



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103765289 B

(45)授权公告日 2017.05.17

(21)申请号 201180051943.1

(22)申请日 2011.08.25

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103765289 A

(43)申请公布日 2014.04.30

(30)优先权数据

61/377,591 2010.08.27 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.04.26

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/049180 2011.08.25

(87)PCT国际申请的公布数据

W02012/027586 EN 2012.03.01

(73)专利权人 小利兰·斯坦福大学托管委员会

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 K·高希 L·伯恩斯

A·埃尔加默 M·J·施尼策尔

E·科克尔 T·W·何

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

代理人 张欣

(51)Int.Cl.

G02B 21/00(2006.01)

(56)对比文件

US 2005/0051723 A1, 2005.03.10,

US 2004/0080750 A1, 2004.04.29,

US 2004/0080750 A1, 2004.04.29,

US 2010/0206731 A1, 2010.08.19,

CN 1623110 A, 2005.06.01,

US 2009/0201577 A1, 2009.08.13,

US 2009/0161103 A1, 2009.06.25,

审查员 班贵军

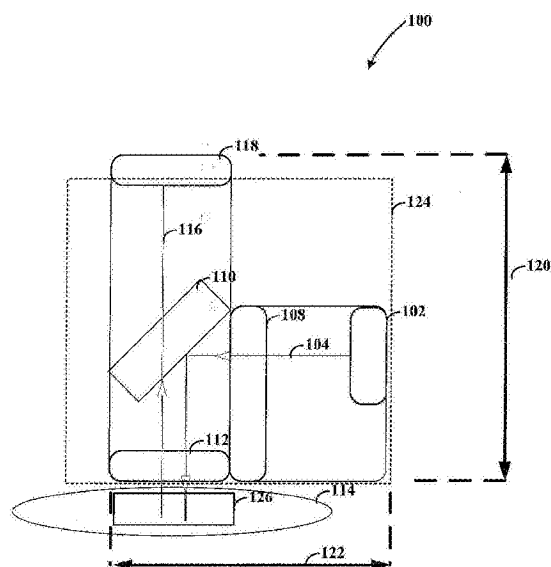
权利要求书4页 说明书13页 附图6页

(54)发明名称

具有先进的成像性质的显微镜成像设备

(57)摘要

实现系统、方法、和设备用于显微镜成像方案。本公开的一个实施例涉及落射荧光显微镜。该显微镜包括具有光学传感器阵列的图像捕捉电路。光学装置被配置为将小于约1mW的激发光引导向至少0.5mm²的视场中的目标对象并且将由该激发光引起的落射荧光发射引导向该光学传感器阵列。该光学装置和光学传感器阵列各自充分靠近目标对象来为视场的图像提供至少2.5 μm分辨率。



1. 一种落射荧光显微镜,包括:

包括光学传感器阵列的图像捕捉电路;和

光学装置,被配置为:(i) 将小于1mW的激发光引导到包含在包括目标对象的视场中的至少 0.5mm^2 的区域,并且(ii) 将由所述激发光引起的落射荧光发射引导向所述光学传感器阵列,所述光学装置和所述光学传感器阵列各自充分靠近所述目标对象来为所述视场的图像提供至少 $2.5\mu\text{m}$ 的分辨率。

2. 如权利要求1所述的显微镜,其特征在于,所述光学装置包括物镜、发光二极管、和CMOS图像传感器阵列,每一个均被包含在所述显微镜的大小小于一立方英寸的集成外壳内。

3. 如权利要求1所述的显微镜,其特征在于,所述光学装置包括物镜、发光二极管、和CMOS图像传感器阵列,每一个均被包含在集成外壳内,其中所述显微镜重量小于2克。

4. 如权利要求1所述的显微镜,其特征在于,所述目标对象的在所述图像捕捉电路处的光学放大小于或等于5。

5. 如权利要求1所述的显微镜,其特征在于,所述光学装置被配置为在提供所述激发光的光源、所述光学传感器阵列、和物镜之间提供自对准。

6. 如权利要求1所述的显微镜,其特征在于,所述光学装置被配置为在实时成像过程中,通过调整所述光学传感器阵列和物镜之间的距离,来提供图像的聚焦。

7. 如权利要求1所述的显微镜,其特征在于,还包括至少一个光学滤波器元件和产生所述激发光的光源,且其中所述至少一个光学滤波器元件、所述光源、和所述光学传感器阵列被配置为分离和重新安装至所述显微镜。

8. 如权利要求1所述的显微镜,其特征在于,所述光学装置和所述光学传感器阵列各自充分地接近所述目标对象来以至少36Hz的速率为所述视场中的图像的生成提供至少 $2.5\mu\text{m}$ 的分辨率。

9. 如权利要求2所述的显微镜,其特征在于,包括所述图像捕捉电路和所述光学装置的所述显微镜,重量小于2克,且其中包含在所述外壳内的发光二极管提供所述激发光。

10. 如权利要求1所述的显微镜,其特征在于,所述光学装置包括物镜和发出所述激发光的光源,且所述光学装置被包含在所述显微镜的外壳内,所述外壳大小小于一平方英寸;且其中所述图像捕捉电路和包括所述光源的所述光学装置,重量小于2克。

11. 如权利要求10所述的显微镜,其特征在于,由所述光源所提供的激发光被所述光学装置的一个或多个激发元件引导至所述物镜。

12. 如权利要求11所述的显微镜,其特征在于,所述物镜被配置为将所述激发光引导至目标对象并将所述激发光聚焦在视场上。

13. 如权利要求12所述的显微镜,其特征在于,所述光学装置还包括一个或多个发射元件,被配置为由经由所述物镜从所述目标对象接收到的落射荧光发射光来提供焦平面。

14. 如权利要求13所述的显微镜,其特征在于,所述图像捕捉电路被设置在所述焦平面处且配置为以足够的分辨率来捕捉包括多个独立毛细血管的视场的图像,来将单个毛细血管与另一个区分开来。

15. 如权利要求14所述的显微镜,其特征在于,所述视场的图像具有足够分辨率来区分流过各毛细血管的各红血球。

16. 如权利要求14所述的显微镜,其特征在于,所述一个或多个发射元件包括位于所述物镜和所述图像捕捉电路之间的消色差透镜,其中所述消色差透镜从所述物镜接收经准直的落射荧光并将所述经准直的落射荧光聚焦在设置所述图像捕捉电路的所述焦平面处。

17. 如权利要求10所述的显微镜,其特征在于,所述目标对象是老鼠的脑部,且所述显微镜被配置为安装在所述老鼠的头部并提供在清醒的行为过程中的体内脑部成像。

18. 如权利要求17所述的显微镜,其特征在于,所述清醒的行为包括所述老鼠的运动,且所述视场的图像包括具有足够分辨率的所述老鼠脑部的多个独立毛细血管,从而在所述运动过程中将单个毛细血管与另一个区分开来。

19. 如权利要求14所述的显微镜,其特征在于,使得所述视场的图像焦点对准的从所述物镜到所述目标对象的所述视场的距离为50-250 μm 。

20. 如权利要求10所述的显微镜,其特征在于,从所述物镜到所述图像捕捉电路的距离小于1英寸。

21. 如权利要求12所述的显微镜,其特征在于,在不使用光纤的情况下,所述激发光从所述外壳内的所述光源被提供至所述目标对象。

22. 如权利要求10所述的显微镜,其特征在于,在所述外壳内没有设置光纤。

23. 如权利要求10所述的显微镜,其特征在于,所述外壳由黑色材料制成或包括吸收材料层。

24. 如权利要求14所述的显微镜,其特征在于,所述外壳在固定住所述图像捕捉电路的外壳部分与固定住所述物镜的外壳部分之间包括有螺纹接口,所述螺纹接口被配置为提供对所述图像捕捉电路和所述物镜之间的距离的精细调节,从而调节所述焦平面。

25. 如权利要求14所述的显微镜,其特征在于,所述光学装置包括双色镜,所述双色镜被配置为将来自所述光源的所述激发光反射至所述物镜并将来自物镜的所述落射荧光发射光穿过至所述图像捕捉电路。

26. 如权利要求10所述的显微镜,其特征在于,还包括同步电路,所述同步电路与显示所述视场的图像的外部设备进行接口。

27. 如权利要求26所述的显微镜,其特征在于,所述外部设备提供对于所述光源的控制。

28. 如权利要求2所述的显微镜,其特征在于,所述物镜是梯度折射率 (GRIN) 透镜。

29. 如权利要求28所述的显微镜,其特征在于,所述梯度折射率透镜具有如下特性中的至少一个:2mm的直径、0.245的节距、或0.45的数值孔径。

30. 如权利要求10所述的显微镜,其特征在于,所述显微镜被配置并布置为捕捉所述目标对象的所述视场的视频图像。

31. 一种落射荧光显微镜,包括:

光源,被配置成从提供小于6mW的能量源产生激发光,其中激发光被引导到包含在包括目标对象的视场中的至少0.5mm²的区域;

包括传感器阵列的成像电路;和

物镜,被配置为充分接近所述光源、所述传感器阵列、和所述目标对象地进行操作,来对于至少0.5mm²的视场的图像提供至少2.5 μm 的图像分辨率。

32. 如权利要求31所述的显微镜,其特征在于,还包括大小小于一平方英寸的外壳,所

述外壳包含成像电路和光学光源。

33. 如权利要求32所述的显微镜,其特征在于,所述物镜被配置为引导来自所述目标对象的经准直的激发光。

34. 一种大小小于一立方英寸的落射荧光显微镜,所述显微镜包括:

被配置为将光引导到包含在包含成像目标的视场中的至少 0.5mm^2 的区域的光激发装置;

包含光学传感器阵列的成像电路,被配置为从由所引导的光和所述成像目标之间的交互引起的荧光而生成图像数据;和

光学装置,被配置为将所述荧光引导至具有足够强度的光学传感器阵列,并在超过 0.5mm^2 面积上以至少 $2.5\mu\text{m}$ 的分辨率来聚焦所述图像数据,

其中所述落射荧光显微镜的大小小于一立方英寸。

35. 如权利要求34所述的显微镜,其特征在于,还包括大小小于一平方英寸的外壳,所述外壳包含所述成像电路,且其中所述显微镜重量小于2克。

36. 如权利要求35所述的显微镜,其特征在于,还包括提供光的光源,所述光源包含在所述外壳内。

37. 如权利要求35所述的显微镜,其特征在于,还包括接口,所述接口配置为与外部光学数据记录/配置系统进行通信。

38. 如权利要求35所述的显微镜,其特征在于,所述图像捕捉电路被配置并布置为以至少50Hz的速率来捕捉成像目标的连续图像。

39. 一种成像设备,包括:

大小小于一立方英寸的便携式外壳,所述便携式外壳包含,

提供激发光的激发源;

提供具有第一端和第二端的光学路径的细长装置,所述细长装置包括位于所述光学路径的第一端的物镜;

被配置和布置为将激发光引导至所述物镜的一个或多个激发元件;和

一个或多个发射元件,被配置和布置为由从所述物镜接收到的落射荧光发射光在所述光学路径的所述第二端提供焦平面;和

成像电路,包括位于所述焦平面处的光学传感器阵列,所述成像电路被配置和布置为从所述落射荧光发射光来捕捉目标对象的图像,所述图像具有足够的视场来捕捉多个独立毛细血管且具有足够分辨率来将单个毛细血管与另一个区分开来。

40. 如权利要求39所述的成像设备,其特征在于,所述物镜将近似被准直的落射荧光发射光引导至所述光学路径中,且其中所述足够的分辨率可将流过毛细血管的各红血球区别或解析。

41. 如权利要求39所述的成像设备,其特征在于,所述光学传感器阵列包括CMOS传感器。

42. 如权利要求39所述的成像设备,其特征在于,所述细长装置还包括位于所述光学路径中在所述物镜和所述光学传感器之间的消色差透镜,所述消色差透镜被配置为从所述物镜接收经准直的落射荧光并将所述经准直的落射荧光聚焦在对应于所述光学传感器阵列的焦平面上。

43. 如权利要求39所述的成像设备,其特征在于,所述激发源是发光二极管。

44. 如权利要求39所述的成像设备,其特征在于,所述细长装置还包括位于所述光学路径中的双色镜,所述双色镜被配置为将来自所述激发源的所述激发光反射到所述物镜并使得来自所述物镜的落射荧光发射光穿过。

45. 如权利要求39所述的成像设备,其特征在于,所述成像设备被配置和布置为以至少50Hz的速率捕捉所述目标对象的连续图像,所述图像具有足够视场来捕捉多个单个毛细血管且具有足够分辨率来将单个毛细血管相对另一个辨认出来并辨认出流过毛细血管的红血球。

46. 如权利要求39所述的成像设备,其特征在于,所述激发源被使用紧固元件物理地连接至所述细长装置,所述紧固元件允许用另一个激发源来替换所述激发源。

47. 如权利要求39所述的成像设备,其特征在于,所述细长装置还包括位于所述光学路径中位于所述物镜和所述光学传感器阵列之间的发射滤波器,所述发射滤波器配置为带通,该带通包括所述落射荧光发射光的波长。

48. 如权利要求39所述的成像设备,其特征在于,所述细长装置被配置为调整所述光学路径中的光学元件来允许所述图像的聚焦。

49. 如权利要求39所述的成像设备,其特征在于,所述成像设备被配置为捕捉参与运动的器官的活体图像。

50. 如权利要求39所述的成像设备,其特征在于,还包括用于将所捕捉的图像作为数字数据传输的发射器电路。

51. 如权利要求39所述的成像设备,其特征在于,还包括接口,其耦合至所述外壳、耦合至另一个光学系统。

52. 如权利要求39所述的成像设备,其特征在于,所述设备包括同步电路,用于接口至外部光学数据记录/配置系统,其中所述同步电路被配置和布置为通信帧有效信息,该帧有效信息用于提供在所述成像设备和所述外部光学数据记录/配置系统之间所通信的数据的同步信息。

53. 一种使用如权利要求39所述的成像设备的方法,包括将所述成像设备安装至支承结构的底板和从底板上拆除的步骤,该底板用于允许慢性实验过程中对于公共成像位置的重复成像的准确的显微镜对齐。

54. 一种使用如权利要求1所述的落射荧光显微镜的方法,包括将所述落射荧光显微镜安装至支承结构的底板和从底板上拆除的步骤,该底板用于允许慢性实验过程中对于公共成像位置的重复成像的准确的显微镜对齐。

具有先进的成像性质的显微镜成像设备

[0001] 相关文档

[0002] 本专利文献根据35U.S.C.§119要求名为“Microscopy Imaging Device with Advanced Imaging Properties”、在2010年8月27日提交的美国临时专利申请系列号No.61/377,591的权益；在这个根本的临时申请中提交的专利文献和附录，包括其中应用的参考文献，通过参考全部并入此处。

[0003] 特定实施例的概览

[0004] 本公开的各方面一般地涉及显微镜成像设备，例如，微型落射荧光成像设备。

[0005] 光学显微镜经常被设计为具有相当大尺寸和花费的仪器。生物学中的成像的作用增加，且光学显微镜的微型化集成有助于很多新应用的进步。例如，量产的、小型显微镜，可用于对自由行动的动物中的细胞的成像，特别是对于脑部中的细胞的成像，为此，有用的是理解细胞动态如何与动物行为有关。

[0006] 尽管没有限制于此，本公开的各方面涉及由量产零件制成的微型(<2g)、集成的荧光显微镜，包括半导体光源和图像传感器，允许在跨~0.5mm²区域范围的成像。这样的设备可被配置为以足够的图像质量和/或分辨率对于细胞动态做出高速观察，这样的观察对于以高达100Hz的帧采集率查看活鼠脑部的动态是有用的。微型显微镜的使用可对于各种不同应用有帮助(如，跟踪在超过9个小脑微域上延伸的高达>200的浦肯雅神经原中同时发生的Ca²⁺激增)。

[0007] 本公开的各方面涉及落射荧光显微镜。该显微镜包括具有光学传感器阵列的图像捕捉电路。光学装置被配置为将小于约1mW的激发光引导向至少0.5mm²的视场中的目标对象并且将由该激发光引起的落射荧光发射引导向光学传感器阵列。该光学装置和光学传感器阵列各自充分靠近目标对象来为视场的图像提供至少2.5μm分辨率。

[0008] 本公开的特定实施例涉及落射荧光显微镜，该显微镜具有被配置为从提供小于6mW的能量源产生激发光的光源。该显微镜包括包含传感器阵列的成像电路，还包括物镜，其被配置为在和光源、图像传感器阵列、以及目标对象充分近处操作，从而为至少0.5mm²的视场提供至少2.5μm图像分辨率。

[0009] 本公开的其他实施例涉及占据小于一立方英寸的落射荧光显微镜。这样的显微镜包括被配置为将光引导向包含成像目标的视场的光激发装置。包含光学传感器阵列的成像电路被配置为从由所引导的光和成像目标之间的交互引起的荧光中生成图像数据。光学装置被配置为将荧光引导至光学传感器阵列，该传感器阵列具有对于图像数据的足够强度和焦距以使得图像数据描述超过0.20mm²并有至少3μm的分辨率。在其他实施例中，对于图像数据的强度和焦距足以对于至少0.5mm²的视场以2.5μm图像分辨率来描绘。

[0010] 根据本公开的其他实施例，成像设备包括尺寸上小于一立方英寸的便携式外壳。该便携式外壳包括数个元件，包括配置为提供激发光的激励源。还包括一结构，该结构被配置为提供具有第一端和第二端的光学路径。该结构包括位于光学路径第一端的物镜；被配置和布置为将激发光引导至物镜的一个或多个激发元件；和一个或多个发射元件，被配置和布置为由物镜接收到的落射荧光发射光在光学路径的第二端提供焦平面。成像电路包括

位于焦平面处的光学传感器阵列,且该光学传感器阵列被配置和布置为从落射荧光发射光来捕捉目标对象的图像,该图像具有足够的视场来捕捉多个独立毛细血管且具有足够分辨率来将单个毛细血管与另一个区分开来。

[0011] 以多个所示的实现和应用例示了本公开的特定方面,这些实现和应用中的一些在附图中示出,且以所附权利要求部分为特征。以上概览并不旨在描述本公开的每个例示实施例或者每个实现。

附图说明

[0012] 考虑以下结合附图对本公开的各个实施例的详细描述,可更完整地理解本公开的各方面,在附图中:

[0013] 图1示出根据本公开的实施例的落射荧光显微镜设备的框图;

[0014] 图2示出根据本公开的实施例的具有外部光源的落射荧光显微镜设备的框图;

[0015] 图3示出根据本公开的实施例的微型荧光显微镜的截面;

[0016] 图4示出根据本公开的实施例的物镜以及在物镜中的射线传播;

[0017] 图5示出根据本公开的实施例的,具有两个透镜元件和附加光谱过滤组件的成像路径的光学射线轨迹图;和

[0018] 图6示出根据本公开的实施例的显微镜系统的框图。

[0019] 虽然本公开可顺应于各种修改和替代形式,但其细节已作为示例在附图中示出并将被进一步详细地描述。然而,应该理解,其目的不是为了将本公开限制为所描述的特定实施例。相反,本发明旨在覆盖落入本公开的精神和范围内的所有修改、等同和替代。

具体实施方式

[0020] 相信本发明可被应用于各种不同类型的设备和工艺,且本公开已经被发现特别适用于落射荧光成像应用。尽管本公开不一定受限于这样的应用,通过使用这种背景讨论各个示例可使本公开的各个方面得到理解。

[0021] 根据本公开的特定示例性实施例,通过使用显微镜设备和系统,帮助落射荧光成像。例如,该设备和/或系统的特定方面允许为激发光使用特别低级别,该特别低级别被用于在目标对象或细胞中生成落射荧光。一些方面允许以较高分辨率对于较大视场成像。又进一步的方面涉及图像的高速捕捉,该图像可实时或近乎实时地查看。尽管这些辅助点没有限制,它们相关于本公开的数个不同实施例。

[0022] 一个特定方面涉及激发光的光源和用于成像的目标对象或细胞之间的接近。为了落射荧光成像,激发光和目标对象之间的交互引起成像荧光的生成。该激发光被引导向目标对象且具有配置为由荧光团、荧光标记、或荧光探针吸收的特定波长。然后,荧光团在不同(如,更长)波长处发光。所吸收的光的量有关于被传递至目标对象的激发光的量。以此方式,所生成的荧光的量相关于激发光的量。尽管各种光传递机制可帮助减少光行进通过介质时的衰减,随着通过介质的行进距离增加,光的衰减将增加。还有,在使用空气和其他介质时,在光的传递和/或衰减中,介质的组成和其他分散属性可起着非常重要的作用,而光学路径长度的减少(主要导致光通过空气行进的减少)对减少衰减几乎不起作用。显微镜设备和系统的设计允许在极为接近目标对象处放置激发光的光源,藉此有助于使用较短的光

学路径。这在使用低功率光源和/或使用低水平光捕捉图像方面,是特别有用的。

[0023] 根据此处讨论的一个或多个实施例,可使用各种荧光源。提到特定荧光源并不必然排除了使用其他荧光源(如,基因编码的荧光蛋白,诸如GFP、GCaMP,及其变型)。

[0024] 本公开的其他方面涉及将光学元件、滤波器、和摄像头集成到单个外壳内,这对于消除光纤束及其相关的限制可特别有用。

[0025] 又一些方面涉及目标对象或细胞相对于用于从落射荧光捕捉图像数据的图像传感器之间的接近。图像分辨率和成像时间相关于可由图像传感器收集并检测的落射荧光的量。由于目标对象和图像传感器之间的光学路径的性质引起的落射荧光的衰减是不期望的。显微镜设备和系统的精心的设计允许在极为接近目标对象处放置图像传感器,藉此有助于使用较短的光学路径。

[0026] 还是根据本公开,在目标对象的成像过程中,显微镜设备的物镜被设置为相对于对象目标接近。物镜和目标对象之间的较大的距离可对于在目标对象处接收到的激发光的量以及在物镜处接收到并由物镜所收集的荧光的量具有不利的影响。因此,设置物镜相对于目标对象的接近可能是有利的。

[0027] 本公开的实施例涉及显微镜设备和系统,其对于相对较大的视场捕捉图像数据,该图像数据提供目标对象的较高的分辨率。本公开的一个这样的实施例包括图像捕捉电路,具有传感器元件或元素阵列,提供该图像捕捉电路来对于视场成像。该传感器元件对于视场的不同部分检测落射荧光。传感器元件可被配置为具有充足的敏感度且接近目标对象来帮助图像捕捉和产生。

[0028] 本公开的其他实施例涉及图像捕捉的曝光时间的长度。当激发荧光时,它们可开始丢失它们发出荧光的能力,这有时被称为光褪色。另外,落射荧光成像涉及由目标对象吸收激发光。这个所吸收的光的一些转换为热。这个所产生的热可对于曝光时间做出限制,如,对于生理学材料/细胞的加热可引起细胞损伤甚至死亡。然而,如果激发光的强度降低,可增加曝光时间。如果,例如,目标对象和图像传感器之间的光耦合被改善,可减少激发光的强度。光毒性的效果可比局部化加热具有更大的损害。本公开的各方面减轻或消除不利地影响图像捕捉和数据的相关处理的那些效果。

[0029] 本公开的特定实施例涉及连同曝光时间调节进行的激发光强度调节,从而改进图像质量,该图像是用于特定目的(如,图像捕捉速率、分辨率、视场大小或成像深度)。

[0030] 根据本公开的其他方面,对于小尺寸的目标对象,使用相对低的光学变焦以及视场的高分辨率成像。通过对根据此处讨论的各方面的显微镜设备和系统的精心设计和应用,可减轻对于特定级别的成像所需的对于光学变焦的约束。

[0031] 本公开的各实施例涉及使用根据此处讨论的各方面的显微镜设备和/或系统对于目标对象的实时成像。在这些实施例中的特定实施例中,通过在保持不变的分辨率的同时减少视场来增加成像速率,通过减少曝光时间来减少图像捕捉时间和/或对于这样的实时成像可获得的帧速率相关联于全视场的大小以及所期望的图像分辨率。此处任选地实现的另一个因素包括所使用的图像传感器的类型和响应度。若期望能实时显示图像的话,又一些其他因素涉及传送和处理图像数据用于显示的能力。

[0032] 本公开的又一些其他实施例涉及辅助在体内或体外落射荧光成像。例如,活体对象的体内成像,对于将外部刺激和其他因素与所捕捉的图像关联起来是特别有利的。通过

将所捕捉的图像的性质与外部刺激相关起来,这个关联可被用作,例如,诊断/研究工具。在较高帧速率的实时成像可进一步提供因变于时间的此种关联。

[0033] 本公开的实施例涉及具有帮助分离与重组显微镜设备的各组件的模块化设计的显微镜设备和/或系统。可使用这样的分离和重组来用新的和/或不同的模块化组件来替代模块化组件。例如,可用具有相同或不同光学和电学性质的新的光源来替换该光源。光学传感器和/或光学导向元件(如,镜、滤波器和透镜)的阵列也可被移除和替换。如果期望的话,光学传感器也可被移除和替换。

[0034] 在根据本公开的特定其他实施例中,一个或多个成像设备包括同步电路,用于与外部光学数据处理(记录和/或配置)系统进行接口。该同步电路包括逻辑电路(如,可编程或半可编程芯片(微控制器或ASIC)),被配置和布置为通信帧参考/有效信号。在典型应用中,帧有效信号将为在成像设备和外部系统之间通信的数据提供同步信息(如IEEE通信标准中所定义的),该同步信息与该数据一同提供。可使用这样的光学数据记录/配置系统来安装软件、配置试验和工序的设置参数、在这样的试验和工序过程中提供可视反馈、并记录光学数据用于处理和进一步研究。

[0035] 在又一些实施例中,本公开涉及使用此处描述的成像设备的方法。特定设备包括用作提供支撑/稳定性的基础结构且还允许显微镜(再)对准的底板。这些方法包括将落射荧光显微镜组装和再组装到该底板从而允许显微镜对准变得准确的步骤。这样的准确应该能足以在例如慢性试验过程中对于同一成像位置重复成像。

[0036] 现在参看附图,图1示出根据本公开的实施例的落射荧光显微镜设备的框图。落射荧光显微镜设备100包括在尺寸120和122内的多个组件。未图示的是又一个尺寸,其垂直于尺寸120和122延伸。尽管没有必须限制于此,这些尺寸中每一个可小于一英寸。根据其他实施例,这些尺寸可略大,例如可大数个厘米的数量级。

[0037] 落射荧光显微镜设备100包括光源102。这个光源102生成激发光104。在特定实现中,光源102是发光二极管(LED)或有机发光二极管(OLED)。激发光104由光学装置124引导向目标对象114,用于对目标对象成像。光学装置可包括一个或多个物镜112、(二色)镜110、和激发滤波器108以及发射滤波器(未示出)。来自目标对象114的落射荧光116被从/由物镜引导向图像捕捉电路118。落射荧光显微镜设备100被配置为从视场126引导光并捕捉视场126的图像数据。

[0038] 在本公开的各实施例中,显微镜设备100可包括一个或多个图像聚焦光学元件(如,消色差透镜)和发射滤波器。这些和其他元件可帮助控制显微镜设备100的光学性质。

[0039] 根据一个实施例,所示出的元件分别被集成到相对小的区域内,如,在具有尺寸120、122的单个外壳内。对于减少从光源102到目标对象114以及返回图像捕捉电路118的光学路径长度,这样的各组件的集成可特别有用。减少这个光学路径可以是有助于显微镜设备100的多个不同性质和能力的配置参数的一部分。例如,在特定实施例中,显微镜可对于面积高达 1mm^2 的成像视场提供具有 $1\mu\text{m}$ 分辨率的图像。

[0040] 用光学传感器阵列118来配置特定的示例性实施例。光学装置124被配置为将小于约 1mW (各种实施例提供更高的激发功率,如, 100mW)的激发光引导向至少 0.5mm^2 的视场126中的目标对象114并且将由该激发光104引起的落射荧光发射116引导向光学传感器阵列118。在各实施例中,视场126可至少 1mm^2 。该光学装置124和光学传感器阵列118各自配置得

充分靠近目标对象114来为视场126的图像提供至少2.5 μ m分辨率。在其他实施例中,光学装置124和光学传感器阵列118可被配置为提供至少1 μ m分辨率。在特定实施例中,样本处的激发光功率是可变的且可在100 μ W-100mW范围内,取决于特定配置和成像约束。在一个实施例中,光学装置可以在提供激发光的光源、光学传感器阵列、和物镜之间提供自对准。在一个实施例中,光学装置可以在实时成像过程中,通过调整光学传感器阵列和物镜之间的距离,来提供图像的聚焦。在一个实施例中,光学传感器阵列(成像设备)可以被配置和布置为以至少50Hz的速率捕捉目标对象的连续图像。

[0041] 根据本公开的实施例,光源102可传递高达37流明或6mW的光。然而,并不一定要求光源102提供这样强度的光。另外,由目标对象接收到的光的量小于(相对于衰减因子)光源102提供的光的量。例如,一个实施例的衰减导致在光源处的6mW对应于被传递至目标对象的1mW激发功率。类似地,为了在样本处传递100mW的激发功率,光源可被配置为提供高达600mW。

[0042] 尽管图1示出各组件在尺寸120、122内,但是其他实施例是可能的。例如,图2示出根据本公开的实施例的具有外部光源的落射荧光显微镜设备的框图。该落射荧光显微镜设备200包括外部光源214。这个外部光源214耦合至光学装置250,该装置包括在尺寸216和218内的多个组件。未图示的是又一个尺寸,其垂直于尺寸216和218延伸。尽管没有必须限制于此,这些尺寸中每一个可小于一立方英寸。根据其他实施例,这些尺寸可在数个厘米的数量级上。

[0043] 根据本公开的一个实施例,外部光源214经由光纤电缆212耦合至该光学装置250。来自外部光源214和光纤电缆212的激发光通过(任选的)激发滤波器208。(双色)镜204和物镜206将激发光导向目标对象210。特定地,激发光被导向视场220。激发光使得目标对象210中的荧光团用落射荧光发出荧光。这个落射荧光由(双色)镜204和物镜206导向光学传感器202。

[0044] 在本公开的各实施例中,显微镜设备200在成像路径中还可包括一个或多个图像聚焦光学元件(如,消色差透镜)和发射滤波器。这些和其他元件(图1中未示出)可帮助控制显微镜设备200的光学性质。

[0045] 尽管光源214没有定位成接近光学装置250,但是由于目标对象210、物镜206和/或光学传感器202之间的接近,被传递至目标对象210的激发光的量仍可被设置为低水平。特定地,这个接近对于在目标对象和光学传感器之间提供充分的光耦合是特别有用的。因此,落射荧光可相对于图像性质是较低的强度。另外,在目标对象210处的激发强度的较低水平可允许在光褪色、加热、或其他不利影响成为因素之前激发光的较长的曝光。

[0046] 以下讨论提供实验性实施例的细节。尽管实验性实施例提供有关各种参数和结果的示例和细节,这些方面并不必须限制到本公开的各种其他实施例。该实验性实施例被配置和设置为提供较小的落射荧光显微镜。显微镜将包括光源的特别集成的装置、光学元件、滤波器、和摄像头结合到单个外壳内。

[0047] 微型荧光显微镜的集成度和所获得的尺寸比例可被配置为用于很多应用中。特别富有挑战的应用涉及在体内的脑部成像,如,在老鼠或类似生物体内。在至少一个这样的应用中,该显微镜被设计为安装在老鼠的头部用于在清醒的行为过程中进行体内脑部成像。为了被配置用于这个应用和其他应用,显微镜被设计具有苛刻的物理尺寸且具有大量要

求,如,从而易于由老鼠在清醒和主动行为过程中所容忍。例如,假设成年老鼠质量约为25g,该显微镜被设计为3g或更小。其他设计考虑涉及有关图像质量、可靠性、和速度。

[0048] 一个实施例被配置用于高速、细胞水平的脑部成像的成像。大量制造的成本和简化度是荧光显微镜设计中的另一个因素。特定实施例被配置且设计为以低成本来大量生产(如,可缩放调整且可顺应于大量生产)的集成设备。

[0049] 图3示出根据这样的考虑而设计的和根据本公开的实施例的微型荧光显微镜的截面。垂直箭头表示激发(向下箭头)和发射(向上箭头)路径。单个外壳300包含光源314和图像捕捉电路302、以及荧光过滤器组(发射滤波器306和激发滤波器316)和微光学元件(聚光透镜312、双色镜310、消色差透镜308、物镜318、和聚焦机制304)。光源与带有过滤器组的摄像头以及显微镜光学元件的这个集成有助于在各种应用(诸如体内成像)中的高分辨率图像捕捉。在一个实施例中,可以调整光学路径中的光学元件来允许图像的聚焦。

[0050] 根据一个实施例,固态发光二极管(LED)(较小、可顺应于聚光光源元件集成、且可以低成本量产)被用于激发光源。互补金属氧化物半导体(CMOS)图像传感器被用作摄像头。

[0051] 在本公开的特定实验性实施例中,图3中所示的LED光源可使用安装在定制的6mmX6mm印刷电路板(PCB)(还可包括散热槽)上的蓝色LED 314实现。使用鼓状微透镜312来收集照明,然后照明穿过4mmX4mm激发滤波器316,偏转双色镜310,并进入成像路径。梯度折射率(GRIN)物镜微透镜318将照明聚焦到样本上。来自样本的荧光发射通过物镜318、双色镜310、4mmX400发射滤波器306、和消色双合管透镜308返回,其将图像聚焦到安装在具有功率和信号调节电子元件的8.4mm X 8.4mm PCB上的CMOS图像传感器302(640X 480像素)。LED光源、CMOS摄像头、和光学组件被集成到具有模块化设计的显微镜外壳300内,模块化设计允许对于不同的应用需要,诸如激发LED和CMOS摄像头芯片之类的单独组件被替换。另外,可集成存储器电路来存储图像数据。模块化方面允许在不将显微镜从成像目标移除(如,显微镜可留存固定于生物体)的情况下,移除并替换存储器电路。因此,所捕捉的图像被本地地存储且然后通过移除存储器电路而被检索,存储器电路可被配置为与诸如膝上型计算机之类的外部设备交互。

[0052] 在示例性实施例中,使用聚醚醚酮(PEEK)制造显微镜外壳且显微镜外壳具有允许通过调整摄像头位置聚焦在亚微米准确度上的内置机制图像聚焦能力。根据各种所期望的应用,还可使用其他材料(如,生物兼容和耐溶剂的材料)。经由外部数据采集PCB,该显微镜可被插入计算机,该数据采集PCB具有标准USB接口,提供实时图像采集、显示、和摄像头和光源控制。

[0053] 本公开的实施例涉及在成像路径上和落射荧光显微镜上的设计和控制。成像路径包括透镜和其他光学调节和导向组件。附加组件可包括,例如,光谱过滤组件和/或消色双合成像管透镜。

[0054] 图4示出根据本公开的实施例的物镜和该物镜中的射线传播。在特定实施例中,物镜402是GRIN物镜。该GRIN物镜是圆柱形透镜,具有导致从目标对象404发源、以正弦路径传播的射线406的径向减少的折射率分布,如图4中所示。由于相对其他类型物镜的较小的形状因子和易于与其他微光学元件集成和/或减少光学路径长度,GRIN透镜可能是特别有用的。

[0055] 在本公开的一个实验性实施例中,被用于从样本收集荧光发射的GRIN物镜直径为

2mm且节距为0.245。节距1对应于射线传播的一个完整的正弦路径；因此0.245的节距导致接近于被认为是准直光线的光线，如图4中所示。物镜数值孔径(NA)是0.45。所收集的荧光发射穿过双色镜和微型发射滤波器，且然后荧光图像通过具有15mm焦距的消色透镜聚焦到CMOS图像传感器上。

[0056] 图5示出，根据本公开的实施例的，具有两个透镜元件和附加光谱过滤组件的成像路径的光学射线轨迹图。这些光线示出样本平面内的点如何成像到CMOS摄像头上。光线(502、504、506、508、510)从样本平面内五个不同的点源追迹到CMOS摄像头上的成像的点。使用软件建模来执行成像路径的设计和光线轨迹模拟。从目标对象512发出的光线穿过GRIN物镜514。GRIN物镜514准直光线。然后光线由双色镜516导向消色透镜518。发射滤波器520过滤掉不理想的光波长，诸如反射的激发光。然后光线撞击传感器阵列/摄像头522，此处它们被记录并被用于生成目标对象512的图像。

[0057] 成像路径和光学元件所提供的光学放大可根据期望的应用而被配置。另外，通过物镜和目标对象之间的接近以及目标对象、物镜、和图像捕捉电路之间的接近可不需要光学放大，导致其中较低的光学放大(1-4x)可允许在大于 1mm^2 的视场中对较大样本成像，同时仍然提供至少 $1\mu\text{m}$ 的较高的空间分辨率的实施例。在一个实施例中，目标对象的在图像捕捉电路处的光学放大小于或等于5。

[0058] 根据实验和相关实施例，显微镜光学放大范围在4.5-5.5x之间。工作距离，即，从物镜的近表面到作为焦点的样本平面中的点之间的距离，约150-200 μm 或约50-250 μm (这些尺寸可取决于焦平面的精确位置)。通过光学设计的分辨能力，可评估光学设计的性能，且其中一个度量是光学点扩展函数的半峰值全带宽(FWHM)。以此方式计算的成像路径的在轴、横向空间分辨率约为 $1.2\mu\text{m}$ ，在视场的周围减少到约 $1.6\mu\text{m}$ 。然而，这个度量未必是限制性的，因为可获得的空间分辨率也是因变于各种因素的，包括但不限于，摄像头像素大小。

[0059] 本公开的各方面涉及目标对象、激励源、和图像传感器之间的照明路径的性质。例如，仔细设计照明路径可对所观察的样本提供有效且均匀的激发。激发光源与照明路径的耦合对于提供充分且被良好控制的照明来激发样本是有用的。在一个实验性实现中，具有在约470nm的照明光谱峰值的蓝色LED被用作激发光源。这个LED被安装在带有散热槽的6mmX6mmPCB上。散热槽帮助在操作过程中保持LED结温的稳定。

[0060] 相比仅在局部区域上的驱动电流(实际转移函数是曲线)，LED照明输出是(一阶)线性的。然而，该输出表现出温度依赖性。实验性结果示出，20-30mA的驱动电流足以传递所需的照明功率到样本处。这个驱动电流约是LED的最大额定驱动电流的五十分之一(1/50)(如，最大驱动电流为1A且一般驱动电流是20mA)。对于给定的驱动电流，在LED打开且LED照明输出稳定后大约60s后，LED结一般达到均衡温度。在特定实施例中，可经由本征温度测量或与前馈或反馈系统耦合的外部温度测量，在温度变化上实时地稳定LED光输出。例如，从温度传感器(如，温度敏感的电容器或温度感测二极管)和/或电流传感器接收到的数据可被用于控制被提供至LED的电力的量。在特定实施例中，在制造过程中或者在制造后一点，可校准提供这样的控制的控制电路。

[0061] 根据实验性实施例，LED照明由鼓型透镜收集、穿过微型荧光激发滤波器、且然后在将照明引导至GRIN物镜的双色镜上反射、并至样本。该系统被设计为收集并传递光到样本来获得在整个样本视场上以平均光功率密度的空间地均匀、均质的照明。这可通过近似

柯勒照明来完成。在柯勒照明中，光源和样本平面位于共轭面的不同组上、确保了光源没有在样本上成像、且以平均的光功率密度在样本上获得均匀照明。

[0062] 根据实验性实施例，荧光滤波器组被配置为将激发照明和荧光发射分开。滤波器组包括三个部分：激发滤波器、双色镜、和发射滤波器。滤波器和双色镜的光谱曲线被配置为允许蓝色激发和绿色发射。这些光谱曲线可修正用于成像合成荧光探针的较宽的调色板，诸如荧光及其反应衍生物、以及基因编码的荧光蛋白，诸如绿色荧光蛋白 (GFP)。对于特定的实验性实现，滤波器组的特定光谱特性和尺寸如下。激发滤波器是480/40nm的光谱的带通滤波器且尺寸为4mm X 4mm X 1.05mm，发射滤波器也是535/50nm光谱的带通滤波器且具有4mm X 4mm X 1.05mm的类似尺寸，且双色镜具有较长带通光谱曲线、通过大于506nm的波长，且具有4mm X 4.8mm X 1.05mm的尺寸。在其他实施例中，该滤波器组可被配置为允许激发的多个波长的激发以及带有多个激发/发射光谱的多个荧光标记的成像。

[0063] 本公开的实施例涉及使用CMOS图像传感器。CMOS图像传感器是用CMOS设计并制造的数字成像传感器。这对于提供可以低成本量产的图像传感器而言是特别有利的。另外，使用CMOS技术对于提供在既低功率且高速操作的方案是有用的。可用数字像素实现CMOS图像传感器，其中从光子到位的转换直接在逐像素的模拟数字转换器和动态存储器以像素水平完成。这对于高速成像应用和受益于高速捕捉的静态和视频速率成像应用 (诸如动态范围增强) 是特别有用的。

[0064] 在特定实现中，使用具有640X 480像素分辨率的CMOS图像传感器，每一个像素具有5.6μm X 5.6μm的尺寸。该CMOS图像传感器被封装在5.6mm X 5.8mm芯片级别封装内。传感器输出是连续的数字低压差分信号 (LVDS) 格式。这样的LVDS格式对于帮助与最小数量的互连交互是特别有用的，这可以是对于最小化附连至显微镜的引线数量的重要考量。

[0065] 传感器的实验性特性，图示于表1中，简短地描述如下。通过计算1000个图像帧中的像素强度的标准偏差来估算像素读取噪声，该1000个像素帧是在全黑且充分短地曝光的情况下采集的从而来自暗电流散粒噪声的噪声贡献极小。暗电流、和暗信号非均匀性 (DSNU)，在像素阵列上由于设备失配引起的暗电流的变化，通过在黑暗中以足够长曝光时间采集1000帧、且然后将这些帧平均为单帧 (目的是理想地平均化时间噪声) 来估算。然后从被均匀化的图像中的像素的平均和标准偏差中找到暗电流和暗信号非均匀性。采用这些实验地表征的传感器标准，以及传感器的其他已知的电性质，CMOS图传感器被分析地建模来估算入射光子流密度范围的图象逼真度。

[0066] 表1

[0067]

封装大小	5.6 X 5.8 mm ²
------	---------------------------

[0068]

阵列大小	640 X 480 pixels
像素大小	5.6 X 5.6 μm^2
帧速率	36 fps/Hz
帧读取噪声	10 e^-
暗电流 (室温)	900 e^-/s
暗信号非均匀性	30 e^-/s
最大阱容	52,000 e^-

[0069] 这些实验结果是说明性的且并不意味着限制。例如，表1的帧速率/图像捕捉速度应被理解为是在特定实验参数的情况下。例如，所捕捉的视场 (FOV) 至少为0.5mm²，但是可高达1mm²或甚至更大。较小的FOV可允许更高的帧速率 (如，在100Hz下为370 μm)。

[0070] 根据本公开的实施例的一个应用涉及在活体老鼠脑部的成像实验。由于入射在典型活体老鼠脑部成像实验的传感器平面上的光子流密度是10¹¹光子/cm²/sec，这对应于20,000电子/pixel/sec，该CMOS图像传感器在活体老鼠脑部成像实验的有限区域的光子散粒噪声中操作。因此，CMOS图像传感器的像素读取噪声和暗电流数、其中以低光情况执行成像的应用的相关考量项，对于图像逼真度具有可以忽略的影响。估算的传感器动态范围达60dB，这被认为是高于足以捕捉在活体老鼠脑部成像数据组中观察到的信号强度的范围，可见CMOS图像传感器的成像性能度量良好地适合满足应用需要。

[0071] 本公开的实施例涉及图像数据、控制信号的通信和/或向显微镜设备供电。对于很多应用，显微镜的信赖度 (intrusiveness) 是相关的考虑。这个方面可受到被用于提供通信和/或电源给显微镜设备的引线数量的不利影响。因此，本公开的各方面涉及减少显微镜和外部系统之间的引线的数量，外部系统可提供控制和/或图像存储和处理功能。根据特定实验性实现，使用双引线I2C接口来与显微镜设备通信控制信息。该I2C接口将引线定义为SCLK和SDATA，并使用串行接口通信，藉此提供低引线数的解决方案。在特定实施例中，可使用附加旋转元件 (如，换向器) 来帮助移动且减轻或消除在连接引线上的扭转应力。各种其他协议和通信解决方案都是可能的。

[0072] 根据本公开的特定实施例，在被传递至图像传感器之前，输入电源是步降的且由低压差稳压器 (LDO) 所调节。在被传送到图像传感器之前，输入时钟信号 (162MHz) 被传输至时钟缓冲器并由该时钟缓冲器存储。然后，所接收到的时钟信号被用于内部地生成27MHz主时钟信号。传感器的图像数据输出是10-位数字化格式且在双引线串行LVDS协议上传输。然而，本公开，不是必须被限制于任何特定通信协议或电源提供机制的。

[0073] 图6示出根据本公开的实施例的显微镜系统的框图。显微镜600的电有源组件中的两个包括光激发源602和传感器阵列604。在特定实施例中，显微镜600从外部接口模块650处接收电源和控制信号。这允许各电路和组件 (如，电源、存储器和/或图像处理) 位于远离显微镜之处。接口模块650可被设计为用于单机组件或与另一个设备 (诸如计算机) 连接。

[0074] 在特定实施例中,接口模块650被配置为提供显微镜数据采集与控制,并且位于显微镜成像设备外部。在另一些实施例中,如,对于其中重量/大小不排除这样的集合的应用,接口模块650(带有或不带有输入/输出(I/O)接口616)可与显微镜设备600集合。

[0075] 根据本公开的一个实施例,接口模块650包括输入/输出(I/O)接口606(发送器/接收器/收发器电路)。这个I/O接口606可被用于提供电源、控制,并向显微镜600发送和接收图像数据。例如,可从一个或多个功率调节器610提供电源;可从控制接口614提供控制信号;驱动信号608用于给光激发源602供电;且图像数据可被通信至(图像)数据处理单元或电路612。因此,显微镜600还可被配置为具有一个或多个发射器/接收器/收发器电路来允许与接口模块650的通信。

[0076] 在本公开的一个实施例中,使用有线连接,I/O接口606连接至显微镜600。有线连接可使用任意数量的不同协议来传输功率和通信信号。特定应用(如,活性器官的活体成像)受益于有线连接,有线连接是轻、柔、或以其他形式顺应于成像对象的移动的。因此,特定实施例实现具有较少的钉(pin)/引线数量的通信协议和解决方案。

[0077] 根据本公开的其他实施例,I/O接口606被设计为使用无线通信。当并行成像充分接近彼此的数个移动成像对象时,显微镜成像设备的无线控制和无线数据传递可特别有用。在一个非限制性实例中,I/O接口606可使用磁场感应,诸如从ISO/IEC 14443导出的近场通信。通过互感耦合,近场通信还允许电源被无线地提供至显微镜。其他无线通信协议和解决方法也是可能的。

[0078] 根据各实施例,接口模块650被设计为具有与另一个设备(诸如膝上型/桌面型计算机)相接口的输入/输出(I/O)接口616,这个I/O接口616还可包括显示屏幕,用于呈现从显微镜600捕捉的图像。根据特定实施例,I/O接口616可被集成为接口模块650的一部分或者是独立组件(如,经由有线或无线通信链路连接)。

[0079] 此处讨论的I/O接口606和616的各示例并不是限制性的。根据现有的通信协议,I/O接口可被定制地设计或实现。

[0080] 在特定实施例中,可使用存储器618来存储图像数据和/或软件指令,用于由数据处理单元或电路612执行,数据处理单元或电路612可使用专用处理器(如,现场可编程门阵列)或被配置为执行专用软件指令的通用目的微处理器来实现。存储器618可包括提供非易失性存储器(如,闪存)和/或易失性存储器(如,易失性随机存取存储器(RAM))。

[0081] 使用包含在显微镜600内的两个印刷电路板(PCB)来实现本公开的特定实施例。第一PCB 602包括发光二极管(LED)。第二PCB 604包括互补金属氧化物半导体(CMOS)成像/摄像头芯片。这些PCB均经由九个薄且柔性的引线(2个引线至LED PCB 602且7个引线至摄像头PCB 604)连接至定制(custom)外部系统650,这九个引线被封在外径1.5mm的单个聚氯乙烯(PVC)外壳内。外部系统650经由通用目的USB成像数据采集适配器与计算机接口。对于进行实时显微镜控制和数据采集以及图像的立即显示,这个配置可特别有用。

[0082] 使用I2C控制器614来提供内部集成电路(I2C)串行通信接口。可使用I2C接口来控制作为PCB 604的一部分的(CMOS)成像/摄像头芯片的操作和功能。从成像/摄像头芯片输出的图像数据,根据数字低压差分摆动(LVDS)格式来串化并传输。

[0083] 根据此处讨论的各实施例,实验性荧光显微镜可被制造、组装、和测试。实际上可以分布和流水线方式来实现显微镜制造、组装、和测试过程。可分别制造摄像头和LED PCB,

同时独立地制造或获得透镜和滤波器。显微镜外壳可被制造为成套的独立部件来帮助其制造。

[0084] 使用或不使用成像光学元件,可测试摄像头PCB的功率、摄像头控制、和有效输出数据的存在。LED PCB的测试可包括驱动LED同时监测照明输出。一旦完全组装,显微镜外壳被设计为将光学部件维持与LED和摄像头PCB对准。显微镜外壳由黑色聚醚醚酮(PEEK)制成,PEEK是轻质量、化学抗蚀、坚硬、且可机器加工的。尽管黑色外壳吸收了大部分杂散光,可将薄层的黑色毡布或其他吸收材料固定(如,胶粘)在倾向于光反射的位置。在固定住摄像头PCB的外壳部分与显微镜本体之间的螺纹接口被配置为对于这两者之间的空间提供精细调节,从而设置在所获取的图像中焦点对准的样本平面。显微镜设计的模块化本质允许需要时移除和互换各部件(如,摄像头和LED PCB和滤波器以及双色镜组)。

[0085] 根据这个方法制造的实验性显微镜的各种特征被加以测试。表2示出被用于对活体老鼠的脑部进行活体成像且没有图像对准的实验性地被制造的微型荧光显微镜的各规格。

[0086] 表2

[0087]

尺寸	8.4X 13X 22mm ³
质量	2g
分辨率	2.5μm
视场	0.48mm ²
光子流	3X 10 ¹¹ ph/cm ² /s
SNR	37dB
成像持续时间	40-50mins

[0088] 基于显微镜的调制传递函数(MTF)的模拟的显微镜分辨率,被确定为2.3μm。如表2中显示,所测得的显微镜分辨率,经验性地被估算为约2.5μm。通过对西门子星(Siemens Star)分辨率测试图案进行成像,测得显微镜分辨率。

[0089] 为了测试实验性显微镜的分辨率能力,使用锐边、斜条来作为合成场景,并用虚拟显微镜成像。然后在斜条的数字图像的不同截面处导出平均边缘响应、或线扩展函数,且然后计算MTF。这些结果表明,由摄像头像素节距确定的奈奎斯特速率经发现是89周期/mm。这对应于样本平面中的2.2μm特征大小。MTF 10,即,在对比度衰减至理想对比度的10%处的分辨率,被图示为2.3μm。

[0090] 从上述讨论的本公开的实施例中,可能有数个变型。例如,显微镜可被配置为包括本地电源,诸如电池。在其他实例中,可配置显微镜阵列来捕捉目标对象的各图像。

[0091] 特定实施例涉及器官的活体成像。下文讨论的各实施例涉及,通过将集成的显微镜安装在头盖骨上,进行小脑蚓体的成像,来研究与运动同时发生的微循环、以及其他老鼠行为。虽然如此,本公开并不被如此限制,且可被应用于各种不同领域和应用。

[0092] 在涉及活体成像的特定实验性实施例中,对于表现出剧烈运动活动的老鼠被实施一次脑部成像,脑部成像时(在多次实验中)使用被固定在老鼠脑部的微型显微镜。当老鼠被麻醉时连接显微镜,且从麻醉药效过后约15-60分钟之后开始成像。使用头盖连接的显微镜,可对于多个行为捕捉老鼠行为的多个视频片段和蚓体内的相关联的微循环。例如,老鼠

在竞技场中漫步代表第一行为而老鼠在运动轮上骑行代表第二行为。在实验性实现中,使用集成的显微镜记录了微循环,该显微镜在FITC-右旋糖苷注入静脉后以100Hz捕捉图像。这个荧光染料标记了血浆,使得红血球在黑暗中可见。可观察到独立的红血球流过毛细血管。为了减少生理学中光子引起的改变的可能性,对于每一个成像过程,持续照明的持续时间和平均功率被限制为<5分钟且<600μW。在各成像过程之间允许至少过去2分钟,且试验过程的整个成像持续时间一般在45分钟左右。对于小脑脉管和微循环成像实验,帧采集速率约为100Hz,且对于钙成像研究,是30-46Hz。

[0093] 尽管此处讨论了若干种活体应用,本公开的设备和方法可被用于其它成像方案,诸如在放映过程中和其他应用过程中的形态学确定。

[0094] 根据一个实施例,使用此处讨论的集成显微镜有助于各器官显形的标识。高分辨率成像有助于上述行为,可使用高分辨率成像来标识有区别的特性。例如,显形可被标识为野生类型和具有带有Alexa-488髓鞘碱性蛋白的荧光免疫标签的erbb3变异斑马鱼。脊髓和后部侧脉神经可被成像并用于区别野生类型的鱼。在erbb3鱼中,Schwann细胞不能显现(develop)后部侧脉。

[0095] 根据另一个实施例,使用集成的显微镜有助于孔板中准确的细胞计数化验。例如,用羟基荧光素标记的活体MCF 7人类乳腺癌细胞的基本浓度($CO \approx 4.0 \times 10^5$ 细胞/mL)可被稀释,其中6种浓度中的每一浓度有8个样本。任选地,可使用自动化算法来对于图像中细胞的快速且有效的计数。

[0096] 根据一个实施例,该自动化算法使用定制细胞计数算法中的连续阶段的分析。诸如(计算机)处理器电路之类的逻辑电路(如,包括用于提供处理器指令的存储器电路/介质)执行对于用羟基荧光素标记的活体MCF 7人类乳腺癌细胞的(原始)荧光图像的对比均衡。接着,该处理器电路将所得图像转换为二进制格式,可对该二进制格式执行初始分段。然后标识并计数单个细胞。形态学过滤的迭代循环允许在初始分段后还留存的多个细胞簇分段为独立细胞。

[0097] 本公开的实施例涉及使用显微镜成像设备作为大型光学系统的一部分。例如,显微镜成像设备可被嵌入活体来帮助长期、慢性的成像。通过提供移动电源和控制/处理电路,可帮助此举。这些和其他元件可被集成到显微镜成像设备外壳内或在外部被连接(如,使用到位于对象其他部位的控制单元的有线连接)。在另一个实例中,可与专用光学设备一起使用显微镜成像设备,例如,来帮助活体内窥镜检查或在外科手术过程中监测对象。

[0098] 上文和附图中示出的所描述的各种实施例仅通过图示的方式提供,并且不应该被理解为限制本公开。基于上面的讨论和示例,本领域技术人员将容易地认识到,可以对本公开进行各种修改和改变,而不用严格地遵循这里示出的和描述的示例性的实施例和应用。例如,除了活体内成像外的其他应用可顺应于使用类似方法的实现。此外,可以各种方法实现上述示例性实施例和实现中的一个或多个,包括数字和/或模拟电路和/或基于软件的方法。结合本公开的各种示例性实施例来实现这些方法。这些修改和改变没有脱离在所附权利要求书中陈述的本公开的真实范围。

[0099] 如上所述,在以下描述和所引用的参考文献中,上述了相关本公开的特定应用和背景细节。附录中的实施例可结合上述实施例和实现中的一个或多个、以及附图和下文所述的那些,一起被实现。可参看在以下临时申请中提交的附录,该临时申请通过参考全部并

入此。

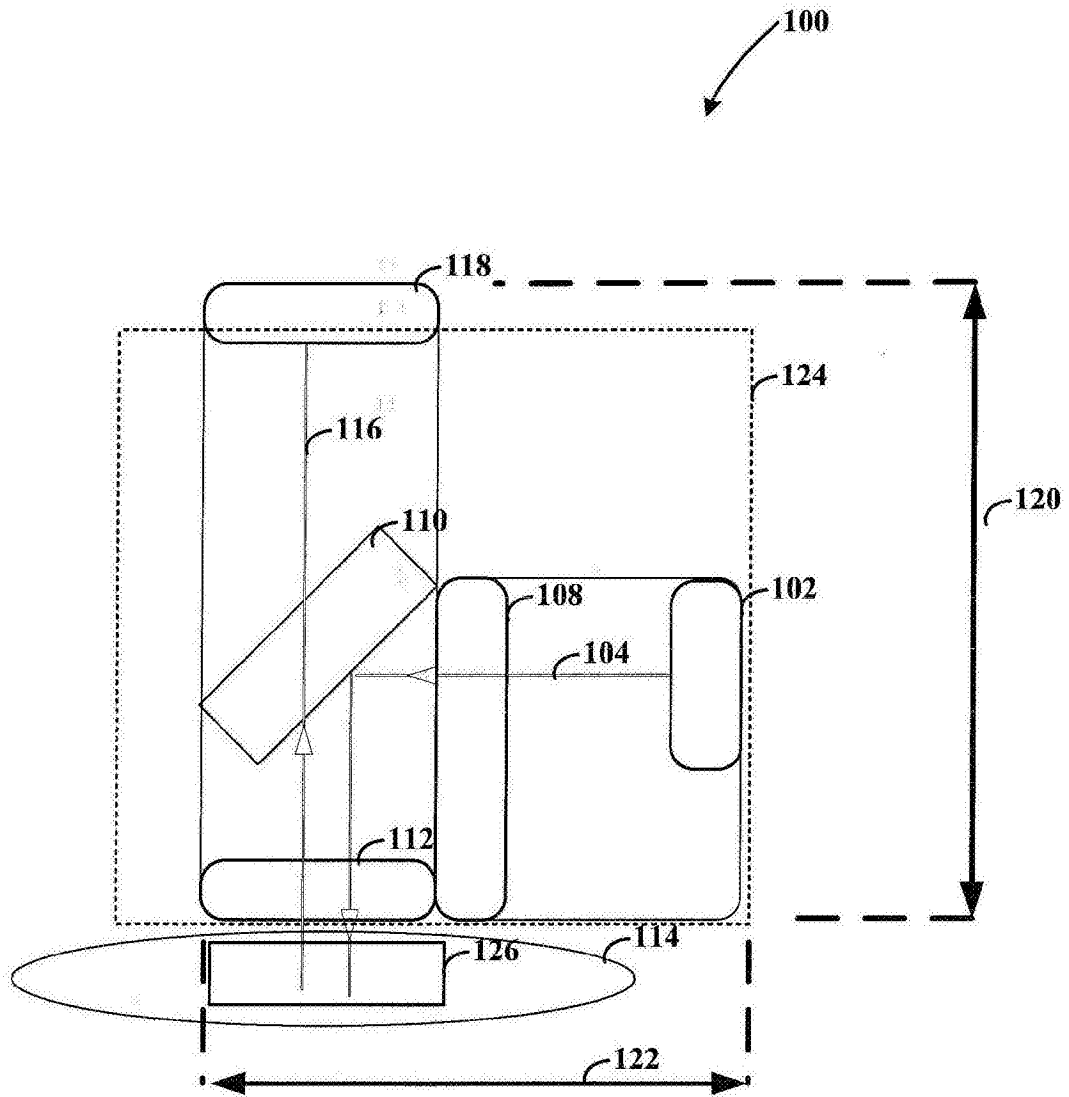


图1

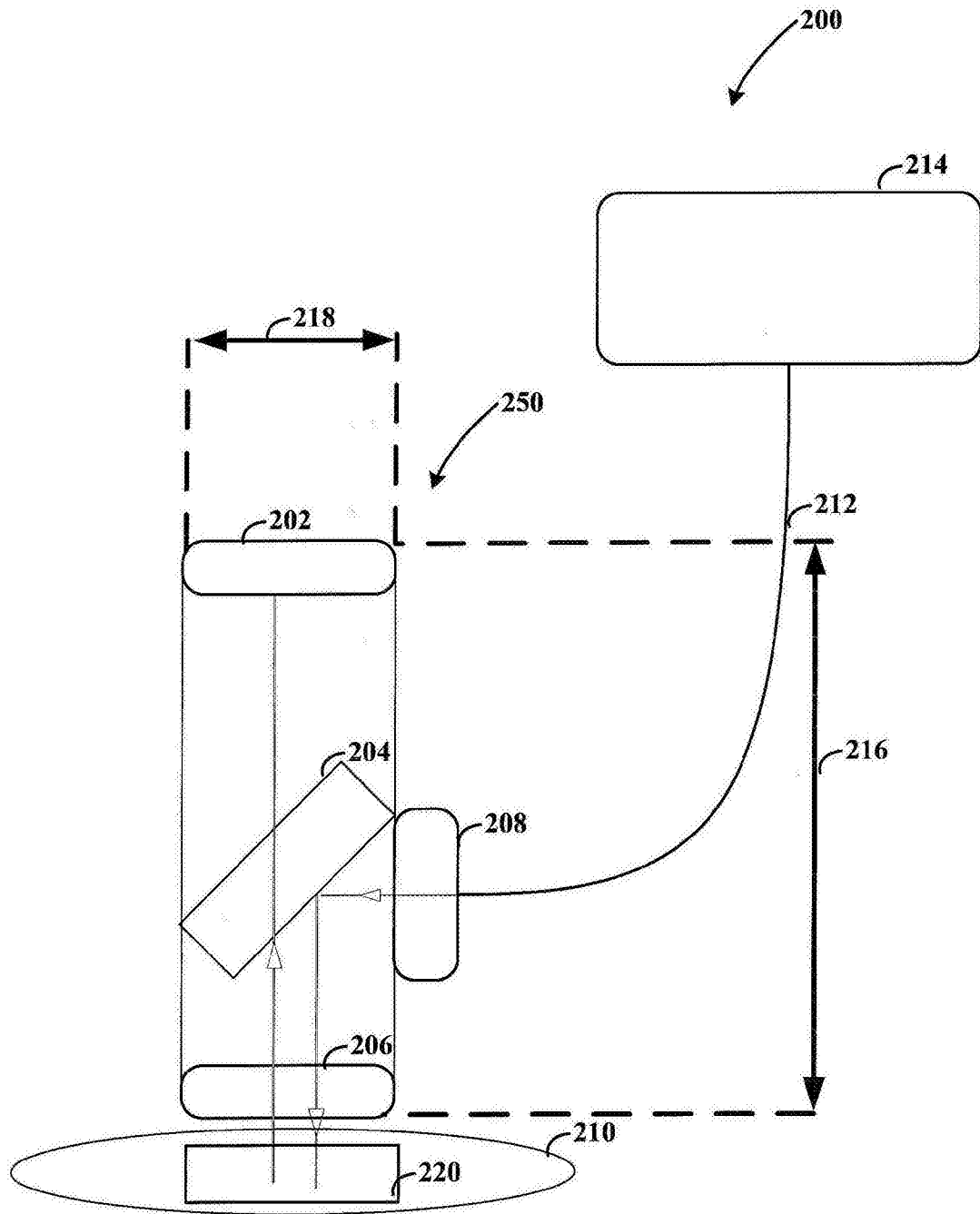


图2

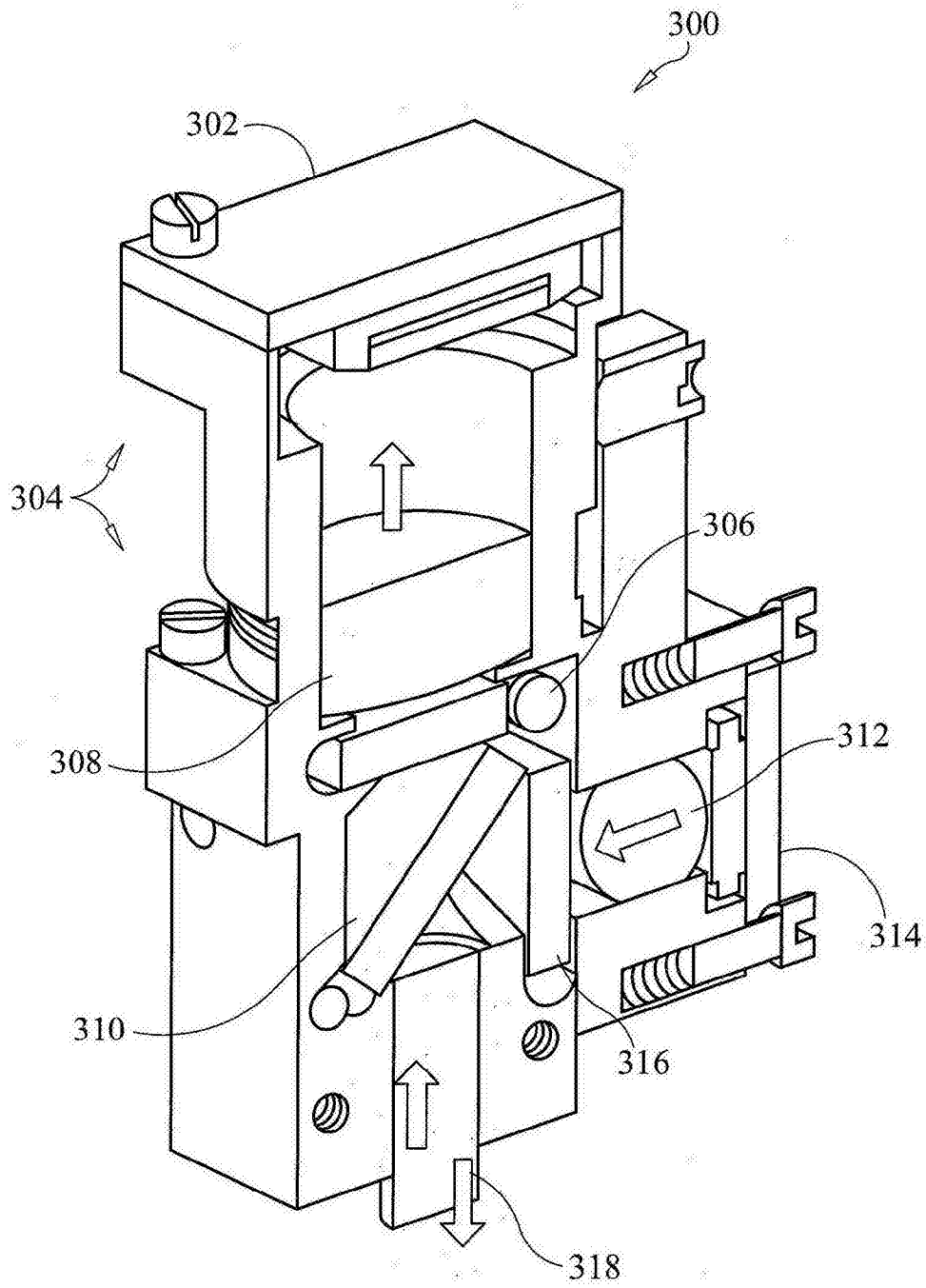


图3

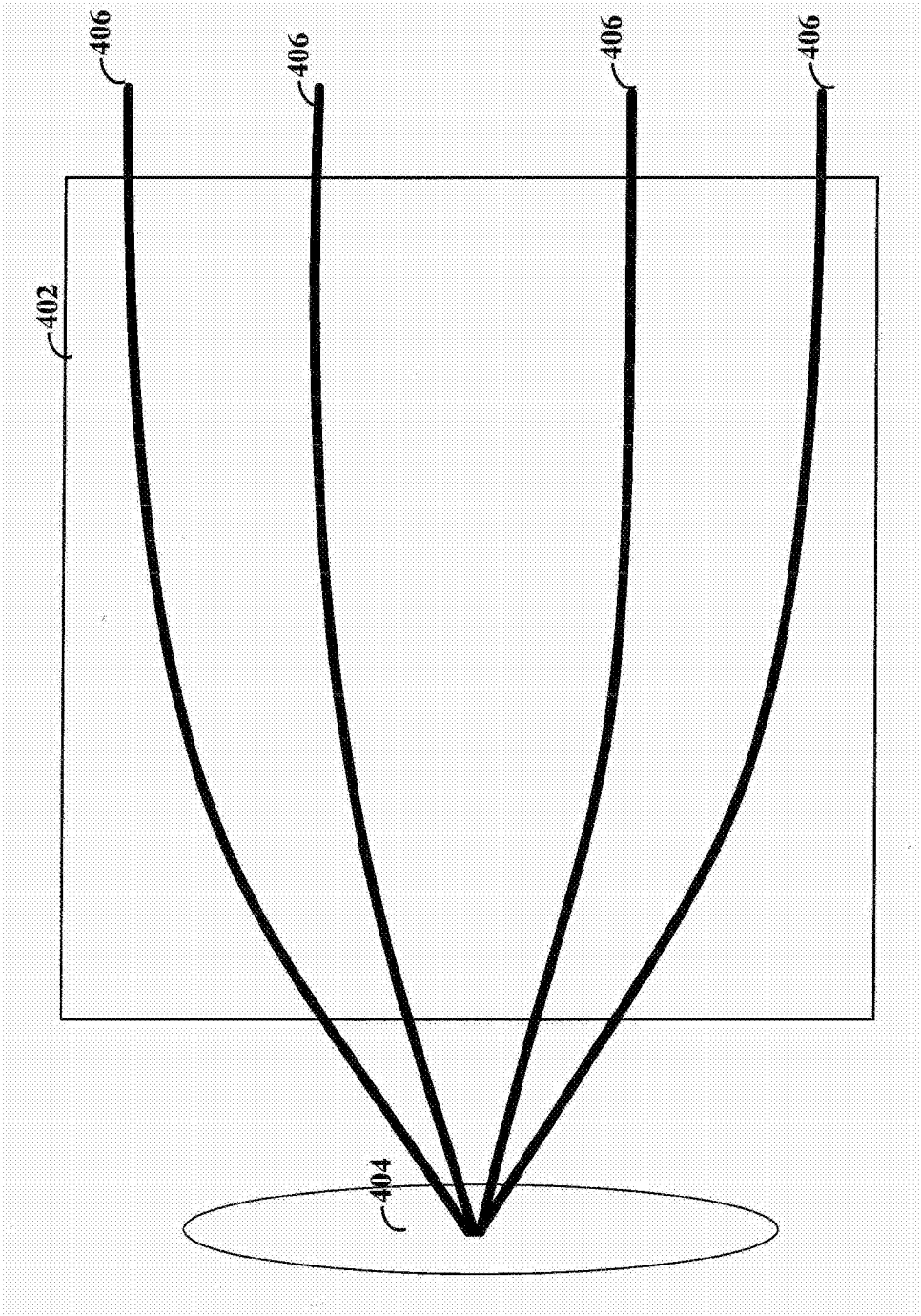


图4

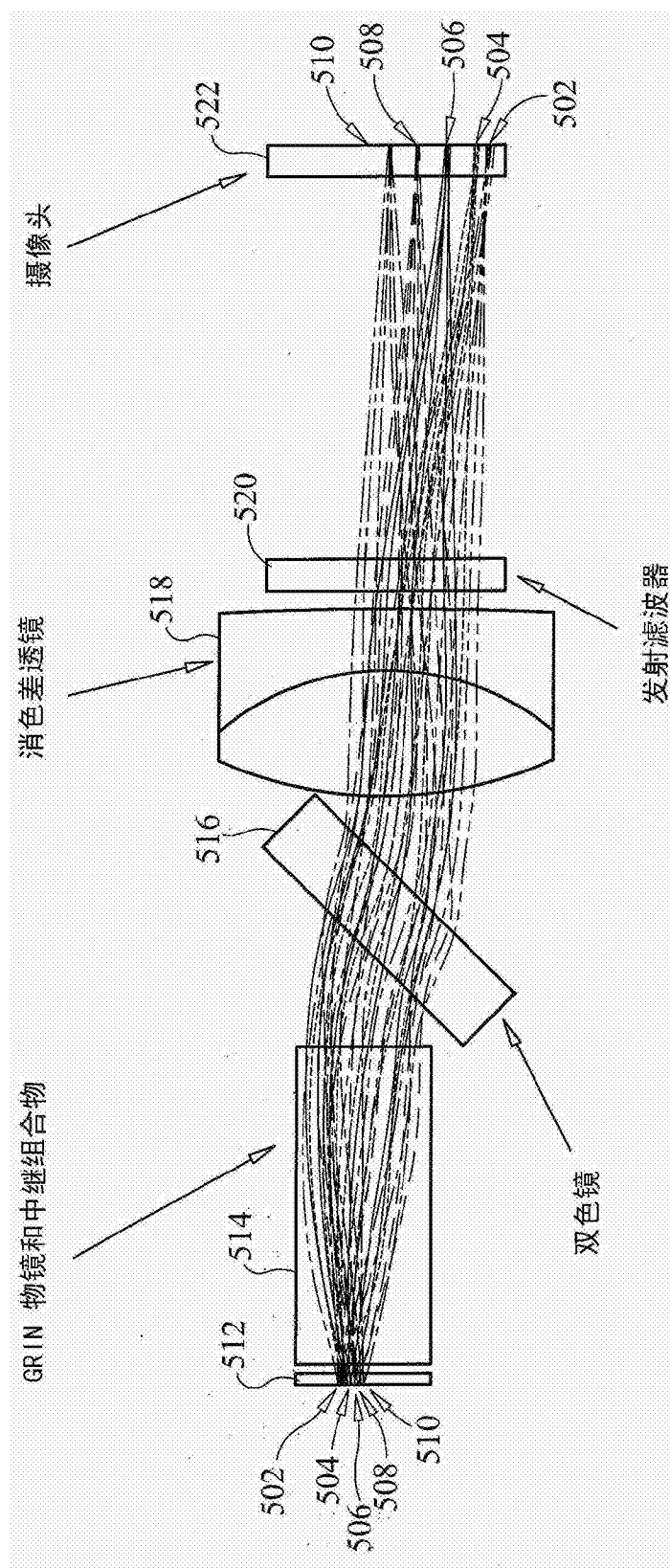


图5

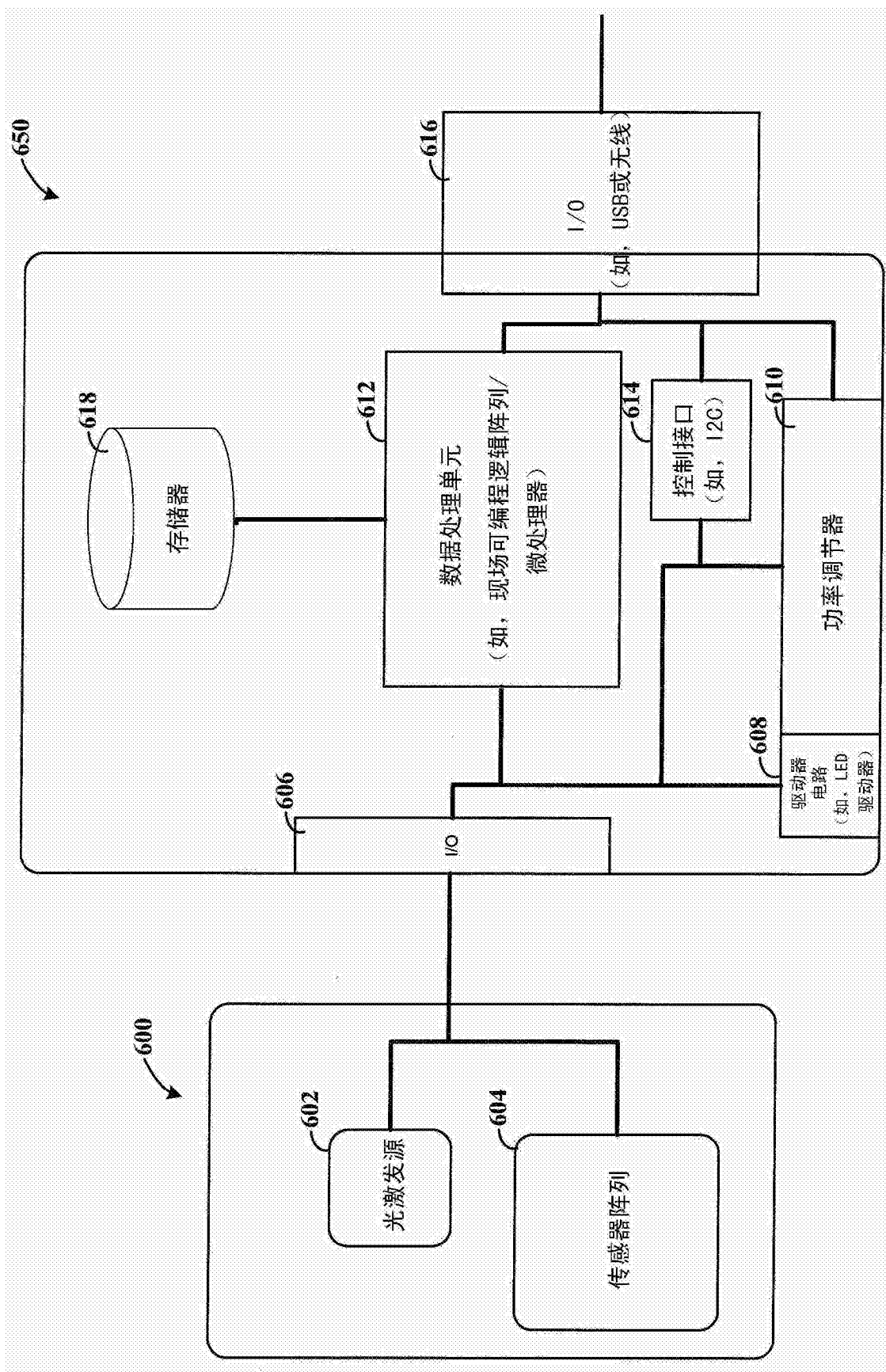


图6