



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103105383 A

(43) 申请公布日 2013. 05. 15

(21) 申请号 201210459090. 1

(22) 申请日 2012. 11. 14

(30) 优先权数据

102011055330. 4 2011. 11. 14 DE

(71) 申请人 徕卡显微系统复合显微镜有限公司

地址 德国韦茨拉尔

(72) 发明人 B·威兹高斯盖

(74) 专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理  
有限公司 11280

代理人 王勇 王博

(51) Int. Cl.

G01N 21/64 (2006. 01)

G02B 21/00 (2006. 01)

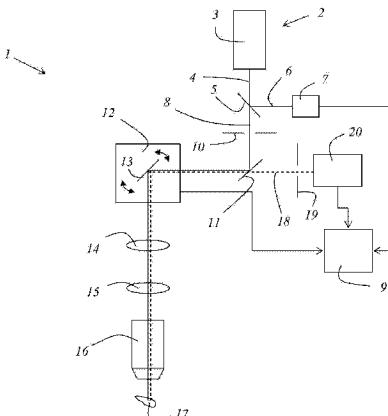
权利要求书5页 说明书7页 附图6页

(54) 发明名称

测量样本中激发态寿命的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种测量样本中激发态寿命的方法，特别是测量荧光寿命的方法，以及执行这种方法的设备。首先，生成激发脉冲并用该激发脉冲照亮样本区域。随后，生成表示激发脉冲的功率 - 时间曲线的第一数字数据序列，并且根据第一数字数据序列确定第一开关时刻。此外，利用检测器检测从样本区域发出的检测光，生成表示检测光的功率 - 时间曲线的第二数字数据序列，并且根据第二数字数据序列确定第二开关时刻。最后，计算第一和第二开关时刻之间的时间差。



1. 一种测量样本中激发态寿命的方法,特别是测量荧光寿命的方法,包括下述步骤:
  - a. 生成激发脉冲并用该激发脉冲照亮样本区域,
  - b. 生成表示激发脉冲的功率 - 时间曲线的第一数字数据序列,
  - c. 根据第一数字数据序列确定第一开关时刻,
  - d. 利用检测器检测从样本区域发出的检测光,
  - e. 生成表示检测光的功率 - 时间曲线的第二数字数据序列,
  - f. 根据第二数字数据序列确定第二开关时刻,及
  - g. 计算第一和第二开关时刻之间的时间差。
2. 如权利要求 1 的方法,其中,
  - a. 循环地重复步骤 a-g,并且 / 或者
  - b. 以恒定重复频率循环地重复步骤 a-g。
3. 如权利要求 1 或 2 的方法,其中,激发脉冲源自主光脉冲,主光脉冲的一部分被传递到激发检测器,激发检测器生成第一模拟电信号,第一模拟电信号的幅度 - 时间曲线取决于主光脉冲的该部分的功率的时间曲线,并且,为了生成第一数字数据序列,第一模拟电信号具体地以预定和 / 或可预定的第一时隙在时间上采样。
4. 如权利要求 3 的方法,其中,利用标准化电信号,具体地利用二进制数字生成第一数据序列,生成的方式如下:当取样的幅度低于定义的和 / 或可定义的第一激发阈值时,生成较低的标准化信号,或者当取样的幅度高于定义的和 / 或可定义的第二激发阈值时,生成不同于较低标准化信号的较高的标准化信号。
5. 如权利要求 1-4 中任一项的方法,其中,检测器生成第二模拟电信号,第二模拟电信号的幅度 - 时间曲线取决于检测光的功率的时间曲线,并且,为了生成第二数字数据序列,第二模拟电信号具体地以预定和 / 或可预定的第二时隙在时间上采样。
6. 如权利要求 5 的方法,其中,利用标准化电信号,具体地利用二进制数字生成第二数据序列,生成的方式如下:当取样的幅度低于定义的和 / 或可定义的第一检测阈值时,生成较低的标准化信号,或者当取样的幅度高于定义的和 / 或可定义的第二检测阈值时,生成不同于较低标准化信号的较高的标准化信号。
7. 如权利要求 3-6 中任一项的方法,其中,
  - a. 以远高于重复频率的采样频率对第一和 / 或第二模拟电信号进行采样,并且 / 或者
  - b. 以比重复频率高大于 50 倍,具体地高大于 100 倍的采样频率对第一和 / 或第二模拟电信号进行采样,并且 / 或者
  - c. 以比重复频率高大约 125 倍的采样频率对第一和 / 或第二模拟电信号进行采样,并且 / 或者
  - d. 以 10GHz 的采样频率对第一和 / 或第二模拟电信号进行采样,而重复频率为 80MHz。
8. 如权利要求 3-7 中任一项的方法,其中,为了增加时间分辨率,
  - a. 重复地对第一模拟电信号进行采样,并且 / 或者
  - b. 重复地对第一模拟电信号进行采样,但带有比时隙短的时间偏移量,具体地是连续可调的时间偏移量,并且 / 或者
  - c. 对第一模拟电信号采样 n 次,但带有对应于时隙的第 n 个系数的时间偏移量,并且 / 或者

- d. 重复地对第二模拟电信号进行采样，并且 / 或者
  - e. 重复地对第二模拟电信号进行采样，但带有比时隙短的时间偏移量，具体地是连续可调的时间偏移量，并且 / 或者
  - f. 对第二模拟电信号采样 n 次，但带有对应于时隙的第 n 个系数的时间偏移量。
9. 如权利要求 8 的方法，其中，多次采样的采样结果在数学上相结合，具体地相互交错，从而分别产生第一数据序列和第二数据序列。
10. 如权利要求 1-9 中任一项的方法，其中，
  - a. 利用第一采样装置生成第一数字数据序列，该第一采样装置包括比较器和 / 或恒定系数鉴频器，并且 / 或者
  - b. 利用第二采样装置生成第二数字数据序列，该第二采样装置包括比较器和 / 或恒定系数鉴频器。
11. 如权利要求 1-10 中任一项的方法，其中，具体地由第一串并转换器将第一数据序列转换成第一并行数据字，并且 / 或者，具体地由第二串并转换器将第二数据序列转换成第二并行数据字。
12. 如权利要求 11 的方法，其中，每个数据字均表示一个测量期间，该测量期间至少与连续激发脉冲之间的时间间隔一样长，优选地，与该时间间隔完全一样长。
13. 如权利要求 1-12 中任一项的方法，其中，第一开关时刻被限定为下述时刻：
  - a. 在第一数据序列内和 / 或在第一数据字内从较低标准化信号变为较高标准化信号或从较高标准化信号变为较低标准化信号的时刻，或者
  - b. 根据在第一数据序列内和 / 或在第一数据字内从较低标准化信号变为较高标准化信号的第一变化时刻和从较高标准化信号变为较低标准化信号的第二变化时刻计算，并且具体地通过计算变化之间的时间间隔的算术平均值计算第一开关时刻。
14. 如权利要求 1-13 中任一项的方法，其中，第二开关时刻被限定为下述时刻：
  - a. 在第二数据序列内和 / 或在第二数据字内从较低标准化信号变为较高标准化信号或从较高标准化信号变为较低标准化信号的时刻，或者
  - b. 根据在第二数据序列内和 / 或在第二数据字内从较低标准化信号变为较高标准化信号的第一变化时刻和从较高标准化信号变为较低标准化信号的第二变化时刻计算，并且具体地通过计算变化之间的时间间隔的算术平均值计算第二开关时刻。
15. 如权利要求 1-14 中任一项的方法，其中，生成多个计算出的时间差的至少一个频率分布。
16. 如权利要求 1-14 中任一项的方法，其中，
  - a. 不同的样本区域，具体地彼此相邻和 / 或在扫描线彼此相邻布置的样本区域被相继地顺序分析激发态寿命，并且 / 或者
  - b. 不同的样本区域，具体地彼此相邻和 / 或在扫描线彼此相邻布置的样本区域被相继地顺序分析激发态寿命；位置信息被添加到每个样本区域的数据序列和 / 或数据字和 / 或频率分布和 / 或时间差中，
  - c. 不同的样本区域，具体地彼此相邻和 / 或在扫描线彼此相邻布置的样本区域被相继地顺序分析激发态寿命，并且生成样本的荧光寿命影像 (FLIM)。
17. 如权利要求 1-15 中任一项的方法，其中，扫描装置用于引导激发光和 / 或检测光。

18. 一种用于执行根据权利要求 1-17 中任一项的方法的装置。

19. 一种测量样本中激发态寿命的设备,特别是测量荧光寿命的设备,该设备包括用于产生激发脉冲以利用该激发脉冲照亮样本区域的光源以及用于检测从样本区域发出的检测光的检测器,其中还提供有控制装置,该控制装置:

- a. 生成表示激发脉冲的功率 - 时间曲线的第一数字数据序列,
- b. 根据第一数字数据序列确定第一开关时刻,
- c. 生成表示检测光的功率 - 时间曲线的第二数字数据序列,
- d. 根据第二数字数据序列确定第二开关时刻,
- e. 计算第一和第二开关时刻之间的时间差。

20. 如权利要求 19 的设备,其中,光源产生激发脉冲的序列,具体地产生恒定重复频率的激发脉冲序列,并且控制装置循环地重复步骤 a-e。

21. 如权利要求 19 或 20 的设备,其中,光源生成主光束,该主光束被光束分离器分成包括激发脉冲的激发束以及测量束,激发检测器接收测量束并生成第一模拟电信号,第一模拟电信号的幅度 - 时间曲线取决于测量束的功率的时间曲线,并且,为了生成第一数字数据序列,控制装置具体地以预定和 / 或可预定的第一时隙在时间上对第一模拟电信号进行采样。

22. 如权利要求 19-21 中任一项的设备,其中,控制装置利用标准化电信号,具体地利用二进制数字生成第一数据序列,生成的方式如下:当取样的幅度低于定义的和 / 或可定义的第一激发阈值时,生成较低的标准化信号,或者当取样的幅度高于定义的和 / 或可定义的第二激发阈值时,生成不同于较低标准化信号的较高的标准化信号。

23. 如权利要求 19-22 中任一项的设备,其中,检测器生成第二模拟电信号,第二模拟电信号的幅度 - 时间曲线取决于检测光的功率的时间曲线,并且,为了生成第二数字数据序列,控制装置具体地以预定和 / 或可预定的第二时隙在时间上对第二模拟电信号进行采样。

24. 如权利要求 19-23 中任一项的设备,其中,控制装置利用标准化电信号,具体地利用二进制数字生成第二数据序列,生成的方式如下:当取样的幅度低于定义的和 / 或可定义的第一检测阈值时,生成较低的标准化信号,或者当取样的幅度高于定义的和 / 或可定义的第二检测阈值时,生成不同于较低标准化信号的较高的标准化信号。

25. 如权利要求 21-24 中任一项的设备,其中,控制装置

a. 以远高于重复频率的采样频率对第一和 / 或第二模拟电信号进行采样,并且 / 或者  
b. 以比重复频率高多于 50 倍,具体地高多于 100 倍的采样频率对第一和 / 或第二模拟电信号进行采样,并且 / 或者

c. 以比重复频率高大约 125 倍的采样频率对第一和 / 或第二模拟电信号进行采样,并且 / 或者

d. 以 10GHz 的采样频率对第一和 / 或第二模拟电信号进行采样,而重复频率为 80MHz。

26. 如权利要求 21-25 中任一项的设备,其中,为了增加时间分辨率,控制装置

a. 重复地对第一模拟电信号进行采样,并且 / 或者  
b. 重复地对第一模拟电信号进行采样,但带有比时隙短的时间偏移量,具体地是连续可调的时间偏移量,并且 / 或者

- c. 对第一模拟电信号采样 n 次,但带有对应于时隙的第 n 个系数的时间偏移量,并且 / 或者
  - d. 重复地对第二模拟电信号进行采样,并且 / 或者
  - e. 重复地对第二模拟电信号进行采样,但带有比时隙短的时间偏移量,具体地是连续可调的时间偏移量,并且 / 或者
  - f. 对第二模拟电信号采样 n 次,但带有对应于时隙的第 n 个系数的时间偏移量。
- 27. 如权利要求 26 的设备,其中,控制装置将多次采样的采样结果在数学上相结合,具体地相互交错,从而分别产生第一数据序列和第二数据序列。
- 28. 如权利要求 19-27 中任一项的设备,其中,
  - a. 利用第一采样装置生成第一数字数据序列,该第一采样装置包括比较器和 / 或恒定系数鉴频器,并且 / 或者
  - b. 利用第二采样装置生成第二数字数据序列,该第二采样装置包括比较器和 / 或恒定系数鉴频器。
- 29. 如权利要求 19-28 中任一项的设备,其中,提供第一串并转换器以将第一数据序列转换成第一并行数据字,并且 / 或者,提供第二串并转换器以将第二数据序列转换成第二并行数据字。
- 30. 如权利要求 29 的设备,其中,第一和 / 或第二串并转换器生成均表示一个测量期间的数据字,该测量期间至少与连续激发脉冲之间的时间间隔一样长,优选地,与该时间间隔完全一样长。
- 31. 如权利要求 19-30 中任一项的设备,其中,
  - a. 控制装置将第一开关时刻限定为在第一数据序列内和 / 或在第一数据字内从较低标准化信号变为较高标准化信号或从较高标准化信号变为较低标准化信号的时刻,或者
  - b. 控制装置根据在第一数据序列内和 / 或在第一数据字内从较低标准化信号变为较高标准化信号的第一变化时刻和从较高标准化信号变为较低标准化信号的第二变化时刻计算第一开关时刻,并且具体地通过计算算术平均值计算第一开关时刻。
- 32. 如权利要求 19-31 中任一项的设备,其中,
  - a. 控制装置将第二开关时刻限定为在第二数据序列内和 / 或在第二数据字内从较低标准化信号变为较高标准化信号或从较高标准化信号变为较低标准化信号的时刻,或者
  - b. 控制装置根据在第二数据序列内和 / 或在第二数据字内从较低标准化信号变为较高标准化信号的第一变化时刻和从较高标准化信号变为较低标准化信号的第二变化时刻计算第二开关时刻,并且具体地通过计算算术平均值计算第二开关时刻。
- 33. 如权利要求 19-31 中任一项的设备,其中,控制装置生成多个计算出的时间差的至少一个频率分布。
- 34. 如权利要求 19-33 中任一项的设备,其中,
  - a. 提供扫描装置,用于将激发光导向不同的样本位置和 / 或用于扫描样本,并且 / 或者
  - b. 提供扫描装置,用于将激发光导向不同的样本位置和 / 或用于扫描样本,控制装置将和扫描装置的具体位置有关的位置信息添加到每个样本区域的数据序列和 / 或数据字和 / 或频率分布和 / 或时间差中。
- 35. 如权利要求 19-34 中任一项的设备,其中,控制装置和 / 或至少一个采样装置和

/ 或至少一个串并转换器形成可编程集成电路的一部分, 具体地, 形成现场可编程门阵列(FPGA)的一部分。

36. 如权利要求 19-34 中任一项的设备, 其中, 该设备形成扫描显微镜的一部分, 具体地, 形成共聚集扫描显微镜的一部分。

37. 一种包括根据权利要求 19-35 中任一项的设备的扫描显微镜。

## 测量样本中激发态寿命的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及测量样本中激发态寿命的方法,具体地,涉及测量荧光寿命的方法以及用于实施这种方法的设备。

[0002] 本发明还涉及测量样本中激发态寿命的设备,具体地,涉及测量荧光寿命的设备,该设备包括用于产生激发脉冲以利用该激发脉冲照亮样本区域的光源以及用于检测从样本区域发出的检测光的检测器。

### 背景技术

[0003] 通过分析利用一种或多种荧光染料标记的样本的激发态寿命,可获得与样本性质有关的重要信息。尤其是当使用多种荧光染料时,可以通过利用荧光寿命成像显微仪(FLIM)获得与被分析的样本区域有关的信息(例如与其成分和环境有关的信息)。在细胞生物学中,例如,可以通过测量荧光染料的寿命间接地推断出样本区域中的钙离子浓度。

[0004] 现有多种方法来测量荧光染料的激发态寿命。一些方法在1999年Kluwer Academic/Plenum出版的由Joseph R. Lakowicz所著的教科书“Principles of Fluorescence Spectroscopy”第二版中有所描述。例如,可以调制激发光随着时间的功率,从而可以通过发出光的相位延迟推断出激发态的寿命。

[0005] 还可以利用短光脉冲激发荧光染料,从而可以电子地测量发射脉冲的时间延迟。举例来说,德国专利公开文献DE 102004017956A1描述了一种分析样本中激发态的寿命的显微镜,其包括至少一个用于产生激发光的光源以及至少一个用于接收从样本发出的检测光的检测器。显微镜的特征在于:光源包括发出脉冲激发光的半导体激光器以及调整设备,调整设备用于将脉冲重复频率调整至样本的特定的寿命特性。

[0006] 具体地,数据分析所需的电子设备是可商购的,其通常以PC插卡的形式提供。然而,除了高成本之外,这样的时间测量卡具有死区时间特别长的缺点,从而,在样本激发之后,其仅能够检测第一个检测脉冲(第一个检测光子)的到达然后在很长的一段时间内处于“盲”状态。最终,对于用户来说,包含在从样本发出的检测光中的信息的很大一部分仍然是隐藏的。

[0007] 此外,不可能对激发脉冲实现高重复频率,因此,也不可能在一个测量周期内进行频繁地测量。实际可实现的测量率远低于可商购的脉冲激光器的一般重复频率。出于该原因,举例来说,需要十分长的时间才能收集足够的数据以生成FLIM影像。

### 发明内容

[0008] 因此,本发明的一个目的在于提供一种可能在较短的时间内获得更精确测量结果的方法。

[0009] 该目的是通过包括下述步骤的方法来实现的:

[0010] a. 生成激发脉冲并用该激发脉冲照亮样本区域,

[0011] b. 生成表示激发脉冲的功率-时间曲线的第一数字数据序列,

- [0012] c. 根据第一数字数据序列确定第一开关时刻，  
[0013] d. 利用检测器检测从样本区域发出的检测光，  
[0014] e. 生成表示检测光的功率 - 时间曲线的第二数字数据序列，  
[0015] f. 根据第二数字数据序列确定第二开关时刻，及  
[0016] g. 计算第一和第二开关时刻之间的时间差。
- [0017] 本发明的另一目的是提供一种可能在较短的时间内获得更精确测量结果的设备。  
[0018] 该目的是通过上述类型的设备来实现的，该设备包括控制装置，该控制装置：  
[0019] a. 生成表示激发脉冲的功率 - 时间曲线的第一数字数据序列，  
[0020] b. 根据第一数字数据序列确定第一开关时刻，  
[0021] c. 生成表示检测光的功率 - 时间曲线的第二数字数据序列，  
[0022] d. 根据第二数字数据序列确定第二开关时刻，  
[0023] e. 计算第一和第二开关时刻之间的时间差。
- [0024] 根据本发明，尤其发现：仅当信息处理控制装置也能够检测这些发生在第一光子到达之后的但仍属于同一激发脉冲的光子事件时，可以获得除第一光子的到达时间之外的额外信息。还发现，这可以通过将模拟测量信号立即转换成数字序列而实现。
- [0025] 具体地，本发明有利地使得能够以 80MHz 及以上的重复频率(对应于可商购的脉冲激光器的频率)循环地重复测量。此外，可以获得更精确的与样本的寿命特点有关的信息(具体的由于高数据处理速度)，不仅在任意一个时刻中检测了第一光子的到达时间，还检测了所有光子事件，只要有足够的激发功率。
- [0026] 在方法的一种具体实施方式中，激发脉冲源自主光脉冲，主光脉冲的一部分被传送到激发检测器，激发检测器生成第一模拟电信号，第一模拟电信号的幅度 - 时间曲线取决于主光脉冲的该部分的功率的时间曲线，并且，为了生成第一数字数据序列，第一模拟电信号具体地以预定和 / 或可预定的第一时隙在时间上采样。
- [0027] 具体地，光源可生成主光束，该主光束被光束分离器分成包括激发脉冲的激发束以及测量束，激发检测器可接收测量束并生成第一模拟电信号，第一模拟电信号的幅度 - 时间曲线取决于测量束的功率的时间曲线，并且，为了生成第一数字数据序列，控制装置具体地以预定和 / 或可预定的第一时隙在时间上对第一模拟电信号进行采样。
- [0028] 举例来说，可以通过从标准化电信号(具体地，二进制数字)生成第一数据序列而实现第一数据序列的快速生成，生成的方式如下：当取样的幅度低于定义的和 / 或可定义的第一激发阈值时，生成较低的标准化信号(例如“0”)，或者当取样的幅度高于定义的和 / 或可定义的第二激发阈值时，生成不同于较低标准化信号的较高的标准化信号(例如“1”)。
- [0029] 有利地，检测器可生成第二模拟电信号，第二模拟电信号的幅度 - 时间曲线取决于检测光的功率的时间曲线，并且，为了生成第二数字数据序列，控制装置具体地以预定和 / 或可预定的第二时隙在时间上对第二模拟电信号进行采样。
- [0030] 类似于第一数据序列，可以从标准化电信号(具体地，二进制数字)生成第二数据序列，生成的方式如下：当取样的幅度低于定义的和 / 或可定义的第一激发阈值时，生成较低的标准化信号，或者当取样的幅度高于定义的和 / 或可定义的第二激发阈值时，生成不同于较低标准化信号的较高的标准化信号。
- [0031] 为了能够最大程度上检测到所有的光子事件，在有利的实施方式中，为了生成数

据序列,具体地由控制装置以远高于重复频率的采样频率对第一和 / 或第二模拟电信号进行采样。具体地,以比重复频率高大于 50 倍,具体地高大于 100 倍的采样频率对第一和 / 或第二模拟电信号进行采样。在一种特别有利的实施方式中,以比重复频率高大约 125 倍的采样频率对第一和 / 或第二模拟电信号进行采样。在一种具体实施方式中,以 10GHz 的采样频率对第一和 / 或第二模拟电信号进行采样,而重复频率为 80MHz。

[0032] 在一种具体实施方式中,为了进一步增加时间分辨率,重复地对第一模拟电信号进行采样。具体地,可以重复地对第一模拟电信号进行采样,但带有比时隙短的时间偏移量,具体地是连续可调的时间偏移量。

[0033] 在一种提供特别精确结果的特别有利的实施方式中,对第一模拟电信号采样 n 次,但带有对应于时隙的第 n 个系数的时间偏移量。例如,在双采样的情况下,提供的时间偏移量可以相应地是时隙的持续时间的一半。

[0034] 优选地,随后将多次采样的采样结果在数学上相结合,具体地相互交错,从而分别产生第一数据序列和第二数据序列。具体地,通过多次采样和数据上的结合,可以产生包含 n 倍更多数据的数据序列,并且,与通过对单一测量期间的单一采样相比,具有明显更高的信息内容。

[0035] 举例来说,当使用包括比较器和 / 或恒定系数鉴频器的第一采样装置时,可以更快且更可靠地生成第一数字数据序列。具体地,这使得可能毫无压力地实现数十 Gbits(例如,28Gbits)范围内的采样率。这同样适于第二数字数据序列的生成,其有利地利用第二采样装置进行,该第二采样装置也包括比较器和 / 或恒定系数鉴频器。采样率可以相同,但并非必须相同。而且,取决于具体的应用,用于生成第一数字数据序列的采样率可以不同于用于生成第二数字数据序列的采样率。

[0036] 在方法的一种有利实施方式中,第一数据序列被转换成第一并行数据字,并且 / 或者第二数据序列被转换成第二并行数据字。具体地,可提供第一串并转换器以将第一数据序列转换成第一并行数据字。可选地或此外,可提供第二串并转换器以将第二数据序列转换成第二并行数据字。这样的实施方式具有如下特别优势:可以在并行运行的评估电子元件中快速且有效地处理数据字。

[0037] 具体地,第一和 / 或第二串并转换器可有利地生成均表示一个测量期间的数据字,该测量期间至少与连续激发脉冲之间的时间间隔一样长。

[0038] 下述情况是特别有利的:第一和 / 或第二串并转换器生成均表示一个测量期间的数据字,该测量期间与连续激发脉冲之间的时间间隔完全一样长,这是因为,随后与和激发脉冲关联的测量周期有关的所有信息在任意一个时刻被结合到一个数据字中。这有助于处于数据并增加了分析的速度和效率。

[0039] 有利地,具体地可由控制装置将第一开关时刻限定为在第一数据序列内和 / 或在第一数据字内从较低标准化信号变为较高标准化信号或从较高标准化信号变为较低标准化信号的时刻。这种确定开关时刻的方法十分快速。

[0040] 可选地,可由控制装置根据在第一数据序列内和 / 或在第一数据字内从较低标准化信号变为较高标准化信号的第一变化时刻和从较高标准化信号变为较低标准化信号的第二变化时刻计算第一开关时刻,并且具体地通过计算变化之间的时间间隔的算术平均值计算第一开关时刻。这种确定开关时刻的方法十分精确。

[0041] 类似的,可以以相同的方式限定第二开关时刻,即,第二开关时刻被限定为在第二数据序列内和 / 或在第二数据字内从较低标准化信号变为较高标准化信号或从较高标准化信号变为较低标准化信号的时刻。

[0042] 可选地,也可由控制装置根据在第二数据序列内和 / 或在第二数据字内从较低标准化信号变为较高标准化信号的第一变化时刻和从较高标准化信号变为较低标准化信号的第二变化时刻计算第二开关时刻,并且具体地通过计算变化之间的时间间隔的算术平均值计算第二开关时刻。

[0043] 可以通过生成多个计算出的时间差的至少一个频率分布而获得十分精确的与待分析的样本区域的性质有关的信息。举例来说,频率分布可用在样本的 FLIM 影像的生成中。

[0044] 具体地,为了生成荧光寿命影像,不同的样本区域,具体地彼此相邻和 / 或在扫描线彼此相邻布置的样本区域可以被相继地顺序分析激发态寿命。对于额外的数据分析,将位置信息添加到每个样本区域的数据序列和 / 或数据字和 / 或频率分布和 / 或时间差中是十分有利的。

[0045] 为了能够相继地顺序分析不同的(特别是邻近的)样本位置(具体地用于扫描样本),使用扫描装置引导激发光和 / 或检测光是有利的。扫描装置可包括一个或多个倾转镜,举例来说,倾转镜的旋转位置是通过电流计可调的。

[0046] 在一种特别有利的实施方式中,扫描装置用于将激发光引导到不同的样本位置和 / 或用于扫描样本,控制装置将和扫描装置的具体位置有关的位置信息添加到每个样本区域的数据序列和 / 或数据字和 / 或频率分布和 / 或时间差中。可通过该数据以十分快速和效率的方式生成荧光寿命影像。

[0047] 在一种运行十分可靠和快速的实施方式中,控制装置和 / 或至少一个采样装置和 / 或至少一个串并转换器形成可编程集成电路的一部分,具体地,形成现场可编程门阵列(FPGA)的一部分。这样的实施方式具有额外的优势,即其十分容易适于独立的边界条件。

[0048] 在一种有利的实施方式中,本发明的设备形成扫描显微镜的一部分,具体地,形成共聚集扫描显微镜的一部分。

[0049] 本发明的其他目的、优势、特征和可能应用可源自下文中参考附图对示例性实施方式的说明。在本文中,所有描述的和 / 或展示的特征单独或以任意有用组合的方式构成了本发明的主题,而不管它们在权利要求中或其前序部分中的组合方式。

## 附图说明

[0050] 附图中:

[0051] 图 1 描述了包括有根据本发明的设备的扫描显微镜的示例性实施方式;

[0052] 图 2 示出了激发光和检测光在极低激发功能和高激发功率下的功率 - 时间曲线;

[0053] 图 3 示出了激发光和检测光的时间曲线以及在一种可能的实施方式数字数据序列的表示法;

[0054] 图 4 示出了激发光和检测光的时间曲线以及在另一种可能的实施方式数字数据序列的表示法;

[0055] 图 5 以示意性的形式示出了一种示例性实施方式;及

[0056] 图 6 示意性地示出了为第一和 / 或第二模拟电信号增加时间分辨率的过程。

### 具体实施方式

[0057] 图 1 示出了包括有根据本发明的设备的扫描显微镜的示例性实施方式。扫描显微镜 1 是共聚焦扫描显微镜。

[0058] 扫描显微镜 1 具有脉冲激光器 3 形式的光源 2, 其适于产生激发脉冲的快速序列。具体地, 脉冲激光器 3 产生入射到第一光束分离器 5 上的主光束 4。在此处, 主光束 4 被分成测量束 6 和激发束 8。测量束 6 被导入到激发检测器 7 上。激发检测器 7 生成第一模拟电信号, 其幅度 - 时间曲线与激发束 8 的功率的时间曲线成比例。第一模拟电信号被传递到控制装置 9 上, 控制装置 9 由此生成表示激发束 8 的功率 - 时间曲线的第一数字数据序列。

[0059] 激发束 8 通过照明针孔 10, 随后到达主光束分离器 11。主光束分离器将激发束 8 导向扫描装置 12, 该扫描装置 12 包括利用万向接头安装的扫描镜 13。随后, 激发束 8 通过扫描光学元件 14、管状光学元件 15, 并通过显微镜物镜 16, 到达样本 17。因此, 样本区域暴露在激发光之下, 由此光学的激发其中存在的荧光染料。

[0060] 从样本发出的检测光 18 沿着激发束 8 从主光束分离器 11 至样本 17 的相同光学路径到达主光束分离器 11, 但方向相反, 随后通过主光束分离器和下游的检测针孔 19, 并最终到达检测器 20。

[0061] 检测器 20 生成第二模拟电信号, 其幅度 - 时间曲线取决于检测光 18 的功率的时间曲线。第二模拟电信号还传送给控制装置 9。在此处, 为了生成第二数字数据序列, 第二模拟电信号以预定的第二时隙在时间上取样。在这一点上, 如下文中示例性实施方式更详细描述的那样, 控制装置 9 以与第一数据序列时间相关的方式生成第二数据序列。

[0062] 扫描装置 12 将与扫描镜 13 的具体位置有关的信息传送给控制装置 9。控制装置 9 将该信息与从第一模拟电信号和第二模拟电信号分别获得的数据相互关联, 以使得可以推断出数据属于哪个样本位置。

[0063] 图 2 在其上半部分示出了在十分低的激发功率下的激发光 21 的功率 - 时间曲线以及检测光 22 的功率 - 时间曲线。可看出, 由于激发光的低功率造成的低发射几率, 仅可能捕捉和检测到一些光子事件 23 (photon event)。这样的测量情况仍然可以通过现有技术中的设备来处理。然而, 这不适用于图中下半部分所示的情况(高激发功率)。

[0064] 在高激发功率的情况下, 发射几率高到一个激发脉冲 24 可能甚至触发若干个光子事件 23。第一数字数据序列 25 和第二数字数据序列 26 的生成在图 3 和图 4 中示出。

[0065] 图 3 和图 4 示出了从标准化电信号(即, 二进制数字 0 和 1)生成数字数据序列 25、26 的实施方式, 生成的方式如下: 当取样的幅度低于定义的和 / 或可定义的第一激发阈值时, 设置较低的标准化信号(即 0), 当取样的幅度高于定义的和 / 或可定义的第二激发阈值时, 设置较高的标准化信号(即 1)。这两个阈值可以相同, 但并非必须相同。

[0066] 在图 3 所示的实施方式中, 第一开关时刻 27 被限定(具体地, 由控制装置 9 限定)为在第一数据序列 25 内和 / 或在第一数据字内从较低标准化信号(即 0)变为较高标准化信号(即 1)的时刻。

[0067] 类似地, 关于第二数据序列 26, 第二开关时刻 28 被限定为在第二数据序列 26 内和

/ 或在第二数据字内从较低标准化信号(即 0)变为较高标准化信号(即 1)的时刻。

[0068] 图 4 示出了利于与恒定系数鉴频器一起使用的另一实施方式。在该实施方式中,第一开关时刻 27 被限定(具体地,由控制装置 9 限定)为在第一数据序列 25 内和 / 或在第一数据字内第一变化时刻(从较低标准化信号变为较高标准化信号)和第二变化时刻(从较高标准化信号变为较低标准化信号)的算术平均值。类似地,第二开关时刻 28 也被计算为第二数据序列 26 内的相应变化时刻的算术平均值。

[0069] 图 5 以示意性示图示出了示例性实施方式,其中,为清楚起见,独立的元件被示为方框。利用从脉冲激光器 3 形式的光源 2 发出的照明光 8 照亮样本 17。同时,生成第二模拟电信号,其幅度与照明光 8 的功率成比例。第一模拟电信号被传送到第一恒定系数鉴频器 42 以进行信号修整。随后,修整的第一模拟电信号传送到第一比较器 43,第一比较器 43 通过在时间上对第一模拟信号取样而生成第一数字数据序列。

[0070] 第一数字数据序列被传送到串并转换器 29,串并转换器 29 生成第一并行数据字。在各种情况下,数据字表示一个测量周期,该测量周期与连续激发脉冲之间的时间间隔完全一样长。随后,数据字被传送至关联单元 30。

[0071] 检测器 20 接收从样本 17 发出的检测光 18 并生成第二模拟电信号,该第二模拟电信号被传送到第二恒定系数鉴频器 31 以进行信号修整。修整的第二模拟电信号随后被传送到第二比较器 32,第二比较器 32 通过在时间上对第二模拟信号取样而生成第二数字数据序列。第二数字数据序列随后被传送到串并转换器 33,串并转换器 33 生成第二并行数据字。在各种情况下,第二并行数据字表示一个测量周期,该测量周期与连续激发脉冲之间的时间间隔完全一样长。随后,第二数据字也被传送至关联单元 30。

[0072] 扫描控制单元 34 将与被检测的样本区域关联的像素数据传送给关联单元 30。

[0073] 关联单元 30 将第一数据字、第二数据字和像素数据在数据包内彼此相互关联。数据包随后被传送到单元 35 以确定开关时刻并计算第一和第二开关时刻之间的时间差。此外,在单元 35 中还计算每种情况中的时间差的频率分布。计算的数据和信息被输送到存储器 36 中并存储在其中。还可能在稍后离线分析数据和信息。可选地或此外,数据可在实验中在线显示给用户,例如,以 FLIM 影像的形式。

[0074] 图 6 示意性地示出了为第一和 / 或第二模拟电信号的粗采样(drafting sampling)增加时间分辨率的过程。在该过程中,各自的模拟电信号 37 由比较器 32(如上文详细描述的那样)转换成 n 个相同的数字数据序列 38。每个数字数据序列 38 经过延迟阶段 39-1 至 39-n。延迟阶段 39-1 至 39-n 将各个数字数据序列 38 延迟至不同的程度。延迟阶段 39-x 的延迟时间与下一阶段 39-(x+1) 的延迟时间相差一时间偏移量,该时间偏移量对应于时隙的第 n 个系数。随后,数字数据序列 38 都被传送到各自的串并转换器 40-1 至 40-n,串并转换器 40-1 至 40-n 生成各自的数字数据字。这些数据字随后在组合和关联单元 41 在数学上结合。

[0075] 附图标记列表

[0076] 1 扫描显微镜

[0077] 2 光源

[0078] 3 脉冲激光器

[0079] 4 主光束

- [0080] 5 光束分离器
- [0081] 6 测量束
- [0082] 7 激发检测器
- [0083] 8 激发束
- [0084] 9 控制装置
- [0085] 10 照明针孔
- [0086] 11 主光束分离器
- [0087] 12 扫描装置
- [0088] 13 扫描镜
- [0089] 14 扫描光学元件
- [0090] 15 管状光学元件
- [0091] 16 显微镜物镜
- [0092] 17 样本
- [0093] 18 检测光
- [0094] 19 检测针孔
- [0095] 20 检测器
- [0096] 21 激发光的功率 - 时间曲线
- [0097] 22 检测光的功率 - 时间曲线
- [0098] 23 光子事件
- [0099] 24 激发脉冲
- [0100] 25 第一数字数据序列
- [0101] 26 第二数字数据序列
- [0102] 27 第一开关时刻
- [0103] 28 第二开关时刻
- [0104] 29 第一串并转换器
- [0105] 30 关联单元
- [0106] 31 恒定系数鉴频器
- [0107] 32 比较器
- [0108] 33 第二串并转换器
- [0109] 34 扫描控制单元
- [0110] 35 单元
- [0111] 36 存储器
- [0112] 37 电信号
- [0113] 38 数字数据序列
- [0114] 39 延迟阶段
- [0115] 40 串并转换器
- [0116] 41 组合和关联单元
- [0117] 42 第一恒定系数鉴频器
- [0118] 43 第一比较器

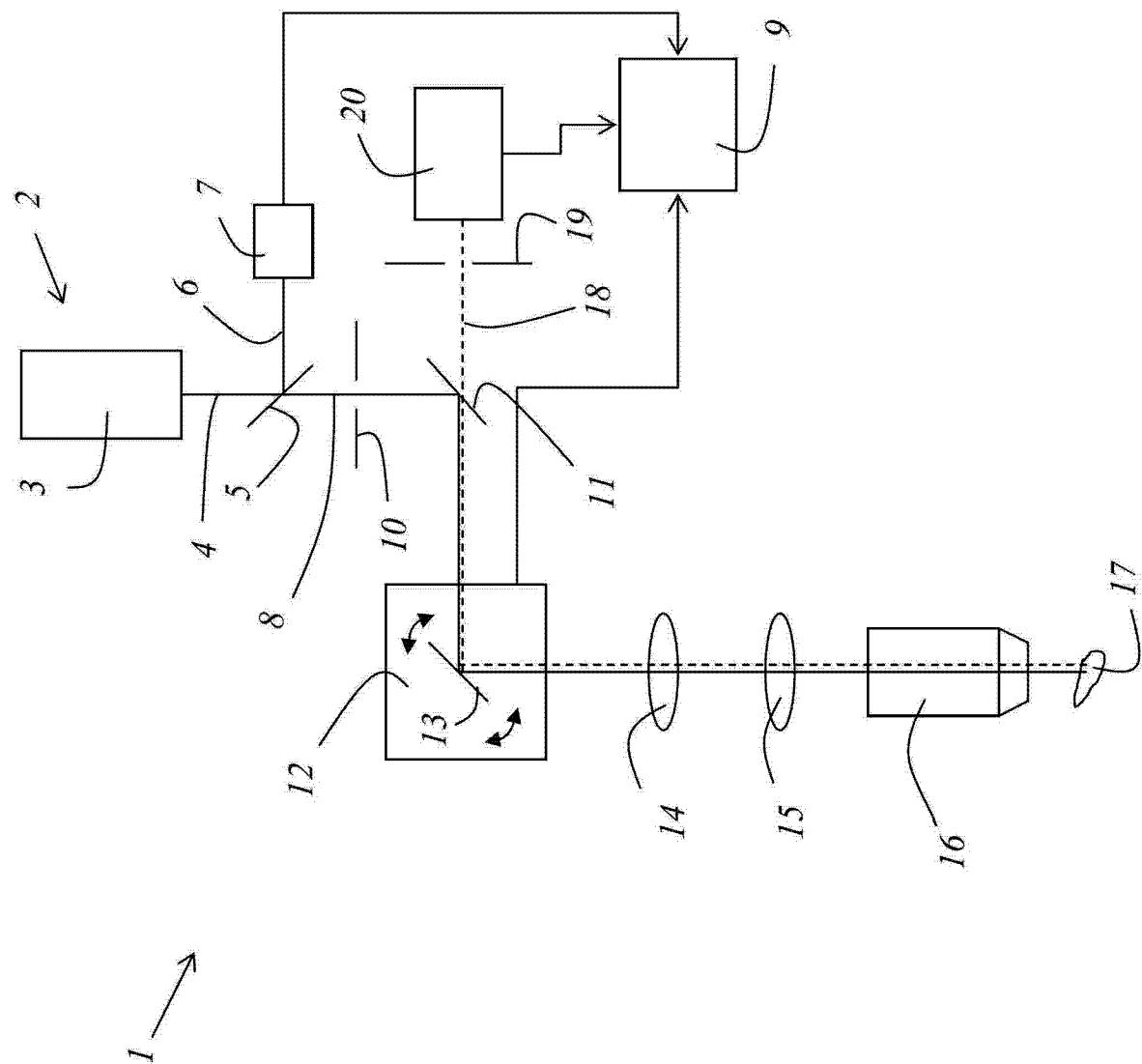


图 1

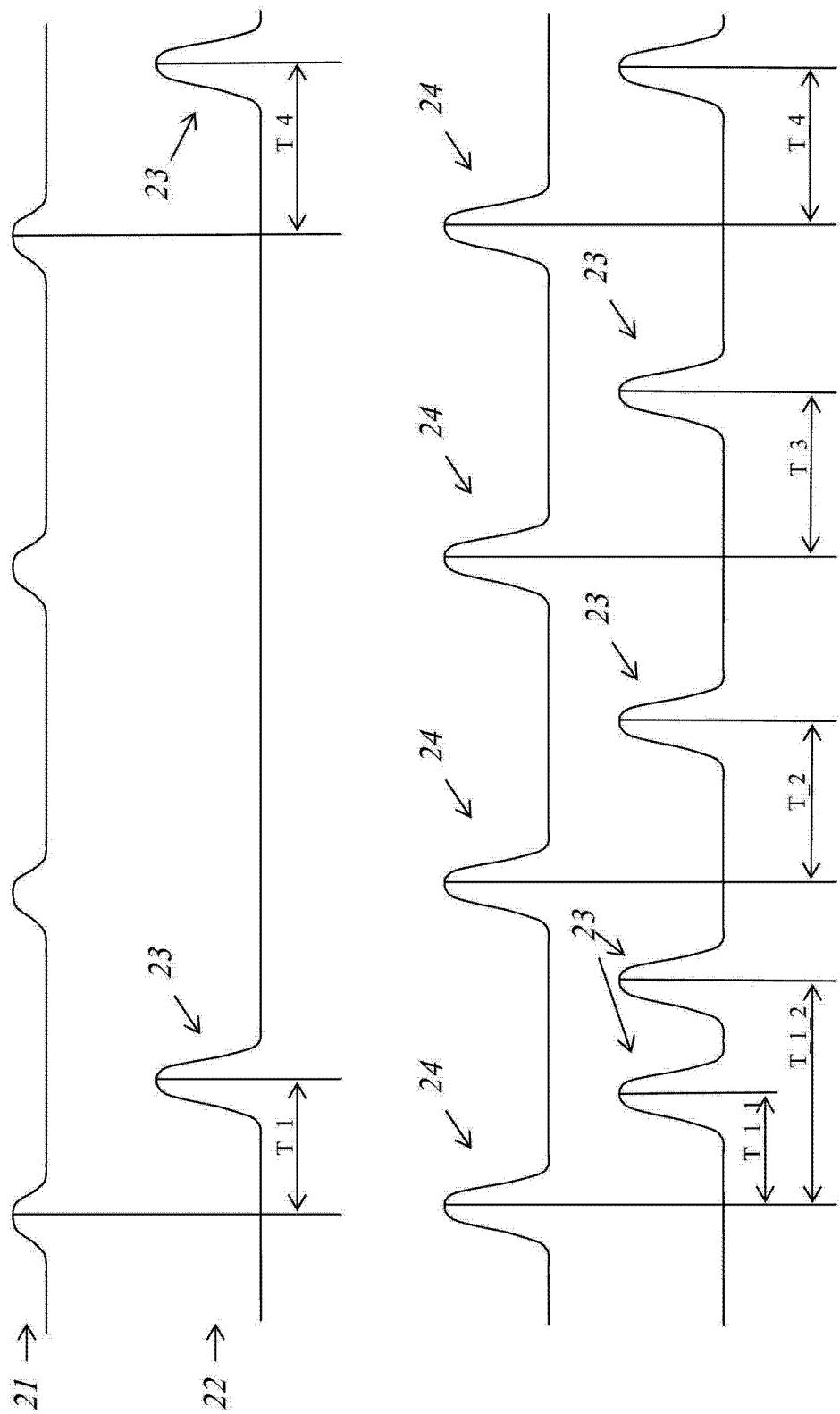


图 2

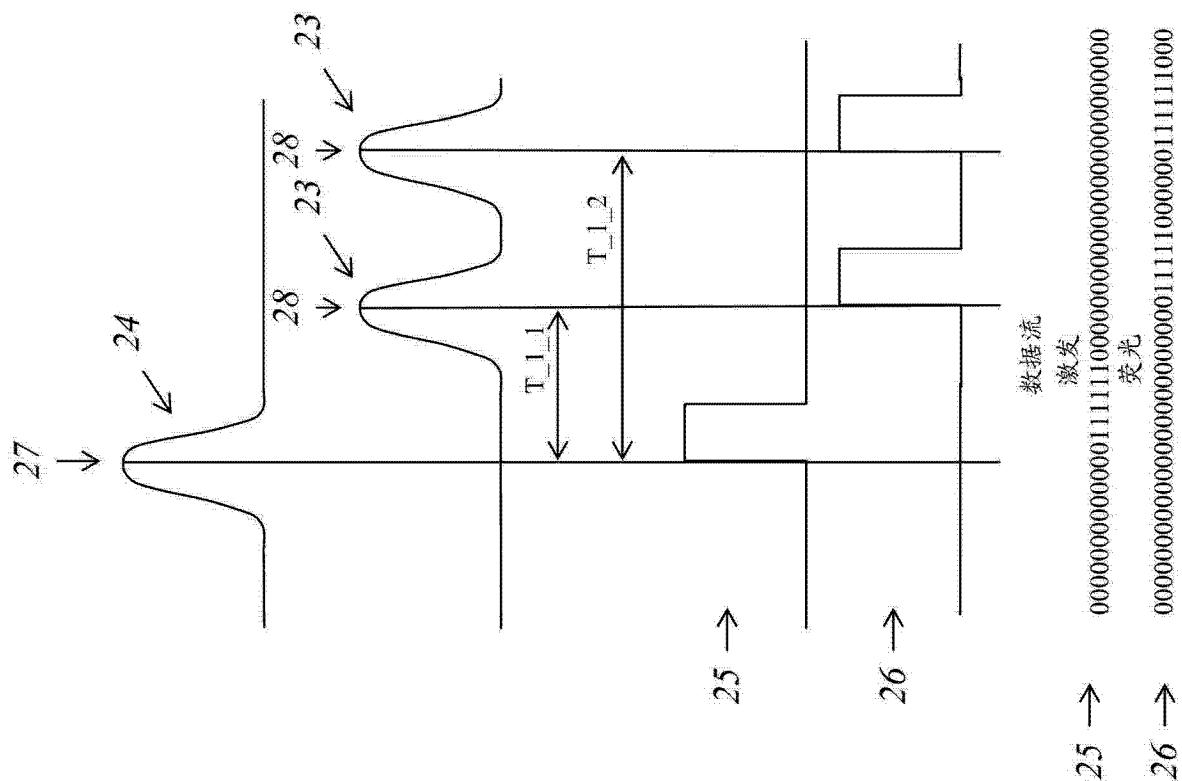


图 3

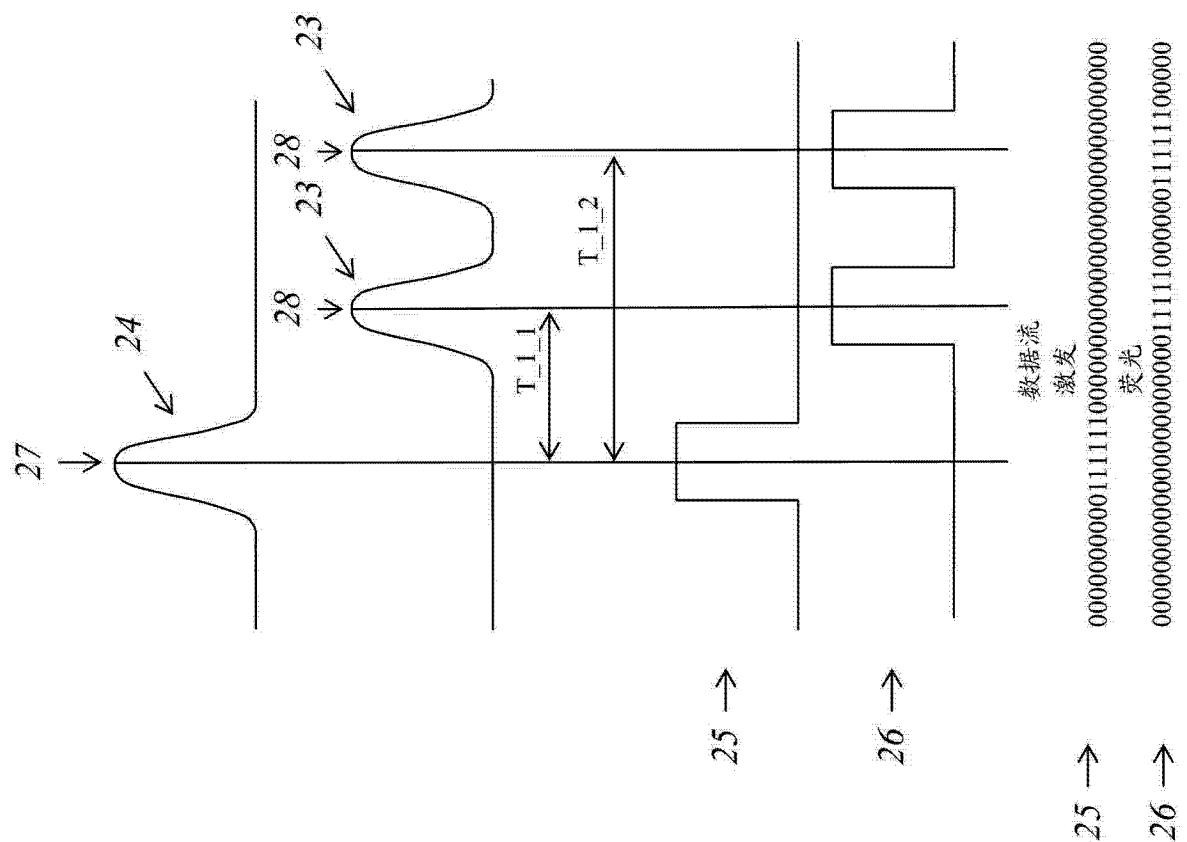


图 4

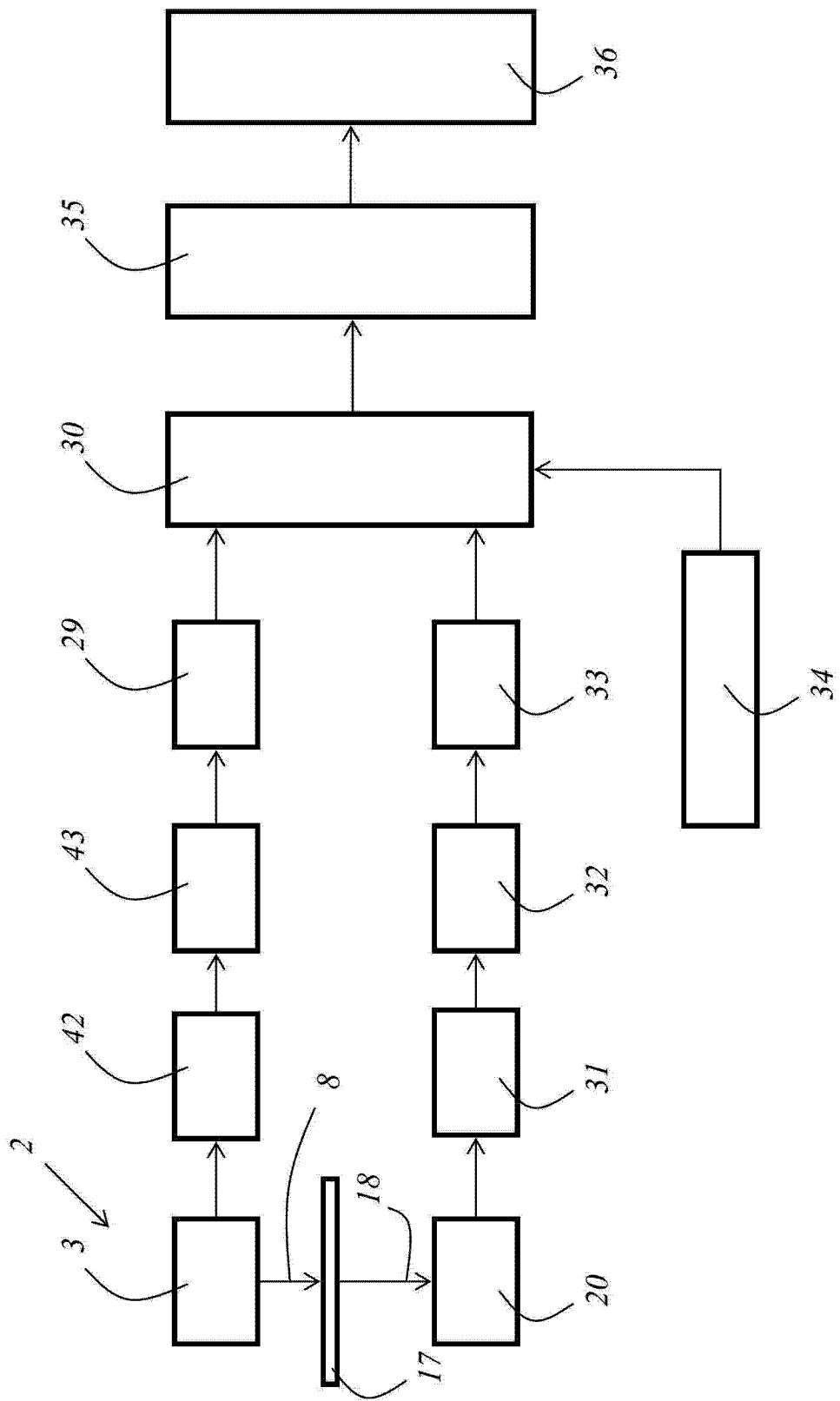


图 5

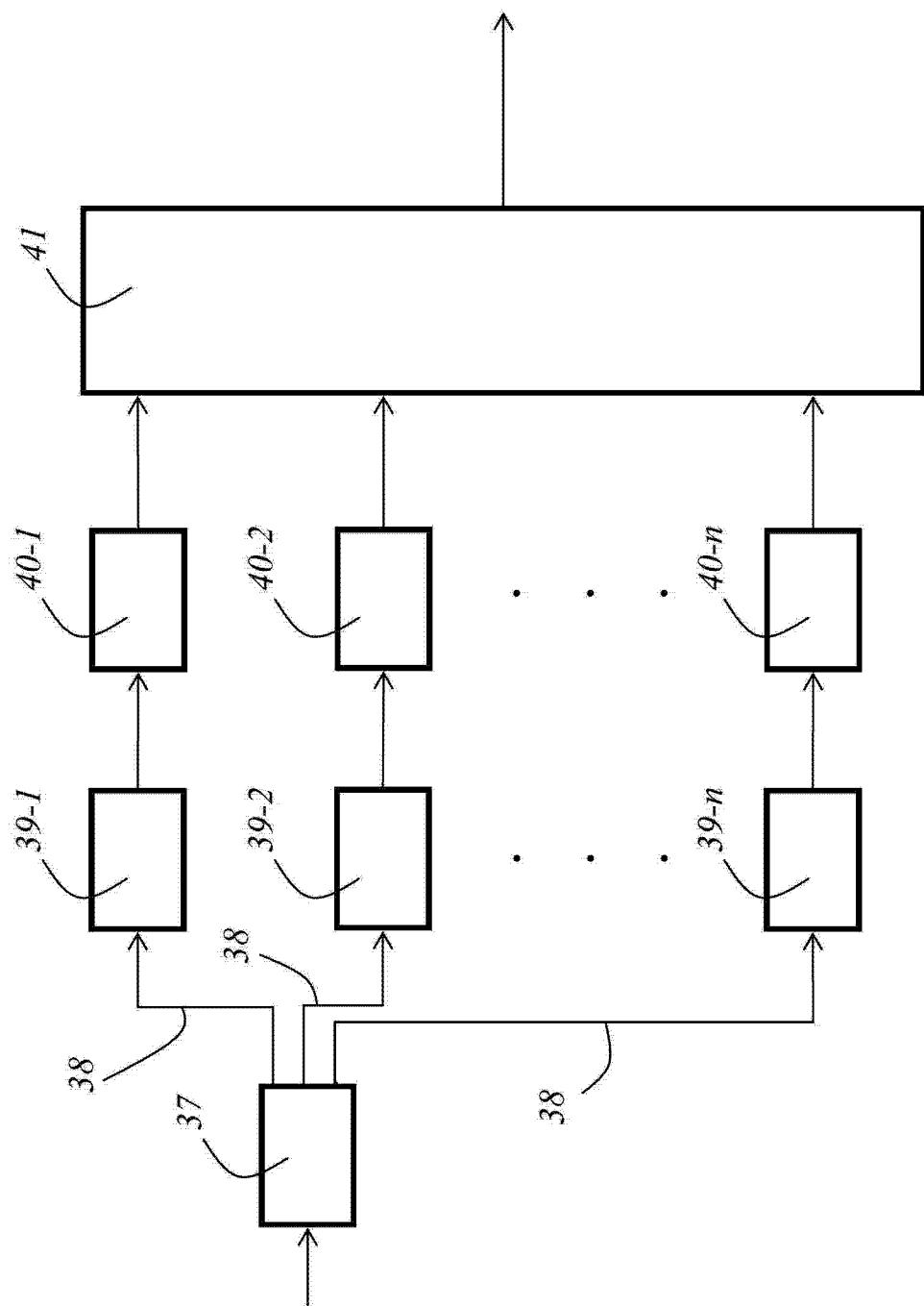


图 6