

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G02B 21/00 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200580004313.3

[45] 授权公告日 2009 年 8 月 12 日

[11] 授权公告号 CN 100526932C

[22] 申请日 2005.1.27

[21] 申请号 200580004313.3

[30] 优先权

[32] 2004. 2. 9 [33] EP [31] 04100462.3

[86] 国际申请 PCT/IB2005/050354 2005.1.27

[87] 国际公布 WO2005/076050 英 2005.8.18

[85] 进入国家阶段日期 2006.8.8

[73] 专利权人 皇家飞利浦电子股份有限公司

地址 荷兰艾恩德霍芬

[72] 发明人 B·格莱希

[56] 参考文献

US5807677A 1998.9.15

US2003/0085703A1 2003.5.8

WO02/059582A1 2002.8.1

审查员 孙孟辉

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 顾 珊 梁 永

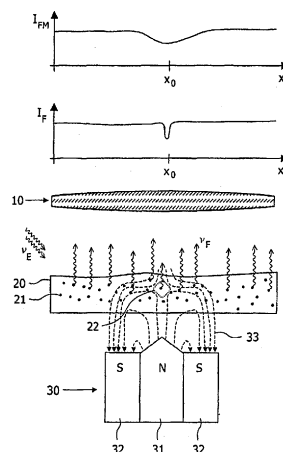
权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 1 页

[54] 发明名称

荧光显微镜装置以及确定样品中荧光标记物的方法

[57] 摘要

本发明涉及显微镜装置和可以用所述显微镜装置确定样品(20)中磁和/或电敏感荧光标记物(21)的空间分布的方法。荧光辐射(V_F)由样品(20)中的初级辐射(V_E)激发并且由显微镜成像。同时,在样品(20)内产生空间非均匀磁场和/或电场(33),其例如具有最小场强的小焦点区(22)。荧光辐射的发射在焦点区(22)中被局部改变,这可以在测量的强度分布(I_{FM})中被观察。以这种方式,甚至可以在具有小于显微镜(10)的光学分辨率的尺寸的区域(22)中重建荧光标记物(21)的分布。



1. 一种显微镜装置, 用于成像包含磁和/或电敏感荧光标记物(21)的样品(20), 包括:

- 荧光显微镜(10), 用于激发和成像来自样品(20)的荧光辐射(v_F);

- 场发生器(30), 用于在样品(20)中产生非均匀磁场和/或非均匀电场(33)。

2. 根据权利要求1所述的显微镜装置, 其被设计成以限定的方式改变样品(20)中的非均匀场(33)。

3. 根据权利要求1所述的显微镜装置, 其特征在于用于产生非均匀场(33)的所述场发生器(30)具有第一极性(N)的第一极体(31), 其在至少两个相对侧上邻近于不同极性(S)的第二极体(32)。

4. 根据权利要求1所述的显微镜装置, 其特征在于它包括用于对所述荧光显微镜(10)记录的图像(I_{FM})进行图像处理的数据处理设备, 所述数据处理设备被设计成由在一个或多个记录期间的非均匀场(33)的已知空间强度分布来重建样品(20)中荧光标记物(21)的分布。

5. 一种用于确定样品(20)中磁和/或电敏感荧光标记物(21)的空间分布的方法, 所述方法包括以下步骤:

- 在样品(20)中产生非均匀磁场和/或非均匀电场(33);

- 激发样品(20)中的荧光辐射(v_F);

- 借助于荧光显微镜(10)产生来自样品(20)的荧光辐射(v_F)的图像(I_{FM});

- 借助于产生的图像(I_{FM})和借助于所述场(33)的已知强度分布, 计算荧光标记物(21)的空间分布。

6. 根据权利要求5所述的方法, 其特征在于所述非均匀磁场(33)具有至少 10^2T/m 的梯度。

7. 根据权利要求5所述的方法, 其特征在于所述非均匀磁场(33)具有至少为 10^6T/m 的梯度。

8. 根据权利要求5所述的方法, 其特征在于所述非均匀电场具有至少 10^{11}V/m^2 的梯度。

9. 根据权利要求5所述的方法, 其特征在于所述非均匀电场具有

至少为 10^{15}V/m^2 的梯度。

10. 根据权利要求 5 所述的方法, 其特征在于所述非均匀场 (33) 具有场强的局部最小值 (22)。

11. 根据权利要求 10 所述的方法, 其特征在于所述非均匀场 (33) 是无场点或区域。

12. 根据权利要求 10 所述的方法, 其特征在于所述局部最小值 (22) 的宽度小于荧光显微镜 (10) 的光学分辨率。

13. 根据权利要求 5 所述的方法, 其特征在于样品 (20) 位于具有荧光标记物 (21) 的溶液中。

荧光显微镜装置以及确定样品中荧光标记物的方法

技术领域

本发明涉及一种显微镜装置，其具有用于成像样品中荧光标记物分布的荧光显微镜。本发明还涉及用于确定样品中荧光标记物的空间分布的方法。

背景技术

在荧光显微术中，用专门设计的显微镜观察样品中荧光标记物的分布。荧光标记物是化学物质，其在受到适当的初级辐射刺激之后发出特征光谱范围的荧光，这就是常常用术语“荧光染料”来称呼它的原因。通过将荧光标记物结合到其它分子，例如药剂或蛋白，可以获得关于生物系统的代谢过程的信息。但是用目前的荧光显微镜可以实现的分辨率被限制在大约 100nm 至 30nm 的范围，因此对分子水平的较小结构或过程的研究是不可能的。

发明内容

基于该背景，本发明的目标是提供在透明和混浊介质中提高荧光显微镜的分辨率的手段。

具有权利要求 1 的特征的显微镜装置和具有权利要求 5 的特征的方法实现了所述目标。在从属权利要求中包含了有利的实施方式。

根据本发明的显微镜装置用于成像包含荧光标记物的样品（例如生物样品）。在这里，荧光标记物将是磁和/或电敏感的，也就是说，所述标记物的荧光性能（荧光强度，荧光的光谱移动，极化，强度的时间变化，等等）受到外部磁场或电场影响。

所述显微镜装置包括以下部件：

- 荧光显微镜，用于激发和成像来自样品的荧光辐射。用于该目的合适显微镜可从荧光显微术领域获知。

- 场发生器，用于在样品中产生空间非均匀磁场和/或空间非均匀电场，其中所述场的非均匀性必须至少存在于局部区域中。

使用所述显微镜装置，有可能比用传统的荧光显微术从样品的研

究中提取更多的信息。这归结于这样的事实，即有可能在样品中产生空间非均匀场，所述空间非均匀场根据要求影响待观察的荧光标记物的发射性能。所以所述场给用户机会来特定地和因而地改变样品内的局部条件以影响荧光。特别地，以这种方式可以在荧光辐射方面提高荧光显微镜的分辨率，该装置的特定应用在下面更具体地被描述。此外，使用所述显微镜装置也有可能用提高的分辨率在混浊介质中进行分析。

根据第一、优选实施方式，所述显微镜装置被设计成以限定的方式改变样品中的非均匀磁场和/或电场，例如从而移动其位置和/或改变其分布。通过观察给定样品体积如何响应所述场的变化，可以获得关于包含在其中的荧光标记物的重要信息。如果例如所述场具有带特殊条件（例如场强的最小值）的小焦点区，那么这样的话，可以选择性地在样品内的不同点处分析荧光标记物的存在。

构造具有理想性质的场发生器存在各种可能性。关于这一点在某种程度上可以求助于因其它应用而众所周知的方案，例如磁性粒子的成像（参照 DE 10151778 A1，其全部内容被结合到本申请中以作参考）。根据优选实施方式，所述场发生器包括第一极性（在磁场的情况下，例如“北极”，在电场的情况下，例如“负极”）的第一极体，在至少两个相对侧上所述第一极体邻近另一极性（分别为“南极”，“正极”）的第二极体。所述第一极体优选地具有尖端。如将要在附图的描述范围内具体说明的，在这样一种配置的情况下，在所述场发生器附近通常存在点形区，在该区域场强呈现最小值。当观察样品时于是这适合作为焦点区。

在最简单的情况下由磁场或电场导致的样品中荧光性能的变化可以由显微镜装置的用户单纯用眼睛观察。然而，优选地，借助于数据处理设备对显微镜装置记录的图像进行高级图像处理。关于这一点，所述数据处理设备被设计成由在一个或多个记录期间的（空间和任选地时间）非均匀场的已知强度分布和由测量的荧光辐射来重建样品中荧光标记物的分布。如果例如所述场具有最小场强的焦点区，则所述数据处理设备能够考虑这样的事实，即在该区域中的荧光相应地变化（增加或减小）。

本发明进一步涉及用于确定样品中磁和/或电敏感荧光标记物的

空间分布的方法，所述方法包括以下步骤：

- 在样品中产生不时变的或时变的非均匀磁场和/或非均匀电场，从而荧光标记物局部遇到不同条件。

- 例如通过适当量子能的初级辐射激发样品中的荧光辐射。

- 产生来自样品的荧光辐射的至少一个光学图像。

- 借助于至少一个上述图像和借助于所述非均匀场的已知相关强度分布，来计算荧光标记物的空间分布。优选地，在空间不同场强分布的情况下所述计算基于至少两个图像。如果场强分布使得它们均允许分析点形区或像素/体元，通常需要 N 个不同场强分布来代表 N 个像素/体元。

所述方法通常涉及可以用上述类型的显微镜装置执行的步骤。关于所述方法的细节、优点和更多方面，特别参考以上描述。通过借助于空间非均匀场和使用对其敏感的荧光标记物局部改变样品内荧光的条件，所述方法允许用高局部分辨率从样品提取信息。

如果在所述方法中使用非均匀磁场，它优选地具有（至少在一个点）至少 10^2T/m 的梯度，特别优选至少 10^3T/m ，尤其优选至少 10^6T/m 。在这样的梯度值下，每纳米的磁场强度变化大约 $0.1 - 1 \text{mT}$ ，其中已知的磁敏感荧光标记物已响应这样的变化。在所述梯度，可以在 1nm 的区域中实现空间分辨率。

如果在所述方法中使用非均匀电场，这优选地具有（至少在一个点）至少 10^{11}V/m^2 的梯度，特别优选至少 10^{15}V/m^2 。在这些值下和使用普通电敏感荧光标记物，类似地获得在纳米范围中的分辨率。

根据所述方法的优选实施方式，所述非均匀场被配置成使得它可以具有场强的局部最小值。特别地，该最小值可以具有零值，也就是可以对应于无场区。优选地，所述局部最小值的宽度小于所述荧光显微镜的光学分辨率。在这里，依赖所述场对所考虑的荧光标记物的影响而方便地限定所述最小值的“宽度”。如果是后者，例如在消失场具有最小荧光产额的情况下，其中当所述场增加时荧光产额增加到最大值，所述“宽度”可以被限定成荧光产额低于所述最大值的特定百分比（例如 50% ）的区域。在所述局部最小值的空间限制区域中，因此产生用于荧光的特殊条件，这导致从样品发出的荧光辐射中的可观察效果。所述最小值因此可以用作焦点区以用于目标分析样品内的

小体积。

根据所述方法的另一方面，样品在其分析期间位于包含荧光标记物的溶液中。以这种方式，从所述溶液不断地替换例如通过漂白而损失和/或降解的荧光标记物，从而样品中的荧光可以保持较长的时期。

本发明的这些和其它方面从其后描述的实施方式显而易见并且将参考其后描述的实施方式进行阐述。

附图说明

在图中，单一的附图示意性地显示了根据本发明的显微镜装置的原理及其使用。

具体实施方式

在荧光显微术领域中，关键是确定样品 20 内荧光标记物 21 的分布；例如在生物样品的情况下，该分布可以提供关于解剖和/或代谢状况的信息。例如可以在位于 Oberkochen 的 Carl Zeiss 公司的 LSM 510 系列中找到合适的荧光显微镜。为了激发荧光，样品 20 被辐射以（原始的）光子 ν_B ，所述光子由荧光标记物 21 的原子和分子吸收并且因此将它们送入受激能态。该能态然后通过荧光光子 ν_F 的发射再次退化，其具有标记物的波长特征。

从进入相关显微镜 10 的荧光光子 ν_F 中，由显微镜的光学系统产生荧光辐射的强度分布的图像。在该图像上，观察者可以通过眼睛检查例如荧光标记物的浓度增加的区域。而且，在通常的高级评估方法的情况下，荧光辐射的强度分布被定量地测量。迄今为止根据所述原理工作的所有已知荧光显微镜的共同点在于这样的事实，即光学分辨率被限制在大约 100 - 30nm 的值。

为了克服该限制，使用在图中示出的装置，提出了使用磁敏感荧光标记物 21 以及样品 20 内的空间非均匀磁场 33。磁敏感荧光标记物依赖它们所处的外部磁场的强度改变它们的荧光性能。这样的荧光标记物的典型例子是所谓的“激态复合物”，其由受激复合物形成。也就是说，分子穿越原始光子进入受激状态并且与另一分子组合形成二聚物。在该二聚物中，单态和三重态的能级实际上随着时间退化并

慢慢移动。如果使用外部磁场，三重态分成三个不同状态，由此单态和三重态的混合速度改变。激态复合物可以越过进入基态同时发出荧光光子，将发射该光子的概率取决于是否存在单态或三重态。以这种方式，荧光产额也取决于外部磁场。这里磁场引起的荧光变化总计可以超过 30%，并且已经可以用小于 2mT 的场实现效果。理想地，激态复合物的两个反应方彼此化学结合以形成所谓的分子内激态复合物。磁敏感荧光标记物的例子可以从涉及 MARY（磁场对反应产率的影响）光谱学的研究获知，参照 Günter Grampp 等人：RIEKEN Review No. 44（2002 年 2 月）。此外，在这方面可以参考 N.Kh.Petrov 的出版物（例如：N.Kh.Petrov, V.N.Borisenko, A.V.Starostin, M.V.Alfimov, Amplification of the cage effect in binary solvents detected by technique of magnetic modulation of exciplex fluorescence, Izv.AN SSSR, ser.chim., 1991, no.11, p. 2456;

N.Kh.Petrov, V.N.Borisenko, A.V.Starostin, M.V.Alfimov, Polar molecular clusters produced upon photoinduced electron transfer in an intermolecular exciplex in binary solvents, J.Phys.Chem., 1992, vol.96, no.7, p.2901;

N.Kh.Petrov, V.N.Borisenko, M.V.Alfimov, Study of preferential solvation in binary solvent mixtures by the fluorescence-detected magnetic field effect, J.Chem.Soc., Faraday Trans., 1994, vol.90, no.1, 109-111; N.Kh.Petrov, V.N.Borisenko, M.V.Alfimov, Magnetic Field Effects of Exciplex Fluorescence of the Pyrene-Azacrown Ether System in the presence of Alkali and Alkaline Earth Salts, J.Chem.Soc., Mendeleev Commun. 1995; N.Kh.Petrov, V.N.Borisenko, M.V.Alfimov, T.Fiebig, H.Staerk, Fluorescence-detected Magnetic Field Effects in Exciplex Systems Containing Azacrown Ethers as Electron Donor, J.Phys.Chem., 1996, vol.100, no.16, 6368-6370.

作为另一选择，替代磁敏感荧光标记物，可以使用电敏感荧光标记物。这些由于这样的事实而相应地被辨别，即它们的荧光性能取决

于它们所处的外部电场。荧光性能的明显变化频繁发生在 10^6V/m 量级的电场强度中的差异处。电敏感荧光标记物也用于测量自然发生的电场强度（例如，细胞膜内的）。为此，电敏感荧光标记物例如在美国专利说明书 2002/0155520 A9 中记载；在此描述的标记物也可以用于本情况中，并且所述文献被全部结合到本申请中以作参考。此外，关于该主题可以参考作为更多的出版物代表的 Jian-young Wu 等人的 *Histochemical Journal*, 30 169-187 (1998)。为了记录，下面描述的用于磁敏感荧光标记物的方法同样可以类似地用于电敏感标记物。

为了能够利用荧光标记物 21 对磁场的敏感性，能够在样品 20 内产生非均匀磁场 33 的场发生器 30 放置在探头 20 附近。在所示的例子中，场发生器 30 包括三个（例如永磁）极体。具有“磁北极”极性的第一极体 31 优选地具有尖端以便提高对样品的光学可达性。在第一极体 31 的相对侧上存在两个另外的具有“磁南极”极性的极体 32。这些可以替换地环形围绕第一极体 31。使用该配置，其中磁场强度大约为零的焦点区 22 出现在第一极体 31 的尖端前面，如虚场力线 33 所示。尖端距焦点区 22 的距离取决于期望的梯度，对于 10^6T/m 的梯度典型地大约为 $1\mu\text{m}$ ，对于 10^3T/m 的梯度为毫米范围。焦点区的宽度例如大约可以为 1nm 。此外，确定场发生器 30 的尺寸，使得焦点区 22 周围的磁场 33 的梯度超过 10^6T/m （在非均匀电场的情况下，所述梯度应当超过 10^{15}V/m^2 ）。

在图中，在显微镜装置之上，来自样品 20 的荧光辐射 v_F 在位置 x 上的强度 I_F 的分布被再现。假设在这里的例子中荧光标记物 21 在样品 20 中大致均匀分布，从而原则上所有点发出强度相同的荧光辐射。然而，除此之外的是非均匀磁场 33 的小焦点区 22，在该区域中强度减小。在相关点 x_0 处，强度分布 I_F 因此呈现最小值。但是由于显微镜 10 的有限光学分辨率，因此所述最小值不能被直接清晰地再现。相反地，用显微镜装置观察的荧光强度 I_{FM} 的过程具有在图的上部图表中示出的过程，其中所述最小值相应地被加宽和展平。由于非均匀磁场 33 的位置和因此样品内焦点区 22 的位置可以变化，因此焦点区 22 的该“模糊”再现仍然可以用于提高显微镜装置的分辨率。通过同时观察被测强度分布 I_{FM} 中的变化，可以得出关于局部限定区

域 22 中的状况的数学结论。结果，通过移动焦点区 22，可以用纳米范围的分辨率扫描荧光标记物的浓度。

为了优化可用显微镜装置获得的再现质量，应当优选地使背景辐射的比例最小化，因此信噪比被最大化。这样做的一种方式包括通过初级辐射 ν_0 仅仅激发小样品区，并且将观察限制在相应的小区域。理想地，因此使用高质量共焦扫描显微镜。此外，诸如双光子激发和受激发射这样的技术是有用的。也可以通过在时间上积分和/或用于激发的高亮级来提高信噪比。在这方面荧光标记物的光致退色限制了该方法。与所有上述技术类似，通常从荧光显微术获知的许多其它技术也可以与本方法结合使用。

而且，可能出现的情况是荧光标记物 21 将由于受激状态的化学反应（例如与氧气）而随着时间退化。在这种情况下，优选地通过扩散替换退化标记物分子。如果例如将要观察样品的表面，这可以被浸入到荧光标记物的溶液中。荧光标记物的分子然后在样品的表面吸收退化分子，所述退化分子不时地由来自所述溶液的荧光标记物的未消耗分子替换。

所述显微镜装置可以用于成像固体，其方式与目前用电子显微镜进行的扫描类似。在上述基于磁场的方法中有利地是样品并不需要被干燥，并且生物样品甚至可以仍然是活的。如果使用电场，样品应当被电绝缘。这例如可以通过将其放置在油或去矿化水中或者通过冷冻来实现。

而且，所述方法可以用于检测生物分子。在这种情况下，不同分子的样品可以与荧光标记物（一种或多种的颜色）混合，其特异地或非特异地结合到待标识的分子。然后借助于观察到的荧光标记物的空间分布实现分子的标识。在荧光标记物与分子非特异结合的情况下，例如可以通过这样的事实来标识大分子，即荧光标记物结合到分子的不同点，因此致使分子的特征空间形式可识别。在荧光标记物的特异结合的情况下，所述方法例如可以允许 DNA 样品的快速分段；在这里，不同颜色可以编码不同的核苷酸。

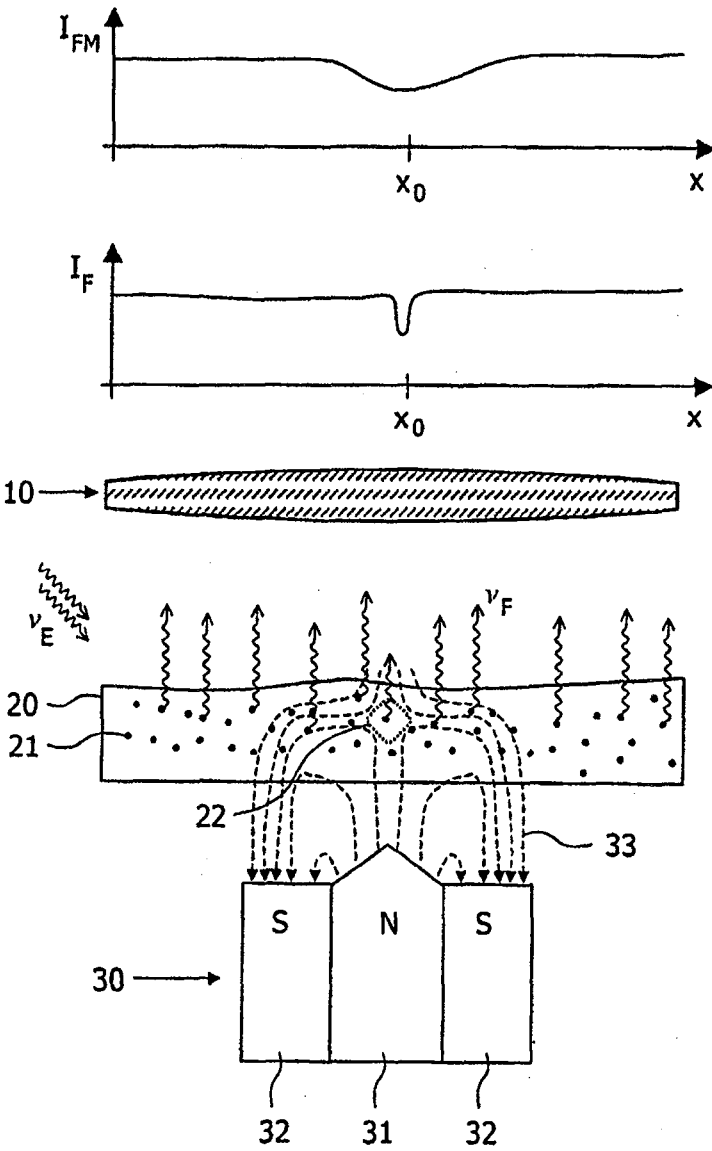


图 1