

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 009 441**

51 Int. Cl.:

G02B 27/58 (2006.01)

G02B 27/09 (2006.01)

G02B 21/24 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G02B 21/00 (2006.01)

G02B 27/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.04.2018 PCT/GB2018/050917**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.10.2018 WO18185489**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2018 E 18717675 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2024 EP 3607390**

54 Título: **Componente óptico para generar un patrón de luz periódico**

30 Prioridad:

07.04.2017 GB 201705660

07.04.2017 NO 20170592

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

26.03.2025

73 Titular/es:

UNIVERSITETET I TROMSØ - NORGES

ARKTISKE UNIVERSITET (100.00%)

Hansine Hansens veg 18

9019 Tromsø, NO

72 Inventor/es:

AHLUWALIA, BALPREET SINGH;

HUSER, THOMAS R. y

HELLESØ, OLAV GAUTE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 3 009 441 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

Componente óptico para generar un patrón de luz periódico

5 Campo

La presente invención se refiere a componentes ópticos, sistemas y métodos para iluminar una muestra con un patrón de luz periódico. Más concretamente, pero no exclusivamente, se refiere a componentes ópticos, sistemas y métodos para la obtención de imágenes de una muestra mediante microscopía de iluminación estructurada (SIM).

10

Antecedentes

Los microscopios ópticos se utilizan dentro de la histología, la biología celular y campos relacionados para ver muestras biológicas tales como células. Sin embargo, el poder de resolución de los microscopios ópticos es limitado debido al límite de difracción de la luz. Esta limitación restringe la resolución de la microscopía de luz visible a unos 200 a 300 nm. Para superar este límite, se han desarrollado varias técnicas denominadas "nanoscopia", "imágenes de superresolución" o "microscopía de superresolución".

15

Estas técnicas de obtención de imágenes de superresolución permiten obtener imágenes de una muestra biológica con una resolución más fina que 200 nm, y posiblemente hasta alrededor de 20 a 50 nm. Suelen procesar la luz emitida por marcadores, como fluoróforos fotoconmutables o puntos cuánticos, adheridos a la muestra biológica o incrustados en ella. Ejemplos conocidos de tales técnicas de superresolución incluyen técnicas de conjunto como la microscopía de iluminación estructurada (SIM) y la microscopía de agotamiento por emisión estimulada (STED), y técnicas de localización de molécula única como la microscopía de localización fotoactivada (PALM) y la microscopía de reconstrucción óptica estocástica (STORM).

20

25

Las técnicas de localización de moléculas individuales suelen proporcionar una mejor resolución (por ejemplo, 20-50 nm), pero suelen ser más lentas que las técnicas de conjunto y, por lo tanto, no suelen ser adecuadas para obtener imágenes de muestras de células vivas.

30

En general, la STED tiene una resolución óptica práctica de unos 30 nm. Sin embargo, al tratarse de una técnica basada en el escaneado (por ejemplo, una técnica basada en el escaneado de trama), también adolece de velocidades de obtención de imágenes lentas (en torno a 0,1 Hz para un campo de visión amplio) que no son adecuadas para la obtención de imágenes de células vivas. Este problema se agrava cuando se necesita un amplio campo de visión (es decir, cuando hay que escanear una gran superficie de muestra). Además, las técnicas STED suelen requerir una iluminación de alta potencia para excitar los marcadores emisores de luz (por ejemplo, los fluoróforos), lo que resulta problemático porque puede provocar efectos de fotoblanqueamiento y fototoxicidad.

35

En las técnicas basadas en SIM, la muestra se ilumina con diferentes patrones de luz periódicos. Típicamente, el patrón de luz periódico es un patrón de luz rayada periódica que se genera utilizando rejillas de difracción. Durante el procesamiento de imágenes, las franjas del patrón de luz periódico se desplazan normalmente con respecto a la muestra y también se rotan con respecto a la muestra, a lo largo de una secuencia de fotogramas, con el fin de generar e iluminar la muestra con una pluralidad de patrones de luz periódica diferentes. A continuación, puede construirse una imagen de superresolución de la muestra basada en el análisis de Fourier de los diferentes patrones de emisión de los marcadores emisores de luz que resultan de los diferentes patrones de iluminación. Estos patrones de emisión revelan información sobre la estructura de la muestra más allá del límite de resolución del sistema de imagen, debido al efecto Moiré causado por los patrones de iluminación periódicos.

40

45

Los montajes SIM convencionales suelen tener una resolución óptica de alrededor de 100-130 nm y adquieren imágenes más rápidamente que los montajes STED y de localización de molécula única (por ejemplo, las velocidades de obtención de imágenes SIM de alrededor de 0,1-1 Hz son típicas para un campo de visión amplio). Además, a diferencia de los sistemas basados en el escaneado, los sistemas convencionales basados en SIM pueden capturar una imagen de campo amplio (por ejemplo, 50-100 μm^2 o más) de la muestra en una sola toma. Sin embargo, la mejora en la velocidad de obtención de imágenes proporcionada por los montajes convencionales basados en SIM (aunque con menor resolución que STED) no se considera en general lo suficientemente rápida para muchos experimentos prácticos con células vivas.

50

55

Para aumentar la velocidad de formación de imágenes de los montajes SIM es posible reducir el campo de visión sobre el que se toma una imagen. Utilizando este enfoque, se han descrito configuraciones basadas en SIM que toman imágenes a velocidades de 11 Hz en un campo de visión de 8 $\mu\text{m} \times 8 \mu\text{m}$. Sin embargo, la reducción del campo de visión a menudo no es deseable porque, si se requiere una vista de campo amplio, la muestra y el aparato de formación de imágenes deben reposicionarse y realinearse entre sí para obtener una imagen compuesta de toda la muestra. Esto es especialmente problemático cuando se obtienen imágenes de muestras de células vivas.

60

Algunos montajes de formación de imágenes de luz estructurada utilizan disposiciones opto-mecánicas tales como lentes móviles, etapas, rejillas móviles o espejos para desplazar y/o rotar los patrones de luz periódicos. Uno de los

65

problemas de estos sistemas es que la velocidad de imagen está limitada por la velocidad a la que se mueven estos componentes.

5 Por ejemplo, el documento US 6.255.642 B1 (Instituto Tecnológico de Massachusetts) describe un sistema que implica un espejo móvil que se utiliza para desplazar franjas con respecto a una muestra.

10 En general, la resolución óptica de los montajes de tipo SIM está limitada por el espaciado entre franjas en el patrón de luz periódico (por ejemplo, el espaciado entre las franjas en un patrón de iluminación rayado). Sin embargo, otros factores pueden limitar aún más la resolución. Por ejemplo, en las configuraciones SIM convencionales, en las que el patrón de iluminación se forma con una lente objetivo de formación de imágenes, la resolución óptica puede verse limitada aún más por el límite de difracción de la lente objetivo. El límite de difracción de una lente objetivo viene dado por $\lambda_0 / (2 * N.A.)$ donde λ_0 es la longitud de onda, y N.A. es la apertura numérica de la lente objetivo. El factor de mejora de resolución de la SIM es el doble para una lente objetivo dada, es decir, $\lambda_0 / (4 * N.A.)$, que suele ser de 100-130 nm para longitudes de onda visibles (500-650 nm). En muchas aplicaciones (por ejemplo, en aplicaciones de imagen de células vivas) es deseable aumentar la resolución óptica de los montajes SIM.

15 La presente invención pretende abordar al menos algunas de estas deficiencias en los enfoques conocidos para generar patrones de luz periódicos adecuados para microscopía de superresolución.

20 Sumario

De un primer aspecto, la invención proporciona un componente óptico según la reivindicación 1.

25 De un segundo aspecto, la invención proporciona un método para iluminar una región de muestra de un componente óptico según la reivindicación 12.

30 De acuerdo con la presente invención, será visto por los expertos en la materia que un único componente óptico (por ejemplo, un chip óptico) puede dirigir tres haces de luz separados, simultáneamente o en diferentes momentos, en la región de la muestra a lo largo de diferentes direcciones para formar varios patrones de interferencia de dos y tres haces en la región de la muestra.

35 Se apreciará que dirigir al menos dos haces de luz directa u oblicuamente el uno hacia el otro dentro de la región de la muestra hará que los haces interfieran. Esta interferencia generará un patrón de luz periódico (es decir, un patrón de interferencia periódica) adecuado para iluminar una muestra dentro de la región de la muestra. Iluminar una muestra con un patrón de luz periódico es útil en aplicaciones como la microscopía de súper resolución (por ejemplo, imágenes SIM) donde, por ejemplo, el patrón de iluminación excita la fluorescencia en la muestra. En algunas realizaciones, el patrón de luz emitida (es decir, el patrón de fluorescencia) de la muestra puede visualizarse y analizarse utilizando métodos de procesamiento SIM conocidos.

40 Al evitar la necesidad de múltiples componentes opto-mecánicos separados para generar y dirigir haces de luz a lo largo de diferentes direcciones dentro de la región de la muestra, con el fin de interferir dentro de la región de la muestra, este único componente óptico evita gran parte de la complejidad de alineación implicada en los montajes de formación de imágenes SIM tradicionales. Además, al reducir o eliminar el uso de dichos componentes, el componente óptico puede facilitar una configuración mucho más pequeña, más barata y menos compleja para la obtención de imágenes SIM.

45 El (primer) divisor óptico permite formar al menos dos haces de luz (por ejemplo, dicha primera luz de entrada y la segunda luz de entrada) para generar un patrón de luz periódico a partir de un haz de luz de entrada (por ejemplo, dicha luz de entrada). De este modo, es posible mantener con precisión cualquier diferencia en la longitud de la trayectoria entre las dos salidas del divisor óptico y la región de la muestra, ya que no depende de la alineación precisa de componentes externos.

50 En algunas realizaciones, este único haz de luz de entrada puede recibirse en una única cara del componente óptico, con lo que resulta relativamente fácil incorporar el componente óptico en un sistema de formación de imágenes completo. La tercera luz de entrada también puede recibirse en la misma cara del componente óptico.

55 Así, se apreciará que el componente óptico único puede recibir menos de tres haces de luz de entrada para generar un patrón de interferencia de tres haces porque el divisor de guía de onda divide ventajosamente la luz de entrada para generar al menos dos haces que interfieren. Por ejemplo, el divisor de guía de onda puede estar dispuesto para recibir luz de entrada en su entrada y generar la primera, segunda y tercera luz de entrada. En este caso, la tercera luz de entrada puede dirigirse a la guía de onda adicional desde una tercera salida del divisor óptico. Esto permite generar un patrón de interferencia de tres haces dentro de la región de la muestra a partir de un único haz de luz de entrada, recibido a la entrada del divisor óptico, reduciendo aún más la necesidad de una alineación cuidadosa de múltiples elementos ópticos discretos.

65 Opcionalmente, el componente óptico puede comprender una guía de onda adicional. Por comodidad, esta guía de

onda adicional se denominará en lo sucesivo "segunda guía de onda". La segunda salida del divisor puede estar dispuesta para dirigir la segunda luz de entrada a la región de la muestra a través de la segunda guía de onda. La segunda guía de onda puede estar dispuesta para utilizar la reflexión interna total para dirigir la segunda luz de entrada a la región de la muestra a lo largo de la segunda trayectoria en la segunda dirección. También por conveniencia, la mencionada "guía de onda adicional" se denominará en el presente documento "tercera guía de onda", aunque se apreciará que no hay "segunda guía de onda" en algunas realizaciones, por ejemplo, si la segunda salida del divisor óptico se acopla directamente a la región de la muestra.

Si la luz se dirige en la primera, segunda y tercera direcciones simultáneamente, el patrón de interferencia periódica resultante dentro de la región de la muestra será el resultado de la interferencia del primer, el segundo y el tercer haz de luz. La generación de un patrón de interferencia periódica con al menos tres haces de esta manera puede producir un patrón que tiene más franjas que un patrón de interferencia de dos haces. Aumentar el número de franjas puede ser útil para mejorar la calidad de la imagen SIM en determinadas condiciones de imagen, como cuando se utilizan técnicas SIM de moteado. Las posiciones de las franjas pueden determinarse en parte por el desplazamiento angular entre pares de haces vecinos. Cambiar las posiciones de las franjas puede ser útil para ajustar la calidad de la imagen SIM. Notablemente, el patrón de franja formado por la guía de onda puede hacerse más pequeño que la franja generada por el lente objetivo típicamente usado en SIM convencional y en SIM de moteado convencional, fabricando las guías de onda de un material de alto índice de refracción - por ejemplo, un material que da un índice de refracción efectivo de 2 o más.

La primera, segunda y tercera direcciones son coplanarias (cuando se consideran como vectores sin posición). La primera, segunda y tercera trayectorias asociadas (con posiciones y direcciones) se sitúan preferentemente en un plano común.

La tercera guía de onda puede estar dispuesta opcionalmente para recibir la tercera luz de entrada desde una tercera salida del divisor óptico. De este modo, el componente óptico puede generar un patrón de interferencia de tres haces con un solo haz de luz de entrada. Las realizaciones de la presente invención pueden permitir que se generen patrones de luz de iluminación más complejos que los que pueden conseguirse utilizando ópticas de campo lejano convencionales.

En algunas realizaciones, el componente óptico comprende una cuarta guía de onda dispuesta para recibir la cuarta luz de entrada y utilizar la reflexión interna total para dirigir la cuarta luz de entrada a la región de muestra a lo largo de una cuarta trayectoria en una cuarta dirección que es diferente de la primera, la segunda y la tercera direcciones.

En este caso, los expertos en la materia verán que un único componente óptico (por ejemplo, un chip óptico) forma cuatro haces de luz separados y los dirige a la región de la muestra a lo largo de diferentes direcciones, aunque no necesariamente todos al mismo tiempo. En particular, pueden formarse dos pares diferentes de haces de luz y dirigirse a la región de la muestra a lo largo de direcciones diferentes. Por ejemplo, la primera luz de entrada procedente de la primera guía de onda y la segunda luz de entrada procedente de la segunda salida del divisor óptico pueden dirigirse a la región de la muestra para formar un primer par de haces de luz interferentes. La tercera luz de entrada procedente de la guía de onda adicional y la cuarta luz de entrada procedente de la cuarta guía de onda pueden dirigirse a la región de la muestra para formar un segundo par de haces interferentes. De este modo, pueden activarse diferentes pares de haces interferentes en diferentes momentos mediante la recepción selectiva de luz de entrada en el divisor óptico o la recepción de la tercera y cuarta luz de entrada en la ulterior y cuarta guías de onda, respectivamente. Esto facilita la generación de al menos dos patrones de interferencia distintos en diferentes orientaciones relativas a la región de la muestra, adecuados para el procesamiento de imágenes SIM. Por supuesto, también puede generarse un patrón de interferencia de cuatro haces en la región de la muestra recibiendo luz de entrada en el divisor óptico y recibiendo tercera y cuarta luz de entrada en la ulterior y cuarta guías de onda, respectivamente.

Los métodos que realizan la invención pueden por tanto comprender además las etapas de:

- recibir la cuarta luz de entrada en una cuarta guía de onda del componente óptico;
- utilizar la reflexión interna total dentro de la cuarta guía de onda para dirigir la cuarta luz de entrada a la región de la muestra a lo largo de una cuarta trayectoria en una cuarta dirección, en la que la cuarta dirección es diferente de la primera, la segunda y la tercera direcciones;
- interferir la primera luz de entrada con la segunda luz de entrada para formar un primer patrón de luz periódico en la región de la muestra; e
- interferir la tercera luz de entrada con la cuarta luz de entrada para formar un segundo patrón de luz periódico en la región de la muestra.

Opcionalmente, la tercera guía de onda puede recibir una tercera luz de entrada desde una tercera salida del divisor óptico. La cuarta guía de onda puede recibir una cuarta luz de entrada procedente de una cuarta salida del divisor óptico. Alternativamente, el componente óptico puede comprender un segundo divisor óptico y la tercera guía de onda puede estar dispuesta para recibir la tercera luz de entrada desde una salida del segundo divisor óptico. La cuarta guía de onda puede recibir una cuarta luz de entrada procedente de una salida diferente del segundo divisor óptico.

Se apreciará que el primer par de haces de luz que interfieren puede formar un primer patrón de luz periódico dentro de una región de muestra. El segundo par de haces de luz interferentes puede formar un segundo patrón de luz periódico dentro de la región de la muestra. El segundo patrón de luz periódico se orienta preferentemente de forma diferente con respecto a la región de la muestra que el primer patrón de luz periódico. El primer y segundo patrones de luz periódicos pueden formar franjas lineales. Las franjas lineales del primer patrón de luz periódico pueden extenderse perpendicularmente a un eje de la región de muestra, y las franjas lineales del segundo patrón de luz periódico pueden extenderse perpendicularmente a un eje diferente de la región de muestra.

En uso, la luz puede dirigirse al divisor óptico para dirigir la luz a la región de muestra en la primera dirección y en la segunda dirección al mismo tiempo, para formar un primer patrón de luz periódico en la región de muestra. Adicional o alternativamente, la luz puede dirigirse a la región de la muestra en la tercera dirección al mismo tiempo que la luz se dirige a la región de la muestra en la cuarta dirección, con el fin de formar un segundo patrón de luz periódico en la región de la muestra. Alternativa o adicionalmente, la luz puede dirigirse a la región de la muestra en la tercera dirección al mismo tiempo que la luz se dirige a la región de la muestra en la primera y la segunda direcciones, con el fin de formar un tercer patrón de luz periódico en la región de la muestra. Alternativa o adicionalmente, la luz puede dirigirse a la región de la muestra en la cuarta dirección al mismo tiempo que la luz se dirige a la región de la muestra en la primera y la segunda direcciones, a fin de formar un cuarto patrón de luz periódico en la región de la muestra. Alternativa o adicionalmente, la luz puede dirigirse a la región de la muestra en la tercera y cuarta direcciones al mismo tiempo que la luz se dirige a la región de la muestra en la primera y segunda direcciones, para formar un quinto patrón periódico de luz en la región de la muestra. En este último caso, se genera un patrón de interferencia de cuatro haces.

El componente óptico comprende preferentemente una capa de guiado óptico (es decir, una capa de núcleo). El componente óptico está dispuesto preferentemente para apantallar parte o toda la luz de entrada de la atmósfera, dirigiendo parte o toda la luz en la capa de guía óptica. Preferentemente, esta capa de guiado óptico no es aire (aunque, por supuesto, puede estar adyacente o rodeada de aire); preferentemente es sólida. De este modo, el componente óptico puede minimizar o evitar las fluctuaciones en el patrón de interferencia causadas por fluctuaciones aleatorias en la atmósfera -por ejemplo, debidas a fluctuaciones en el flujo de aire y en la composición del aire- que, de otro modo, podrían dar lugar a desplazamientos de fase aleatorios entre los haces interferentes y, por tanto, a una inestabilidad no deseada en el patrón de interferencia.

Además, se apreciará que, debido a que los haces interferentes formados por el divisor de guía de onda se derivan de la misma luz de entrada, cualquier fluctuación temporal experimentada por la luz de entrada antes de entrar en el divisor de guía de onda -cualquiera que sea la causa- puede esperarse que afecte a cada uno de los haces interferentes de la misma manera. De este modo, las fluctuaciones no deberían provocar un desplazamiento de fase relativo entre los haces interferentes. Por lo tanto, un patrón de interferencia generado por las realizaciones de la invención puede ser más estable que los patrones formados con técnicas SIM alternativas que utilizan campos de luz que se propagan, por ejemplo, en el espacio libre.

En un conjunto preferido de realizaciones, el componente óptico se utiliza en un sistema que comprende una unidad de formación de imágenes que utiliza una lente objetivo para recoger la luz emitida por una muestra en la región de muestra. El objetivo puede formar parte de la unidad de imagen o ser un componente independiente. Las técnicas SIM convencionales utilizan el mismo objetivo para dirigir la luz a la región de la muestra, para generar un patrón de interferencia y también para obtener imágenes de una muestra. Las realizaciones de la presente invención, sin embargo, utilizan el componente óptico para dirigir la luz sobre la muestra, independientemente de la lente de imagen. De este modo, la lente del objetivo de la unidad de formación de imágenes puede optimizarse únicamente para recoger la luz de la muestra. En particular, puede utilizarse una lente de menor apertura numérica en comparación con las técnicas anteriores, ya que no es necesario que la lente enfoque la luz de iluminación muy finamente, por lo que puede proporcionar ventajosamente un campo de visión más amplio para obtener imágenes más extensas de una muestra, sin pérdida de resolución óptica. Cuando la región de la muestra es adyacente a una cara del componente óptico, la unidad de formación de imágenes puede recoger la luz directamente de la región de la muestra -por ejemplo, la lente del objetivo puede estar situada en el mismo lado del componente óptico que la región de la muestra- o la unidad de formación de imágenes puede recoger la luz que pasa a través del componente óptico desde la región de la muestra -por ejemplo, con la lente del objetivo situada en un lado opuesto del componente óptico que la región de la muestra-

Preferentemente, el componente óptico es un componente fotónico integrado. Es decir, por ejemplo, el componente óptico puede ser un circuito integrado fotónico (PIC) o un circuito óptico integrado. En general, un PIC comprenderá al menos dos secciones, con al menos una guía de onda (por ejemplo, una guía de onda unidimensional o bidimensional) entre ellas.

El componente óptico es preferentemente un componente monolítico. Es preferible que no contenga piezas móviles independientes. Los elementos (por ejemplo, divisor(es) óptico(s), guía(s) de ondas y región(es) de muestra) del componente óptico están preferentemente unidos entre sí, directa o indirectamente. Pueden cultivarse o depositarse en un sustrato común. Los elementos del componente óptico pueden comprender uno o más de material semiconductor y material dieléctrico (por ejemplo, dióxido de silicio). El material semiconductor y/o el material dieléctrico pueden crecer sobre un sustrato (por ejemplo, vidrio, silicio o un sustrato de material del grupo III-IV). Por

ejemplo, el material semiconductor y/o el material dieléctrico pueden cultivarse mediante un proceso epitaxial (por ejemplo, epitaxia de haces moleculares) o un proceso de deposición (por ejemplo, un proceso de pulverización catódica o de deposición química de vapor). Los elementos del componente óptico pueden estar integrados monolíticamente en un sustrato del componente óptico, que puede ser un sustrato plano. La integración de los elementos garantiza además que la luz de entrada recibida por el componente óptico esté protegida de los efectos de un entorno fluctuante (por ejemplo, fluctuaciones de temperatura). Por lo tanto, se apreciará que los componentes ópticos aquí divulgados funcionan para dirigir y apantallar simultáneamente la luz con el fin de reducir las fluctuaciones de fase en los haces de luz interferentes. De este modo, no se necesitan componentes opto-mecánicos separados para (i) guiar la luz, y (ii) proteger la luz de los cambios de temperatura, humedad y/o flujo de aire. Ventajosamente, por lo tanto, los componentes ópticos divulgados aquí pueden hacerse más pequeños y más baratos que los arreglos de la técnica anterior.

Un sustrato del componente óptico puede ser, o comprender, silicio o vidrio. Preferentemente, el sustrato tiene un grosor máximo o medio (por ejemplo, la media) de menos de 200 micrómetros, como 160-170 micrómetros. En algunas realizaciones, el sustrato puede ser transparente, para permitir que la luz se recoja de la región de la muestra a través del sustrato.

En algunas realizaciones, la primera dirección puede ser paralela y opuesta a la segunda dirección. En consecuencia, la primera y la segunda luz de entrada dentro de la región de la muestra pueden ser haces de propagación contraria. El patrón de interferencia periódica generado por la interferencia de dos haces que se propagan en sentido contrario suele ser sustancialmente rayado.

En algunas otras realizaciones, la segunda dirección puede estar angularmente desplazada con respecto a la primera dirección en un ángulo de menos de 180 grados. Opcionalmente, el desplazamiento angular puede ser inferior a 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 o 160 grados.

En general, el patrón de luz periódico generado por realizaciones de la invención puede tener cualquier forma. No se limita a ningún periodo espacial concreto ni a ningún número concreto de repeticiones periódicas (tres instancias de un elemento común sería normalmente un mínimo para establecer que un patrón tiene una estructura periódica, pero puede haber millones de repeticiones o más). El patrón puede ser simple (por ejemplo, rayas rectas) o más complejo (por ejemplo, un patrón de manchas con una estructura regular). El patrón puede ser periódico en una sola dimensión, o en dos o tres dimensiones. El periodo en cada dimensión puede diferir. Se apreciará que el periodo en cualquier dimensión puede variar sobre el patrón -por ejemplo, aumentando lentamente con la distancia, alejándose de una región central- sin que esto impida que el patrón se considere periódico.

Típicamente, el periodo de franja será igual a $\lambda_0 / 2 \cdot n_{\text{efectivo}} \cdot \sin \theta$, donde λ_0 es la longitud de onda de la luz dirigida en las primera y segunda direcciones, n_{efectivo} es el índice de refracción efectivo del modo guiado, y θ es el ángulo de desfase entre la primera y segunda direcciones. Esta fórmula permite generar un periodo de franja deseado, eligiendo adecuadamente la longitud de onda y el ángulo de desfase. Si los ángulos de desplazamiento entre pares de direcciones no son iguales, pueden generarse patrones de franjas con periodos diferentes, incluso para la misma longitud de onda de luz de entrada (aunque con orientaciones diferentes). La posibilidad de cambiar fácilmente el periodo de franja puede ser útil en determinadas aplicaciones de formación de imágenes, por ejemplo, cuando se utilizan lentes de objetivo de menor aumento y menor apertura numérica (para permitir un amplio campo de visión), en las que podría ser necesario cambiar el periodo de franja del patrón de iluminación para llenar el espacio de Fourier.

Como se ha mencionado anteriormente, en algunas realizaciones, el componente óptico puede comprender una cuarta guía de onda dispuesta para recibir la cuarta luz de entrada y utilizar la reflexión interna total para dirigir la cuarta luz de entrada a la región de muestra, como un cuarto haz de luz, a lo largo de una cuarta trayectoria en una cuarta dirección que es diferente de la primera, la segunda y la tercera direcciones.

En algunas realizaciones, la primera, la segunda, la tercera y la cuarta direcciones son coplanarias (cuando se consideran como vectores sin posición). La primera y la segunda trayectorias pueden estar situadas a lo largo de un primer eje que atraviesa la región de la muestra, pero en direcciones opuestas. La tercera y cuarta direcciones pueden estar situadas a lo largo de un segundo eje que atraviesa la región de la muestra, pero en direcciones opuestas. El segundo eje puede estar desplazado angularmente con respecto al primero. El desplazamiento angular entre el primer eje y el segundo eje puede ser igual a 90 grados, pero los ejes están preferentemente desplazados con un ángulo agudo inferior a 90 grados, y puede ser inferior a 10, 20, 30, 40, 45, 50, 60, 70 u 80 grados.

En otras realizaciones, la tercera dirección puede estar angularmente desplazada con respecto a la primera dirección en un ángulo de menos de 180 grados. El desplazamiento angular puede ser inferior a 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 o 160 grados. La cuarta dirección puede estar angularmente desplazada con respecto a la tercera dirección en un ángulo inferior a 180 grados. El desplazamiento angular puede ser inferior a 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 o 160 grados.

La cuarta guía de onda puede estar dispuesta para recibir la cuarta luz de entrada desde una cuarta salida del divisor óptico. De este modo, el componente óptico puede generar un patrón de interferencia de cuatro haces con un solo haz de luz de entrada.

- 5 Alternativamente, la cuarta guía de onda puede estar dispuesta para recibir la cuarta luz de entrada desde una segunda salida del segundo divisor óptico. De este modo, el componente óptico puede conmutarse entre la generación de un patrón de interferencia mediante la interferencia del primer y segundo haces de luz (por ejemplo, a lo largo del primer eje a través de la región de la muestra), y la generación de un patrón de interferencia mediante la interferencia del tercer y cuarto haces de luz (por ejemplo, a lo largo del segundo eje a través de la región de la muestra) dependiendo de si la luz de entrada se recibe en el primer divisor óptico o en el segundo divisor óptico.
- 10 En algunas realizaciones, el componente óptico está dispuesto para dirigir la luz de entrada a la región de muestra en cinco, seis, siete, ocho o más direcciones diferentes, a lo largo de trayectorias respectivas. En una serie de realizaciones, el componente óptico está dispuesto para dirigir la luz hacia la región de la muestra en direcciones opuestas a lo largo de cada uno de los tres ejes diferentes. El componente óptico puede comprender tres divisores ópticos, cada uno de los cuales tiene dos salidas que están acopladas a dos guías de onda respectivas que están dispuestas para dirigir la luz en direcciones opuestas respectivas a lo largo de uno de los tres ejes. Los tres ejes pueden ser coplanarios y estar regularmente espaciados en rotación, es decir, a 120 grados entre sí. Esto permite iluminar una muestra en la región de la muestra con patrones de franjas en tres orientaciones diferentes, giradas 120 grados entre sí, lo que permite utilizar fácilmente las técnicas de procesamiento SIM conocidas.
- 15 En algunas realizaciones, el componente óptico puede comprender una rejilla acoplada ópticamente a la región de muestra. La rejilla óptica puede estar dispuesta para dirigir la luz recibida hacia la región de la muestra a lo largo de la tercera trayectoria en la tercera dirección. La tercera guía de onda puede acoplarse ópticamente a la rejilla para dirigir la tercera luz de entrada a la región de la muestra en la tercera dirección a través de la rejilla. Se apreciará que la tercera guía de onda puede recibir la tercera luz de entrada de una fuente externa, - por ejemplo, en los sistemas aquí presentes, un dispositivo de inyección de luz puede inyectar la tercera luz de entrada en la tercera guía de onda.
- 20 Preferentemente, la luz dirigida a la región de la muestra en la primera dirección y la segunda dirección se encuentra en un primer plano, y la tercera dirección no se encuentra en el primer plano. La tercera dirección puede ser perpendicular al primer plano.
- 25 Alternativamente, la tercera guía de onda puede estar acoplada ópticamente a la primera guía de onda para recibir al menos parte de la luz de la primera guía de onda. La disposición ópticamente acoplada de la primera guía de onda y la tercera guía de onda puede formar un acoplador direccional (por ejemplo, acoplador de guía de onda evanescente). Así, la luz que entra en la primera guía de onda puede dividirse de modo que una parte de la luz recibida se propague en la primera guía de onda, y otra parte de la luz recibida se propague en la tercera guía de onda.
- 30 En realizaciones de cualquier aspecto en las que la primera luz de entrada y la segunda luz de entrada se dirigen a la primera guía de onda y a la segunda guía de onda respectivamente desde un divisor óptico, puede generarse convenientemente y con precisión un patrón de interferencia de tres haces a partir de un solo haz de entrada al divisor óptico, y la tercera luz de entrada. En las realizaciones en las que la tercera guía de onda está acoplada ópticamente a la primera guía de onda para recibir al menos parte de la luz de la primera guía de onda como tercera luz de entrada,
- 35 se verá que el patrón de interferencia de tres haces puede generarse convenientemente y con precisión a partir de un solo haz de entrada en el divisor óptico del componente óptico.
- 40 En realizaciones preferidas, el componente óptico comprende un sustrato, y la rejilla óptica está dispuesta entre la región de muestra y el sustrato del componente óptico. Preferentemente, la rejilla está dispuesta directamente debajo de la región de la muestra. De este modo, la rejilla puede dirigir la tercera luz de entrada a la región de la muestra en la tercera dirección desde debajo de la región de la muestra. Preferentemente, la tercera guía de onda está dispuesta entre la región de la muestra y el sustrato. La tercera guía de onda puede estar situada junto a la rejilla y, preferentemente, en el mismo plano que la rejilla.
- 45 El componente óptico puede ser sustancialmente plano, o puede comprender un sustrato plano. Por lo tanto, el componente o sustrato puede definir un plano. La primera y la segunda dirección pueden (cuando se consideran vectores sin posición) estar situadas en el plano del componente óptico.
- 50 El componente óptico comprende preferentemente una interfaz de entrada. La interfaz de entrada puede estar acoplada ópticamente a una o más -y preferentemente a todas- las guías de onda; esto puede ser por medio de una o más guías de onda de acoplamiento en el componente óptico. La interfaz de entrada puede acoplarse al divisor óptico mediante una guía de onda de acoplamiento. La interfaz de entrada puede estar distribuida en una pluralidad de caras del componente óptico, pero preferentemente está formada en una cara del componente óptico.
- 55 La interfaz de entrada puede proporcionarse mediante un único zócalo u otro medio de conexión, que puede comprender una pluralidad de puertos de entrada. Cada puerto de entrada puede corresponder a un conjunto respectivo de una o más guías de onda; estos conjuntos pueden solaparse. La interfaz de entrada puede estar dispuesta para acoplarse con uno o más cables de fibra óptica (por ejemplo, un conjunto de fibras o un adaptador de fibra) que pueden proporcionar luz de entrada al componente óptico. El uso de una interfaz de entrada de este tipo puede simplificar el proceso de conexión y configuración.
- 60
- 65

El componente óptico puede comprender un primer puerto de entrada y un segundo puerto de entrada. El primer y segundo puertos de entrada pueden estar ambos acoplados ópticamente a la primera guía de onda; por ejemplo, el componente óptico puede comprender un combinador óptico que tenga una primera entrada acoplada ópticamente al primer puerto de entrada, una segunda entrada acoplada ópticamente al segundo puerto de entrada y una salida acoplada ópticamente a la primera guía de onda. El combinador óptico podría comprender una unión de guía de onda de rama en Y. El combinador óptico puede estar situado a continuación del divisor óptico. El primer y segundo puertos de entrada también pueden estar acoplados ópticamente a la segunda o tercera guía de onda. Para al menos algunas longitudes de onda de la luz de entrada, el componente óptico puede estar dispuesto de modo que al proporcionar la luz de entrada al primer puerto de entrada se cree un primer patrón de interferencia en la región de la muestra, mientras que, alternativamente, al proporcionar la luz de entrada al segundo puerto de entrada se cree un segundo patrón de interferencia en la región de la muestra, el primer y segundo patrones de interferencia tienen una orientación común, pero el segundo patrón de interferencia está desplazado (es decir, desfasado) con respecto al primer patrón de interferencia.

En algunas realizaciones de los métodos divulgados en el presente documento, cualquiera de una o más de la primera, la segunda (cuando está presente) o la tercera guía de onda recibe adicionalmente luz de entrada auxiliar respectiva primera, segunda o tercera, preferentemente de la misma longitud de onda que la primera, segunda y tercera luz de entrada. La primera guía de onda puede dirigir la primera luz de entrada auxiliar hacia la región de la muestra a lo largo de la primera trayectoria en la primera dirección. Del mismo modo, cuando está presente, la segunda guía de onda puede dirigir la segunda luz de entrada auxiliar a la región de la muestra a lo largo de la segunda trayectoria en la segunda dirección. La tercera guía de onda puede dirigir la tercera luz de entrada auxiliar hacia la región de la muestra a lo largo de la tercera trayectoria en la tercera dirección. Así, se apreciará que un patrón de interferencia de dos haces o un patrón de interferencia de tres haces puede generarse dentro de la región de la muestra con luz de entrada auxiliar. La primera luz de entrada auxiliar dentro de la región de muestra puede tener un desfase distinto de cero con respecto a la primera luz de entrada dentro de la región de muestra.

Esto puede conseguirse mediante el chip óptico que tiene una diferencia de longitud de trayectoria óptica desde una entrada al componente óptico y la región de muestra entre la primera luz de entrada y la primera luz de entrada auxiliar. La segunda luz de entrada auxiliar dentro de la región de muestra puede tener un desfase distinto de cero con respecto a la segunda luz de entrada dentro de la región de muestra. La tercera luz de entrada auxiliar dentro de la región de muestra puede tener un desfase distinto de cero con respecto a la tercera luz de entrada dentro de la región de muestra. De este modo, introduciendo selectivamente la luz auxiliar, en lugar de la luz de entrada, por una o más de la primera, segunda y tercera guías de onda, puede obtenerse un desplazamiento lateral en un patrón de interferencia.

El chip óptico puede comprender primeras y/o segundas y/o terceras guías de onda auxiliares. Una o varias de la primera, segunda y tercera guías de onda pueden acoplarse ópticamente, por ejemplo mediante un combinador óptico, a una primera, segunda y tercera guías de onda auxiliares. La primera, la segunda y la tercera guías de onda auxiliares pueden estar dispuestas respectivamente para dirigir la primera, la segunda y la tercera luz de entrada auxiliar hacia la primera, la segunda y la tercera guías de onda. Preferentemente, una o más de la primera, segunda y tercera guías de onda auxiliares están dispuestas para recibir respectivamente primera, segunda y tercera luz de entrada auxiliar de uno o más divisores de guía de onda auxiliares. Preferentemente, el divisor o divisores auxiliares de guía de onda forman parte del componente óptico.

Por supuesto, se apreciará que no es esencial desfasar la fase de la luz de entrada auxiliar con las guías de onda auxiliares y que en algunas realizaciones la luz de entrada auxiliar recibida por uno o más elementos del componente óptico puede tener inherentemente un desfase distinto de cero con respecto a la luz de entrada.

Se apreciará que desplazar la fase de uno o más de los haces de luz de entrada auxiliares que interfieren dentro de la región de muestra puede generar un patrón de interferencia que es diferente de cualquiera de los patrones de interferencia generados al interferir dos o más de los haces de luz de entrada dentro de la región de muestra. Por ejemplo, el patrón de interferencia auxiliar generado al dirigir la primera luz de entrada auxiliar a la región de la muestra en la primera dirección y la segunda luz de entrada auxiliar a la región de la muestra en la segunda región será diferente del patrón de interferencia generado al dirigir la primera luz de entrada a la región de la muestra en la primera dirección y la segunda luz de entrada a la región de la muestra en la segunda región. En particular, se apreciará que la posición de las franjas de interferencia en este patrón de interferencia auxiliar será diferente.

En realizaciones que comprenden una cuarta guía de onda, la cuarta guía de onda puede estar dispuesta para recibir la cuarta luz de entrada auxiliar y dirigir la cuarta luz de entrada auxiliar a la región de muestra a lo largo de la cuarta trayectoria en la cuarta dirección. En este caso, la cuarta guía de onda puede estar acoplada ópticamente a una cuarta guía de onda auxiliar. La cuarta guía de onda auxiliar puede dirigir la cuarta luz de entrada auxiliar a la cuarta guía de onda. La cuarta guía de onda auxiliar puede recibir la cuarta luz de entrada auxiliar del divisor de la guía de onda auxiliar.

Ventajosamente, por lo tanto, las franjas en un patrón de luz periódico generado dentro de la región de muestra pueden desplazarse axialmente seleccionando para interferir luz de entrada auxiliar o luz de entrada.

En algunas realizaciones, cualquiera de la primera, la segunda (cuando está presente), la tercera o la cuarta (cuando está presente) guías de onda puede recibir luz de entrada auxiliar desde la salida de un divisor de guía de onda auxiliar respectivo. En este caso, la trayectoria óptica desde una salida del divisor de guía de onda auxiliar hasta la región de muestra puede ser más largo que la trayectoria óptica desde la salida del primer divisor óptico, u otro de los divisores de guía de onda auxiliares, hasta la región de muestra. Se apreciará que la mayor longitud de la trayectoria desplazará la fase de la luz de entrada auxiliar con respecto a la luz de entrada.

Preferentemente, el primer divisor óptico puede ser un divisor de rama en Y, un acoplador de guía de onda evanescente (también denominado en el presente documento acoplador direccional) o un componente de interferencia multimodo (MMI). Una ventaja de utilizar una MMI es que proporciona una división de bajas pérdidas y puede proporcionar más de dos salidas.

En algunas realizaciones, al menos una de las guías de onda (por ejemplo, al menos la primera guía de onda) está dispuesta para guiar la luz recibida hacia la región de muestra a lo largo de una trayectoria óptica respectiva, en el que dicha trayectoria óptica tiene una anchura que aumenta en una dirección hacia la región de muestra. Esto puede ser útil para iluminar un área mayor de la región de la muestra con la luz recibida, y generar así un patrón de interferencia mayor. La anchura aumenta preferentemente de forma adiabática, de modo que puede mantenerse una condición monomodo de la guía de onda; esto puede ser útil para determinadas técnicas de formación de imágenes SIM.

La región de muestra está situada preferentemente al menos en parte dentro o adyacente al componente óptico. La región de la muestra puede estar definida, al menos en parte, por una o más superficies del componente óptico. Estas una o más superficies pueden recubrirse con una capa biocompatible, por ejemplo, una capa que comprenda moléculas de BSA (albúmina sérica bovina), PEG (polietilenglicol) o PLL (poli-L-lisina). El componente óptico puede definir un pocillo de muestra con una o más paredes, por ejemplo, cuatro o más paredes laterales planas. La región de muestra puede estar en el pocillo de muestra. La región de muestra o pocillo de muestra comprende preferentemente una base, que es preferentemente plana. El pocillo de la muestra puede estar definido, al menos en parte, por una capa o región de revestimiento del componente óptico. El pocillo de la muestra puede estar definido, al menos en parte, por uno o más elementos (por ejemplo, de polidimetilsiloxano) que colindan con el componente óptico, o que sobresalen del componente óptico; estos elementos pueden definir una cámara abierta o cerrada.

En algunas realizaciones, una cara (por ejemplo, una base) de la región de muestra puede estar definida por una superficie de una capa de guía óptica (es decir, capa de núcleo) del componente óptico. La superficie de la capa de guiado óptico puede estar expuesta (por ejemplo, al aire o al agua), al menos adyacente a la región de muestra (al menos, cuando no hay muestra presente). Por ejemplo, en algunas realizaciones se utiliza un fluido como el aire o el agua como capa de revestimiento superior de la guía(s) de onda, en cuyo caso una base de la región de muestra puede estar definida por una superficie superior de la capa de guiado óptico de la guía(s) de onda. De este modo, se puede colocar una muestra directamente sobre una guía de onda, para que interactúe con un campo evanescente de luz guiada dentro de la guía de onda. En tales disposiciones, puede que no siempre sea necesario un pocillo de muestras, y una muestra puede iluminarse con un patrón de interferencia colocándola directamente sobre una guía de onda y guiando dos haces que se propagan en sentido contrario dentro de la guía de onda; sin embargo, en algunos casos puede proporcionarse un pocillo de muestras, por ejemplo, mediante una cámara de muestras colocada sobre la superficie de la guía de onda, para contener la muestra.

En un conjunto de realizaciones, al menos la primera guía de onda comprende una faceta de extremo desde la que la luz (por ejemplo, la primera luz de entrada) que recibe se dirige a la región de muestra. Preferentemente, la segunda guía de onda (cuando está presente) comprende una faceta final desde la que la luz de entrada que recibe (es decir, la segunda luz de entrada) se dirige a la región de la muestra. Preferentemente, la tercera guía de onda comprende una faceta final desde la que la luz de entrada que recibe (es decir, la tercera luz de entrada) se dirige a la región de la muestra. En tales disposiciones se apreciará que las facetas extremas de al menos la primera y la tercera guías de onda pueden definir paredes laterales respectivas de un pocillo de muestra. Por lo tanto, la faceta final de al menos la primera y la segunda guía de onda puede colocarse lateral a un área de superficie en la que la muestra es posicionable en la región de la muestra. Además, al menos una de estas paredes laterales puede comprender al menos una capa de guía de onda. La región de la muestra puede colindar con la faceta final. Alternativamente, puede haber un medio, como un espacio de aire y/o una solución tampón celular (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato, PBS), entre la faceta del extremo y la muestra o región de muestra. La faceta del borde puede recubrirse con una capa biocompatible, por ejemplo, que comprenda moléculas de BSA (albúmina sérica bovina), PEG (polietilenglicol) o PLL (poli-L-lisina).

Tales disposiciones permiten ventajosamente que los fluoróforos (u otros marcadores emisores de luz de este tipo incrustados dentro de la muestra) sean excitados más allá de una región superficial de la muestra - por ejemplo, más profundamente en la muestra de lo que penetra un campo evanescente de la guía de onda, que es típicamente unos pocos cientos de nanómetros.

Tales disposiciones también permiten que los fluoróforos (u otros marcadores emisores de luz de este tipo) se exciten eficientemente a una potencia relativamente alta, para una fuente de luz dada (por ejemplo, láser), en comparación

con las técnicas de iluminación basadas en campo evanescente conocidas, en las que las potencias de excitación son relativamente bajas - típicamente menos de aproximadamente el 10 % de la potencia de luz de entrada total.

La luz procedente de la faceta extrema de al menos la primera guía de onda tiene preferentemente forma de lámina de luz. La lámina de luz entra preferentemente en la región de la muestra en un plano sustancialmente paralelo a un plano principal del componente óptico (por ejemplo, el plano de un sustrato plano del componente óptico). Al generar una lámina de luz, se puede iluminar preferentemente toda la sección transversal de una región de la muestra. En consecuencia, un patrón de interferencia periódica puede iluminar toda la sección transversal de la región de la muestra.

El espesor de un haz u hoja de luz que emana de la faceta extrema de al menos la primera guía de onda es preferentemente inferior a 500, 1000 o 2000 nanómetros. Para facilitar esto, la capa de guía de onda de al menos la primera guía de onda puede depositarse como una fina película de material transparente que transmite la luz. Esta fina película puede tener un grosor inferior a 1 micrómetro.

En otro conjunto de realizaciones, al menos la primera guía de onda está dispuesta para dirigir hacia la región de la muestra únicamente un componente de campo evanescente de la luz que recibe. En tales realizaciones, la región de la muestra está preferentemente en contacto con al menos la primera guía de onda.

Cualquiera de las guías de onda puede comprender una primera región de núcleo respectiva y una primera región de revestimiento en contacto con la primera región de núcleo, teniendo la primera región de núcleo un índice de refracción mayor que la primera región de revestimiento y estando dispuesta para guiar la luz recibida a lo largo de la guía de onda utilizando reflexión interna total. Preferentemente, dos o más de las guías de onda (por ejemplo, la primera y la segunda guía de onda) comprenden el mismo núcleo y las mismas regiones de revestimiento. Uno o más de los divisores ópticos (por ejemplo, el primer divisor óptico) puede comprender las mismas regiones de núcleo y de revestimiento. La primera región de revestimiento (por ejemplo, una región de revestimiento óptico inferior) de la(s) guía(s) de ondas y/o el(los) divisor(es) óptico(s) puede(n) estar dispuesta(s) entre la primera región del núcleo y un sustrato del componente óptico. En algunas realizaciones, la primera región del núcleo puede estar dispuesta entre la primera región de revestimiento y una segunda región de revestimiento (por ejemplo, una región de revestimiento óptico superior). La segunda región de revestimiento tiene preferentemente un índice de refracción inferior al de la primera región del núcleo. En algunas realizaciones, puede utilizarse aire o agua como segunda región de revestimiento; en este caso, puede considerarse que una región de aire o agua constituye la segunda región de revestimiento y forma parte del componente óptico, o puede considerarse que el aire o el agua están separados del componente óptico, de modo que el componente óptico no comprende en sí una capa de revestimiento superior.

Términos tales como "superior", "inferior", "pocillo" y "base", tal como se utilizan en el presente documento, no deben entenderse como que limitan necesariamente el componente óptico para ser utilizado en cualquier ángulo de inclinación particular. Sin embargo, en algunas realizaciones, la gravedad puede utilizarse para retener una muestra en la región de la muestra, y el componente óptico puede entonces tener un ángulo natural de uso, o una gama de ángulos utilizables.

En montajes SIM convencionales en los que el patrón de iluminación se forma con una lente objetivo de formación de imágenes, la resolución óptica de SIM es aproximadamente $\lambda_0/4.N.A.$, donde N.A. es la apertura numérica de la lente objetivo. Normalmente, el N.A. más alto utilizado en estas técnicas convencionales es de 1,49 y, en algunos casos, la muestra se sumerge en una solución cuyo índice de refracción se aproxima al del agua (es decir, en torno a 1,33).

Al menos algunas de las disposiciones aquí divulgadas tienen una resolución óptica de $\lambda_0/2(N.A. + n_{\text{efectivo}})$, donde n_{efectivo} es el índice de refracción efectivo del modo guiado dentro de la guía de onda, y N.A. es la apertura numérica de un objetivo de formación de imágenes. Esto permite mejorar la resolución utilizando un n_{efectivo} mayor que N.A. Esto es posible utilizando elementos con un índice de refracción adecuadamente alto en el componente óptico para dirigir la luz de interferencia dentro de la región de la muestra. Por ejemplo, se puede conseguir un n_{efectivo} de alrededor de 1,9 a 2 utilizando guías de onda de pentóxido de tántalo o nitruro de silicio.

El espaciado entre franjas en un patrón de luz es típicamente proporcional a $\lambda_0/2n_{\text{efectivo}}$, donde λ_0 es la longitud de onda de los haces que interfieren en el vacío y n_{efectivo} es el índice de refracción efectivo del modo guiado dentro de la guía de onda. En algunas disposiciones de la técnica anterior, n_{efectivo} suele ser de 1 a 1,33, ya que la mayor parte o la totalidad de la energía de los haces interferentes, en la región de interferencia, se encuentra en un medio basado en aire o agua.

En realizaciones de la presente invención (por ejemplo, realizaciones en las que la luz evanescente forma un patrón de luz periódico), en las que un patrón de luz está formado por haces de luz interferentes que tienen la mayor parte de su energía luminosa dentro de uno o más elementos de dirección de la luz (por ejemplo, en una guía de onda que dirige la luz hacia la región de la muestra, o un divisor óptico que dirige la luz hacia la región de la muestra), se apreciará que el índice de refracción efectivo experimentado por la luz interferente dependerá de la composición del índice de refracción de los elementos que dirigen la luz, en lugar de principalmente aire o agua, y, como resultado, n_{efectivo} puede hacerse superior a 1,33 porque los elementos que dirigen la luz pueden fabricarse a partir de materiales

que tienen índices de refracción superiores a 1,33. Por ejemplo, pueden obtenerse valores de n_{efectivo} de alrededor de 1,7 a 2 en guías de onda que comprenden una capa de núcleo de pentaóxido de tántalo o nitruro de silicio y capas de revestimiento de silicio.

5 Valores n_{efectivo} más altos reducen el espaciado entre las franjas en el patrón de interferencia, lo cual es deseable porque aumenta la resolución de la imagen SIM. Por lo tanto, preferentemente, en algunas realizaciones, al menos una de las guías de onda comprende pentaóxido de tántalo o nitruro de silicio, preferentemente en la capa del núcleo. Preferentemente, al menos una de las guías de onda tiene una capa de revestimiento que comprende silicio. Preferentemente, el componente óptico es tal que n_{efectivo} es mayor que 1,33 en la región de la muestra y preferentemente al menos 2, por ejemplo, 2,5, 3, 3,5 o más.

10 En realizaciones en las que la región de muestra comprende un pocillo de muestra para alojar una muestra, el pocillo de muestra puede estar definido al menos parcialmente por una o ambas de la primera región de revestimiento y la primera región de núcleo.

15 La primera región de revestimiento de la primera guía de onda, y preferentemente la segunda guía de onda (cuando está presente), puede estar conformada para definir, al menos parcialmente, la región de muestra (por ejemplo, un pocillo de muestra) para alojar la muestra. En particular, una o ambas de la primera región de revestimiento y la primera región de núcleo pueden estar conformadas para definir un pocillo o región de muestra (por ejemplo, proporcionando un plano base para una región o pocillo de muestra).

20 En un conjunto de realizaciones, al menos la primera guía de onda es una guía de onda unidimensional o es una guía de onda bidimensional. En algunas realizaciones, una o más de las guías de onda es una guía de onda monomodo. En algunas realizaciones, una o más de las guías de onda es una guía de onda acanalada bidimensional, o una guía de onda en tira bidimensional, o una guía de onda de losa unidimensional.

25 En las guías de onda acanalada, se apreciará que el guiado óptico transversal (es decir, en una dirección normal a un plano de las capas/regiones de núcleo y revestimiento) se proporciona mediante un contraste de índice de refracción entre la capa de núcleo y las capas de revestimiento. El guiado óptico lateral se consigue mediante una cresta en la capa de revestimiento superior. El guiado óptico lateral en la estructura de guía de onda acanalada aumenta la intensidad de la luz evanescente (es decir, el campo evanescente) que se propaga fuera de la capa central. Por consiguiente, en comparación con el uso de una estructura de guía de onda de losa convencional (que no tiene cresta), puede aumentarse la intensidad de la luz evanescente que se superpone a la región de la muestra. Así, utilizando una guía de onda acanalada, puede aumentarse la intensidad de la luz evanescente dirigida a la región de la muestra desde una guía de onda acanalada, lo que permite generar un patrón de luz periódico más intenso.

30 Otra ventaja de utilizar guías de onda acanalada en comparación con las guías de onda de losa (que sólo proporcionan guiado óptico transversal) es que permiten curvas y giros más pronunciados con menos fugas de luz. De este modo, se pueden utilizar curvas y giros más pronunciados en la guía de onda para proporcionar un componente óptico más compacto con una huella reducida. En particular, se pueden utilizar curvas y giros más pronunciados en la guía de onda para dirigir la luz de entrada desde un lado del componente óptico (por ejemplo, desde la cara de entrada) a diferentes lados de la región de la muestra y a lo largo de diferentes direcciones dentro de la región de la muestra para generar diferentes patrones de luz periódicos.

35 Para reducir aún más las pérdidas por curvatura en la guía de onda, y por lo tanto permitir curvas y giros aún más pronunciados para hacer que el componente óptico sea aún más compacto, una o más de las guías de onda en las realizaciones del presente documento pueden comprender una guía de onda en tira. Las guías de onda en tira también tienen una cresta que proporciona un guiado óptico lateral. Sin embargo, a diferencia de las guías de onda acanalada, la cresta se extiende a través de la capa superior de revestimiento y a través (o al menos parcialmente) de la capa central de la guía de onda.

40 Otra ventaja de utilizar guías de onda en tira es que proporcionan un campo evanescente intenso que se propaga fuera de la capa del núcleo. En consecuencia, en las realizaciones en las que sólo el campo evanescente (es decir, la luz evanescente) se dirige a la región de la muestra, la intensidad del patrón de luz periódico que ilumina la muestra puede aumentarse utilizando una guía de onda en tira para dirigir la luz a la región de la muestra.

45 En algunas realizaciones, una o más de las guías de onda pueden ser guías de onda de losa, particularmente en casos en los que no se requieren altas potencias y curvas/giros pronunciados. También se apreciará que las guías de onda de losa pueden ser preferibles en algunos casos porque pueden ser más fáciles de fabricar que las guías de onda acanalada y de losa.

50 La anchura de la estructura de guía de onda de losa puede ser de 100 μm a 500 μm , o de 100 μm a 150 μm , o de 100 μm a 200 μm , o de 100 μm a 300 μm , o de 100 μm a 400 μm , aunque potencialmente podría estar fuera de estos rangos. La anchura, r_w , de una cresta en una guía de onda acanalada o una guía de onda en tira puede ser: 1 μm $\leq r_w < 100 \mu\text{m}$; o 1 $\mu\text{m} \leq r_w \leq 10 \mu\text{m}$; o 10 $\mu\text{m} \leq r_w \leq 30 \mu\text{m}$; o 10 $\mu\text{m} \leq r_w \leq 50 \mu\text{m}$; o 10 $\mu\text{m} \leq r_w < 100 \mu\text{m}$, aunque potencialmente podría situarse fuera de estos rangos.

Opcionalmente, al menos una de las guías de onda (por ejemplo, la primera o la segunda guía de onda) está acoplada a un ajustador de fase respectivo que está dispuesto para ajustar la fase de al menos una porción de la luz recibida (por ejemplo, la primera luz de entrada) antes de que se dirija a la región de muestra. El componente óptico puede comprender uno o más de dichos ajustadores de fase.

Preferentemente, el ajustador (o ajustadores) de fase es un ajustador de fase activo tal como un ajustador de fase térmico o un ajustador de fase electroóptico. Sin embargo, el ajustador (o ajustadores) de fase puede ser un ajustador de fase pasivo. Un ajustador de fase pasivo puede, por ejemplo, comprender un hueco rellenable en la capa de revestimiento superior de una guía de onda respectiva a la que esté acoplado el ajustador de fase, que puede ser adecuado para el relleno selectivo con uno o más materiales de diferentes índices de refracción (por ejemplo, dióxido de silicio, PMMA o SU8) a fin de cambiar el índice de refracción efectivo de la guía de onda.

La velocidad de los ajustadores de fase activos actuales es superior a 1 GHz, lo que es mucho más rápido que los componentes opto-mecánicos actuales que normalmente tienen velocidades de modulación en el rango de kHz. En consecuencia, los ajustadores de fase pueden permitir que el patrón de luz periódico se desplace en relación con la región de la muestra a velocidades mucho más rápidas que los montajes opto-mecánicos de la técnica anterior.

Cualquiera de una o más de las guías de onda puede ser una guía de onda bidimensional que tiene una porción curvada o angulada que se curva o angula hacia la región de muestra y está dispuesta para utilizar la reflexión interna total para dirigir la luz de entrada respectiva a lo largo de la porción curvada o angulada y hacia la región de muestra.

Ciertos métodos que realizan la invención, según cualquiera de los aspectos descritos en el presente documento, comprenden además utilizar el patrón o patrones de luz periódicos para realizar microscopía de iluminación estructurada (SIM). El análisis puede realizarse mediante una técnica SIM conocida. Preferentemente, el patrón de luz se ajusta linealmente (por ejemplo, axialmente) y/o angularmente, utilizando uno o más de los mecanismos descritos en el presente documento, durante la formación de imágenes. Este ajuste puede realizarse mediante una unidad de imagen o mediante una unidad de control independiente.

Así, a partir de otro aspecto, la invención proporciona un sistema para obtener imágenes de una muestra utilizando microscopía de iluminación estructurada (SIM), comprendiendo el sistema:

- un aparato de inyección de luz;
- un componente óptico según cualquier aspecto divulgado en el presente documento, dispuesto para recibir luz de entrada del dispositivo de inyección de luz e iluminar la región de la muestra con un patrón de luz periódico;
- una lente objetivo dispuesta para recoger la luz que emana de la región de la muestra; y
- una unidad de formación de imágenes dispuesta para realizar microscopía de iluminación estructurada (SIM) con la luz recogida.

De otro aspecto, la invención proporciona un método de formación de imágenes de una muestra utilizando microscopía de iluminación estructurada (SIM), que comprende:

- iluminar una región de muestra de un componente óptico con un patrón de luz periódico, mediante cualquier método aquí descrito;
- recoger la luz que emana de la región de muestra; y
- realizar microscopía de iluminación estructurada (SIM) con la luz recogida.

La región de muestra contiene preferentemente una muestra -por ejemplo, una muestra biológica-. Es preferible que la muestra contenga marcadores fluorescentes, aunque no es imprescindible.

En cualquiera de estos aspectos, el aparato de inyección de luz puede comprender una lente para enfocar la luz de entrada procedente de una fuente de luz en el componente óptico. La fuente de luz puede formar parte del aparato de inyección de luz. La fuente de luz es preferentemente un láser o cualquier otra fuente de luz coherente para generar un patrón de luz periódico. Por ejemplo, la fuente de luz puede ser una fuente de luz láser, como un láser de estado sólido, un láser de fibra o un láser de diodo. La longitud de onda de la luz de entrada puede estar dentro del espectro visible (por ejemplo, de unos 400 a unos 800 nanómetros) o cercano al infrarrojo (por ejemplo, de unos 800 a unos 1500 nanómetros). La primera, segunda, tercera y cuarta luz de entrada (en su caso) tienen preferentemente una longitud de onda común.

En otras realizaciones, el aparato de inyección de luz puede comprender una fibra óptica que dirige la luz desde la fuente de luz al componente óptico, por ejemplo, en una interfaz de entrada del componente óptico. Alternativamente, la fibra puede dirigir la luz de la fuente luminosa a la lente.

El sistema puede comprender un multiplexor óptico, tal como un conmutador óptico, que puede estar dispuesto para dirigir selectivamente la luz de la fuente de luz a lo largo de uno o más de una pluralidad de trayectorias. Cada trayectoria puede inyectar luz en el componente óptico (por ejemplo, en uno o varios puertos de entrada diferentes de

la interfaz de entrada) mediante una lente o una o varias fibras ópticas. Al controlar qué haces de luz emitir, el multiplexor óptico permite controlar selectivamente qué entrada, o combinación de entradas, recibe luz de entrada. De este modo, se puede variar el patrón de interferencia en la región de la muestra.

5 Los multiplexores ópticos son preferentemente del tipo utilizado en redes de telecomunicaciones (por ejemplo, conmutadores ópticos 40G). Esto es ventajoso, ya que la generación de patrones de luz periódicos está limitada únicamente por la velocidad del multiplexor óptico, en lugar del movimiento de los componentes opto-mecánicos (por ejemplo, espejo móvil) como en los montajes de la técnica anterior. De hecho, los multiplexores ópticos actuales, como los de telecomunicaciones, tienen velocidades de modulación de más de 1 GHz, mucho más rápidas que los componentes opto-mecánicos actuales, que suelen tener velocidades de modulación en el rango de los KHz.

Además, el aparato de inyección de luz puede comprender uno o más moduladores de amplitud para ajustar la amplitud de cada haz de luz de entrada inyectado en el componente óptico. Los moduladores de amplitud permiten controlar la intensidad de las franjas de interferencia en el patrón de luz periódico.

15 Opcionalmente, el aparato de inyección de luz puede estar dispuesto para inyectar luz de entrada que tenga una o más longitudes de onda diferentes en el componente óptico. Las diferentes longitudes de onda de la luz de entrada pueden ser generadas por un láser sintonizable, o un conjunto de fuentes de luz que comprenda una fuente de luz para cada longitud de onda. La longitud o longitudes de onda de la luz de entrada pueden seleccionarse para que los marcadores emisores de luz emitan luz. Se pueden utilizar diferentes longitudes de onda de luz de entrada para cambiar el número de franjas y desplazar la posición de las franjas con respecto a la muestra.

En algunas realizaciones, la unidad de formación de imágenes también está dispuesta para controlar un desfase entre la primera luz de entrada y la segunda luz de entrada.

25 La unidad de imagen puede comprender uno o más de: sensores de imagen, procesadores, memoria, ASIC, FPGA, DSP, entradas y salidas. Puede comprender una memoria que almacene instrucciones de software para ordenar a la unidad de formación de imágenes que realice una o más etapas de la formación de imágenes SIM.

30 La unidad de formación de imágenes puede estar dispuesta para realizar la formación de imágenes SIM con luz recogida de una pluralidad de patrones de luz periódicos en la región de muestra. Puede disponerse para realizar análisis de frecuencia, como el análisis de Fourier, con la luz recogida.

35 En algunas realizaciones, la primera dirección y la segunda dirección se encuentran en un primer plano, y la lente objetivo también está dispuesta para recibir luz de entrada desde el aparato de inyección de luz y para dirigir luz de entrada a la región de muestra a lo largo de una cuarta dirección, en la que la cuarta dirección no se encuentra en el mismo plano que la primera y la segunda direcciones.

40 En todos los aspectos, la luz interferente puede tener la misma polarización. Los elementos del componente óptico (por ejemplo, al menos la primera guía de onda y/o al menos el primer divisor óptico) pueden estar dispuestos para dirigir la luz con su polarización en el plano de la capa central, o en el plano del componente óptico (por ejemplo, plano del sustrato del componente óptico). La interferencia de luz con la misma polarización aumenta la visibilidad de las franjas, proporcionando así una mejor imagen SIM. La visibilidad es máxima cuando la luz interferente tiene su polarización en el plano de la capa central, o plano del componente óptico (por ejemplo, plano del sustrato del componente óptico).

45 Características de cualquier aspecto o realización descritos en el presente documento pueden, siempre que sea apropiado, aplicarse a cualquier otro aspecto o realización descritos en el presente documento. Cuando se haga referencia a diferentes realizaciones o conjuntos de realizaciones, debe entenderse que no son necesariamente distintas, sino que pueden solaparse.

Descripción específica

55 A continuación se describirán realizaciones preferidas de la invención, solamente a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

- La figura 1 es un esquema de un dispositivo de formación de imágenes SIM que incluye un componente óptico;
- La figura 2 es una vista planar del componente óptico de la figura 1;
- La figura 3 es una vista lateral del componente óptico de la figura 1 a lo largo de la región de muestra;
- 60 Las figuras 4a-4h son perfiles transversales de tres tipos alternativos de guías de onda;
- La figura 5 es una vista en planta de un patrón de interferencia periódica generado en la región de muestra del componente óptico de la figura 1;
- La figura 6 es una vista lateral de un componente óptico;
- La figura 7 es una vista plana de un dispositivo de inyección de luz y un componente óptico según la presente invención;
- 65 Las figuras 8a, 8b y 8c muestran vistas planas de tres patrones de iluminación diferentes que pueden generarse

cambiando el ángulo de un patrón de luz periódico dentro de la región de muestra del componente óptico de la figura 7;

La figura 9 es una vista plana de un dispositivo de inyección de luz y un componente óptico según la presente invención;

5 La figura 10 es una vista plana de un dispositivo de inyección de luz y un componente óptico según la presente invención;

La figura 10b es una vista esquemática de una variante de la disposición de inyección de luz y de un componente óptico;

La figura 11 es una vista lateral de un componente óptico para generar imágenes SIM en 3D;

10 La figura 12 es una vista lateral de un patrón de interferencia periódica generado en la región de muestra del componente óptico de la figura 11; y

La figura 13 es un esquema de un montaje para la obtención de imágenes SIM en 3D que incluye un componente óptico.

15 La figura 1 muestra un aparato 100 para realizar microscopía de fluorescencia, que incluye una lente objetivo 30, tal como una lente objetivo Plan N 20x/0,4 Olympus™, que tiene un campo de visión delantero 32 que se enfrenta a una región de muestra 55 de un componente óptico 10. También incluye un dispositivo de inyección de luz 40 acoplado ópticamente a una interfaz de entrada 11 del componente óptico 10. Una muestra 50 se coloca en una región de muestra 55. El aparato 100 también incluye una unidad de formación de imágenes 60 configurada para recibir y procesar la luz recogida por la lente objetivo 30 dentro del campo de visión delantero 32.

20 La muestra 50 en este ejemplo es una célula biológica embebida con marcadores emisores de luz tales como fluoróforos o puntos cuánticos, aunque, por supuesto, pueden utilizarse otros tipos de muestras. Por ejemplo, la muestra puede ser una célula biológica con dispersión elástica y no elástica.

25 El dispositivo de inyección de luz 40 comprende una lente 46 y una fuente de luz 42 que, en este ejemplo, es una fuente láser de longitud de onda visible. La lente 46 está dispuesta para recibir la luz 44 de la fuente luminosa 42 y enfocarla hacia la interfaz de entrada 11 del componente óptico 10. Esta luz inyectada constituye la luz de entrada para el componente óptico 10.

30 Como se ilustra mejor en la figura 2, la interfaz de entrada 11 del componente óptico 10 comprende una guía de onda de entrada 12 que recibe la luz de entrada desde el dispositivo de inyección de luz 40. La guía de onda de entrada 12 está dispuesta para dirigir la luz de entrada a un divisor óptico 13 que, en este ejemplo, es un divisor de guía de onda de rama y, aunque se apreciará que puede ser cualquier otro tipo de divisor óptico, como un acoplador de interferencia multimodo (MMI) o un acoplador de guía de onda evanescente.

35 Las dos salidas del divisor de rama y 12 están cada una acoplada ópticamente a una primera y segunda guía de onda 14, 15 respectivas. La primera y la segunda guía de onda 14, 15 se curvan hacia, y se acoplan ópticamente a, lados opuestos respectivos 55a, 55b de la región de muestra 55 para dirigir dos haces de luz de entrada de propagación contraria a la región de muestra 55 a lo largo de direcciones paralelas y opuestas 14x, 15x. Las direcciones 14x y 15x están ambas a lo largo del eje 55x de la región de muestra 55.

40 Se apreciará que dirigir dos o más haces de luz entre sí dentro de la región de muestra 55 (a lo largo de diferentes direcciones, por ejemplo, 14x, 15x) hará que los haces interfieran y generen un patrón de interferencia periódica. El patrón de interferencia periódica iluminará la muestra 50 y hará que las partículas emisoras de luz dentro de la muestra 50 emitan luz. El patrón de luz emitido puede ser utilizado por la unidad de formación de imágenes 60 para realizar una microscopía de iluminación estructurada (SIM) de la muestra 50.

45 La figura 5 ilustra un ejemplo de un patrón de luz periódico generado dirigiendo dos haces de luz de entrada que se propagan en sentido contrario hacia la región de la muestra desde las guías de onda 14 y 15 de la figura 2. Como se describirá más adelante, las franjas del patrón de interferencia periódica pueden desplazarse a lo largo del eje 55x ajustando la diferencia de fase relativa entre los haces de luz que interfieren.

50 Las guías de onda 12, 14, 15 en el componente óptico son guías de onda acanalada bidimensionales (como se ilustra en la figura 4b) pero, como se explica más adelante, la guía de onda podría ser en su lugar una guía de onda de canal bidimensional o una guía de onda en tira (por ejemplo, como se ilustra en la figura 4c), o una guía de onda de losa unidimensional (por ejemplo, como se ilustra en la figura 4a). Se sabe cómo fabricar estas estructuras de guía de onda unidimensionales y bidimensionales. La estructura de capas de las guías de onda puede verse en las figuras 1, 3 y 4b. Como se muestra, cada una de las guías de onda 12, 14, 15 está formada sobre un sustrato 201 y comprende una capa de guiado óptico 203 (a veces denominada aquí capa de núcleo 203) intercalada entre una capa de revestimiento superior 204 y una capa de revestimiento inferior 202. La capa de revestimiento inferior 202 está dispuesta entre el sustrato 201 y una primera cara 208 de la capa de núcleo 203. La capa de revestimiento superior 204 está dispuesta sobre una segunda cara 209 de la capa de núcleo 203 que es opuesta a la primera cara 208 de la capa de núcleo 203. La capa central 203 tiene un índice de refracción más alto que las capas de revestimiento 202, 204 y guía la luz de entrada a lo largo de la guía de onda 12, 14, 15 utilizando reflexión interna total.

65

En algunas realizaciones, puede formarse una guía de onda unidimensional o bidimensional utilizando un fluido tal como aire o agua como capa de revestimiento superior. Las figuras 4d-4f ilustran tales formas alternativas de guía de onda. Específicamente, la figura 4d ilustra una guía de onda de losa unidimensional, la figura 4e ilustra una guía de onda acanalada bidimensional y la figura 4f ilustra una guía de onda en tira de canal bidimensional. Cada una de estas guías de onda comprende, respectivamente, una capa de revestimiento inferior 202' dispuesta sobre un sustrato 201', y una capa de núcleo 203' dispuesta sobre la capa de revestimiento inferior 202'. La superficie superior 205' de la capa de núcleo 203' en cada guía de onda está expuesta a un fluido como aire o agua. La anchura de la capa central de la guía de onda de losa (figura 4d) puede ser de 100 μm a 500 μm , o de 100 μm a 150 μm , o de 100 μm a 200 μm , o de 100 μm a 300 μm , o de 100 μm a 400 μm , o mayor.

La superficie superior 205' de la capa de núcleo 203' de la guía de onda acanalada de la figura 4e está conformada (por ejemplo, utilizando un proceso de grabado adecuado tal como grabado iónico reactivo o grabado húmedo) para definir una cresta 206 que sobresale del grueso de la capa de núcleo 203'. Las paredes laterales 207 de la cresta 206 se elevan desde la capa central 203'.

La capa de núcleo 203' de la guía de onda en tira de la figura 4f está formada en su totalidad (por ejemplo, utilizando un proceso de grabado adecuado tal como grabado iónico reactivo o grabado húmedo) como una cresta 208, asentada sobre una capa de revestimiento inferior 202' más ancha. Las paredes laterales 209 de la cresta 208 se extienden a toda la altura de la capa central 203'.

Se apreciará que las crestas 206, 208 en la guía de onda acanalada y la guía de onda en tira proporcionan un contraste de índice de refracción lateral con el medio fluido circundante. Este contraste lateral del índice de refracción se utiliza para guiar la luz en el plano lateral (es decir, en un plano paralelo al plano del sustrato 201').

La anchura, r_w , de la cresta 206 en una guía de onda acanalada y la anchura de la cresta 207 en una guía de onda en tira pueden ser: $1 \mu\text{m} \leq r_w < 100 \mu\text{m}$; o $1 \mu\text{m} \leq r_w \leq 10 \mu\text{m}$; o $10 \mu\text{m} \leq r_w \leq 30 \mu\text{m}$; o $10 \mu\text{m} \leq r_w \leq 50 \mu\text{m}$; o $10 \mu\text{m} \leq r_w < 100 \mu\text{m}$, aunque pueden ser más anchos que esto. Por ejemplo, las crestas 206, 207 pueden tener una anchura de 25 a 500 μm y un grosor de 150 a 220 nm.

En disposiciones alternativas, la guía de onda acanalada de la figura 4e o la guía de onda en tira de la figura 4f pueden comprender una capa de revestimiento superior sólida 204' como se ilustra en la figura 4g y la figura 4h, respectivamente. En la figura 4g, una capa de revestimiento superior sólida 204' cubre la cresta 206 de la guía de onda acanalada. En la figura 4h, una capa de revestimiento superior sólida 204' cubre la cresta 208 de la guía de onda en tira.

Se apreciará que cada una de las guías de onda unidimensionales descritas en el presente documento puede ser una guía de onda de losa unidimensional de acuerdo con cualquiera de las guías de onda ilustradas en las figuras 4a y 4d. Cada una de las guías de onda bidimensionales descritas en el presente documento puede ser una guía de onda bidimensional en forma acanalada o tira de acuerdo con cualquiera de las guías de onda ilustradas en las figuras 4b, 4c, 4e, 4f o 4g.

Se apreciará que las guías de onda acanalada y otras guías de onda bidimensionales de este tipo confinan el campo óptico de la luz de entrada guiada en la dirección transversal (es decir, la dirección normal a la capa de núcleo) y la dirección lateral (es decir, en una dirección a través del plano de la capa de núcleo). En cambio, las guías de onda unidimensionales confinan el campo óptico de la luz de entrada guiada sólo en la dirección transversal (es decir, la dirección normal a la capa central).

También se apreciará que en cualquiera de las guías de onda (es decir, unidimensional o bidimensional) una porción de la luz de entrada que está siendo guiada en la misma viaja fuera de la región del núcleo de la guía de onda 203. Esta porción de luz se conoce en la técnica como campo evanescente. Normalmente, el campo evanescente se propagará en las capas superior e inferior del revestimiento.

En este ejemplo, y como se ve mejor en la vista lateral de la región de muestra 55 de la figura 3, la región de muestra 55 tiene la forma de un pocillo de muestra. El pocillo de muestras 55 se encuentra donde la guía de onda 14 se une con la guía de onda 15 y está definido por un pocillo a través de la capa de revestimiento superior 204 de las guías de onda 14, 15. Un resultado del posicionamiento del pocillo de muestra 55 en esta región es que sólo la luz evanescente que se propaga en la capa de revestimiento superior 204 de las guías de onda 14, 15 (y no la luz que se propaga en la capa de núcleo 203) se dirige hacia el pocillo de muestra 55 desde cada guía de onda 14, 15. Por consiguiente, en este ejemplo, se apreciará que los patrones de luz periódicos (por ejemplo, 510 en la figura 5) que se generan dentro del pocillo de muestra 55 (es decir, la región de muestra 55) están causados por la interferencia de la luz evanescente dirigida al pocillo de muestra desde las guías de onda 14 y 15. La luz dirigida a la región de muestra 55 se denomina en el presente documento luz de excitación y los patrones de luz periódicos generados se denominan patrones de iluminación o patrones de excitación. La cara de una guía de onda desde la que la luz de excitación se dirige a la muestra 50 se denomina en el presente documento cara de salida.

La unidad de formación de imágenes 60 incluye un dispositivo de detección de fluorescencia 62 para detectar luz de

la muestra 50, tal como un sensor CCD o sCMOS y una unidad de control electrónico 64 para controlar el dispositivo de detección de fluorescencia 62 y el dispositivo de inyección de luz 40, y para procesar la luz detectada para producir una imagen SIM de la muestra 50 utilizando técnicas de formación de imágenes SIM conocidas.

5 La guía de onda 14 también comprende un ajustador de fase activo 18 (véase, figura 2) tal como un ajustador de fase
 10 térmico, optofluídico o un ajustador de fase electroóptico. El ajustador de fase 18 ajusta el índice de refracción de la
 guía de onda 14 para desplazar la fase del haz de luz en la región de muestra 55 desde la guía de onda 14 con
 respecto a la fase del haz de luz en la región de muestra 55 desde la guía de onda 16. El cambio de la diferencia de
 fase relativa entre estos haces de luz interferentes desplaza la posición de las franjas en el patrón de interferencia
 resultante axialmente con respecto a la región de muestra 55. Opcionalmente, la guía de onda 16 también puede
 comprender un ajustador de fase.

La unidad de formación de imágenes 60 controla el desplazamiento de la franja, por ejemplo, ajustando la corriente
 y/o la tensión suministradas al ajustador de fase 18.

15 A modo de ejemplo, para tomar una imagen SIM de una muestra dentro de la región de muestra, el dispositivo de
 inyección de luz 40 inyecta luz de entrada en la guía de onda de entrada 12 de la interfaz de entrada 11. La guía de
 onda de entrada 12 dirige la luz de entrada al divisor óptico 13 que, a su vez, divide la luz de entrada en primera y
 20 segunda luz de entrada. La primera luz de entrada es recibida por la primera guía de onda 14 desde la primera salida
 del divisor óptico 13, y la segunda luz de entrada es recibida por la segunda guía de onda 15 desde la segunda salida
 del divisor óptico 13. La primera y la segunda guía de onda 14, 15 se curvan hacia la región de la muestra para dirigir
 la segunda luz de entrada a la región de la muestra 55 a lo largo de una primera dirección 14x, y dirigir
 25 la segunda luz de entrada a la región de la muestra 55 a lo largo de una segunda dirección 15x. La primera dirección
 14x y la segunda dirección 15x tienden a una hacia la otra para generar un primer patrón de luz periódico para excitar
 la muestra 50. Preferentemente, la primera y segunda direcciones 14a, 15x son paralelas y opuestas. El patrón de luz
 fluorescente emitido por la muestra 50 como resultado del primer patrón de luz periódico 510 (es decir, el primer patrón
 de excitación) es registrado y procesado por la unidad de formación de imágenes 60, como se explica a continuación.

30 Después de excitar la muestra 50 con el primer patrón de luz periódico (es decir, primer patrón de excitación), la unidad
 de formación de imágenes 60 ajusta la fase del ajustador de fase 18 para desplazar las franjas del primer patrón de
 luz periódico por otro desplazamiento de fase (por ejemplo, $2\pi/3$) a lo largo del eje 55x. El patrón de luz periódico
 desplazada forma un segundo patrón de luz periódico (es decir, un segundo patrón de excitación). Por supuesto, en
 otras realizaciones, el segundo patrón periódico de luz puede formarse desplazando las franjas en cualquier cantidad
 35 entre 0 y $2-\pi$.

A continuación, las franjas se desplazan adicionalmente en $2\pi/5$ (o alternativamente cualquier cantidad) a lo largo del
 eje 55x para formar e iluminar la muestra con un tercer patrón de luz periódico (es decir, un tercer patrón de excitación).

40 Las franjas pueden, por supuesto, desplazarse un número adicional de veces para iluminar la muestra con un número
 adicional de patrones de excitación.

Cada patrón de excitación hará que los fluoróforos de la muestra 50 presenten fluorescencia y emitan luz. La lente
 objetivo 30 recoge la luz emitida por los fluoróforos para cada patrón de excitación. La luz recogida por la lente objetivo
 30 se dirige al dispositivo de detección de fluorescencia 62. El dispositivo de detección de fluorescencia 62 detecta la
 45 luz recibida como señales eléctricas y transmite las señales eléctricas a la unidad de control electrónico 64 para cada
 patrón de excitación. La unidad de control electrónico 64 procesa las señales eléctricas asociadas con todos los
 patrones de excitación utilizando métodos de procesamiento SIM conocidos para producir una imagen de la muestra.

50 La unidad de control electrónico 64 puede comprender cualquier medio de procesamiento adecuado, como uno o más
 de microprocesadores, microcontroladores, ASIC, FPGA, DSP, memoria y memoria que contiene instrucciones de
 software; puede comprender un único dispositivo, como un PC de sobremesa, o puede distribuirse como un servidor
 remoto o una nube de servidores.

55 Opcionalmente, la unidad de formación de imágenes 60 también puede incluir uno o más filtros tales como un filtro de
 banda para filtrar la luz recogida por la lente objetivo 4. Por ejemplo, el filtro puede estar configurado para bloquear la
 luz correspondiente a la luz de excitación y transmitir la luz correspondiente a la luz emitida por los fluoróforos.

60 Se apreciará que en el ejemplo anterior, y en otras realizaciones descritas en el presente documento, se genera un
 patrón de luz periódico (es decir, un patrón de excitación) recibiendo luz desde el dispositivo de inyección de luz 40
 en una cara del componente óptico 10. Esto da lugar a una disposición más sencilla y compacta para iluminar la
 muestra 50 con un patrón de luz periódico que las disposiciones convencionales, ya que, por ejemplo, no se requieren
 componentes opto-mecánicos adicionales para dirigir dos haces de luz de propagación contraria dentro de la región
 de muestra 55 desde dos caras diferentes del componente óptico 10. Además, no se necesitan componentes opto-
 mecánicos, como un espejo móvil, para desplazar las franjas de un patrón de interferencia con respecto a la muestra.

65 En las guías de onda acanalada, se apreciará que el guiado óptico transversal (es decir, en la dirección normal al

plano de las capas) se proporciona mediante el contraste de índice de refracción entre la capa de núcleo 203 y las capas de revestimiento 202, 204. El guiado óptico lateral se consigue mediante una cresta que se extiende parcialmente a través de la capa de revestimiento superior 204, pero no a través de la capa de núcleo 203 de la guía de onda. El guiado óptico lateral en la estructura de la guía de onda de cresta 400b aumenta la intensidad de la luz evanescente (es decir, el campo evanescente) que se propaga fuera de la capa central 203. En consecuencia, en comparación con el uso de una estructura de guía de onda de losa convencional 400a (que no tiene cresta), la intensidad de la luz evanescente que se superpone a la región de muestra 55 aumenta. De este modo, al utilizar una estructura de guía de onda acanalada, se aumenta la intensidad de la luz de excitación que interactúa con la muestra 50 y, por tanto, se produce una fluorescencia más intensa. Otra ventaja de las guías de onda acanaladas frente a las de losa (que sólo proporcionan guiado óptico transversal) es que permiten curvas y giros más pronunciados con menos fugas de luz. De este modo, se pueden utilizar curvas y giros más pronunciados en la guía de onda para proporcionar un componente óptico 10 más compacto con una huella reducida. En particular, pueden utilizarse curvas y giros más pronunciados en la guía de onda para dirigir la luz de entrada desde un lado del componente óptico (por ejemplo, desde la interfaz de entrada) a diferentes lados de la región de muestra 55 y a lo largo de diferentes direcciones dentro de la región de muestra 55 para generar diferentes patrones de luz periódicos.

Para reducir aún más las pérdidas por curvatura en la guía de onda, y por lo tanto permitir curvas y giros aún más agudos para hacer que el componente óptico sea aún más compacto, las guías de onda en las realizaciones del presente documento pueden estar en forma de guías de onda en tira. Como se ilustra en la figura 4c, las guías de onda en tira 400C también tienen una cresta que proporciona guiado óptico lateral. Sin embargo, a diferencia de las guías de onda acanalada, la cresta se extiende a través de la capa superior de revestimiento 204 y a través (o al menos parcialmente) de la capa central 203 de la guía de onda. Otra ventaja de utilizar guías de onda en tira 400C es que aumentan la intensidad del campo evanescente que se propaga fuera de la capa central. En consecuencia, en las realizaciones en las que sólo el campo evanescente se dirige a la región de la muestra, la intensidad del patrón de luz periódico que ilumina la muestra puede aumentarse utilizando una guía de onda en tira 400c para dirigir la luz a la región de la muestra. Así, por ejemplo, las guías de onda 14 y 15 de la figura 2 pueden ser guías de onda en tira.

En realizaciones alternativas, las guías de onda del presente ejemplo pueden ser guías de onda de losa, particularmente en casos en los que no se requieran altas potencias y curvas/giros pronunciados. También se apreciará que las guías de onda de placa pueden ser preferibles en algunos casos porque son más fáciles y baratas de fabricar y pueden implicar menos o ninguna etapa de fotolitografía en comparación con las guías de onda acanalada y de losa.

Generalmente, para los rangos de longitud de onda y guías de onda descritos en el presente documento, el guiado óptico lateral puede ser despreciable para anchuras de cresta superiores a 20 micras.

En las realizaciones del presente documento, las guías de onda acanalada, tira y losa se forman preferentemente sobre un sustrato de silicio o transparente 201 y comprenden una capa de núcleo delgada 203 (preferentemente menos de 500 nm e idealmente 100-200 nm) de pentóxido de tántalo Ta_2O_5 o nitruro de silicio Si_3N_4 , una capa de revestimiento inferior 202 de dióxido de silicio SiO_2 , y una capa de revestimiento superior 204 de dióxido de silicio SiO_2 . Los revestimientos superior 204 e inferior 202 pueden fabricarse alternativamente con un material cuyo índice de refracción se aproxime al índice de refracción de la muestra 50 (por ejemplo, $n=1,38$). Sin embargo, en otras realizaciones, el sustrato del componente óptico puede ser de vidrio. Adicional o alternativamente, la capa de revestimiento superior de las guías de onda puede ser aire. En las realizaciones en las que la capa de revestimiento superior de las guías de onda es aire, la muestra puede iluminarse con un patrón de excitación formado por la interferencia de haces de luz evanescente colocándola directamente sobre la parte superior de las guías de onda en la región en la que se encuentran para interferir sus respectivos haces de luz. En este caso, la región de la muestra es la región donde la muestra es iluminada por los haces de luz interferentes y la región de la muestra puede no comprender un pocillo de muestra.

Las crestas de las guías de onda acanalada 200b y las guías de onda en tira 200C pueden definirse mediante un proceso de grabado adecuado. Por ejemplo, el fresado por haz de iones o el grabado iónico reactivo pueden utilizarse para grabar la capa de revestimiento superior 204 para definir una cresta. La capa de revestimiento superior 204 se graba preferentemente a una profundidad de 200 nm por encima de la capa de núcleo 203. Se ha comprobado que el fresado por haz de iones reduce ventajosamente la rugosidad de la pared lateral de la guía de onda. De este modo, pueden reducirse las pérdidas de propagación óptica dentro de una estructura de guía de onda.

En las realizaciones del presente documento, la dirección de uno o más de los haces interferentes dentro de la región de muestra puede estar desplazada angularmente con respecto a la dirección de otro haz interferente dentro de la región de muestra. El desplazamiento angular puede estar comprendido entre 0 y 180 grados. Por ejemplo, en referencia a la figura 2, la guía de onda 16 puede curvarse hacia un lado no opuesto de la región de muestra (por ejemplo, el lado 55c en la figura 2) y acoplarse ópticamente con él para dirigir la luz de entrada a la región de muestra 55 (es decir, el pocillo de muestra) en un ángulo comprendido entre 0 y 180 grados con respecto a la primera dirección 14x. Como ejemplo adicional, la región de muestra 55 puede acoplarse directamente a la segunda salida del divisor óptico 13 para dirigir la segunda luz de entrada a la región de muestra 55 desde el lado 55c a lo largo de una dirección que está angularmente desplazada con respecto a la primera dirección 14x.

En las realizaciones del presente documento, los ajustadores de fase son preferentemente un ajustador de fase activo tal como un ajustador de fase térmico o un ajustador de fase electroóptico. Sin embargo, en realizaciones alternativas, los ajustadores de fase pueden ser un ajustador de fase pasivo. Un ajustador de fase pasivo puede ser, por ejemplo, un hueco rellenable en la capa de revestimiento superior de una guía de onda respectiva a la que está acoplado el ajustador de fase, en el que el relleno selectivo del hueco con materiales de índice de refracción diferente (por ejemplo, dióxido de silicio, PMMA o SU8) cambia el índice de refracción efectivo de la guía de onda.

Opcionalmente, el dispositivo de inyección de luz en las realizaciones del presente documento puede comprender una fibra óptica que dirige la luz desde la fuente de luz a la interfaz de entrada del componente óptico. Además, opcionalmente, la lente puede acoplar la luz de la fibra óptica a la interfaz de entrada.

Además opcionalmente, un multiplexor óptico tal como un conmutador óptico puede estar dispuesto para dirigir selectivamente la luz de la fuente de luz a lo largo de uno o más trayectorias diferentes, en el que cada trayectoria se inyecta en una o más entradas diferentes de la interfaz de entrada por la lente y/o una fibra óptica. En otras realizaciones, el dispositivo de inyección de luz puede inyectar luz de entrada con una o más longitudes de onda diferentes en la interfaz de entrada de un componente óptico. Las diferentes longitudes de onda de la luz de entrada pueden ser generadas por un láser sintonizable, o un conjunto de fuentes de luz que comprenda una fuente de luz para cada longitud de onda. La longitud o longitudes de onda de la luz de entrada se seleccionan para que los marcadores emisores de luz emitan luz, por ejemplo, la longitud o longitudes de onda de la luz de entrada pueden estar en el espectro visible (de 400 a 800 nanómetros) o cerca del infrarrojo (de 800 a 1500 nanómetros). Además, cada fuente de luz puede ser una fuente de luz láser, como un láser de estado sólido, un láser de fibra o un láser de diodo. Adicional o alternativamente, cada fuente de luz puede ser una fuente de luz LED o cualquier otra fuente de luz adecuada para SIM. En las figuras 7, 9, 10 y 13 se ilustran ejemplos de tales disposiciones alternativas de dispositivos de inyección de luz.

Opcionalmente, la guía o guías de onda, el divisor o divisores ópticos, los ajustadores de fase y la región de muestra 55 de las realizaciones del presente documento pueden estar integrados monolíticamente en el sustrato 201 del componente óptico 10.

Opcionalmente, las guías de onda pueden comprender una región de extremo ensanchado 15, 17, como se ejemplifica en la figura 2. La región de extremo abocinado 15, 17 se ensancha a lo largo de su longitud para aumentar la anchura de un pocillo de muestra 55. El aumento de la anchura de la guía de onda amplía la anchura del campo de luz óptica que se propaga a lo largo de la guía de onda y permite un pocillo de muestra 55 más grande para alojar una muestra 50. Un pocillo de muestra 55 más grande combinado con un campo de luz de excitación más amplio permite ventajosamente obtener imágenes de un área de muestra más grande para la obtención de imágenes SIM.

El pocillo de muestra 55 puede formarse utilizando técnicas de fotolitografía y grabado (por ejemplo, grabado húmedo o fresado por haz de iones) para definir un hueco en la capa de revestimiento superior 204 de las guías de onda respectivas. Por ejemplo, el grabado en húmedo puede utilizarse para definir un pocillo de muestra 55 en la cresta de la guía de onda acanalada 400b o de la guía de onda en tira 400c.

En las realizaciones del presente documento, el pocillo de muestra 55 puede definirse en la capa de revestimiento superior 204 de una sola guía de onda (por ejemplo, la guía de onda 14).

Antes de colocar la muestra en la región de muestra, el componente óptico puede limpiarse sumergiendo el componente óptico 10 en Hellmanex™ al 5 % (v/v) (de Sigma Aldrich™) durante 10 minutos a 70 °C. Posteriormente, el Hellmanex™ puede eliminarse sumergiéndolo en primer lugar en agua desionizada, en segundo lugar en isopropanol (de Sigma Aldrich™), y en tercer lugar en agua desionizada.

El pocillo de muestra en las realizaciones descritas en el presente documento puede contener una biocapa 205 dispuesta sobre la capa de núcleo de guía de onda 203 como se ilustra en la figura 3. La biocapa impide la unión inespecífica de los fluoróforos de la muestra a la capa 203 del núcleo de la guía de onda y puede comprender BSA o PEG. Además, la biocapa 205 facilita el cultivo de una muestra directamente dentro del pocillo de muestras. La biocapa 205 es preferible pero no obligatoria. Además, el grosor de la biocapa 205 se selecciona para garantizar que el patrón de luz periódico generado por los campos evanescentes interferentes siga solapándose con la muestra en el pocillo de muestras y suele ser inferior a 20 nm.

Opcionalmente, las muestras pueden prepararse directamente en el pocillo de muestra siguiendo protocolos estándar como, por ejemplo, protocolos conocidos utilizados para la fijación de células a cubreobjetos de vidrio.

La figura 6 ilustra una disposición alternativa en la que las facetas de extremo 614', 616' de las guías de onda primera y segunda 614, 616 definen el pocillo de muestra 655 (es decir, la región de muestra 655). El pocillo de muestra 655 puede definirse terminando cada guía de onda hasta, o a través de, la capa de sustrato 201. Normalmente, la guía de onda puede terminarse grabando o hendiendo la guía de onda. Se apreciará que el término faceta final aquí tiene su significado habitual en la técnica y, en consecuencia, es la cara de salida de la guía de onda de la que sustancialmente

todo el modo óptico guiado en la capa de núcleo se emite. En el ejemplo ilustrado en la figura 3, se apreciará que las guías de onda 14 y 15 no tienen una faceta final, ya que las guías de onda se unen para formar una capa central continua 203 debajo del pocillo de muestra 55.

5 En el ejemplo ilustrado en la figura 6, la primera luz de entrada guiada a lo largo de la guía de onda 614 se dirige desde la faceta de extremo de la guía de onda 614' al pocillo de muestra 655. Del mismo modo, la segunda luz de entrada guiada a lo largo de la guía de onda 616 se dirige desde la faceta final de la guía de onda 616' hacia el pocillo de muestras 655 a lo largo de una segunda dirección. Dado que la segunda dirección tiende hacia la primera, el primer haz de luz de la guía de onda 614 interfiere con el segundo haz de luz de la guía de onda 616 para formar un patrón de interferencia periódica para iluminar la muestra.

10 Las figuras 7-10 ilustran realizaciones en las que el componente óptico comprende guías de onda adicionales y, en algunos casos divisores ópticos adicionales, para dirigir la luz de entrada a una región de muestra a lo largo de diferentes direcciones. Como se describe más adelante, las múltiples direcciones de entrada permiten al componente óptico rotar un patrón de luz periódico dado con respecto a un eje de la región de la muestra (es decir, cambiar la orientación de un patrón de excitación con respecto a la muestra). Además, las múltiples direcciones de entrada permiten generar patrones de interferencia periódicos con más de dos haces de luz de entrada. Además, permite que los haces de luz se dirijan a la región de la muestra a lo largo de direcciones que no son paralelas a la dirección de otro haz de luz. De este modo, los componentes ópticos de la presente invención no se limitan a interferir únicamente los haces de luz que se propagan en sentido contrario dentro de la región de la muestra.

15 La figura 7 ilustra un componente óptico 710 que comprende seis guías de onda 714-719, que son preferentemente guías de onda acanalada bidimensionales 400b. Las guías de onda 714-719 no están conectadas entre sí y terminan en una cara común del componente óptico 710. Las porciones de extremo terminadas están acopladas ópticamente al dispositivo de inyección de luz 740 y, en consecuencia, definen una interfaz de entrada 711 del componente óptico 710. Cada una de las guías de onda se curva hacia diferentes lados de la región de la muestra, y están acopladas ópticamente a ellos, para dirigir la luz de entrada desde el dispositivo de inyección de luz 740 a la región de la muestra 755 a lo largo de seis direcciones diferentes 714a-719a.

20 Específicamente, las guías de onda 714 y 715 están dispuestas para dirigir la luz de entrada a la región de muestra 755 a lo largo de las direcciones 714a y 715a, respectivamente. Las direcciones 714a y 715a son direcciones opuestas a lo largo de un primer eje 755x de la región de muestra 755. Las guías de onda 716 y 717 están dispuestas para dirigir la luz de entrada a la región de muestra 755 a lo largo de las direcciones 716a y 717a, respectivamente. Las direcciones 716a y 717a son direcciones opuestas a lo largo de un segundo eje 755y de la región de muestra 755. El segundo eje 755y está desplazado angularmente 60 grados con respecto al primer eje 755x, y en consecuencia las direcciones 716a y 717a están desplazadas 60 grados con respecto a las direcciones 714a y 715a. Las guías de onda 718 y 719 están dispuestas para dirigir la luz de entrada a la región de muestra 755 a lo largo de las direcciones 718a y 719a, respectivamente. Las direcciones 718a y 719a son direcciones opuestas a lo largo de un tercer eje 755z de la región de muestra 755. El segundo eje 755y está desplazado angularmente 60 grados con respecto al primer eje 755x y al segundo eje 755y. Por consiguiente, las direcciones 718a y 719a están desplazadas 60 grados con respecto a las direcciones 714a y 715a, y 60 grados con respecto a las direcciones 716a y 717a.

25 Para iluminar un área mayor de la región de muestra 755, cada guía de onda 714-719 comprende preferentemente una región de extremo ensanchado 714b-719b para expandir el campo óptico de su respectiva luz de entrada antes de que se dirija a la región de muestra 755.

30 El dispositivo de inyección de luz 740 comprende una fuente de luz 742 (por ejemplo, una fuente de luz láser visible o casi infrarroja), un divisor de haz 745, dos moduladores de amplitud 718a, 718b, dos multiplexores ópticos 719a, 719b, y una lente 746. El dispositivo de inyección de luz 740 genera seis posibles haces de luz 744a-744f, cada uno de los cuales se acopla ópticamente a una guía de onda 714-719 respectiva mediante la lente 746. Los seis haces de luz posibles se generan de la siguiente manera. En primer lugar, la luz del láser 742 se divide en dos haces mediante un divisor de haz 745. Los dos haces de luz se dirigen entonces a un respectivo ajustador de amplitud 718a, 718b antes de ser enviados a un respectivo multiplexor óptico 719a, 719b. El ajustador de amplitud 719a, 719b controla la visibilidad de las franjas de interferencia en el patrón de luz periódico mediante el ajuste de la amplitud de la luz que se inyecta en las guías de onda 714-719. Los multiplexores ópticos 719a, 719b son preferentemente del tipo utilizado en redes de telecomunicaciones (por ejemplo, conmutadores ópticos 40G) y están configurados para emitir selectivamente cualquiera de los haces de luz 744a, 744b, 744c, 744d, 744e y 744f, o una combinación de estos. Al controlar qué haces de luz emitir, los multiplexores ópticos 719a, 719b controlan selectivamente en cuál de las guías de onda 714-719, o en qué combinación de guías de onda 714-179, se inyecta la luz de entrada.

35 Se apreciará que en este ejemplo, puede inyectarse luz en dos o más cualesquiera de las guías de onda 714-719 para generar un patrón de luz periódico. Además, pueden generarse diferentes patrones periódicos de luz para iluminar la muestra inyectando luz en diferentes combinaciones de guías de onda (por ejemplo, utilizando las guías de onda 714, 715 y 718 para dirigir la luz a la región de la muestra 755 a lo largo de las direcciones 714a, 715a y 718a, respectivamente). Además, se apreciará que la orientación de las franjas en un patrón de luz periódico dado puede rotarse en relación con la región de muestra dirigiendo selectivamente la luz a la región de muestra 755 desde

combinaciones apropiadas de guías de onda. Por ejemplo, como se muestra en la figura 8, un patrón de luz periódico 800a-800c "similar a una rejilla" (que se genera dirigiendo dos haces de luz que se propagan en sentido contrario hacia la región de la muestra 755 desde guías de onda opuestas, por ejemplo, 714 y 715) puede generarse en diferentes orientaciones relativas a la región de la muestra 755 dirigiendo la luz hacia la región de la guía de onda 755 desde diferentes pares de guías de onda opuestas (por ejemplo, 714 y 715, 716 y 717, y 718 y 719).

Para obtener una imagen SIM de una muestra que reside dentro de la región de muestra 755 utilizando el patrón de luz periódico "similar a una rejilla" 800a-800c mostrado en la figura 8, se pueden seguir las siguientes etapas.

En primer lugar, se inyecta luz de entrada en las guías de onda 714 y 715 para dirigir haces de luz de propagación contraria a lo largo del eje 755x en la región de la muestra. La interferencia de los dos haces de propagación contraria genera un primer patrón de luz periódico 800b para excitar la muestra. El patrón de luz fluorescente emitido por la muestra como resultado del primer patrón de luz periódico 800b (es decir, el primer patrón de excitación) es recogido por una lente objetivo 30, y registrado y procesado por una unidad de formación de imágenes 60, según las realizaciones antes mencionadas.

A continuación, para cambiar la orientación del primer patrón de luz periódico con respecto a la región de muestra 755, el multiplexor óptico se configura para inyectar luz de entrada en las guías de onda 716 y 717 con el fin de dirigir haces de luz de propagación contraria a lo largo del eje 755y en la región de muestra 755. El patrón de interferencia resultante forma un segundo patrón de luz periódico (es decir, un segundo patrón de excitación). El patrón de luz fluorescente emitido desde la muestra como resultado del segundo patrón de luz periódico 800b es recogido por la lente objetivo 30, y registrado y procesado por una unidad de imagen 60.

Posteriormente, para cambiar aún más la orientación del primer patrón de luz periódico con respecto a la región de muestra 755, el multiplexor óptico se ajusta para inyectar luz de entrada en las guías de onda 718 y 719 con el fin de dirigir haces de luz de propagación contraria a lo largo del eje 755z en la región de muestra 755. El patrón de interferencia resultante forma un tercer patrón de luz periódico (es decir, un tercer patrón de excitación). El patrón de luz fluorescente emitido por la muestra como resultado del tercer patrón de luz periódico 800c es recogido por la lente objetivo 30, y registrado y procesado por una unidad de imagen 60.

La orientación del primer patrón de luz periódico puede, por supuesto, cambiarse un número adicional de veces para iluminar la muestra con un número adicional de patrones de excitación. Se entenderá que, en algunos ejemplos, la longitud de onda de la luz de entrada puede variar entre las diferentes orientaciones, de modo que los patrones no necesariamente tienen todos el mismo período.

Finalmente, como en las realizaciones anteriores, la unidad de control electrónico 64 de la unidad de formación de imágenes 60 procesa las señales eléctricas asociadas con todos los patrones de excitación utilizando métodos de procesamiento SIM conocidos para producir una imagen SIM de la muestra.

Preferentemente, los pares de guías de onda opuestas (por ejemplo, 714 y 715) pueden comprender cada uno un ajustador de fase acoplado a una de las guías de onda (por ejemplo, 714). El ajustador de fase puede utilizarse para desplazar el espaciado de franja de los patrones de luz periódicos para cada orientación con el fin de generar más patrones de excitación. La unidad de formación de imágenes 60 puede utilizar los patrones de emisión resultantes de estos patrones de excitación adicionales para generar una imagen SIM.

Opcionalmente, los ajustadores de amplitud (por ejemplo, absorbedores de luz variables) pueden ajustarse para aumentar el contraste entre las franjas de interferencia en los diversos patrones de luz de periodo (es decir, patrones de excitación).

La figura 9 muestra un ejemplo de una disposición en la que el número de entradas en la interfaz de entrada 911 se reduce mediante el uso de divisores ópticos 913a-913c para acoplar la luz de entrada desde el dispositivo de inyección de luz 940 a una o más guías de onda 914-919 para dirigir la luz de entrada a la región de muestra 955 a lo largo de una o más direcciones diferentes 914a-919a.

Como se muestra, la interfaz de entrada 911 del componente óptico 910 comprende tres divisores ópticos de rama y 913a-913c. La entrada de cada divisor óptico 913a-913c termina en la cara izquierda del componente óptico 910 y está dispuesta para recibir luz de entrada inyectada en el componente óptico 940 desde el dispositivo de inyección de luz 940. Las dos salidas de cada divisor óptico 913a-913c están cada una acoplada ópticamente a una guía de onda 914-919 respectiva. Las guías de onda 914-919 son preferentemente guías de onda acanaladas y cada guía de onda se curva hacia, y está acoplada ópticamente a, diferentes lados de la región de muestra 955 para dirigir la luz de entrada desde el dispositivo de inyección de luz 940 a la región de muestra 955 a lo largo de seis direcciones diferentes 914a-919a.

Específicamente, las guías de onda 914 y 915 están dispuestas para dirigir la luz de entrada a la región de muestra 955 a lo largo de las direcciones 914a y 915a, respectivamente. Las direcciones 914a y 915a son direcciones opuestas a lo largo de un primer eje 955x de la región de muestra 955. Las guías de onda 916 y 917 están dispuestas para

dirigir la luz de entrada a la región de muestra 955 a lo largo de las direcciones 916a y 917a, respectivamente. Las direcciones 916a y 917a son direcciones opuestas a lo largo de un segundo eje 955y de la región de muestra 955. El segundo eje 955y está desplazado angularmente 60 grados con respecto al primer eje 955x. En consecuencia, se apreciará que las direcciones 916a y 917a están desplazadas 60 grados con respecto a las direcciones 914a y 915a. Las guías de onda 918 y 919 están dispuestas para dirigir la luz de entrada a la región de muestra 955 a lo largo de las direcciones 918a y 919a, respectivamente. Las direcciones 918a y 919a son direcciones opuestas a lo largo de un tercer eje 955z de la región de muestra 955. El segundo eje 955y está desplazado angularmente 60 grados con respecto al primer eje 955x y al segundo eje 955y. Por consiguiente, las direcciones 918a y 919a están desplazadas 60 grados con respecto a las direcciones 914a y 915a, y 60 grados con respecto a las direcciones 916a y 917a.

Para iluminar un área mayor de la región de muestra 955, cada guía de onda 914-919 comprende preferentemente una región de extremo ensanchado para expandir el campo óptico de su respectiva luz de entrada antes de que se dirija a la región de muestra 955.

El dispositivo de inyección de luz 940 comprende una fuente de luz 942 (por ejemplo, una fuente de luz láser visible o casi infrarroja), una fibra óptica 944, un multiplexor óptico 919, y una lente 946. La luz procedente de la fuente de luz 942 se dirige al multiplexor óptico 919 a través de la fibra óptica 942. Como en otras realizaciones, el multiplexor óptico 919 es preferentemente del tipo utilizado en redes de telecomunicaciones y está dispuesto para controlar qué guía de onda, o guías de onda, inyecta la luz de entrada. Preferentemente, el multiplexor óptico está optimizado para las longitudes de onda aquí descritas, por ejemplo, longitudes de onda visibles en la región de 400-700 nm.

En este ejemplo, se apreciará que la inyección de luz de entrada en el divisor óptico 913a dará como resultado haces de luz de propagación contraria que se inyectan en la región de muestra 955 a lo largo del eje 955x desde el par de guías de onda 914 y 915. La luz de entrada de estas guías de onda 914, 915 viajará a la región de muestra 955 a lo largo de las direcciones 914a y 915a, respectivamente, e interferirá para generar un primer patrón de luz periódico 800b. La luz de entrada inyectada en el divisor óptico 913b hará que la luz de entrada sea inyectada en la región de muestra 955 a lo largo de las direcciones 916a y 917b por el par de guías de onda 916 y 917. La luz de entrada que viaja dentro de la región de muestra 955 a lo largo de las direcciones 916a y 917b interferirá para generar un segundo patrón de luz periódico 800c. Puede generarse un tercer patrón de luz periódico inyectando luz de entrada en el divisor óptico 913c para dirigir la luz de entrada a la región de muestra 955 a lo largo de las direcciones 918a y 919a utilizando las guías de onda 918 y 919.

Así, se apreciará que la luz de entrada puede inyectarse en dos o más cualesquiera de los divisores ópticos para generar diferentes patrones de luz periódicos. Además, la orientación del patrón de luz periódico puede girarse con respecto a la región de la muestra cambiando el divisor óptico que inyecta la luz de entrada.

En consecuencia, por ejemplo, para obtener una imagen SIM de una muestra con esta disposición, el dispositivo de inyección de luz 940 puede iluminar secuencialmente una muestra dentro de la región de muestra 955 con el primer, segundo y tercer patrones de luz periódicos inyectando secuencialmente luz de entrada en los divisores ópticos 913a, 913b y 913c. El patrón de luz emitido desde la muestra como resultado de los diferentes patrones periódicos de luz puede ser recogido por una lente y procesado por una unidad de imagen 60 para generar una imagen SIM de la muestra utilizando técnicas conocidas de procesamiento SIM, según las otras realizaciones aquí descritas.

Preferentemente, las guías de onda 914-919 pueden comprender cada una un ajustador de fase 918a-918c, 918a'-918c'. Al igual que en las realizaciones anteriores, el ajustador de fase puede utilizarse para desplazar el espaciado de franja de los patrones de luz periódicos para cada orientación con el fin de generar patrones de excitación adicionales. La unidad de formación de imágenes 60 puede utilizar los patrones de emisión resultantes de estos patrones de excitación adicionales para generar una imagen SIM.

En las disposiciones anteriores, se apreciará que la orientación y la posición de las franjas del patrón de luz periódico pueden cambiarse con respecto a la región de muestra sin tener que mover el dispositivo de inyección de luz y/o el componente óptico. Además, el dispositivo de inyección de luz 940 inyecta luz de entrada en una sola cara del componente óptico 955, lo que resulta en una configuración de imagen SIM más compacta en comparación con las configuraciones convencionales. Además, en las realizaciones que comprenden un multiplexor óptico, la generación de los primer, segundo y tercer patrones de luz periódicos está limitada únicamente por la velocidad del multiplexor óptico, en lugar del movimiento de los componentes opto-mecánicos (por ejemplo, el espejo móvil) como en los montajes convencionales. Esto es ventajoso, ya que los multiplexores ópticos actuales, como los de telecomunicaciones, tienen velocidades de modulación de más de 1 GHz y esto es mucho más rápido que los componentes opto-mecánicos actuales, que suelen tener velocidades de modulación en el rango de los KHz.

En una disposición alternativa, las franjas de un patrón de interferencia periódica dado pueden desplazarse axialmente acortando o alargando la longitud del trayectoria óptica de al menos uno de los haces que interfieren. En el ejemplo anterior, esto se consigue preferentemente utilizando un ajustador de fase (es decir, 918a-c), como un ajustador de fase térmico. Sin embargo, en una variante, esto se consigue dirigiendo selectivamente la luz a una guía de onda desde dos divisores ópticos diferentes que tienen dos longitudes de trayectoria óptica diferentes. Las diferentes longitudes del trayectoria óptica pueden conseguirse, por ejemplo, fabricando los divisores ópticos con diferentes

materiales de índice de refracción o, preferentemente, teniendo una mayor longitud de salida (por ejemplo, una salida de rama y más larga).

La figura 10 ilustra una disposición en la que cada guía de onda 1014-1019 está acoplada para recibir luz de entrada de dos divisores ópticos de rama y 1013a-1013f diferentes. Así, por ejemplo, la guía de onda 1014 se acopla a una de las salidas del divisor óptico 1013a y a una de las salidas del divisor óptico 1013b. Dado que la salida del divisor óptico 1013a tiene una longitud de trayectoria óptica relativamente más corta que la salida del divisor óptico 1013b, la fase del haz de luz (relativa a otro haz de luz interferente) dirigido a la región de muestra 1055 desde la guía de onda 1014 puede alterarse dependiendo de si se utiliza el divisor óptico 1013a o el divisor óptico 1013b para inyectar luz en la primera guía de onda 1014. La selección del divisor óptico 1013a-1013f a utilizar depende, por supuesto, del divisor óptico 1013a-1013f en el que se inyecta la luz de entrada desde el dispositivo de inyección de luz 1040. Por ejemplo, el dispositivo de inyección de luz 1040 puede utilizar el multiplexor óptico 1046 para controlar en qué divisor óptico 1013a-1013f inyectar la luz procedente de la fuente de luz 1042.

En este ejemplo, cada una de las guías de onda 1014-1019 del componente óptico 1055 está dispuesta para recibir luz de entrada de una salida de dos divisores ópticos diferentes, en el que las salidas tienen diferentes longitudes de trayectoria óptica. En consecuencia, la fase relativa de la luz de entrada que se dirige a la región de muestra 1055 desde una guía de onda 1014-1019 determinada se ajusta seleccionando de qué divisor óptico recibe la luz de entrada la guía de onda.

Así, por ejemplo, para obtener una imagen SIM de una muestra que reside dentro de la región de muestra 1055 puede inyectarse primero luz de entrada en el divisor óptico 1013a para iluminar la muestra con un primer patrón de interferencia periódica. A continuación, para desplazar axialmente la posición de las franjas del primer patrón de interferencia periódica (por ejemplo, para desplazar linealmente la franja en $\pi/3$ a lo largo del eje 1055x de la región de muestra 1055) se puede inyectar luz de entrada en el divisor óptico 1013b.

Para cambiar (por ejemplo, rotar) la orientación de las franjas en el primer patrón de interferencia periódica con respecto a la región de muestra 1055 (es decir, y de ese modo iluminar la región de muestra 1055 con un segundo patrón de interferencia periódica) puede inyectarse luz de entrada en el divisor óptico 1013c. Las franjas del patrón de luz del segundo período pueden desplazarse axialmente inyectando luz de entrada en el divisor óptico 1013d.

Para cambiar aún más la orientación de las franjas en el primer patrón de interferencia periódica con respecto a la región de muestra 1055 (y de ese modo iluminar la región de muestra 1055 con una luz de interferencia de tercer período), puede inyectarse luz de entrada en el divisor óptico 1013e. Las franjas del patrón de luz del tercer período pueden desplazarse axialmente inyectando luz de entrada en el divisor óptico 1013f.

Al igual que en las otras realizaciones, la luz de la muestra en respuesta a los diferentes patrones de luz periódicos de iluminación (es decir, los diferentes patrones de iluminación asociados con las diferentes orientaciones y desplazamientos de franja) puede recogerse y procesarse utilizando métodos de procesamiento SIM conocidos para generar una imagen SIM de la muestra.

En una realización alternativa, un componente óptico similar al ilustrado en la figura 10 puede comprender tres divisores ópticos de rama y adicionales, haciendo un total de nueve divisores ópticos de rama y, alimentados desde nueve entradas respectivas en la interfaz de entrada 1011, como se muestra en la figura 10b. Cada una de las seis guías de onda 1014-1019 está acoplada para recibir luz de entrada de tres divisores de rama y diferentes.

En otras disposiciones, pueden añadirse más de tres divisores ópticos de rama y adicionales al componente óptico de la figura 10. Por supuesto, también puede haber más de seis guías de onda que emitan luz a la región de la muestra.

Para generar imágenes SIM 3D, también es necesario dirigir la luz de entrada a la región de la muestra a lo largo de una dirección inclinada con respecto al plano de la región del núcleo del componente óptico. Esto puede lograrse en las realizaciones del presente documento mediante el uso de un acoplador de rejilla y guía de onda como se ilustra en la figura 11, o dirigiendo la luz a la región de la muestra utilizando una lente objetivo como se ilustra en la figura 13.

En la figura 11, un acoplador de guía de onda evanescente 1120 se coloca por debajo, y se acopla ópticamente, a una guía de onda 1114 del componente óptico 1155 (por ejemplo, puede ser una de las guías de onda del componente óptico antes mencionadas o una guía de onda separada y dedicada para dirigir la luz a la región de muestra 1155 a través del acoplador de guía de onda 1120) con el fin de recibir parte de la luz de entrada en la guía de onda 1114. Preferentemente, el acoplador de guía de onda evanescente 1120 está dispuesto entre el sustrato del componente óptico 1155 y la capa central de la guía de onda 1114 de forma que se solapa con el campo evanescente de la luz de entrada en la guía de onda 1114. Un resultado de este solapamiento es que parte de la luz de entrada en la guía de onda 1114 se acoplará en el acoplador de guía de onda evanescente 1120. El acoplador de guía de onda 1120 está dispuesto para dirigir la luz recibida hacia una rejilla 1121 situada debajo de la región de muestra 1155. Típicamente, el acoplador de guía de onda evanescentes 1120 puede comprender una capa central para guiar la luz recibida a lo largo de su longitud, de la misma manera que las guías de onda antes mencionadas. La capa de núcleo puede estar intercalada entre una capa de revestimiento superior y una capa de revestimiento inferior, y la rejilla 1121 puede estar

grabada en la capa de revestimiento superior para solaparse con el campo evanescente de la luz guiada en el acoplador de guía de onda evanescente 1120. La rejilla 1121 puede disponerse utilizando técnicas conocidas para dirigir parte de la luz superpuesta hacia la región de muestra 1155 situada encima. Esta luz dirigida hacia arriba 1122 tendrá, por supuesto, un ángulo relativo al plano de la región de muestra 1155. Además, esta luz dirigida hacia arriba 1122 también tendrá un ángulo relativo a las direcciones 1114a, 1115a a lo largo de las cuales se inyecta la luz de entrada en la región de muestra 1155 desde las guías de onda 1114, 1115. Se apreciará que el uso de "hacia arriba" aquí no limita estas realizaciones de ser utilizado en otras orientaciones.

La figura 12 ilustra una simulación del patrón de luz periódico 3D que se genera como resultado de (i) dirigir la luz de entrada desde una rejilla 1121 en la región de muestra 1155 en una dirección ortogonal relativa al plano de la región de muestra 1155, y (ii) dirigir (por ejemplo, con cualquiera de las mencionadas guías de onda opuestas) la luz de entrada en la región de muestra 1155 a lo largo de direcciones opuestas y paralelas 1114a, 1115a en el plano de las guías de onda 1114, 1115.

A modo de ejemplo, pueden realizarse las siguientes etapas para obtener una imagen SIM 3D de una muestra. En primer lugar, la luz de entrada 1122 puede dirigirse hacia arriba desde la rejilla 1121 hacia la región de muestra 1155, de forma que interfiera con el primer patrón de luz periódico 800b de la figura 8. A continuación, la luz de entrada 1122 procedente de la rejilla 1121 puede ser interferida con el segundo patrón de luz periódico 800c de la figura 8. Posteriormente, la luz de entrada 1122 procedente de la rejilla 1121 puede ser interferida con el tercer patrón de luz periódico 800a de la figura 8.

Opcionalmente, las franjas del primer, segundo y tercer patrones de luz periódicos pueden desplazarse utilizando un ajustador de fase, según las realizaciones anteriores.

La luz emitida por la muestra en respuesta a los diferentes patrones de luz periódicos iluminantes (es decir, los diferentes patrones de iluminación asociados con las diferentes orientaciones y desplazamientos de franja) puede recogerse y procesarse utilizando métodos de procesamiento SIM conocidos para generar una imagen SIM 3D de la muestra.

La figura 13 muestra un aparato 1300 para realizar microscopía de fluorescencia, que incluye una lente objetivo 1330, tal como una lente objetivo Plan N 20x/0,4 Olympus™, que tiene un campo de visión delantero 1332 que se enfrenta a una región de muestra 1355 de un componente óptico 1310. También incluye un dispositivo de inyección de luz 1340 acoplado ópticamente a una interfaz de entrada 1311 del componente óptico 1310. Una muestra 1350 se coloca en la región de muestra 1355. El aparato 1300 también incluye una unidad de formación de imágenes 1360 configurada para recibir y procesar la luz recogida por la lente objetivo 1330 dentro del campo de visión delantero 1332. La unidad de formación de imágenes 1360 puede comprender el mismo componente que la unidad de formación de imágenes 60 de la figura 1.

El dispositivo de inyección de luz 40 comprende una lente 1346 y una fuente de luz 1342 que, en este ejemplo, es una fuente láser de longitud de onda visible. La luz procedente de la fuente luminosa se divide en dos haces mediante un divisor externo 1333 (por ejemplo, un divisor multiplexor de fibra óptica). Uno de los haces de salida del divisor 1333 se dirige a una primera lente 1346a mediante una primera fibra óptica 1344a. El otro haz de salida del divisor 1333 se dirige a una segunda lente 1346b mediante una segunda fibra óptica 1344b. La primera lente 1346a está dispuesta para enfocar la luz procedente de la primera fibra óptica 1344a hacia la interfaz de entrada 1311 del componente óptico 1310. El componente óptico 1310 puede formar un primer haz de entrada y un segundo haz de entrada con la luz recibida, y dirigir estos haces a la región de la muestra (por ejemplo, a través de guías de onda 2D) de acuerdo con cualquiera de los métodos y disposiciones divulgados en el presente documento.

La segunda lente 1346b está dispuesta para enfocar la luz procedente de la segunda fibra óptica 1344b sobre un espejo 1347. El espejo 1347 dirige la luz recibida hacia la lente objetivo 1330. La lente objetivo 1330 enfoca la luz del espejo 1347 en la región de muestra 1355 como tercera luz de entrada 1348 en un ángulo de 90 grados relativo al plano de la región de muestra 1355. Sin embargo, en algunas realizaciones, la lente objetivo 1330 puede estar dispuesta para dirigir la tercera luz de entrada a la región de muestra 1355 en cualquier ángulo relativo al plano de la región de muestra 1355. Preferentemente, el campo de visión de la lente objetivo 1330 está orientado hacia la región de muestra 1355, y la lente objetivo 1330 está dispuesta para recoger la luz de la muestra 1350 dentro de la región de muestra 1355.

Para generar imágenes en 3D, el aparato de la figura 13 puede utilizarse para dirigir luz de entrada a la región de la muestra utilizando la lente objetivo 1330 de manera que interfiera con un primer patrón de luz periódico generado por el componente óptico 1310. Por ejemplo, el primer patrón de luz periódico puede ser el patrón de luz periódico 800b de la figura 8b. La tercera luz de entrada procedente de la lente objetivo 1330 puede ser interferida posteriormente con otros patrones de luz periódica generados por el componente óptico 1310 (por ejemplo, la tercera luz de entrada puede ser interferida con el patrón de luz periódico 800c de la figura 8c, y posteriormente con el patrón de luz periódico 800a de la figura 8a).

Opcionalmente, las franjas del primer, segundo y tercer patrones de luz periódicos pueden desplazarse utilizando un

ajustador de fase, según las realizaciones anteriores.

5 La luz emitida por la muestra en respuesta a los diferentes patrones de luz periódicos iluminantes (es decir, los diferentes patrones de iluminación asociados con las diferentes orientaciones y desplazamientos de franja) puede recogerse y procesarse utilizando métodos de procesamiento SIM conocidos para generar una imagen SIM 3D de la muestra.

10 En disposiciones en las que la luz de excitación dirigida sobre la muestra emana de una faceta de borde de la guía de onda, la capa de revestimiento superior de la guía de onda puede ser aire. Es decir, las capas de la guía de onda pueden comprender una región de revestimiento inferior dispuesta sobre el sustrato del componente óptico y una región de núcleo 203 dispuesta sobre la región de revestimiento inferior.

15 En realizaciones alternativas en las que se utiliza aire como capa de revestimiento superior de la guía o guías de onda, se apreciará que la muestra puede colocarse directamente sobre la guía de onda para interactuar con el campo evanescente de la luz guiada dentro de la guía de onda. Por consiguiente, en esta disposición no se necesita un pocillo de muestra y la muestra puede iluminarse con un patrón de interferencia colocándola directamente sobre la guía de onda y guiando dos haces que se propagan en sentido contrario dentro de la guía de onda.

20 En las realizaciones anteriores, los divisores ópticos son un divisor de guía de onda de rama y, aunque se apreciará que pueden ser alternativamente cualquier otro tipo de divisor óptico, tal como un acoplador de interferencia multimodo (MMI) o un acoplador de guía de onda evanescente.

25 Se apreciará por los expertos en la materia que la invención se ha ilustrado describiendo varias realizaciones específicas de la misma, pero no se limita a estas realizaciones; son posibles muchas variaciones y modificaciones, dentro del ámbito de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un componente óptico (910) para iluminar una región de muestra (955) con un patrón de luz periódico, comprendiendo el componente óptico una primera guía de onda (914), una guía de onda adicional (916, 917, 918, 919), y un divisor óptico (913a), teniendo el divisor óptico (913a) (i) una entrada (911) para recibir luz de entrada, (ii) una primera salida, y (iii) una segunda salida, en el que:
- 10 la primera salida del divisor óptico (913a) se acopla ópticamente a la primera guía de onda (914) para dirigir la primera luz de entrada a la primera guía de onda;
- 10 la primera guía de onda (914) está dispuesta para utilizar la reflexión interna total para dirigir la primera luz de entrada a la región de muestra (955) a lo largo de una primera trayectoria en una primera dirección (914a);
- 15 la segunda salida del divisor óptico (913a) se acopla ópticamente a la región de muestra (955) para dirigir la segunda luz de entrada a la región de muestra (955) a lo largo de una segunda trayectoria en una segunda dirección (915a);
- 15 la guía de onda adicional (916, 917, 918, 919) está dispuesta para recibir la tercera luz de entrada y utilizar la reflexión interna total para dirigir la tercera luz de entrada a la región de muestra (955) a lo largo de una tercera trayectoria en una tercera dirección (916a, 917a, 918a, 919a);
- 20 la segunda dirección (915a) es diferente de la primera dirección (914a) de modo que, en uso, la primera luz de entrada interfiere con la segunda luz de entrada para formar un patrón de luz periódico en la región de muestra (955);
- 20 la tercera dirección (916a, 917a, 918a, 919a) es diferente de la primera dirección (914a) y de la segunda dirección (915a); y
- la primera, segunda y tercera direcciones (914a; 915a; 916a, 917a, 918a, 919a) son coplanarias.
- 25 2. Un componente óptico (910) como se reivindica en la reivindicación 1, que comprende una entrada (911) formada en una sola cara del componente óptico (910) y dispuesta para recibir la primera, segunda y tercera luces de entrada.
- 30 3. Un componente óptico (910) como se reivindica en la reivindicación 2, en el que la entrada (911) comprende una única toma para el acoplamiento con uno o más cables de fibra óptica (944a, 944b, 944c).
- 35 4. Un componente óptico (910) como se reivindica en cualquier reivindicación anterior, en el que la primera, segunda y tercera trayectorias se encuentran en un plano común.
- 40 5. Un componente óptico (910) como se reivindica en cualquier reivindicación anterior, que comprende además una cuarta guía de onda (916, 917, 918, 919), en la que la cuarta guía de onda (916, 917, 918, 919) está dispuesta para recibir una cuarta luz de entrada y utilizar reflexión interna total para dirigir la cuarta luz de entrada a la región de muestra (955) a lo largo de una cuarta trayectoria en una cuarta dirección (916a, 917a, 918a, 919a), en la que la cuarta dirección (916a, 917a, 918a, 919a) es diferente de la primera, la segunda y la tercera direcciones (914a; 915a; 916a, 917a, 918a, 919a) y es coplanaria con la primera, segunda y tercera direcciones (914a; 915a; 916a, 917a, 918a, 919a).
- 45 6. Un componente óptico como se reivindica en cualquier reivindicación anterior, en el que el componente óptico es un componente fotónico integrado.
- 50 7. Un componente óptico como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que al menos una de dichas guías de onda está dispuesta para guiar la luz recibida hacia la región de muestra a lo largo de una trayectoria óptica respectiva, en el que dicha trayectoria óptica tiene una anchura que aumenta en una dirección hacia la región de muestra.
- 55 8. Un componente óptico como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que al menos una de dichas guías de onda comprende una faceta final dispuesta para dirigir la luz hacia la región de la muestra.
9. Un componente óptico como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que al menos una de dichas guías de onda está dispuesta para dirigir, hacia la región de la muestra, sólo un componente de campo evanescente de la luz recibida por la guía de onda.
- 60 10. Un componente óptico como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el componente óptico define un pocillo de muestra para alojar una muestra.
- 65 11. Un componente óptico como se reivindica en la reivindicación 10, que comprende una capa de núcleo y una capa de revestimiento óptico, en el que el pocillo de muestra está definido al menos en parte por la capa de revestimiento óptico y la capa de núcleo.
12. Un método para iluminar una región de muestra (955) de un componente óptico (910), comprendiendo el método:
- proporcionar un componente óptico (910) que comprenda una primera guía de onda (914), otra guía de onda (916, 917, 918, 919) y un divisor óptico (913a);

- recibir luz de entrada en el divisor óptico (913a);
recibir una primera luz de entrada en la primera guía de onda (914) desde una primera salida del divisor óptico (913a);
5 utilizar la reflexión interna total dentro de la primera guía de onda (914) para dirigir la primera luz de entrada a la región de la muestra a lo largo de una primera trayectoria en una primera dirección (914a);
dirigir, desde una segunda salida del divisor óptico (913a), una segunda luz de entrada a la región de muestra (955) a lo largo de una segunda trayectoria en una segunda dirección (915a), en la que la segunda dirección (915) es diferente de la primera dirección (914a);
10 recibir la tercera luz de entrada en la guía de onda adicional (916, 917, 918, 919);
usar reflexión interna total dentro de la guía de onda adicional (916, 917, 918, 919) para dirigir la tercera luz de entrada a la región de muestra (955) a lo largo de una tercera trayectoria en una tercera dirección (916a, 917a, 918a, 919a), en la que la tercera dirección (916a, 917a, 918a, 919a) es diferente de la primera (914a) y segunda (915a) direcciones, y la primera (914a), segunda (915a) y tercera (916a, 917a, 918a, 919a) direcciones son coplanares; e
15 interferir la primera luz de entrada y la segunda luz de entrada, o la primera, segunda y tercera luz de entrada, juntas para formar un patrón de luz periódico en la región de muestra (955).
13. Un método de obtención de imágenes de una muestra mediante microscopía de iluminación estructurada, que comprende:
20 iluminar una región de muestra de un componente óptico con un patrón de luz periódico, como se reivindica en la reivindicación 12;
recoger la luz que emana de la región de muestra; y
realizar microscopía de iluminación estructurada con la luz recogida.
25
14. Un sistema para obtener imágenes de una muestra en una región de muestra utilizando microscopía de iluminación estructurada, el sistema comprende:
30 un aparato de inyección de luz;
un componente óptico según cualquiera de las reivindicaciones 1-11;
una lente objetivo dispuesta para recoger la luz que emana de la región de la muestra; y
una unidad de formación de imágenes dispuesta para realizar microscopía de iluminación estructurada con la luz recogida.
35

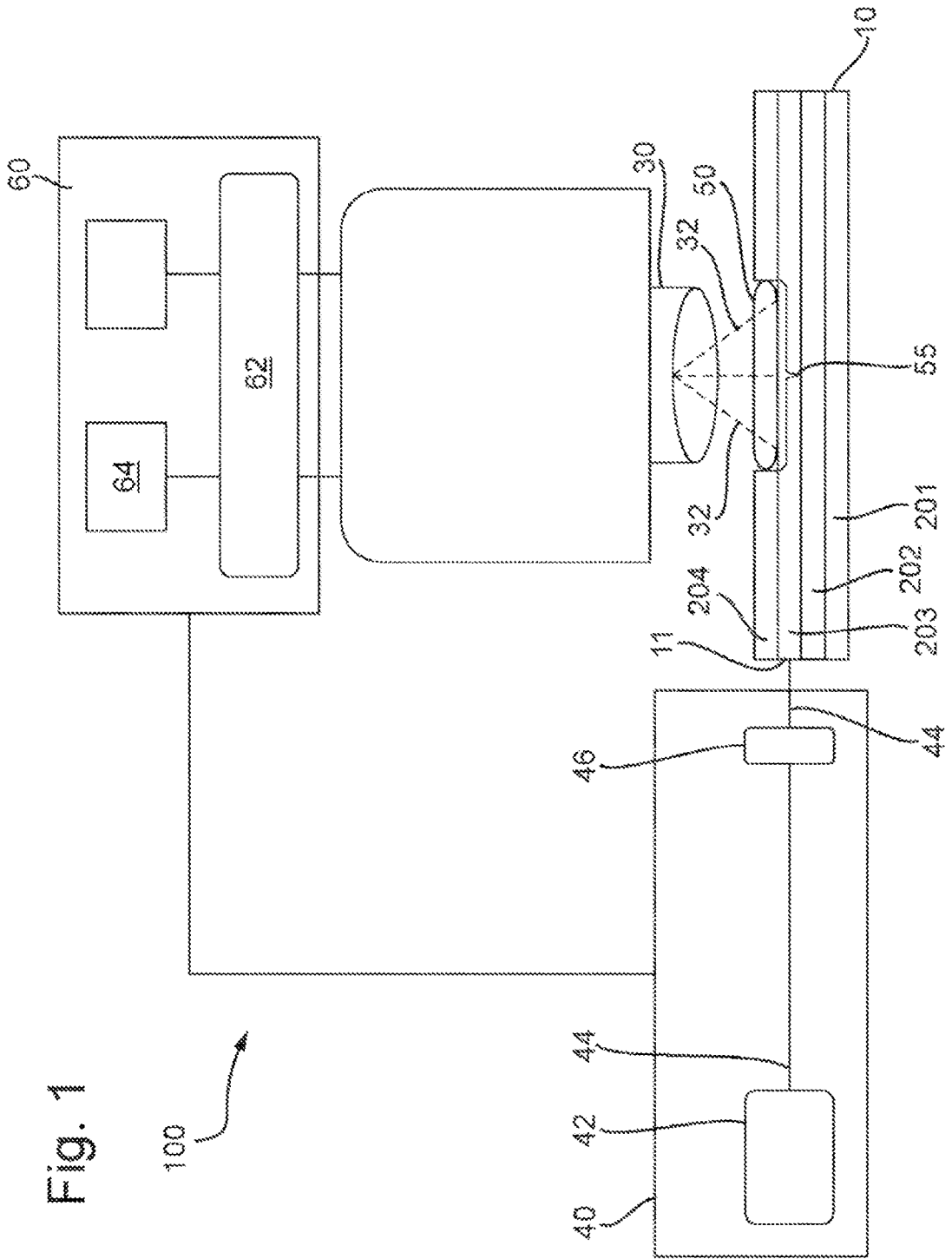


Fig. 2

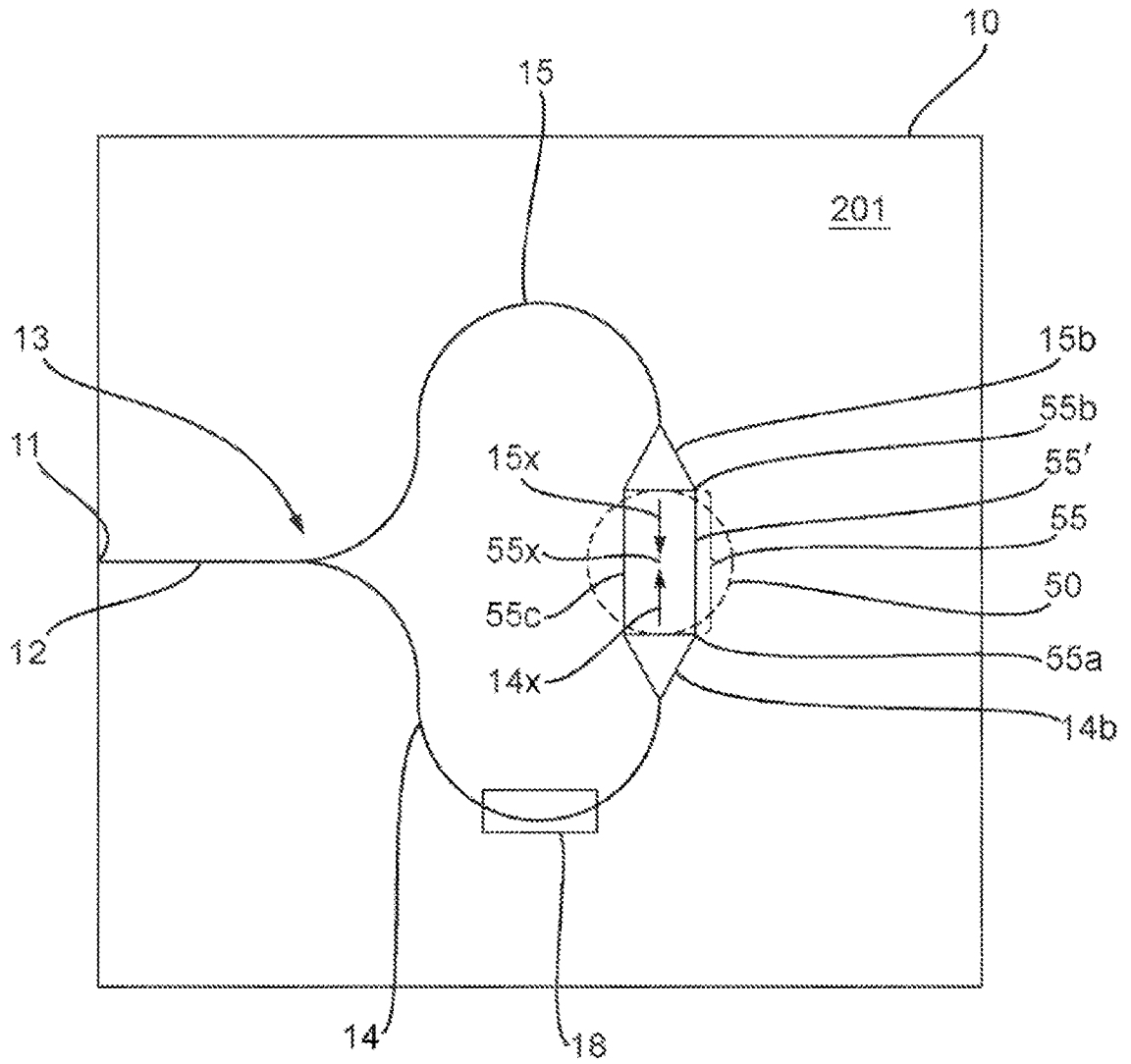


Fig. 3

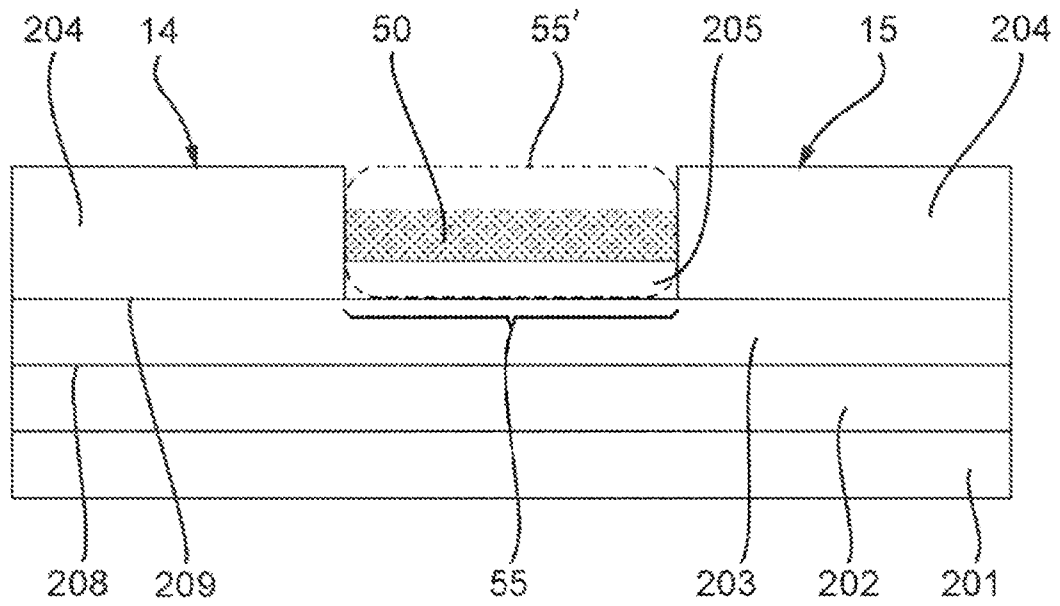


Fig. 4a

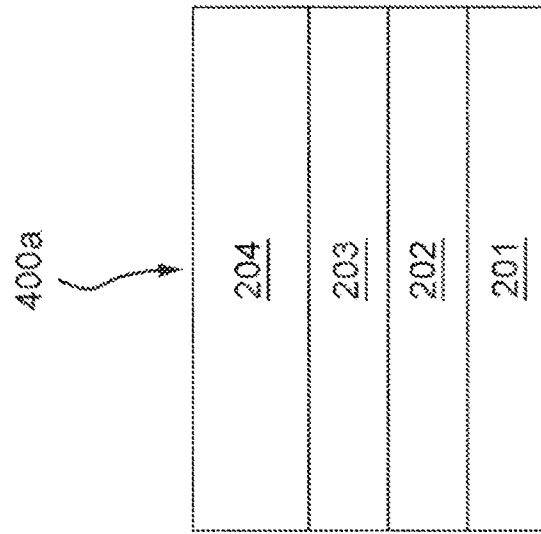


Fig. 4b

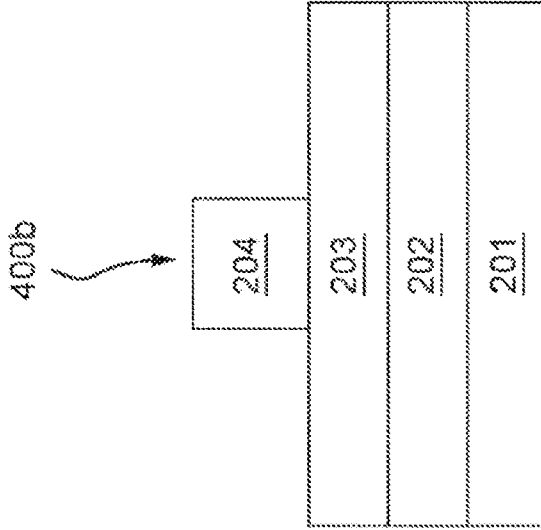


Fig. 4c

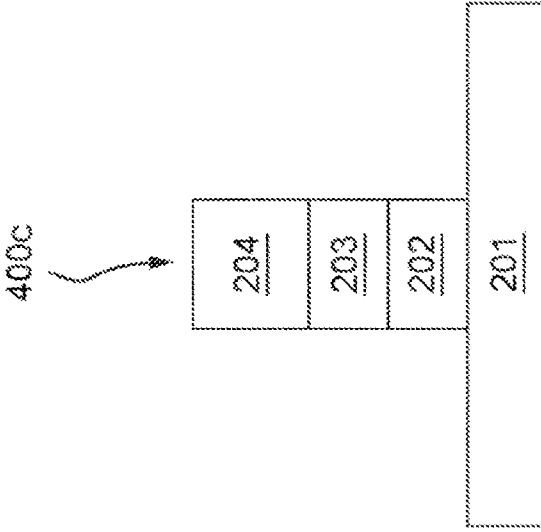


Fig. 4d

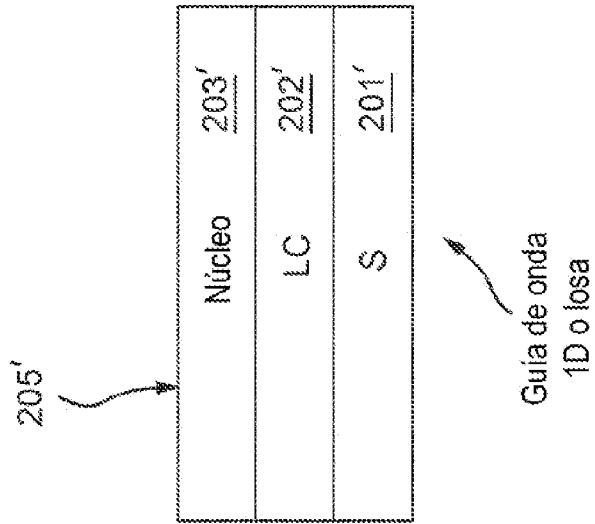


Fig. 4e

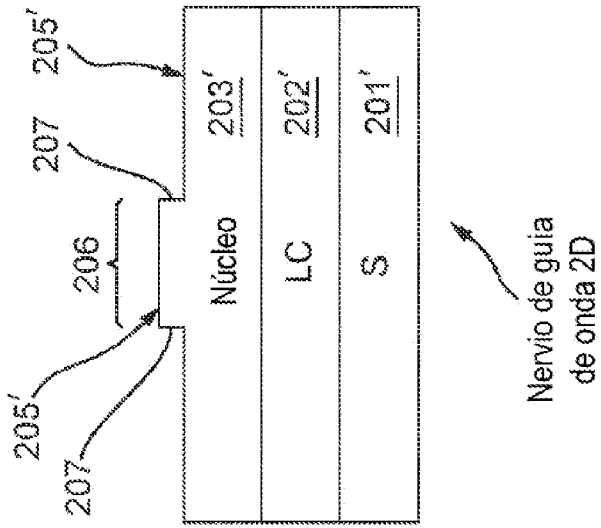


Fig. 4f

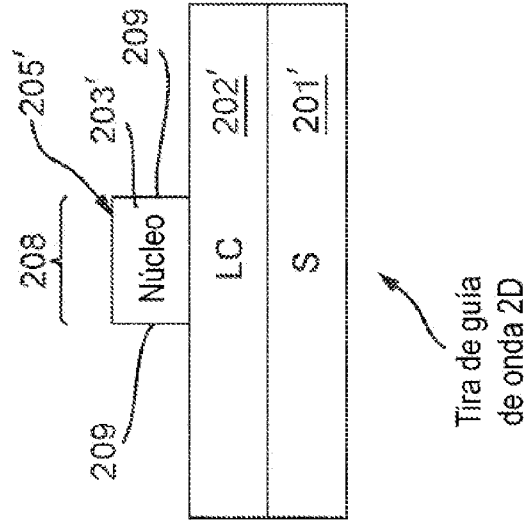
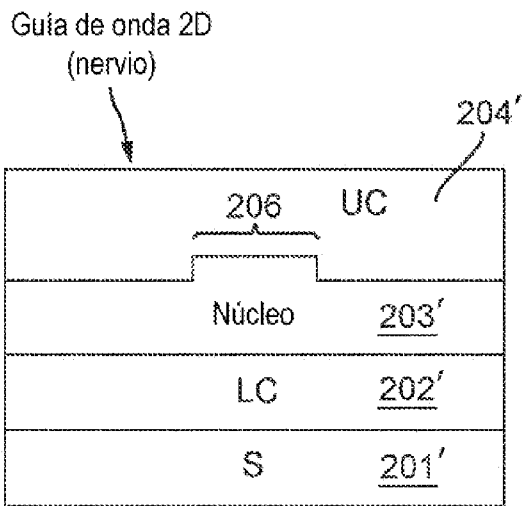
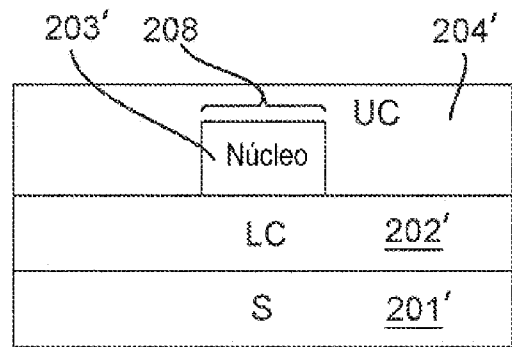


Fig. 4g



Lc = Núcleo de revestimiento inferior

Fig. 4h



UC = Revestimiento superior

Fig. 5

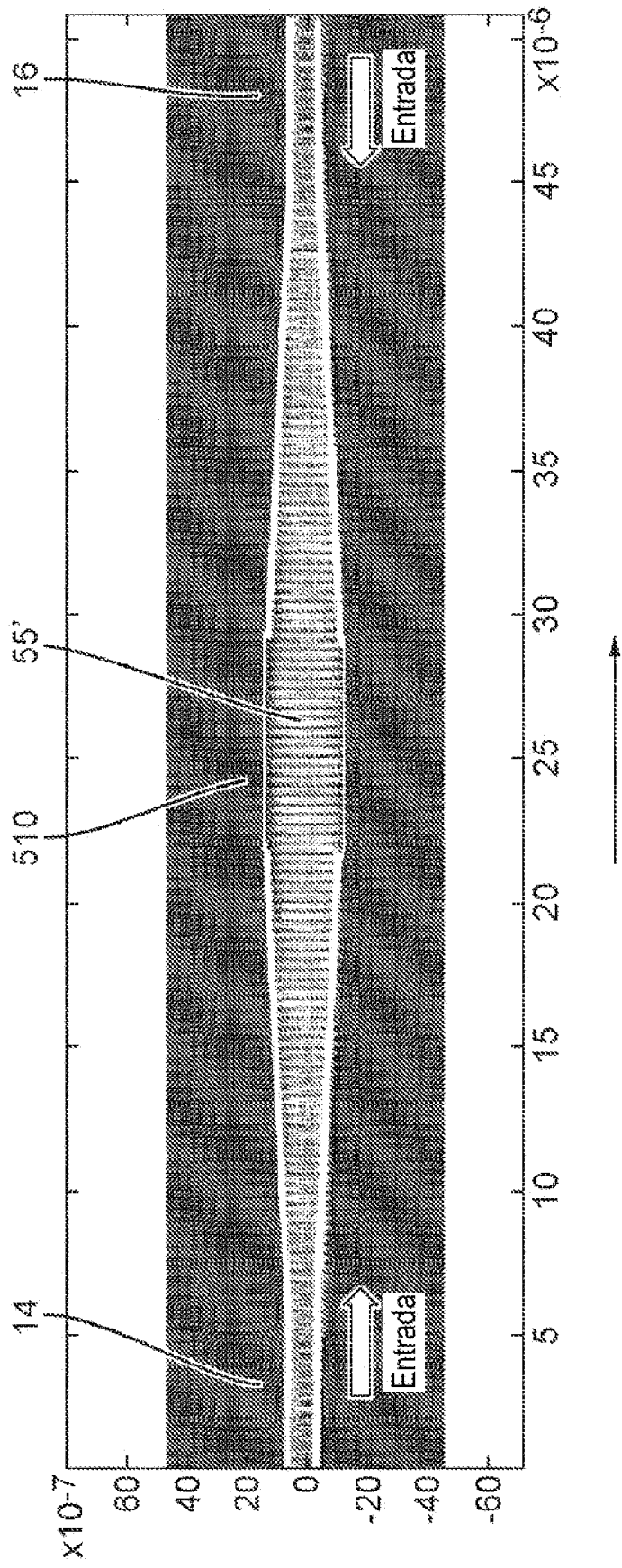


Fig. 6

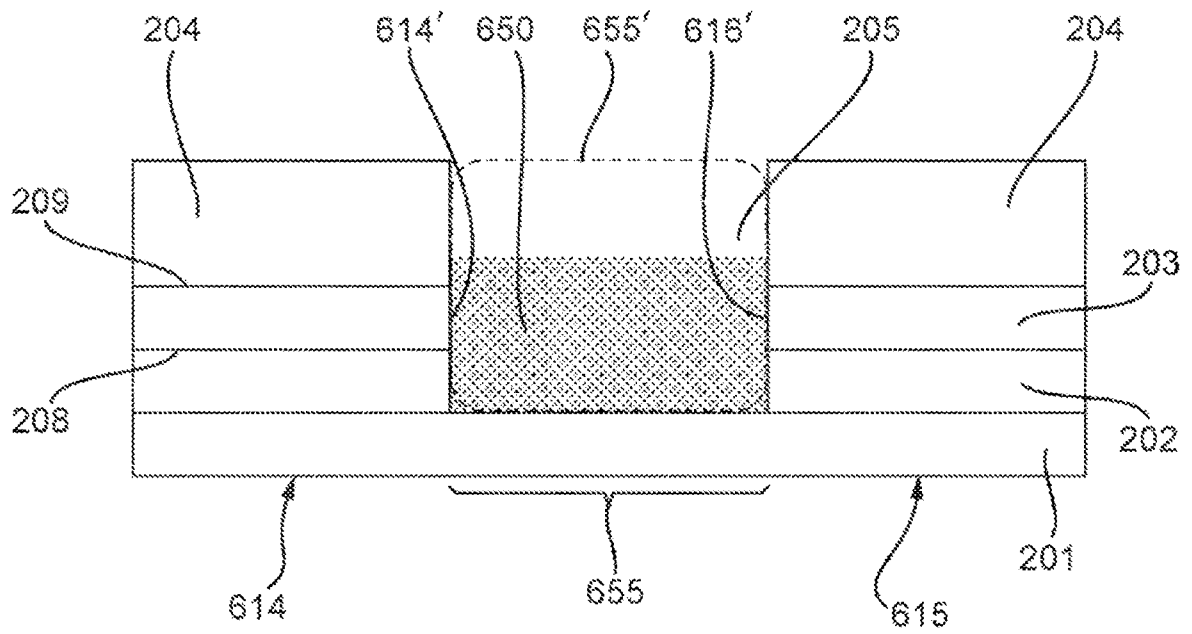


Fig. 7

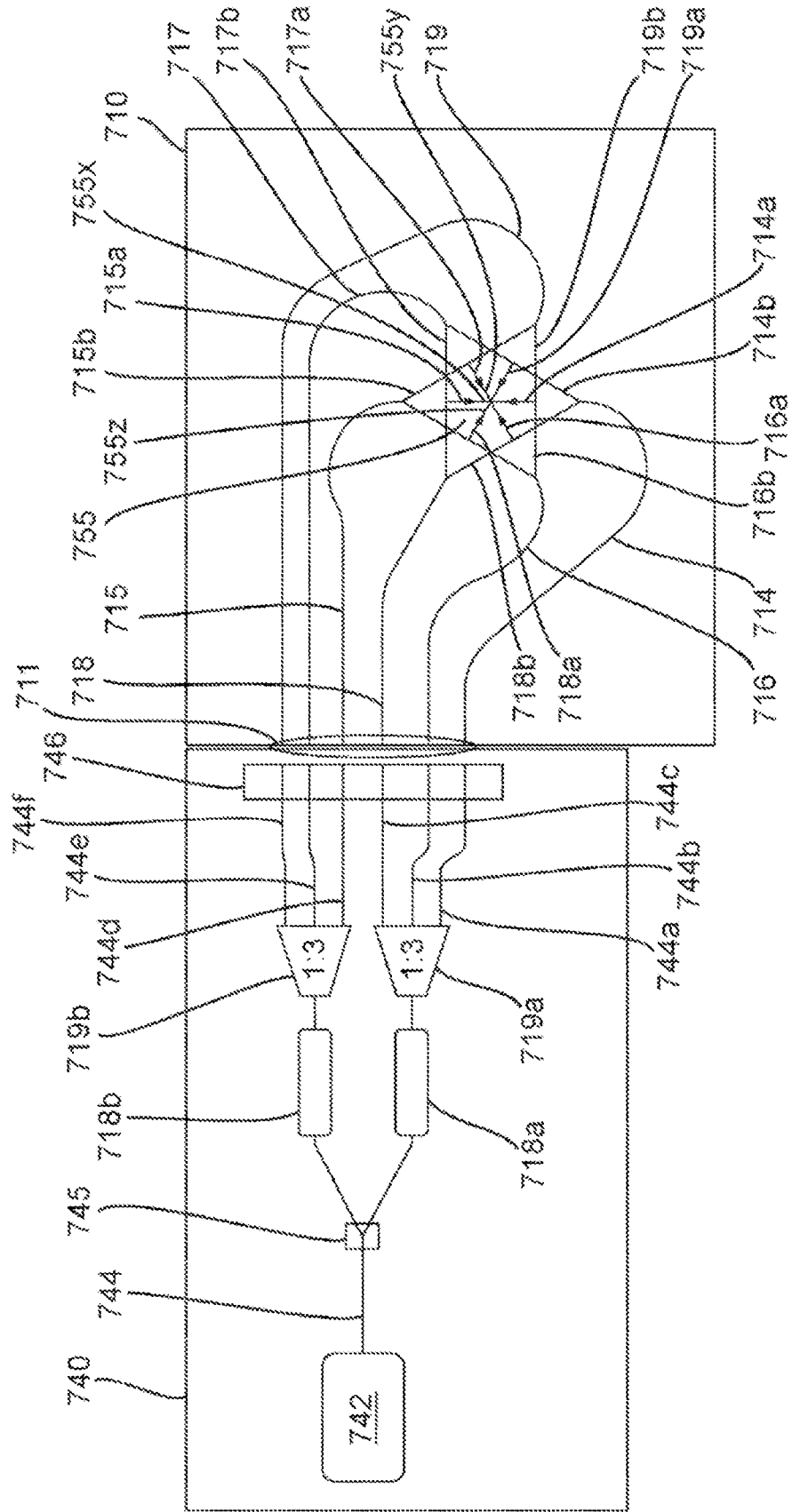


Fig. 8a

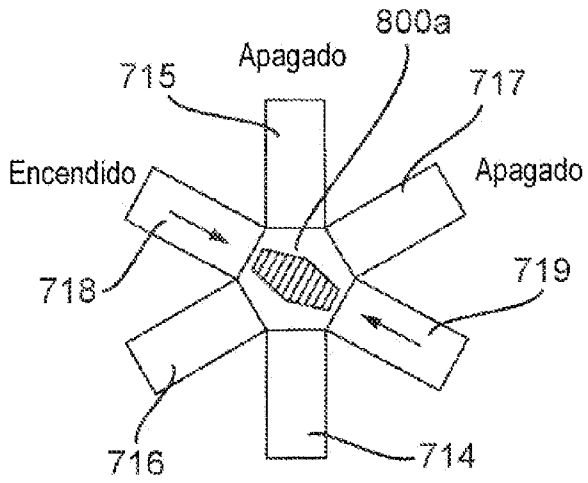


Fig. 8b

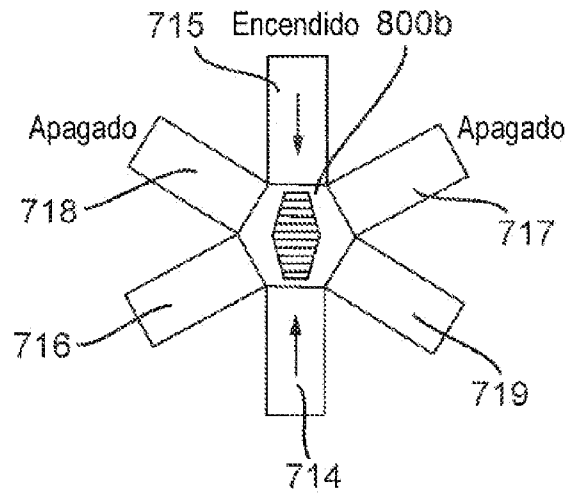


Fig. 8c

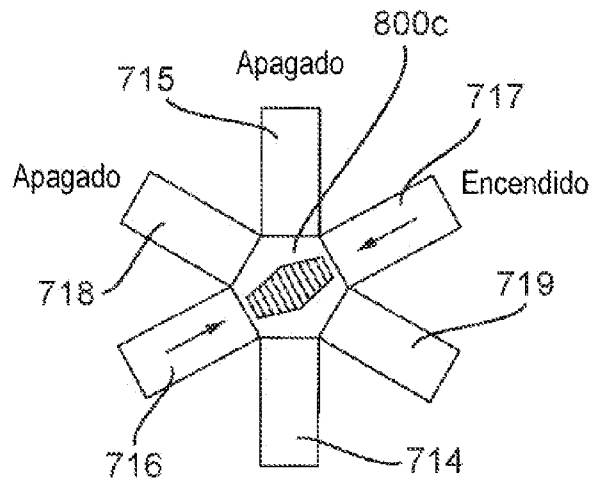


Fig. 9

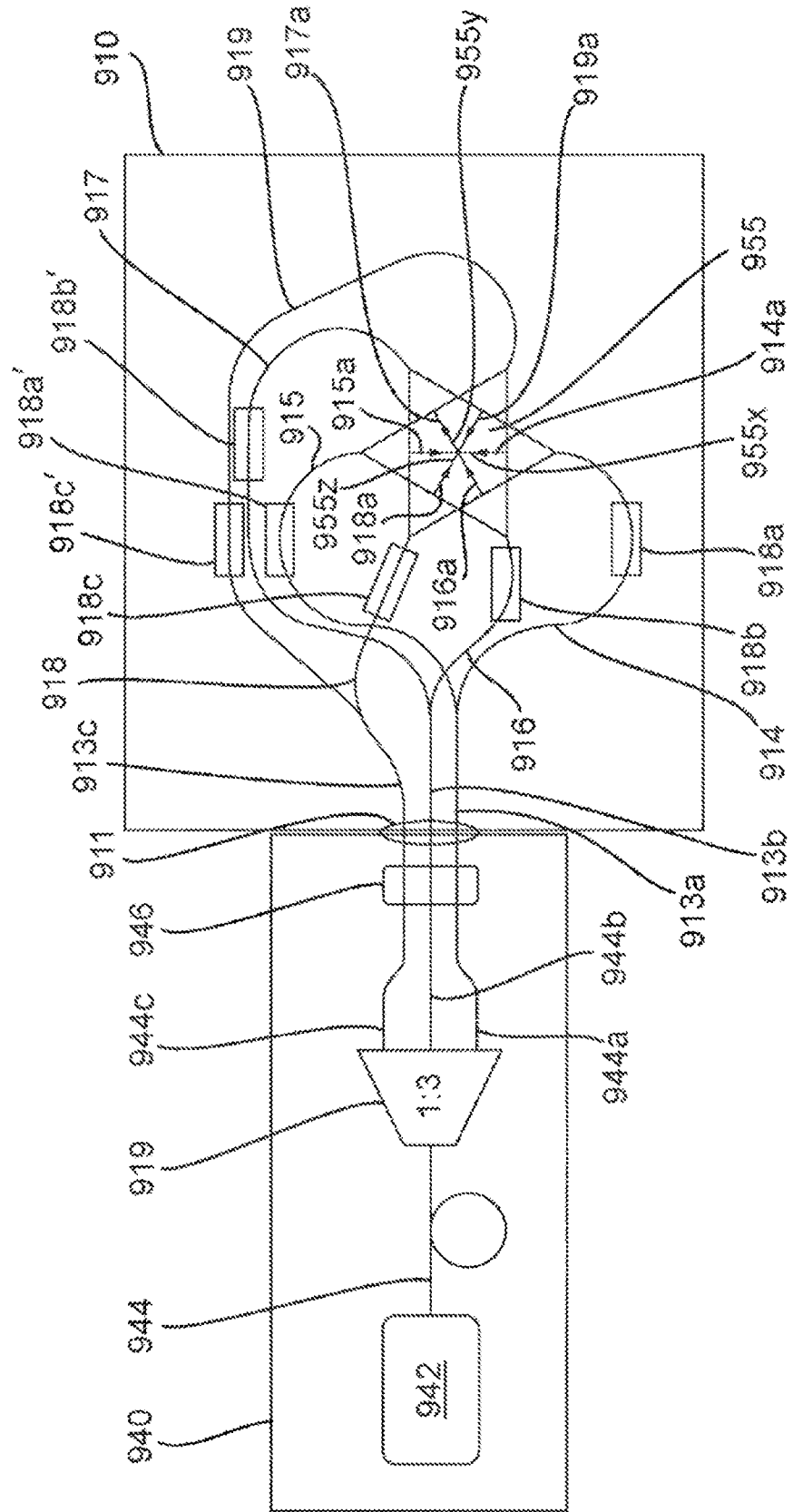


Fig. 10

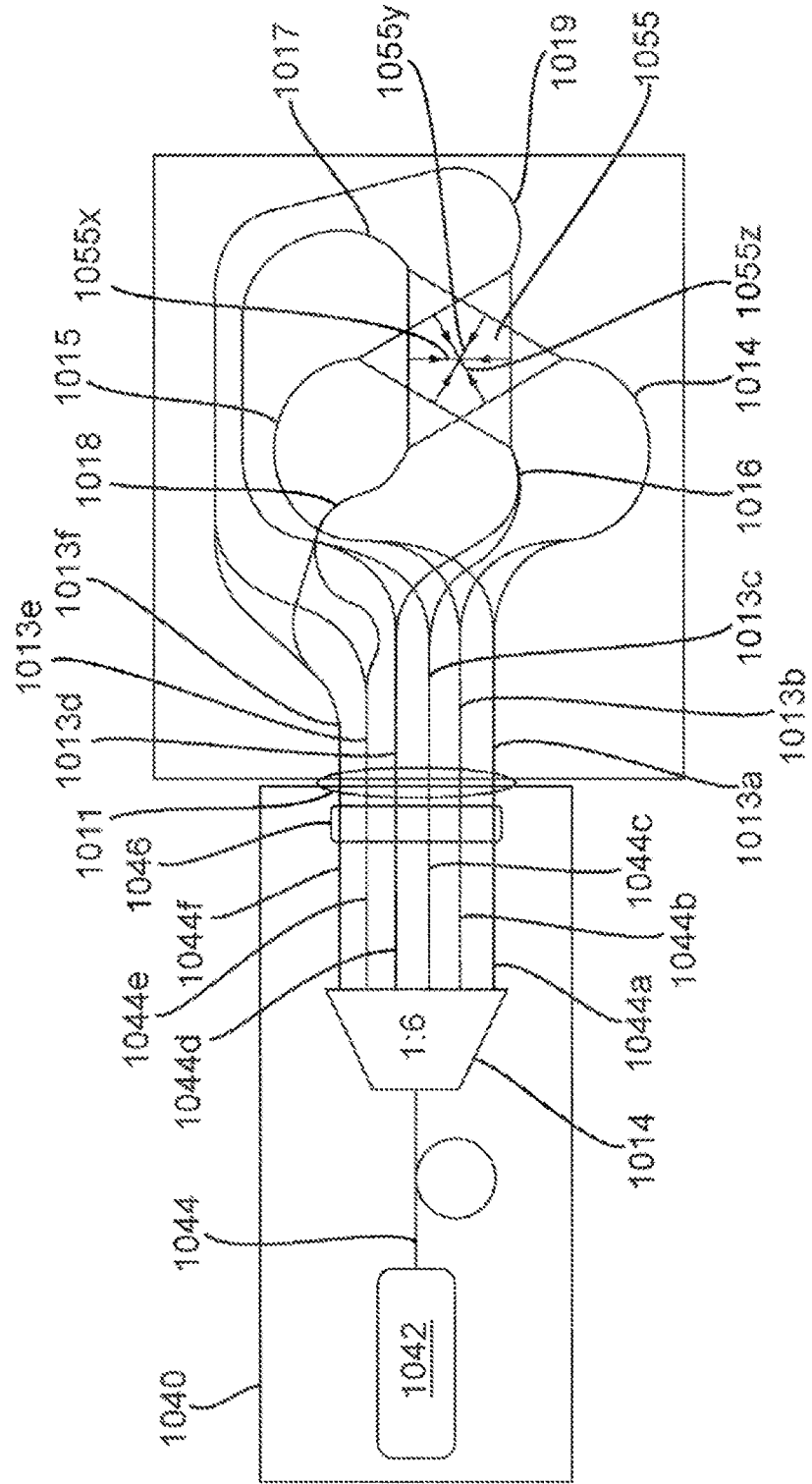


Fig. 10b

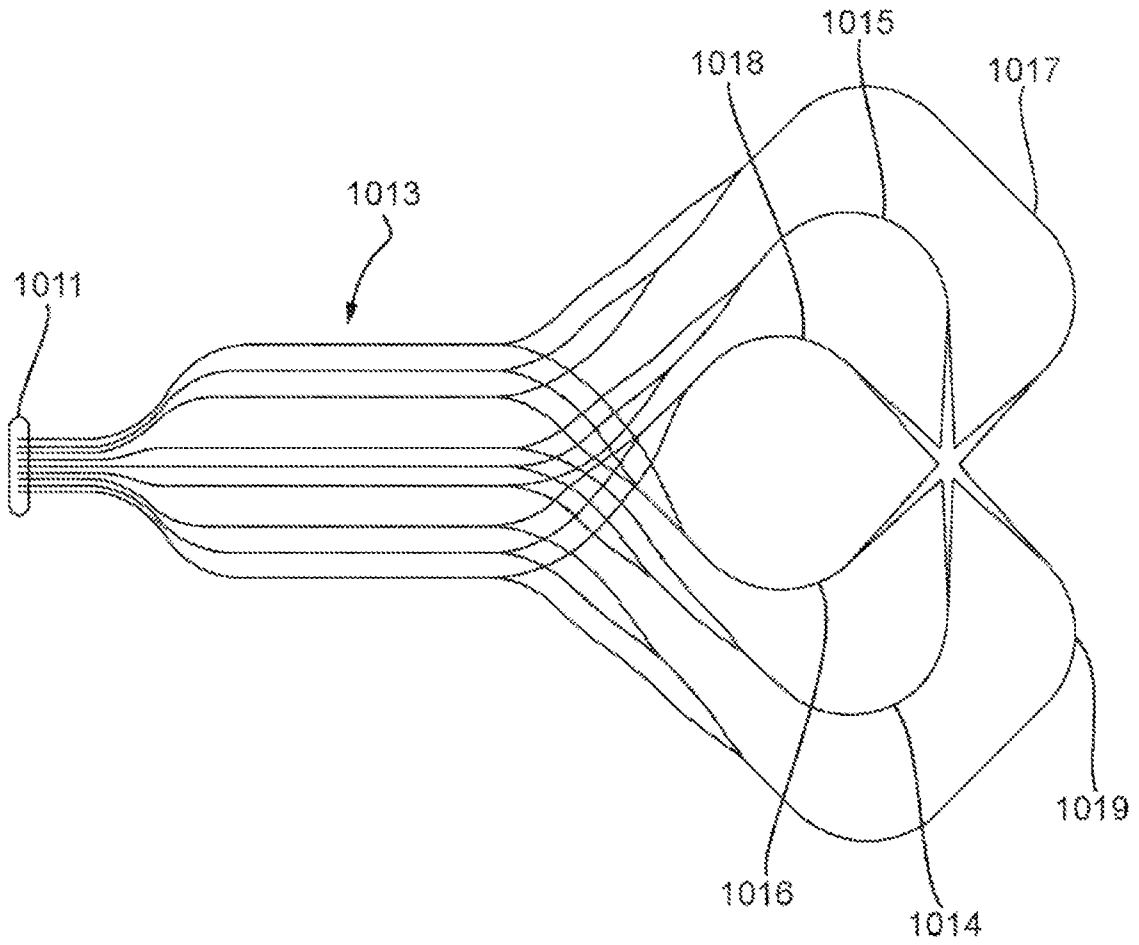


Fig. 11

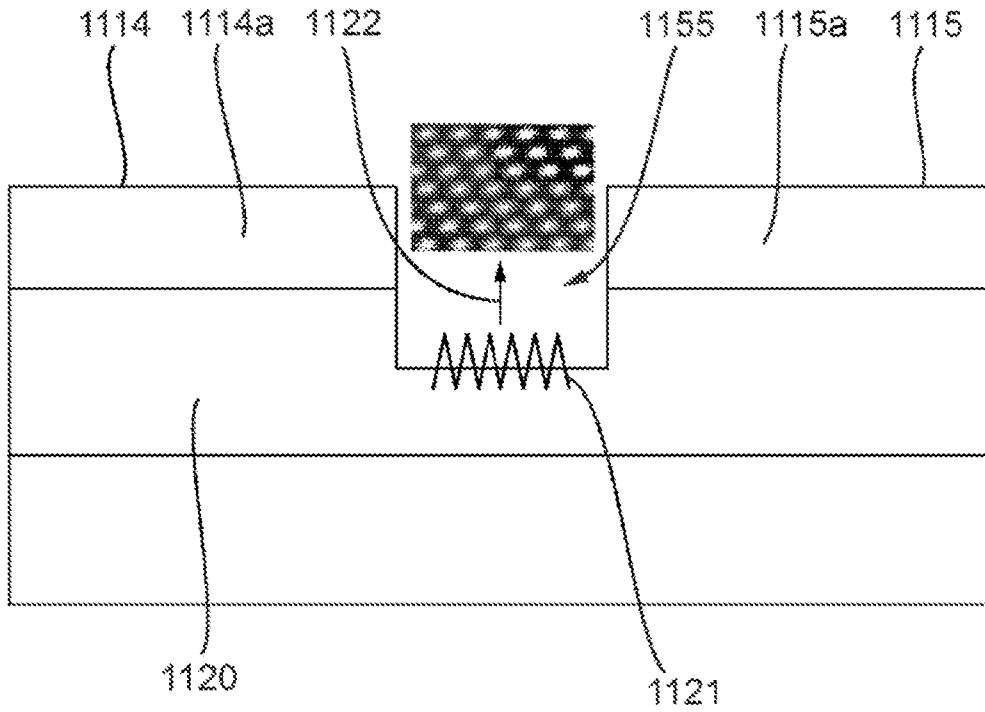


Fig. 12

