



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G02B 21/34 (2020.02); G01N 21/64 (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2018126775, 22.12.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
22.12.2016

Дата регистрации:
22.07.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
23.12.2015 EP 15202526.8

(43) Дата публикации заявки: 28.01.2020 Бюл. № 4

(45) Опубликовано: 22.07.2020 Бюл. № 21

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 23.07.2018

(86) Заявка РСТ:
EP 2016/082352 (22.12.2016)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2017/109057 (29.06.2017)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО
"Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

БОАМФА Мариус Иосиф (NL),
ВАЛСТЕР Сусанне Майке (NL),
ВЕРСХЮИРЕН Маркус Антониус (NL)

(73) Патентообладатель(и):

КОНИНКЛЕЙКЕ ФИЛИПС Н.В. (NL)

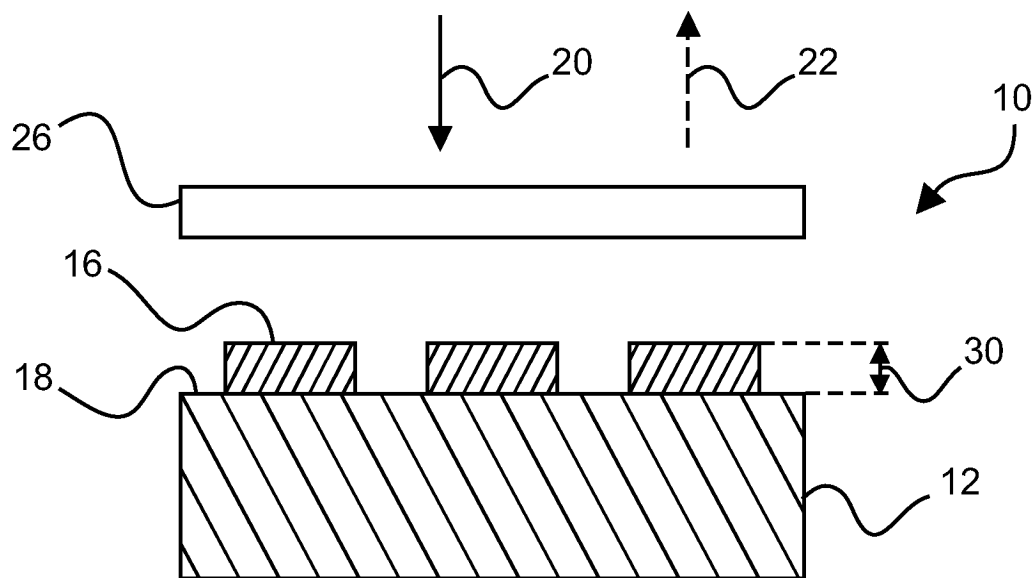
(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: US 2011318226 A1, 29.12.2011. US
2004196455 A1, 07.10.2004. US 2013109050 A1,
02.05.2013. Sarah Kim и др. "Patterned Arrays of
Au Rings for Localized Surface Plasmon
Resonance", LANGMUIR, т. 22, No 17, 2006 г.,
стр. 7109-7112.

(54) ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ КАЛИБРОВочный СЛАЙД

(57) Реферат:

Изобретение относится к области измерительной техники и касается калибровочного слайда. Калибровочный слайд содержит подложку и структуру пикселей. Структура пикселей содержит множество разнесенных металлических наноструктур, расположенных на поверхности подложки. Металлические наноструктуры расположены для создания плазмонных резонансов, которые делают возможным поглощение света на длине волны возбуждения, чтобы создавалось

фотолюминесцентное и/или флуоресцентное излучение для формирования флуоресцентного изображения. Флуоресцентное изображение содержит множество значений интенсивности пикселей, которые предоставляются для калибровки флуоресцентного микроскопа. Технический результат заключается в повышении стабильности во времени излучения слайда и исключении необходимости периодической калибровки калибровочного слайда. 4 н. и 11 з.п. ф-лы, 16 ил.



ФИГ. 1А



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

G02B 21/34 (2020.02); G01N 21/64 (2020.02)(21)(22) Application: **2018126775, 22.12.2016**(24) Effective date for property rights:
22.12.2016Registration date:
22.07.2020

Priority:

(30) Convention priority:
23.12.2015 EP 15202526.8(43) Application published: **28.01.2020 Bull. № 4**(45) Date of publication: **22.07.2020 Bull. № 21**(85) Commencement of national phase: **23.07.2018**(86) PCT application:
EP 2016/082352 (22.12.2016)(87) PCT publication:
WO 2017/109057 (29.06.2017)Mail address:
**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**BOAMFA, Marius, Iosif (NL),
VALSTER, Susanne, Maaïke (NL),
VERSCHUUREN, Marcus, Antonius (NL)**

(73) Proprietor(s):

Koninklijke Philips N.V. (NL)(54) **FLUORESCENT CALIBRATION SLIDE**

(57) Abstract:

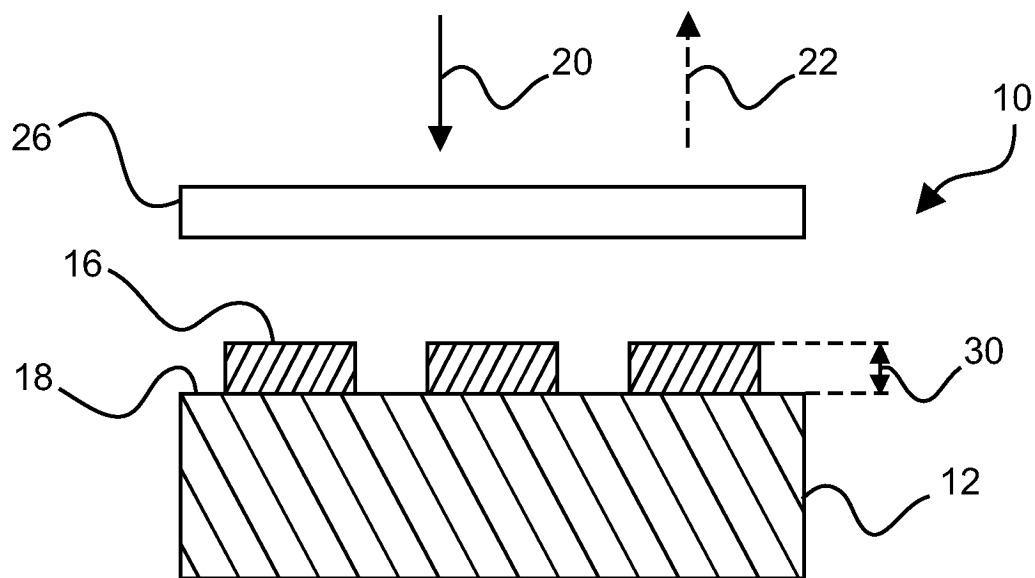
FIELD: measuring equipment.

SUBSTANCE: invention relates to a calibration slide. Calibration slide comprises substrate and pixel structure. Pixel structure comprises a plurality of spaced metal nanostructures arranged on the surface of the substrate. Metal nanostructures are arranged to create plasmon resonances which enable absorption of light at excitation wavelength, that photoluminescent and/or

fluorescent radiation is created to form a fluorescent image. Fluorescent image has a plurality of pixel intensity values which are provided for calibrating a fluorescent microscope.

EFFECT: technical result consists in improvement of stability in time of slide radiation and elimination of necessity of periodic calibration of calibration slide.

15 cl, 16 dwg



ФИГ. 1А

RU 2 7 2 7 5 5 4 C 2

RU 2 7 2 7 5 5 4 C 2

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к области формирования флуоресцентного изображения, а в частности, к калибровочному слайду, к системе калибровки флуоресцентного микроскопа и к способу калибровки флуоресцентного микроскопа.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Формирование флуоресцентного изображения используют, например, в биологии, медицине и материаловедении. Например, в цифровой патологии формирование флуоресцентного изображения позволяет осуществлять многоканальное сканирование флуоресцентно-меченых препаратов, что позволяет исследователям получать дополнительную информацию от образцов. Однако после продолжительного использования точность сканирования системы формирования флуоресцентного изображения может измениться или даже ухудшиться, например, вследствие некорректной работы оптической схемы флуоресцентного микроскопа. Поэтому для гарантии характеристик флуоресцентный микроскоп необходимо регулярно калибровать. Обычно для калибровки флуоресцентного микроскопа используют калибровочный слайд. Например, в патентном документе US2013/029559 A1 описан калибровочный слайд на основе флуоресцентного красителя. Однако, чтобы калибровочные слайды на основе красителя были совместимыми с многочисленными каналами флуоресценции, могут требоваться многочисленные красители.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Имеется необходимость в создании калибровочного слайда, который является совместимым с многочисленными каналами флуоресценции.

Задача настоящего изобретения решается объектом изобретения из независимого пункта формулы изобретения, дальнейшие варианты осуществления которого включены в зависимые пункты формулы изобретения. Следует отметить, что описываемые ниже аспекты изобретения относятся к калибровочному слайду, системе калибровки флуоресцентного микроскопа и к способу калибровки флуоресцентного микроскопа.

Согласно первому аспекту настоящего изобретения предложен калибровочный слайд для флуоресцентного микроскопа. Калибровочный слайд содержит подложку и структуру пикселей, содержащую множество разнесенных металлических наноструктур, расположенных на поверхности подложки. Металлические наноструктуры расположены для создания плазмонных резонансов, которые делают возможным поглощение света на длине волны возбуждения, чтобы создавалось фотолюминесцентное и/или флуоресцентное излучение для формирования флуоресцентного изображения.

Флуоресцентное изображение содержит множество значений интенсивности пикселей, которые предоставляются для калибровки флуоресцентного микроскопа.

Здесь следует отметить, что изобретение можно успешно использовать в микроскопах любых видов, которые пригодны для формирования изображения так называемого цельного препарата при цифровой патологии. Например, изобретение охватывает микроскопы с построчным сканированием, а также с мозаичным сканированием.

Калибровочный слайд, действие которого основано на плазмонных резонансах, имеет широкий спектр поглощения и излучения, который может перекрывать все типичные каналы флуоресценции при возбуждении светом на соответствующей длине волны возбуждения. Таким образом, при одной и той же площади калибровочного слайда можно создавать фотолюминесцентное и/или флуоресцентное выходное излучение в пределах широкого спектрального диапазона. Иначе говоря, плазмонные структуры одного вида на калибровочном слайде можно использовать для калибровки всех каналов флуоресценции. Этим можно исключить необходимость в многочисленных

флуоресцентных красителях. Кроме того, вследствие естественного резонансного поглощения возбуждающего света в металлических наноструктурах и переизлучения части возбуждающего света на других длинах волн фотолюминесценция и/или флуоресценция такого калибровочного слайда может быть менее склонной к деградации. Например, в противоположность традиционным образцам на основе красителя такой калибровочный слайд может быть стабильным во времени и может не быть просветленным. Кроме того, поскольку плазмоника не ослабевает с течением времени, может отсутствовать необходимость в калибровке калибровочного слайда, например, каждый год.

Согласно примеру подложка является оптически прозрачной.

Таким образом, формирование флуоресцентного изображения можно сочетать с формированием светлопольного изображения, в котором структура пикселей является видимой как цветное изображение. Видимость структуры пикселей калибровочного слайда может позволить быстро устанавливать образец в заданное положение, определять местоположение образца и выполнять визуальное исследование образца, и это делает калибровку более быстрой.

Согласно примеру металлические наноструктуры расположены с возможностью связи друг с другом.

Благодаря сочетанию локализованных и связанных резонансов можно получать калибровочный слайд с резонансной длиной волны в диапазоне от ультрафиолетового до красного света. Этим обеспечивается гибкость при создании различных цветов под действием освещения ярким светом.

Согласно примеру калибровочный слайд образуют не только для калибровки флуоресцентного отклика, но также для калибровки цветов, например, для системы формирования светлопольного и флуоресцентного изображения. Такой комбинацией можно повышать эффективность процесса калибровки.

Согласно примеру калибровочный слайд также снабжают по меньшей мере одной структурой, выбираемой из группы, содержащей монослой окрашенных микробусинок, мишень для проверки разрешающей способности и искажения и слой неорганических люминофоров.

Иначе говоря, калибровочный слайд содержит два или большее количество образцов или мишеней. Согласно одному примеру калибровочный слайд содержит структуру пикселей для получения фотолюминесценции и/или флуоресценции от плазмонных эффектов и монослой окрашенных микробусинок. Согласно дальнейшему примеру калибровочный слайд содержит структуру пикселей, монослой окрашенных микробусинок и мишень для проверки разрешающей способности и искажения.

Таким образом, характерные особенности флуоресценции и ложных изображений можно имитировать плазмонными резонансами. Фокусировку и визуализацию можно оценивать по микробусинкам. Мишень для проверки разрешающей способности и искажения позволяет оценивать артефакты разрешающей способности и сшивки изображений. При объединении многочисленных мишеней на одном и том же калибровочном слайде можно более эффективно и точно осуществлять калибровку.

Кроме того, неорганические люминофоры также можно сочетать с плазмоникой для усиления излучения в определенной части спектра излучения.

Согласно четвертому аспекту настоящего изобретения предложен способ изготовления флуоресцентного калибровочного слайда с множеством структур, содержащего структуру пикселей с множеством разнесенных металлических наноструктур, расположенных на поверхности подложки, монослой окрашенных

микробусинок и мишень для проверки разрешающей способности и искажения, при этом способ содержит следующие этапы: aa) осаждение монослоя окрашенных микробусинок на подложку с образованием предметного стекла микроскопа; bb) осаждение структуры пикселей и мишени для проверки разрешающей способности и искажения на две другие подложки с образованием двух покровных стекол; и cc) установку двух покровных стекол на предметное стекло микроскопа для образования калибровочного слайда.

Иначе говоря, три операции могут быть выполнены относительно отдельных подложек, которые объединяют друг с другом после завершения этих операций.

Таким образом, хотя способы изготовления, включающие эти три технологии (литографию по методу наноимпринтинга и сухое травление, образование химической связи и оптическую литографию), являются несовместимыми друг с другом, все три можно сочетать относительно одного калибровочного слайда.

Согласно второму аспекту настоящего изобретения предложена система калибровки флуоресцентного микроскопа. Система калибровки содержит флуоресцентный микроскоп и калибровочный слайд согласно одному из примеров, описанных выше и в дальнейшем. Флуоресцентный микроскоп содержит источник света и детектор света. Источник света и детектор света расположены на оптическом пути. При калибровке источник света настроен на подачу света с длиной волны возбуждения, поглощаемого металлическими наноструктурами калибровочного слайда, расположенного на оптическом пути, для создания фотолюминесцентного и/или флуоресцентного излучения. Детектор света выполнен с возможностью обнаружения создаваемого фотолюминесцентного и/или флуоресцентного излучения для регистрации данных флуоресцентного изображения в качестве данных для проверки калибровки в целях калибровки.

Флуоресцентный микроскоп можно использовать в цифровой патологии. Например, флуоресцентный микроскоп может быть, например, многоканальным флуоресцентным сканером для цифровой патологии, светлопольным и флуоресцентным сканером для цифровой патологии или светлопольным, флуоресцентным сканером для цифровой патологии методом FISH (флуоресцентной гибридизации in-situ).

Таким образом, систему формирования флуоресцентных изображений можно калибровать в многочисленных каналах флуоресценции без необходимости в замене калибровочного слайда. Этим можно упростить процедуру калибровки и повысить эффективность. Кроме того, также можно гарантировать точность калибровки вследствие равномерности интенсивности флуоресценции на микроскопическом уровне.

Согласно примеру система калибровки также снабжена калибровочным устройством, содержащим блок памяти и блок обработки. Блок памяти выполнен с возможностью сохранения заданных стандартных калибровочных данных по меньшей мере одного канала флуоресценции. Блок обработки выполнен с возможностью сравнения регистрируемых данных для проверки калибровки с сохраняемыми заданными стандартными калибровочными данными для формирования профиля коррекции интенсивности по меньшей мере одного канала флуоресценции. Профиль коррекции интенсивности предоставляется для коррекции данных флуоресцентного изображения флуоресцентного патологического образца, получаемого флуоресцентным микроскопом для по меньшей мере одного канала флуоресценции.

Калибровочное устройство может быть неотъемлемой частью флуоресцентного микроскопа. В ином случае калибровочное устройство может быть компьютером.

Согласно примеру в дополнение к структуре пикселей по меньшей мере одна

структура предусмотрена на поверхности калибровочного слайда, которая выбирается из группы, содержащей монослой окрашенных микробусинок и мишень для проверки разрешающей способности и искажения. Детектор света выполнен с возможностью регистрации данных изображения по меньшей мере одной структуры в качестве
 5 дополнительных данных для проверки калибровки. Блок памяти выполнен с возможностью сохранения дополнительных заданных стандартных калибровочных данных по меньшей мере одной структуры. Блок обработки выполнен с возможностью сравнения регистрируемых дополнительных данных для проверки калибровки и сохраняемых дополнительных заданных стандартных калибровочных данных для
 10 калибровки параметра флуоресцентного микроскопа. Параметр выбирается из группы, содержащей качество фокусировки флуоресцентного микроскопа и артефактов разрешающей способности и сшивки изображений.

Таким образом, флуоресценцию, цвет, фокусировку, формирование изображения и сшивку изображений или сочетание их для флуоресцентного микроскопа можно
 15 оценивать и калибровать без замены калибровочного слайда. Процесс калибровки может быть упрощен, и этим также может быть повышена эффективность калибровки флуоресцентного микроскопа.

Согласно примеру флуоресцентный микроскоп представляет собой
 эпифлуоресцентный микроскоп.

Способ эпифлуоресценции может обеспечить высокое отношение сигнала к шуму.

Согласно третьему аспекту настоящего изобретения предложен способ калибровки флуоресцентного микроскопа, содержащего источник света и детектор света, которые расположены на оптическом пути, при этом способ содержит следующие этапы, на
 25 которых выполняют: а) освещение калибровочного слайда, расположенного на оптическом пути, светом от источника света по направлению к детектору света; при этом калибровочный слайд содержит подложку и структуру пикселей, содержащую множество разнесенных металлических наноструктур, при этом металлические наноструктуры расположены для создания плазмонного резонанса; и при этом свет, освещающий калибровочный слайд, создает плазмонные резонансы, которые
 30 обеспечивают поглощение света на длине волны возбуждения, чтобы создавалось фотолюминесцентное и/или флуоресцентное излучение для формирования флуоресцентного изображения, содержащего множество значений интенсивности пикселей, которые предоставляются для калибровки флуоресцентного микроскопа; b) регистрацию данных флуоресцентного изображения в качестве данных для проверки
 35 калибровки; и с) использование данных для проверки калибровки в целях калибровки флуоресцентного микроскопа.

Согласно примеру этап с) также содержит следующие подэтапы, на которых выполняют: с1) подготовку заданных стандартных калибровочных данных; с2) сравнение получаемых данных для проверки калибровки с заданными стандартными
 40 калибровочными данными для образования профиля коррекции интенсивности; и с3) использование профиля коррекции интенсивности для калибровки данных флуоресцентного изображения флуоресцентного патологического образца, получаемого с помощью флуоресцентного микроскопа.

Согласно примеру в дополнение к структуре пикселей по меньшей мере одну
 45 структуру предусматривают на поверхности калибровочного слайда, которую выбирают из группы, содержащей монослой окрашенных микробусинок и мишень для проверки разрешающей способности и искажения; и при этом способ также содержит следующие этапы, на которых выполняют: d) регистрацию данных изображения по меньшей мере

одной структуры в качестве дополнительных данных для проверки калибровки; е) подготовку дополнительных заданных стандартных калибровочных данных по меньшей мере одной структуры; и f) сравнение регистрируемых дополнительных данных для проверки калибровки и сохраняемых дополнительных стандартных калибровочных данных для калибровки параметра флуоресцентного микроскопа; при этом параметр выбирают из группы, содержащей качество фокусировки флуоресцентного микроскопа и артефакты разрешающей способности и сшивки изображений.

Согласно аспекту настоящего изобретения предложен калибровочный слайд, который позволяет использовать эффекты плазмонного резонанса для поглощения света на длине волны возбуждения, чтобы создавалось фотолюминесцентное и/или флуоресцентное излучение для калибровки флуоресцентного микроскопа.

Калибровочный слайд содержит тонкий слой металлических наноструктур, который имеет толщину меньше чем 1 мкм. При небольшой толщине можно гарантировать, что на калибровочном слайде не будет участков вне фокуса, и дополнительно то, что калибровочный слайд будет иметь толщину, сравнимую с патологическим препаратом. Таким образом, калибровочный слайд также является пригодным для применений, подобных цифровой патологии. Кроме того, калибровочный слайд имеет равномерную интенсивность флуоресценции на микроскопическом уровне по всему калибровочному слайду. Кроме того, флуоресценция калибровочного слайда является менее склонной к деградации по сравнению с флуоресценцией калибровочных слайдов на основе флуоресцентного красителя. Кроме того, благодаря процессу изготовления может гарантироваться равномерная интенсивность флуоресценции в относительно больших партиях, которая требуется для оценивания изменчивости сканера.

Эти и другие аспекты настоящего изобретения станут очевидными и понятными при обращении к вариантам осуществления, описанным ниже.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Примеры вариантов осуществления изобретения будут описаны ниже при обращении к следующим чертежам, на которых:

- фиг. 1А и 1В - приведенные для примера схематичные виды калибровочного слайда;
- фиг. 2А-2D - виды калибровочного слайда согласно дальнейшим примерам;
- фиг. 3А и 3В - два примера флуоресцентного изображения калибровочного слайда;
- фиг. 4А и 4В - примеры флуоресцентных изображений калибровочного слайда из фиг. 3В при облучении светом с двумя различными длинами волн возбуждения;
- фиг. 5 - вид калибровочного слайда согласно дальнейшему примеру для калибровки как флуоресценции, так и цвета;
- фиг. 6 - вид калибровочного слайда с многочисленными структурами согласно дальнейшему примеру;
- фиг. 7 - схема приведенного для примера флуоресцентного микроскопа;
- фиг. 8 - иллюстрация основных этапов примера способа калибровки флуоресцентного микроскопа;
- фиг. 9 - иллюстрация дальнейшего примера способа; и
- фиг. 10 - иллюстрация основных этапов примера способа изготовления флуоресцентного калибровочного слайда с множеством структур.

Чертежи являются только схематичными и выполнены не в масштабе. Одни и те же позиции относятся к одинаковым или подобным элементам на всех чертежах.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

На фиг. 1В показан вид сверху приведенного для примера калибровочного слайда для флуоресцентного микроскопа 42 (см. пример на фиг. 7). На фиг. 1А показано

сечение по линии 1А-1А на фиг. 1В.

Калибровочный слайд 10 содержит подложку 12 и структуру 14 пикселей с множеством разнесенных металлических наноструктур 16, расположенных на поверхности 18 подложки 12. Металлические наноструктуры 16 расположены для создания плазмонного резонанса, который делает возможным поглощение света 20, показанного стрелкой со сплошной линией, на длине волны возбуждения с образованием фотолюминесцентного и/или флуоресцентного излучения 22, показанного стрелкой с пунктирной линией, для формирования флуоресцентного изображения. Флуоресцентное изображение содержит множество значений интенсивности пикселей, которые предоставляются для калибровки флуоресцентного микроскопа.

При необходимости предусматривают покровное стекло 26 для покрытия и защиты структуры 14 пикселей. Для закрепления необязательного покровного стекла 26 можно использовать клей, смолу или любой другой подходящий материал, который вводят между металлическими наноструктурами 16.

Дополнительная возможность заключается в покрытии металлических наноструктур 16 оптически прозрачным оксидным слоем (непоказанным). Металлические наноструктуры 16 могут быть конформно покрыты оксидным слоем. Оксидный слой может быть выполнен, например, из диоксида кремния (SiO_2), нитрида кремния (Si_3N_4), смеси SiO_2 и Si_3N_4 (SiO_xN_y) или другого подходящего оксида или материала.

Необязательный оксидный слой может обеспечить лучшую защиту и облегчить прикрепление покровного стекла.

Подложка 12, также называемая диэлектрической подложкой, может быть изготовлена из любого подходящего материала.

Согласно одному примеру подложка 12 является не пропускающей (или слабо пропускающей) свет. Например, подложка 12 представляет собой кремниевую (Si) подложку, подложку со структурой кремний на диэлектрике или германиевую (Ge) подложку.

Согласно другому примеру подложка 12 является оптически прозрачной на рабочей длине волны, что позволяет свету проходить без заметного рассеяния или поглощения. Подложка 12 может быть полностью прозрачной. Например, подложка 12 может пропускать больше чем 90% света. Кроме того, подложка 12 может быть частично прозрачной. Например, подложка 12 может пропускать 60% света. Например, подложка может быть изготовлена из диоксида кремния, диоксида титана, нитрида кремния, кварца, плавленого кварца, пластиков, сапфира и т.д.

Прозрачность подложки 12 может обеспечить работу калибровочного слайда 10 в режиме пропускания, который сочетается с формированием светлопольного изображения. Таким образом, образец (или структура пикселей) является видимым при светлопольной микроскопии, и это позволяет осуществлять быструю установку в заданное положение, определение местоположение образца и визуальное исследование образца, и поэтому калибровка становится более быстрой.

Согласно дальнейшему примеру подложка 12 также может быть подложкой с низкой автофлуоресценцией. Однако автофлуоресценция такой подложки должна быть достаточно низкой без заметного влияния на контраст создаваемой плазмонами фотолюминесценции и/или флуоресценции.

Металлические наноструктуры 16 могут содержать металл, выбираемый из группы, содержащей золото, серебро, медь и алюминий. Кроме того, могут рассматриваться другие металлы, подходящие для получения плазмонных резонансов. Опционально или предпочтительно металлом является алюминий или сплав алюминия. Алюминий

может поддерживать плазмонный резонанс в ультрафиолетовой (УФ) области, что невозможно в случае серебра и золота. Кроме того, алюминий является стабильным в окружающей среде и имеет меньшую стоимость, чем серебро и золото.

5 Термин «наноструктура» относится к структуре с по меньшей мере одним размером по наношкале.

Согласно одному примеру каждая металлическая наноструктура имеет размер 28 в поперечном сечении в пределах от 30 нм до 700 нм, предпочтительно от 60 нм до 450 нм. Размер 28 в поперечном сечении относится к размеру на всем протяжении поверхности 18 подложки 12, на которой расположены металлические наноструктуры 16. На фиг. 1В металлические наноструктуры 16 показаны имеющими поперечное сечение круговой формы. В этом случае размер 28 в поперечном сечении соответствует диаметру круговой формы.

Согласно одному примеру каждая металлическая наноструктура имеет толщину 30 в пределах от 10 нм до 1 мкм, предпочтительно от 25 нм до 150 нм. Термин «толщина» 15 относится к высоте металлической наноструктуры 16, которая продолжается от поверхности 18 подложки 12.

Как показано на фиг. 1А, металлические наноструктуры 16 могут образовывать выступы на поверхности 18 подложки 12. Согласно другому примеру (непоказанному) металлические наноструктуры 16 могут образовывать выемки в поверхности 18 20 подложки 12.

Металлические наноструктуры 16 могут располагаться периодически на всем протяжении поверхности 18 подложки 12. Например, на фиг. 1В металлические наноструктуры 16 расположены с образованием двумерной квадратной решетки. Кроме того, металлические наноструктуры 16 могут быть расположены иным образом, 25 например, с образованием двумерной гексагональной решетки.

Согласно другому примеру (непоказанному) металлические наноструктуры 16 расположены квазипериодическим образом с нерегулярной периодичностью.

Согласно одному примеру расстояние 32 между соседними металлическими наноструктурами 16 сравнимо с длиной волны видимого света, которая находится в 30 пределах от 100 нм до 1 мкм, предпочтительно от 180 нм до 650 нм. Кроме того, расстояние 32 может именоваться шагом, который представляет собой расстояние между центрами двух соседних металлических наноструктур. В качестве варианта металлические наноструктуры 16 располагают с обеспечением связи друг с другом.

Термин «связь» относится к связанным резонансам между соседними металлическими 35 наноструктурами.

Сочетание локализованных и связанных резонансов делает возможным образование различных цветов, охватывающих широкий диапазон длин волн. Такое сочетание может обеспечить гибкость конструкции калибровочного слайда при калибровке как характеристик флуоресценции, так и цветовых характеристик.

40 Компонировкой металлических наноструктур 16 на поверхности 18 подложки 12 определяется структура 14 пикселей.

На фиг. 2А-2D показаны виды сверху структуры 14 пикселей калибровочного слайда 10 согласно дальнейшим примерам.

На фиг. 2А структура 14 пикселей содержит решетку металлических наноструктур 16 одного размера. Каждой металлической наноструктурой 16 обозначается пиксель.

На фиг. 2В, 2С и 2D цвета задаются периодичностью множества блоков 34 металлических наноструктур, так что блоком металлических наноструктур обозначается крупный пиксель.

На фиг. 2В и 2С каждый блок 34 металлических наноструктур содержит металлические наноструктуры 16 с различными размерами в поперечном сечении.

На фиг. 2D блок 34 металлических наноструктур содержит металлические наноструктуры 16 с размером в поперечном сечении, отличающемся от размера
5 остальной части структуры 14 пикселей.

Таким образом, на поверхности калибровочного слайда могут быть образованы структуры различных элементов.

На фиг. 3А и фиг. 3В показаны флуоресцентные изображения калибровочного слайда 10 согласно двум примерам. На фиг. 3А калибровочный слайд 10 снабжен структурой
10 из небольших элементов. На фиг. 3В калибровочный слайд 10 снабжен структурой из крупных элементов.

Структура 14 пикселей металлических наноструктур 16 может быть изготовлена при использовании способа, выбираемого из группы, содержащей литографию по методу наноимпринтинга и сухое травление. Благодаря процессу изготовления в пределах
15 крупных партий может гарантироваться однородность, которая удовлетворяет требованиям задачи стандартизации. Кроме того, процессом изготовления может гарантироваться гибкость при формировании рельефа на калибровочном слайде со специализированными картинками флуоресценции (см., например, фиг. 3А и 3В).

Кроме того, следует отметить, что одна и та же область структуры 14 пикселей может
20 обеспечивать выход флуоресценции в пределах широкого спектрального диапазона при облучении с различными длинами волн возбуждения.

На фиг. 4А и фиг. 4В показаны два примера флуоресцентного изображения структуры 14 пикселей из фиг. 3В при облучении светом с двумя различными длинами волн возбуждения.

Иначе говоря, один и тот же калибровочный слайд может иметь широкий спектр
25 поглощения и излучения, который может перекрывать все типичные каналы флуоресценции при возбуждении на соответствующих длинах волн возбуждения.

Термин «канал флуоресценции» относится к паре фильтров возбуждения и излучения, которые избирательно пропускают свет на длинах волн возбуждения и излучения,
30 специфических для красителя, такого как 4',6-диамидин-2-фенилиндол (DAPI), флуоресцинизоцианат (FITC), тетраметилродамин (TRITC) и цианины (Cy).

Таким образом, многочисленные флуоресцентные красители не требуются. Плазмонные металлические наноструктуры одного вида позволяют калибровать все каналы флуоресценции.

Кроме того, поскольку калибровочный слайд также работает в режиме пропускания и пиксели также могут образовывать цвета при освещении ярким светом, один и тот же калибровочный слайд также может представлять собой средство для калибровки
35 цветов.

На фиг. 5 показан калибровочный слайд 10 согласно одному примеру для калибровки
40 как флуоресценции, так и цветов. Калибровочный слайд 10 содержит по меньшей мере две подструктуры 36 пикселей. По меньшей мере две подструктуры 36 пикселей выполнены с возможностью образования различных цветов (показанных различными уровнями серого) при освещении ярким светом, например, при использовании металлических наноструктур 16 с различными размерами и/или с различной
45 компоновкой.

Этим можно обеспечить гибкую архитектуру цветовой карты (или цветовой мишени) для выбранного способа калибровки цветов. Например, структура 14 пикселей может представлять цветовую мишень согласно стандарту IT8 Американского национального

института стандартов с 24 серыми полями и 264 цветовыми полями в виде подструктур 36 пикселей. Кроме того, структура 14 пикселей может представлять собой цветовую мишень Массачусетской больницы общего профиля (MGH) с 8 цветовыми полями в виде подструктур 36 пикселей. Таким образом, подструктуры пикселей могут также

называться цветовыми образцами.

На фиг. 6 показан дальнейший пример, в котором в дополнение к структуре 14 пикселей по меньшей мере одна структура 38, 40 предусмотрена на поверхности 18 калибровочного слайда 10. По меньшей мере одна структура 38, 40 выбирается из группы, содержащей монослой окрашенных микробусинок и мишень для проверки разрешающей способности и искажения. В качестве варианта обе структуры 38, 40 располагают на поверхности 18, при этом структура 38 содержит монослой окрашенных микробусинок, а структура 40 содержит мишень для проверки разрешающей способности и искажения.

Иначе говоря, калибровочный слайд 10 может содержать два или большее количество различных образцов или мишеней. Например, калибровочный слайд 10 может содержать флуоресцентную мишень с фотолюминесценцией и/или флуоресценцией, создаваемой в результате плазмонных эффектов, монослой окрашенных микробусинок, мишень для проверки разрешающей способности и искажения или сочетание их.

Таким образом, характерные особенности флуоресценции и ложных изображений можно имитировать плазмонными резонансами. Мишень для проверки разрешающей способности и искажения позволяет оценивать артефакты разрешающей способности и сшивки изображений. Поэтому эффективность процесса калибровки может быть повышена. Кроме того, пользователь также может помещать этот сложный образец в сканер или на столик сканера.

Многочисленные структуры могут быть осаждены на подложку любым подходящим способом. В варианте примера, показанного на фиг. 6, микробусинки из структуры 38 присоединены к подложке 12 химическим способом, тогда как металлические наноструктуры из структуры 14 пикселей и мишень для проверки разрешающей способности и искажения из структуры 40 осаждены на два покровных стекла 26, например, с использованием процесса оптической литографии.

Это может позволить объединять многочисленные структуры при использовании различных способов изготовления.

В качестве дальнейшего варианта в дополнение к структуре 14 пикселей может быть предусмотрен слой неорганических люминофоров (непоказанный), таких как легированный церием алюмоиттриевый гранат (YAG:Ce), или линейных излучателей в наночастицах. Слой неорганических люминофоров может быть расположен поверх структуры пикселей или совмещен с ней. Неорганические люминофоры могут иметь размер частиц в пределах от микрометров до меньше чем 200 нм.

Таким образом, металлические наноструктуры могут обеспечивать возбуждение резонанса неорганических люминофоров, например нанолюминофоров, усиливая преобразование света. Кроме того, вследствие высокой химической стойкости неорганические люминофоры могут не деградировать (или меньше деградировать) со временем.

На фиг. 7 показан схематичный вид приведенной для примера системы 100 калибровки флуоресцентного микроскопа. Система 100 калибровки содержит флуоресцентный микроскоп 42 и калибровочный слайд 10 согласно одному из упомянутых выше примеров.

Флуоресцентный микроскоп 42 содержит источник 44 света, необязательное

оптическое устройство 46 и детектор 48 света. Оптическое устройство 46 может содержать, например, фильтр 50 возбуждения, дихроичное зеркало 52 (или дихроичный светоделитель), фильтр 54 излучения и объектив 56 (или линзы). Источник 44 света, оптическое устройство 46 и детектор 48 света расположены на оптическом пути.

5 При калибровке источник 44 света настраивают для образования света 20 на длине волны возбуждения, показанного стрелкой со сплошной линией, проходящего через оптическое устройство 46, поглощаемого металлическими наноструктурами 16 (непоказанными) калибровочного слайда 10, расположенного на оптическом пути, чтобы создать фотолюминесцентное и/или флуоресцентное излучение 22, показанное
10 стрелкой с пунктирной линией. Детектор 48 света выполнен с возможностью обнаружения фотолюминесцентного и/или флуоресцентного излучения 22 для регистрации данных флуоресцентного изображения в качестве данных для проверки калибровки.

В варианте примера, показанного на фиг. 7, флуоресцентный микроскоп 42
15 представляет собой эпифлуоресцентный микроскоп, в котором свет 20 с длиной волны возбуждения фокусируется на калибровочный слайд 10 через объектив 56. Фотолюминесцентное и/или флуоресцентное излучение 22, излучаемое калибровочным слайдом 10, фокусируется на детектор 48 света тем же самым объективом 56, который используется для возбуждения. Иначе говоря, только отраженный возбуждающий свет
20 20 достигает объектива 56 вместе с излучаемым фотолюминесцентным и/или флуоресцентным излучением. Поэтому способом эпифлуоресценции можно получать более высокое отношение сигнала к шуму.

Флуоресцентный микроскоп 42 можно использовать в цифровой патологии. Примеры включают в себя многоканальный флуоресцентный сканер для цифровой патологии,
25 светопольный и флуоресцентный сканер для цифровой патологии или светопольный, флуоресцентный сканер для цифровой патологии методом FISH (флуоресцентной гибридизации in-situ).

Как показано на фиг. 7, в качестве варианта система 100 калибровки также снабжена калибровочным устройством 58. Калибровочное устройство 58 содержит блок 60
30 памяти и блок 62 обработки.

Блок 60 памяти выполнен с возможностью сохранения заданных стандартных калибровочных данных по меньшей мере одного канала флуоресценции. Блок 62 обработки выполнен с возможностью сравнения регистрируемых данных для проверки калибровки с сохраняемыми заданными стандартными калибровочными данными для
35 образования профиля коррекции интенсивности по меньшей мере одного канала флуоресценции. Профиль коррекции интенсивности предоставляется для коррекции данных флуоресцентного изображения флуоресцентного патологического образца, получаемого флуоресцентным микроскопом для по меньшей мере одного канала флуоресценции.

40 Согласно одному примеру профиль коррекции интенсивности является значением коррекции интенсивности.

Согласно дальнейшему примеру профиль коррекции интенсивности является матрицей коррекции интенсивности.

Согласно одному примеру калибровочное устройство 58 объединено с
45 флуоресцентным микроскопом 42. Согласно другому примеру калибровочным устройством 58 является компьютер, который принимает данные для проверки калибровки с флуоресцентного микроскопа 42.

В качестве дальнейшего варианта в дополнение к структуре 14 пикселей по меньшей

мере одна структура 38, 40 предусмотрена на поверхности 18 калибровочного слайда 10, которая выбирается из группы, содержащей монослой окрашенных микробусинок и мишень для проверки разрешающей способности и искажения (см. фиг. 6). Кроме того, детектор 48 света выполнен с возможностью регистрации данных изображения по меньшей мере одной структуры 38, 40 в качестве дополнительных данных для проверки калибровки. Блок 60 памяти выполнен с возможностью сохранения дополнительных заданных стандартных калибровочных данных по меньшей мере одной структуры 38, 40. Блок 62 обработки выполнен с возможностью сравнения регистрируемых дополнительных данных для проверки калибровки и сохраняет дополнительные заданные стандартные калибровочные данные для калибровки параметра флуоресцентного микроскопа 42. Параметр выбирается из группы, содержащей качество фокусировки системы формирования флуоресцентного изображения и артефакты разрешающей способности и сшивки изображений.

Калибровка качества фокусировки флуоресцентного микроскопа может быть основана на измерении свойства изображений микробусинок, выбираемого из группы, содержащей интенсивность, площадь, плотность и распределение. Затем при калибровке флуоресцентного микроскопа значения измеряемого свойства сравниваются с дополнительными заданными стандартными калибровочными данными, то есть с известными значениями.

Таким образом, один и тот же калибровочный слайд можно использовать для калибровки флуоресценции, цвета, качества фокусировки, артефактов разрешающей способности и сшивки изображений. Поэтому эффективность процесса калибровки может быть повышена.

Согласно одному примеру калибровочный слайд 10 постоянно установлен во флуоресцентном микроскопе 42.

Иначе говоря, калибровочный слайд может быть встроен во флуоресцентный микроскоп 42. Это может гарантировать очень высокое качество в течение продолжительного периода времени.

На фиг. 8 показан способ 200 калибровки флуоресцентного микроскопа, содержащего источник света и детектор света, которые расположены на оптическом пути.

Способ 200 содержит следующие этапы.

На первом этапе 210, также называемом этапом а), калибровочный слайд устанавливают на оптическом пути и освещают светом от источника света по направлению к детектору света. Калибровочный слайд содержит подложку и структуру пикселей, содержащую множество разнесенных металлических наноструктур, расположенных на поверхности подложки, при этом металлические наноструктуры расположены для создания плазмонного резонанса. Свет, освещающий калибровочный слайд, создает плазмонные резонансы, которые делают возможным поглощение света на длине волны возбуждения с образованием фотолюминесцентного и/или флуоресцентного излучения для формирования флуоресцентного изображения, содержащего множество значений интенсивности пикселей, которые предоставляются для калибровки флуоресцентного микроскопа.

На втором этапе 220, также называемом этапом б), данные флуоресцентного изображения из флуоресцентного изображения регистрируют в качестве данных для проверки калибровки.

На третьем этапе 230, также называемом этапом с), данные для проверки калибровки используют для калибровки флуоресцентного микроскопа.

Согласно примеру, показанному в качестве варианта на фиг. 5, этап с) способа также

содержит следующие подэтапы.

На первом подэтапе 232, также называемом подэтапом с1), подготавливают заданные стандартные калибровочные данные.

5 На втором подэтапе 234, также называемом подэтапом с2), регистрируемые данные для проверки калибровки сравнивают с заданными стандартными калибровочными данными, чтобы образовать профиль коррекции интенсивности.

На третьем подэтапе 236, также называемом подэтапом с3), профиль коррекции интенсивности используют для калибровки данных флуоресцентного изображения флуоресцентного патологического образца, получаемого флуоресцентным микроскопом.

10 На фиг. 9 показан дальнейший вариант, в соответствии с которым в дополнение к структуре пикселей на поверхности калибровочного слайда располагают по меньшей мере одну структуру, которую выбирают из группы, содержащей монослой окрашенных микробусинок и мишень для проверки разрешающей способности и искажения.

Способ также содержит действия, выполняемые на последующих этапах.

15 На четвертом этапе 240, также называемом этапом d), данные изображения по меньшей мере одной структуры регистрируют в качестве дополнительных данных для проверки калибровки.

На пятом этапе 250, также называемом этапом e), подготавливают дополнительные заданные стандартные калибровочные данные по меньшей мере одной структуры.

20 На шестом этапе 260, также называемом этапом f), для калибровки параметра флуоресцентного микроскопа выполняют сравнение регистрируемых дополнительных данных для проверки калибровки и сохраняемых дополнительных стандартных калибровочных данных, при этом параметр выбирают из группы, содержащей качество фокусировки флуоресцентного микроскопа и артефакты разрешающей способности и сшивки изображений.

25 На фиг. 10 показан способ 300 изготовления калибровочного слайда с множеством структур, содержащих структуру пикселей с множеством разнесенных металлических наноструктур, расположенных на поверхности, монослой окрашенных микробусинок и мишень для проверки разрешающей способности и искажения, при этом способ
30 содержит следующие этапы: aa) осаждение 302 монослоя окрашенных микробусинок на подложку с образованием предметного стекла микроскопа; bb) осаждение 304 структуры пикселей и мишени для проверки разрешающей способности и искажения на две другие подложки с образованием двух покровных стекол; и cc) установку 306 двух покровных стекол на предметное стекло микроскопа для образования
35 калибровочного слайда.

Металлические наноструктуры могут быть изготовлены при использовании литографии по методу наноимпринтинга и сухого травления. Например, согласованную с подложкой литографию по методу импринтинга (SCIL) можно использовать для образования маски для травления (например, по золь-гель технологии на основе
40 диоксида кремния) на непрерывном слое алюминия, после чего эта структура переносится на алюминий при использовании анизотропного реактивного ионного травления, основанного на химии хлора.

Мишень для проверки разрешающей способности и искажения можно изготавливать процессом оптической литографии.

45 Для получения монослоя окрашенных микробусинок обычно требуется особый химический процесс с этапами печатания/образования пятен бусинок на поверхности и последующего вымывания излишка бусинок.

Однако получение монослоя микробусинок на том же самом слайде после

согласованной с подложкой литографии по методу импринтинга или оптической литографии невозможно, поскольку при согласованной с подложкой литографии по методу импринтинга разрушается химическая модификация поверхности. Выполнять согласованную с подложкой литографию по методу импринтинга после получения 5 микробусинок также невозможно, поскольку на этапе облучения ультрафиолетовым светом разрушается соединение микробусинок с поверхностью и модификация поверхности делает невозможной осаждение алюминия. Оптическая литография после согласованной с подложкой литографии по методу импринтинга также невозможна, поскольку при согласованной с подложкой литографии по методу импринтинга 10 разрушаются элементы, полученные оптической литографией.

Хотя каждую мишень (структуру пикселей, окрашенные микробусинки и мишень для проверки разрешающей способности и искажения) создают с помощью процесса, сильно отличающегося от других процессов, и эти процессы несовместимы друг с другом, эти мишени все же можно объединять на одном калибровочном слайде при 15 получении их на других подложках.

Следует отметить, что варианты осуществления изобретения описаны с обращениям к различным объектам изобретения. В частности, некоторые варианты осуществления описаны с обращением к заявленному способу, тогда как другие варианты осуществления описаны с обращением к заявленному устройству. Однако, исходя из 20 изложенного выше и сопровождающего описания, специалист в данной области техники на основании описания должен прийти к заключению, что в дополнение к любому сочетанию признаков, относящемуся к одному объекту изобретения, любое сочетание признаков, относящихся к другим объектам, следует считать раскрытым в этой заявке. Однако все признаки могут быть объединены с получением синергетических эффектов, 25 которые являются более чем простым суммированием признаков.

Хотя изобретение было представлено на чертежах и подробно описано в приведенном выше описании, такие представление и подробное описание следует считать иллюстративными или примерными, а не ограничивающими. Изобретение не ограничено раскрытыми вариантами осуществления. Другие варианты раскрытых вариантов 30 осуществления могут быть поняты и осуществлены специалистами в данной области техники при применении на практике заявленного изобретения, на основании излучения чертежей, раскрытия и зависимых пунктов формулы изобретения.

В формуле изобретения слово «содержащий» не исключает других элементов или этапов, а неопределенный артикль не исключает множества. Один процессор или другой 35 блок может выполнять функции нескольких элементов, перечисленных в формуле изобретения. То, что некоторые признаки перечисляются во взаимно различных зависимых пунктах формулы изобретения, не означает, что сочетание этих признаков не может быть использовано с достижением преимущества. Любые позиции в формуле изобретения не должны толковаться как ограничивающие объем.

(57) Формула изобретения

1. Калибровочный слайд (10) для флуоресцентного микроскопа, содержащий: подложку (12); и

структуру (14) пикселей, содержащую множество разнесенных металлических наноструктур (16), расположенных на поверхности (18) подложки, и по меньшей мере 45 одну дополнительную структуру, расположенную на поверхности калибровочного слайда, которая выбирается из группы, содержащей монослой окрашенных микробусинок, мишень для проверки разрешающей способности и искажения, слой

неорганических люминофоров;

в котором металлические наноструктуры расположены для создания плазмонных резонансов, которые делают возможным поглощение света (20) на длине волны возбуждения, чтобы создавалось фотолюминесцентное и/или флуоресцентное излучение (22) для формирования флуоресцентного изображения; и

в котором флуоресцентное изображение содержит множество значений интенсивности пикселей, которые предоставляются для калибровки флуоресцентного микроскопа.

2. Калибровочный слайд по п. 1, в котором подложка является оптически прозрачной.

3. Калибровочный слайд по п. 1 или 2, в котором металлические наноструктуры расположены с возможностью связи друг с другом.

4. Калибровочный слайд по одному из предшествующих пунктов, в котором структура пикселей содержит по меньшей мере две подструктуры (36) пикселей, при этом по меньшей мере две подструктуры пикселей выполнены с возможностью образования различных цветов при освещении ярким светом.

5. Калибровочный слайд по одному из предшествующих пунктов, в котором металлические наноструктуры содержат металл, выбираемый из группы, содержащей золото, серебро, медь и алюминий, при этом предпочтительно, чтобы металлом был алюминий или сплав алюминия.

6. Калибровочный слайд по одному из предшествующих пунктов, в котором каждая металлическая наноструктура имеет размер (28) в поперечном сечении в пределах от 30 нм до 700 нм, предпочтительно от 60 нм до 450 нм; в котором каждая металлическая наноструктура имеет толщину (30) в пределах от 10 нм до 1 мкм, предпочтительно от 25 нм до 150 нм; и/или в котором расстояние (32) между соседними металлическими наноструктурами является сравнимым с длиной волны видимого света, и оно находится в пределах от 100 нм до 1 мкм, предпочтительно от 180 нм до 650 нм.

7. Система (100) калибровки, содержащая:

флуоресцентный микроскоп (42) и калибровочный слайд по одному из предшествующих пунктов;

в которой флуоресцентный микроскоп содержит источник (44) света, детектор (48) света; при этом источник света и детектор света расположены на оптическом пути;

в которой при калибровке источник света настроен на подачу света с длиной волны возбуждения, поглощаемого металлическими наноструктурами калибровочного слайда, расположенного на оптическом пути, для создания фотолюминесцентного и/или флуоресцентного излучения; и

в которой детектор света выполнен с возможностью обнаружения создаваемого фотолюминесцентного и/или флуоресцентного излучения для регистрации данных флуоресцентного изображения в качестве данных для проверки калибровки в целях калибровки.

8. Система по п. 7, где система калибровки также снабжена калибровочным устройством (58), содержащим блок (60) памяти и блок (62) обработки; в которой блок памяти выполнен с возможностью сохранения заданных стандартных калибровочных данных из по меньшей мере одного канала флуоресценции; в которой блок обработки выполнен с возможностью сравнения регистрируемых данных для проверки калибровки с сохраняемыми заданными стандартными калибровочными данными для формирования профиля коррекции интенсивности по меньшей мере одного канала флуоресценции; и в которой профиль коррекции интенсивности предоставляется для коррекции данных флуоресцентного изображения флуоресцентного патологического образца, получаемого флуоресцентным микроскопом для по меньшей мере одного канала флуоресценции.

9. Система по п. 7 или 8, в которой в дополнение к структуре пикселей по меньшей мере одна структура предусмотрена на поверхности калибровочного слайда, которая выбирается из группы, содержащей монослой окрашенных микробусинок и мишень для проверки разрешающей способности и искажения; в которой детектор света выполнен с возможностью регистрации данных изображения по меньшей мере одной структуры в качестве дополнительных данных для проверки калибровки; в которой блок памяти выполнен с возможностью сохранения дополнительных заданных стандартных калибровочных данных по меньшей мере одной структуры; в которой блок обработки выполнен с возможностью сравнения регистрируемых дополнительных данных для проверки калибровки и сохраняемых дополнительных заданных стандартных калибровочных данных для калибровки параметра флуоресцентного микроскопа; и в которой параметр выбирается из группы, содержащей качество фокусировки флуоресцентного микроскопа и артефакты разрешающей способности и сшивки изображений.

10. Система по любому одному из пп. 7-9, в которой флуоресцентный микроскоп представляет собой эпифлуоресцентный микроскоп.

11. Система по любому одному из пп. 7-10, в которой калибровочный слайд постоянно установлен во флуоресцентном микроскопе.

12. Способ (200) калибровки флуоресцентного микроскопа, содержащего источник света и детектор света, которые расположены на оптическом пути, при этом способ содержит этапы, на которых:

а) освещают (210) калибровочный слайд, расположенный на оптическом пути, светом от источника света по направлению к детектору света; при этом калибровочный слайд содержит подложку и структуру пикселей, содержащую множество разнесенных металлических наноструктур, расположенных на поверхности подложки, при этом металлические наноструктуры расположены для создания плазмонного резонанса; и при этом свет, освещающий калибровочный слайд, создает плазмонные резонансы, которые обеспечивают поглощение света на длине волны возбуждения, чтобы создавалось фотолюминесцентное и/или флуоресцентное излучение для формирования флуоресцентного изображения, содержащего множество значений интенсивности пикселей, которые предоставляются для калибровки флуоресцентного микроскопа;

б) регистрируют (220) данные флуоресцентного изображения в качестве данных для проверки калибровки; и

с) используют (230) данные для проверки калибровки в целях калибровки флуоресцентного микроскопа.

13. Способ по п. 12, в котором этап с) способа также содержит следующие подэтапы, на которых:

с1) подготавливают (232) заданные стандартные калибровочные данные;

с2) сравнивают (234) регистрируемые данные для проверки калибровки с заданными стандартными калибровочными данными, чтобы образовать профиль коррекции интенсивности; и

с3) используют профиль коррекции интенсивности для калибровки данных флуоресцентного изображения флуоресцентного патологического образца, получаемого с помощью флуоресцентного микроскопа.

14. Способ по п. 12 или 13, в котором в дополнение к структуре пикселей по меньшей мере одну структуру предусматривают на поверхности калибровочного слайда, которую выбирают из группы, содержащей монослой окрашенных микробусинок и мишень для проверки разрешающей способности и искажения; и где способ также содержит

следующие этапы, на которых:

d) регистрируют (240) данные изображения по меньшей мере одной структуры в качестве дополнительных данных для проверки калибровки;

5 e) подготавливают (250) дополнительные заданные стандартные калибровочные данные по меньшей мере одной структуры; и

f) сравнивают (260) регистрируемые дополнительные данные для проверки калибровки и сохраняемые дополнительные заданные стандартные калибровочные данные для калибровки параметра флуоресцентного микроскопа; при этом параметр выбирают из группы, содержащей качество фокусировки флуоресцентного микроскопа и артефакты разрешающей способности и сшивки изображений.

10 15. Способ (300) изготовления флуоресцентного калибровочного слайда с множеством структур, содержащего структуру пикселей с множеством разнесенных металлических наноструктур, расположенных на поверхности подложки, монослой окрашенных микробусинок и мишень для проверки разрешающей способности и искажения, при этом способ содержит следующие этапы, на которых:

15 aa) осаждают (302) монослой окрашенных микробусинок на подложку, образуя предметное стекло микроскопа;

bb) осаждают (304) структуру пикселей и мишень для проверки разрешающей способности и искажения на две другие подложки, образуя два покровных стекла; и

20 cc) устанавливают (306) два покровных стекла на предметное стекло микроскопа для образования калибровочного слайда.

25

30

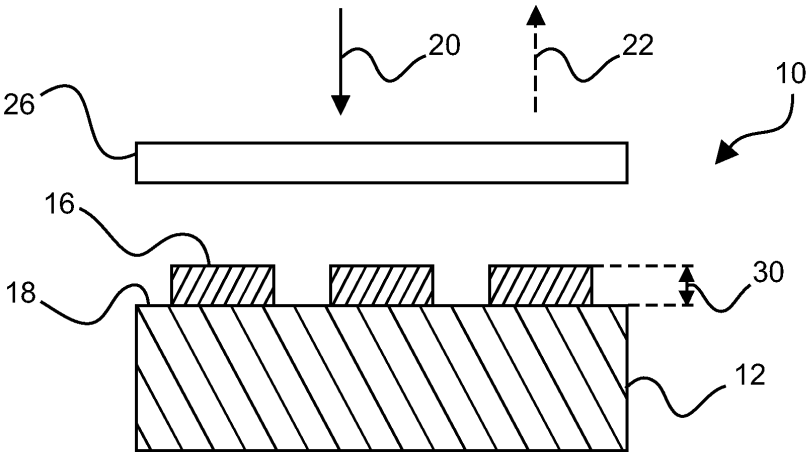
35

40

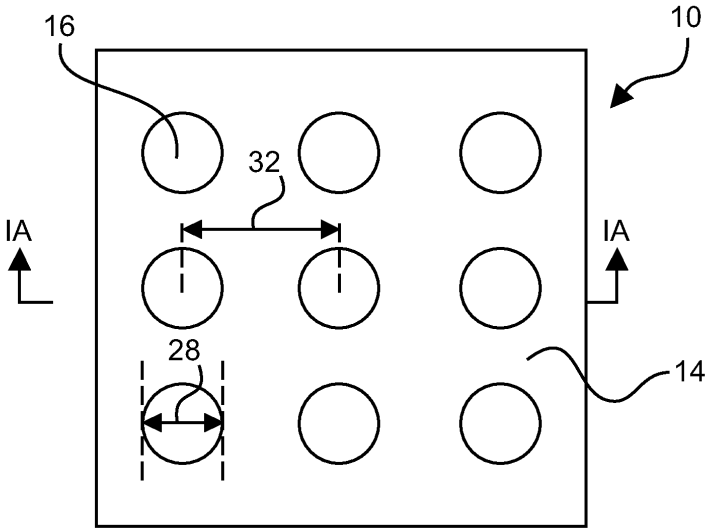
45

1

1/9



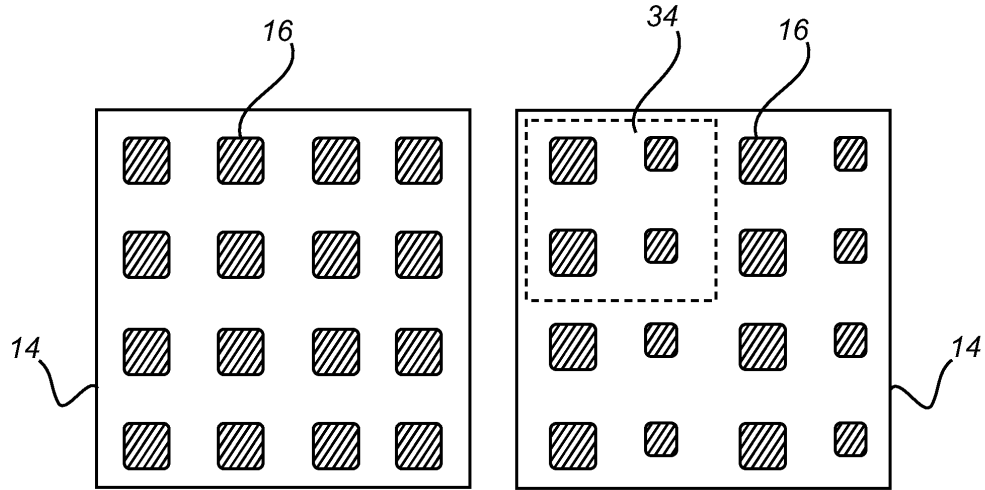
ФИГ. 1А



ФИГ. 1В

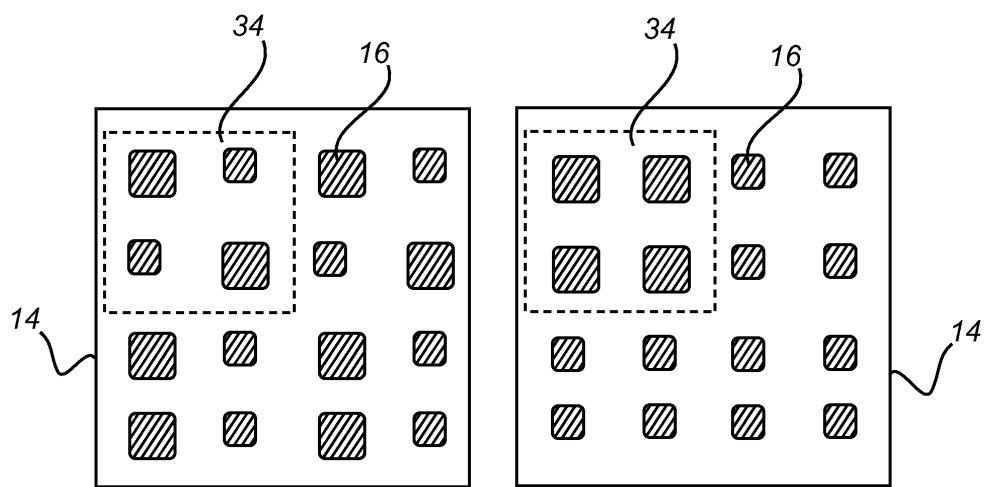
2

2/9



ФИГ. 2А

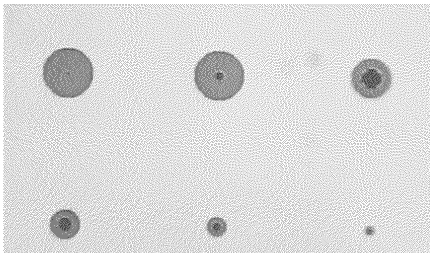
ФИГ. 2В



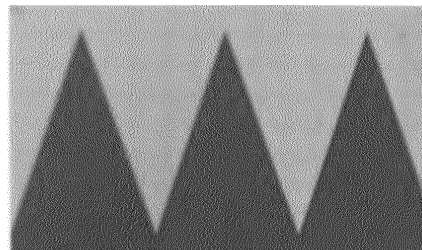
ФИГ. 2С

ФИГ. 2D

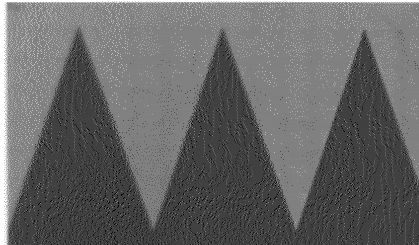
3/9



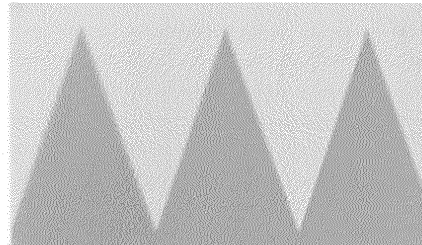
ФИГ. 3А



ФИГ. 3В

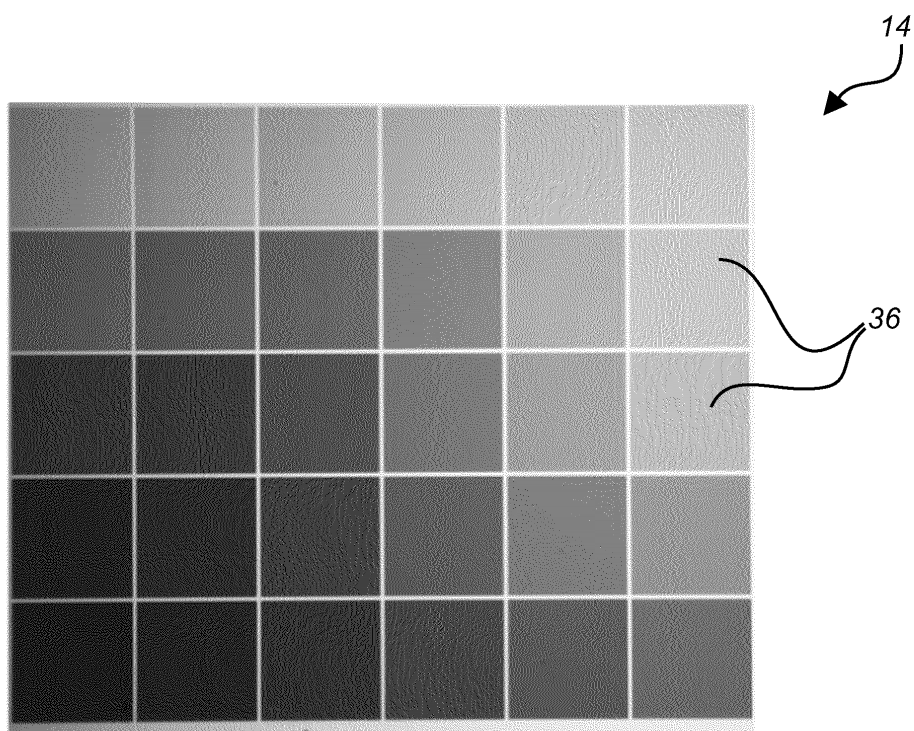


ФИГ. 4А



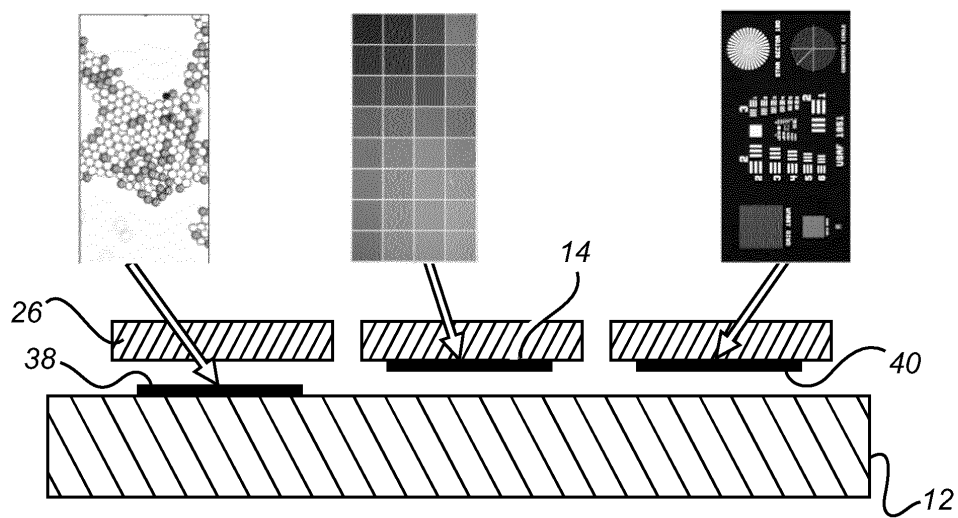
ФИГ. 4В

4/9



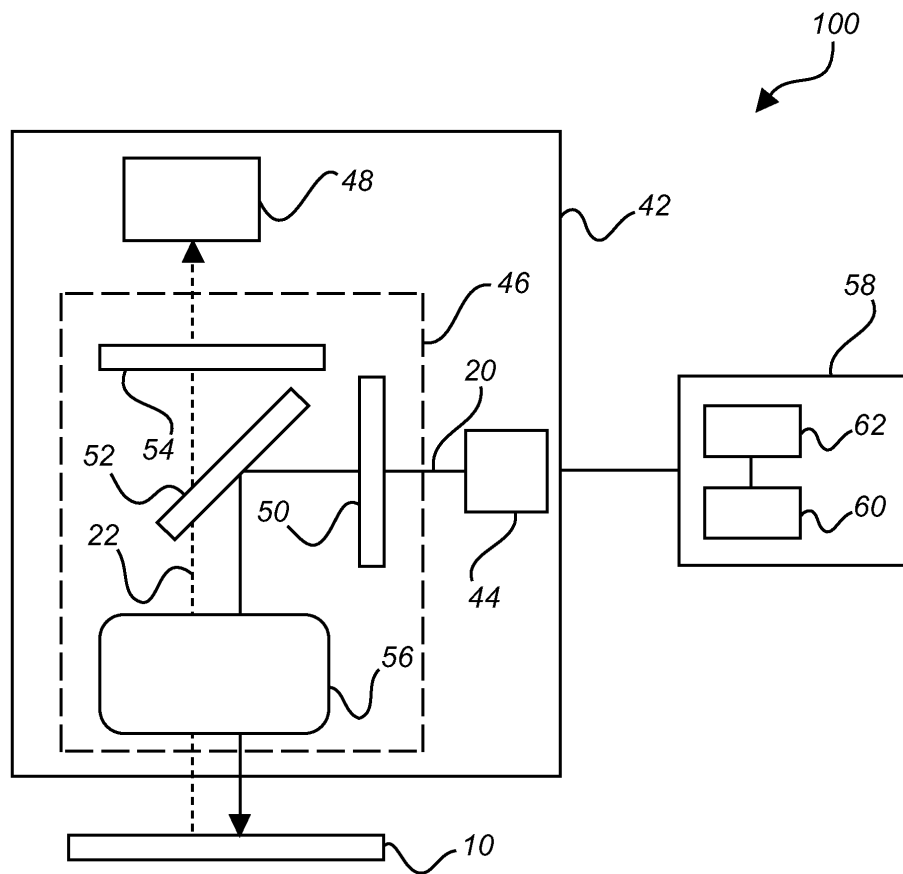
ФИГ. 5

5/9



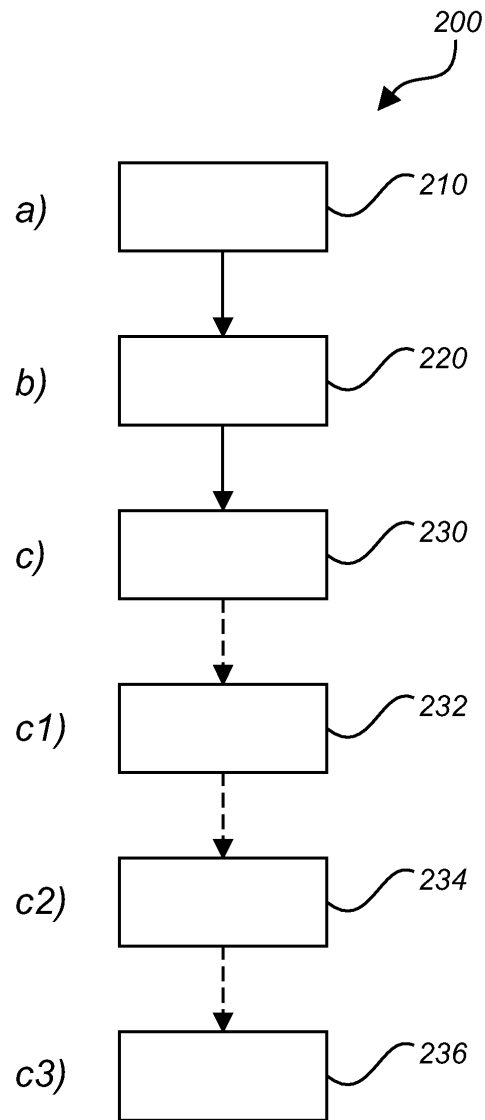
ФИГ. 6

6/9



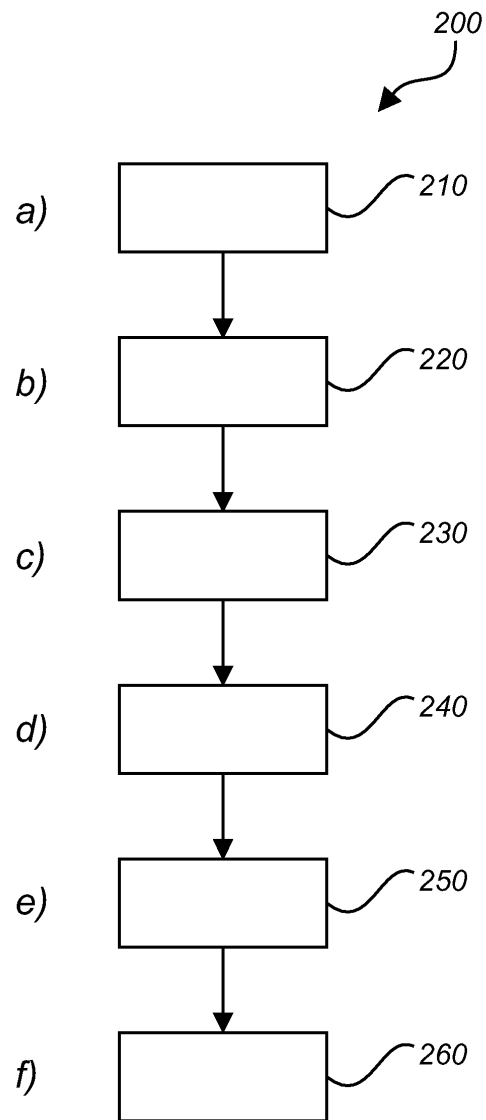
ФИГ. 7

7/9



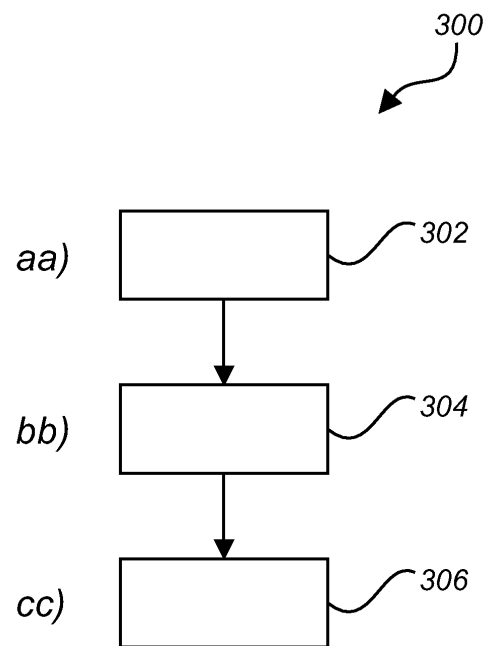
ФИГ. 8

8/9



ФИГ. 9

9/9



ФИГ. 10