



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105158887 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 16

(21) 申请号 201510642770. 0

(22) 申请日 2015. 09. 29

(71) 申请人 南京理工大学

地址 210094 江苏省南京市孝陵卫 200 号

(72) 发明人 左超 陈钱 孙佳嵩 李加基

顾国华 张玉珍 冯世杰 张佳琳

胡岩 陶天阳 张良 孔富城

张敏亮 范瑶 林飞

(74) 专利代理机构 南京理工大学专利中心

32203

代理人 唐代盛

(51) Int. Cl.

G02B 21/06(2006. 01)

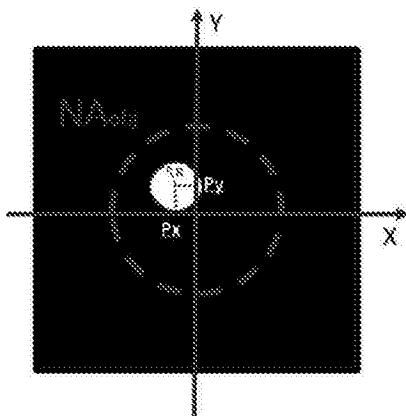
权利要求书2页 说明书7页 附图6页

(54) 发明名称

基于可编程 LED 阵列照明的多模式显微成像方法

(57) 摘要

本发明公开了一种基于可编程 LED 阵列照明的多模式显微成像方法，LED 阵列作为显微镜成像系统的照明光源，直接安置在显微镜成像系统的样品载物台下方，并且 LED 阵列的中心处于显微镜成像系统的光轴上，从而实现相衬成像、光场成像及光学染色成像模式。本发明可灵活实现光学染色显微成像，无需在显微镜的成像光路中加入任何附加光学元件，例如环形光阑、微透镜阵列、相位板等；从而简化系统结构，大大降低成本。



1. 一种基于可编程 LED 阵列照明的多模式显微成像方法, 其特征在于 LED 阵列 (1) 作为显微镜成像系统 (2) 的照明光源, 直接安置在显微镜成像系统 (2) 的样品载物台 (6) 下方, 并且 LED 阵列 (1) 的中心处于显微镜成像系统 (2) 的光轴上, 从而实现相衬成像、光场成像及光学染色成像模式;

在进行成像前, 标记 LED 阵列 (1) 中每个像素点的位置, 即首先建立坐标系, 坐标原点位于 LED 阵列中央, 对于任意一个像素点 P, 其位置坐标为 (P_x, P_y), 定义该点所对应的照明

$$\text{数值孔径 } NA_i = \sin \theta_i = \sin \arctan \frac{\sqrt{P_x^2 + P_y^2}}{f} \approx \frac{\sqrt{P_x^2 + P_y^2}}{f}, f \text{ 代表聚光镜的焦距 LED 阵列中}$$

心距离载物台的距离, 每个像素点 P 的照明数值孔径决定了其所发出的光学照射样品的角度

$$\theta_i = \arctan \frac{\sqrt{P_x^2 + P_y^2}}{f} \approx \frac{\sqrt{P_x^2 + P_y^2}}{f}.$$

2. 根据权利要求 1 所述的基于可编程 LED 阵列照明的多模式显微成像方法, 其特征在于相衬显微成像的步骤如下:

步骤一: 将显微镜成像系统 (2) 的显微物镜 (7) 切换到与实际观察的样品尺寸相应倍率的相衬显微物镜, 相衬显微物镜是在传统显微物镜的后焦面处增加了一个环状相位板;

步骤二: 仅点亮 LED 阵列 (1) 中一个中心环形区域的像素点即可, 其余部分不点亮, 该环形区域与显微物镜 7 的后焦面环状相位板区域相吻合;

步骤三: 在样品载物台 (6) 上放入待观察样品, 采用显微镜成像系统 (2) 的相机 (9) 拍摄图像并于显示器 (5) 上显示即可得到相衬显微成像结果。

3. 根据权利要求 1 所述的基于可编程 LED 阵列照明的多模式显微成像方法, 其特征在于光场显微成像的实现步骤如下:

步骤一: 将显微镜成像系统 (2) 的显微物镜 (7) 切换到与实际观察的样品尺寸相应倍率的普通显微物镜;

步骤二: 仅点亮 LED 阵列 (1) 中一个圆形区域的像素点即可, 其余部分不点亮, 控制该圆形区域的圆心像素位置坐标为 (P_x, P_y), 可实现对光场显微成像的观察角度

$(\theta_x, \theta_y) = \arctan \frac{(P_x, P_y)}{f}$ 进行控制; 控制该圆形区域的半径 R 可实现对于照明数值孔径角

θ_{i11} 的控制: $\theta_{i11} = \arctan R/f$, 数值孔径角 θ_{i11} 反比于焦深;

步骤三: 在样品载物台 (6) 上放入待观察样品, 采用相机 (9) 拍摄图像并于显示器 (5) 上显示即可得到光场显微成像结果。

4. 根据权利要求 1 所述的基于可编程 LED 阵列照明的多模式显微成像方法, 其特征在于光学染色显微成像的实现步骤如下:

步骤一: 将显微镜成像系统 (2) 的显微物镜 (7) 切换到与实际观察的样品尺寸相应倍率的普通显微物镜;

步骤二: 在 LED 阵列 (1) 中显示对应于明场光学染色、暗场光学染色、明场暗场复合光学染色、差分光学染色或相衬光学染色的指定图案;

步骤三: 在样品载物台 (6) 上放入待观察样品, 采用相机 (9) 拍摄图像并于显示器 (5)

上显示即可得到光学染色显微成像结果。

5. 根据权利要求 4 所述的基于可编程 LED 阵列照明的多模式显微成像方法, 其特征在于明场光学染色显微成像所对应的指定图案只包含一个彩色中央圆形即可, 其余部分不发光, 其颜色选取为红、绿、蓝或是它们的混合中的任何一种, 该圆形区域的大小正比于聚光镜孔径光阑的大小。

6. 根据权利要求 4 所述的基于可编程 LED 阵列照明的多模式显微成像方法, 其特征在于暗场光学染色显微成像所对应的指定图案为一个中空的彩色圆环, 其余部分不发光, 该圆环的内径与显微物镜的数值孔径区域 NA_{obj} 相切, 外径大于内径, 其颜色选取为为红、绿、蓝或是它们的混合中的任何一种。

7. 根据权利要求 4 所述的基于可编程 LED 阵列照明的多模式显微成像方法, 其特征在于明场暗场复合光学染色显微成像所对应的指定图案为明场光学染色图案与暗场光学染色图案相结合, 显微物镜的数值孔径区域 NA_{obj} 内显示一种颜色, 而位于显微物镜的数值孔径区域 NA_{obj} 外的圆环区域显示另一种颜色, 其颜色组合选取为红、绿、蓝或是它们的混合中的任何一种。

8. 根据权利要求 4 所述的基于可编程 LED 阵列照明的多模式显微成像方法, 其特征在于差分光学染色显微成像所对应的指定图案在明场暗场复合光学染色图案的基础上, 进一步把彩色圆环分割为面积相等的若干子区域, 子区域相邻的颜色取不同的颜色, 其颜色组合选取为红、绿、蓝或是它们的混合中的任何一种。

9. 根据权利要求 4 所述的基于可编程 LED 阵列照明的多模式显微成像方法, 其特征在于相衬光学染色显微成像所对应的指定图案为一个中空的彩色圆环, 其余部分不发光, 该环形区域与显微物镜 7 的后焦面环状相位板区域相吻合, 其颜色选取为红、绿、蓝或是它们的混合中的任何一种。

基于可编程 LED 阵列照明的多模式显微成像方法

技术领域

[0001] 本发明属于光学显微成像技术,特别是一种基于可编程 LED 阵列照明的多模式显微成像方法。

背景技术

[0002] 相衬成像、偏光成像是比较常见的两种显微成像方法,其对应的显微镜分别称为相衬显微镜与偏光显微镜。相衬显微镜又称为相差显微镜,其是荷兰科学家 Zernike 于 1935 年发明的(盛富根. 微分干涉相衬显微镜的原理分析(矢量法)[J]. 光学仪器, 1986, (5).),用于观察未染色标本的显微镜。相衬显微镜利用物体不同结构成分之间的折射率和厚度的差别,把通过物体不同部分的光程差转变为振幅(光强度)的差别,经过带有环状光阑的聚光镜和带有相位片的相差物镜实现观测的显微镜。主要用于观察活细胞或不染色的组织切片,有时也可用于观察缺少反差的染色样品。

[0003] 虽然相差显微镜具备传统明场显微镜所不具备的功能,但其共性都是这需要显微光路中附加一些光学元件,如:环状光阑等,这就无形中增加了光路调节的复杂度。此外相差显微镜中的环状光阑尺寸需要与每个物镜单独匹配,如果系统中有 4 个不同倍率的物镜,则需要分别配备四种不同尺寸的环状光阑与之相配。显然,这使得聚光镜的结构变得日益复杂,元件数目越来越多,成本也随之越来越高。这种复杂的聚光镜结构一般需要熟练的显微镜工作者进行操作,并需要针对标本的差异和物镜的不同进行实践、校正(刘金,解玉兰. 柯拉照明在显微镜调节中的应用[J]. 实验室科学, 2006, (2):117-118.)。

[0004] 光场成像是近年来新兴的一种计算成像方式。光场是表示光辐射分布的函数,反映了光波动强度与光波分布位置和传播方向之间的映射关系。光场成像通过记录光辐射在传播过程中的四维位置和方向的信息,相比只记录二维的传统成像方式多出 2 个自由度,因而在图像重建过程中,能够获得更加丰富的图像信息。采用光场成像的显微镜被称为光场显微镜,其需要在显微镜成像系统的一次像面处插入一个微透镜阵列,每个微透镜记录的光线对应相同位置不同视角的场景图像,从而得到一个四维光场。额外微透镜阵列的引入增加了系统的成本。此外,传统的光场显微镜多出的二维角度信息是以牺牲一定的空间分辨率作为代价的,二者之间存在一个折衷。现有光场显微镜普遍存在图像空间分辨率不能满足需求的问题,如果加大图像空间分辨率的同时,兼顾轴向分辨率,则会对光电探测器件提出更高要求。这是当前制约光场成像技术的一个瓶颈,如何解决二者之间的矛盾,是光场成像中的一个关键问题(聂云峰,相里斌,周志良. 光场成像技术进展[J]. 中国科学院大学学报, 2011, 28(5):563-572.)。

[0005] 为了解决这个问题,发明专利《基于 LED 阵列的多模式显微成像系统及其方法》(申请号:201510186306.5)采用 LED 阵列作为显微镜照明光源,在同一个显微系统中实现了包含了明场、暗场、差分相衬三种显微成像模式,解决了传统显微镜在明场、暗场、差分相衬成像时光路复杂,操作难度大的问题。然而,这些现有技术对于如何采用 LED 阵列实现相衬成像、光场成像及光学染色显微成像仍然有很多问题无法解决。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种基于可编程 LED 阵列照明的相衬成像、光场成像及光学染色显微成像等多模式显微成像方法，无需往传统显微镜的成像光路中加入任何附加光学元件，无需频繁切换系统，从而显著提升了显微镜的灵活性与多功能性以及显微系统所能获得的信息量。

[0007] 实现本发明目的的技术解决方案为：一种基于可编程 LED 阵列照明的多模式显微成像方法，LED 阵列作为显微镜成像系统的照明光源，直接安置在显微镜成像系统的样品载物台下方，并且 LED 阵列的中心处于显微镜成像系统的光轴上，从而实现相衬成像、光场成像及光学染色成像模式。

[0008] 本发明与现有技术相比，其显著优点：(1) 无需在显微镜的成像光路中加入任何附加光学元件，例如环形光阑、微透镜阵列、相位板等；从而简化系统结构，大大降低成本。(2) 可灵活实现光学染色显微成像，这是传统显微镜所不具备的成像功能。(3) 可实现全分辨率光场成像，不存在传统光场成像中空间分辨率与角分辨率的矛盾问题。由于这三大优点，该显微成像方法可望在植物学、动物学、细胞生物学、半导体、材料科学、纳米技术、生命科学、医学诊断等众多领域得到广泛应用。

[0009] 下面结合附图对本发明作进一步详细描述。

附图说明

[0010] 图 1 是基于可编程 LED 阵列的显微镜装置示意图。

[0011] 图 2 是 LED 阵列中每个像素点的坐标系示意图。

[0012] 图 3 是基于可编程 LED 阵列照明的相衬显微成像方法中 LED 阵列所需显示的指定图案，其中虚线部分代表的是显微物镜的数值孔径区域 NA_{obj} 。

[0013] 图 4 是基于可编程 LED 阵列照明的光场显微成像方法中 LED 阵列所需显示的指定图案与坐标系示意图，其中虚线部分代表的是显微物镜的数值孔径区域 NA_{obj} 。

[0014] 图 5 是基于可编程 LED 阵列照明的明场光学染色显微成像方法中 LED 阵列所需显示的指定图案，其中虚线部分代表的是显微物镜的数值孔径区域 NA_{obj} 。

[0015] 图 6(a) 是基于可编程 LED 阵列照明的暗场光学染色显微成像方法中 LED 阵列所需显示的指定图案 1(单色)，其中虚线部分代表的是显微物镜的数值孔径区域 NA_{obj} 。

[0016] 图 6(b) 是基于可编程 LED 阵列照明的暗场光学染色显微成像方法中 LCD 液晶面板或 LED 阵列所需显示的指定图案 2(一个包含赤橙黄绿青蓝紫所有色彩的彩色圆环)，其中虚线部分代表的是显微物镜的数值孔径区域 NA_{obj} 。

[0017] 图 7 是基于可编程 LED 阵列照明的明场暗场复合光学染色显微成像方法中 LED 阵列所需显示的指定图案，其中虚线部分代表的是显微物镜的数值孔径区域 NA_{obj} 。

[0018] 图 8(a) 是基于可编程 LED 阵列照明的差分光学染色显微成像方法中 LED 阵列所需显示的指定图案 1(2 段编码)，其中虚线部分代表的是显微物镜的数值孔径区域 NA_{obj} 。

[0019] 图 8(b) 是基于可编程 LED 阵列照明的差分光学染色显微成像方法中 LED 阵列所需显示的指定图案 2(4 段编码)，其中虚线部分代表的是显微物镜的数值孔径区域 NA_{obj} 。

[0020] 图 9(a) 是基于可编程 LED 阵列照明的相衬光学染色显微成像方法中 LED 阵列所

需显示的指定图案 1(单色),其中虚线部分代表的是显微物镜的数值孔径区域 NA_{obj} 。

[0021] 图 9(b) 是基于可编程 LED 阵列照明的相衬光学染色显微成像方法中 LED 阵列所需显示的指定图案 2(一个包含赤橙黄绿青蓝紫所有色彩的彩色圆环),其中虚线部分代表的是显微物镜的数值孔径区域 NA_{obj} 。

[0022] 图 10(a) 是传统明场光学显微镜拍摄到的衍射光学元件样品的图像。

[0023] 图 10(b) 是采用本发明明场暗场复合光学染色显微成像方法拍摄到的衍射光学元件样品的图像。

[0024] 图 10(c) 是采用本发明差分光学染色显微成像方法拍摄到的衍射光学元件样品的图像。

[0025] 图 10(d) 是采用本发明差分光学染色显微成像方法拍摄到的衍射光学元件样品的另一组图像。

具体实施方式

[0026] 本发明基于可编程 LED 阵列照明的多模式显微成像方法是在硬件平台基于可编程 LED 阵列的显微镜上实现的。结合图 1,基于可编程 LED 阵列的显微镜主要包括 LED 阵列 1、显微镜成像系统 2、电路控制系统 3、计算机主机 4、显示器 5,所述显微镜成像系统 2 包括样品载物台 6、显微物镜 7、镜筒透镜 8 以及相机 9(彩色或者灰度相机),其中透射过样品载物台 6 的光被显微物镜 7 收集,并经过镜筒透镜 8 放大后成像在相机 9 的图像平面。电路控制系统 3 分别与 LED 阵列 1、相机 9、计算机主机 4 相连接。显示器 5 为传统显示器(即一般的 CRT 或者 LCD 液晶显示器),用于显示成像结果。

[0027] LED 阵列 1 作为显微镜的照明光源,其被直接安置在样品载物台 6 下方,其距离载物台的上表面距离 H 一般在 20~100mm 之间,并且 LED 阵列 1 的中心处于显微镜成像系统 2 的光轴上。LED 阵列 1 中单个 LED 元素为红绿蓝三色 LED,其典型波长为红光 635nm、绿光 525nm 和蓝光 475nm。每个 LED 元素之间中心间距典型值为 3~10mm。LED 阵列 1 并不需要进行单独加工,一般在市场上可直接购置。其包含呈阵列排列的一组多个 LED,这些 LED 通过固定基板实现物理与电路连接,如表 1 给出了一个市面上可购置的 LED 阵列的产品参数。在此 LED 阵列中,LED 元素共有 32 行、32 列,一共 1024 个,单个 LED 的亮度在 2000cd/m²以上。

[0028] 表 1 LED 阵列的物理参数

[0029]

项目	参数
LED波长	红635nm、绿525nm、蓝475nm
LED个数	32×32
LED间距	3mm
单个LED发光面尺寸	150μm
单个LED亮度	2000cd/m ²
阵列尺寸	128mm × 128mm × 17mm (5.0" × 5.0" × 0.65")
重量	170g
单个LED覆盖光锥角	150°
电源	5V
电流	最大2A (全亮)

[0030] LED阵列1中每个LED元素均可通过计算机主机4控制电路控制系统3实现单独点亮,形成不同空间分布的彩色图案。类似地,通过计算机主机4控制电路控制系统3还可实现不同空间分布的彩色图案的快速切换,实现在时间上快速变化的彩色图案。电路控制系统3还用于产生触发脉冲使LED阵列1精确地与相机9实现同步采集。所述的电路控制系统3的具体实现电路可以采用(但不限于)单片机、ARM、或者可编程逻辑器件等现有技术即可实现,具体实现方法可参考相关文献,如郭宝增,邓淳苗:基于FPGA的LED显示屏控制系统设计[J].液晶与显示,2010,25(3):424-428。

[0031] 本发明基于可编程LED阵列的显微镜的“可编程”在于LED阵列1中对入射照明的灵活操控性。利用LED阵列作为显微系统的照明光源,可实现多角度照明光、多照明孔径、光源相干性多变可控,从而可实现采用传统显微镜无法实现或者难以实现的显微功能。

[0032] 本发明基于可编程LED阵列照明的多模式显微成像方法实施之前,首先必须对LED阵列中每个像素点的位置进行标记,具体方法如下:结合图1,建立坐标系。其中矩形区域代表LCD液晶面板或LED阵列的有效区域,坐标原点位于其中央。对于任意一个像素点P,其位置坐标为(P_x, P_y),我们定义该点所对应的照明数值孔径为

$$NA_i = \sin \theta_i = \sin \arctan \frac{\sqrt{P_x^2 + P_y^2}}{f} \approx \frac{\sqrt{P_x^2 + P_y^2}}{f}, \text{对于基于LCD液晶 } f \text{ 代表LED阵列中心距}$$

离载物台的距离。每个像素点P的照明数值孔径决定了其所发出的光学照射样品的角度

$$\theta_i = \arctan \frac{\sqrt{P_x^2 + P_y^2}}{f} \approx \frac{\sqrt{P_x^2 + P_y^2}}{f}, \text{由此公式可见,越靠近LED阵列边缘的像素,其所发出的}$$

光学照射样品的角度 θ_i 越大。

[0033] 基于可编程LED阵列照明的多模式显微成像方法,包含相衬成像、光场成像及光学染色显微成像方法,它们的实现步骤类似,区别仅仅在于所选用的物镜7种类以及LED阵列1显示图案不同。

[0034] 本发明基于可编程 LED 阵列照明的相衬显微成像方法, 实现步骤如下:

[0035] 步骤一: 将基于可编程 LED 阵列的显微镜的显微物镜 7 切换到合适倍率的相衬显微物镜, 这里“合适倍率”是指根据实际观察的样品尺寸, 使用者观察所需的放大倍数, 与观察所需的实际区域而选定。相衬显微物镜与传统显微物镜的区别在于其后焦面处增加了一个环状相位板。

[0036] 步骤二: 仅点亮 LED 阵列 1 中一个中心环形区域的像素点即可(其余部分不点亮)。该环形区域与显微物镜 7 的后焦面环状相位板区域相吻合。该环形区域的示意图如图 3 所示, 其中虚线部分代表的是显微物镜 7 的数值孔径区域 NA_{obj} 。显然, 由于环状相位板位于显微物镜 7 的后焦面上, 所以环形区域是落在显微物镜 7 的数值孔径区域 NA_{obj} 之内的。

[0037] 步骤三: 在此配置下, 在样品载物台 6 上放入待观察样品, 采用相机 9 拍摄图像并于显示器 5 上显示即可得到相衬显微成像结果。

[0038] 本发明基于可编程 LED 阵列照明的光场显微成像方法, 实现步骤如下:

[0039] 步骤一: 将基于可编程 LED 阵列的显微镜的显微物镜 7 切换到合适倍率的普通显微物镜, 这里“合适倍率”是指根据实际观察的样品尺寸, 使用者观察所需的放大倍数, 与观察所需的实际区域而选定。

[0040] 步骤二: 仅点亮 LED 阵列 1 中一个圆形区域的像素点即可(其余部分不点亮)。结合图 4, 控制该圆形区域的圆心像素位置坐标为 (P_x, P_y) , 可实现对光场显微成像的观察角

度 $(\theta_x, \theta_y) = \arctan \frac{(P_x, P_y)}{f}$ 进行控制。控制该圆形区域的半径 R 可实现对于照明数值孔径角

θ_{i11} 的控制: $\theta_{i11} = \arctan R/f$, 数值孔径角 θ_{i11} 反比于焦深。一般而言, 该圆形区域要落在物镜的数值孔径 NA_{obj} 区域之内。

[0041] 步骤三: 在此配置下, 在样品载物台 6 上放入待观察样品, 采用相机 9 拍摄图像并于显示器 5 上显示即可得到相衬显微成像结果。

[0042] 本发明基于可编程 LED 阵列照明的光学染色显微成像方法, 与之前类似的是, 光学染色显微成像方法的实现关键步骤是在 LCD 液晶面板 1 上显示指定图案。光学染色显微成像方法又可分为明场光学染色、暗场光学染色、明场暗场复合光学染色、差分光学染色、相衬光学染色等, 它们的实现步骤类似, 区别仅仅在于 LCD 液晶面板 1 的显示图案不同, 实现步骤如下:

[0043] 步骤一: 将基于可编程 LED 阵列的显微镜的显微物镜 7 切换到合适倍率的普通显微物镜, 这里“合适倍率”是指根据实际观察的样品尺寸, 使用者观察所需的放大倍数, 与观察所需的实际区域而选定。

[0044] 步骤二: 在 LED 阵列 1 中显示对应于明场光学染色、暗场光学染色、明场暗场复合光学染色、差分光学染色或相衬光学染色的指定图案。

[0045] 步骤三: 在此配置下, 在样品载物台 6 上放入待观察样品, 采用相机 9 拍摄图像并于显示器 5 上显示即可得到相衬显微成像结果。

[0046] 所述明场光学染色显微成像所对应的指定图案只包含一个彩色中央圆形即可(其余部分不发光)。其颜色可以选取为红 / 绿 / 蓝, 或是他们的混合中的任何一种。该圆形区域的大小正比于聚光镜孔径光阑的大小, 一般而言要略小于物镜的数值孔径(虚线部分代表的是显微物镜的数值孔径区域 NA_{obj})。

[0047] 暗场光学染色显微成像所对应的指定图案为一个中空的彩色圆环（其余部分不发光）。该圆环的内径与显微物镜的数值孔径区域 NA_{obj} 相切，外径略大于内径（一般为内径的 120% - 180%）。其颜色可以选取为红 / 绿 / 蓝，或是他们的混合中的任何一种。甚至可以选取为包含赤橙黄绿青蓝紫所有色彩的彩色圆环。

[0048] 明场暗场复合光学染色显微成像所对应的指定图案为明场光学染色图案与暗场光学染色图案相结合。显微物镜的数值孔径区域 NA_{obj} 内显示一种颜色，而位于显微物镜的数值孔径区域 NA_{obj} 外的圆环区域显示另一种颜色。其颜色组合可以选取为红 / 绿 / 蓝，或是他们的混合中的任何一种。

[0049] 差分光学染色显微成像所对应的指定图案在明场暗场复合光学染色图案的基础上，进一步把彩色圆环分割为面积相等的若干子区域，子区域相邻的颜色可以取不同的颜色。其颜色组合可以选取为红 / 绿 / 蓝，或是他们的混合中的任何一种。彩色圆环还可被等面积分割为 4 段甚至更多，且子区域相邻的颜色均可以取不同的颜色。

[0050] 相衬光学染色显微成像所对应的指定图案为一个中空的彩色圆环（其余部分不发光）。该环形区域与显微物镜 7 的后焦面环状相位板区域相吻合。其颜色可以选取为红 / 绿 / 蓝，或是他们的混合中的任何一种。甚至可以选取为包含赤橙黄绿青蓝紫所有色彩的彩色圆环。

[0051] 所述明场光学染色、暗场光学染色、明场暗场复合光学染色、差分光学染色或相衬光学染色的指定图案如图 5- 图 9 所示。

[0052] 其中明场光学染色如图 5 所示，LED 阵列 1 只需显示一个彩色中央圆形即可（其余部分不发光）。图 5 中以黄色为例，实际上可以选取为红 / 绿 / 蓝，或是他们的混合中的任何一种。该圆形区域的大小正比于聚光镜孔径光阑的大小，一般而言要略小于物镜的数值孔径（虚线部分代表的是显微物镜的数值孔径区域 NA_{obj} ）。

[0053] 暗场光学染色如图 6(a) 所示，LED 阵列 1 只需显示一个中空的彩色圆环即可（其余部分不发光）。该圆环的内径与显微物镜的数值孔径区域 NA_{obj} 相切，外径略大于内径（一般为内径的 120% - 180%）。图 6(a) 中以黄色为例，实际上可以选取为红 / 绿 / 蓝，或是他们的混合中的任何一种。甚至可以选取为包含赤橙黄绿青蓝紫所有色彩的彩色圆环，如图 6(b) 所示。

[0054] 明场暗场复合光学染色如图 7 所示，顾名思义就是将明场光学染色图案与暗场光学染色图案相结合。显微物镜的数值孔径区域 NA_{obj} 内显示一种颜色，而位于显微物镜的数值孔径区域 NA_{obj} 外的圆环区域显示另一种颜色。图 7 中以黄色 / 绿色为例，实际上颜色组合可以选取为红 / 绿 / 蓝，或是他们的混合中的任何一种。

[0055] 差分光学染色如图 8(a) 所示，其在明场暗场复合光学染色图案的基础上，进一步把彩色圆环分割为面积相等的若干子区域，子区域相邻的颜色可以取不同的颜色。图 8(a) 中，彩色圆环被分割为两部分，颜色分别取了红和绿。实际上颜色组合可以选取为红 / 绿 / 蓝，或是他们的混合中的任何一种。不仅仅限于图 8(a) 所示的 2 段编码，如图 8(b) 所示，彩色圆环还可被等面积分割为 4 段甚至更多，且子区域相邻的颜色均可以取不同的颜色。

[0056] 相衬光学染色如图 9(a) 所示，LED 阵列 1 只需显示一个中空的彩色圆环即可（其余部分不发光）。该环形区域与显微物镜 7 的后焦面环状相位板区域相吻合。显然，由于环状相位板位于显微物镜 7 的后焦面上，所以环形区域是落在显微物镜 7 的数值孔径区域

NA_{obj} 之内的。图 9(a) 中以黄色为例,实际上可以选取为红 / 绿 / 蓝,或是他们的混合中的任何一种。甚至可以选取为包含赤橙黄绿青蓝紫所有色彩的彩色圆环,如图 9(b) 所示。

[0057] 为了表明本发明的实际使用效果,我们采用一实例来说明。在实例中,我们采用基于可编程 LED 阵列的显微镜对衍射光学元件样品进行观察,图 10(a) 是传统明场光学显微镜拍摄到的衍射光学元件样品的图像。注意该样品本身是无色透明的,在传统明场显微镜下的对比度是很低的,图 10(b) 是采用本发发明明场暗场复合光学染色显微成像方法拍摄到的衍射光学元件样品的图像。图 10(c) 是采用本发发明差分光学染色显微成像方法拍摄到的衍射光学元件样品的图像。图 10(d) 是采用本发发明差分光学染色显微成像方法拍摄到的衍射光学元件样品的另一组图像。由实验结果可以看出采用本发明所拍摄到的衍射光学元件样品的光学染色图像的对比度获得了很强的提升,并且图像中产生了红绿蓝多种色彩。

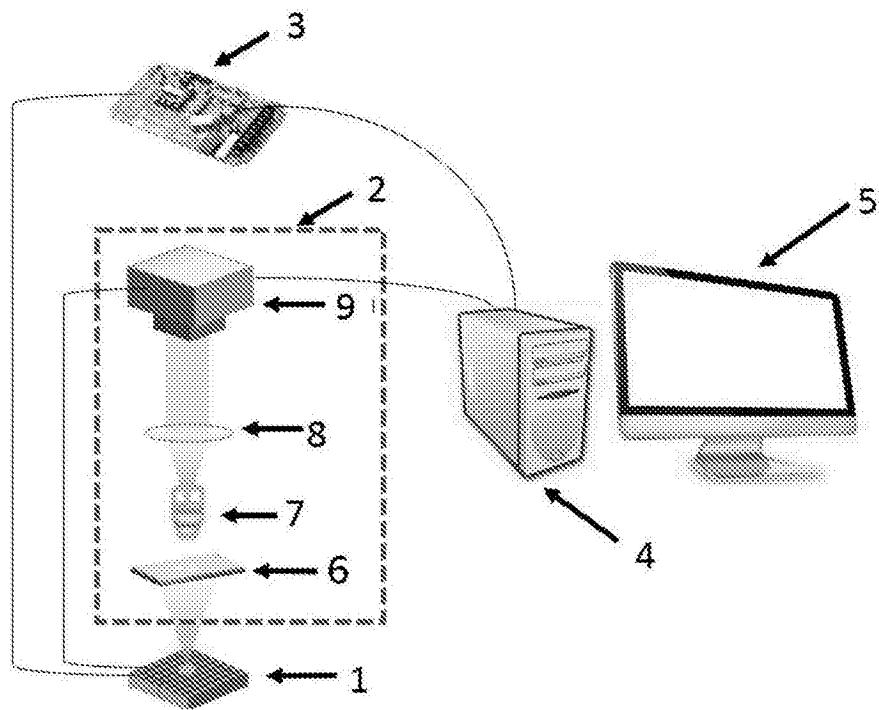


图 1

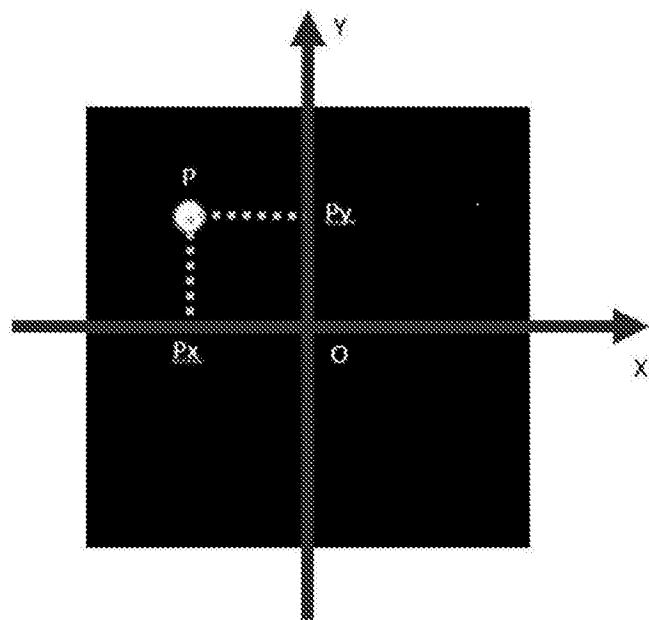


图 2

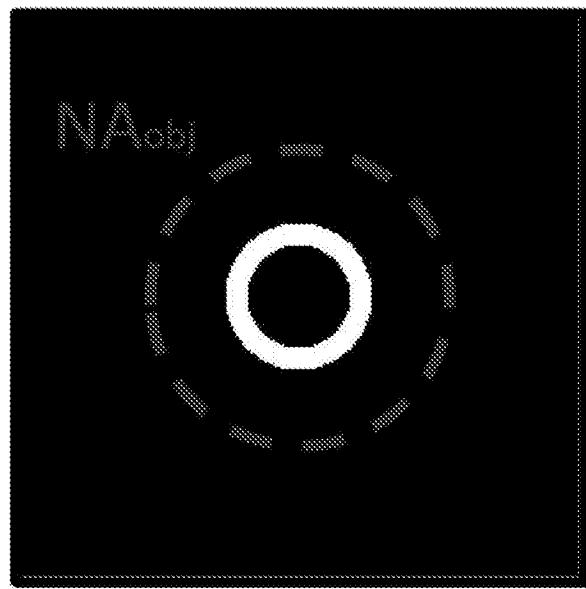


图 3

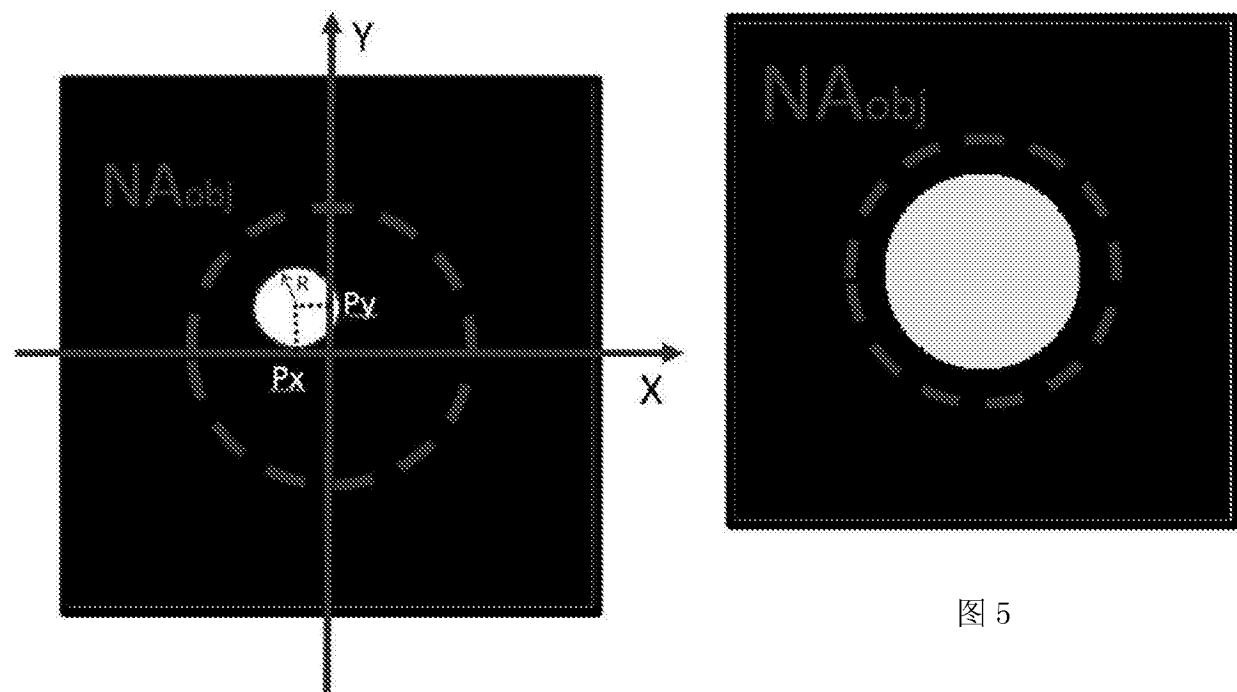


图 5

图 4

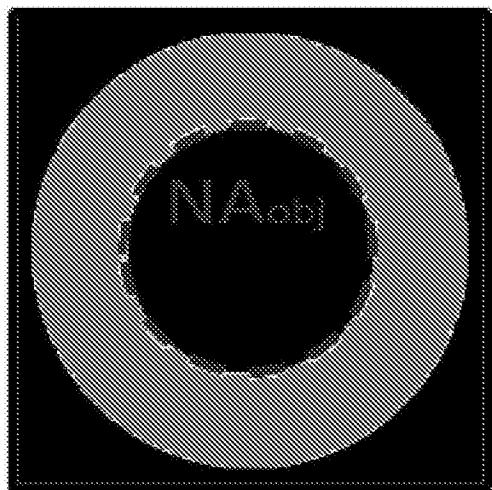


图 6(a)

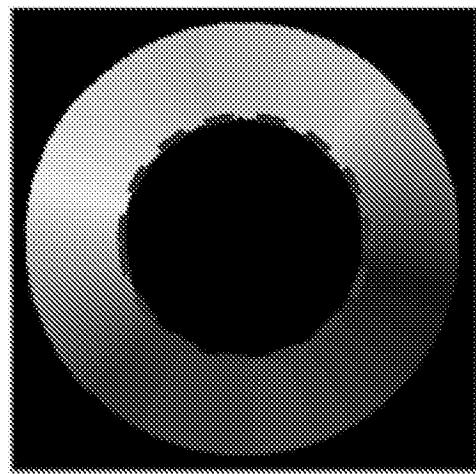


图 6(b)

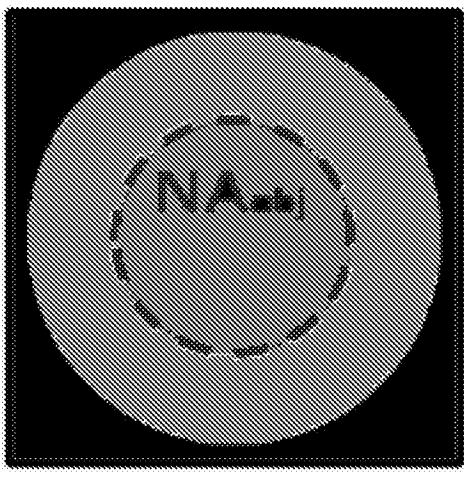


图 7

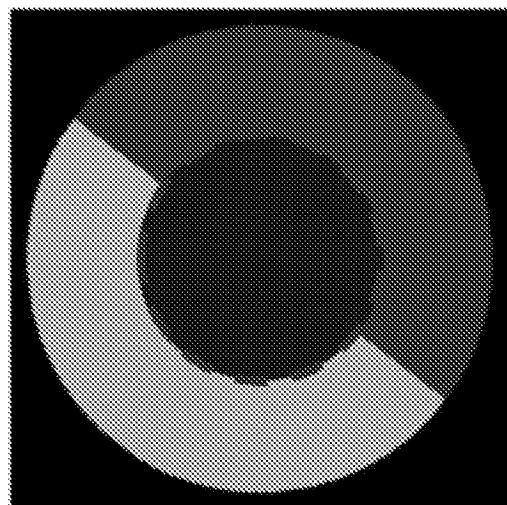


图 8(a)

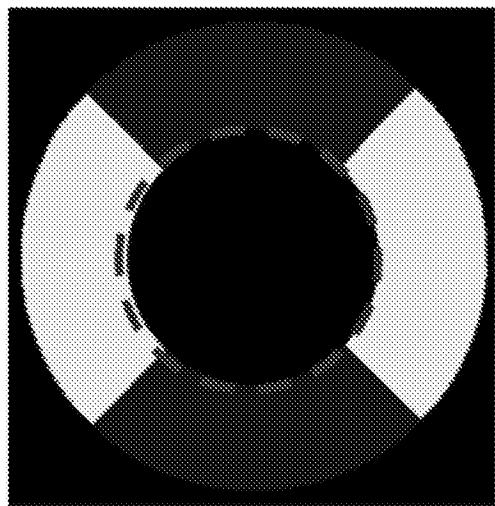


图 8 (b)

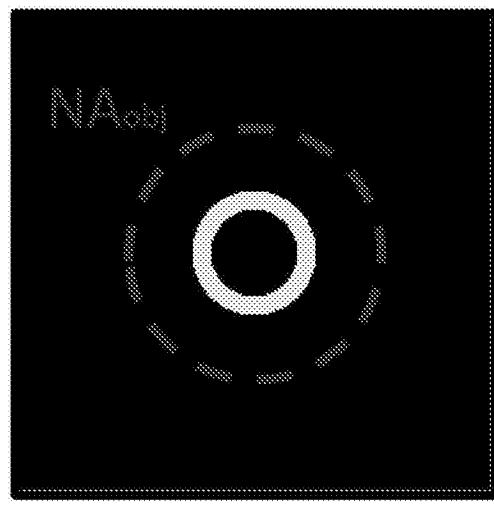


图 9 (a)

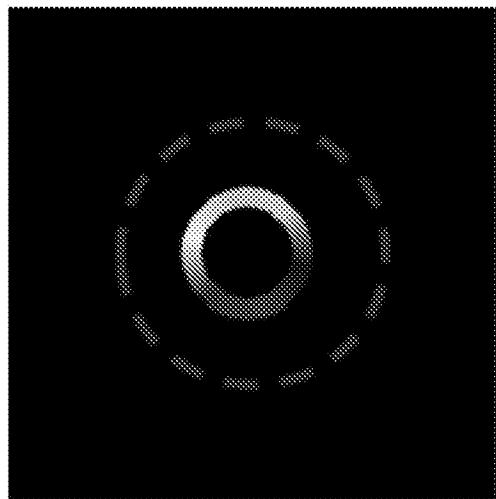


图 9 (b)

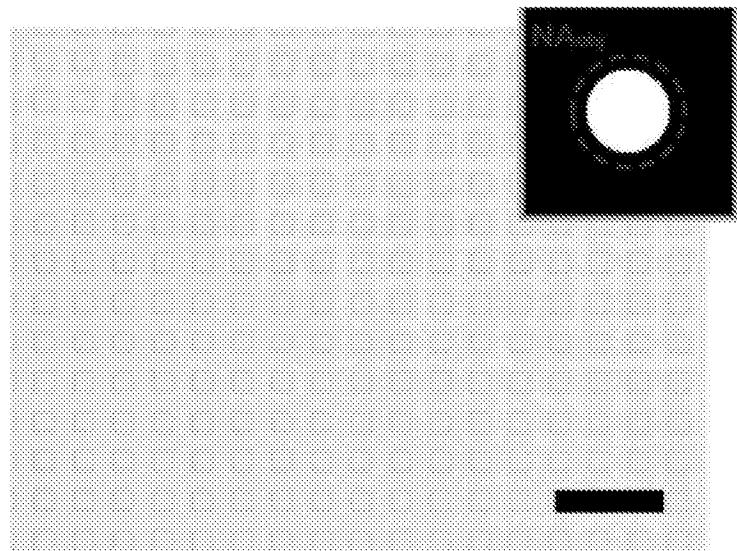


图 10 (a)

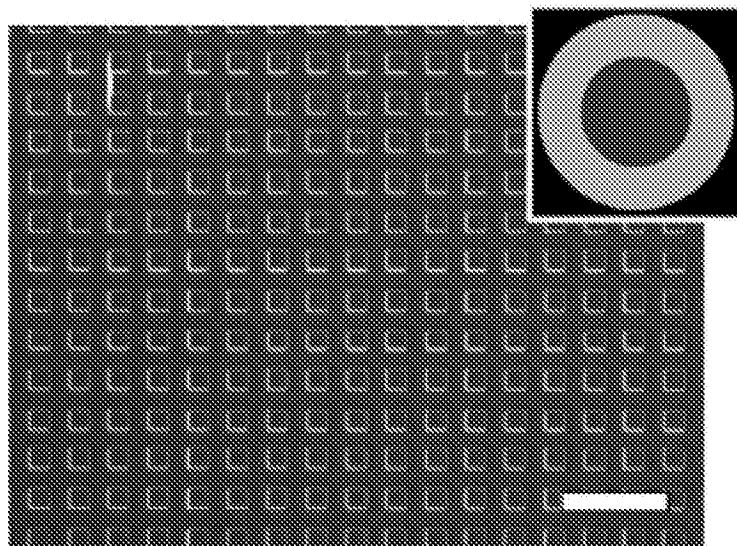


图 10 (b)

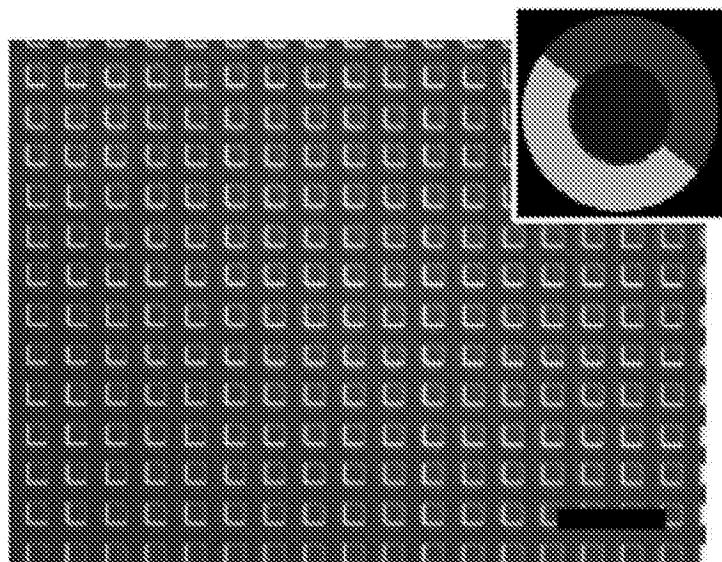


图 10(c)

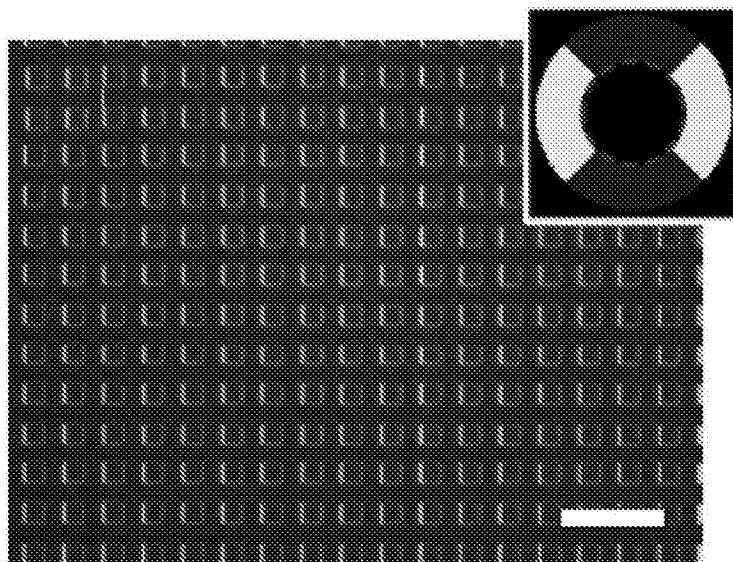


图 10(d)