



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102565013 A

(43) 申请公布日 2012.07.11

(21) 申请号 201110319974.2

(22) 申请日 2011.10.20

(30) 优先权数据

102010049212.4 2010.10.21 DE

(71) 申请人 鲁道夫·格罗斯科夫

地址 德国柯尼希斯布龙

(72) 发明人 鲁道夫·格罗斯科夫

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 侯宇

(51) Int. Cl.

G01N 21/64 (2006.01)

G01J 3/02 (2006.01)

G01J 3/457 (2006.01)

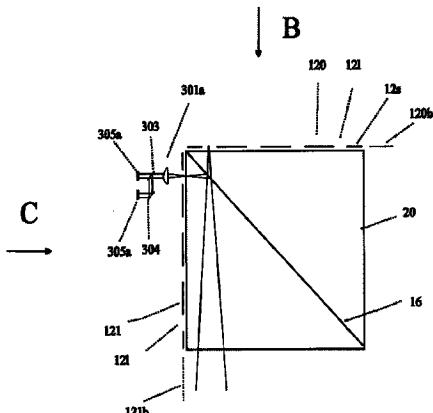
权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 4 页

(54) 发明名称

同时的荧光相关光谱术

(57) 摘要

本发明涉及一种用于在研究物体的多个位置上同时进行荧光相关光谱术的方法和装置，该方法和装置使得能成本低廉地制造为此所需的仪器，该装置带有一个照亮物体 (14) 且具有发光区域 (121) 的照明光栅 (120b)、一个将所述照明光栅 (120b) 投影在所述物体 (14) 处的聚焦平面 (14s) 内的物镜装置 (13u) 以及一个位于接收器侧的孔板 (121)，按照本发明，根据所述聚焦平面为观测光路的孔板的每个孔 (121) 配设一个用于光谱分离从物体返回的光线的装置 (302a)，并且每个用于光谱分离的装置 (302a) 配设有至少两个光线接收器 (305a)。



1. 一种用于在检查物体的多个位置上同时进行荧光相关光谱术的方法或装置,该方法或装置使得能成本低廉地制造为此所需的仪器,所述装置带有照亮物体(14)且具有发光区域(121)的照明光栅(120b)、将所述照明光栅(120b)投影在所述物体(14)处的聚焦平面(14s)内的物镜装置(13u)以及位于接收器侧的孔板(121),其特征在于,根据所述聚焦平面为观测光路的孔板的每个孔(121)配设一个用于光谱分离从样品返回的光线的装置(302a),并且每个用于光谱分离的装置(302a)配设有至少两个光线接收器(305a)。

2. 按权利要求1所述的装置,其特征在于,所述用于光谱分离光线的装置(302a)分别由至少一个二色镜(303)和至少一个全反射镜(304)组成。

3. 按权利要求1或2所述的装置,其特征在于,所述用于光谱分离光线的装置(302a)被调节到相同的光波长。

4. 按权利要求1或2所述的装置,其特征在于,所述用于光谱分离光线的装置(302a)被调节到不同的光波长。

5. 按一项或多项前述权利要求所述的装置,其特征在于,至少一个,但优选每个用于光谱分离光线的装置(302a)之前连接有聚光透镜(301a),该聚光透镜(301a)位于所述接收器侧的孔(121)与所述用于光谱分离光线的装置(302a)之间。

6. 按一项或多项前述权利要求所述的装置,其特征在于,沿一个方向射出所述二色镜(303)的光线射到所述光线接收器之一(305a)上,并且沿另一方向射出所述二色镜的光线经由全反射镜(304)射到另一个光线接收器(305a)上。

7. 按一项或多项前述权利要求所述的装置,其特征在于,将雪崩光电二极管阵列(305)中相邻的雪崩光电二极管(305a)用作光线接收器,其中,未被反射而穿过所述二色镜(303)的光线射到所述雪崩光电二极管接收器之一(305a)上,并且被所述二色镜反射的光线经由全反射镜(304)被引向另一个雪崩光电二极管接收器(305a)。

8. 按一项或多项前述权利要求所述的装置,其特征在于,被所述二色镜(303)反射的光线被导向第二个二色镜,并且被所述第二个二色镜反射的光线被引向第二光线接收器,并且穿过所述第二个二色镜的光线经由一个全反射镜被引向第三光线接收器。

同时的荧光相关光谱术

技术领域

[0001] 本发明涉及一种通过荧光相关光谱术检查物体的装置或方法,其用于在检查物体的多个位置上同时进行荧光相关光谱术并且使得能成本低廉地制造为此所需的仪器,带有一个照亮物体且具有发光区域的照明光栅(Beleuchtungsraster)、一个将照明光栅投影在物体处的聚焦平面内的物镜装置以及一个位于接收器侧的孔板(Lochplatte)或孔眼光阑(Lochblende)。

背景技术

[0002] 在共焦显微镜检查中,按已知方式通过孔眼光阑(Lochblende)照亮物体,并且通过光线接收器观察物体被照亮的点,该光线接收器的光敏表面与由照明光阑形成的照亮点一样小(Minsky, M., 美国专利文件 US 3013467 和 Minsky, M., Memoir on inventing the confocal scanning microscope, Scanning10, p. 128–138)。共焦显微镜检查相对于传统方式的优点是,共焦显微镜检查提供深度分辨率(沿z坐标的测量),并且在拍摄图像时较少产生散射光。只有处于焦点中的物体平面被照得很亮。位于聚焦平面上方和下方的物体平面得到明显较少的光线。

[0003] 共焦原理已被利用了一段时间,以便例如在样品中的唯一位置上观察分子的化学反应。为此应用的原理称为荧光相关光谱术(FCS)。由此使得能够单独地观察生物切片中分子之间的化学反应。例如为了诊断疾病以及为了评估化学物质和药品的效用,该方法在近些年內已经在化学、生物学和医学中提供了一种获取有价值认知的可能性。为此目的,很多大公司开发了有效的研究仪器。这些仪器可非常灵活地应用于例如许多不同的光波长和测量参数。但遗憾的是必须承认这些仪器的制造很耗费,并且因此出于经济原因几乎不被考虑进行广泛使用。而且同时只能在样品的一个位置进行测量,尽管样品中值得研究的化学和/或生物化学事件同时发生在非常多的位置上。

发明内容

[0004] 因此,本发明所要解决的技术问题在于,提供一种方法或和装置,它们使得可以同时在多个位置进行共焦的荧光相关光谱术并且使得能够成本低廉地制造为此所需的仪器。

[0005] 在专利文献 DE 19918689 中描述了一种装置,该装置包括一个照亮物体且具有发光区域的照明光栅并且配备有一个将照明光栅投影在物体处的聚焦平面内的物镜装置以及一个接收器光栅,该接收器光栅带有前置的孔板以及孔,这些孔穿过孔板由物镜装置加载。照明光栅的每个发光区域在此加载接收器光栅的至少两个相邻的光敏区域,并且照明光栅设计为由照明设备加载的照明侧孔板,其中,物体光线借助分光六面体射出到接收器光栅,并且接收器侧和照明侧的孔板设计在分光六面体上,并且与该分光六面体共同构成一个唯一的紧凑的组件。

[0006] 还已知的是,通过两个雪崩 - 光检测器(APDs,即雪崩光电二极管)的结合可以同时检测两个荧光信号。卡尔蔡司公司的 ConfoCor3 就具备这种性能。它可以分析两个相互

作用的、用不同荧光颜料标记出的一对信号。在该装置中，一对 APD 现在接收两个自由配合基和配合基复合物的三重信号。以此方式，双重标记的复合物发出独立的、到达两个 APD 的荧光信号，这与带有一个荧光连接对 (Bindungspartner) 的经典 FCS 方法不同。但在特定时间点只观察样品中的一个位置。

[0007] 本发明所要解决的技术问题就在于，指明一种途径，如何能够利用可供使用的 APD 阵列在样品中的多个位置上同时地进行荧光相关光谱术 (sFCS)。

[0008] 本发明为此规定，根据聚焦平面为照明光路的孔板的每个孔配设一个用于光谱分离从样品返回的光线的装置，并且每个用于光谱分离的装置配设有至少两个光线接收器。

[0009] 此外本发明规定，为了同时在样品不同位置上检查同类分子，所述用于光谱分离光线的装置被调节到相同的光波长。

[0010] 为了同时检查相同物体中不同种类的分子，本发明规定，所述用于光谱分离光线的装置被调节到不同的光波长。

附图说明

[0011] 附图示例性示出本发明可能的实际实施形式。在附图中：

[0012] 图 1 示出按本发明的图像拍摄设备的整体结构；

[0013] 图 2 示出一个分光六面体和一个按本发明使用的、用于光谱分离光线的装置的例子；

[0014] 图 3 示出分光六面体和按本发明配设的、用于同时单独地对于样品中的多个不同位置进行光线的光谱分离的组件；

[0015] 图 4a 至图 4d 示出用于光谱分离光线的组件的例子，以及当使用带有 36 个接收器二极管的 APD 阵列时，如何按本发明构造这些组件。

具体实施方式

[0016] 在图 1 中用 11 表示光源，例如卤素灯，其借助聚光器 11k、一层中的孔发光。这种层可通过已知方式例如由铬在玻璃板 12g 上制成。这些孔格栅式地布置在所述层中。例如层 18 包括大小例如为 $4 \mu m * 4 \mu m$ 的孔。这些孔本身的大小明显小于它们的间距。

[0017] 由层中被照亮的孔产生的照明格栅位于照明平面 120b 中。该平面通过透镜 13o、13u 投影在聚焦平面 13f 中，使得物体 14 在聚焦平面中被格栅形设置的光点照亮。

[0018] 对于非透明物体来说只能照亮表面 14o，而对于透明物体来说也可以用光点照亮内部的层 14s。由物体在聚焦平面 13f 中反射的光线由透镜 13u、13o 经由分光器 16 聚焦在光阑平面 121b 中。前述分光器 16 在荧光应用中按已知方式设计为二色镜。物体 14 可通过调节设备 15 在全部的三个空间方向上移动，从而可以检查物体 14 的不同层 14s。

[0019] 接收器光栅 17 用于接收来自样品的光信号。由以下附图得出这如何按本发明实现。

[0020] 接收器光栅 17 的信号经由连接导线 17v 传输至计算机 18，该计算机 18 按已知方式进行评估并且将评估结果例如以图形的形式呈现在屏幕 18b 上。该计算机 18 也可以通过连接导线 18v 控制聚焦平面 13f 在物体中的移动以及沿 x 和 y 方向的扫描。这种控制可以作为固定程序存入计算机中或者根据评估结果进行。

[0021] 图 2 示出具有孔板 120 和分光器 16 的分光六面体 20, 该孔板在平面 120b 中的照明光栅中具有孔 1201。在平面 120b 中具有带发光区域 12s 的照明侧孔板 120。沿方向 B 射来的照明光线被引向样品并且从样品返回的光线经由分光器 16 引向接收器侧的孔板 121, 该孔板 121 在分光六面体上位于平面 121b 中并且与照明侧的孔板 120 相同地设计。按照本发明, 来自样品中被照亮的各个位置的光线照射到配属于该位置的聚光透镜 301a 上。聚光透镜用于将照射到其上的光线转化为大致平行的光束, 该平行光束随即由接下来的微型组件光谱分离并且传输给 APD 接收器 305a。在这个实施例中, 微型组件由一个二色滤光器 303 和一个全反射镜 304 组成。

[0022] 图 3 示出分光六面体并且示意性示出按本发明配设的用于光谱分离光线和接收光线的组件。在接收器侧, 在平面 121b 中具有前述的接收器侧孔板, 然后是聚光透镜阵列 301、用于单独分离光线的阵列 302 和 APD 阵列 305。

[0023] 图 4a 至图 4d 示出用于光谱分离光线的组件的例子, 以及当使用带有 36 个接收器二极管的 APD 阵列时, 如何按本发明构造这些组件。图 4a 示出孔 121 在接收器侧的孔板 121 中的位置, 图 4b 示出聚光透镜 301a 在聚光透镜阵列 301 中的位置, 图 4c 示出用于光谱分离来自样品的光线的微型组件的位置, 并且图 4d 示出 APD 接收器 305a 在 APD 阵列 305 中的位置。

- [0024] 附图标记清单
- [0025] 301 聚光透镜阵列
- [0026] 301a 聚光透镜
- [0027] 302 用于从共焦光路中单独地光谱分离出光线的微型组件的阵列
- [0028] 302a 用于从共焦光路中单独地光谱分离出光线的微型组件
- [0029] 303 二色滤光器
- [0030] 304 全反射镜
- [0031] 305APD 阵列
- [0032] 305aAPD 接收器
- [0033] 14 物体
- [0034] 121 发光区域
- [0035] 120b 照明光栅
- [0036] 13u 物镜装置
- [0037] 14s 聚焦平面
- [0038] 17 接收器光栅
- [0039] 121 孔板
- [0040] 11, 11k, 11f 照明设备
- [0041] 20 分光六面体
- [0042] 121 接收器侧的孔板
- [0043] 120 照明侧的孔板
- [0044] 16 分光器

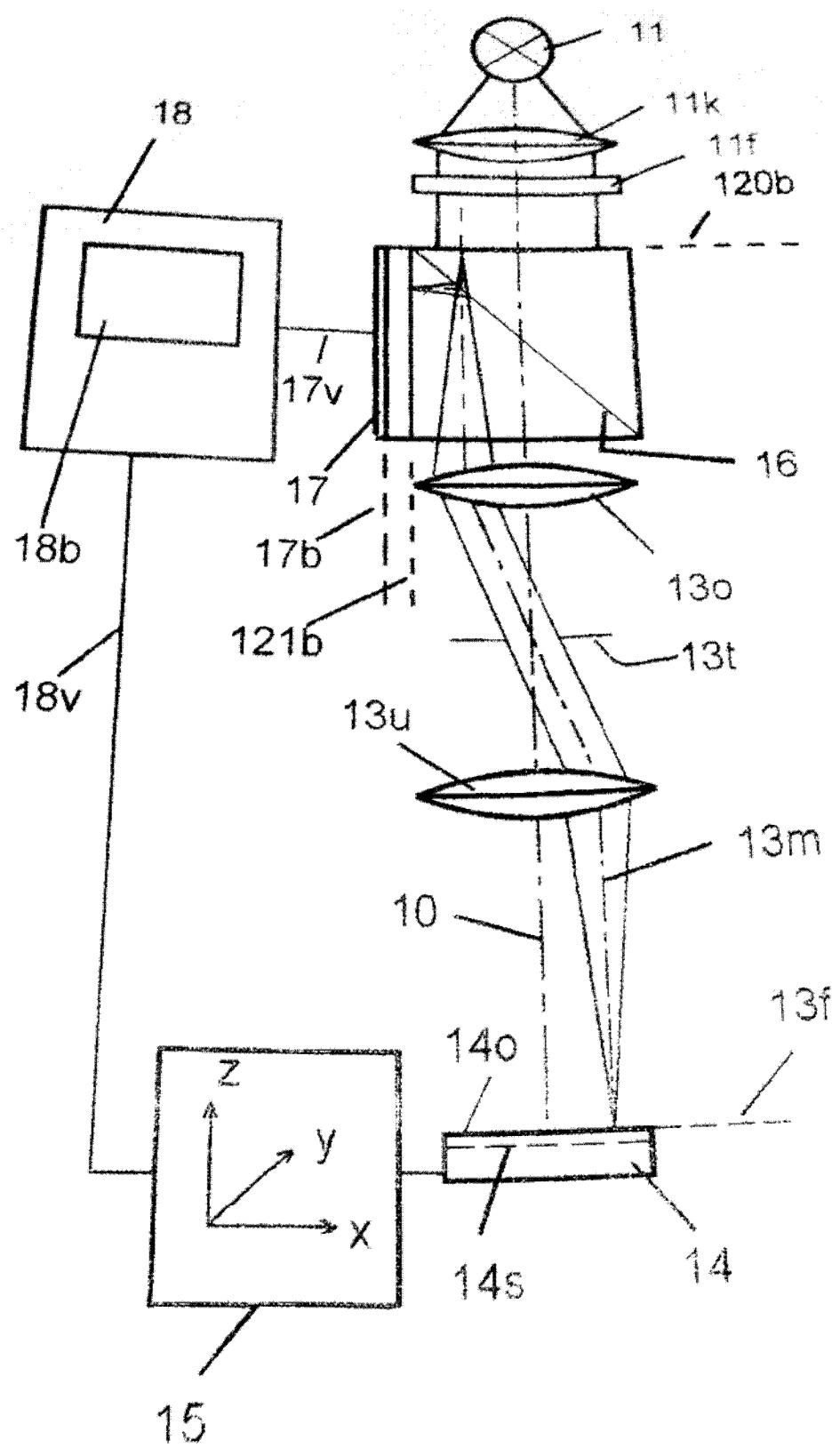


图 1

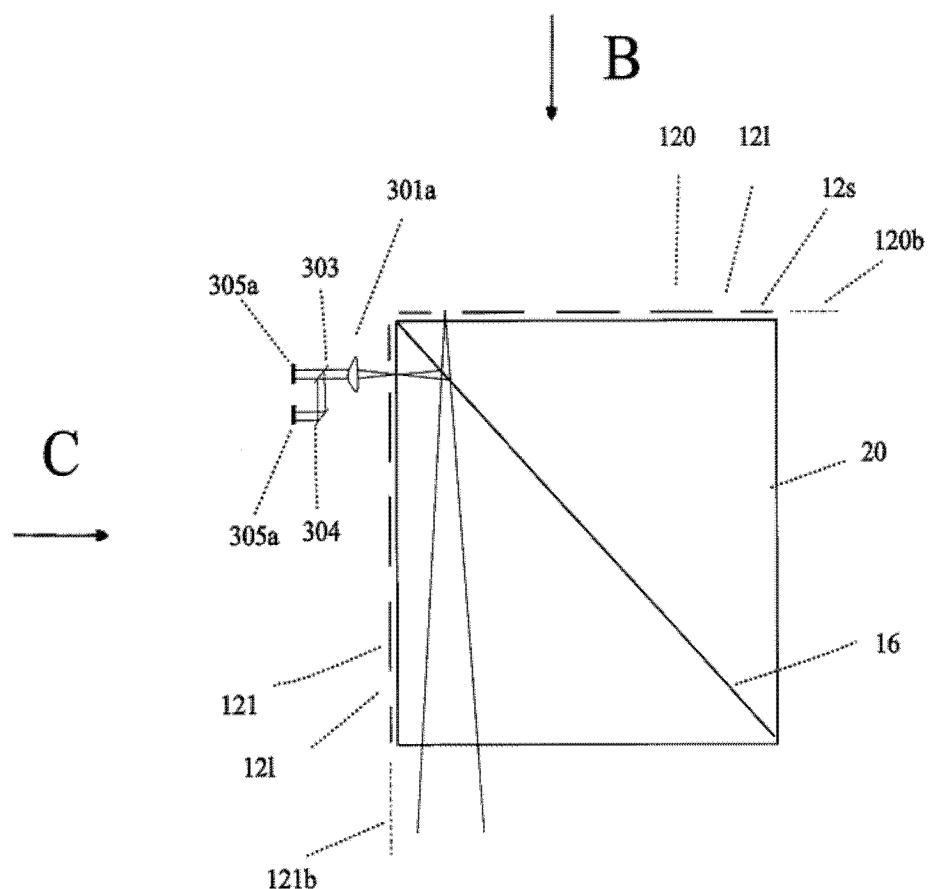


图 2

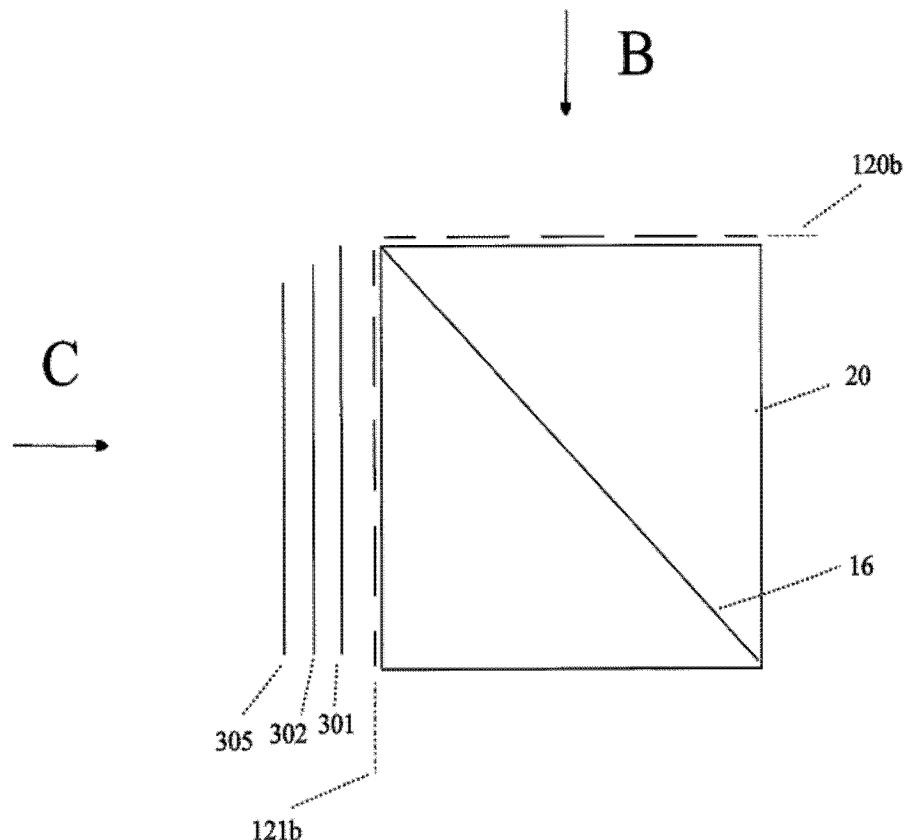


图 3

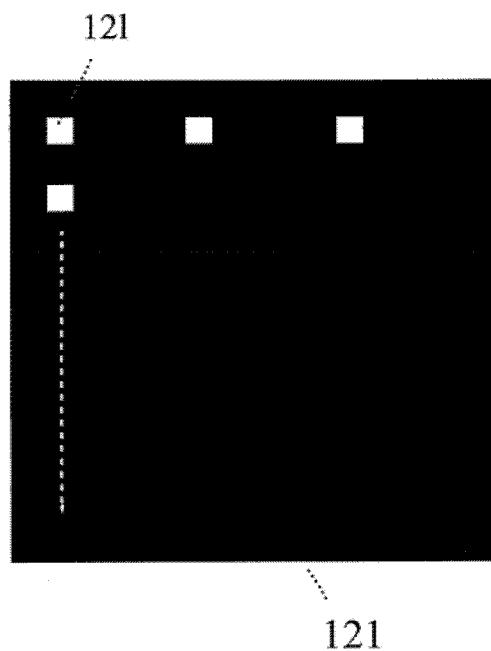


图 4a

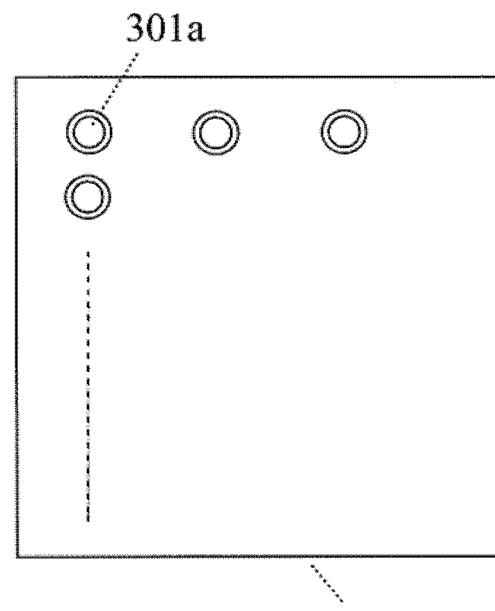


图 4b

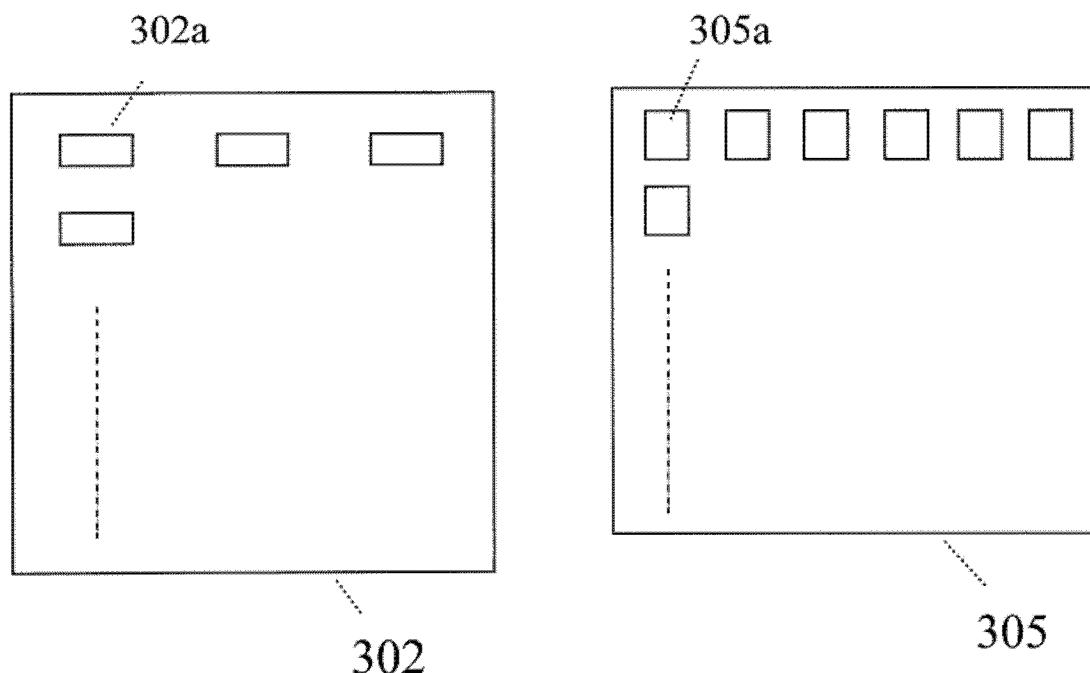


图 4c

图 4d