镜的检测光学器件特别是检测物镜对不同的高度平面成像。为了记录不同高度平面的图像,原则上可以在高度方向上改变检测物镜或样本安装座。然后,从显微镜图像中确定最大清晰度的显微镜图像。然后将对应于最大清晰度的显微镜图像的高度平面用作校准测量焦点位置。例如,此方法适用于反射光布置中的通光测量或荧光测量(即,未测量未偏转地通过的照明光)。此外,当使用结构化照明时,这种方法是可能的。在这种情况下,结构化照明可代替结构化样本或结构化介质而使用,如下面更详细描述。

[0060] 对于样本测量,焦点位置的确定可以按与校准测量类似的方式进行。在样本测量中,可以记录多个样本图像,其中光显微镜的检测光学器件对不同的高度平面成像。然后确定样本图像中最大清晰度的样本图像。然后使用与最大清晰度样本图像相对应的高度平面作为测量焦点位置。

[0061] 如果使用结构化照明,则焦点位置的确定也可以以简单的方式进行,所述结构化照明相对于检测光束路径横向地、特别是垂直地照射到样本。这在光片显微镜或光片荧光显微镜中尤其如此。结构化照明图案在样本区域中的位置取决于样本介质的折射率或校准测量中使用的介质的折射率。因此,也可以确定结构化照明图案的位置并将其用于确定折射率。因此,样本介质本身不需要包括产生图像对比度的结构。如果照明灯在样本中产生亮度对比度就足够了。结构化照明光可以在这方面通常被理解为具有在样本区域内的焦点。例如,可以使用具有圆形横截面的光束,其通过照明光学器件聚焦到样本区域中的某一范围中,所述范围的特征可以尤其在于其在 z 方向上的位置。根据(样本)介质折射率的不同,对于不同的 z 位置,不同清晰地成像结构。通过针对不同的 z 位置确定具有结构的最大清晰度的图像,可以将校准测量焦点位置模拟地导出到结构化样本。

[0062] 此外,取决于(样本)介质的折射率,照明光的焦点位置受到影响。检测方向横向于照明方向,使得照明光的焦点位置可以由记录的显微镜图像确定。在这种情况下,焦点位置不是 z 位置,而是照明光的行进方向 x 上的位置,即 x 位置,其中 x 方向和 z 方向彼此横向或垂直。还有更复杂的结构化照明,例如这里可以使用网格状照明。

[0063] 考虑到这些想法,可能优选的是,在至少一个校准测量中,将照明光作为结构化照明光照射到具有已知折射率的介质中,和/或将照明光作为结构化照明光照射到样本测量中的样本介质中。照明光束路径在此横向于检测光束路径,并且结构化照明光的横截面在结构化照明光的行进方向上变化。结构化照明光具有最小横截面的位置被用作焦点位置。

[0064] 在优选实施例中,结构化照明光是聚焦光束。照明光的照明光束路径因此可以横穿检测光的检测光束路径;照明光可以被聚焦到具有已知折射率的介质中和/或被聚焦到样本介质中;在校准测量中,在至少一个显微镜图像中确定照明光具有最小横截面的位置,并且此位置被用作校准测量焦点位置;和/或在样本测量中记录至少一个样本图像,并且在

此图像中确定照明光具有最小横截面的位置,并且将此位置用作样本测量焦点位置。

[0065] 如果进行至少两个校准测量,则这些校准测量可以至少在照射光的发射中以如下方式彼此不同:

[0066] -对于其中的一个校准测量,照明光的校准测量焦点位置在图像场中心前方的行进方向上,以及

[0067] -对于另一个校准测量,照明光的焦点在图像场中心后面的行进方向上。

[0068] 以此方式,校准测量覆盖了可能的焦点位置的相当大的范围,使得这里确定的参数适合于从已经在样本测量中确定的焦点位置导出折射率。上面提及的图像场中心可以视为用检测光学器件和相机设备记录的图像的中心点。

[0069] 在下文中,为了清楚起见,解释本文中使用的几个表述。

[0070] 波长相关折射率可以理解所述折射率可以针对不同的波长具有不同的数值。

[0071] 样本测量是指对样本介质的检验。与此相反,校准测量是指对另一种介质的检验。此介质与样本介质的不同之处在于其折射率(和折射率的波长相关性)是初始的/先前已知的。样本测量和校准测量可以各自包括多个图像记录,在这些图像记录之间,例如样本位置或照明或检测设置是变化的。原则上,相关的只是可以从样本测量或校准测量中确定照明光或检测光在样本区域内(即,在样本介质内或附近,或在具有已知折射率的介质内或附近)的焦点位置。

[0072] 检测光可以被理解为来自样本的光。检测光例如可以是在样本处散射、反射或衍射的照明光。或者,检测光也可以是或包括荧光或磷光。可以将荧光团例如所谓的珠(荧光球)或所谓的基准点(固定标记)添加到样本介质中以允许使用荧光灯进行焦点确定。

[0073] 上述数学模型通常表达了焦点位置对这里所研究的介质/样本介质的折射率的相关性。因此,模型可以包括等式,其至少包含焦点位置和折射率作为变量。如果执行校准测量,则可以使用相同的等式作为可以确定等式的常数的值的模型。然后将这个值用于样本测量。

[0074] 表述“样本”和“样本介质”可能是同义词。或者,表述“样本介质”可以指随后添加样本的介质。后一种变型有利于容易地确定样本介质中结构化照明光的传播和聚焦位置,而样本本身不影响聚焦的位置(在这种情况下会使分析更难)。

[0075] 一个物镜可以用于将照明光引导至样本并引导来自样本的检测光两者。取决于显微镜方法,对于照明光和检测光可以使用两个或更多个不同的物镜,其在本公开中也被称为照明物镜和检测物镜。在这种情况下,物镜也可以被理解为是照明物镜或检测物镜。

[0076] 相机设备可以是配置为记录空间分辨图像的任何装置/单元。相机设备因此可以例如包括一个或多个1D或2D的CCD或CMOS芯片。

[0077] 光显微镜的控制和评估单元原则上可以是任何类型的计算装置。这可以集成在光显微镜支架上或在光显微镜支架处,或者也可以与其间隔布置,例如在个人计算机或通过网络装置连接的计算机中。控制和评估单元尤其可以被配置为执行这里作为方法变体描述的本发明的实施例。

[0078] 因此,作为附加设备特征描述的本发明的特征也可以被认为是本发明方法的变体,反之亦然。

附图说明

- [0079] 下面参照附图描述本发明的其它优点和特征。
- [0080] 图1示出了本发明的光显微镜的第一示例性实施例。
- [0081] 图2示出了本发明的光显微镜的第二示例性实施例。
- [0082] 图3示出了图1的细节,其中示出了用于解释校准测量的照明光束路径的示意图。
- [0083] 总体上在附图中用相同的附图标记表示类似和类似作用的部件。

具体实施方式

- [0084] 图1中示意性地示出了本发明的光显微镜100的第一示例性实施例。
- [0085] 在这个示例中,光显微镜100被配置用于光片显微镜。在这种情况下,照明光束22到达样本区域所沿着的照明光束路径横向于检测来自样本区域的检测光所沿着的检测光束路径。
- [0086] 光显微镜100因此包括照明物镜20和不同于照明物镜20的检测物镜30。
- [0087] 待检验的样本介质位于样本室10中。作为示例,示出了检测物镜30浸没在样本室10中的样本介质中。
- [0088] 照明光源(这里未示出)的照明光22通过照明物镜20照射到样本介质中。样本介质中的照明光22的行进方向表示为x方向。横向或垂直于此,检测光经由物镜30在指示为z方向的方向上引导到相机设备(这里未示出)。检测光尤其可以是散射照明光或荧光。
- [0089] 照明光22与样本介质的折射率相关地在界面处被折射到样本介质。这在样本室10的边缘处示出,与照明物镜20相距距离d0。照明物镜20在样本介质中产生照明光22的焦点。这个与样本室10的边缘间隔开距离d1的焦点位置由附图标记25表示。焦点位置25取决于样本介质的折射率n1。
- [0090] 聚焦照明光22即减小照明光22的横截面不仅如图1所示在z方向上执行,而且在y方向上执行,即在图面的垂直方向上执行。y方向垂直于检测光束路径,以便可以记录在x方向和y方向上延伸的显微镜图像。作为照明光22的焦点位置25,可以确定x方向上其中照明光22的y延伸最小的位置。
- [0091] 照明灯22在此示例中可以具有圆环或圆形横截面。然而,只要可以确定焦点,也可以使用其它形状或图案。
- [0092] 对于光片显微镜,可以使用柱面透镜,其中照明光仅聚焦在z方向上。然而,在y方向上,照明光延伸以在样本介质中形成光片或薄照明层。为了可能确定焦点位置,在这种情况下,可以移除或更换进行样本测量的柱面透镜,使得照明光22也在y方向上聚焦。
- [0093] 焦点的x位置现在包含关于介质的折射率的信息:使用其中折射率n1的焦点位置25取决于(样本)介质的数学模型。在本示例中,焦点位置25是x位置并且因此也可以被称为Xmax。
- [0094] 例如,可以将以下等式用作数学模型:
- [0095]
$$X_{\max} = c \cdot n_1 + \text{Offset}$$
- [0096] 这里,c是与折射率n1相乘的常数,Offset是加上的常数。
- [0097] 例如,可以借助斯涅尔定律通过以下等式针对图1的布置说明常数c:
- [0098]
$$d_1 = [(r_0 - NA \cdot d_0) / NA] n_1 = c \cdot n_1$$

[0099] 这里, d_1 表示焦点位置 25 距离样本容器的边缘的距离, 而 d_0 表示照明物镜 20 到样本容器的边缘的距离。在距离 d_0 上应用折射率 n_0 , 并且在上述等式中针对空气选择 $n_0 = 1$ 。NA 是照明孔径, r_0 是照明光 22 在离开照明物镜 20 时的半径。

[0100] 上述等式中的常数 $Offset$ 尤其取决于图像场相对于相机设备的位置。

[0101] 两个常数 c 和 $Offset$ 可以是初始已经的和/或可以通过校准测量来确定, 如下面更详细描述。

[0102] 折射率 n_1 的知识对于具有特别高质量的图像记录非常重要。特别是如果折射率是波长相关的, 则折射率的确定对于照明光或检测光的暂时使用的波长是有利的。

[0103] 参考图 1, 已经针对适用于光片显微镜的光显微镜描述了焦点位置的确定。然而, 焦点位置也可以用于不同设计的光显微镜中。例如,

[0104] 图 2 示出了适用于反射光测量和/或通光测量的光显微镜 100。

[0105] 这种光显微镜 100 包括用于直线光测量的照明光源 40 和用于反射光测量的照明光源 50。照明光源 40 的照明光沿照明光束路径 41 经由可选提供的滤波器 42 引导至样本介质 12。穿过样本的照明光——此类照明光被称为检测光——沿着检测光束路径 61 通过检测物镜 44 和可选滤波器 62 被引导到相机设备 60。

[0106] 相反, 照明光源 50 的照明光以反射光布置引导到样本介质 12 上。为此, 照明光经由可选的分束器 45 被引导到与检测光共用的光束路径, 并且以这种方式通过物镜 44 引导到样本介质 12。样本介质 12 然后可以发出例如荧光作为检测光。然后检测光通过物镜 44 引导到相机设备 60。物镜 44 因此在此用作检测物镜并且也用作照明物镜。

[0107] 样本介质 12 在这种情况下包括结构化的样本。结构化样本可以理解为使得样本介质 12 在其横截面上不均匀地作用于照明光。以这种方式, 由相机设备 60 记录的图像包括对比度并允许确定图像清晰度。

[0108] 现在可以连续记录样本的不同高度平面的图像。高度平面将被理解为在检测光的方向上彼此偏移的层/平面。为了记录不同的高度平面, 可以移动样本, 例如可以改变照明光束路径或检测光束路径, 使得连续不同的高度平面被清晰地成像到相机设备上 (即, 连续地、不同的高度平面光学共轭到相机设备所位于的图像平面)。

[0109] 从这样记录的图像中, 现在可以确定焦点位置。例如, 可以从记录的图像中选择具有最大清晰度的图像。与此图像相对应的高度平面被认为是焦点位置。

[0110] 如已经参考图 1 的示例性实施例所描述的, 现在可以从焦点位置导出样本介质的折射率 n_1 。为此, 可以使用上文提及的等式, 其中焦点位置是图 2 的实施例中的 z 位置, 并且因此被称为 Z_{max} :

[0111] $Z_{max} = c * n_1 + Offset$

[0112] 取决于测量布置, 所确定的折射率 n_1 可以指照明或检测光的波长。如果图 2 的实施例用于荧光测量, 则确定检测光的焦点。折射率 n_1 在这种情况下指的是检测光。相反, 在图 1 的实施例中, 确定照明光的焦点位置, 并且因此确定的折射率 n_1 是指照明光。在通光测量中, 照明光和检测光可以具有相同的波长, 以使上述区别无用。

[0113] 在图 2 的实施例中, 使用结构化样本来确定记录图像的清晰度。或者, 也可以使用结构化照明。例如, 如参照图 1 所解释的, 结构化照明可以由聚焦照明光束形成, 所述聚焦照明光束在 x 方向上传播, 即横向或垂直于检测方向传播。如参考结构化样本所述, 此照明光

束现在也可在z方向上移位,或者检测光束路径被调整为连续测量几个高度平面。不同的高度平面将相对于照明光束来理解。以这种方式可以确定照明光束被聚焦的高度平面。这意味着确定z位置,在该位置处照明光束在y方向上具有最小的延伸。如上所述,基于所述焦点位置,可以确定样本介质的折射率。

[0114] 在下文中,描述校准测量。通过校准测量,可以确定等式的参数,使用这些参数来从测量的焦点位置导出折射率。在上述示例性等式中,这些参数是常数c和Offset。

[0115] 校准测量与样本测量的不同之处在于记录具有已知折射率n1的介质的一个或多个显微镜图像。然后从显微镜图像确定焦点位置Zmax或Xmax。因此,只有参数c和Offset是未知的并且需要确定。这两个参数例如可以通过两个校准测量来确定。或者,这些参数中的一个也可以用校准测量来确定,而另一个参数以另一种方式确定(特别是不用光显微镜)。

[0116] 下面参照图3描述图1的设置的校准测量。所述图再次示出照明光22,所述照明光22在y方向上聚焦并且照射通过样本区域,如参照图1所描述。检测物镜30再次垂直地测量,即沿z方向。

[0117] 图3示出了照明光22的四种不同情况a)至d),照射光22被照射到样本区域并穿过具有已知折射率的介质。

[0118] 理想地,照明光的焦点位置25Xmax应该位于图像场中心x1上,因为检测光束路径的光学部件通常为此设计。这种理想的情况a)在图3中示意性地示出。

[0119] 必须考虑到,在情况a)至d)中所描绘的光束22的变化厚度尤其是y厚度。光束22的y延伸经由检测物镜30确定。

[0120] 在样本介质中,焦点位置与样本介质折射率相关地偏离其图像场中心。例如,这在情况b)中示出,其中焦点位置26位于与x1有距离的x2处。

[0121] 情况c)和d)示出了两种不同的校准测量。这些测量可能例如在照明光的波长中彼此不同。布置在用于校准测量的样本区域中的介质可以具有与波长相关的已知折射率。由此,在情况c)和d)中,两个焦点位置27和28彼此不同。两个焦点位置27和28各自对应于属于相应折射率n1的值Xmax。使用上述等式 $X_{\max} = c \cdot n_1 + \text{Offset}$,现在确定两个常数c和Offset。代替不同波长的照明光,校准测量结果也可以在例如不同的照明方向和不同的照明变焦设置方面有所不同。这也会改变常数c和/或Offset,但是,可以计算这种改变,使得在这种情况下,还可以使用两个校准测量来针对某个照明方向或照明变焦设置来确定两个未知参数c和Offset。

[0122] 然后,可以将具有未知折射率的样本介质置于样本区域中。通过确定焦点位置并且使用所使用的数学模型的已知(特别是通过校准测量已知的)常数,可以很容易确定样本介质的折射率。然后,可以将样本放置在样本介质中。或者,可以在确定焦点位置之前将样本添加到样本介质中。

[0123] 了解样本介质的折射率,可以有利地调整后续检验,从而提高图像记录的质量。例如,可以移动照明光学器件或者可以横向偏移物镜。

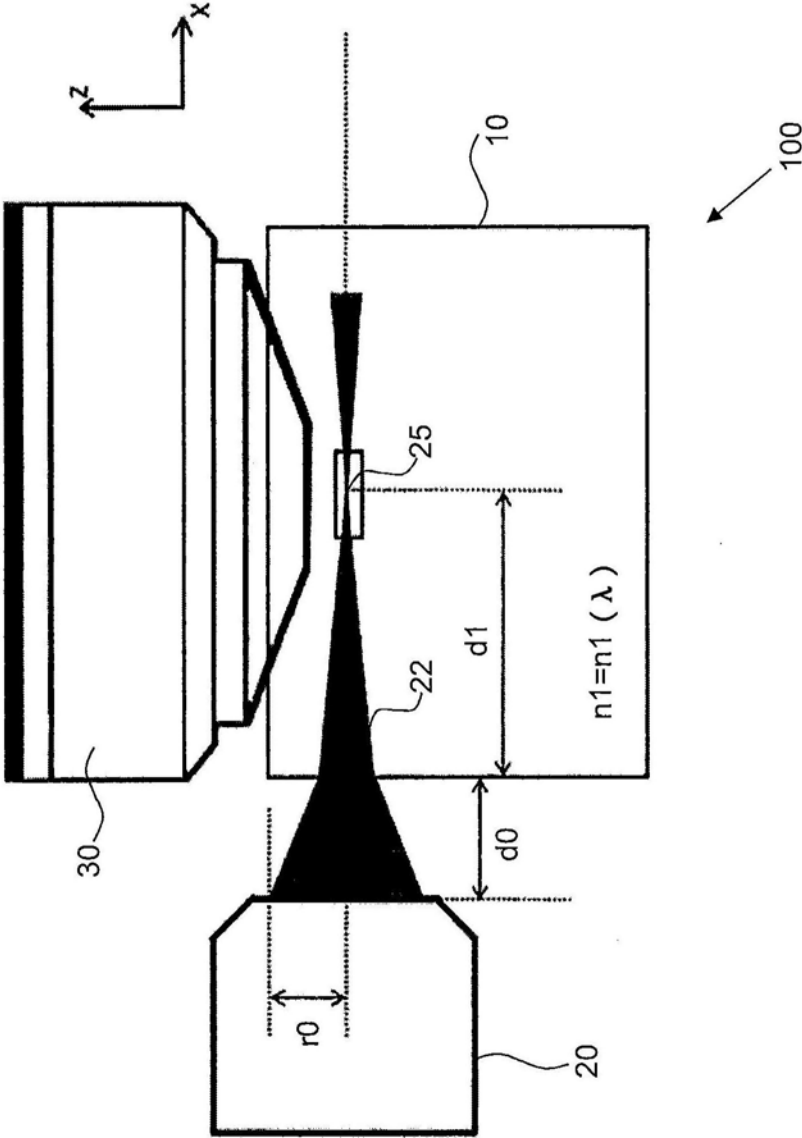


图1

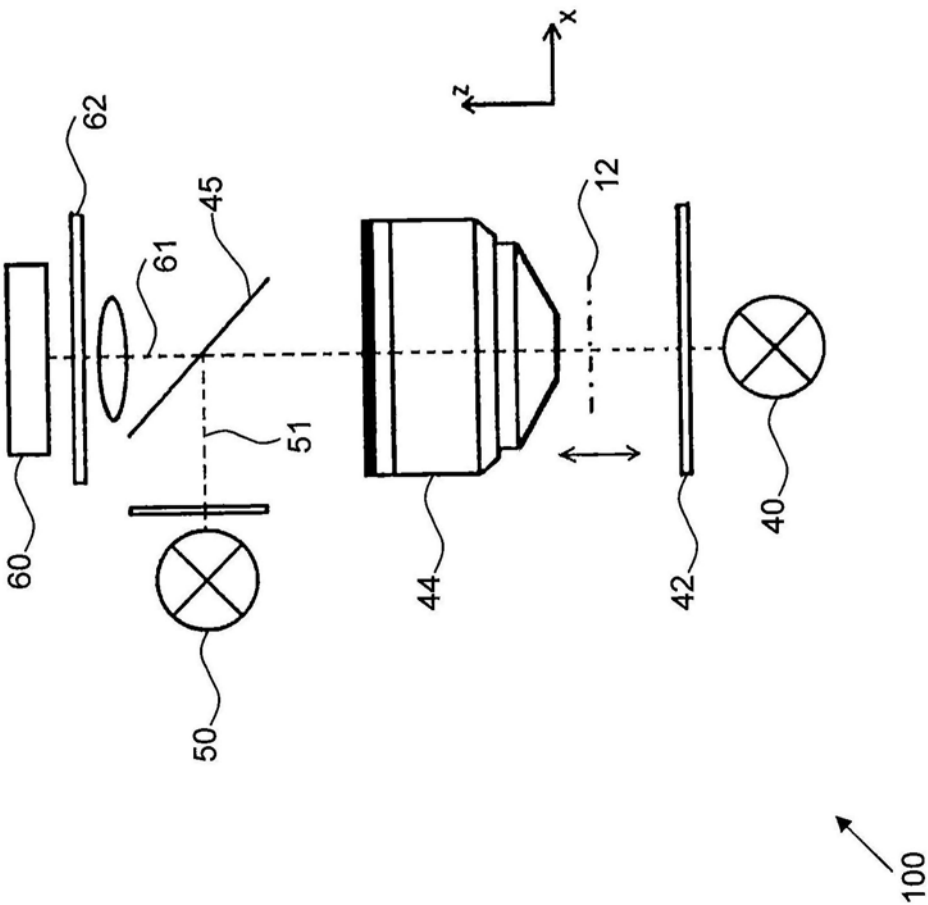


图2

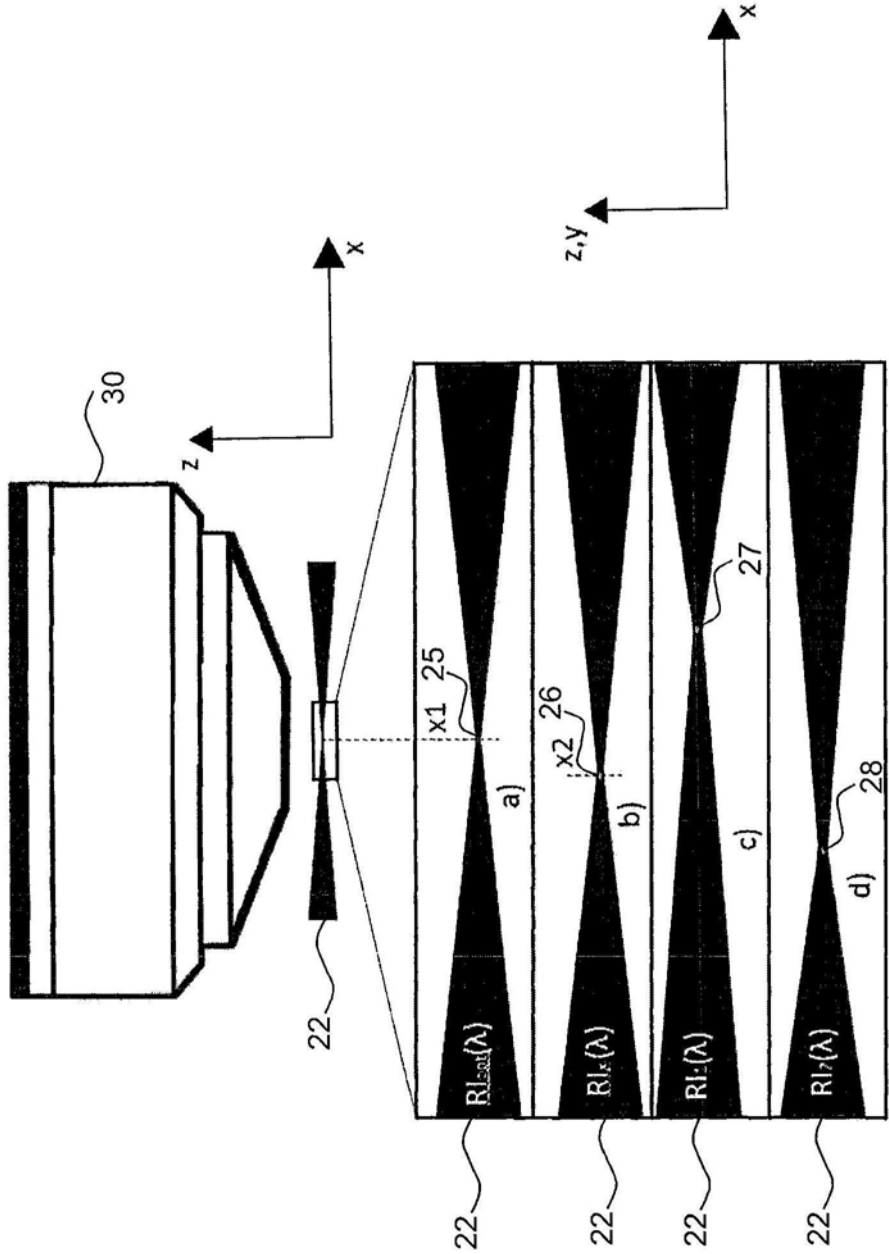


图3