



(21) 申请号 202180058676.4

(22) 申请日 2021.07.29

(30) 优先权数据

102020120190.7 2020.07.30 DE

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.01.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2021/071269 2021.07.29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/023474 DE 2022.02.03

(71) 申请人 卡尔蔡司显微镜有限责任公司

地址 德国耶拿

(72) 发明人 丹尼尔·施韦特 蒂莫·安胡特

彼得·沙赫特

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
责任公司 11219

专利代理师 杨靖 韩毅

(51) Int.Cl.

G01N 21/64 (2006.01)

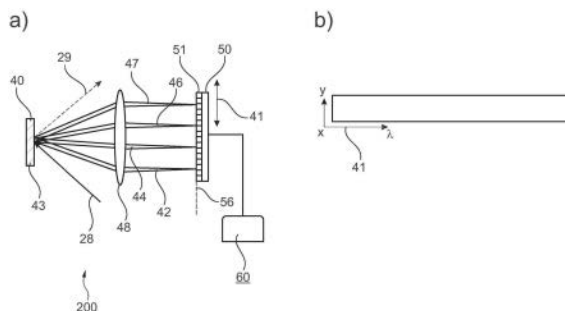
权利要求书5页 说明书19页 附图11页

(54) 发明名称

探测发射光的方法、探测设备和激光扫描显微镜

(57) 摘要

本发明涉及用于在激光扫描显微镜中探测发射光、尤其是来自至少一种荧光染料的荧光的方法,其中,利用成像光学器件将来自样品的发射光引导到位于图像平面中的具有多个像素的二维矩阵传感器上,其中,利用矩阵传感器以空间超采样的方式探测探测点分布函数。该方法的特征在于,利用色散装置尤其是在色散方向上对来自样品的发射光进行光谱分解,利用矩阵传感器对经光谱分解的发射光进行光谱分辨式探测,并且在评估由像素区域的像素测得的强度时,至少针对这些像素中的一些像素取消光谱分离。在另外的方面中,本发明涉及用于在激光扫描显微镜中以光谱分辨方式探测发射光的探测设备,并涉及激光扫描显微镜。



1. 用于在激光扫描显微镜中探测发射光 (28)、尤其是来自至少一种荧光染料的荧光的方法, 其中, 利用成像光学器件 (48) 将来自样品 (S) 的发射光 (28) 引导到位于图像平面 (56) 中的具有多个像素 (51) 的二维矩阵传感器 (50) 上,

其中, 利用所述矩阵传感器 (50) 以空间超采样的方式探测探测点分布函数,

其特征在于,

利用色散装置 (40) 尤其是在色散方向 (41) 上对来自样品 (S) 的发射光 (28) 进行光谱分解,

利用所述矩阵传感器 (50) 对经光谱分解的发射光 (42、44、46、47) 进行光谱分辨式探测, 并且

在评估由像素区域 (71、72) 的像素 (i, j) 测得的强度 ($I_{i,j}; g_{i,j}$) 时, 至少针对这些像素 (i, j) 中的一些像素取消光谱分离。

2. 根据权利要求1所述的方法,

其特征在于,

根据利用所述矩阵传感器 (50) 测得的光谱来识别至少一个被分配给染料的发射的像素区域 (71、72)。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,

其特征在于,

为了确定所述矩阵传感器 (50) 上的发射光的光谱强度分布 ($sp(\lambda)$ 、 sp_i), 通过如下方式确定属于确定的波长 (λ_i) 的强度值 ($sp(\lambda)$ 、 sp_i), 即, 将所述矩阵传感器 (50) 的垂直于色散方向 (41) 的列 (i) 的多个像素 (i, j) 的测量数据 ($I_{i,j}; g_{i,j}$) 进行求和, 尤其是所述矩阵传感器 (50) 的垂直于色散方向 (41) 的列 (i) 的所有像素 (i, j) 的测量数据进行求和。

4. 根据权利要求2或3所述的方法,

其特征在于,

为了识别所述像素区域 (71、72), 在所获知的光谱分布中自动化搜索最大量 (mx1、mx2) 和最小量 (mi),

并且

基于所找到的最大量 (mx1、mx2) 和最小量 (mi) 向用户建议用于计算确定的染料的点分布函数的光谱边界, 或

基于所找到的最大量 (mx1、mx2) 和最小量 (mi) 自动规定光谱边界。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,

其特征在于,

所述像素区域 (71、72) 在所述矩阵探测器 (50) 上重叠, 并且对由各个像素测得的强度执行光谱解混。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,

其特征在于,

针对至少一种荧光染料确定探测点分布函数。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法,

其特征在于,

将由多个利用激发光 (14) 同时照射在样品 (S) 上的点射出的发射光 (28) 同时引导到所

述矩阵传感器(50)上并进行评估。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法，

其特征在于，

所述矩阵传感器(50)在光子计数模式下运行。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的方法，

其特征在于，

为了针对像素区域(71、72)的各个像素(i, j)取消光谱分离，在考虑到属于像素区域(71、72)的染料的发射光的光谱强度分布($sp(\lambda)$ 、 sp_i)的情况下并在考虑到所述矩阵传感器(50)上各个光谱部分的空间强度分布(I_i^{cal})的情况下，使由这些像素(i, j)测得的强度值($I_{i,j}$)相互抵消。

10. 根据权利要求9所述的方法，

其特征在于，

将如下强度分布(I_i^{cal})作为各个光谱部分的空间强度分布使用：所述强度分布由垂直于色散方向(41)的列(i)的像素(i, j)测得，尤其是由在各自的像素区域(71、72)中测得最高强度的那个列(i)的像素测得。

11. 根据权利要求1至8中任一项所述的方法，

其特征在于，

为了针对像素区域(71、72)的各个像素(i, j)取消光谱分离，将由所述像素(i, j)测得的强度值($g_{i,j}$)分配给图像平面(56)中的相对于各自的像素(i, j)移位了的位置(像素再分配)，其中，移位矢量($d_{i,j}$)依赖于各自的像素(i, j)的位置并依赖于属于该位置的波长(λ)。

12. 根据权利要求11所述的方法，

其特征在于，

针对确定的像素(i, j)的移位矢量($d_{i,j}$)的不依赖于波长的部分通过将参考像素(12,3)到有关像素(i, j)的矢量($g_{i,j}$)的矢量分量以再分配系数、尤其是以-1/2进行缩放来获得。

13. 根据权利要求11或12所述的方法，

其特征在于，

在执行像素再分配后得到的探测点分布函数在色散方向(x 、41)上与垂直于色散方向(y)基本上具有相同的形状。

14. 根据权利要求11所述的方法，

其特征在于，

属于与样品结构相配属的波长范围的移位矢量($d_{i,j}$)通过评估多个扫描图像的相位相关性来确定。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的方法，

其特征在于，

利用所述矩阵传感器(50)、例如利用所述矩阵传感器(50)的一些像素并且尤其是利用所述矩阵传感器(50)的每个单像素执行时间分辨式测量，用以确定染料的荧光寿命。

16. 用于在激光扫描显微镜中探测发射光的探测设备，所述探测设备尤其是用于执行根据权利要求1至15中任一项所述的方法，所述探测设备

具有在图像平面(56)上具有多个像素(51)的二维矩阵传感器(50),所述二维矩阵传感器用于以空间超采样的方式探测来自样品(S)的发射光(28)的探测点分布函数,

并且还具有成像光学器件(48),所述成像光学器件用于将所述发射光(28)引导到所述二维矩阵传感器(50)上,

其特征在于,

为了对所述发射光(28)进行光谱分离,存在有色散装置(40),所述矩阵传感器(50)被设立和定位成用于对经光谱分离的探测光(42、44、46、47)进行光谱分辨式探测,并且

存在与所述矩阵传感器(50)连接的评估电子器件(60),所述评估电子器件被设立成用于在评估由像素区域(71、72)的像素(i,j)测得的强度($I_{i,j}; g_{i,j}$)时针对这些像素(i,j)取消光谱分离。

17. 根据权利要求16所述的探测设备,

其特征在于,

所述评估电子器件(60)被设立成用于为了取消光谱分离而在考虑到针对属于像素区域(71、72)的染料的发射光的光谱强度分布($sp(\lambda)$ 、 sp_i)的情况下并在考虑到所述矩阵传感器(50)上各个光谱部分的空间强度分布(I_i^{cal})的情况下,使由像素区域(71、72)的像素(i,j)测得的强度值($I_{i,j}$)相互抵消。

18. 根据权利要求16或17所述的探测设备,

其特征在于,

所述评估电子器件(60)被设立成用于为了取消针对像素区域(71、72)的各个像素(i,j)的光谱分离而将由所述像素(i,j)测得的强度值($g_{i,j}$)分配给图像平面(56)中的相对于各自的像素(i,j)移位了的位置(像素再分配),其中,移位矢量($d_{i,j}$)依赖于各自的像素(i,j)的位置并依赖于属于该位置的波长(λ)。

19. 根据权利要求16至18中任一项所述的探测设备,

其特征在于,

所述色散装置(40)具有光衍射装置和/或光折射装置,尤其是光栅(43)和/或棱镜。

20. 根据权利要求16至19中任一项所述的探测设备,

其特征在于,

所述矩阵传感器(50)具有模拟积分探测器和/或光子计数探测器,尤其是sCMOS相机、EMCCD相机和/或(CMOS) SPAD阵列。

21. 根据权利要求16至20中任一项所述的探测设备,

其特征在于,

色散方向(41)在所述矩阵传感器(50)的坐标方向(x)的方向上。

22. 根据权利要求16至21中任一项所述的探测设备,

其特征在于,

在所述矩阵传感器(50)、尤其是SPAD阵列的前面布置有微透镜,用以提高探测效率。

23. 根据权利要求16至22中任一项所述的探测设备,

其特征在于,

所述矩阵传感器(50)的平面内的探测点分布函数的艾里斑的直径小于所述矩阵传感器(50)的20倍的光栅常数。

24. 根据权利要求16至23中任一项所述的探测设备，
其特征在于，

所述矩阵传感器(50)在色散方向(41)上的每个像素(51; (i, j))的光谱带宽小于0.5nm, 优选小于0.4nm, 特别优选小于0.3nm。

25. 根据权利要求16至24中任一项所述的探测设备，
其特征在于，

所述成像光学器件(48)具有变焦系统。

26. 根据权利要求16至25中任一项所述的探测设备，
其特征在于，

所述矩阵传感器(50)和所述评估电子器件(60)，尤其为了确定染料的荧光寿命，被设立成用于例如利用所述矩阵传感器(50)的一些像素且优选是利用所述矩阵传感器(50)的每个单像素执行时间分辨式测量。

27. 激光扫描显微镜，

所述激光扫描显微镜尤其是用于执行根据权利要求1至15中任一项所述的方法，所述激光扫描显微镜具有：

光源(12)，尤其是激光器，所述光源用于发出激发光(14)，

具有显微镜物镜(24)的激发光路(10)，所述激发光路用于将所述激发光(14)引导到待检的样品(S)上或其中，

在激发光路(10)中的扫描装置(22)，所述扫描装置用于扫描在所述样品(S)上的至少一个照明斑点(27)，

探测光路(30)，所述探测光路用于将从所述样品(S)射出的发射光(28)、尤其是荧光引导到探测单元(32)上，

用于检测所述发射光(28)的探测单元(32)，

用于将激发光(14)和发射光(28)分开的主分色分器(18)，和

控制和评估单元(34)，尤其是PC，所述控制和评估单元用于驱控所述光源(12)并用于评估由所述探测单元(32)获得的测量数据，

其特征在于，

所述探测单元(32)具有根据权利要求16至26中任一项所述的探测设备(200)。

28. 根据权利要求27所述的显微镜，

其特征在于，

所述控制和评估单元(34)被设立成

用于搜索在所获知的光谱分布($sp(\lambda)$ 、 sp_i)中的最大量($mx1$ 、 $mx2$)和最小量(mi)，

并且用于基于所找到的最大量($mx1$ 、 $mx2$)和最小量(mi)建议用于计算确定的染料分布函数的光谱边界，或

用于基于所找到的最大量($mx1$ 、 $mx2$)和最小量(mi)自主规定用于计算确定的染料分布函数的光谱边界。

29. 根据权利要求27或28所述的显微镜，

其特征在于，

所述控制和评估单元(34)与所述探测设备(200)一起被设立成用于实施根据权利要求

1至12中任一项所述的方法。

探测发射光的方法、探测设备和激光扫描显微镜

技术领域

[0001] 在第一方面,本发明涉及一种根据权利要求1的前序部分所述的用于在激光扫描显微镜中探测发射光、尤其是来自至少一种荧光染料的荧光的方法。在另外的方面,本发明涉及一种根据权利要求16的前序部分所述的用于在激光扫描显微镜中探测发射光的探测设备和一种根据权利要求27的前序部分所述的激光扫描显微镜。

背景技术

[0002] 按类属的用于在激光扫描显微镜中探测发射光、尤其是来自至少一种荧光染料的荧光的方法例如在M.Castello等人的“Image Scanning Microscopy with Single-Photon Detector Array (用单光子探测器阵列进行图像扫描显微镜检查)”,bioRxiv,doi:<http://dx.doi.org/10.1101/335596> (以下称:[2019年Castell等人])公开。在此,利用成像光学器件将来自样品的发射光引导到位于图像平面中的二维矩阵传感器上,该二维矩阵传感器具有多个像素,并且利用矩阵传感器以空间超采样的方式探测探测点分布函数。

[0003] 同样在[2019年Castell等人]中公开了一种按类属的用于在激光扫描显微镜中探测发射光的探测设备。按类属的探测设备具有在图像平面内的具有多个像素的二维矩阵传感器,以用于以空间超采样的方式探测来自样品的发射光的探测点分布函数,以及具有用于将发射光引导到二维矩阵传感器上的成像光学器件。

[0004] 同样在[2019年Castello等人]中描述了一种按类属的激光扫描显微镜,并且其具有以下部件:用于发出激发光的光源、尤其是激光器;具有显微镜物镜的激发光路,其用于将激发光引导到待检的样品上或引导到其中;在激发光路中的扫描装置,其用于扫描样品上的至少一个照明斑点;探测光路,其用于将从样品射出的发射光、尤其是荧光引导到探测单元上;主分色器,其用于将激发光和发射光分开;探测单元,其用于检测发射光;控制和评估单元,尤其是PC,其用于驱控光源并用于评估从探测单元得到的测量数据。

[0005] 在生物医学研究中,共焦激光扫描显微镜(LSM)在过去的几十年里已经确立了自己作为强大工具的地位,这是因为它们除了对发荧光的生物样品进行纯粹的成像之外,还支持许多基于图像的、相关联的或统计学上的实验和分析。这种能力的主要原因是,利用LSM可以用适度的仪器技术方面的花费同时测量多种染料。为此已知有许多解决方案。例如,可以利用二色性滤光片将光束分裂成不同的部分光束,然后将这些部分光束分别例如输送给作为传感器的光电倍增管(英文:Photomultiplier Tube-PMT)。而组件是更灵活的,这些组件利用光栅或棱镜对发射光进行光谱色散,以便然后利用行传感器探测光谱。不期望的光谱范围可以利用传感器前面的能运动的光阑灵活地且依赖于染料地被阻断。此外,也已知有如下解决方案,其中,例如利用镜面反射的光阑来限定光谱带,然后将这些光谱带输送给不同的PMT。在这里和下文中,术语“染料”不仅包括合成染料而且还包括发荧光的蛋白质。此外,还应包括内在发射的结构。例如,许多生物结构在确定的波长的激光射入的情况下将发光,于是这例如被称为自发荧光。

[0006] 虽然在大约30年前就有理论上描述的但直到2014年才利用蔡司公司的LSM880实

现商业化的共焦显微镜系统的创新是所谓的图像扫描显微镜(image scanning microscopy) (ISM; http://www.gattaquant.com/files/en_wp_airyscan-detector.pdf)。它基于利用类似相机的传感器以超采样的方式测量探测点分布函数,并且一方面能够实现尽管针孔开放,但仍达到共焦的分辨率极限,并且另一方面经由对探测的内在并行化明显提高了系统的灵敏度。然而,如今在LSM980中实施的解决方案一方面是非常昂贵的,这是因为基于光纤的图像转换(从2D到1D)与GaAsP-PM-行探测器相结合。另一方面,因此严重限制了可以用于对点分布函数(PSF)进行超采样的像素数量。在具体情况中,正好是32个像素。因此,这些传感器只能有意义地被用在借助二色性滤光片来限定光谱通道的组件中,并且在这些组件中还需要光学变焦,利用该光学变焦,使得依赖于所选物镜(更准确地说是光导率和NA/M比率)和波长的PSF被引导到传感器。此外,这种探测器技术的单件成本几乎不允许每个仪器安装一个以上的探测器。

[0007] 在传感器方面,近年来在所谓的SPAD阵列或SPAD相机(SPAD=Single-photon avalanche diode,单光子雪崩二极管)领域中已经呈现出快速发展。原则上,这些相机能够实现对像素进行独特激活,其中,一个像素在此由单独的单光子雪崩二极管实现。此外,像素可以在所谓的盖革模式下运行,从而在面传感器上可以进行光子计数。因此,使得所读取的信号是立即数字化的,这就能够实现极高的在1MHz左右的范围内的帧频。此外,SPAD相机不具有读取噪声。读取噪声尤其发生在其他传感器上,如sCMOS传感器或CCD,并随着高读取率而强烈增加。EM-CCD采用靠近传感器的放大机制,以便提高信号超过读取噪声,并因此原则上可以成为单光子敏感。然而,在此引入了显著的放大噪声(其也被称为过量噪声;乘法噪声),该放大噪声使传感器的有效灵敏度减半。此外,在像素数量更高的情况下从根本上限制了所能实现的速度。sCMOS相机实现了0.3e范围内的较低的读出噪声,这原则上允许利用这些相机进行光子计数。

[0008] 由于帧频在MHz范围内,使得作为用于LSM的传感器的SPAD相机已经变得很有意义,其像素停留时长在1 μ s范围内。例如,利用这样的相机以传感器分辨率为512 $\times$ 128个像素在数据深度为1bit的情况下实现了156kfps(fps=frames per second,帧每秒)。这相当于约10Gbit的数据速率。这意味着,具有大约1000 $\times$ 6个像素的行传感器甚至应该能在1bit数据深度的情况下实现1Mfps的帧频。目前,这些限制还没有达到根本上的极限,而是更确切地说在技术上由巨大的数据速率来确定。在只有一个bit的数据深度的情况下,能实现的速度大约相当于死区时间的倒数,并因此位于10MHz的范围内。然而,对于上面的示例,这将相当于100Gbit/s的数据速率。

发明内容

[0009] 可以被视为本发明的一个任务是,提供一种上述类型的方法,该方法能特别多样性地使用。此外,还应说明一种合适的探测设备和一种激光扫描显微镜。

[0010] 该任务通过具有权利要求1的特征的方法、具有权利要求13的特征的探测设备和具有权利要求23的特征的激光扫描显微镜来解决。

[0011] 根据本发明的方法的有利的变体以及根据本发明的探测设备的和根据本发明的显微镜的优选实施例将在下文中尤其是与从属权利要求书和附图相关联地进行阐述。

[0012] 根据本发明,上述类型的方法通过如下方式进行改进,即,利用色散装置尤其是在

色散方向上对来自样品的发射光进行光谱分解,利用矩阵传感器对经光谱分解后的发射光进行光谱分辨式探测,并在评估由像素区域的像素所测得的强度时,至少是针对这些像素中的一些像素取消光谱分离。

[0013] 根据本发明,上述类型的探测设备通过如下方式改进,即,存在色散装置,用以对发射光进行光谱分离,设立且定位有矩阵传感器,用以以光谱分辨方式探测经光谱分离的探测光,并且存在与矩阵传感器连接的评估电子器件,该评估电子器件被设立成用于在评估由像素区域的像素测得的强度时针对这些像素取消光谱分离。

[0014] 根据本发明,上述类型的激光扫描显微镜通过如下方式改进,即,使得探测单元具有根据本发明的探测设备。

[0015] 可以被视为本发明的基本思路是,对来自样品的发射光进行光谱分离,从而使得不同的荧光染料的光谱部分原则上首先撞击到矩阵传感器的不同的、即空间上分开的区域上。对这些区域进行识别,并分别与一种荧光染料相配属。然后,至少针对各自区域中的其中一些像素,对光谱分开进行计算回溯,从而可以原则上与已知的ISM一样针对各个荧光染料获知点分布函数。因此,针对不同的荧光染料,可以测量各自的点分布函数。在任何情况下,针对那些测得明显强度的像素,都适宜地执行光谱分开。

[0016] 可以被视为本发明的重要优势是,既可以实现光谱灵活性的优点,又可以达到通过超采样点分布函数在分辨率和灵敏度方面所实现的效果。

[0017] 因此,根据本发明的方法、根据本发明的探测设备和根据本发明的显微镜还能够实现使ISM也具有光谱色散的信号分布。此外,根据本发明的探测设备和根据本发明的显微镜的特征在于,可以实现特别高的光效率和整体稳定的布置。

[0018] 根据本发明的探测设备尤其适用于执行根据本发明的方法。

[0019] 术语“探测点分布函数”是指探测器上的由点状发光的对象在样品平面中产生的强度分布。

[0020] 属于不同染料的像素区域原则上也可能在探测器上重叠。使得至少对像素区域进行一定的空间上的分开是重要的。明显的是,像素区域分开得越清楚,或者各自的染料的光谱特性区别越大,评估就越容易且越好。

[0021] 根据本发明的激光扫描显微镜且尤其是控制和评估单元可以与探测设备一起被设立成用于执行根据本发明的方法。

[0022] 下文将解释可以如何执行对光谱分离进行计算回溯的一些示例。

[0023] 在该方法的一个特别优选的变体中,根据利用矩阵传感器测得的光谱来识别至少一个被分配给一个染料的发射的像素区域。

[0024] 适宜地,首先获知发射光在矩阵传感器上的光谱强度分布。然后,基于该强度分布可以例如识别像素区域。此外,该强度分布可以被用于对光谱分离进行计算回溯。在根据本发明的方法的一个特别优选的变体中,为了确定发射光在矩阵传感器上的光谱强度分布,通过如下方式确定属于确定的波长的强度值,即,将垂直于色散方向的矩阵传感器的一列的多个像素的测量数据、尤其是矩阵传感器一列的所有像素的测量数据进行求和。

[0025] 这些涉及发射光的光谱强度分布的数据例如在测量环境发生变化之后可以被自动重新获知。被视为测量环境的变化尤其是待检的样品的变化,必要时也是被检的样品位置的变化,这些待检的样品或被检的样品位置必要时可以用不同的染料进行制备。

[0026] 补充或附加地可以设置的是,涉及光谱分布的数据被连续地且尤其是自动地从待规定数量的尤其是刚刚前面的测量中获知。该变体具有的优点是,不需要单独启动数据采集。

[0027] 应理解,对于在此描述的所有评估来说,将多个测量数据相加,以便达到更好的信噪比。如果有必要,使得为了获取期望的数据而被求平均的测量次数可以不同。

[0028] 在根据本发明的方法的另外的优选的变体中,然后为了识别像素区域,在所获知的光谱分布中自动化搜索最大量和最小量,并且可以基于所找到的最大量和最小量向用户建议用于计算确定的染料的点分布函数的光谱边界。替选地,也可以基于所找到的最大量和最小量自动规定光谱边界。因此,在根据本发明的显微镜中,控制和评估单元可以被设立成用于搜索在所获知的光谱分布中的最大量和最小量,并用于基于所找到的最大量和最小量来建议用于计算确定的染料的点分布函数的光谱边界。替选地,控制和评估单元可以被设立成用于自主地规定光谱边界,以用于基于所找到的最大量和最小量来计算确定的染料的点分布函数。

[0029] 利用根据本发明的方法和根据本发明的显微镜也可以对具有光谱重叠的染料或发荧光的蛋白质的样品进行成像和测量。

[0030] 在根据本发明的方法的一个优选的变体中,像素区域在矩阵探测器上重叠,并且对由各个像素测得的强度执行光谱解混。原则上,光谱解混或“光谱解混合(spectral unmixing)”的方法是已知的。

[0031] 除了在此描述的用于取消光谱分裂的方法外,还可以在取消光谱分裂之前或之后执行这样的用于光谱解混(“光谱解混合”)的方法。

[0032] 例如,首先可以针对自由选择的光谱带的数量(在两种染料的情况下,典型地是两个具有纯发射的区域和一个具有重叠发射的区域)执行对色散的取消,然后可以应用图像扫描显微镜,并然后对(在示例中是三个的)通道进行解混。

[0033] 利用该措施可以在一个像素中确定确定的光谱分量的相对份额。这意味着,例如根据用于像素再分配的规范(见下文),不移位像素的整个强度,而只移位经加权的部分。根据本发明的组件可以用来采集相应的参考光谱。然后在下一步骤中例如可以进行逐行的光谱解混,并确定各自的光谱权重,由此得到光谱的经加权的部分。除了光谱解混合的方法外,还有另外的用于分开光谱部分的措施,例如PCS、SCA,以及使用“深度学习(deep learning)”。

[0034] 根据本发明的方法尤其可以被用于针对至少一种荧光染料确定探测点分布函数。然而,本发明的特别优点是,也有可能的是,从一次测量的测量数据中确定针对具有不同发射光谱的多种染料的探测点分布函数。

[0035] 如果所使用的矩阵传感器的尺寸、具体是该矩阵传感器的像素数量允许,则原则上根据本发明的方法的多点变体也是可能的。在此,将由多个利用激发光同时照射在样品上的点射出的发射光同时引导到矩阵传感器上并进行评估。激发光路和探测光路在此需要被设立成用于多斑点激发和多斑点探测。

[0036] 在针对像素区域的各个像素取消光谱分离的第一优选变体中,在考虑到属于该像素区域的染料的发射光的光谱强度分布的情况下并在考虑到矩阵传感器上各个光谱部分的空间上的强度分布的情况下,使由这些像素测得的强度值相互抵消。

[0037] 因此对应地,根据本发明的探测设备的评估电子器件可以被设立成用于在考虑到属于像素区域的染料的发射光的光谱强度分布的情况下并在考虑到矩阵传感器上各个光谱部分的空间上的强度分布的情况下,使由该像素区域的像素测得的强度值相互抵消,用以取消光谱分离。

[0038] 各个光谱部分的空间上的强度分布决定了染料的点分布函数的在矩阵传感器上相对彼此移位的光谱部分在色散方向上的空间重叠程度。

[0039] 在此可以使用如下强度分布作为各个光谱部分的空间上的强度分布:该强度分布从垂直于色散方向的一列的像素中测得,尤其是从在各自的像素区域中测得最高强度的那个列中测得。这基于如下假设:矩阵传感器上的探测点分布函数是旋转对称的,即是圆形的。如果使用旋转对称的光学器件,这就是很好的假设。

[0040] 在另一组重要的方法变体中,针对像素区域的各个像素取消光谱分离通过对像素再分配来完成。对于非光谱分辨的方法来说,这方面从图像扫描显微镜 (ISM) 中已知,例如参见[2019年Castello等人]。

[0041] 因此,根据本发明的探测设备的评估电子器件可以被设立成用于将由像素测得的强度值分配给图像平面中的相对于各自的像素移位了的位置(像素再分配),用以针对像素区域的各个像素取消光谱分离,其中,移位矢量依赖于各自的像素的位置并依赖于属于该位置的波长。

[0042] 在这些方法变体中,将由像素测得的强度值分配给图像平面中相对于各自的像素移位了的位置(像素再分配),用以针对像素区域的各个像素取消光谱分离。与已知的像素再分配一样,移位矢量在此依赖于各自的像素的位置,但在此附加地还依赖于属于该位置的波长。

[0043] 具体来说,为每个像素确定一个移位矢量,用于像素再分配,该移位矢量依赖于有关像素的位置并依赖于属于该有关像素的波长。然后,将针对该有关像素测得的强度值分配给相对于该有关像素被移位了该移位矢量的位置。

[0044] 针对确定的像素的移位矢量的不依赖于波长的部分例如可以通过将从参考像素到有关像素的矢量的分量用再分配系数进行缩放来获得。假设用于激发和发射的点分布函数是相同的(忽略斯托克斯偏移),将得到-1/2的再分配系数,也就是说,从确定的像素测得的强度值将配属于图像平面中的正好处于从参考像素到有关像素的线路的中间的位置。

[0045] 尤其地,像素再分配如下这样地执行,即,使获得的探测点分布函数在色散方向上与垂直于色散方向基本上具有相同的形状。这基于这样的假设,即,在使用旋转对称的光学器件时,探测点分布函数必须具有圆对称的强度分布。

[0046] 然而还存在获得相应的移位矢量的另外的方法。例如,属于与样品结构相配属的波长范围的移位矢量可以通过评估多个扫描图像的相位相关性来确定。

[0047] 在根据本发明探测设备中,可以使用模拟积分的探测器和/或光子计数的探测器作为矩阵传感器。优选使用sCMOS相机、EMCCD相机和/或电荷积分传感器。特别有利地,矩阵传感器具有SPAD相机,或者使用SPAD相机作为矩阵传感器。特别优选地,矩阵传感器、尤其是SPAD相机,在光子计数模式下运行,其中,可以对各个光子进行计数。也被称为“盖革模式”的该模式的特征在于具有特别有利的信噪比。

[0048] 最近,所使用的传感器的成本大大降低,这对本发明特别有利。在此描述的组件借助传统的PMT技术与光纤耦合的情况下是很难想象的。

[0049] 尤其地,在根据本发明的探测设备中,可以使用光衍射装置和/或光折射装置作为色散装置。特别优选地,色散装置具有光栅、尤其是刻线光栅,和/或具有棱镜。原则上也可以使用棱栅(Grisma),即棱镜和光栅的组合。可调或可控的元件,如DMD(DMD=Digital Micromirror Device,数字微镜装置)、MEMS(MEMS=microelectron-mechanical systems,微机电系统)或SLM(SLM=Spatial Light Modulator;德语:Flächenlichtmodulator,空间光调制器)同样是有可能的。

[0050] 在根据本发明的探测设备的一个特别优选的变体中,色散方向与矩阵传感器的坐标方向一致且尤其是与之平行。例如,在色散方向上的像素可以被称为像素行,而垂直于色散方向的像素可以被称为像素列。矩阵传感器的取向是如下这样的,即,使得色散方向与像素行的方向平行,这具有的优点是,使得像素列中的像素分别属于完全相同的波长范围,或者简单地说,属于完全相同的波长。

[0051] 关于矩阵传感器的规格确定和/或矩阵传感器上的光学成像方面优选的是,矩阵传感器的像素间距(原则上是光栅常数)被选择成大于矩阵传感器的平面内的探测点分布函数的艾里斑宽度在染料的光谱带宽上的变化。此外在这方面优选的是,矩阵传感器和/或矩阵传感器上的光学成像被如下这样地确定规格,即,使得矩阵传感器在色散方向上的每个像素的光谱带宽小于0.5nm,优选小于0.4nm,特别优选小于0.3nm。这些设计方案能够在计算点分布函数方面,具体来说在执行离散去卷积方面实现简化计算的假设。更准确地说,可以良好近似地假定,在染料的光谱走向中,艾里斑的宽度基本上不依赖于波长。尽管如此,还是达到了足够的光谱分辨率。

[0052] 特别优选地,矩阵传感器和/或矩阵传感器上的光学成像还可以如下这样地确定规格,即,使得探测点分布函数在矩阵传感器平面上的艾里斑的直径小于矩阵传感器的20倍的光栅常数,特别优选的是小于7倍的光栅常数,并且特别优选的是小于5倍的光栅常数。在该规格确定中,离散去卷积的计算可以有利地被限制在相对较少的波长上,即被限制在与各自的艾里斑所覆盖的像素数相应的那个数量。

[0053] 优选地,矩阵传感器上的艾里斑的直径可以大于三倍的光栅常数,从而最后可以执行等同于ISM最后阶段的方法。

[0054] SPAD阵列传感器尤其适用于借助TCSPC(time correlated single photon counting,时间相关单光子计数)或“直方图”或“时间窗探测”测量荧光寿命信息(FLIM=Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy,荧光寿命成像显微镜)。为此需要脉冲激发和相应配置的传感器。该传感器以及与艾里扫描(AiryScan)方法的结合例如在Nat Methods 16,175-178(2019)(Nat Methods 16(2019年),第175~178页)中描述。<https://doi.org/10.1038/s41592-018-0291-9>。

[0055] 此外,利用本发明能实现光谱分辨。该组合恰恰是非常有吸引力的。

[0056] 在根据本发明的方法的一个优选变体中,利用矩阵传感器,例如利用矩阵传感器的一些像素,且尤其是利用矩阵传感器的每个单像素执行用于确定染料的荧光寿命的时间分辨式测量。

[0057] 根据本发明的探测设备的一个有利的改进方案的特征在于,矩阵传感器和评估电

子器件尤其是为了确定染料的荧光寿命而被设立成用于例如利用矩阵传感器的一些像素，优选是利用矩阵传感器的每个单像素执行时间分辨式测量。

[0058] 因此，矩阵传感器和电子器件针对该用途被设计成使得因此能实现对荧光寿命的确定，以使优选利用每个像素进行时间分辨式测量成为可能。因此，本发明的这些变体能够实现将光谱分辨的FLIM与图像扫描相结合。适宜地，使用脉冲激光器用于这些测量。

[0059] 为了提高矩阵传感器的探测效率，可以在矩阵传感器的前面，即在矩阵传感器的上游布置有微透镜。

[0060] 为了改变发射光的成像，尤其是为了缩放每个像素的光谱带宽，根据本发明的探测设备的成像光学器件可以具有变焦系统。

[0061] 最后，在根据本发明的显微镜中可以以原则上已知的方式存在用于隐去激发光的器件，尤其是至少一个发射滤光片。优选地，可以存在具有多个发射滤光片的变换装置，例如滤光轮。然而，根据本发明的探测设备也能够实现以下方法变体，其中，发射光的光谱不期望的分量不被评估。为此，例如，矩阵传感器的相应像素、尤其是像素列可以变成无源或被设成非激活。

附图说明

[0062] 下面参照附图解释根据本发明的方法的、根据本发明的探测设备的和根据本发明的激光扫描显微镜的另外的优点和特征。其中：

[0063] 图1：示出根据本发明的激光扫描显微镜的示意性的视图；

[0064] 图2：示出根据本发明的探测设备的示意性的视图；

[0065] 图3：示出用于针对不同数值孔径说明艾里斑的直径与波长的相关性的图表；

[0066] 图4：示出用于说明在衍射光栅情况下的色散角与波长相关性的变化曲线的图表；

[0067] 图5：示出具有典型染料的发射光谱的图表；

[0068] 图6：示出用于说明探测点分布函数关于矩阵传感器在垂直于色散方向的方向上的多个像素的变化曲线的图表；

[0069] 图7：示出模拟图像(图7a)，示出用于说明计数率与像素列中的像素编号的关系的图表(图7b)和示出用于说明计数率与色散方向上的像素编号的关系的图表(图7c)；

[0070] 图8：示出由许多模拟图像积累的图像(图8a)，示出用于说明经求平均的计数率与像素列中的像素编号的关系的图表(图8b)，以及示出用于说明经求平均的计数率与色散方向上的像素编号的关系的图表(图8b)；

[0071] 图9：示出在样品中存在两种染料的情况下由许多模拟图像积累的图像(图9a)，示出用于说明针对两种染料的经求平均的计数率与色散方向上的像素编号的图表(图9b)。示出用于说明经求平均的计数率与色散方向上的像素编号的关系的图表，其中，光谱限制在染料的发射区域(图9c)，并且示出用于说明经求平均的计数率与分别属于两种染料的发射最大量的像素列中的像素编号的关系的图表(图9d)；

[0072] 图10：示出没有光谱分辨的矩阵传感器的示意图，用于解释像素再分配的原理；

[0073] 图11：示出根据本发明的探测设备的矩阵传感器的示意图，用于解释像素区域和本发明的基本目标；以及

[0074] 图12：示出用于根据本发明的探测设备的矩阵传感器的示意图，用于解释光谱分

辨下的像素再分配的原理。

[0075] 相同的且作用相同的部件在图中通常用相同的附图标记标注。

具体实施方式

[0076] 图1示出了根据本发明的激光扫描显微镜100的示意图。作为主要部件,该显微镜100首先具有:光源12、尤其是激光器,其用于发出激发光14;具有显微镜物镜24的激发光路10,其用于将激发光引导到待检的样品S上或其中;以及在激发光路10中的扫描装置22,其用于扫描样品S上的至少一个照明斑点27。为了将从样品S因被加载激发辐射14而射出的发射光28、尤其是荧光引导到探测单元32上,还存在探测光路30,其具有探测单元32,探测单元用于检测发射光28。根据本发明存在的主分色器18用于分开激发光14和探测光28。最后,存在控制和评估单元34,其尤其可以是PC,其用于驱控光源12和评估由探测单元32获得的测量数据。根据本发明,探测单元32包含根据本发明的探测设备200。

[0077] 由光源12发出的激发光14经由偏转镜16到达主分色器18,并在该主分色器处朝扫描装置22的方向上被引导,该扫描装置可以布置在与显微镜物镜24的后光瞳光学共轭的平面上。激发光14从扫描装置22经由扫描物镜和镜筒透镜到达显微镜物镜24,显微镜物镜将激发光14在样品平面26中聚焦到样品S上或样品中的照明斑点27上。扫描物镜和镜筒透镜在图1中被示意性地作为部件23示出。

[0078] 在样品S上或样品S中加载激发光14的区域然后发射出发射辐射28,其中,这典型地是来自给样品S事先制备的染料的荧光。然后发射辐射28在“解扫(descannten)”的探测光路30中沿着与之前激发光14相同的路途回到主分色器18,但从该主分色器透射过并然后到达探测单元32,该探测单元具有根据本发明的探测设备200。由探测单元32测得的数据由控制和评估装置34进行评估。此外,控制和评估装置34可以用来驱控光源12以及扫描单元22。

[0079] 根据本发明的显微镜100尤其是共焦激光扫描显微镜,

[0080] 图2a)示出了根据本发明的探测设备200的一个实施例的示意图。作为主要的组成部分地,探测设备200为了在激光扫描显微镜100中对发射光28进行光谱分辨式探测而具有:用于对来自被检样品S的发射光28进行光谱分离的色散装置40、用于对经光谱分解的发射光进行位置分辨式检测的二维矩阵传感器50、和用于将经光谱分解的发射光引导到二维矩阵传感器50上的成像光学器件48。

[0081] 在图2a)中所示的实施例中,色散装置40是刻线光栅43,更确切地说是反射光栅,其中,待探测的发射光28从下面斜向地入射到刻线光栅43上。也可以使用棱镜或棱栅来代替光栅43。关键的是信号在矩阵传感器50上的限定的光谱涂抹(spektrale Ausschmierung),该光谱涂抹在关于位置的波长分布方面原则上可以是线性的,也可以是非线性的。它只需要是单调的。在所示的实施例中,光栅43的刻线垂直于绘图平面,这导致了(在图2a中)竖直延伸的色散方向41的光谱分裂。衍射度为零阶的光用附图标记29表示。衍射度为零阶的光要么可以不使用,要么可以必要时在旋转偏振的情况下沿着入射的光重新引导到光栅43上,以用于提高探测效率。

[0082] 通过未示出的针孔共轭过滤的发射光28被同样未示出的光学器件准直,并转向到色散装置40上。

[0083] 然后,各个光谱分量42、44、46、47撞击到(图2a中示意性地作为单一透镜示出的)成像光学器件48上。原则上,成像光学器件48也可以具有多个射束整形用的部件,并且尤其还具有变焦系统。

[0084] 成像光学器件48将不同的光谱分量42、44、46、47聚焦到具有多个像素51的矩阵传感器50上。矩阵传感器50例如可以是SPAD多线相机,其例如具有5行,每行具有800个像素,相当于具有800个列。

[0085] 图2b)示出了矩阵传感器50的面的示意图。矩阵传感器50相对于光栅43如下这样地定位,即,使得色散方向41沿行的方向延伸,即平行于图2b)中所示的坐标系的x方向延伸。列的方向平行于y方向延伸。例如,在图2b)中,蓝色光谱部分可能位于光谱的左边缘,而红色光谱部分相应地可能位于右边缘。脚注i和j表示矩阵传感器50的列或行,也就是说像素(i, j)是第j行中第i列中的像素。

[0086] 图2a)中示意性地示出根据本发明的评估电子器件60,它与矩阵传感器50连接,并被设立成在评估由像素区域的像素(i, j)所测得的强度 $I_{i,j}$ 时取消针对这些像素(i, j)的光谱分离。下文将详细解释这些函数。

[0087] 可以包括数据抓取器的评估电子器件60也可以例如在FPGA中、在微控制器中或类似的部件中实现。重要的是,尽可能靠近硬件,即尽可能靠近矩阵传感器50以达到数据量的减少,以此使得数据可以尽可能连续地从评估电子器件60流向控制PC,尤其是流向根据本发明的图1的显微镜100的控制和评估单元34。

[0088] 图2a)中的情况也可以如下这样地描述,即,色散元件40在色散方向41上产生较大的限定的色差,从而使得不同的波长被拉开,并因此可以分别被探测到。在与此垂直的方向上,即在图2b)中在y方向上,点分布函数基本上没有变化。然而,发射光28的光谱色散破坏了点分布函数,使得利用这样的系统应当如何实现ISM成像并不明显。

[0089] 现在为了实现这一点,首先将成像光学器件48相对于矩阵传感器50的规格,即在本示例中相对于SPAD相机的规格进行规格确定。例如,矩阵传感器50可以具有像素间距,其也可以被称为矩阵传感器50的光栅常数,该像素间距为 $a=25\mu\text{m}$ 。

[0090] 众所周知,艾里斑的直径与光的波长和数值孔径有关,如下:

$$d_{\text{Airy}} = \frac{1.22\lambda}{NA} \quad (1)$$

[0092] 为了评估用于ISM的信号,需要在每个空间方向对至少三到四个像素的点分布函数进行超采样。为了在450nm至800nm的相关波长范围内实现这一点,在对传感器进行照明时,需要大约 $NA=0.01$ 的探测侧的数值孔径。这可以从图3的图表得出,其中示出了不同数值孔径下艾里斑的直径与波长的相关性。图3的图表中的y轴的网格在此相当于SPAD相机的假设的像素大小为 $25\mu\text{m}$ 。

[0093] 图4示出了针对1000线/mm的光栅的单位为度的色散角关于单位为nm的波长的变化曲线。例如,如果假设光栅43与SPAD相机50之间的成像光学器件48的焦距为 $f=50\text{mm}$,这将在所述光谱范围的情况下得到光谱在大约730个像素的分布。因此,沉积在像素51上的光谱带宽大约为 $\Delta\lambda(\text{像素})=0.5\text{nm}$ 。

[0094] 原则上,必须对不同的光谱部分进行数值积分,以便从色散模糊的信号分布中恢

复点图像分布函数。如果以这种方式获得了像素的强度,则下一步就是使用图像扫描显微镜 (ISM) 的方法。

[0095] 入射到确定的像素51上的强度用 $I_{i,j}$ 表示,其中,脚注 i 表示列的编号,即它在 x 方向和色散方向41上延伸。脚注 j 表示行的编号,并因此在 y 方向上延伸。

[0096] 强度 $I_{i,j}$ 可以写成:

$$[0097] \quad I_{i,j} = \int_{\Delta\lambda} Sp(\lambda) \left[\int_{\Delta x_i} \text{Airy}(x - x_0(\lambda), \lambda) dx \int_{\Delta y_j} \text{Airy}(y - y_0(\lambda), \lambda) dy \right] d\lambda \quad (2)$$

[0098] 在此, $Sp(\lambda)$ 是受激发的荧光染料的发射光谱, $\text{Airy}(x, \lambda)$ 是相当于点分布函数的空间上的强度分布的艾里函数,其中,艾里函数中的波长 λ 代表如下参数,该参数尤其确定了艾里函数 $\text{Airy}(x, \lambda)$ 的宽度, x_0 表示点分布函数的中心。然后,通过色散 $x_0(\lambda)$ 并通过由光学器件进行调校到列中心 y_0 来规定点分布函数的中心,即最大强度的点。

[0099] 典型地,常见的荧光染料(荧光体)的光谱分布的光谱带宽约为 $\delta\lambda = 50\text{nm}$ (见图5)。根据图3中的图形,在该带宽上的艾里函数的宽度变化明显小于 $10\mu\text{m}$ 。因此,如果针对点分布函数将光谱发射中心的宽度设定为 λ_0 ,则最多产生四分之一像素的误差,这尤其发生在光谱的弱发射的边缘区域中,并因此贡献较小。因此,可以通过 $\text{Airy}(y - y_0, \lambda_0)$ 良好近似地代替 $\text{Airy}(y - y_0, \lambda)$ 。因此,沿 y 坐标的PSF项将变得不依赖于 λ ,并且可以从关于 λ 坐标的积分中提取出来。

[0100] 现在,还剩下一维的去卷积问题,以便在知道受激发的荧光染料的光谱 $Sp(\lambda)$ 的情况下计算 x 方向上的光谱拖尾(spektrale Verschmieren)回到未受干扰的艾里函数。在此,计算耗费和硬件耗费不应低估。毕竟,必须对至少 4×730 个像素的信号进行评估。

[0101] 为了进一步减少评估电子器件60的计算负荷,可以做如下进一步的假设。首先假设,未受干扰的点分布函数是径向对称的。这意味着,沿光谱在色散方向41上,即在 x 方向上的点分布函数的空间上的范围可以从能与 x 方向正交地、即在 y 方向上读取的强度分布 $I_j^{(y)}$ 中获知。此外,具有 $\Delta\lambda < 0.5\text{nm}$ 的每个像素的光谱带宽是非常小的,从而良好近似地可以忽略由于像素扩展而导致的色散信号失真,并因此可以假设每个像素的光谱是分段恒定。此外,从正交方向上、即在 y 方向上确定的强度分布还可以获知积分范围的宽度,即必须形成积分的像素的数量。根据图3中的图表明显的是,对五个像素进行积分是完全足够的。因此得到了对所述问题的以下离散化:

$$[0102] \quad I_{i,j} = I_j^{(y)} \sum_{n=i-2}^{i+2} sp_n \int_{\Delta x_i} \text{Airy}(x - x_0(\lambda_n)) dx \quad (3)$$

[0103] 在此, sp_n 是荧光染料在有关像素的光谱定位上的离散化的强度。现在适用的是,确定以相邻像素为中心的艾里函数与在像素 (i, j) 处测得的强度 $I_{i,j}$ 的比例。

[0104] 为此,也可以从在正交方向上、即在 y 方向上测得的数据中获得近似值。

[0105] 有利的是,首先计算垂直于色散方向的所有像素(即一系列中的所有像素)的信号之

和。由此得到了发射的光谱,该光谱可以被归一化,从而得到如图5中所示的分布。由此可以确定计算离散积分所需的光谱分布的离散值 sp_i 。图5示例性地示出了第一像素 (i, j) 在第一波长 λ_i 下的光谱 sp_i 的值和相当于波长 λ_{i+1} 的紧邻的像素 $(i+1, j)$ 的光谱 sp_{i+1} 的值。如果光谱分布隆起一次,则相邻的像素 $i-2, i-1, i+1, i+2$ 对像素 i 的贡献可以根据沿 y 方向的强度比例来确定。在图6中所示的艾里函数的空间分布的示例中,在光谱的值 sp_{i+1} 情况下的五个像素将得到以下占比的强度分布。

$$[0106] \quad I_i^{cal} = (I(i-2), I(i-1), I(i), I(i+1), I(i+2))$$

$$[0107] \quad = (0.008, 0.16, 0.65, 0.16, 0.008)$$

[0108] 图6还示出了针对在光谱定位 i 处的 sp_i 的、即针对SPAD相机50的与像素编号 $i+1$ 相邻的像素 i 的点分布函数的相当于图5中的光谱的较低的值。

[0109] 利用这样获知的值,也可以对最后剩下的积分 $\int_{\Delta x_i} \text{Airy}(x - x_0(\lambda_n)) dx$ 离散化。然后,针对在像素 (i, j) 中测得的强度 $I_{i,j}$ 得到以下表达:

$$[0110] \quad I_{i,j} = \sum_{n=i-2}^{i+2} sp_n P_{n,j} = \sum_{n=-2}^2 sp_{i-n} P_{i-n,j}$$

(4)

[0111] 在此, $P_{n,j}$ 是像素 (i, j) 处的以相邻像素 n 为中心的艾里函数的强度的所获知的部分。 $I_j^{(y)} * \int_{\Delta x_i} \text{Airy}(x - x_0(\lambda_n)) dx$ 的贡献都包含在 $P_{n,j}$ 中。作为最后步骤的是将像素的强度内容重新排列以保持经由求和符号扩展到的移位 n 。因此,最后感兴趣的不是某个像素 (i, j) 的信号,而是荧光染料的点分布函数的相关采样部分的总和。脚注重新排列在物理上相当于将光谱色散的发射点分布函数移位到共同的参考定位上,就像它在光路上例如可以通过第二次经过色散棱镜实现的那样。因此得到了仅由测量的数据所获知的点分布函数的以下表达式:

$$[0112] \quad I|_n = -2, \dots, 2, j = \sum_i sp_{i-n} P_{i-n,j}$$

(5)

[0113] 在盖革模式下的光子计数用的矩阵传感器中, $P_{i-n,j}$ 以如下方式将每个探测矩阵传感器像素的光子 $N_{i-n,j}$ 根据事先校准的PSF在给定的传感器定位处的PSF的比分布来分配给待确定的PSF的子像素:

$$[0114] \quad P_{i-n,j} = I_{i-n}^{cal} \cdot N_{i-n,j}$$

[0115] (6)

[0116] 因此实现根据本发明的对属于所考虑的染料的像素区域的像素的光谱分裂的取消。

[0117] 如果由于忽略色散的信号拖尾而产生的误差显得太大的话,则可以利用更大的传感器阵列和更大焦距的成像光学器件来应对。利用例如 4×1400 像素且焦距为 $f = 100\text{mm}$ 的阵列,使得每个像素的带宽已经是 $\Delta \lambda < 0.25\text{nm}$ 。因此,在任何情况下都可以找到合理的工作

点。矩阵传感器50不必限制在几个行上。如果可以实现高帧频,也允许有明显更多的图像行,由此也使得多点激发的测量成为可能。这样的并行化迎合了根据本发明的方法,这是因为在给定的帧频情况下,像素停留时间可以延长了并行化的因数。

[0118] 应用上述原理的问题在于对LSM中光子数量的限制。矩阵传感器50提供数字信号,即每个传感器像素和图像的光子。矩阵传感器50的唯一图像稍后被转换为整个LSM图像的像素。由于撞击到矩阵传感器50上的光子通量例如可以是几兆赫的量级,并且LSM的像素停留时间应是 μs 的量级,所以每个像素停留时间只有几个光子被分配到例如 4×730 个像素上。因此,矩阵传感器50的大部分像素将提供零作为基准,而只有少数像素提供一。因此,矩阵传感器50的直接一次性读取尚无法提供可用的结果。此外,光子的发射和探测都是统计学的事件,从而还无法从具有如此少的光子的单一图像中推断出长期平均的光子分布。这在图7a)中得到说明,在那里,针对在 $I_{\text{phot}} = 10\text{MHz}$ 的光子通量下曝光时间为 $1\mu\text{s}$ 地曝光图5的染料光谱,模拟了SPAD相机的单一图像50。每个像素的光谱带宽为 0.5nm 。只可以看到少数事件,这些事件被分组在约 520nm 下的染料的发射最大量周围并且在五行SPAD相机50的中心线上。图7b)示出了分别沿SPAD相机50的(在x方向上的)图像行的信号的总和,它反映了点分布函数。图7c)示出了一列中(即在y方向上的)所有像素的计数事件的总和,并且与探测到的染料光谱一致。很明显,上面解释的算法尚无法有意义地被用于图7的数据。

[0119] 因此,该系统必须用经整合的图像进行校准。然而,这原则上是非常快速的过程,并且通常不需要多于一次的图像扫描。图8a)中说明了在平均光子通量为 10MHz 的情况下,对1000个单一图像进行平均化的情况。积分时长只为 1ms ,并且大约相当于对一个图像行的扫描。图8b)中的由经求和的信号确定的点分布函数几乎完全反映了上述五个像素上的待预期的强度分布,并且图8c)中的光谱也可以再现。

[0120] 从图8b)和图8c)的测量中可以获得 sp_{i-n} 和 $P_{i-n,j}$ 的数据,这些数据可以例如被保存在评估电子器件60的存储器中。然后可以根据规范(公式5)对每个被扫描的图像像素的SPAD图像进行评估。整数的光子数值已经可以转换为浮点值,以便获得亮度情况。

[0121] 根据本发明,针对被配属给染料的像素区域的像素的光谱分离可以被取消的第二种可能性基于像素再分配方法。参照图10至图12对其进行描述。

[0122] 首先,结合图10解释了本身已知的像素再分配的方法,其中,专业术语的表达依据[2019年Castello等人]。

[0123] 考虑图像扫描的情况,在其中,用点状光源扫描样品,并用相对于样品固定的二维共焦探测器阵列位置分辨地测量从样品辐射回来的强度。共焦矩阵传感器可以具有 n 乘 m 个像素 (i, j) ,其脚注 i, j 从1到 n 或 m 。

[0124] 因为期望在稍后评估矩形阵列上的光谱测量,所以为了简单起见,在此假设阵列是矩形的。然而,这本身并不是限制,并且原则上也可以考虑其他几何形状的像素化传感器。尤其地,六边形布置经常被使用,这是因为利用它们可以实现良好的填充系数。

[0125] 然后,为了清楚地表示,我们假设从对象平面到中间图像平面的放大率为1。此外有意义地假定的是,传感器的每个像素都小于1个艾里单位($\text{airy unit} = \text{AU}$)。这种情况相当于图像扫描中的标准假定,即PSF被以空间超采样的方式探测,并且每个像素表示小于 1AU (或小于 0.8AU 、甚至更好的是小于 0.3AU)的有效针孔,见上文。原则上,这种布置的工作方式也适用于比像素大小更小的PSF。然而,这时只可以测量光谱并拍摄光谱共焦图像,于

是图像扫描就无法有意义地被使用。

[0126] 图像扫描显微镜可以被视为线性的且空间不变的系统,也就是说,样品平面被线性地成像到矩阵传感器的图像平面56中。利用变量 x 旨在表示图像平面56中的、即矩阵传感器的平面中的被投射回样品平面中的位置。如果扫描定位位于样品中的位置 x ,即如果换句话说,照明强度的最大量位于样品中的位置 x ,那么利用像素 (i, j) 测得的强度 $g_{i,j}(x)$ 就可以被如下地作为卷积描述:

$$[0127] \quad g_{i,j}(x) = (h_{i,j} * f)(x)$$

$$[0128] \quad = \int h_{i,j}(x-x') f(x') dx'$$

$$[0129] \quad (7)$$

[0130] 在此, $h_{i,j}(x) = h^{\text{exc}}(x) h^{\text{em}}(x-d_{i,j})$ 是分别所考虑的传感器像素的有效PSF。 $h_{i,j}(x)$ 是激发的PSF $h^{\text{exc}}(x)$ 和发射的PSF $h^{\text{em}}(x-d_{i,j})$ 的乘积。激发的PSF $h^{\text{exc}}(x)$ 原则上可以被测得,并且可以假设是已知的。为了获得正确的探测的PSF, $h^{\text{em}}(x-d_{i,j})$ 在单个像素的大小不可忽略的情况下仍需利用描述像素的几何形状的孔径函数(Blendenfunktion)进行卷积。 $d_{i,j}$ 是位于探测器阵列的平面内的矢量,该矢量相当于参考元素、例如位于传感器中心的元素与像素 (i, j) 之间的偏移量。 $d_{i,j}$ 可以作为如下被描述:

$$[0131] \quad d_{i,j} = \begin{pmatrix} d_{i,j}^x \\ d_{i,j}^y \end{pmatrix}$$

$$(8)$$

[0132] 在一个简化的考虑中,可以假设,有效PSF $h_{i,j}(x)$ 的最大量大约位于函数 $h^{\text{exc}}(x)$ 和 $h_{i,j}(x-d_{i,j})$ 的最大量之间的中间,即大约在定位 $s_{i,j} = d_{i,j}/2$ 处。确切地说,如果激发的PSF和发射的PSF相同,这将适用于无像差的系统,没有斯托克斯位移的荧光就是这种情况。像素再分配的基本思路是,假设利用像素 (i, j) 测得的大部分强度来源于样品中的与图像平面56中的有关像素的位置坐标不一致的位置。在简化的考虑中,其中假设有效的PSF其最大量位于函数 $h^{\text{exc}}(x)$ 的最大量和 $h_{i,j}(x-d_{i,j})$ 的最大量中间,则利用像素 (i, j) 测得的强度所来源的位置位于样品平面中的 $s_{i,j} = d_{i,j}/2$ 的位置。

[0133] 像素重配和图像扫描的基本思路是,将相对于参考像素移位的信号朝参考像素的方向移回,并将它们相加。原则上,这在直观上是清楚的,这是因为在以这种方式运行的共焦系统中,矩阵传感器的每个像素 (i, j) 都提供移位的图像。除了回移之外,还可以简单地将图像记录在彼此上,或使用其他形式的抵消,例如多视图去卷积,以便有利地将所有像素的信号相互抵消。

[0134] 图10示出了针对结合具有 5×5 像素的矩阵传感器54进行共焦图像扫描情况的状况和表示。中间的像素 $(3, 3)$ 作为参考像素。圆57代表像素 $(5, 4)$ 的有效PSF的重心。然而,PSF的范围通常要比该圆57大得多,其在图10中只是为了说明PSF最大量的定位而示出。

[0135] 众所周知,利用图像扫描可以实现更好的光学分辨率和改善的信噪比(SNR)。在图像扫描中的颜色相关性可以经由滤镜来实现是已知的。此外已知的是,使用刻线光栅,利用该刻线光栅测量包含两种颜色的PSF并进行评估。

[0136] 然而明显的是,如果直接在多个点上测量光谱,将明显获得更多的信息。这还可以被用于对数据进行光谱解混。附加地,希望即使在这种测量的情况下也可以利用图像扫描

的积极特性。

[0137] 利用在此所述的根据本发明的探测设备可以例如如下这样地执行测量,即,使得与矩阵传感器50上的像素区域相应的确定的发射带的光谱部分被如下这样地进行光谱组合,即,使得对该光谱带来说可以执行所谓的图像扫描(其也被称为艾里扫描或光学再分配)的措施。这种组合在独立权利要求的专业术语中被称为取消光谱分离。

[0138] 因此,为了实现对属于一个发射带的像素的组合,有必要的是,针对数量为N的连贯的像素、即对像素区域的像素使光栅或其他色散的装置的色散影响被取消。

[0139] 这最终类似于让光再次返回通过色散元件使得色散被取消的状况。于是产生了只包含空间信息的PSF,并且在该PSF中,光谱部分被再次在空间上叠加成点图像函数。例如,US2019258041中描述了一些。然而,并不总是能够利用光学手段来取消色散。例如,优选使用光栅用于光谱分裂,这是因为这些光栅产生线性色散。然而,由于效率有限而对光栅进行多重使用,即在光的去路和回路上都使用光栅,这是不利的。此外,用于取消色散的纯光学组件是复杂的、昂贵的,并且需要大量调校。

[0140] 在如通过光栅所产生的线性色散的情况下,适用于沿矩阵传感器的纵向方向x的波长的配属关系的是相关性 $\lambda=kx$ 。在此k是比例常数,其与色散的强度有关,即与光栅的线宽有关。因此,单位是nm/mm。原则上,这些考虑不仅适用于光栅,而且也可以适用于作为色散元件的棱镜。然而,传感器上的位置与波长之间的关系就不能再通过简单的线性关系来描述。于是,对测量的校准和评估就有些不同。

[0141] 此外,使用光栅是优选的,这是因为线性色散导致光谱在波长上的扫描(每个波长的像素)是最佳的,而且位置和波长之间的关系仍保持线性。使用棱镜在光学上有可能更有效一些,但会导致对光谱中的蓝色部分更好的采样,而红色波长在光谱上被“压缩”,并因此被扫描得较差。然而,这是不利的,这是因为恰恰是对于活体样品成像来说选择的波长越长,激发/探测就越温和。在此,利用根据本发明的组件就能很好地探测多重染色。

[0142] 在此应说明一个示例性的设计方案。图11示出了具有两个示意性示出的光谱带的矩阵传感器,这些光谱带例如相当于具有蓝绿色发射范围(像素范围71)和具有更多橙红色发射范围(像素范围72)的发射荧光的样品的光谱特性。数据评估的任务原则上是将确定的光谱带,因此是像素区域71和/或72的像素的信号,如下这样地结合起来,即,产生一个或两个圆对称的点分布函数80(PSF)。随后或同时对以这种方式获得的PSF利用本身已知的图像扫描方法进行评估,可以得到样品的如下图像:在该图像中,图像扫描的有利的特性与光谱分辨率相结合,即两种染料都可以在图像中得到体现。为了保持表述的透明性,在此首先假设染料在光谱上分离到如下这样的程度,即,使得它们落在传感器的不同像素上。这种情况是有利的。然而,利用这种布置也可用于对具有光谱重叠的染料或发荧光的蛋白质的样品进行成像和测量。这在发明内容的部分中已作了解释。

[0143] 图12示出了根据本发明的探测单元的矩阵传感器50的截段,其具有像素(i,j),利用这些像素来测量已色散的发射光28。发射光28沿着方向i被色散分裂。这意味着,给每个列i配属一个波长。在方向j上没有发生波长的色散分裂,也就是说,在那里只存在空间信息。在图12中所示的状况下,像素(12,3)代表具有所属的参考波长 λ_r 的参考像素,其他像素的信号都参照该参考像素。这意味着,其他像素的信号被以与迄今在已知的图像扫描显微镜中实现类似的方式移回到参考像素(12,3)上。在此,“移回”是指将各自的像素的信号以

数字方式配属给矩阵传感器平面中的进而是样品平面中的确定的位置。然而,与已知的方法相比,移位必须以正确考虑色散的方式进行。

[0144] 主要改变在于,对于移位矢量 $d_{i,j}$,假设移位行程由两部分组成:

$$[0145] \quad d_{i,j} = 2s_{i,j} + \xi_i$$

$$[0146] \quad \xi = \xi(x)$$

$$[0147] \quad (9)$$

[0148] $\xi(\lambda)$ 在此是波长的函数。针对该函数的可能选择例如是:

$$[0149] \quad \xi_i = \kappa \left(\frac{\lambda_i}{\lambda_r} - 1 \right)$$

(10)

[0150] 比例常数 κ 在此以长度为单位,并由色散元件的色散强度来确定,尤其是由所用的光栅43的光栅常数来确定。

[0151] 因此,移位行程如下表示:

$$[0152] \quad d_{i,j} = \begin{pmatrix} d_{i,j}^x \\ d_{i,j}^y \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 2s_{i,j}^x + \xi_i \\ d_{i,j}^y \end{pmatrix}$$

(11)

[0153] 在该示例中,色散只涉及x方向。在插图12中,针对所绘制的像素(12,5)的移位矢量因此不会被色散改变,而针对所绘制的像素(8,4)的移位矢量将有具有色散的部分。

[0154] 针对有效PSF的重心可以得到:

$$[0155] \quad s_{i,j} = \begin{pmatrix} \frac{d_{i,j}^x - \xi_i}{2} \\ \frac{s_{i,j}^y}{2} \end{pmatrix}$$

(12)

[0156] 在垂直于色散的方向上,与传统的图像扫描(艾里扫描)评估类似地没有变化,而在色散的方向上发生了拉伸/压缩。这以如下这样方式发生,即,其波长离参考波长较远的部分被更强地校正,从而使得有效PSF的重心向参考像素的方向移近。这时的重心不再是像素与参考像素之间移位长度的一半,而是朝参考像素更近地移动了一些。因此得到了必须以怎样的方式移位像素的部分使得最终可以抵消所有像素的贡献的规范。可选地,在此也可以使用进一步的校准,以便获知正确的 $s_{i,j}$ 。然而,尤其是在样品较厚的情况下,经常用多光子显微镜进行检查,可能会出现移位矢量受到样品引起的畸变的影响的情况[2019年Castello等人;图1c]。在下一段落中将说明一种仅从传感器的单个像素的图像数据中获知这些后移矢量的可能性。

[0157] 经由相位相关来确定移位矢量

[0158] 对所考虑的情况进行数据评估的另外的可能性基于这样的假设,即,属于一个染料的带的波长,在此对该波长进行评估,通常特征在于具有样品的非常具体的空间结构,而

且该结构最终对所有的光谱部分都是相同的,这是因为该结构用相应的染料进行标记。然后,第二种颜色,例如图11中的蓝绿色光谱(像素区域71),的特征在于样品的不同和可区分的结构(例如细胞核,其例如用DAPI标记)。因此,可以假设,这些图像最终都具有很大程度上相同的结构内容,即使它们发射的颜色略有不同。在该情况下,相位相关作为另外的变体来提供[2019年Castello等人]。

[0159] 在此,首先对经扫描的图像的像素进行编号,并按照 $n = (n_x, n_y)$ 进行标注。因此,由 $N_x \times N_y$ 个像素构成的图像被记为 $g_{i,j}(n)$,其中, $n_x = 1 \cdots N_x$ 并且 $n_y = 1 \cdots N_y$ 。此外,限定了所谓的相关图(在此涉及参考像素(3,3)):

$$[0160] \quad r_{i,j} = FFT^{-1} \left(\frac{FFT(g_{i,j})FFT(g_{3,3})^*}{|FFT(g_{i,j})FFT(g_{3,3})^*|} \right) \quad (13)$$

[0161] 以原则上已知的方式,FFT和 FFT^{-1} 在此指的是(快速)傅里叶变换或其倒数。该相关图的最大量

$$[0162] \quad (s_{i,j}^x, s_{i,j}^y) = arg \max_{(n_x, n_y)} (r_{i,j}(n)) \quad (14)$$

[0163] 然后提供相应的移位矢量,以便使图像内容必须以该移位矢量回移。

[0164] 该措施的使用范围也在[2019年Castello等人]中已被讨论。最终,该方法类似于提供不同像素的所谓的对图像的记录。该评估的优点是,色散基本上是不需要知道的,并且色散的不同函数上走向也可以用算法进行处理。此外,该措施对传感器上成像的畸变依赖性较小。然而,计算量更大。

[0165] 原则上,另外的由图像扫描已知的方法也可以用于本发明。为此再次参考[2019年Castello等人]。那里还讨论了所谓的用于数据评估的多视图去卷积,它也可以用于本发明。此外,可以参考蔡司Airyscan的公开文献。

[0166] 因此说明了另一种方法,即可以如何评估具有空间超采样PSF的共焦光谱传感器的数据,以便同时获知具有更高信噪比的分辨率更好的图像,并同时确定光谱。

[0167] 如上所述,光谱本身总是可以通过对一系列的、即垂直于色散方向(在插图3中的方向j)的像素进行求和来获得。

[0168] 多色激发的应用

[0169] 非常有利的是,根据本发明的方法也可以用于同时探测多种染料。为此,有利的是,积分边界,尤其是在色散方向41上可以灵活地规定。积分边界在此是指对于确定的染料必须对点分布函数的各个光谱贡献进行求和的那些边界。由此,例如可以为每种染料分别校准点分布函数的范围。这方面将利用图9进行更详细解释。

[0170] 图9a)示出了SPAD相机50的1000个模拟图像的总和,其中对两种染料以10MHz的光子通量进行曝光并且单个图像的曝光时长为1 μ s。图9b)示出了由图像数据获知的整个光谱。图9c)示出了在限制积分带宽的情况下获得的部分光谱。最后,图9d)示出了在图9c)中所示的部分范围内获知的点分布函数。

[0171] 自动化选项

[0172] 系统的校准总是严格地只对固定预设的实验有效,这是因为它尤其与所选择的物镜和检查的染料有关。因此,在修改实验后有意义的是,通过如下方式可以让系统重新学习校准,即,根据图8和图9评估平均图像数据并将校准数据例如写入到评估电子器件60的存储器中。

[0173] 此外有利地,从最后(几次)LSM图像扫描中持续更新校准数据。由此使得系统可以自主地对实验环境的变化做出反应。

[0174] 另外的有利的方面是通过限定积分边界来自动化地调整光谱通道的可能性。这能够通过通过对光谱空间的具有1nm甚至更细的步幅的高分辨率扫描来实现。例如,根据图9b)的经积分的信号可以使用于寻找最大量和最小量的算法获知用于规定积分边界或等效的光谱通道的建议。因此,该系统也可以有效地探测来自未知样品的发射,并预设有利的染料分开。如果有必要,在矩阵传感器50的y方向上的具有激发光14的波长的光所落入的列不进行评估或被关闭。

[0175] 附图标记列表

[0176]	10	激发光路
[0177]	12	光源
[0178]	(12,3)	参考像素
[0179]	14	激发光
[0180]	16	偏转镜
[0181]	18	主分色器
[0182]	22	扫描装置
[0183]	23	镜筒透镜
[0184]	24	显微镜物镜
[0185]	26	样品平面
[0186]	27	照明斑点
[0187]	28	发射光
[0188]	29	零阶衍射
[0189]	30	探测光路
[0190]	32	探测单元
[0191]	(3,3)	参考像素
[0192]	34	控制和评估单元,尤其是PC
[0193]	40	色散装置
[0194]	41	色散方向
[0195]	42	发射光28的光谱分量
[0196]	43	光栅
[0197]	44	发射光28的光谱分量
[0198]	46	发射光28的光谱分量
[0199]	47	发射光28的光谱分量
[0200]	48	成像光学元件
[0201]	50	二维矩阵传感器

[0202]	51	矩阵传感器50的像素
[0203]	53	像素的大小
[0204]	54	矩阵传感器
[0205]	56	图像平面(=矩阵传感器50的平面)
[0206]	57	函数 $s_{5,4}$ 的重心
[0207]	60	评估电子器件
[0208]	71	染料的像素区域
[0209]	72	染料的像素区域
[0210]	80	圆对称的点分布函数
[0211]	100	激光扫描显微镜
[0212]	200	探测设备
[0213]	a	矩阵传感器50的光栅常数
[0214]	$d_{i,j}$	用于像素再分配的移位矢量
[0215]	$d_{i,j}^x$	移位矢量 $d_{i,j}$ 的x分量
[0216]	$d_{i,j}^y$	移位矢量 $d_{i,j}$ 的y分量
[0217]	$g_{i,j}(n)$	在定位n处的图像
[0218]	$g_{i,j}, g_{i,j}(x)$	由像素i,j测得的强度值
[0219]	$g_{i,j}$	像素i,j到图像平面56中的位置矢量
[0220]	$h^{em}(x)$	发射的PSF
[0221]	$h^{exc}(x)$	激发的PSF
[0222]	$h_{i,j}(x)$	针对像素i,j的有效PSF
[0223]	i	矩阵传感器50的列
[0224]	(i,j)	像素
[0225]	j	矩阵传感器50的行
[0226]	m	矩阵传感器50的行数
[0227]	m_i	光谱分布 sp_i 中的最小量
[0228]	$mx1$	光谱分布 sp_i 中的最大量
[0229]	$mx2$	光谱分布 sp_i 中的最大量
[0230]	n	矩阵传感器50的列数
[0231]	n	到图像点的位置矢量
[0232]	n_x	到图像点的位置矢量n的x分量
[0233]	n_y	到图像点的位置矢量n的y分量
[0234]	$r_{i,j}$	像素i,j的相关图
[0235]	s1	染料的发射光谱
[0236]	s2	染料的发射光谱
[0237]	$s_{i,j}$	到有效PSF $h_{i,j}(x)$ 的最大量的位置矢量
[0238]	$sp(\lambda)$	光谱分布(连续)
[0239]	sp_i	光谱分布(离散)
[0240]	x	图像平面56中的投射到样品平面中的位置

[0241]	x	矩阵传感器50的坐标方向(=色散方向)
[0242]	y	矩阵传感器50的坐标方向(垂直于色散方向)
[0243]	$\text{Airy}(x, \lambda)$	艾里函数
[0244]	I_i^{cal}	空间强度分布
[0245]	$I_{i,j}$	由像素 i, j 测得的强度值
[0246]	N_x	x 方向上的图像点的数量
[0247]	N_y	y 方向上的图像点的数量
[0248]	FFT	快速傅里叶变换
[0249]	FFT^{-1}	快速傅里叶反(逆)变换
[0250]	$P_{i-n,j}$	关于矩阵传感器50上的染料的点分布函数的在色散方向41上移位的光谱部分的空间重叠的重叠数据
[0251]	PSF	点分布函数(Point Spread Function)
[0252]	S	样品
[0253]	SNR	信噪比
[0254]	$\xi(\lambda), \xi_i(\lambda)$	移位矢量 $d_{i,j}$ 的依赖于波长的部分
[0255]	$\delta\lambda$	染料的光谱带宽
[0256]	λ	波长
[0257]	λ_i	在矩阵传感器50的列 i 上的波长
[0258]	λ_r	在参考像素的位置或列上的波长
[0259]	κ	用于模拟移位矢量 $d_{i,j}$ 的色散情况的常数

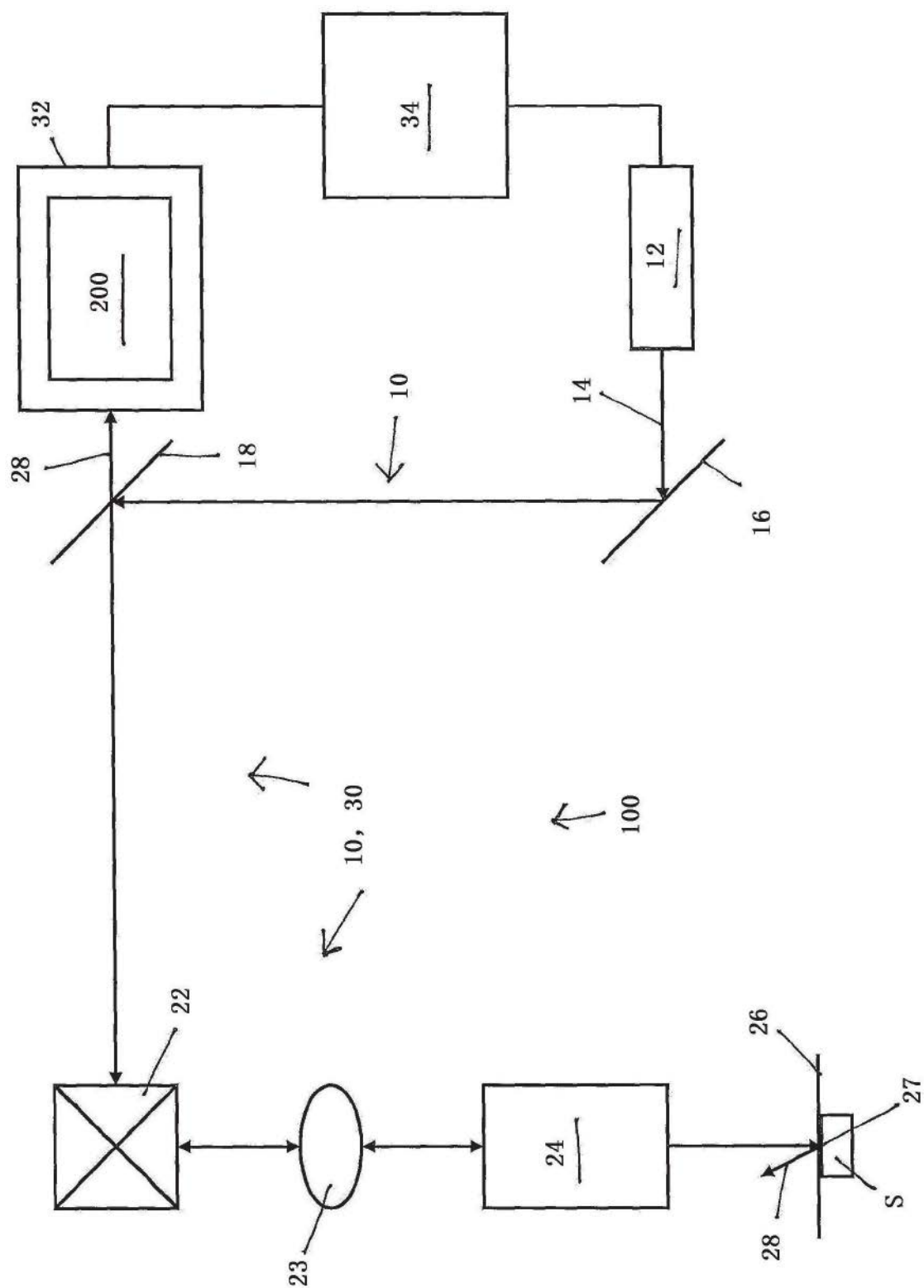


图1

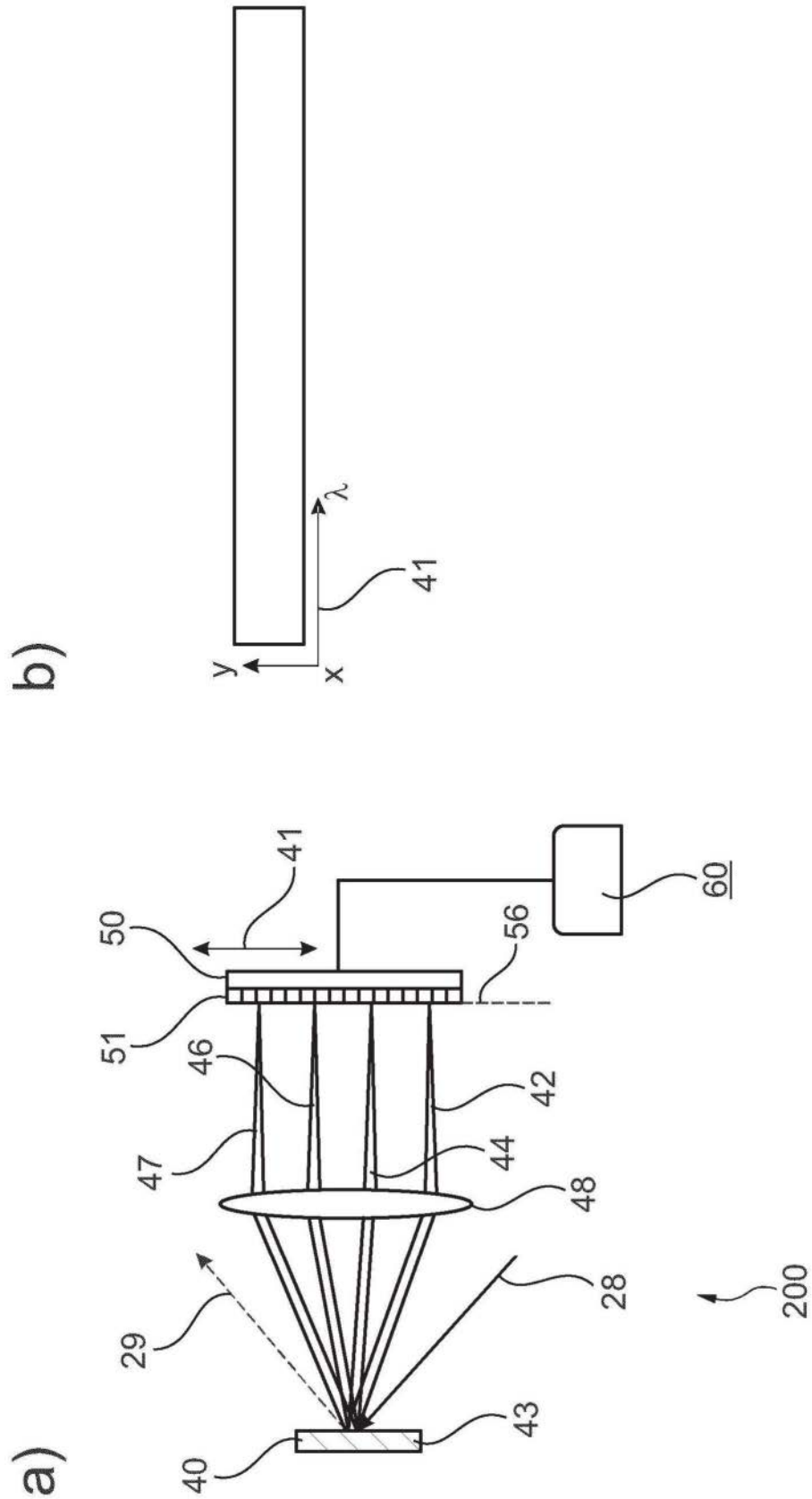


图2

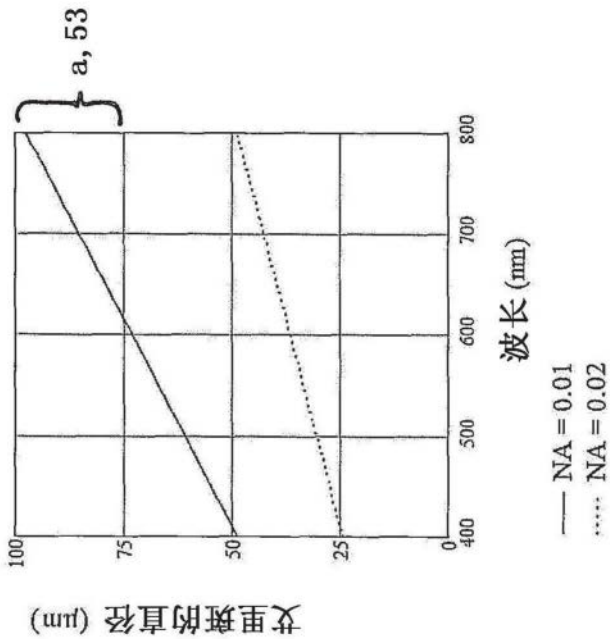


图3

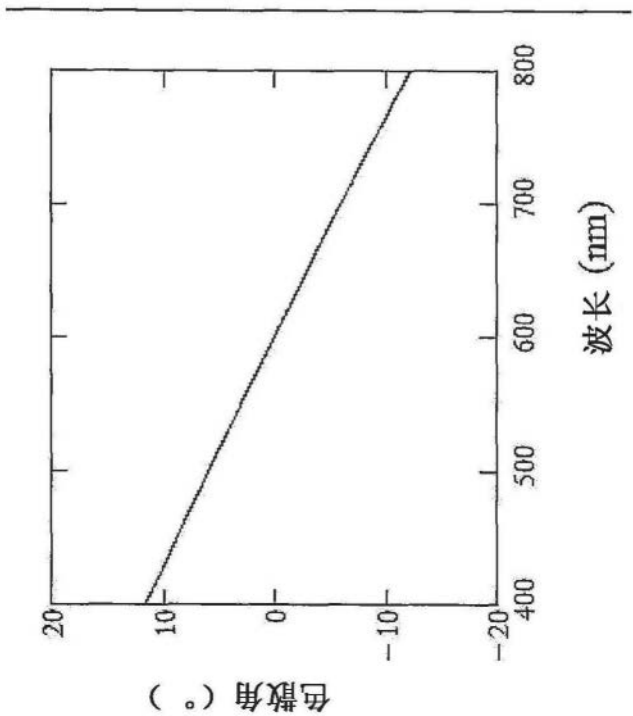


图4

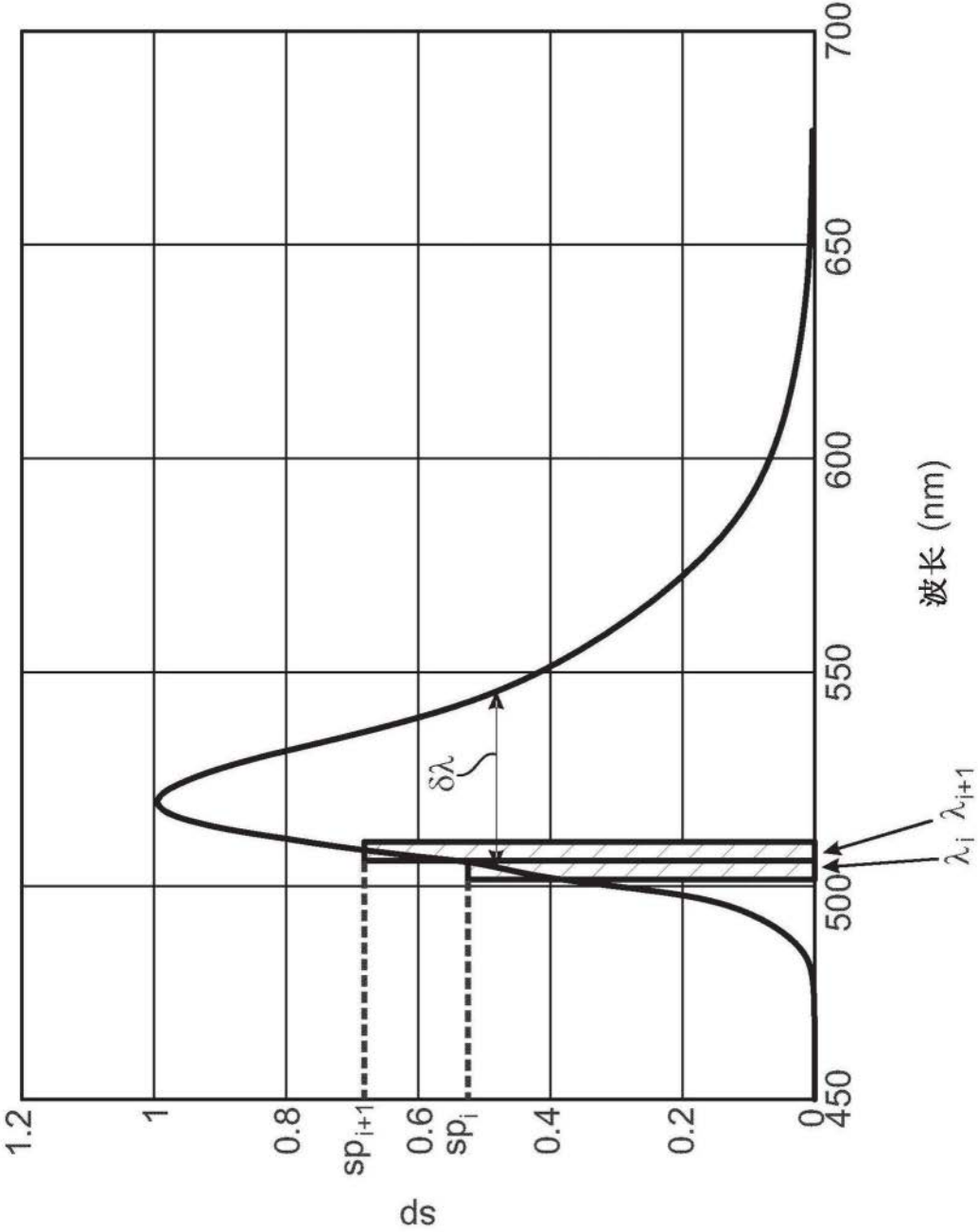


图5

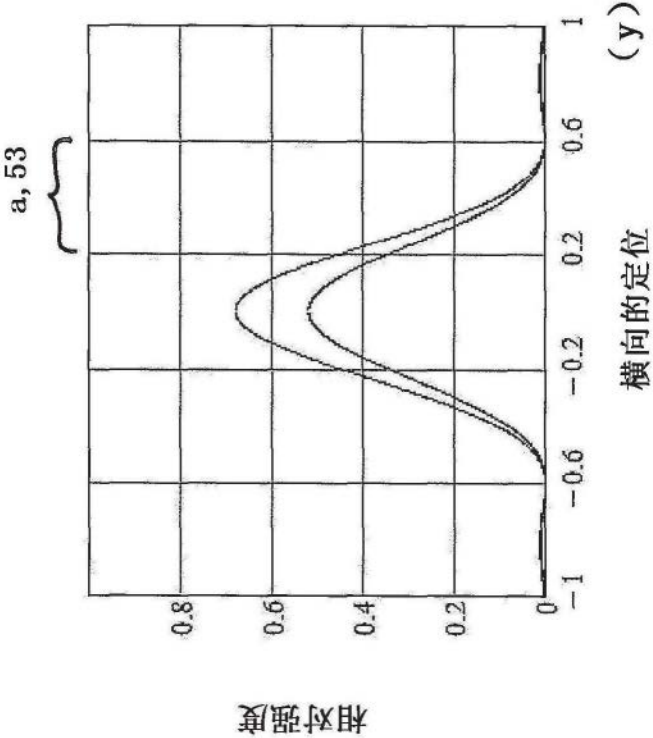


图6

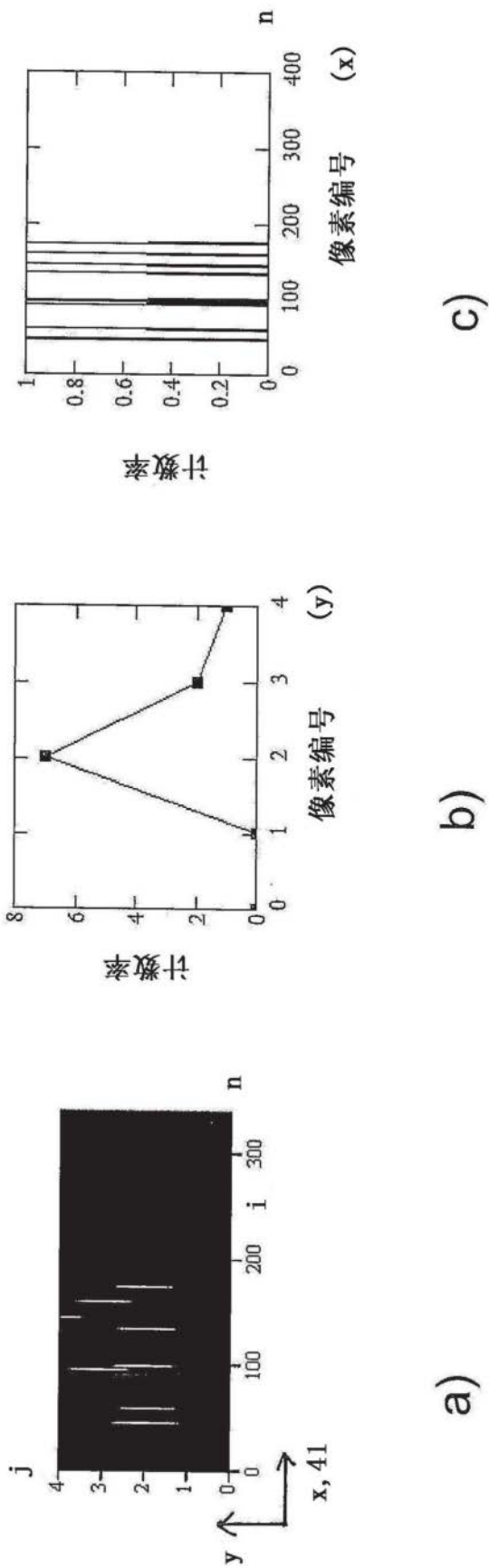


图7

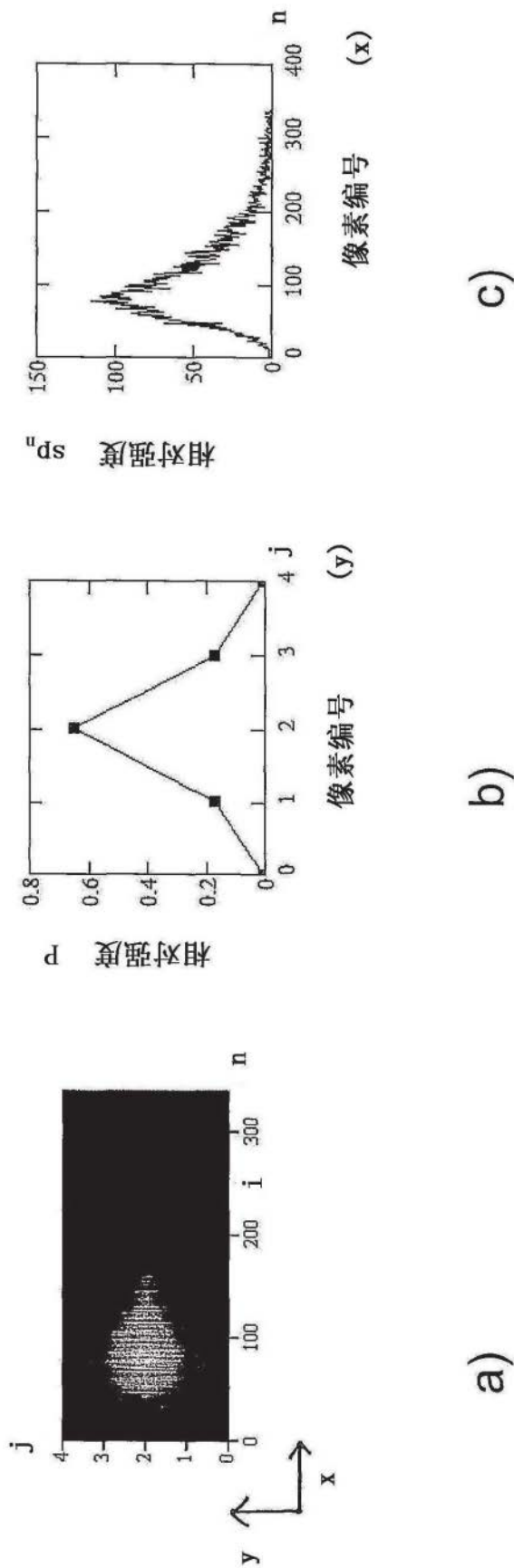
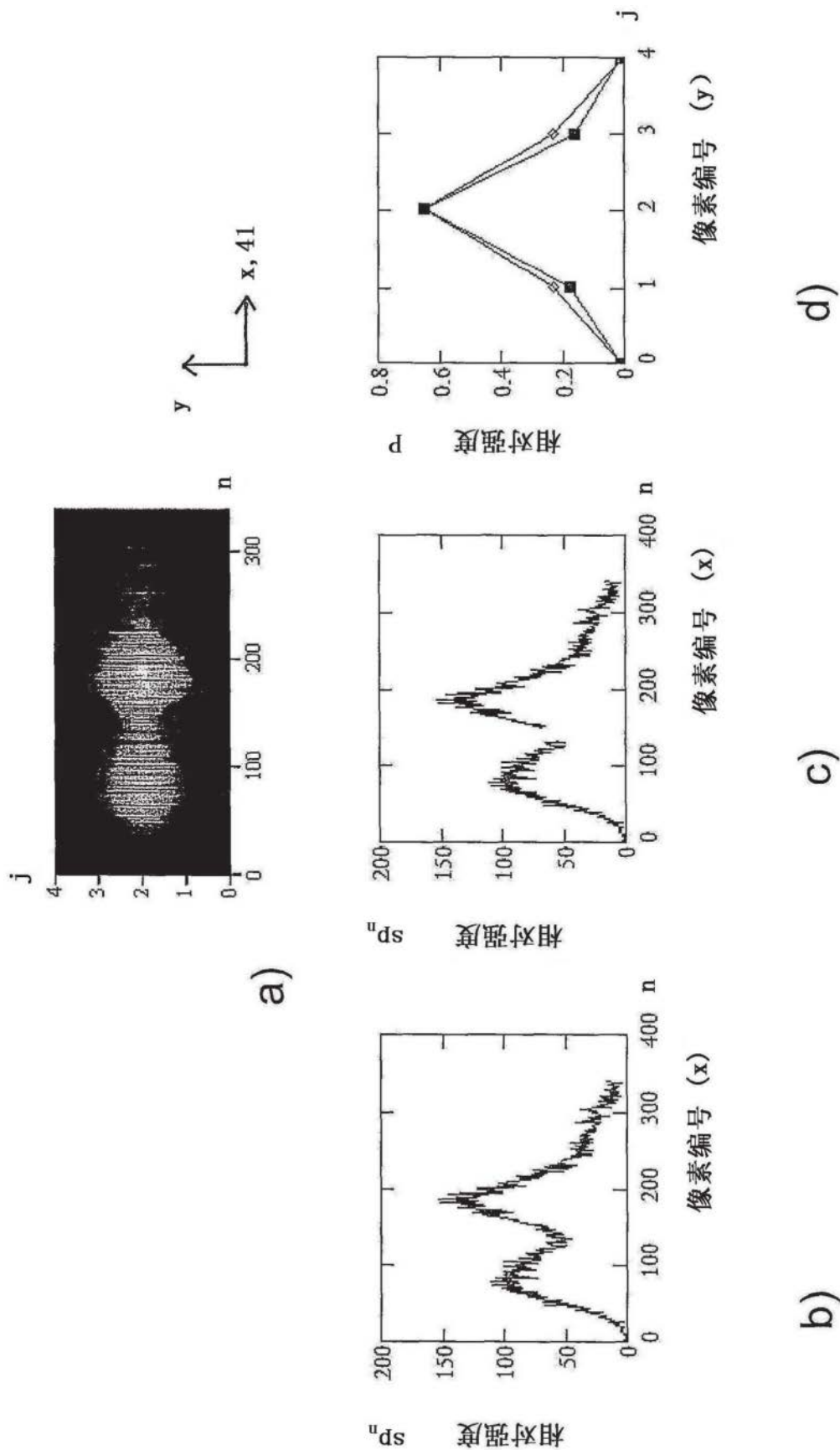


图8



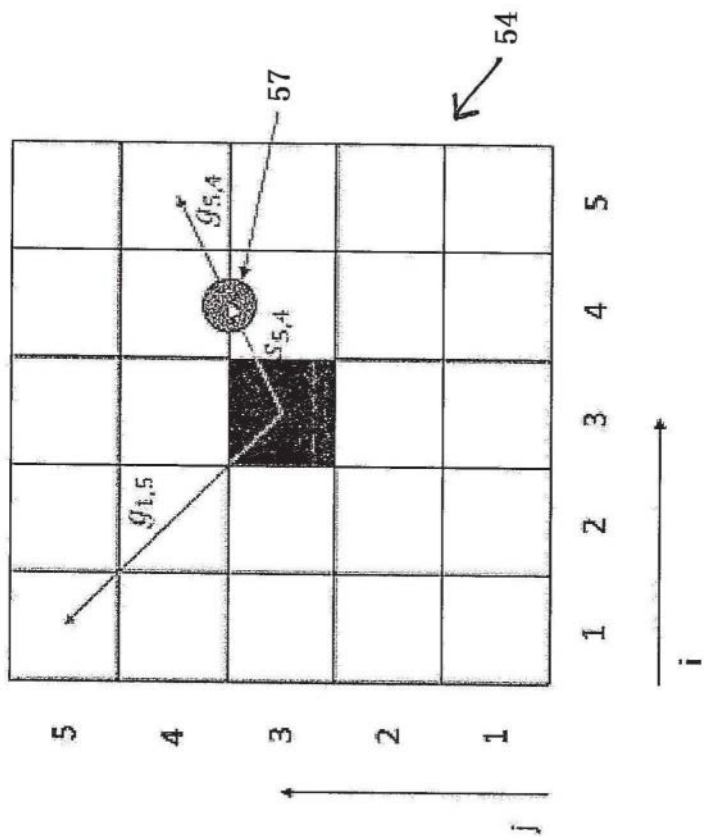


图10

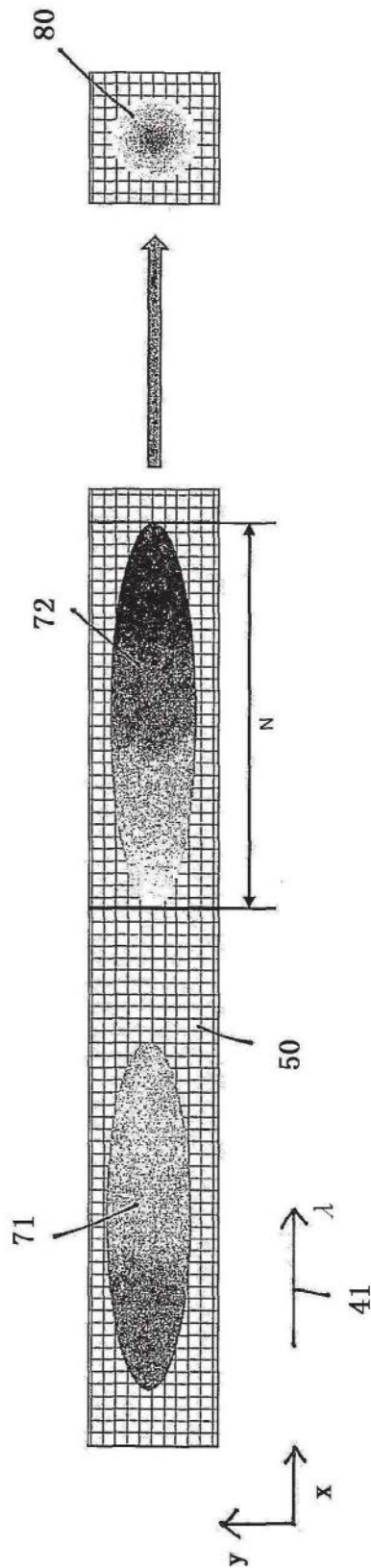


图11

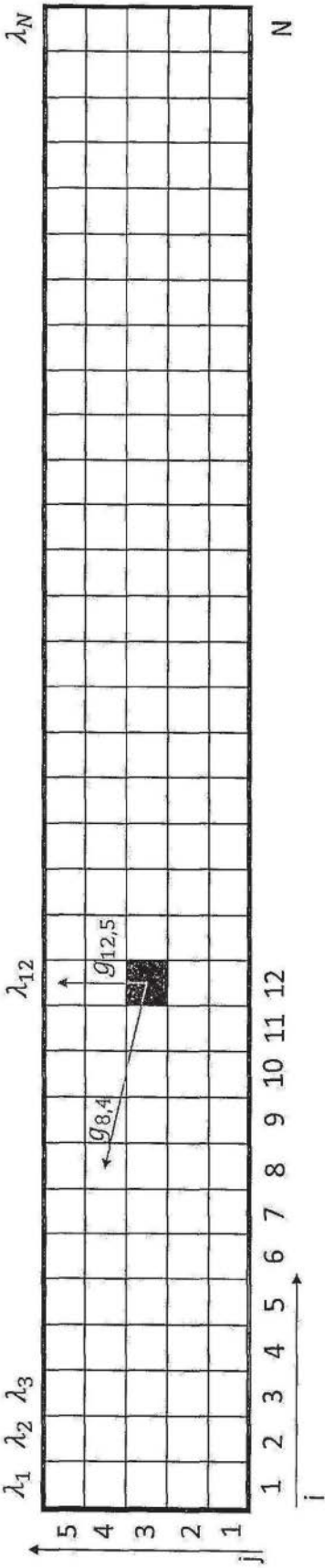


图12