

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 985 958**

51 Int. Cl.:

G02B 21/14 (2006.01)
G02B 21/18 (2006.01)
G01B 9/00 (2006.01)
G01N 21/00 (2006.01)
G02B 21/36 (2006.01)
G02B 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.10.2020** **PCT/GB2020/052522**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.04.2021** **WO21069921**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2020** **E 20792704 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2024** **EP 4042223**

54 Título: **Métodos y aparatos para microscopía de dispersión interferométrica optimizada**

30 Prioridad:

10.10.2019 GB 201914669

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.11.2024

73 Titular/es:

REFEYN LTD (50.0%)
c/o Penningtons Manches LLP, 9400 Garsington
Road, Oxford Business Park
Oxford OX4 2HN, GB y
OXFORD UNIVERSITY INNOVATION LIMITED
(50.0%)

72 Inventor/es:

LANGHORST, MATTHIAS KARL FRANZ;
COLE, DANIEL RICHARD;
GRAHAM, DAVID JOHN LEHAR;
KUKURA, PHILIPP y
PRIEST, LEE

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 985 958 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos y aparatos para microscopía de dispersión interferométrica optimizada.

Campo

5 La presente invención se refiere a métodos y aparatos para microscopía de dispersión interferométrica optimizada (denominada en el presente documento iSCAT).

Antecedentes

iSCAT se ha materializado como un enfoque poderoso para el seguimiento de partículas individuales con una resolución espaciotemporal única y una sensibilidad sin etiquetas hasta el nivel de una sola molécula.

10 iSCAT se divulga, por ejemplo, en Kukura et al., "High-speed nanoscopic tracking of the position and orientación of a single virus", Nature Methods 2009 6:923-935, y en Ortega Arroyo et al. "Interferometric scattering microscopy (iSCAT): new frontiers in ultrafast and ultrasensitive optical microscopy", Physical Chemistry Chemical Physics 2012 14:15625-15636.

15 A pesar del considerable potencial, la aplicación generalizada de iSCAT se ha visto limitada por la necesidad de microscopios personalizados, cámaras no convencionales e iluminación de muestras compleja, lo que limita las capacidades de iSCAT para la detección, obtención de imágenes y caracterización robustas y precisas de objetos tan pequeños como moléculas individuales.

20 En nuestra patente anterior, WO 2018/011591, divulgamos un microscopio de dispersión interferométrica que comprende una nueva máscara espacial que mejora el contraste y está configurada para mejorar las amplitudes relativas de referencia y los campos de luz dispersa. El microscopio allí descrito es capaz de alcanzar una sensibilidad similar a la de las técnicas iSCAT convencionales, pero con una reducción drástica en la complejidad y el coste de implementación, hasta el punto de que un microscopio convencional podría configurarse para realizar iSCAT mediante una simple modificación e inclusión de la máscara espacial.

Sin embargo, a los inventores de la presente solicitud les han resultado evidentes una serie de limitaciones a la sensibilidad de medición que se puede lograr usando ese enfoque.

25 En primer lugar, las fluctuaciones de fondo en la iluminación, por ejemplo debidas al ruido del láser u otros fenómenos de interferencia, a menudo no pueden eliminarse debido a la posibilidad de que dichas fluctuaciones contengan información sobre la muestra que se está interrogando. Por tanto, estas firmas de fondo limitan la sensibilidad de detección.

30 En segundo lugar, la intensidad de la luz con la que se puede iluminar una muestra bajo interrogación está limitada por las características del detector, incluida la capacidad total y la velocidad de lectura. De acuerdo con lo anterior, a intensidades de iluminación más altas, se debe utilizar una máscara espacial más fuerte para reducir la cantidad de luz que llega al detector, limitando el rango de masas y haciendo que el instrumento sea más sensible a influencias externas.

35 En tercer lugar, con un microscopio de este tipo sólo se puede obtener una única medición de las interacciones o eventos de la muestra para el mismo instante en el tiempo, por lo que no se pueden derivar correlaciones a través de algoritmos de detección de partículas para eventos de una sola molécula.

Finalmente, en aplicaciones donde el aparato se utiliza para la detección de masas de muestras (fotometría de masas), el rango dinámico de la medición está limitado por la fuerza elegida de la máscara espacial. Es decir, es necesario optimizar el aparato para la detección de masas altas o bajas.

40 La presente invención proporciona métodos y aparatos para técnicas iSCAT optimizadas que abordan cada una de las limitaciones mencionadas anteriormente. Los métodos aquí divulgados abordan estas limitaciones al manipular la señal de imagen en el lado de detección del aparato después de que la muestra haya dispersado una parte de la luz de iluminación.

Resumen de la invención

45 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para obtener imágenes de una muestra mediante microscopía de dispersión interferométrica. El método comprende: iluminar una muestra con al menos una fuente de luz coherente, mantener la muestra en una ubicación de muestra que comprende una interfaz que tiene un cambio de índice de refracción, iluminar la muestra con radiación de iluminación para generar una señal de retropropagación desde la muestra que comprende luz reflejada en la interfaz y la luz dispersada por la muestra; dividir la señal de retropropagación en señales primera y segunda de manera que cada una de las señales primera y
50 segunda comprenda al menos una parte de la luz dispersada por la muestra; modificar la segunda señal usando un elemento modificador de manera que la segunda señal difiera de la primera señal, en el que modificar la segunda señal comprende desplazamiento de fase, ampliación en una primera dirección o filtrado espacial con una intensidad

mayor que el filtrado espacial aplicado a la primera señal; dirigir las señales primera y segunda hacia detectores primero y segundo para generar, respectivamente, imágenes primera y segunda; y comparar, mediante un procesador, la primera y segunda imágenes para determinar una o más características de la muestra.

El método comprende iluminar una muestra con al menos una fuente de luz coherente, manteniéndose la muestra en una ubicación de muestra que comprende una interfaz que tiene un cambio de índice de refracción, iluminando la muestra con radiación de iluminación para generar una señal de retropropagación desde la muestra que comprende luz reflejada en la interfaz y luz dispersada por la muestra, dividiendo la señal de retropropagación en primera y segunda señal, modificando la segunda señal usando un elemento modificador de modo que la segunda señal difiera de la primera señal, dirigiendo la primera y segunda señal al primer y segundo detector para generar, respectivamente, primera y segunda imágenes y comparar, mediante un procesador, la primera y segunda imágenes para determinar una o más características de la muestra.

Un filtro espacial opcional está configurado para efectuar una reducción de la intensidad de la radiación incidente, siendo la reducción de la intensidad mayor dentro de una apertura numérica predeterminada. Así, el filtro espacial reduce selectivamente la intensidad de la luz iluminadora sobre la luz dispersada, aprovechando el desajuste entre la apertura numérica de la luz iluminadora reflejada y la luz dispersada de los objetos en una muestra en la ubicación de la muestra. Así, el filtro espacial aprovecha las diferentes direccionalidades de estas dos fuentes de luz. La luz de iluminación reflejada típicamente tendrá una apertura numérica relativamente pequeña, mientras que los objetos de tamaño sub-difrativo cerca de una superficie de la muestra dispersan luz preferentemente en aperturas numéricas altas. Por lo tanto, la reducción de intensidad mediante el filtro espacial en aperturas numéricas bajas afecta predominantemente a la luz iluminadora y tiene un efecto mínimo sobre la luz dispersada, maximizando así el contraste de la imagen.

Se obtienen numerosas ventajas al dividir la señal de retropropagación, lo que permite capturar dos imágenes de la muestra del mismo instante en el tiempo y, por lo tanto, a su vez permite investigar la muestra sin fluctuaciones de intensidad dependientes del tiempo, como inconsistencias en la fuente de luz de iluminación introducida por adquisiciones secuenciales de imágenes.

Las propiedades de la muestra, como la masa de la muestra en un experimento de fotometría de masas, también se pueden investigar modificando de forma independiente una de las dos señales divididas antes de que llegue al detector. Esto también se puede hacer para eliminar firmas de ruido de fondo, aumentando la sensibilidad de la medición.

En algunas realizaciones, al menos una fuente de luz coherente comprende un primer láser y un segundo láser, cuyos haces se combinan antes de la iluminación de la muestra. Proporcionar múltiples fuentes de luz conduce a un mayor flujo de fotones en la muestra y, por lo tanto, hace que sea más práctico dividir la señal reflejada en dos señales, cada una de las cuales contiene suficiente información para formar de forma independiente una imagen de la muestra.

En algunas realizaciones, dividir la señal comprende dividir la señal que se propaga hacia atrás en dos señales que tienen polarizaciones ortogonales. La separación del canal de imagen en dos polarizaciones ortogonales permite investigar las propiedades birrefringentes de la muestra.

En algunas realizaciones, dividir la señal comprende dividir la señal de retropropagación en dos señales que tienen diferente potencia óptica. La separación del canal de imagen en dos señales que tienen diferente potencia óptica permite lograr diferentes equilibrios entre el haz de referencia y la luz dispersada de la muestra.

En algunas realizaciones, pasar al menos una de la primera y segunda señales a través de un filtro espacial comprende pasar la primera señal a través de un primer filtro espacial y modificar la segunda señal de modo que difiera de la primera señal comprende pasar la segunda señal a través de un segundo filtro espacial en el que el primer filtro espacial y el segundo filtro espacial están configurados cada uno para efectuar una reducción de la intensidad de la radiación incidente, siendo la reducción de la intensidad mayor dentro de una apertura numérica predeterminada, en el que la primera señal tiene una potencia óptica mayor que la segunda señal y en el que el segundo filtro espacial aplica una mayor reducción de intensidad a la radiación incidente que el primer filtro espacial. El primer filtro espacial y el segundo filtro espacial pueden configurarse cada uno para efectuar una reducción de la intensidad de la radiación incidente, siendo la reducción de la intensidad mayor dentro de una apertura numérica predeterminada. La primera señal puede tener una potencia óptica mayor que la segunda señal y el segundo filtro espacial puede aplicar una mayor reducción de intensidad a la radiación incidente que el primer filtro espacial.

Usando configuraciones anteriores, el uso de un único filtro espacial "general" limitó el rango dinámico de medición, lo que obligó a optimizar el aparato para masa alta o baja. Una máscara de alta resistencia optimiza la captura de imágenes de partículas que tienen un peso molecular bajo, mientras que para partículas que tienen un peso molecular alto puede ser suficiente una máscara débil o incluso ninguna máscara. Dividir la señal reflejada en dos señales de diferente intensidad (por ejemplo, 90:10) y aplicar filtros espaciales de intensidades apropiadas (por ejemplo, 0,1% y 1%) a cada señal permite interrogar un espectro más amplio de masa al tener un brazo dividido optimizado para baja masa y otro brazo dividido optimizado para gran masa.

- En algunas realizaciones, dirigir la primera y segunda señales hacia el primer y segundo detector comprende ajustar la fase de la segunda señal con respecto a la primera señal. Ajustar la fase de la segunda señal con respecto a la primera señal puede comprender pasar la segunda señal a través de una máscara de desplazamiento de fase y/o pasar la segunda señal a través de una lente de formación de imágenes en una ubicación apropiada a lo largo de la trayectoria óptica de la segunda señal. La segunda señal se puede ajustar con respecto a la primera señal en media longitud de onda de la radiación luminosa.
- Algunas fluctuaciones en la iluminación de la muestra (por ejemplo, debido a cambios de reflectividad en el sistema, contribuciones del buffer, reflexiones secundarias, ruido láser y otros fenómenos de interferencia) no se pudieron eliminar en configuraciones anteriores. Estas firmas de fondo limitan la capacidad de eliminar el ruido de la configuración, ya que no se sabe si las fluctuaciones son ruido o se deben a la luz dispersada de la muestra.
- Ajustando independientemente la fase de la primera o segunda señal, y comparando las dos imágenes generadas simultáneamente (ventajosa como se especifica en relación con la reivindicación 1), es posible resaltar fluctuaciones que no están correlacionadas en las dos imágenes y clasificarlas como no originadas en el plano de la imagen.
- Hacerlo proporciona un segundo resultado de medición para correlacionar imágenes de eventos de una sola molécula, que en configuraciones anteriores solo podían procesarse utilizando mediciones únicas por instante en el tiempo, lo que significa que las correlaciones eran difíciles o imposibles de derivar.
- En algunas realizaciones, modificar la segunda señal comprende pasar la segunda señal a través de un elemento óptico configurado para aplicar un aumento asimétrico a la segunda señal a lo largo de una primera dimensión correspondiente a una dimensión x de una cuadrícula de píxeles del segundo detector. En algunas realizaciones, la primera señal puede pasar a través de un elemento óptico configurado para aplicar un aumento asimétrico a la primera señal a lo largo de una segunda dimensión, siendo la segunda dirección ortogonal a la primera dirección y correspondiente a una dimensión y de una cuadrícula de píxeles del segundo detector.
- La cantidad de luz que se podía utilizar en configuraciones anteriores estaba limitada por la lectura de la cámara digital, lo que requería el uso de un filtro espacial más potente, lo que a su vez conduce a una mayor sensibilidad a las vibraciones y a una ampliación de las distribuciones de masa registradas en fotometría de masas. Al dividir la señal en dos y realizar una ampliación unidimensional en cada una de las dimensiones x e y de las señales respectivas, la cámara recibe el mismo número de fotones en el mismo número de píxeles o en uno mayor, que, lo que es más importante, se pueden organizar en una forma de optimizar la velocidad de lectura. Esto equivale a una capacidad para procesar un mayor flujo de fotones detectados sin aumentar la velocidad de lectura de la cámara digital.
- En algunas realizaciones, al menos una fuente de luz coherente está configurada para proporcionar luz de iluminación que tiene al menos dos longitudes de onda de interrogación distintas; y dividir la señal comprende dividir la señal por longitud de onda, de modo que la luz que tiene una primera longitud de onda de interrogación se dirige al primer detector y la luz que tiene una segunda longitud de onda de interrogación se dirige al segundo detector.
- Medir la misma muestra con dos longitudes de onda de sonda diferentes puede ayudar a identificar cambios de medición causados por componentes imperfectos del sistema óptico, o que se deben a que la muestra absorbe en una longitud de onda pero no en otra (por ejemplo, debido a una etiqueta fluorescente o un tinte diferente agregado a la muestra que afectaría la dispersión o debido a la absorción de una longitud de onda en un recubrimiento del soporte de muestra).
- En algunas realizaciones, la apertura numérica predeterminada es idéntica o similar a la apertura numérica de la luz de iluminación reflejada desde la ubicación de la muestra en la señal de retropropagación. Esto maximiza el efecto de contraste de la imagen proporcionado por el filtro espacial.
- En algunas realizaciones, modificar la segunda señal comprende desplazamiento de fase, ampliación en una primera dirección o filtrado espacial con una intensidad mayor que el filtrado espacial aplicado a la primera señal.
- De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un microscopio de dispersión interferométrico que está configurado para llevar a cabo el método de cualquier reivindicación anterior. El microscopio comprende una ubicación de muestra que comprende una superficie reflectante, al menos una fuente de luz coherente configurada para iluminar la ubicación de la muestra, detectores primero y segundo, un divisor de haz configurado para dividir una señal que se propaga hacia atrás desde la ubicación de la muestra en señales primera y segunda y un elemento modificador configurado para modificar la segunda señal de manera que difiera de la primera señal en el que el sistema está configurado para dirigir la primera y segunda señales hacia los detectores primero y segundo, respectivamente.
- En algunas realizaciones, el microscopio de dispersión interferométrica comprende al menos un filtro espacial colocado para filtrar al menos una de la primera señal y la segunda señal, en el que el filtro espacial está configurado para efectuar una reducción en la intensidad de la radiación incidente que es mayor dentro de una abertura numérica predeterminada.
- La presente invención se puede aplicar con ventaja a una muestra que comprende objetos que tienen una sección transversal de dispersión con respecto a la luz iluminadora de 10^{-15} m^2 o menos. Normalmente, tales objetos también

pueden tener una sección transversal de dispersión con respecto a la luz de iluminación de 10^{-26} m^2 o más, es decir, dentro de un rango de 10^{-15} m^2 de 10^{-26} m^2 . Ejemplos de objetos que pueden estudiarse incluyen proteínas o pequeños agregados de las mismas, así como nanopartículas metálicas, orgánicas o inorgánicas.

- 5 Para obtener imágenes de objetos que son dispersores muy débiles, el filtro espacial está dispuesto para dejar pasar la luz de salida con una reducción de intensidad dentro de la apertura numérica predeterminada a 10^{-2} de la intensidad incidente o menos. Normalmente, el filtro espacial puede estar dispuesto para dejar pasar la luz de salida con una reducción de intensidad dentro de la apertura numérica predeterminada a 10^{-4} de la intensidad incidente o más, por ejemplo en el rango de 10^{-2} a 10^{-4} de la intensidad incidente.

Figuras

- 10 Para permitir una mejor comprensión, ahora se describirán realizaciones de la presente invención a modo de ejemplo no limitativo con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La FIG. 1 es un diagrama esquemático de un microscopio iSCAT de la técnica anterior;

La FIG. 2 es un diagrama esquemático de microscopios iSCAT modificados de la técnica anterior;

- 15 Las FIGS. 3a, 3b, 4 y 5 ilustran realizaciones ejemplares de un microscopio iSCAT de acuerdo con la presente invención;

Las FIGS. 6A, 6B y 6C muestran resultados experimentales obtenidos usando métodos y aparatos de acuerdo con la presente invención.

Descripción detallada

- 20 En los sistemas y métodos descritos en el presente documento, la luz utilizada puede ser: luz ultravioleta (que puede definirse en el presente documento con longitudes de onda en el intervalo de 10 nm a 380 nm); luz visible (que puede definirse en el presente documento con longitudes de onda en el intervalo de 380 nm a 740 nm); luz infrarroja (que puede definirse aquí como que tiene longitudes de onda en el rango de 740 nm a 300 μm). La luz puede ser una mezcla de longitudes de onda. En el presente documento, los términos "óptico" y "óptica" se utilizan para referirse en general a la luz a la que se aplican los métodos.

- 25 La FIG. 1 y la FIG. 2 ilustran configuraciones de microscopio iSCAT divulgadas en el documento WO 2018/011591 que tienen una serie de características estructurales y funcionalidades en común con el aparato y los métodos de la presente invención.

- 30 Para completar, la siguiente descripción establecerá los componentes y funcionalidades del microscopio iSCAT de la presente invención que son comunes con los del documento WO 2018/011591 y que se muestran en la FIG. 1 y FIG. 2, luego describe las diversas mejoras a dichas configuraciones proporcionadas por la presente divulgación y proporciona realizaciones de ejemplo de las mismas.

- 35 Por tanto, haciendo referencia a la FIG. 1, el microscopio 1 comprende un soporte de muestra 2 para sostener una muestra 3 en una ubicación de muestra. La muestra 3 puede ser una muestra líquida que comprende objetos de los que se van a formar imágenes, que se describen con más detalle a continuación. El portamuestras 2 puede adoptar cualquier forma adecuada para sostener la muestra 3. Normalmente, el portamuestras 2 sostiene la muestra 3 sobre una superficie, que forma una interfaz entre el portamuestras 2 y la muestra 3. Por ejemplo, el portamuestras 2 puede ser un cubreobjetos y/o puede estar hecho de vidrio. La muestra 3 se puede colocar en el soporte de muestra 2 de manera sencilla, por ejemplo usando una micropipeta.

- 40 El microscopio 1 comprende además una fuente de iluminación 4 y un detector 5. La fuente de iluminación 4 está dispuesta para proporcionar luz iluminadora. La luz iluminadora puede ser luz coherente. Por ejemplo, la fuente de iluminación 4 puede ser un láser. La longitud de onda de la luz iluminadora se puede seleccionar dependiendo de la naturaleza de la muestra 3 y/o de las propiedades a examinar. En un ejemplo, la luz iluminadora tiene una longitud de onda de 405 nm.

- 45 Opcionalmente, la luz de iluminación se puede modular espacialmente para eliminar patrones de motas que surgen de la naturaleza coherente de la iluminación y el ruido del láser, por ejemplo como se detalla en Kukura et al., "High-speed nanoscopic tracking of the position and orientation of a single virus", Nature Methods 2009 6:923-935.

El detector 5 recibe luz de salida reflejada desde la ubicación de la muestra. La luz de iluminación que llega al detector se refleja predominantemente desde una superficie de la muestra, típicamente una interfaz entre la muestra y el soporte de la muestra, proporcionando así interferencia con los objetos de la muestra cercanos a esa superficie.

- 50 Una cantidad relativamente pequeña, normalmente sólo el 0.5%, de la luz de iluminación se refleja en los ejemplos en los que se utiliza una interfaz vidrio-agua, mientras que una cantidad significativamente mayor, normalmente superior al 90%, de luz dispersada por un objeto nanoscópico en la interfaz, se dispersa hacia la dirección de iluminación. Esto mejora intrínsecamente la relación entre los campos de luz dispersa y reflejada más de 1000 veces en comparación

con las geometrías de tipo transmisión, lo que resulta en un mayor contraste interferométrico. Como resultado, es necesario detectar tres órdenes de magnitud menos de fotones para lograr la misma relación señal/ruido nominal dada una dispersión, intensidad de iluminación y tiempo de exposición específicos, que para las configuraciones de tipo de transmisión.

- 5 Normalmente, el microscopio 1 puede funcionar en un modo de campo amplio, en cuyo caso el detector 5 puede ser un sensor de imagen que captura una imagen de la muestra 3. El microscopio 1 puede funcionar alternativamente en un modo confocal, en cuyo caso el detector 5 puede ser un sensor de imagen o puede ser un detector puntual, tal como un fotodiodo, en cuyo caso se puede usar una disposición de escaneo para escanear una región de la muestra 3 para construir una imagen. Ejemplos de sensores de imagen que pueden emplearse como detector 5 incluyen un
- 10 sensor de imagen CMOS (semiconductor de óxido metálico complementario) o un CCD (dispositivo de carga acoplada).

El microscopio 1 comprende además un sistema óptico 10 dispuesto entre el soporte de muestra 2, la fuente de iluminación 4 y el detector 5. El sistema óptico 10 está dispuesto de la siguiente manera para dirigir la luz de iluminación hacia la ubicación de la muestra para iluminar la muestra 3, y para recoger emitir luz reflejada desde la ubicación de la muestra y dirigir la luz de salida al detector 5.

15

El sistema óptico 10 incluye una lente objetivo 11 que es un sistema de lentes dispuesto delante del soporte de muestra 2. El sistema óptico 10 también incluye una lente condensadora 12 y una lente tubular 13. La lente condensadora 12 condensa la luz de iluminación procedente de la fuente de luz 11 (mostrada por líneas continuas en la FIG. 1) a través de la lente objetivo 11 sobre la muestra 3 en la ubicación de la muestra.

- 20 La lente objetivo 11 recoge la luz de salida que comprende tanto (a) luz iluminadora reflejada desde la ubicación de la muestra (mostrada por líneas continuas en la FIG. 1), como (b) luz dispersada desde la muestra 3 en la ubicación de la muestra (mostrada por líneas punteadas en la FIG. 1). La luz reflejada se refleja predominantemente desde la interfaz entre el portamuestras 2 y la muestra 3.

- 25 Normalmente se trata de un reflejo relativamente débil, por ejemplo un reflejo de agua y vidrio. Por ejemplo, la intensidad de la luz iluminadora reflejada puede ser del orden del 0,5% de la intensidad de la luz iluminadora incidente. La luz dispersada es dispersada por objetos en la muestra 3. Luz dispersada de objetos en o cerca de la superficie de la muestra de manera constructiva interfieren con la luz reflejada y por lo tanto son visibles en la imagen capturada por el detector 5.

- 30 Como se muestra en la FIG. 1, la luz iluminadora reflejada y la luz dispersada tienen direccionalidades diferentes. En particular, la luz iluminadora reflejada tiene una apertura numérica que resulta de la geometría del haz de luz emitido por la fuente de luz 4 y el sistema óptico 6. La luz dispersada se dispersa en una amplia gama de ángulos y, por lo tanto, llena la apertura numérica más grande que la luz iluminadora reflejada. La lente tubular 13 enfoca la luz de salida desde la lente objetivo 11 hacia el detector 5.

- 35 El sistema óptico 10 también incluye un divisor de haz 14 que está dispuesto para dividir las trayectorias ópticas para la luz de iluminación de la fuente de luz 4 y la luz de salida dirigida al detector 5. El divisor de haz 14 puede tener una construcción convencional que proporciona reflexión parcial y transmisión parcial de la luz que incide sobre el mismo.

- En los ejemplos de la presente divulgación, la fuente de luz 4 está desplazada de la trayectoria óptica de la lente objetivo 11 de modo que la luz de iluminación de la fuente de luz 4 es reflejada por el divisor de haz 14 hacia la lente objetivo 11 y, a la inversa, el detector 5 está alineado con la trayectoria óptica de la lente objetivo 11 de modo que la luz de salida desde la ubicación de la muestra se transmite a través del divisor de haz 14 hacia el detector 5.
- 40

- Además de los componentes descritos anteriormente que pueden ser de construcción convencional, el microscopio 1 incluye una máscara o filtro espacial 20. En el ejemplo de la FIG. 1, el filtro espacial 20 está formado en el divisor de haz 14 y, por lo tanto, está colocado detrás de la abertura posterior de la lente objetivo 11 y, por lo tanto, directamente detrás del plano focal posterior 15 de la lente objetivo 11, sin embargo, el filtro espacial 20 puede colocarse en otros puntos a lo largo del camino óptico del microscopio iSCAT para lograr el mismo efecto que se describe a continuación.
- 45

El filtro espacial 20 está colocado para filtrar la luz de salida de retropropagación que pasa desde la interfaz del portamuestras al detector 5. En los ejemplos de la presente divulgación en los que el detector 5 está alineado con una trayectoria óptica de la lente objetivo 11, el filtro espacial 20 es por tanto transmisivo.

- 50 El filtro espacial 20 es parcialmente transmisivo y por lo tanto deja pasar la luz de salida, que incluye la luz de iluminación reflejada, pero con una reducción de intensidad. El filtro espacial 20 también está alineado con el eje óptico y tiene una apertura predeterminada de modo que proporciona una reducción de intensidad dentro de una apertura numérica predeterminada. Aquí, la apertura numérica se define en su forma normal como una cantidad adimensional que caracteriza un rango de ángulos con respecto a la ubicación de la muestra desde la cual se origina la luz de salida.

- 55 Específicamente, la apertura numérica NA puede definirse mediante la ecuación: $NA = n \cdot \sin(\theta)$, donde θ es el medio ángulo de captación y n es el índice de refracción del material a través del cual pasa la luz de salida (por ejemplo el material de los componentes del sistema óptico 10).

El filtro espacial 20 puede formarse de cualquier manera adecuada, normalmente comprende una capa de material depositado. El material puede ser, por ejemplo, un metal como plata. En algunas realizaciones, el filtro espacial puede comprender uno o más revestimientos dieléctricos. En algunas realizaciones, el filtro espacial puede formarse de manera que refleje parcialmente la radiación incidente dentro de un rango determinado de ángulos. La deposición se puede realizar usando cualquier técnica adecuada.

Como los objetos de tamaño de subdifracción cerca de una interfaz dispersan la luz preferentemente en una apertura numérica mayor que la luz iluminadora reflejada, la reducción de intensidad proporcionada por el filtro espacial 20 reduce preferentemente la intensidad en la detección de la luz iluminadora reflejada sobre la luz dispersada. De acuerdo con lo anterior, la reducción de intensidad mediante el filtro espacial 20 en aperturas numéricas bajas afecta predominantemente a la luz iluminadora reflejada y tiene un efecto mínimo sobre la luz dispersada, maximizando así el contraste en la imagen capturada. El contraste de imagen mejorado permite la detección de alto contraste de objetos que tienen una dispersión débil.

El mejoramiento del contraste se puede entender de la siguiente manera. Cuando el filtro espacial 20 permite que parte de la luz de salida pase dentro de la apertura numérica predeterminada (es decir, es parcialmente transmisivo en este ejemplo), fracciones de la luz de iluminación y de la luz dispersada llegan al detector e interfieren para una fuente de iluminación suficientemente coherente. La intensidad de luz que llega al detector I_{det} entonces se da por:

$$I_{det} = |E_{inc}|^2 \{r^2 t^2 + |s|^2 + 2rt|s|\cos\Phi\},$$

donde E_{inc} es el campo de luz incidente, r^2 es la reflectividad de la interfaz y t^2 es la transmisividad del filtro espacial 20, s es la amplitud de dispersión del objeto y Φ es la diferencia de fase entre la luz iluminante transmitida y la luz dispersada.

El filtrado adicional proporcionado por el filtro espacial 20 permite que la amplitud del campo de referencia se sintonice directamente mediante la selección de la transmisividad t^2 del filtro espacial 20, en lugar de fijarse mediante la reflectividad de una interfaz vidrio-agua como en el iSCAT estándar. En el caso de que el filtro espacial 20 sea una capa de material depositado, la transmisividad t^2 puede seleccionarse eligiendo el material y/o el espesor de la capa. Dicha sintonización se puede realizar de acuerdo con, por ejemplo, el objeto de dispersión de interés, la capacidad total de la cámara y el aumento.

La iluminación de campo claro garantiza que las retrorreflexiones no deseadas más intensas, que normalmente se originan en el objetivo, se dirijan lejos del detector 5, minimizando el fondo de imágenes y permitiendo grandes campos de visión sin una exploración compleja del haz de luz iluminadora.

Para obtener imágenes de objetos que son dispersores relativamente débiles, el filtro espacial 20 puede disponerse para dejar pasar la luz iluminadora reflejada con una reducción de intensidad dentro de la apertura numérica predeterminada hasta una intensidad en el rango de 10^{-2} a 10^{-4} de la intensidad de luz incidente (en este contexto, la intensidad de la luz de salida que incide sobre el filtro espacial 20).

Por ejemplo, se puede obtener imágenes de una muestra que comprende objetos que tienen una masa de 5000 kDa o menos. Normalmente, las técnicas descritas se pueden aplicar a una muestra que comprende objetos que tienen una masa de 10 kDa o más, por ejemplo objetos que tienen una masa dentro de un rango de 10 kDa a 5000 kDa, y/o a una muestra que comprende objetos que tienen una sección de cruz de dispersión respecto a la luz iluminadora de 10^{-12} m^2 o menos, o más preferentemente 10^{-17} m^2 o menos. Normalmente, dichos objetos también pueden tener una sección transversal de dispersión con respecto a la luz iluminadora, por ejemplo, dentro de un intervalo de 10^{-17} m^2 y de 10^{-26} m^2 . Ejemplos de objetos a los que se pueden aplicar las técnicas de la presente divulgación para obtener imágenes incluyen proteínas o pequeños agregados de las mismas, o sus socios de unión.

Para obtener imágenes simultáneamente de dispersores más fuertes, la transmisividad del segundo filtro se puede establecer entre 1 y 10^{-2} , dependiendo del rango de detección deseado.

Haciendo referencia a la FIG. 2, se ilustra una segunda configuración de ejemplo del microscopio 1. La configuración de la FIG. 2 también se divulga en el documento WO 2018/011591 y es igualmente adecuado para la optimización mediante la aplicación de las técnicas de la presente invención.

La configuración de la FIG. 2 posiciona el filtro espacial 20 en un plano focal conjugado 21 del plano focal posterior de la lente objetivo 11, en lugar de estar detrás de la abertura posterior de la lente objetivo 11. El plano focal conjugado 21 del plano focal posterior 15 de la lente objetivo 11 está formada entre un par de lentes telescópicas 22 y 23 colocadas detrás de la lente tubular 13.

Después de la fuente de luz 4 está dispuesto un deflector acústico-óptico 32 para proporcionar exploración de la luz iluminadora. El deflector acústico-óptico 32 puede operarse para escanear una región de la muestra 3 para construir una imagen y/o proporcionar modulación espacial para eliminar

Patrones de manchas que surgen de la naturaleza coherente de la iluminación y el ruido del láser, como se mencionó anteriormente.

La lente condensadora 12 se reemplaza por un par de lentes telecéntricas 30 y 31 que realizan la función de visualizar cualquier modificación en la trayectoria del haz en el deflector acústico-óptico 32 en el plano focal posterior del objetivo de visualización.

Las posiciones de la fuente de luz 4 y el detector 5 están invertidas con respecto a la configuración de la FIG. 1 de modo que la luz de iluminación de la fuente de luz 4 se transmite a través del divisor de haz 14 hacia la lente objetivo 11 y, a la inversa, la luz de salida desde la ubicación de la muestra es reflejada por el divisor de haz 14 hacia el detector 5.

El divisor de haz 14 es un divisor de haz polarizador y una placa de cuarto de onda 33 está dispuesta entre el divisor de haz 14 y la muestra 3, de modo que el divisor de haz 14 divide la luz. Se dispone un espejo 34 para desviar la luz de salida reflejada por el divisor de haz 14.

Ahora, con referencia a las Figs. 3-5, la siguiente descripción se centra en varias mejoras proporcionadas por la presente invención a las configuraciones descritas anteriormente del microscopio iSCAT 1.

El uso del filtro espacial 20 no altera fundamentalmente los límites de sensibilidad o SNR (relación señal-ruido) alcanzables para un objeto dado, la intensidad de la luz incidente y el tiempo de exposición; sin embargo, la sensibilidad se puede aumentar mediante la manipulación de la señal de retropropagación en el lado de detección del aparato después de que una parte de la luz iluminadora haya sido dispersada por el objeto.

En las configuraciones de ejemplo ilustradas en las FIGS. 3-5, la señal de retropropagación se manipula haciéndola pasar a través de un segundo divisor de haz 36 configurado para dividir la señal de retropropagación en señales primera y segunda, que luego se dirigen, respectivamente, al primer y segundo detectores 5 y 6. De esta manera, se pueden capturar dos señales de imagen separadas para un objeto determinado en el mismo instante y procesarse a través de canales de imagen separados. Esto, a su vez, permite investigar la luz dispersada por una muestra mediante comparación de imágenes sin introducir fluctuaciones de intensidad dependientes del tiempo de la fuente de iluminación o cambios en el sistema óptico 10.

Además, al modificar independientemente al menos una de las dos señales divididas del divisor de haz 36 antes de que lleguen a los detectores, se pueden investigar propiedades adicionales de una muestra y se puede aumentar la sensibilidad de la medición. Por ejemplo, las firmas de ruido de fondo se pueden eliminar de la iluminación, y la primera y segunda señales se pueden sintonizar entre sí y combinar para proporcionar más información sobre una muestra, como se explicará a continuación.

El divisor de haz 36 está configurado para dividir la señal de retropropagación de una manera que depende de qué propiedades de la muestra/señal de retropropagación se están investigando.

Por ejemplo, en algunas realizaciones en las que es deseable dividir la señal por potencia óptica, el divisor de haz 36 puede comprender una placa, provista de una película, que puede ser metálica o dieléctrica, dispuesta a 45° con respecto a las trayectorias ópticas. Alternativamente, el divisor de haz 36 puede ser un divisor de haz cúbico formado por un par de prismas emparejados que tienen una película parcialmente reflectante en la interfaz entre los prismas.

En algunas realizaciones, el divisor de haz 36 es un divisor de haz polarizador, usado en combinación con una placa de cuarto de onda entre el divisor de haz 36 y la muestra 3, y está configurado para dividir la señal de retropropagación en primera y segunda señales polarizadas ortogonalmente. Tal configuración permite el análisis de las propiedades birrefringentes de una muestra mediante los detectores 5 y 6.

En algunas realizaciones, la luz de iluminación comprende al menos dos longitudes de onda de interrogación distintas para iluminar la muestra y el divisor de haz 36 está configurado para dividir la señal de retropropagación por longitud de onda, de modo que la luz que tiene una primera longitud de onda de interrogación se dirige al primer detector 5 y la luz que tiene una segunda longitud de onda de interrogación se dirige al segundo detector 6.

Medir la misma muestra con dos longitudes de onda de sonda diferentes puede ayudar a identificar cambios en la intensidad causados por componentes del sistema óptico que dependen de la longitud de onda. Dicha configuración también puede identificar cambios en la intensidad causados por la muestra que absorbe luz en una longitud de onda pero no en la otra, por ejemplo debido a una etiqueta fluorescente o a un tinte diferente agregado a la muestra que afectaría la dispersión, o debido a la absorción de una longitud de onda en un recubrimiento del soporte de la muestra.

Los métodos de optimización descritos en el presente documento son complementarios y pueden usarse por separado o en combinación entre sí. De acuerdo con lo anterior, en algunas realizaciones el divisor de haz 36 puede comprender múltiples divisores de haz, cada uno configurado para dividir la señal de una manera diferente o de la misma manera de modo que la señal de retropropagación se divida en tres o más señales, cada una de las cuales puede luego dirigirse a un detector separado.

Haciendo referencia a la FIG. 3a, se ilustra un ejemplo de configuración optimizada del microscopio 1 que se basa en la configuración óptica de la FIG. 1.

Además de los componentes ópticos de la FIG. 1, la configuración de la FIG. 3a incluye un segundo detector 6 y un segundo divisor de haz 36 que está ubicado a lo largo de la trayectoria óptica de la señal de retropropagación entre la lente del tubo 13 y los detectores 5 y 6, y que está configurado para dividir la señal de retropropagación en primera y segunda señales.

En el ejemplo ilustrado, la primera señal pasa directamente al detector 5, mientras que la segunda señal se dirige a través de un elemento reflectante 38 a través de un elemento modificador de señal 40, antes de incidir en el segundo detector 6. El elemento modificador de señal 40 se elige de acuerdo con el tipo de optimización de la señal de imagen que se desea.

En un enfoque de optimización de ejemplo, el divisor de haz 36 divide la señal de retropropagación en señales primera y segunda que tienen igual potencia óptica, y el elemento de modificación 40 comprende una máscara retardadora configurada para desfasar la luz dispersada por un objeto sostenido en la ubicación de la muestra por $\pi/2$. En la segunda señal sin afectar la fase de la luz iluminadora. Al hacerlo, la imagen de la muestra en la segunda señal se invierte, provocando que la luz dispersada que de otro modo interferiría de forma constructiva interfiera de forma destructiva.

Como la luz dispersada en la primera señal no está desfasada, la luz dispersada interfiere constructivamente como en el iSCAT convencional. Por lo tanto, cuando se comparan las imágenes adquiridas por los detectores 5 y 6, se correlacionarán las fluctuaciones de intensidad en las imágenes causadas por la dispersión de la muestra, y las fluctuaciones de intensidad que no están correlacionadas entre las dos imágenes se pueden identificar y atribuir a las firmas de fondo como, por ejemplo, imperfecciones en la luz de iluminación.

La identificación de tales firmas de fondo en imágenes iSCAT, obtenidas mediante "sintonización de fase" independiente de la luz dispersada en las señales divididas, permite eliminar las firmas y, por lo tanto, mejora la sensibilidad del microscopio 1.

En un ejemplo alternativo, la fase de la luz dispersada se invierte en su lugar haciendo que el elemento modificador de señal 40 comprenda una lente de imagen, y moviendo dicha lente de imagen a un punto apropiado a lo largo de la trayectoria óptica de la segunda señal dividida entre el segundo divisor de haz 36 y segundo detector 6. Tal configuración permite el mismo efecto de "sintonización" en la fase de la luz dispersada que proporciona una máscara de desplazamiento de fase. Esto se debe a la naturaleza desenfocada de la luz que ilumina desde la fuente de iluminación 4 y a la naturaleza altamente enfocada de la luz dispersada por una muestra 3 de tamaño límite de subdifracción. Este efecto puede entenderse como se explica a continuación.

Si un haz de luz colimado se enfoca en un solo punto en el espacio mediante una lente/elemento de enfoque perfecto, la fase del haz, medida en el otro lado del punto focal a una distancia igual a la longitud focal del elemento de enfoque, será han incurrido en un cambio de fase de π . Exactamente en el punto de enfoque, el cambio de fase será $\pi/2$. Este cambio de fase se denomina cambio de fase de Guy y tiene una dependencia aproximadamente lineal de la distancia desde el punto focal.

En la práctica, ningún elemento de enfoque es capaz de enfocar un haz en un solo punto en el espacio, y la intensidad del cambio de fase en función de la distancia para un haz de luz determinado se basa en qué tan bien enfocado está ese haz. La luz débilmente enfocada, como por ejemplo la luz de iluminación de la fuente de iluminación 4, apenas se ve afectada por el cambio de fase de Guy. Por el contrario, las moléculas individuales o muestras muy pequeñas, como las que se examinan con el microscopio iSCAT de la presente divulgación, tienen tamaños por debajo del límite de difracción de la luz iluminadora y, por lo tanto, actúan como un elemento de enfoque casi perfecto. Como tal, la luz dispersada en la señal que se propaga hacia atrás tendrá una alta dependencia de la fase Guy a lo largo de su trayectoria óptica, mientras que la luz iluminadora no la tendrá.

En el caso de un microscopio iSCAT, tanto la luz dispersada como la luz de iluminación reflejada sufren cambios de fase adicionales debido al cambio del índice de refracción en la interfaz de ubicación de la muestra/objeto antes de pasar a través del divisor de haz 36 y ser fotografiadas en los detectores 5 y 6. esta configuración óptica, que varía la ubicación de la lente de imagen, que en este ejemplo es el elemento modificador 40, permite ajustar el cambio de fase de Guy de la luz dispersada sin afectar la luz iluminadora débilmente enfocada, emulando un cambio en la distancia desde el punto focal.

De acuerdo con lo anterior, la fase de la luz dispersada se puede cambiar sin cambiar la fase de la luz iluminadora, y la imagen de la muestra recibida por el detector 6 se puede invertir como se describe en relación con la máscara de cambio de fase.

La Figura 3a representa una disposición en la que hay dos láseres 4a y 4b que se combinan mediante un divisor de haz 4c para formar un haz de iluminación más potente.

Aunque esta realización se ilustra y describe como una optimización de la configuración de la FIG. 1, también se puede implementar como una optimización de la configuración de la FIG. 2.

La Figura 3b representa una disposición alternativa a la FIG. 3a excepto que no hay ningún filtro espacial 20. El haz todavía está dividido, con un elemento modificador 40 colocado en el camino de la segunda señal dividida. El elemento modificador puede ser un aumento, un cambio de fase o incluso un filtrado espacial de la segunda señal dividida para aumentar la sensibilidad del aparato.

Haciendo referencia a la FIG. 4, se ilustra un ejemplo de configuración optimizada del microscopio 1 que se basa en la configuración óptica de la FIG. 2.

Además de los componentes ópticos de la FIG. 2, la configuración de la FIG. 4 incluye un segundo detector 6 y un segundo divisor de haz 36 que está ubicado a lo largo de la trayectoria óptica de la señal de retropropagación entre la lente del tubo 13 y los detectores 5 y 6, y que está configurado para dividir la señal de retropropagación en primera y segunda señales. En esta configuración, uno o más filtros espaciales 20 están ubicados entre el divisor de haz 36 y los detectores 5 y 6.

En el ejemplo ilustrado, el divisor de haz 36 divide asimétricamente la señal de retropropagación en señales primera y segunda que tienen diferentes potencias ópticas. La primera señal pasa a través de un primer filtro espacial 20 al detector 5, y la segunda señal se dirige a través de un elemento reflectante 38 a través del elemento modificador de señal 40 que es un segundo filtro espacial que tiene una intensidad diferente a la del primer filtro espacial, antes de incidir en el Segundo detector 6.

En experimentos de fotometría de masas, en los que se utiliza un microscopio iSCAT para medir la masa de objetos con límite de subdifracción mantenidos en la ubicación de la muestra, la calidad de la señal de la imagen normalmente debe optimizarse para un rango de masa determinado, ya que los dispersores débiles requieren una mayor potencia óptica en la iluminación y, por lo tanto, que el filtro espacial 20 atenúe más luz de iluminación que los dispersores fuertes.

Dividir asimétricamente la señal de retropropagación y pasar la primera y segunda señales a través de filtros espaciales que tienen diferentes intensidades como se describió anteriormente permite generar la primera y segunda señales, cada una de las cuales tiene un equilibrio diferente entre la luz de iluminación (haz de referencia) y la luz dispersada de la muestra en el plano de la imagen (señal de imagen). Por lo tanto, la primera y segunda imágenes pueden ser adquiridas por los detectores 5 y 6, cada uno de los cuales está optimizado para la medición de objetos de gran masa o para la medición de objetos de baja masa. Esto aumenta el rango de masa dinámico medible con el microscopio 1.

Por ejemplo, el divisor de haz 36 puede configurarse de modo que la primera señal tenga una potencia óptica mayor que la segunda señal, en cuyo caso el segundo filtro espacial aplica una mayor reducción de intensidad a la radiación incidente que el primer filtro espacial. La relación de potencia óptica entre la primera y la segunda señal puede ser, por ejemplo, 90:10, en cuyo caso se utilizarán filtros espaciales de intensidades apropiadas, por ejemplo, atenuación de 0,1% y 1% respectivamente. Esta relación se puede ajustar dependiendo del rango de detección deseado en cualquier dirección, por ejemplo 99:1 con una atenuación de 0,01 y 10 %, respectivamente. Idealmente, la combinación de relación de potencia óptica y atenuación siempre se elige de manera que se mantenga la misma intensidad de luz en ambos canales de imágenes.

La Figura 4 representa un deflector acústico-óptico (AOD) 27 opcional en la trayectoria del haz de iluminación. Después de la fuente de luz está dispuesto un deflector acústico-óptico para poder escanear la luz iluminadora. El deflector acústico-óptico 27 puede funcionar para escanear una región de la muestra 3 para crear una imagen y/o proporcionar modulación espacial para eliminar patrones de motas que surgen de la naturaleza coherente de la iluminación y el ruido del láser, como se mencionó anteriormente.

Aunque esta realización se ilustra con referencia a una configuración basada en la configuración de la FIG. 2, se debe reconocer que este método de optimización también podría implementarse basándose en la configuración de la FIG. 1.

Haciendo referencia a la FIG. 5, se ilustra otra realización ejemplar que se basa en la configuración óptica de la FIG. 1.

La cantidad de luz que se podía utilizar en configuraciones anteriores estaba limitada por la lectura de la cámara digital, lo que requería el uso de un filtro espacial 20 más fuerte, lo que a su vez conduce a una mayor sensibilidad a las vibraciones y a una ampliación de las distribuciones de masa registradas en fotometría de masas.

De manera similar a la configuración de la FIG. 3, la FIG. 5 incluye un segundo detector 6 y un segundo divisor de haz 36 que está ubicado a lo largo de la trayectoria óptica de la señal de retropropagación entre la lente del tubo 13 y los detectores 5 y 6, y que está configurado para dividir la señal de retropropagación en primera y segunda señales.

Sin embargo, en esta realización, en lugar de pasar directamente al detector 5, la primera señal pasa a través de un primer elemento de aumento 42 configurado para ampliar la primera señal a lo largo de un primer eje.

En la realización de la FIG. 5, la segunda señal se dirige a través de un elemento reflectante 38 a través de un elemento modificador de señal, que en este caso es un segundo elemento de aumento 43 configurado para ampliar la segunda señal a lo largo de un eje perpendicular al primer eje.

Los detectores 5 y 6 también están orientados de forma diferente entre sí. Los detectores convencionales basados en píxeles tienden a tener una dirección de lectura electrónica que es más rápida que la otra debido al hecho de que las excitaciones de píxeles se procesan columna por columna en la cuadrícula. De acuerdo con lo anterior, los detectores 5 y 6 están orientados de manera que la dirección a lo largo de la cual la cámara lee la electrónica es capaz de procesar las excitaciones de píxeles más rápidamente está alineada con el primer eje para el detector 5 y con el segundo eje para el detector 6.

Utilizar la configuración descrita anteriormente, es posible aumentar la velocidad a la que se procesan los fotones dispersos de la muestra sin utilizar detectores especializados costosos mediante una mejor coincidencia de los fotones detectados con la operación de lectura de la cámara digital. Por ejemplo, el detector 5 puede leer sólo a lo largo de una única columna del eje X en la que el primer elemento de aumento 42 ha ampliado el flujo de fotones de la primera señal, y el detector 6 puede leer sólo a lo largo de una única columna del eje Y a lo largo de la cual la segunda El elemento de aumento 43 ha ampliado el flujo de fotones de la segunda señal.

Luego, los píxeles de los detectores 5 y 6 se pueden mapear entre sí para asignar adecuadamente ubicaciones X-Y a ambas cámaras, de modo que las imágenes adquiridas de los detectores 5 y 6 se puedan combinar. En algunos casos es necesario corregir las distorsiones de las imágenes fusionadas. Sin embargo, en general, el método descrito anteriormente permite a los detectores convencionales aumentar la velocidad a la que se capturan las imágenes en un número proporcional al aumento realizado por el primer y segundo elemento de aumento con poca pérdida en la calidad de la imagen.

Por lo tanto, la realización descrita compensa la reducción en el número total de fotones en la primera y segunda señales debido al filtro espacial 20 que, como puede verse en la ecuación para I_{det} expuesta anteriormente, mejora el contraste de dispersión en las imágenes adquiridas en a expensas del número total de fotones detectados.

Aunque esta realización se ilustra y describe como una optimización de la configuración de la FIG. 1, también se puede implementar como una optimización de la configuración de la FIG. 2.

Además, en algunas implementaciones de la realización (no ilustrada) solo la primera señal pasa a través de un elemento de aumento, mientras que el segundo canal de imagen se ve en una distribución espacial normal. En tal configuración, la segunda señal puede pasar a través de una máscara diferente o un filtro de intensidad general en lugar de un elemento de aumento. En tales implementaciones, el segundo canal mantiene una resolución espacial completa y puede usarse para localización.

Cada uno de los métodos de optimización descritos anteriormente en relación con las FIGS. 3-5 se pueden usar en combinación entre sí o de forma independiente.

Además, como la señal de retropropagación se divide en señales primera y segunda mediante el divisor de haz 36 con un flujo de fotones más bajo, cada uno de los métodos de optimización descritos puede facilitarse mediante la provisión de una fuente de iluminación de mayor intensidad 4. En algunas realizaciones, una mayor fuente de iluminación de intensidad 4 se proporciona al combinar los haces del primer y segundo láser como se ilustra en la FIG. 3.

Haciendo referencia a la FIG. 6A, un resultado experimental de ejemplo que es una imagen radiométrica de fotometría de masas de dos canales usando un chip, muestra dos imágenes de la misma mezcla de muestra obtenida en el mismo momento usando una configuración de división de haz similar a la del microscopio iSCAT de la FIG. 5 descrito anteriormente, pero sin elementos de aumento.

Haciendo referencia a la FIG. 6B, se muestra otro resultado experimental de ejemplo que muestra una imagen obtenida usando otra configuración de microscopio iSCAT similar a la de la FIG. 5 que incluye un elemento de aumento configurado para estirar uno de los haces divididos a lo largo de una única dimensión. Como puede verse en la FIG. 6B, la imagen de una mezcla de muestra se ha ampliado/estirado a lo largo de la dimensión x.

Haciendo referencia a la FIG. 6C, se muestra el mismo resultado experimental que se muestra en la FIG. 6B, pero con los píxeles en las dimensiones estiradas recombinándose en uno usando agrupamiento unidimensional, lo que demuestra que el contenido y la resolución de la imagen no se pierden con este procedimiento, sino que simplemente se distribuyen los fotones en varios píxeles que luego se pueden recombinar.

El microscopio 1 se puede utilizar para realizar iSCAT para una amplia gama de aplicaciones, incluida la detección de una sola molécula. Una aplicación particular es la obtención de imágenes sin etiquetas de dispersores débiles, donde los objetos de interés deben detectarse invariablemente sobre un fondo grande, lo que reduce el contraste de la imagen. El microscopio 1 se puede utilizar para una amplia gama de estudios y mediciones, por ejemplo para medir cualquier cambio en el índice de refracción, que incluye, por ejemplo: unión/desunión de una sola molécula,

transiciones de fase, agrupamiento, ensamblaje/desensamblaje, agregación, proteína/ interacciones entre proteínas, interacciones entre proteínas y moléculas pequeñas, imágenes sin etiquetas de alta sensibilidad.

- 5 Por tanto, existen numerosas aplicaciones para el microscopio 1, que van desde la investigación fundamental hasta aplicaciones industriales, por ejemplo en la industria farmacéutica. Por ejemplo, iSCAT es actualmente el biosensor de imágenes de una sola molécula sin etiquetas más sensible del mundo, lo que podría tener un impacto significativo, por ejemplo, en el mercado de detección de resonancia de plasmones superficiales. Además, como se describió anteriormente, el microscopio 1 se puede utilizar en la medición de masas, funcionando como un espectrómetro de masas de una sola molécula en solución exacta, precisa y de alta resolución, con muchas aplicaciones en la investigación y la industria.

10

REIVINDICACIONES

1. Un método para obtener imágenes de una muestra mediante microscopía de dispersión interferométrica, el método comprende:
 - iluminar una muestra (3) con al menos una fuente de luz coherente (4), manteniéndose la muestra en una ubicación de muestra que comprende una interfaz que tiene un cambio de índice de refracción, iluminando la muestra con radiación de iluminación para generar una señal de retropropagación desde la muestra que comprende luz reflejada en la interfaz y luz dispersada por la muestra;
 - dividir la señal de retropropagación en señales primera y segunda de manera que cada una de las señales primera y segunda comprenda al menos una parte de la luz dispersada por la muestra;
 - modificar la segunda señal usando un elemento modificador (40, 42, 43) de manera que la segunda señal difiera de la primera señal, en el que modificar la segunda señal comprende desplazamiento de fase, ampliando en una primera dirección o filtrado espacial con una intensidad mayor que el filtrado espacial aplicado a la primera señal;
 - dirigir las señales primera y segunda sobre detectores primero y segundo (5, 6) para generar, respectivamente, imágenes primera y segunda; y
 - comparar, mediante un procesador, la primera y segunda imágenes para determinar una o más características de la muestra.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además pasar al menos una de la primera y segunda señales a través de un filtro espacial, el filtro espacial está configurado para efectuar una reducción de la intensidad de la radiación incidente, siendo la reducción de la intensidad mayor dentro de una apertura numérica predeterminada.
3. El método de cualquiera de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que al menos una fuente de luz coherente comprende un primer láser y un segundo láser, cuyos haces se combinan antes de la iluminación de la muestra.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dividir la señal comprende dividir la señal de retropropagación en dos señales que tienen polarizaciones ortogonales.
5. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que dividir la señal comprende dividir la señal de retropropagación en dos señales que tienen diferente potencia óptica.
6. El método de la reivindicación 5, en el que pasar al menos una de la primera y segunda señales a través de un filtro espacial comprende pasar la primera señal a través de un primer filtro espacial y modificar la segunda señal de modo que difiera de la primera señal comprende pasar la segunda señal a través de un segundo filtro espacial en el que el primer filtro espacial y el segundo filtro espacial están configurados cada uno para efectuar una reducción de la intensidad de la radiación incidente, siendo mayor la reducción de la intensidad dentro de una apertura numérica predeterminada, en el que la primera señal tiene una mayor potencia óptica que la segunda señal y en el que el segundo filtro espacial aplica una mayor reducción de intensidad a la radiación incidente que el primer filtro espacial.
7. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que modificar la segunda señal comprende ajustar la fase de la segunda señal con respecto a la primera señal.
8. El método de la reivindicación 7, en el que ajustar la fase de la segunda señal con respecto a la primera señal comprende pasar la segunda señal a través de una máscara de desplazamiento de fase.
9. El método de cualquiera de la reivindicación 7 u 8, en el que ajustar la segunda señal comprende pasar la segunda señal a través de una lente de formación de imágenes en una ubicación apropiada a lo largo de la trayectoria óptica de la primera señal.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que ajustar la fase de la segunda señal con respecto a la primera señal comprende ajustar la fase de la segunda señal con respecto a la primera señal en media longitud de onda de la radiación de iluminación.
11. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que modificar la segunda señal comprende:
 - pasar la segunda señal a través de un elemento óptico configurado para aplicar aumento asimétrico de la segunda señal a lo largo de una primera dimensión correspondiente a una dimensión x de una cuadrícula de píxeles del segundo detector.
12. El método de la reivindicación 11, en el que el método comprende además: y
 - pasar la primera señal a través de un elemento óptico configurado para aplicar aumento asimétrico a la primera señal a lo largo de una segunda dimensión, siendo la segunda dirección ortogonal a la primera dirección y correspondiente a una dimensión y de una cuadrícula de píxeles del segundo detector.

13. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que al menos una fuente de luz coherente está configurada para proporcionar luz de iluminación que tiene al menos dos longitudes de onda de interrogación distintas; y
- 5 en el que dividir la señal comprende dividir la señal por longitud de onda, de modo que la luz que tiene una primera longitud de onda de interrogación se dirige al primer detector y la luz que tiene una segunda longitud de onda de interrogación se dirige al segundo detector.
14. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que la apertura numérica predeterminada es idéntica o similar a la apertura numérica de la luz iluminadora reflejada desde la ubicación de la muestra.
15. Un microscopio de dispersión interferométrico configurado para llevar a cabo el método de cualquier reivindicación anterior, que comprende:
- 10 una ubicación de muestra (2) que comprende una superficie reflectante;
- al menos una fuente de luz coherente (4) configurada para iluminar la ubicación de la muestra;
- primer y segundo detectores (5, 6);
- un divisor de haz (36) configurado para dividir una señal de retropropagación desde la ubicación de la muestra en
- 15 señales primera y segunda de modo que cada una de las señales primera y segunda comprenda al menos una parte de la luz dispersada por la muestra (3); y
- un elemento modificador (40, 42, 43) configurado para modificar la segunda señal de manera que difiera de la primera señal, en el que modificar la segunda señal comprende desplazamiento de fase, ampliación en una primera dirección o filtrado espacial con una intensidad mayor que el filtrado espacial aplicado a la primera señal;
- 20 en el que el sistema está configurado para dirigir la primera y segunda señales hacia el primer y segundo detector, respectivamente.
16. Un microscopio de dispersión interferométrica de acuerdo con la reivindicación 15, que comprende además al menos un filtro espacial colocado para filtrar al menos una de la primera señal y la segunda señal, en el que el filtro espacial está configurado para afectar una reducción de la intensidad de la radiación incidente que es mayor dentro de la apertura numérica predeterminada.
- 25

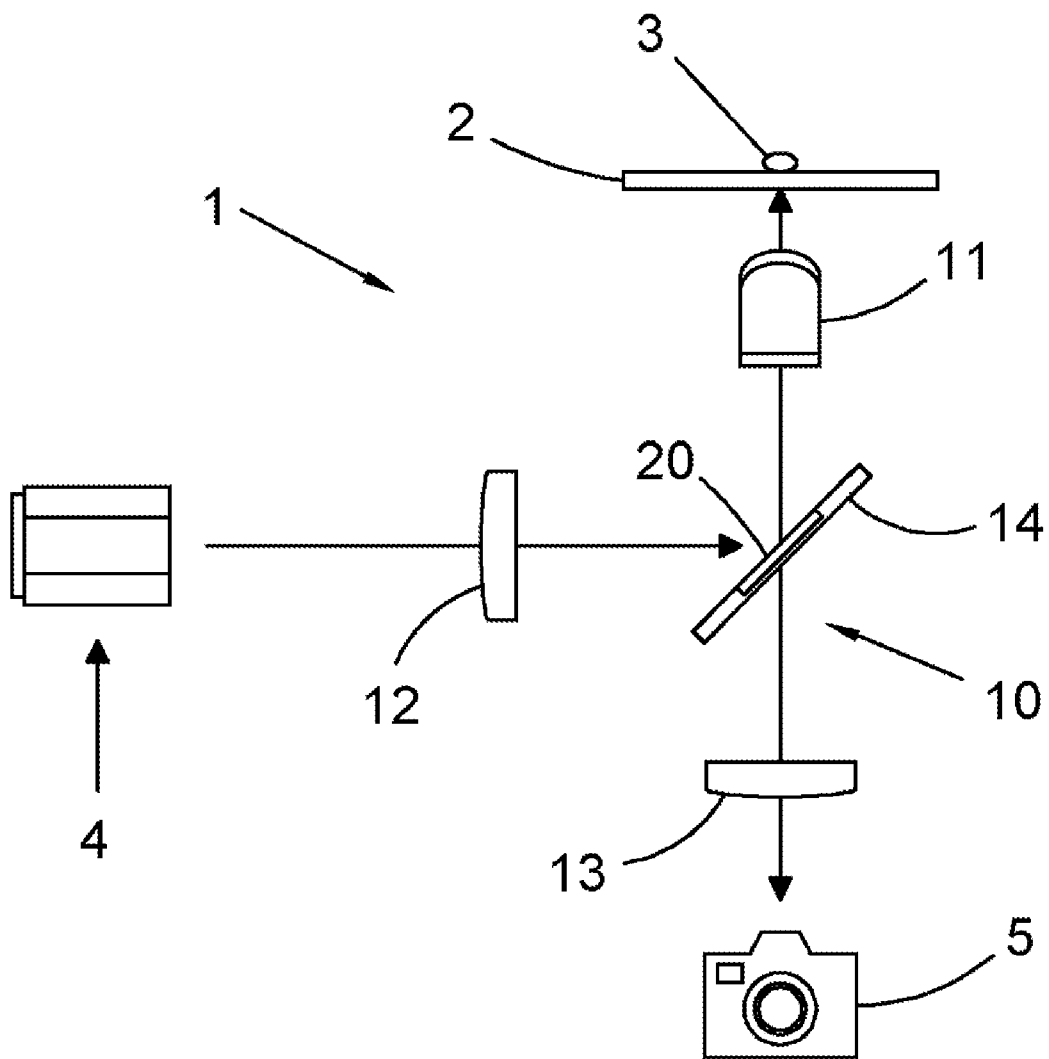


Fig. 1
(Técnica Anterior)

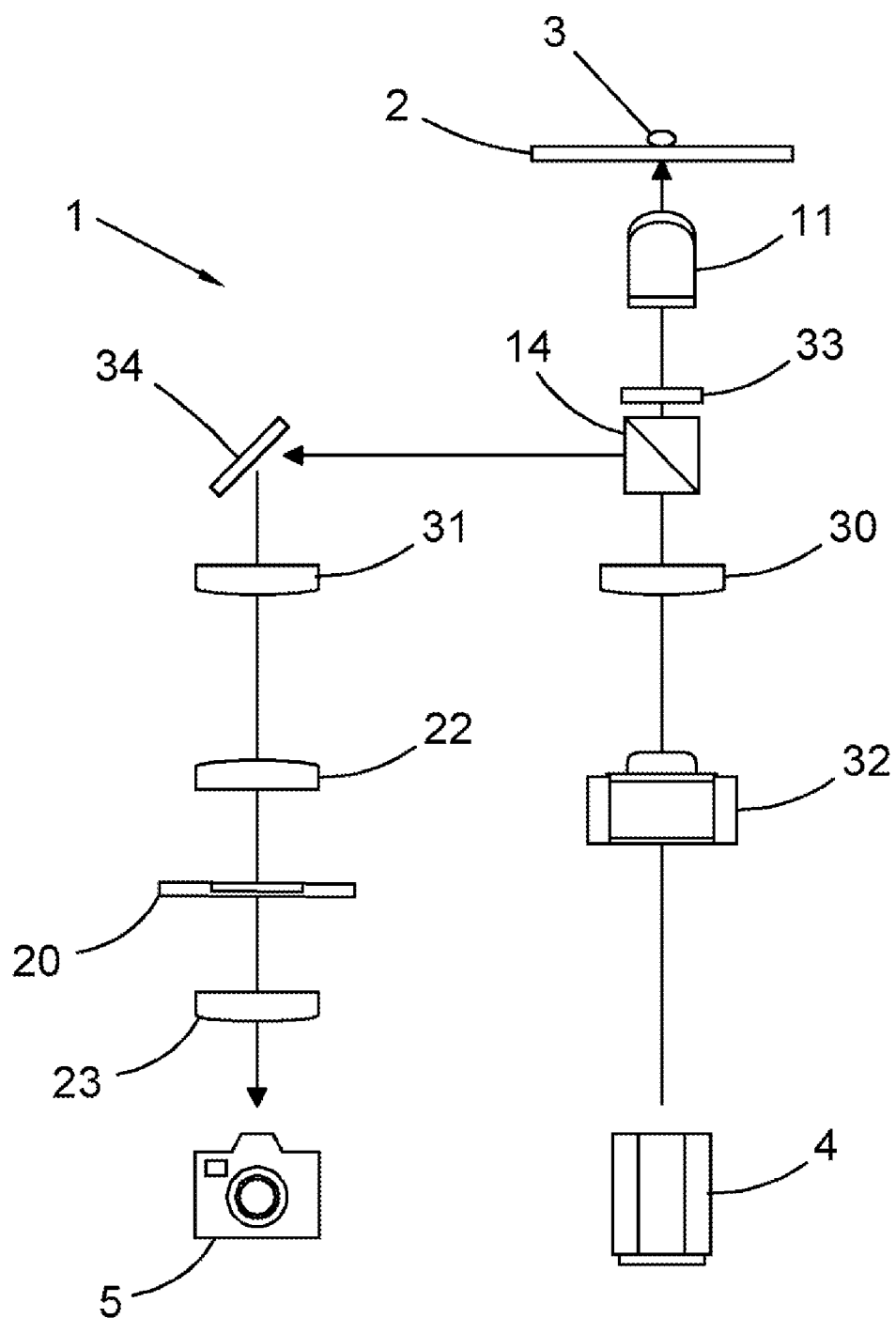


Fig. 2
(Técnica Anterior)

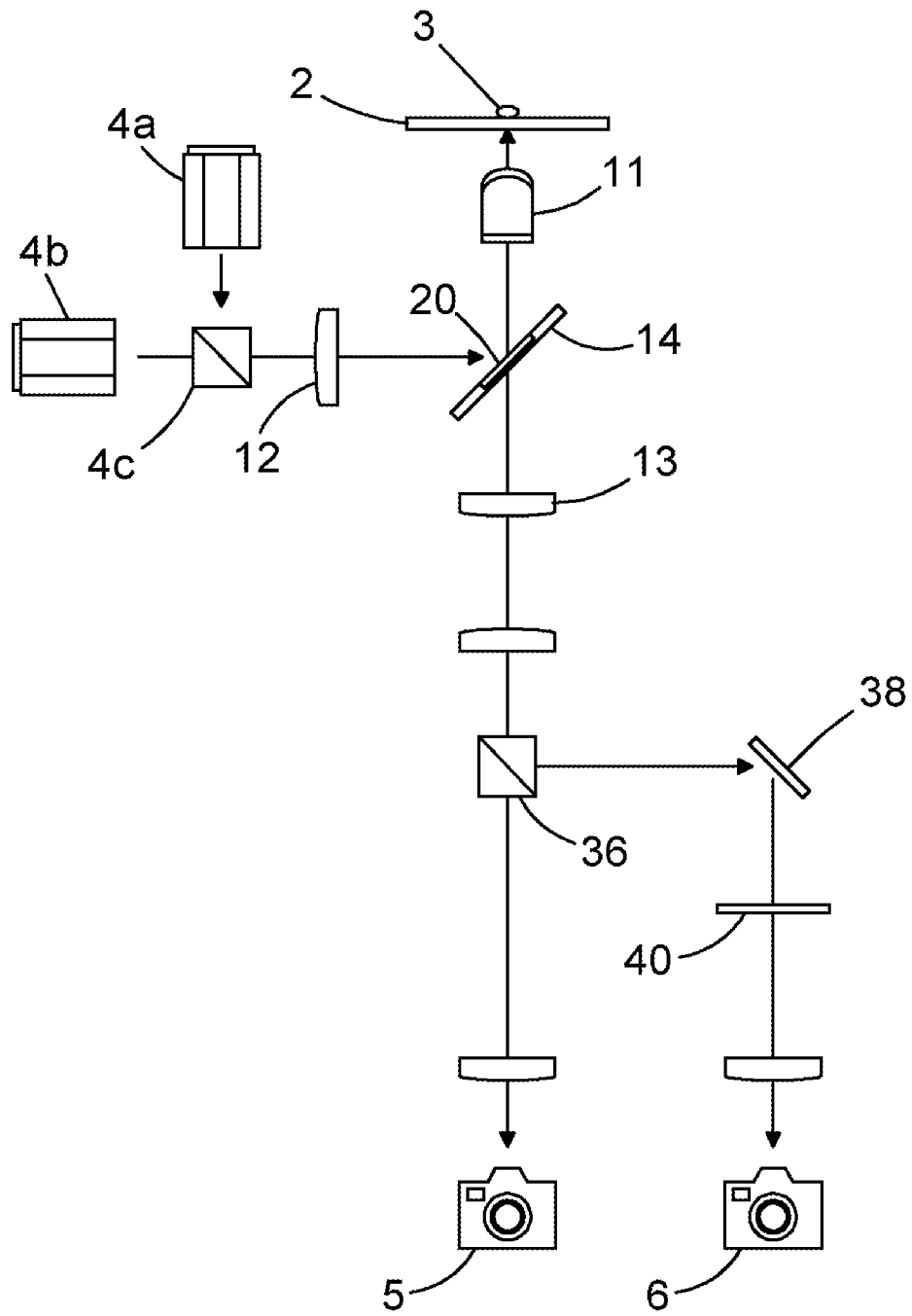


Fig. 3a

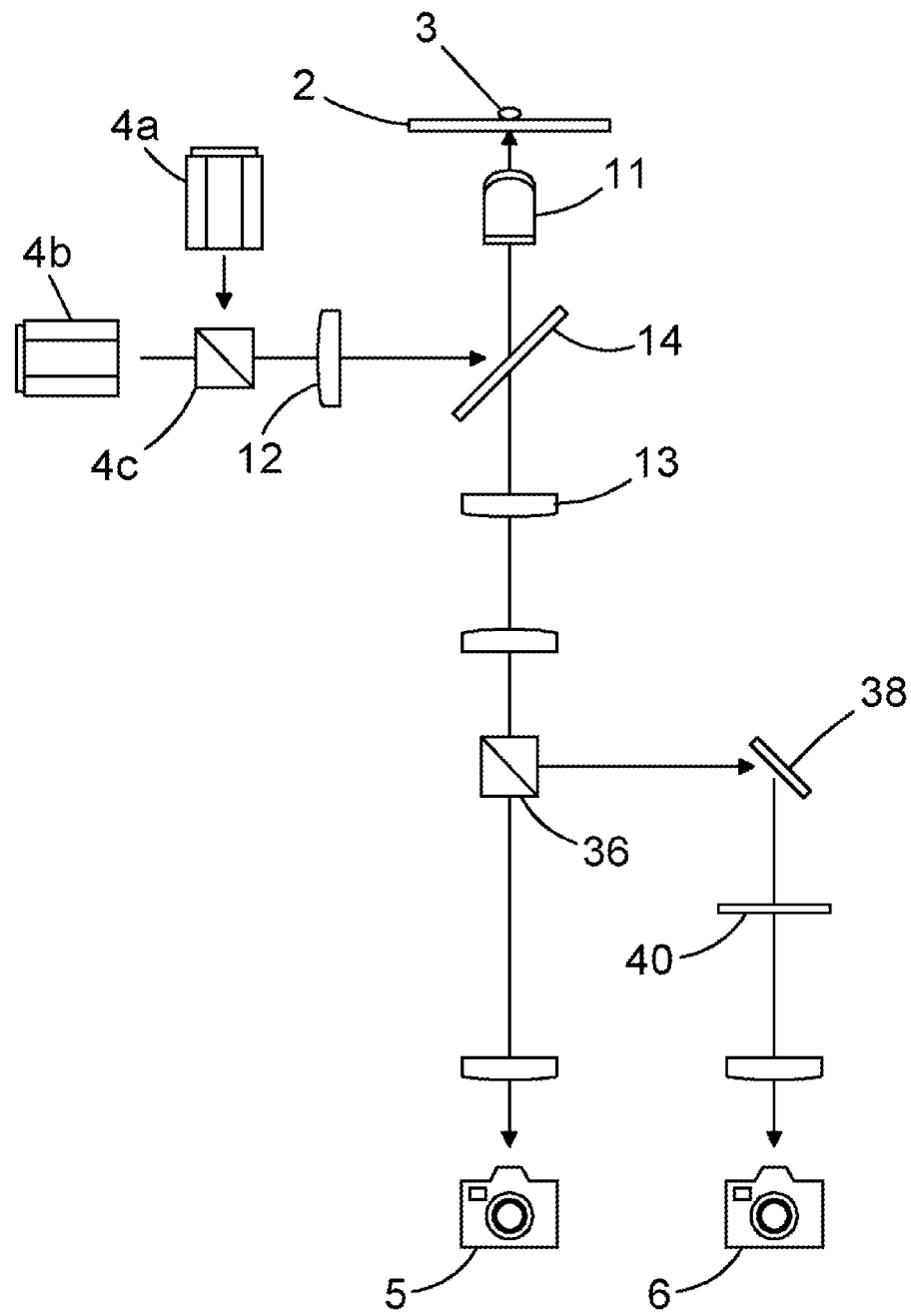


Fig. 3b

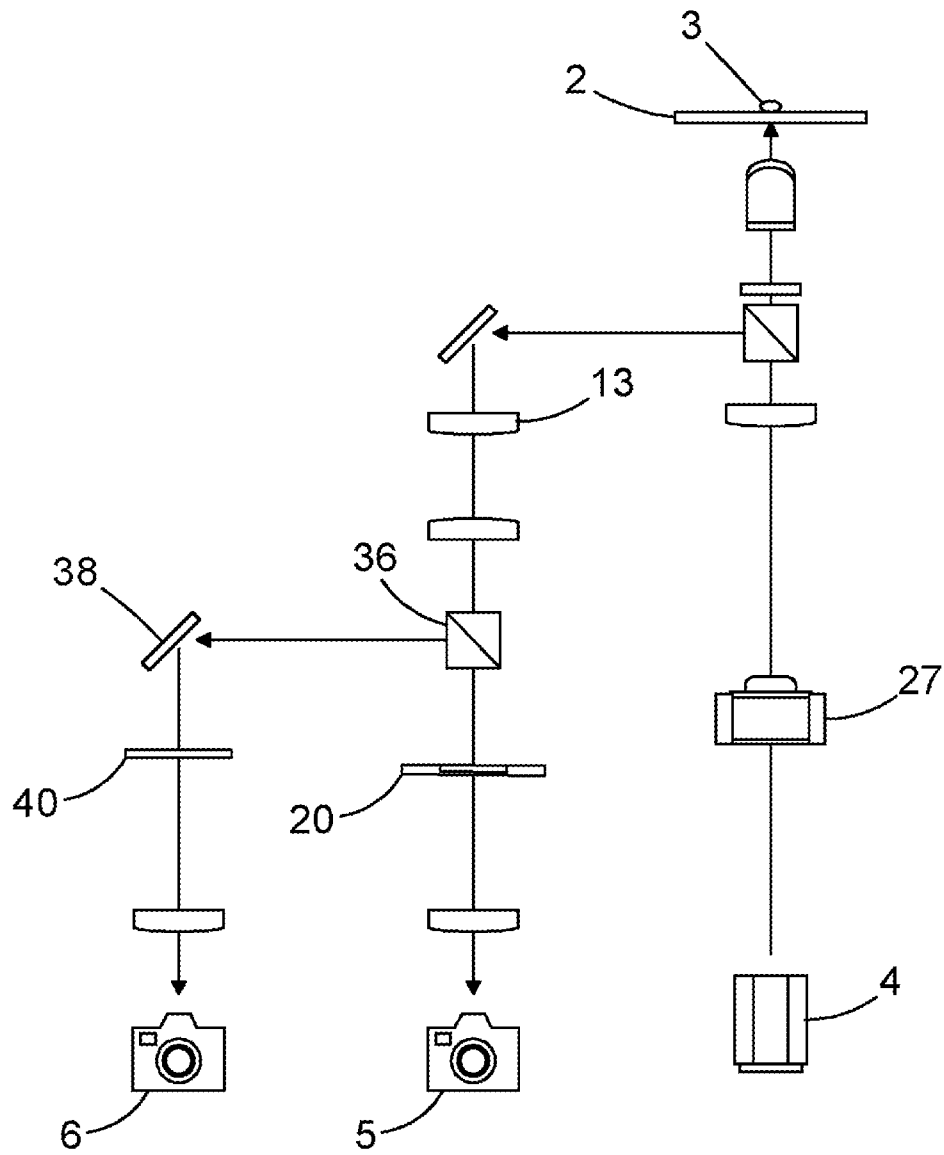


Fig. 4

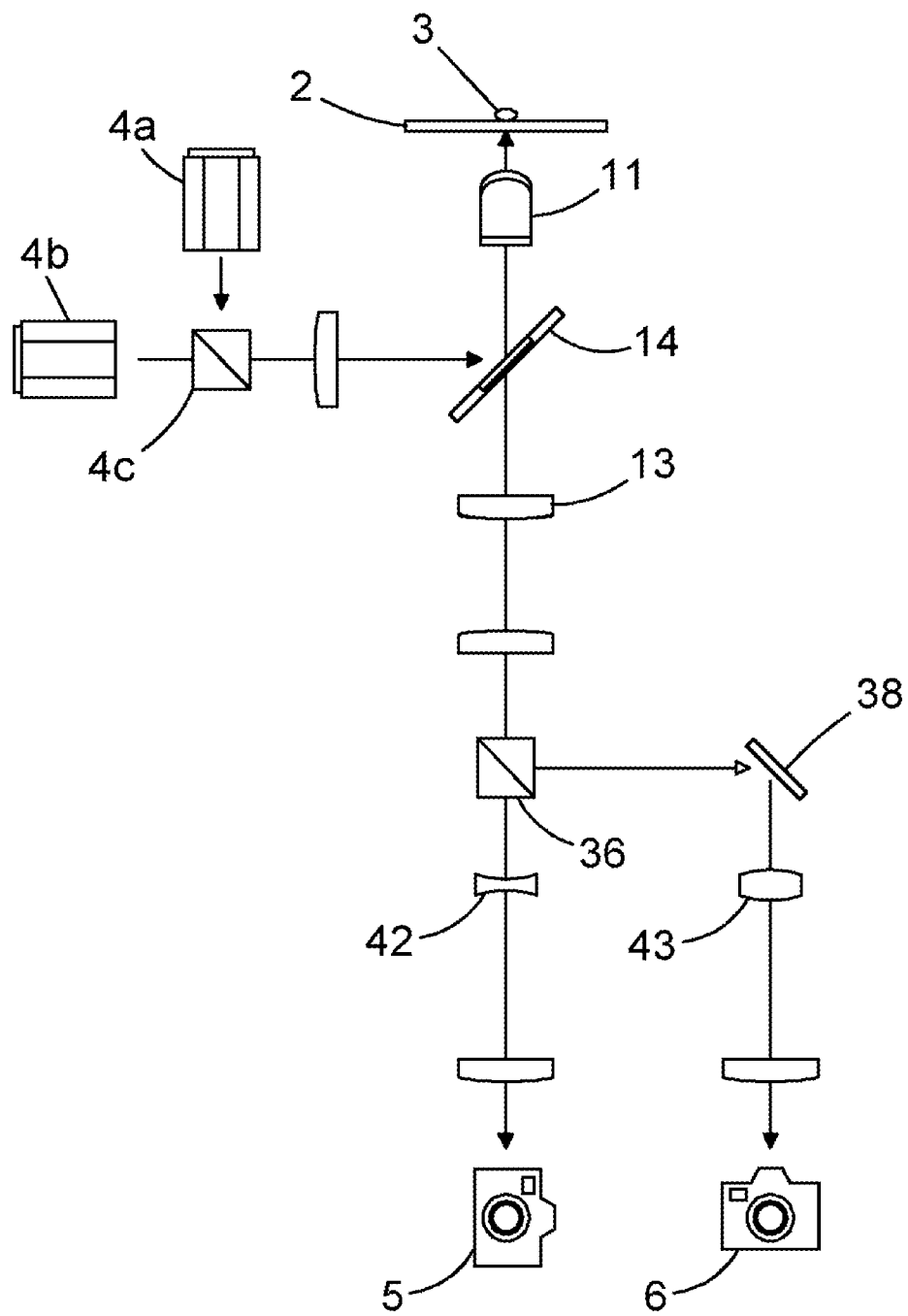


Fig. 5

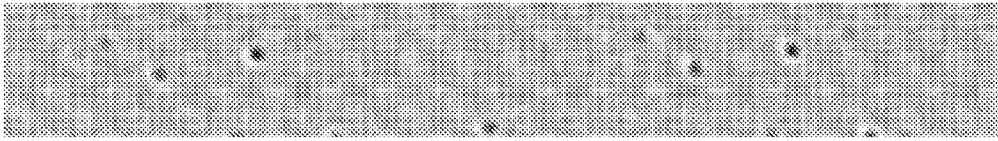


Fig. 6A

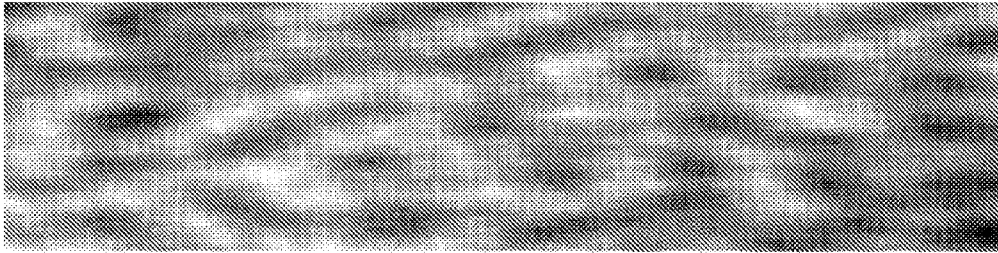


Fig. 6B

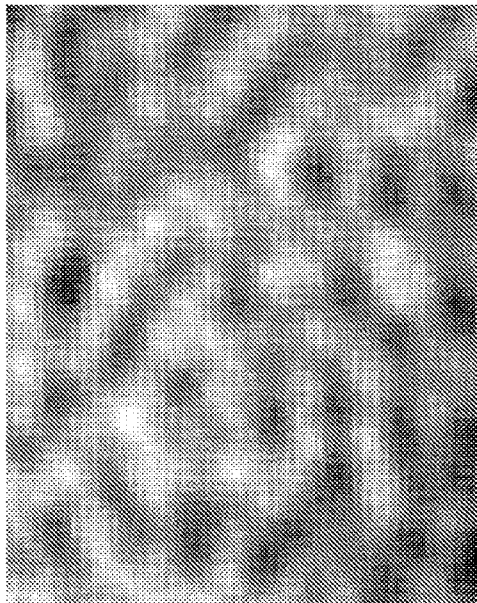


Fig. 6C