



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115437132 A

(43) 申请公布日 2022. 12. 06

(21) 申请号 202210618420.0

G02B 21/06 (2006.01)

(22) 申请日 2022.06.01

G02B 21/08 (2006.01)

(30) 优先权数据

21177041.7 2021.06.01 EP

(71) 申请人 莱卡微系统CMS有限责任公司

地址 德国威茨勒

(72) 发明人 阿诺德·穆勒-伦茨

克里斯蒂安·舒曼

塞巴斯蒂安·希茨勒

(74) 专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事

务所(普通合伙) 11201

专利代理师 宋融冰

(51) Int. Cl.

G02B 21/24 (2006.01)

G02B 21/02 (2006.01)

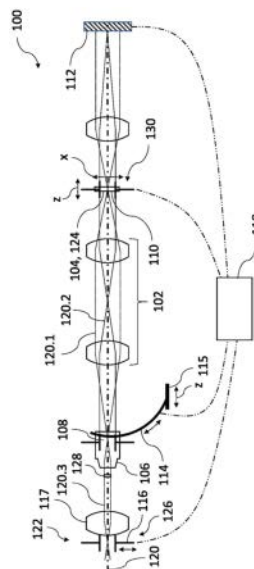
权利要求书2页 说明书11页 附图7页

(54) 发明名称

用于透射光对比的显微镜

(57) 摘要

本发明主要涉及一种用于至少通过透射光对比法对样本进行成像的显微镜(100),所述显微镜(100)包括:物镜支架或转换器(114),被配置为将物镜(106)或多个物镜中的物镜(106)放置在显微镜(100)的光轴(120)上,透镜系统(102),用于形成放置在光轴(120)上的物镜(106)中的任一个物镜的出射光瞳(108)的中间图像(104),所述中间图像(104)形成在与所述出射光瞳共轭的相应共轭平面(124)处,以及控制设备(118),被配置用于自动地将调制元件(110)定位到在所述相应共轭平面(124)的位置处或与相应共轭平面(124)相关的位置处的光轴(120)上。



1. 一种用于至少通过透射光对比法对样本进行成像的显微镜(100),所述显微镜(100)包括:

物镜支架或转换器(114),被配置为将物镜(106)或多个物镜中的物镜(106)放置到显微镜(100)的光轴(120)上,

透镜系统(102),用于形成被放置到光轴(120)上的物镜(106)中的任一个物镜的出射光瞳(108)的中间图像(104),所述中间图像(104)形成在与所述出射光瞳共轭的相应共轭平面(124)处,以及

控制设备(118),被配置用于自动地将调制元件(110)定位到在所述相应共轭平面(124)的位置处或与相应共轭平面(124)相关的位置处的光轴(120)上。

2. 根据权利要求1所述的显微镜(100),其中,所述控制设备(118)被配置为在平行于所述光轴(120)的轴向方向(z)上自动地移动所述调制元件(110)。

3. 根据权利要求1或2所述的显微镜(100),其中,所述控制设备(118)连接到所述物镜支架或转换器(114),以接收关于放置到所述光轴(120)上的相应物镜(106)的信息( $I_1$ )。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的显微镜(100),其中,所述控制设备(118)连接到所述显微镜(100)的聚焦驱动(115),所述聚焦驱动(115)被配置为在平行于所述光轴(120)的轴向方向(z)上移动被放置到所述光轴(120)上的相应物镜(106),以接收关于相应物镜(106)的轴向位置的信息( $I_2$ )。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的显微镜(100),其中,所述控制设备(118)被配置为仅在相应共轭平面(124)的轴向位置位移( $d_z$ )超过预定阈值( $d'_z$ )的情况下,轴向移动所述调制元件(110)。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的显微镜(100),其中,所述控制设备(118)被配置用于在相对于所述光轴(120)的横向方向上自动地移动所述调制元件(110)。

7. 根据权利要求6所述的显微镜(100),其中,所述控制设备(118)被配置为根据定量图像质量分析来确定所述调制元件(110)的横向位移。

8. 根据权利要求7所述的显微镜(100),其中,所述定量图像质量分析包括图像印象的定量再现性和对比度传递函数的定量再现性中的至少一种。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的显微镜(100),其中,所述控制设备(118)被配置为通过使第一调制元件(110)移动离开所述光轴(120)的横向移动、以及通过使另一个第二调制元件(410)移动到所述光轴(120)上的横向移动,将所述第一调制元件(110)更换为所述第二调制元件(410)。

10. 根据权利要求9所述的显微镜(100),其中,所述控制设备(118)被进一步配置为根据所述第二调制元件(410)调适所述显微镜(100)的照明。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的显微镜(100),其中,所述显微镜(100)包括照明单元(122),所述照明单元(122)用于产生照明光束路径,所述照明光束路径用于照明待成像的样本,并且其中被放置到所述光轴(120)上的相应物镜(106)生成用于对样本进行成像的成像光束路径。

12. 根据权利要求11所述的显微镜(100),其中,所述调制元件(110)包括透明部,所述透明部被布置为使得在所述调制元件(110)从其在所述光轴上的位置发生预定的横向位移(d)时,所述成像光束路径穿过所述调制元件(110)的所述透明部。

13. 根据权利要求12所述的显微镜(100), 其中, 所述控制单元(118) 被配置为将所述调制元件(110) 横向移动所述预定的横向位移(d), 以使所述调制元件(110) 非激活。

14. 根据前述权利要求中任一项所述的显微镜(100), 其中, 所述调制元件(110) 被嵌入在具有抗反射涂层的平行平板中。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的显微镜(100), 其中, 所述调制元件(110) 相对于所述光轴(120) 倾斜。

16. 根据前述权利要求中任一项所述的显微镜(100), 当引用权利要求10时, 其中所述照明单元包括聚光透镜孔径转换器(126), 用于生成相应孔径的相应经准直的照明光束路径, 所述控制设备(118) 连接到聚光透镜孔径转换器(126), 以使用预定的空间照明光谱照明所述样本。

17. 根据权利要求16所述的显微镜(100), 其中所述聚光透镜孔径转换器(126) 包括聚光透镜(117) 和聚光孔径光阑转换器(116)。

18. 根据前述权利要求中任一项所述的显微镜(100), 其中, 所述显微镜(100) 进一步包括用于检测待成像的样本的图像的数字图像检测模块(112)。

19. 根据权利要求18所述的显微镜(100), 其中, 所述控制设备(118) 连接到所述数字图像检测模块(112), 以便检测强度图像以用于以下各项中的至少一项: 显示, 记录入档, 样品相位调制的定量重建, 以及样品振幅调制的定量重建。

20. 根据前述权利要求中任一项所述的显微镜(100), 其中, 所述控制设备(118) 被配置为确定所述显微镜(100) 的光学系统的相位传递函数(502) 和振幅传递函数(500, 600) 中的至少一个, 以便重建样本的定量相位图像。

21. 根据前述权利要求中任一项所述的显微镜(100), 进一步包括调制元件定位设备(130), 所述调制元件定位设备(130) 包括至少一个滑块(202, 208), 所述至少一个滑块(202, 208) 被配置为承载所述调制元件(110), 所述至少一个滑块被配置为在平行于所述光轴(120) 的方向和相对于光轴(120) 横向的方向中的至少一个方向上移动。

## 用于透射光对比的显微镜

### 技术领域

[0001] 本发明主要涉及一种用于至少通过透射光对比法对样本进行成像的显微镜。

### 背景技术

[0002] 在显微镜中,透射光对比法可用于将对象的相位信息转换为强度调制,其可以由检测器检测到。这允许观察薄的未染色样本,特别是在细胞生物学中的生物成像中。这通常可以涉及调制元件,如相位环(环膜)或调制器。这种调制器通常还涉及振幅调制,即衰减通过显微镜物镜的光。这些调制器应放置在与显微镜物镜的出射光瞳共轭的平面中,以确保在视野上进行均匀的对比和平移不变的成像。

### 发明内容

[0003] 鉴于上述缺点和问题,需要一种在显微镜中提供调制器的改进方式。根据本发明的实施例,提出了一种具有权利要求1的特征的显微镜。有利的进一步发展形成从属权利要求和随后描述的主题。

[0004] 本发明的实施例通常涉及一种显微镜,该显微镜被配置用于至少通过透射光对比法对样本进行成像。所述显微镜包括物镜转换器,该物镜转换器被配置为将多个(或若干个)物镜中的物镜放置到显微镜的光轴上。请注意,所述显微镜也可以仅配备单个物镜。在这种情况下,不需要物镜转换器,简单的物镜支架就足够了。所述显微镜进一步包括透镜系统,用于形成被放置到光轴上的物镜中的任一个物镜(或单个物镜,如果适用的话)的出射光瞳的真实中间图像,中间图像形成在与出射光瞳共轭的相应共轭平面处。通常,所述显微镜还包括照明单元,所述照明单元用于产生照明光束路径,所述照明光束路径用于照明待成像的样本;被放置到光轴上的相应物镜产生用于对样本进行成像的成像光束路径。优选地,所述显微镜进一步包括用于检测待成像的样本的图像的数字图像检测模块(检测器)。这种数字图像检测模块可以是相机、或者包括相机(或者被包括在相机中)。

[0005] 显微镜可以是倒置显微镜或正置显微镜。例如,在倒置显微镜中,要检查的对象(即样本)使用透射光方法从上方照明,并且物镜安装在显微镜载物台下方。在倒置反射光显微镜的情况下,照明和通过物镜的观察都是从下方进行的。这种入射光显微镜在例如矿物学和冶金学中发挥着重要作用,而倒置透射光显微镜通常用于检查或操作生物样本。倒置显微镜可以很好地接近要检查的样本,因为成像光学器件通常布置在显微镜载物台下方,即在显微镜的支架中。

[0006] 特别是,经由显微镜以正常方式观察时,生物样本和小厚度样本看起来几乎是透明的。这样的样本通常仅具有不同的光学厚度,而光振幅没有减弱或在整个样本上均匀减弱。当光通过这种样本(相位对象)时存在的光程差可以通过各种对比方法对人眼可见。在已知的对比方法中,诸如相位对比、根据霍夫曼的调制对比、浮雕对比、Varell对比或干涉对比,下面仅对作为对比方法的典型代表的相位对比和调制对比方法进行简要说明。

[0007] 在相位对比的情况中,照明光束路径上游的环形光阑通过聚光器成像到无限。照

明光束(“零衍射排列”)穿过环形光阑并在没有衍射的情况下穿透样本,撞击物镜的后焦平面中的相位环(与显微镜中常用的远心物镜的出射光瞳重合)。也就是说,它们击中了已经通过气相沉积进行协调的环形层,例如,与穿透此层相邻相位板的光线相比,实现了 $\lambda/4$ 的相位差。这允许以下功能:在振幅对象的情况下,衍射光相对于零级次具有 $180^\circ$  ( $\lambda/2$ )的相移,而在相位对象的情况下,这只有 $90^\circ$  ( $\lambda/4$ )。这种在相位环中额外引入的 $90^\circ$ 偏移也导致 $180^\circ$ 的总偏移,即与振幅对象相同的相位关系。通过额外削弱相位环中的振幅,将零级次的强度调整为衍射级次。在显微镜的中间图像平面中,与振幅图像相当的图像现在是由衍射级次的干涉产生的。

[0008] 折射率高于周围区域的细节在此图像中显得更暗。当然,也可以将相位环切割成环形光阑,使环形光阑以这种方式映射到相位环上。相位环位于物镜光瞳中,通常位于物镜本身内部。因此,对于相位对比,通常使用特殊的物镜,其中相位环被集成(例如通过在透镜上的气相沉积)。

[0009] 介电层和金属层的组合通常用于构建相位对比层。介电层(例如氧化硅)可用于调整相移,金属层(例如铬)可用于设置所需的透射度。

[0010] 合适的相位环(以及因此相关的环形光阑)的选择不仅取决于物镜,还取决于要检查的样本,其特征在于相应的透射度和相应的相移。

[0011] 此外,相位环的尺寸应根据所需的分辨率或所需的对比度来确定。带有集成相位环的特殊镜头无法灵活应对这种不同的要求。这将需要提供大量的特殊镜头,这需要很大的努力和高昂的成本。因此,在实践中,普通的特殊镜头是普遍适用的标准解决方案,对于特殊情况往往无法达到预期的效果。

[0012] 对于所谓的调制对比,在观察光束路径的光瞳平面中布置板,在该板上提供不同透明度(通常为0%、20%和100%)的带状区域。这种板通常称为调制器或调制元件。由于在这种情况下,衍射图像中的变化不会以相对于物镜的光轴对称的方式发生,因此用这种显微镜观察到的相位对象额外示出类似于对象或样本从一侧倾斜照明时出现的浮雕效果。在照明侧,提供与成像光束路径中的调制器共轭的至少一个狭缝形光阑。这通常以平均透射在成像侧的调制器的条上成像。这些狭缝形光阑通常位于聚光器盘内,每个放大倍率都有特殊的照明狭缝。

[0013] 这种调制器(或调制元件)需要定位到与显微镜物镜的出射光瞳共轭的平面中,以确保在视野上进行均匀的对比和平移不变的成像。虽然这种调制元件通常位于场成像光束路径(正像成像光束路径)的准直区域中,但它(同时)位于光瞳成像光束路径(锥光成像光束路径)的焦点中。因此,移动物镜,例如,改变调制元件的区域中光瞳图像的轴向位置。

[0014] 根据本发明的实施例,实现这一点的方式是显微镜提供控制设备。所述控制设备被配置用于自动地将调制元件(调制器)定位到相应共轭平面的位置处或与相应共轭平面相关的位置处的光轴上,即,在沿着光轴围绕共轭平面的一定范围内的位置。因此,不需要手动定位。相反,将为显微镜的用户提供调制器的正确放置,而无需任何特定的交互。可以提供调制元件定位设备(例如,具有滑块的支架)以布置和移动/定位调制元件。所述控制设备然后连接到所述调制元件定位设备以便自动控制它。

[0015] 优选地,控制设备被配置用于在平行于光轴的轴向方向上,即沿着光轴,自动地移动调制元件。这允许,一方面根据特定需要沿光轴正确定位调制器,另一方面,对于例如,沿

光轴具有不同出射光瞳的位置的不同物镜或不同类别的物镜使用单个调制元件。不需要提供滑块等,其具有沿光轴布置在不同轴向位置处的多个调制元件。

[0016] 有利地,控制设备连接到物镜支架或转换器,以接收关于放置到光轴上的相应物镜的信息。这允许基于当前使用的具有特定出射光瞳位置的物镜来确定调制元件的正确所需的(轴向的)位置。

[0017] 进一步有利的是,如果控制设备连接到显微镜的聚焦驱动,以接收关于相应物镜的轴(或轴向)位置的信息。所述聚焦驱动被配置为在平行于光轴的轴向方向上移动被放置到光轴上的相应物镜。这样,当前使用的物镜的任何轴向移动都可以瞬间被用于确定调制元件所需的轴向位置。注意,这种聚焦驱动可以集成到所述物镜支架或转换器中;换言之,可以提供提供用于改变焦点和改变物镜的轴向移动的通用设备。

[0018] 为了实现调制元件的所需位置,控制设备优选地包括表示聚焦驱动的轴向位置的数据,物镜的出射光瞳相对于定义的机械参考表面的位置(当前放置在光轴上),例如安装螺纹,和附加校准数据。当聚焦驱动和物镜沿光轴移动或改变物镜时,出射光瞳图像的物理位置发生变化,并且因此与出射光瞳共轭的平面也发生变化。控制设备重新计算出射光瞳的图像的所述物理位置,然后使用校准数据将调制元件轴向方向重新定位到与出射光瞳共轭的平面中。

[0019] 为了避免机械磨损和同步开销,可以实施调制元件的重新定位的标准。换言之,根据本发明的实施例的控制设备被配置为仅在相应共轭平面的轴向位置位移(在由于例如物镜改变或焦点改变导致共轭板的轴向位置改变的情况下)超过预定阈值的情况下,轴向移动调制元件。例如,在具有200mm参考焦距和25mm(对角线)视野的显微镜中,光瞳成像的数值光阑为0.0625。因此,光瞳图像的焦深为140 $\mu\text{m}$ (典型波长为546nm)。因此,仅在累积校正高于这种阈值(在该示例中为140 $\mu\text{m}$ )的情况下,才需要机械移动。对于典型的高倍率成像,这通常仅在搜索样本或更换物镜时才会出现。

[0020] 优选地,控制设备被配置用于在相对于光轴的横向方向上自动地移动调制元件。此外,优选地,控制设备还被配置为根据定量图像质量分析来确定调制元件的横向位移。所述定量图像质量分析具体包括图像印象的定量再现性(例如,对比印象,即由于各种相位变化引起的强度调制的精确量;在数学意义上,它是传递函数,它将对象的相位和振幅属性转换为图像信息)和对比度传递函数的定量再现性中的至少一种。换言之,调制元件的横向定位也可以与校准数据结合使用,以实现图像印象的定量再现性以及用于定量分析的对比度传递函数。这不仅适用于同一台显微镜,而且适用于同一类型的不同显微镜。调制元件的横向定位可能会因图像印象的主观变化而暴露给用户,或者用于预先确定的校准位置。

[0021] 对比度传递函数将通过样本或样本中的振幅和相位变化转换为图像中的强度对比。这种强度对比应该被定量地重建,以确保,一方面,不同样本的图像的可比性,以及另一方面,在相位的定量重建中使用相同的对比度传递函数。后者也以类似的方式在“Michael Chen、Lei Tian和Laura Waller,3D微分相差显微镜,Biomed.Opt.Express 7,3940-3950 (2016)”中讨论。例如这些传递函数在那篇文章中在等式(11)中称为H。对等式(11)进行适当的重新表述,例如,允许通过传递函数和来自透射光明场显微镜和调制对比显微镜的图像,或来自不同的调制对比显微镜的实现的图像来确定样本的折射率(相变和吸收)的实部和虚部。

[0022] 根据优选实施例,控制设备被配置为通过使第一调制元件移动离开光轴的横向移动、以及通过使另一个第二调制元件移动到光轴上的横向移动,将第一调制元件更换为第二调制元件。例如,这允许使用相位和调制对比元件或相同类型的不同调制元件。视情况而定,这可能需要改变或调适显微镜的照明,使其适合第二个(更换的)调制元件。例如,照明应以这样的方式进行调适,即为相应的调制元件使用合适的光阑。取决于调制器(或调制元件),狭缝光阑的宽度或长度必须与调制器匹配。物镜和聚光镜的组合决定了孔径光阑平面在调制器所在平面中的放大倍数。如果物镜的放大倍数不同,孔径光阑的图像大小应保持不变,则光阑的大小要改变。如果然后使用另一个(不同的,例如旋转的)调制器,孔径也将相应地调整(例如旋转),以使其适合新的调制器。

[0023] 优选地,调制元件包括透明部,透明部被布置为使得在调制元件从其在光轴上的位置发生预定横向位移时,成像光束路径穿过调制元件的透明部。这意味着没有调制。特别地,控制单元被配置为将调制元件横向移动预定的横向位移,以使调制元件非激活。所述预定的位移通常取决于光瞳的直径。这允许改变成像方式,例如,从对比方法到荧光成像,其中不需要调制。用户不必手动移除这种调制元件。预定的横向位移的特定选择允许最小化必要的行程范围并优化切换速度。特别是,透明部的使用允许短行程。

[0024] 根据进一步优选实施例,调制元件被嵌入在具有抗反射涂层的平行平板中。换言之,(调制元件的)基板本身可以是具有抗反射涂层的平行平板。这减少了成像中潜在的干扰光的反射。

[0025] 减少这种反射或其影响的另一种或附加方式是当出射光瞳的图像位于光束路径的准直部分时(不是必然如此),调制元件(板)特别是相对于光轴如果是倾斜的。附加或替代地,控制设备可以被配置为倾斜调制元件,例如,通过调制元件的支架的特定布置。这将仅在需要时允许倾斜。特别地,调制元件相对于光轴倾斜意味着调制元件从与光轴正交的平面倾斜例如 $1^{\circ}$ 到 $5^{\circ}$ 之间的值。

[0026] 优选地,照明单元包括用于生成相应孔径的相应经准直的照明光束路径的聚光透镜孔径转换器,控制设备连接到聚光透镜孔径转换器,以使用预定的空间照明光谱照明样本。这允许用对比方法所必需的预定的空间照明光谱来照明样本。所述聚光透镜孔径转换器具体包括聚光透镜和聚光孔径光阑转换器(即,用于改变聚光透镜和/或孔径光阑的转换器)。这意味着聚光器可以具有固定透镜,而孔径光阑可以改变(例如,通过改变孔径直径或其他尺寸)以提供相应的照明(另请参见上面关于调适照明的进一步说明)。然而,一般来说,聚光透镜也可能被调适或改变。也可以实施更复杂的孔径控制的方式或措施,诸如DMD(数字显微镜设备)系统、LED(发光二极管)阵列等。

[0027] 根据进一步优选实施例,控制设备连接到所述数字图像检测模块,以便检测强度图像,以用于显示、记录入档、和/或样品相位和/或振幅调制的定量重建。特别是关于相位和/或振幅调制的重建,请参考上面的注释。此外,控制设备优选地被配置为确定显微镜的光学系统的相位传递函数和振幅传递函数中的至少一个,以便重建样本的定量相位图像。当在校准位置使用时,并使用已知的空间照明分布和光学系统的设计数据,控制设备可以计算光学系统的成像特性,例如,以相位传递函数和振幅传递函数的形式。当用不同的成像特征实现两种对比方法时,例如调制对比和明场或调制对比的不同设置,系统可以使用成像特征的多样性和相应的传递函数来重建样本的定量相位图像。

[0028] 这种重建可以基于使用线性相位和振幅传递函数的正向成像模型,该线性相位和振幅传递函数作用于对象(样本)的复杂(相位和振幅)折射率分布,从而为至少两种不同的成像配置产生相应强度图像的数量。该至少两个关系可以组合成线性方程组(像素数乘以两个未知变量和至少像素数乘以两个已知变量),可以求解用于折射率分布的实部和虚部。在存在噪声并使用所谓的Tikhonov型正则化的情况下,这可以通过“Michael Chen、Lei Tian和Laura Waller,3D微分相差显微镜,Biomed.Opt.Express 7,3940-3950(2016)”的等式(11)中描述的维纳滤波器重建方法的适当调适来实现。当然,可以设想更复杂的重建方法,正如在引用的文献中已经提到的那样。

[0029] 总之,本发明的实施例允许优化所述对比方法的可用性,尤其是在自动化多模式显微镜系统中。这尤其是通过自动调制对比显微镜或其控制设备(或方法)实现的,其自动地将调制器定位到与物镜的出射光瞳共轭的平面中,同时考虑到具有聚焦物镜转换器的物镜的机械移动,诸如倒置显微镜中通常使用的那样,自动移除用于明场或荧光成像的光束路径的调制器,并启用调制器的定量定位,从而在部分相干成像的理论内对图像形成进行定量预测。

[0030] 特别地,调制器不必手动插入显微镜支架,也不必使用或甚至提供用于沿光轴等移动的手动杆。用户不必确保插入此类滑块以将正确的光瞳位置调制器定位到光束路径中,无需视觉检查,也无需手动沿光轴移动调制器以主观地使视野中图像印象均匀化。此外,用户不需要横向手动移动调制器来生成符合他们主观喜好的图像表达。除了避免手动用户交互之外,本发明的实施例实现了图像数据的定量评估和对比数据的连续定量分析。

[0031] 此外,在还包括荧光成像的多模式显微镜系统中,当将成像模式从对比技术切换到荧光成像时,用户不必手动移除滑块。而是,不仅自动防止了荧光图像点扩散函数的失真,而且还消除了调制器的衰减,这将导致在诸如荧光成像等光子匮乏的情况下检测到更少的荧光光子并降低信噪比。

[0032] 本发明的其他优点和实施例将从描述和附图中变得显而易见。

[0033] 应该注意的是,前面提到的特征和下面将要进一步描述的特征不仅可以在各自指出的组合中使用,而且可以在进一步的组合中或单独使用,而不脱离本发明的范围。

## 附图说明

[0034] 图1示意性地示出了根据本发明的优选实施例的显微镜;

[0035] 图2示意性地示出了根据本发明的优选实施例的显微镜的调制元件定位设备;

[0036] 图3a和3b示意性地示出了图2的调制元件定位设备的不同视图;

[0037] 图4a和4b示意性地示出了根据本发明的不同优选实施例的显微镜的调制元件;

[0038] 图5a和5b示出了调制对比显微镜的振幅和相位传递函数;

[0039] 图6示出了明视野显微镜的振幅传递函数;以及

[0040] 图7示出了由根据本发明的优选实施例的显微镜的控制设备执行的步骤。

## 具体实施方式

[0041] 图1非常示意性地示出了根据本发明的优选实施例的显微镜100;特别地,图1示出了显微镜100的光束路径和特别感兴趣的相关(光学)组件。注意,这种显微镜100通常还包

括外壳、显微镜载物台等,为了清楚起见未示出。

[0042] 显微镜100包括物镜106,物镜106布置在物镜转换器114(也称为物镜转换器或转塔)上;经由物镜转换器114。物镜106被放置到显微镜100的光轴120上并具有出射光瞳108。可以在物镜转换器114上或此处提供进一步的物镜(未示出),并且然后将物镜转换器114被配置为将多个物镜中的任何一个放置到光轴120上(用双侧箭头指示)。

[0043] 此外,提供了聚焦驱动115,被配置为在平行于光轴120的轴向方向z方向上移动被放置到光轴120上的相应物镜106。注意,聚焦驱动115可以与物镜转换器114集成。

[0044] 进一步,显微镜100包括透镜系统102,例如由两个透镜(中继系统)表示,用于形成当前被放置到光轴120上的物镜106(或任一物镜)的出射光瞳108的真实中间图像104。所述中间图像104形成在与出射光瞳18共轭的相应共轭平面124处。

[0045] 进一步,显微镜100包括用于生成照明光束路径120.3的照明单元122,用于照明待成像的样本128。被放置到光轴120上的相应物镜106生成用于对样本128成像的(正像)成像光束路径120.2。样本128的图像通过数字图像检测模块(检测器)112检测,该数字图像检测模块可以是相机、或者相机的一部分。请注意,如果需要,也可以使用目镜(例如,额外使用)。

[0046] 照明单元122包括具有孔径光阑的固定聚光透镜117。进一步,照明单元122包括用于生成相应孔径的相应经准直的照明光束路径的聚光透镜孔径转换器126。所述聚光透镜孔径转换器126包括除了所述聚光透镜117之外的聚光孔径光阑转换器116,用于改变孔径光阑(特别是其尺寸,由双侧箭头指示)。

[0047] 注意,还示出了锥光成像光束路径120.1。正像成像光束路径120.2代表用于物镜106将样本128成像到无穷的光束,而锥光光束路径120.1代表如上所述将出射光瞳108成像到中间图像104中的光束路径。

[0048] 进一步,显微镜100包括调制元件110,其被放置到相应共轭平面124的位置处或在共轭平面124周围的预定范围内的光轴120上,即沿z方向。调制元件110可以在平行于轴120的方向(z方向)上移动,并且可以在相对于光轴120的横向方向(x方向)上移动。调制元件被布置在调制元件定位设备130上,这将参照图2更详细地描述。

[0049] 进一步,显微镜100包括控制设备118,其包括例如处理器(它可以是PC或集成到显微镜中的控制单元),被配置用于将所述调制元件110自动定位到上述位置的光轴120上。特别地,所述控制设备118可以(电)连接到所述元件定位设备130,以便根据需要(自动)移动和定位所述调制元件110。

[0050] 此外,所述控制设备118(电)连接到聚焦驱动115,以接收关于相应物镜106的轴向位置的信息。这允许确定调制元件110所需的轴向位置。进一步,所述控制设备118(电)连接到聚光透镜孔径转换器126,,以使用预定的空间照明光谱照明样本。这可能包括控制聚光透镜孔径转换器126或其聚光孔径光阑转换器116以改变孔径的直径(通过打开或关闭孔径光阑)。

[0051] 图2比图1更详细地示出了根据本发明的优选实施例的显微镜的调制元件定位设备130。所述调制元件定位设备130包括z轨道200和z滑块202。所述z滑块202布置在z轨道200上,使得它可以在z方向上移动。提供电机204和驱动轴212以便移动z滑块,并且在z方向上以非常精确的方式定位该z滑块。

[0052] 所述z滑块202又包括x轨道206和x滑块208。所述x滑块208布置在该x轨道206上使得它可以在z方向上移动。提供电机210和驱动轴(未示出)以便移动x滑块并以非常精确的方式在x方向上定位它。调制元件110被放置在x滑块208上(这可能是倾斜的,如上所述)。电机204和210都可以连接到所述控制设备118并由所述控制设备118控制。所述z轨道200可以以固定方式布置在显微镜100中或显微镜100处。

[0053] 调制元件定位设备130相对于显微镜100的光轴120布置为使得调制元件定位设备130的z方向与光轴120一致或平行(图1中所示的z方向)。因此,调制元件110在z方向(,即平行于光轴120)和x方向上可移动,即,在相对于光轴120的横向方向上可移动。注意,调制元件110具有特别是板的形式,或者例如嵌入到具有抗反射涂层的平行平板中。然后将这种板布置成与光轴120正交或略微倾斜以减少反射。

[0054] 图3a和3b示出了图2的调制元件定位设备130沿光轴120观察到图2中所示顶侧的不同视图。特别地,图3a示出了调制元件110被定位到光轴120上的情况。这通过出射光瞳108的图像300.1可视化。可以看出,调制元件110的不透明或部分透明的部分或区域的部分(通过两条平行线指示,参见图4a以获得更详细的视图)被放置在图像300.1内。

[0055] 特别地,图3b示出了调制元件110位于光轴120之外的情况。可以看出,调制元件110的所有不透明和部分透明的部分或区域(由两条平行线指示的)被放置在图像之外,图像表示为300.2。为了将调制元件110(或其非透明区域)移出成像光束路径(图3a中的图像300.1),x滑块将在(横向)x方向上移动。注意,调制元件110包括(完全)透明部,该透明部被布置为使得在调制元件110从其在光轴120上的位置发生预定横向位移时,成像光束路径穿过调制元件110。

[0056] 图4a和4b示意性地示出了根据本发明的不同优选实施例的显微镜的不同种类的调制元件。这些调制元件用于调制对比方法。特别地,图4a示出了调制元件110,基本上在图3a、3b中更详细地示出。调制元件110具有矩形板的形式并且包括不透明的部分或区域400(例如,100%的吸收系数或0%的透明度)、部分透明的部分或区域402(例如,80%的吸收系数或20%的透明度),以及(完全)透明的部分或区域404(例如0%的吸收系数或100%的透明度)。

[0057] 图像300.1示出了调制元件110位于光轴上时的出射光瞳的图像,以及图像300.2示出了调制元件110被放置到光轴外侧时的出射光瞳的图像。在后一种情况下,全成像光束路径(仅)通过全透明部404。这意味着调制元件110(或其效果)被停用。为了实现这一点,调制元件110横向移动(图4a中的垂直方向,图3a、3b中的x方向)预定的横向位移,离开光轴。在图4a所示的示例中,这种预定的横向位移对应于两个图像300.1和300.2的中心之间的距离,用附图标记d表示。

[0058] 图4b示出了调制元件110以及除此之外第二或进一步的调制元件410。举例来说,调制元件110和410都被提供为单个或组合的调制元件412,给调制元件110的调制效果提供区域或部分400、402和404。此外,它通过部分透明的部分或区域406(例如80%的吸收系数或20%的透明度)和非透明的部分或区域408(例如100%的吸收系数或0%的透明度)提供另一种调制效果。

[0059] 虽然吸收系数可能与调制元件110的相同,但是这些区域或部分406、408相对于相应的部分或区域400、402旋转了90°,并且它们以相反的顺序布置。这样,受调制元件410影

响的调制对比相对于调制元件110旋转了 $90^\circ$ 。

[0060] 为了将调制元件410放置到光轴上,组合的调制元件412在横向(图4b中的垂直方向)上进一步移动,从而获得出射光瞳的图像300.3。调制元件定位设备则应该能够实现所需的横向位移。注意,这两个调制元件110和410也可以作为两个单独的元件或板提供。两个调制元件的差异可以包括例如具有合适孔径的对比的强度。

[0061] 图5a和5b示出了用于调制对比显微镜和成像的振幅传递函数500(图5a)和相位传递函数502(图5b)。在每种情况下,对比C(以任意单位)在垂直方向与横向( $k_x, k_y$ )方向(以 $\mu\text{m}^{-1}$ 为单位)被示出。这些函数可以通过控制设备从整个系统的相应数据和检测到的图像中确定或计算,并允许重建成像的样本的定量相位图像。诸如图4b中410(或组合的元件412)所描绘的调制器布置可用于改进相位传递函数的频率空间覆盖以进行定量相位重建。

[0062] 图6示出了明场显微镜中的振幅传递函数600。对比C(以任意单位)在垂直方向与横向( $k_x, k_y$ )方向(以 $\mu\text{m}^{-1}$ 为单位)被示出。与用于调制对比的传递函数类似,此函数可以通过控制设备从整个系统的相应数据和检测到的图像中确定或计算,并允许重建成像的样本的定量相位图像。

[0063] 图5a、5b和6中的传递函数起到传递函数H的作用,它将对象的复折射率分布与由系统检测到的强度图像相关联(参见上面的注释,同样是关于“Michael Chen, Lei Tian和 Laura Waller, 3D微分相差显微镜, Biomed. Opt. Express 7, 3940-3950 (2016)”)。由于前向图像形成通常被表述为卷积运算,因此通常诸如在相应的图中描绘相应的传递函数的傅立叶振幅。

[0064] 可以很容易地看出,调制对比相位传递函数502(图5b)确实将对象的相位变化( $k_y > 0$ 或 $k_y < 0$ )转换为正或负强度调制,并且将对象的振幅(吸收率)转换为图像的负强度调制,而用于透射光明场成像的相位传递函数处处为零,因此已被省略。如上所述,整个系统的相位传递函数的覆盖可以通过使用诸如元件410的调制元件来改进。在这些传递函数的帮助下,整个成像系统的正向模型可以如上所述被形成并最终被倒置。

[0065] 如图5b中所示,在 $k_y = 0$ 处有一条线,在该线处相位传递函数的振幅消失了,也就是说,此方向上的相位结构不会在图像中生成任何对比。这对重建设没有吸引力。在第二位置的帮助下,调制器410可以将此线旋转到 $k_x = 0$ (由于非透明区域和部分透明区域旋转了 $90^\circ$ ),从而使得总共覆盖了除了 $k_x = k_y = 0$ 之外的所有频率分量。这允许生成明显更好的重建。

[0066] 图7示出了根据本发明的优选实施例的显微镜的控制设备,例如图1中所示的控制设备100执行的步骤,以便定位或移动调制元件。

[0067] 在步骤700中,控制设备从物镜转换器接收关于哪个物镜当前被放置到光轴上的信息 $I_1$ 。在步骤702中,控制设备从聚焦驱动接收关于当前放置到光轴上的物镜的轴向位置的信息 $I_2$ 。在步骤704中,控制设备基于接收到的信息和进一步的数据 $D_c$ ,如显微镜的光学组件的数据、校准数据等,确定相应共轭平面的轴向位移 $d_z$ 。

[0068] 在步骤706中,控制设备检查是否确定的轴向方向 $d_z$ 高于预定阈值 $d'_z$ ,如果是,则在步骤708中将调制元件沿z方向移动该轴向位移 $d_z$ 。这具体包括控制调制元件定位设备及其电机。

[0069] 在进一步的步骤710中,如果需要停用调制元件,则控制设备可以通过将调制元件

移动预定横向位移 $d$  (如上所述) 将其移出光轴。

[0070] 如本文所用, 术语“和/或”包括一个或多个相关列出的项目的任何和所有组合, 并且可以缩写为“/”。

[0071] 尽管已经在装置的上下文中描述了一些方面, 但显然这些方面也代表了对相应方法的描述, 其中块或设备对应于方法步骤或方法步骤的特征。类似地, 在方法步骤的上下文中描述的方面也表示对应装置的对应块或项目或特征的描述。

[0072] 一些实施例涉及一种显微镜, 该显微镜包括如结合图1至7的一个或多个附图所描述的控制设备。可替代地, 显微镜可以是结合如图1至7的一个或多个附图描述的系统的一部分或连接到系统。图1示出了显微镜100的示意图, 其中控制设备(系统) 118被配置为执行本文所述的方法。显微镜100包括控制设备(计算机系统) 118。显微镜100被配置为拍摄图像并连接到计算机系统118。计算机系统118被配置为执行本文描述的方法的至少一部分。计算机系统118可以被配置为执行机器学习算法。计算机系统118和显微镜100可以是单独的实体, 但也可以一起集成在一个公共外壳中。计算机系统118可以是显微镜100的中央处理系统的一部分和/或计算机系统118可以是显微镜100的子组件的一部分, 诸如传感器、致动器、相机或照明单元等。

[0073] 计算机系统118可以是具有一个或多个处理器和一个或多个存储设备的本地计算机设备(例如个人计算机、笔记本电脑、平板计算机或移动电话), 或者可以是分布式计算机系统(例如具有一个或多个处理器和一个或多个分布在各个位置的存储设备的云计算系统, 例如, 分布在本地客户端和/或一个或多个远程服务器群和/或数据中心)。计算机系统118可以包括任何电路或电路组合。在一个实施例中, 计算机系统118可以包括一个或多个可以是任何类型的处理器。如本文所用, 处理器可以指例如显微镜或显微镜组件(例如相机) 或任何其他类型的处理器或处理电路的任何类型的计算电路, 诸如但不限于微处理器、微控制器、复杂指令集计算(CISC) 微处理器、精简指令集计算(RISC) 微处理器、非常长的指令字(VLIW) 微处理器、图形处理器、数字信号处理器(DSP)、多核处理器、现场可编程门阵列(FPGA)。可以包括在计算机系统118中的其他类型的电路可以是定制电路、专用集成电路(ASIC) 等, 诸如例如一个或多个电路(诸如通信电路) 用于如移动电话、平板电脑、笔记本电脑、双向无线电和类似电子系统等无线设备。计算机系统118可以包括一个或多个存储设备, 其可以包括一个或多个适用于特定应用的存储器元件, 诸如随机存取存储器(RAM) 形式的主存储器、一个或多个硬盘驱动器和/或一个或多个处理可移动介质的驱动器, 诸如光盘(CD)、闪存卡、数字视频磁盘(DVD) 等。计算机系统118还可以包括显示设备、一个或多个扬声器以及键盘和/或控制器, 其可以包括鼠标、轨迹球、触摸屏、语音识别设备或允许系统用户向计算机系统118输入信息和从计算机系统118接收信息的任何其他设备。

[0074] 一些或所有方法步骤可以通过(或使用) 硬件装置来执行, 例如处理器、微处理器、可编程计算机或电子电路。在一些实施例中, 一些一个或多个最重要的方法步骤可以由这样的装置执行。

[0075] 取决于某些实施要求, 本发明的实施例可以以硬件或软件来实施。可以使用非暂时性存储介质来执行该实施, 诸如数字存储介质, 例如软盘、DVD、蓝光、CD、ROM、PROM和EPROM、EEPROM或闪存, 其上存储有电子可读控制信号, 它们与可编程计算机系统协作(或能够协作), 使得执行相应的方法。因此, 数字存储介质可以是计算机可读的。

[0076] 根据本发明的一些实施例包括具有电子可读控制信号的数据载体,其能够与可编程计算机系统协作,从而执行本文描述的方法之一。

[0077] 通常,本发明的实施例可以实现为具有程序代码的计算机程序产品,当计算机程序产品在计算机上运行时,该程序代码可操作用于执行方法之一。例如,程序代码可以存储在机器可读载体上。

[0078] 其他实施例包括存储在机器可读载体上的用于执行本文描述的方法之一的计算机程序。

[0079] 换言之,因此,本发明的实施例是具有程序代码的计算机程序,该程序代码用于当计算机程序在计算机上运行时执行本文描述的方法之一。

[0080] 因此,本发明的进一步实施例是一种存储介质(或数据载体,或计算机可读介质),其包括存储在其上的计算机程序,用于在由处理器执行时执行本文所述的方法之一。数据载体、数字存储介质或记录介质通常是有形的和/或非暂时性的。本发明的进一步实施例是如本文所述的装置,包括处理器和存储介质。

[0081] 因此,本发明的进一步实施例是表示用于执行本文所述方法之一的计算机程序的数据流或信号序列。数据流或信号序列可以例如被配置为经由数据通信连接,例如经由互联网传送。

[0082] 进一步实施例包括处理装置,例如计算机或可编程逻辑器件,被配置为或适用于执行本文描述的方法之一。

[0083] 进一步实施例包括其上安装有用于执行本文所述方法之一的计算机程序的计算机。

[0084] 根据本发明的进一步实施例包括一种装置或系统,被配置为将用于执行本文描述的方法之一的计算机程序(例如,电子地或光学地)传送到接收器。例如,接收器可以是计算机、移动设备、存储器设备等。例如,该装置或系统可以包括用于将计算机程序传送到接收器的文件服务器。

[0085] 在一些实施例中,可编程逻辑器件(例如,现场可编程门阵列)可用于执行本文描述的方法的一些或所有功能。在一些实施例中,现场可编程门阵列可以与微处理器协作以执行本文描述的方法之一。通常,这些方法优选地由任何硬件装置来执行。

[0086] 参考标记列表

|        |     |           |
|--------|-----|-----------|
| [0087] | 100 | 显微镜       |
| [0088] | 102 | 透镜系统      |
| [0089] | 104 | 中间图像      |
| [0090] | 106 | 物镜        |
| [0091] | 108 | 出射光瞳      |
| [0092] | 110 | 调制元件      |
| [0093] | 112 | 数字图像检测模块  |
| [0094] | 114 | 物镜转换器     |
| [0095] | 115 | 聚焦驱动      |
| [0096] | 116 | 聚光孔径光阑转换器 |
| [0097] | 117 | 聚光透镜      |

|        |                     |             |
|--------|---------------------|-------------|
| [0098] | 118                 | 控制设备        |
| [0099] | 120                 | 光轴          |
| [0100] | 120.1               | 锥光成像路径      |
| [0101] | 120.2               | 正像成像路径      |
| [0102] | 120.3               | 照明光束路径      |
| [0103] | 122                 | 照明单元        |
| [0104] | 124                 | 共轭平面        |
| [0105] | 126                 | 聚光透镜孔径转换器   |
| [0106] | 128                 | 样本          |
| [0107] | 130                 | 调制元件定位设备    |
| [0108] | 200                 | z轨道         |
| [0109] | 202                 | z滑块         |
| [0110] | 204,210             | 电机          |
| [0111] | 206                 | x轨道         |
| [0112] | 208                 | x滑块         |
| [0113] | 212                 | 驱动轴         |
| [0114] | 300.1,300.2,300.3   | 出射光瞳的图像     |
| [0115] | 400、408             | 非透明部        |
| [0116] | 402、406             | 部分透明部       |
| [0117] | 404                 | 透明部         |
| [0118] | 500、502、600         | 传递函数        |
| [0119] | D                   | 预定的横向位移     |
| [0120] | $d_z$               | 轴向位置位移      |
| [0121] | $d'_z$              | 预定的轴向位置位移阈值 |
| [0122] | C                   | 对比度         |
| [0123] | $D_C$               | 数据          |
| [0124] | $I_1, I_2$          | 信息          |
| [0125] | $x, y, z, k_x, k_y$ | 方向          |
| [0126] | 700-708             | 步骤          |



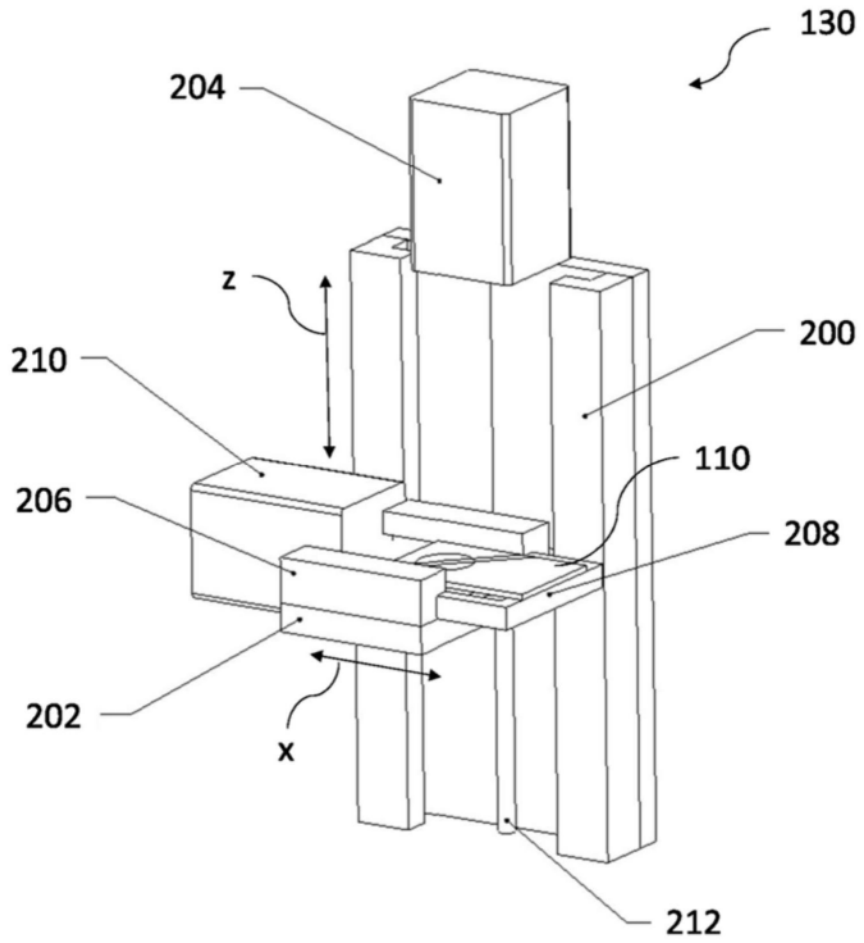


图2

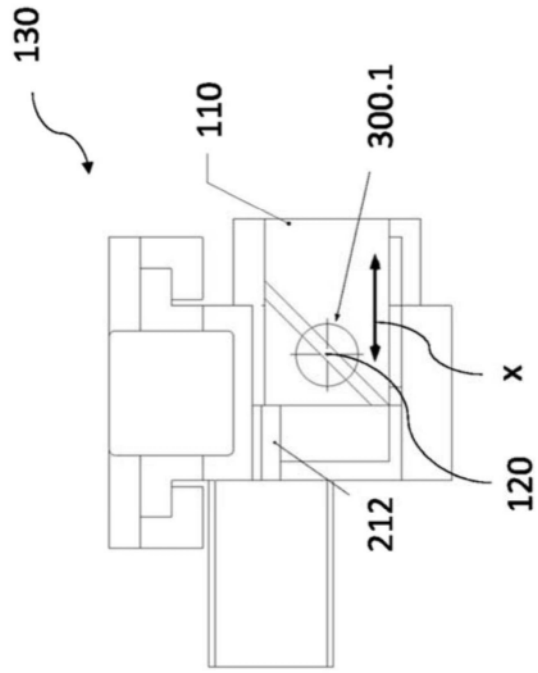


图3a

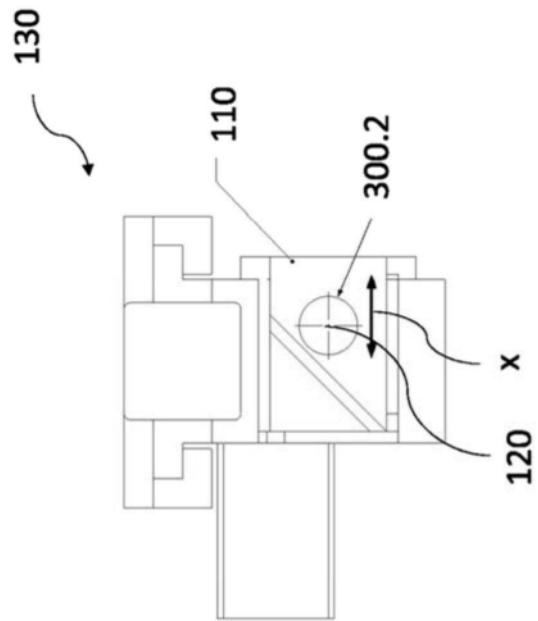


图3b

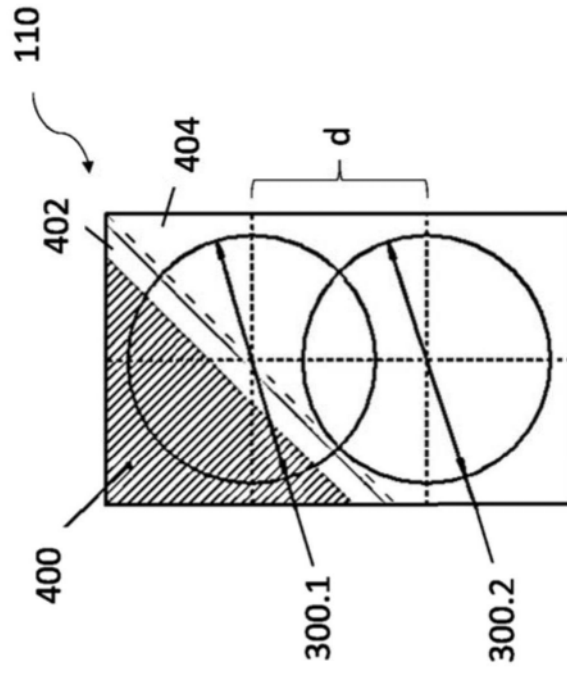


图4a

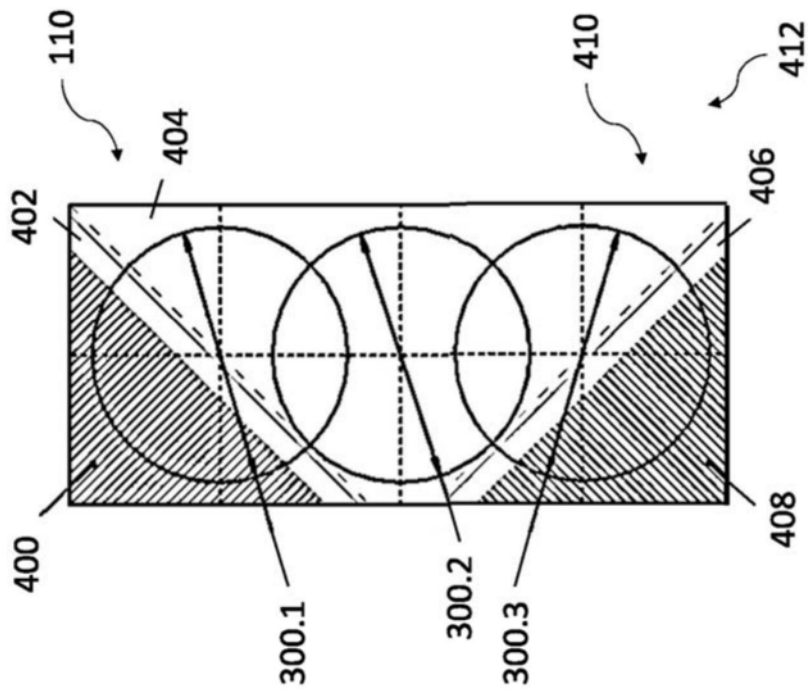


图4b

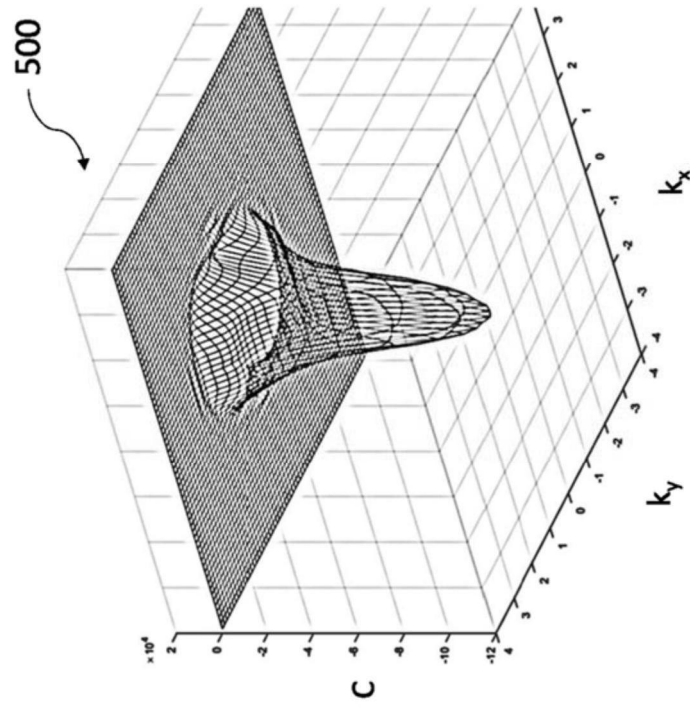


图5a

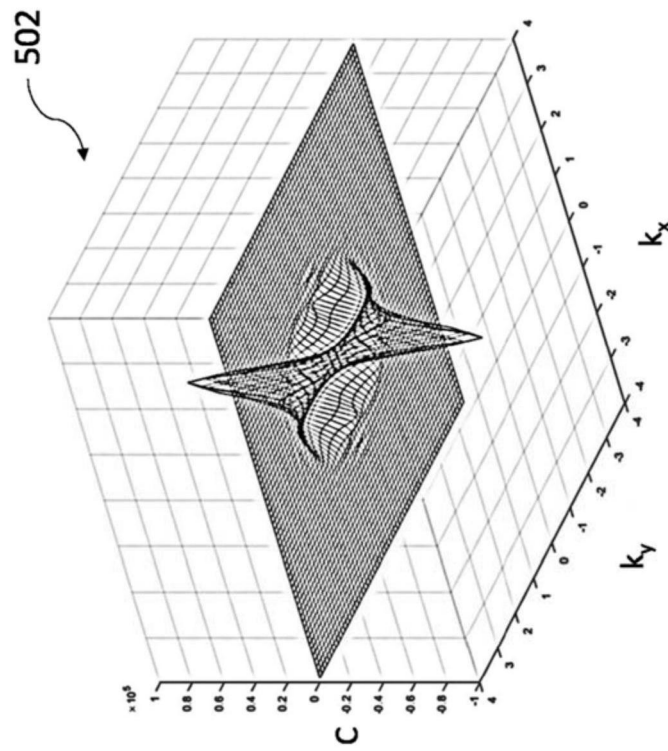


图5b

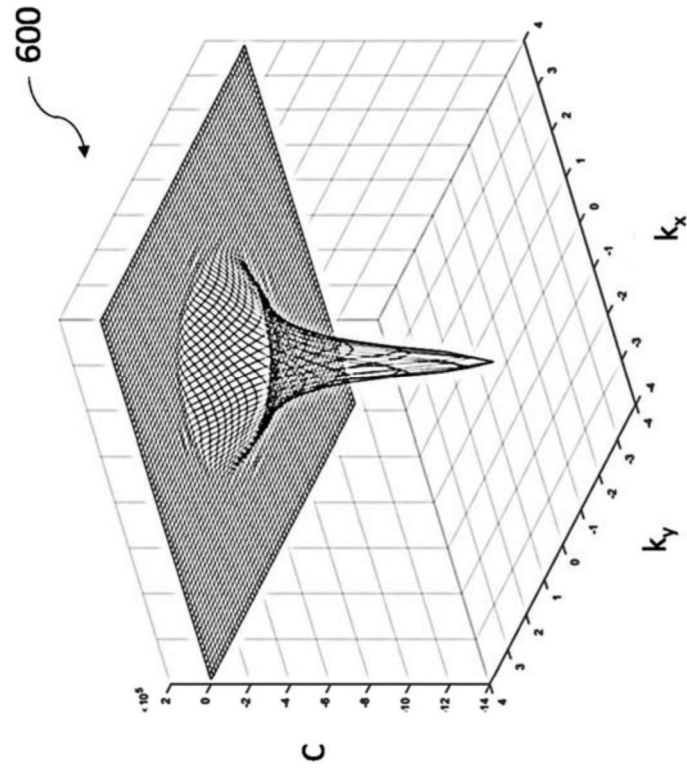


图6

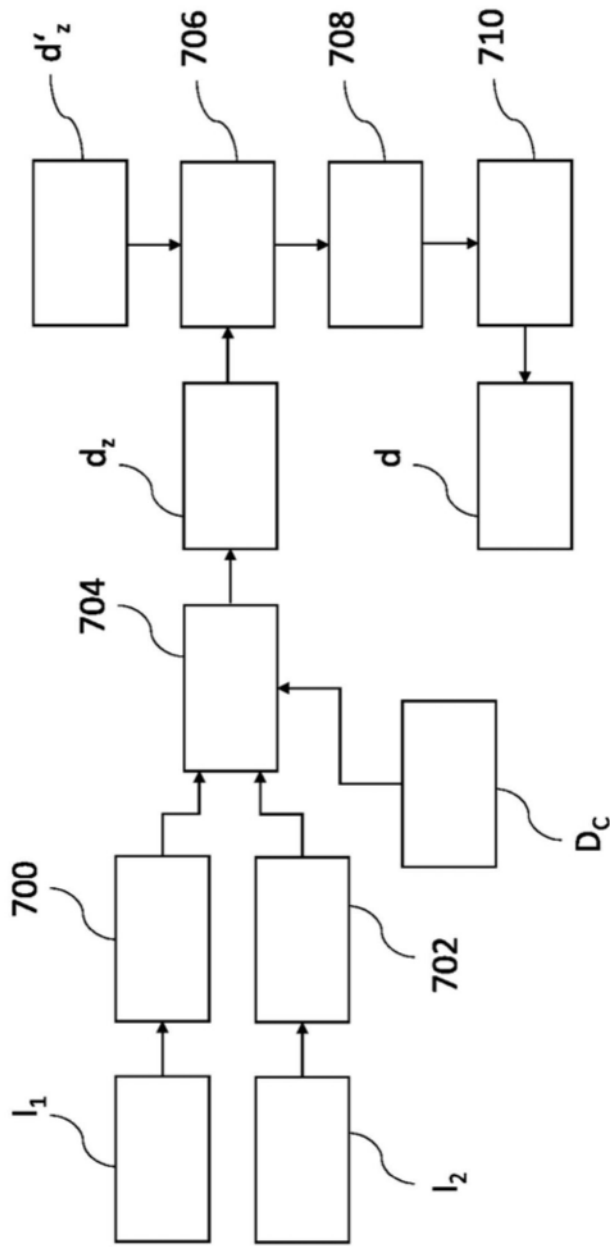


图7