



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102016551 B

(45) 授权公告日 2012. 09. 19

(21) 申请号 200980115071. 3

G02B 21/06 (2006. 01)

(22) 申请日 2009. 04. 28

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

102008022493. 6 2008. 05. 07 DE

US 7369308 B2, 2008. 05. 06,

WO 2008009581 A, 2008. 01. 24,

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 10. 28

审查员 郎琪

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2009/003056 2009. 04. 28

(87) PCT申请的公布数据

W02009/135607 DE 2009. 11. 12

(73) 专利权人 卡尔·蔡司显微成像有限公司

地址 德国耶拿

(72) 发明人 曼弗雷德·马萨 布鲁尼·维纳斯

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司

公司 11002

代理人 瞿卫军

(51) Int. Cl.

G01N 21/64 (2006. 01)

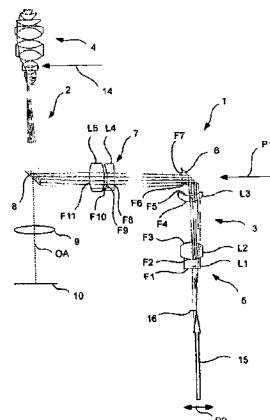
权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 4 页

(54) 发明名称

用于样品瞬逝照明的装置和方法

(57) 摘要

本发明涉及一种样品瞬逝照明的装置,所述装置包括设有光学校正元件(3)和位于所述光学校正元件下游的物镜(4)的光学照明元件,从而用所提供的包含具有至少两种不同波长的光辐射的光束瞬逝地照明样品。校正光学元件(3)具有横向色差,其在照明期间导致光辐射根据波长在不同高度穿透物镜(4)的光瞳(14),并且对其选择,使得在瞬逝照明期间辐射进入样品的穿透深度的波长相关差减小。



1. 一种用于样品瞬逝照明的装置,包括照明光学器件,其设有校正光学器件(3)和位于所述校正光学器件(3)下游的物镜(4),以用所提供的包含具有至少两种不同波长的光辐射(S1、S2)的光线束(15)瞬逝照明所述样品,所述校正光学器件(3)具有横向色差,其在照明期间导致所述光辐射(S1、S2)根据所述波长在不同高度穿过所述物镜(4)的光瞳(14),并且以如此方式对其选择,即减小在瞬逝照明期间辐射进入所述样品(11)的穿透深度与波长相关的差异;

其中,所述装置包括馈送单元,其将所述光线束(15)以离轴方式馈送至所述校正光学器件(3)。

2. 按照权利要求1所述的装置,其中,所述校正光学器件(3)包含至少一个折射元件(L1、L2、L3)。

3. 按照权利要求1或2所述的装置,其中,所述校正光学器件(3)包含至少一个倾斜放置的平板(17)和/或倾斜放置的透镜。

4. 按照权利要求1或2所述的装置,其中,所述校正光学器件(3)包括与所述物镜光瞳(14)共轭的平面(16),所提供的光线束(15)穿过所述平面。

5. 按照权利要求3所述的装置,其中,所述校正光学器件(3)包括与所述物镜光瞳(14)共轭的平面(16),所提供的光线束(15)穿过所述平面。

6. 按照权利要求1所述的装置,其中,所述馈送单元以如此方式馈送所述校正光学器件(3)的光线束(15),以使其不平行于所述校正光学器件(3)的光轴而延伸。

7. 按照权利要求1所述的装置,其中,所述校正光学器件(3)包括至少一个衍射元件(20、25)。

8. 一种用于样品瞬逝照明的方法,包括含有至少两种不同波长的光辐射的光线束,所述光线束经校正光学器件和设置于所述校正光学器件下游的物镜引导至样品,以使得样品被瞬逝照明,

所述校正光学器件具有横向色差,其在照明期间导致光辐射根据所述波长在不同高度穿过所述物镜的光瞳,并且以如此方式对其选择,即减小在瞬逝照明期间辐射进入所述样品的穿透深度与波长相关的差异;

其中,所述光线束以离轴方式馈送至所述校正光学器件。

9. 按照权利要求8所述的方法,其中,所述校正光学器件设有至少一个折射元件。

10. 按照权利要求8或9所述的方法,其中,所述校正光学器件设有至少一个倾斜放置的平板和/或倾斜放置的透镜。

11. 按照权利要求8或9所述的方法,其中,所述校正光学器件具有与物镜光瞳共轭的平面,所提供的光线束穿过所述平面。

12. 按照权利要求11所述的方法,其中,所述光线束包括光辐射,以使其作为同轴光线束穿过共轭平面。

13. 按照权利要求8、9或12所述的方法,其中,用具有所述至少两种波长的光辐射同时照明所述样品。

14. 按照权利要求10所述的方法,其中,所述校正光学器件具有与物镜光瞳共轭的平面,所提供的光线束穿过所述平面。

15. 按照权利要求10所述的方法,其中,用具有所述至少两种波长的光辐射同时照明

所述样品。

16. 按照权利要求 11 所述的方法,其中,用具有所述至少两种波长的光辐射同时照明所述样品。

17. 按照权利要求 8 所述的方法,其中,所述光线束以如此方式馈送至所述校正光学器件,以使其不平行于所述校正光学器件的光轴而延伸。

18. 按照权利要求 8 所述的方法,其中,所述校正光学器件设有至少一个衍射元件 (20、25)。

用于样品瞬逝照明的装置和方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于样品瞬逝照明的装置和方法。

背景技术

[0002] 在样品的瞬逝照明中,如此提供照明样品的光线束以使得在样品的边界面发生全反射。因此样品中形成了持续存在的瞬逝波,其强度随相对边界面的距离按指数减弱。

[0003] 强度下降到 $1/e$ 的距离可以定义为描述瞬逝波穿透深度的距离。典型值位于 100 至 200nm 的范围内。

[0004] 瞬逝辐射例如用于在样品中激发荧光。然后能够借助显微镜探测所激发的荧光辐射。

[0005] 几种具有不同波长的荧光越来越多地被激发。这在相同的条件下应该明显发生至最可能的程度,以使得单个荧光图像依然有意义并且能够定量地相互结合或相互比较。在穿透深度依赖于波长和入射角这方面存在难题。在相同入射角时,穿透深度对于不同波长是大小不同的。

发明内容

[0006] 在此基础上,本发明的目的是提供一种用于样品瞬逝照明的装置,其中穿透深度与波长相关的差异被减小。而且,将提供用于样品瞬逝照明的特定方法。

[0007] 该目的通过一种用于样品瞬逝照明的装置而实现,所述装置包括照明光学器件,其设有校正光学器件和设置于所述校正光学器件下游的物镜,并且用所提供的包含至少两种不同波长光辐射的光线束瞬逝照明样品,校正光学器件具有横向色差,其在照明期间导致光辐射根据波长在不同高度穿过物镜光瞳,并且对其以如此方式选择,即减小在瞬逝照明期间辐射进入样品的穿透深度与波长相关的差异。

[0008] 因此,根据本发明的装置可用于同时以具有至少两种不同波长的光辐射或以具有两种不同波长的光锥照明样品,其在例如荧光检验的情况下具有优势。穿透深度的差异能够显著减小,由其例如可以评估来源于同时或顺序完成的频率激发的多光谱图像。

[0009] 因而瞬逝照明中的光谱穿透深度与依据本发明的装置相统一。所以具有不再需要提供仪器中用于校准光谱穿透深度的调整选项的优势。

[0010] 在依照本发明的装置中有利地利用了物镜光瞳的高度影响照明角度并因此影响瞬逝照明中的穿透深度。依照本发明通过有意的校正光学器件的倍率色差对其如此进行利用,即物镜光瞳中存在需要的依赖于波长的高度,从而在瞬逝照明期间获得相同的穿透深度。

[0011] 由于依照本发明的装置,可以用高得多的频率在例如其中不同荧光团或染料以不同波长被同时或顺序激发的实验情况下进行测量或检验,因为再也不需要像以前所必需的那样为了达到相同的穿透深度或相同的激发量而在两个检测(或瞬像(snapshot))之间移动机械元件了。

[0012] 校正光学器件可包括衍射和 / 或折射元件。尤其,其可以是倾斜放置的平板、楔形物、棱镜、衍射元件和 / 或可以倾斜放置的透镜,以及这些元件的任意组合。由校正光学器件引起的横向色差也可以通过考虑物镜的放大倍率而特别地选择。如果物镜在照明中具有色差,这可以在选择校正光学器件的横向色差或倍率色差时考虑。

[0013] 校正光学器件可以具有与物镜光瞳共轭的平面,所提供的光线束穿过所述平面。尤其是,所提供的光线束平行于校正光学器件的光轴穿过共轭平面。在这种情况下校正光学器件的设置容易实现。

[0014] 另外,光线束能够以离轴方式与物镜光瞳中的主光线所需传播路径相对应地以一定距离并在一定角度下穿过该平面。例如在光纤内不同波长的光可以提供在该平面中,依照本发明其光线以限定的横向色差在物镜光瞳中成像,由此能够以有目的的方式减小穿透深度的光谱差。

[0015] 尤其,根据本发明的用于样品瞬逝照明的装置可包括馈送单元,其以离轴方式和 / 或采用光线束不平行于校正光学器件的光轴延伸的方式来馈送校正光学器件的光线束。馈送单元可包括光纤,设置其光纤端面以实现所期望的光线束馈送。可以理解馈送单元也能够包括其它光学元件,诸如分束器、透镜、光栅等。

[0016] 在所提供的光线束中,包括具有不同波长尤其是彼此同轴的光锥 (ray pencil)。这简化了校正光学器件的配置。

[0017] 根据本发明的用于样品瞬逝照明的装置还可以包括驱动元件,其例如可以作为馈送单元的一部分,并且用它可以设定光线束的位置和 / 或角度,光线束在该位置中或该角度下穿过共轭平面。尤其,光线束到校正光学器件光轴的距离可以改变。因此有可能同时改变对于所有波长的穿透深度。

[0018] 也可以这样设置驱动元件,以使得在物镜光瞳中所有依赖于波长的高度可因此同时改变。优选地,以这样的方式实行改变,即穿透深度以不依赖于波长的方式变化。在借助驱动元件改变穿透深度的情况下,光谱穿透深度可发生微小的依赖于波长的变化。与非校正情形相比,仍存在的差异降低了至少一个量级。

[0019] 当所提供的光线束包括两个或更多个具有不同波长的光锥时,穿透深度与波长相关的差异能够最小化。特别是有可能对于两种、三种或更多波长的穿透深度是相同的。与穿透深度没有进行任何校正的情形相比,显著的减小在波长介于中间的情形下是可能的。与非校正的情形相比,仍存在的差异能够降低一个或几个量级。

[0020] 在多于两种或三种不同波长的情况下,校正光学器件可以设置成例如这样的方式以使得对于所有的波长光谱差异被最小化。例如对于任何波长来讲可以要求光谱差异不超过预定的限值。任何其它类型的最小化也是可能的。

[0021] 光辐射或光学光锥在这里将特别理解为根据光学定律而表现的电磁辐射。尤其是,其涉及来自可见波长范围的辐射。来自红外范围或紫外范围的辐射也是可能的。

[0022] 根据本发明的用于样品瞬逝照明的装置可以是显微镜组件。在这种情形下,可以用这样的方式设置能够瞬逝照明样品的显微镜,即使得辐射在样品中的穿透深度与波长相关的差异减小。

[0023] 在这种情形下,校正光学器件可以利用显微镜照明光学器件的一部分。校正光学器件可以包括设置于物镜下游的入射垂直照明的一部分。在这种情形下,校正光学器件包

括例如校正组件,其可被加到显微镜上并与照明光学器件的该部分一起实现依照本发明的校正光学器件。在这种情形下,校正光学器件优选地以这样的方式设置,即与所使用的照明光学器件的该部分一起实现所期望的校正光学器件的横向色差。

[0024] 当使用这种显微镜探测荧光辐射时,它也经常称作 TIRF(=全内反射荧光)显微镜。在 TIRF 显微镜中,大幅地减小从落射荧光(epi-fluorescence)获知的背景荧光并且成像对比度大幅地提高。结果是很高的 z 轴向分辨率(z-resolution)。瞬逝场的典型厚度为 100 至 200nm。

[0025] 依据本发明的装置容许在 TIRF 显微镜和用几种不同波长的处理中优化激发光谱量,以通过利用这几种波长而获得更明亮和更好的 TIRF 彩色图像。

[0026] 由于成像原理,根据本发明的装置的这种照明方法尤其适合于检测在细胞膜环境下的动态过程以及检测无细胞的系统中分子与分子的相互作用。另外,电生理学和药理学实验的结合(样品操作)也将起到主要作用,因为 TIRF 显微镜能够在先前只有间接测量可行的地方提供图像。

[0027] 根据本发明的用于样品瞬逝照明的装置还可以包括产生光线束的源。辐射特别可涉及激光辐射。

[0028] 根据本发明的用于样品瞬逝照明的装置和具有这种装置的显微镜可包括本领域普通技术人员已知的控制装置。尤其显微镜可采取惯用方式设置。

[0029] 由用于样品瞬逝照明的方法进一步实现本发明目的,其包括光线束,所述光线束包含具有至少两种不同波长的光辐射,经校正光学器件和设置于校正光学器件下游的物镜将光线束引导至样品,使得样品被瞬逝照明,所述校正光学器件具有横向色差,其在照明期间导致光辐射依照波长在不同高度穿过物镜光瞳,并且以如此方式对其选择,即减小在瞬逝照明期间辐射在样品中的穿透深度与波长相关的差异。

[0030] 依据本发明的方法容许同时以不同波长瞬逝照明样品并确保穿透深度只稍有差异。特别是,穿透深度可以相同。

[0031] 以这一方法可在突出方式中实现具有不同波长的相同照明条件。

[0032] 校正光学器件可设有至少一个折射和/或至少一个衍射元件。

[0033] 尤其,校正光学器件可包括与物镜光瞳共轭的平面,所提供的光线束穿过所述平面。优选地,对于不同波长光线束作为同轴线束穿过共轭平面。

[0034] 在该方法中,优选以具有不同波长的光辐射同时照明样品。

[0035] 该方法可用于以离轴方式和/或不平行于校正光学器件的光轴延伸的方式对校正光学器件提供光线束。因而能够以有目的的方式利用校正光学器件的横向色差,使得不同波长在所期望的不同高度穿过物镜光瞳。

[0036] 依照本发明的照明方法可用于显微镜检测中。因此提供了特定的显微镜使用方法,例如 TIRF 显微镜使用方法。显微镜使用方法可采用本领域技术人员已知的方式进一步开发。

[0037] 要理解以上所提到和下面仍要解释的特征不仅能用于所阐明的组合中,而且也用于不脱离本发明范围的其它组合或单独地使用。

附图说明

[0038] 参照所附的同样公开了有关本发明的特征的附图,本发明将在下文得到更为详细的解释,其中:

[0039] 图 1 示出了依照本发明用于样品瞬逝照明的装置的一个实施例的示意图;

[0040] 图 2 示出了图 1 的带有样品 11 的物镜 4 的放大图;

[0041] 图 3 示出了依照本发明用于样品瞬逝照明的装置的另一个实施例;

[0042] 图 4 示出了图 1-3 的实施例中现有穿透深度的解释的示意图;

[0043] 图 5 示出了依照本发明使用衍射光学器件的样品瞬逝照明装置的另一个实施例;以及

[0044] 图 6 示出了依照本发明使用以衍射方式作用的光栅的样品瞬逝照明装置的另一个实施例。

具体实施方式

[0045] 在图 1 和 2 所示的实施例中,依照本发明的样品瞬逝照明装置集成于显微镜 2 中,并且包括校正光学器件 3 和置于校正光学器件 3 下游的物镜 4。

[0046] 校正光学器件 3 包括带有三个透镜 L1、L2 和 L3 的校正单元 5,下游的偏转棱镜 6,带有两个透镜 L4 和 L5 的入射光光学器件 7 和反射镜 8。

[0047] 入射光光学器件 7 可以是显微镜 2 的常规入射垂直照明部件。出于简化图解的原因,这里未表示入射垂直照明的更多元件。如果移除棱镜 6,用于入射垂直照明的光将从箭头 P1 所示的方向遇到入射光光学器件 7,然后经反射镜 8 被馈送到显微镜光束路径中。反射镜 8 可设置为部分透明的反射镜和 / 或二向色反射镜(取决于应用)。

[0048] 显微镜 2 还可以包括管状光学器件 9 和图像传感器 10。

[0049] 在依照图 1 和 2 的实施例中,以波长 450nm 和 575nm 的辐射 15 进行的样品 11 的瞬逝照明采取这样的方式,即穿透深度与两波长无关,在每一情形下均为 93nm。所提供的光线束 15 在图 1 中由箭头表示。箭头的尖端位于平面 16 上并可以是例如辐射 15 出射的光纤端面。

[0050] 在这种情形下,采用平面 16 是物镜 4 的出射光瞳 14 的共轭平面的方式设置校正光学器件 3,出射光瞳 14 的位置如图 1 中箭头 14 所表示。另外,校正光学器件 3 包括横向色差,配置横向色差,使得以该方式补偿了两种波长 450nm 和 575nm 在待检测样品 11 的瞬逝照明中穿透深度 d(图 2)依赖于波长的差。

[0051] 对于两种波长 450nm 和 575nm,为了获得相同的 93nm 的预定穿透深度 d,设置校正光学器件 3 的校正单元 5,使其具有强的横向色差。采用这样的方式选择横向色差,即具有波长 450nm 的光辐射或者光学光锥 S1 在探测侧比具有波长 575nm 的光辐射 S2 以更低的高度 h1(距光轴 OA 的距离)穿过物镜 4 的光瞳 14,如图 2 中示意性地表示。通过校正单元 5 预设不同的高度 h1、h2(距光轴 OA 的距离),使得作为因而辐射 S1、S2 在样品 11 上产生不同入射角的结果,对于两种波长每个穿透深度 d 都是 93nm。

[0052] 校正单元 5 的设置取决于高度 h,其可以基于所期望的穿透深度 d 进行如下计算:

[0053] 穿透深度 d 可以根据下面的公式 1 表示:

$$[0054] \quad d = \frac{\lambda}{4\pi n_2 \sqrt{(\sin \alpha / \sin \alpha_g)^2 - 1}} \quad (1)$$

[0055] λ 代表所使用的光辐射的波长, α 代表当前光束的入射角度, α_g 代表转变为全反射的光束入射的临界角, 以及 n_2 代表样品 (即被瞬逝照明的介质) 的折射率。

[0056] 全反射的临界角 α_g 可根据下面的公式 2 表示:

$$[0057] \quad \sin \alpha_g = \frac{n_2}{n_1} \quad (2)$$

[0058] 其中 n_1 是盖玻片 12 的折射率。

[0059] 当公式 1 和 2 联立, 进入样品 11 中的瞬逝波的穿透深度可表示如下:

$$[0060] \quad d = \frac{\lambda}{4\pi \sqrt{n_1^2 \sin^2 \alpha - n_2^2}} \quad (3)$$

[0061] 如果穿透深度 d 对于不同的波长是相同的, 由公式 3 可以要求如下表达式必须是常量。

$$[0062] \quad \frac{n_1^2 \sin^2 \alpha - n_2^2}{\lambda^2} \quad (4)$$

[0063] $n_1 \cdot \sin \alpha$ 的值对应物镜 4 中物体侧上的孔径。这导致处于包括无限成像距离的正弦条件下的如下公式:

$$[0064] \quad h = (n_1 \sin \alpha) f \quad (5)$$

[0065] 其中 h 是物镜 4 的出射光瞳 14 中各个孔径光束的高度并且 f 是物镜 4 的焦距。

[0066] 对于确定或期望的穿透深度在物体侧上所需的孔径 ($n_1 \cdot \sin \alpha$) 可由公式 3 对各个波长进行计算。公式 5 得出射进入物镜 4 的出射光瞳 14 的光依赖于波长的高度 h 。当依赖于波长的高度 h 已知时, 设计产生于校正单元 5 的倍率色差, 以使得供给到校正单元 5 的光线束 15 的具有不同波长的光线 S1、S2 以计算的高度 h 穿过出射光瞳 14。

[0067] 另外, 光线束 15 距离校正光学器件 3 光轴的轴向距离能够在图 1 的装置中改变, 如双箭头 P2 所示。穿透深度可以通过距离的变化而改变。距离的变化可特别地通过促动器产生 (未示出)。

[0068] 当穿透深度以这种方式设定为如这里所假设的不同于 93nm 的值时, 借助校正单元 5 仍然可实现依赖于波长的不同穿透深度的减小。但是可能发生的是穿透深度永远不再完全相同。然而穿透深度的差与没有依照本发明的校正单元 5 的情形相比大幅地降低。

[0069] 以下的表 1 示出了透镜 L1 至 L5 的各个区域的半径和距离以及所用透镜材料各自的折射率。

[0070] 表 1

[0071]

表面	半径 (mm)	厚度/至下一表面距离 (mm)	折射率 (对于 514.5 nm)
16	∞	27.464	1
F1	-33.4951	5.96	1.73004
F2	12.32	11.28	1.435962
F3	-12.32	27.109	1
F4	10,903	4.07	1.612309
F5	9.173	8.46	1
F6	∞	10	1.52049
F7	∞	44.02	1
F8	86.5932	4.6	1.644665
F9	24.938	1.725	1
F10	28.184	9.63	1.501224
F11	-32.543	111.139	1
14			

[0072] 另一个可能的校正单元 5 如图 3 所示。在这种情形下,校正单元包括倾斜的平板 17 并且校正单元补偿 425nm 和 575nm 的穿透深度 d 的色差。

[0073] 还可能的校正单元如图 5 和 6 所示。在图 5 中,馈送到校正光学器件的光线束穿过衍射光学器件 (20),其导致依赖于波长的辐射的分束。光线被下游的透镜 21 准直,透镜 21 的焦点位于所提供的光线束在衍射光学器件上的作用点。

[0074] 在图 6 中,馈送到校正光学器件的光线束遇到衍射作用光栅 25,导致依赖于波长的辐射的分束。光线被下游的透镜 26 准直,透镜 26 的焦点位于所提供的光线束在衍射光栅上的作用点。

[0075] 当使用物镜 4 时,波长 425nm 和 575nm 在穿透深度为 93nm 所获得的高度差 $\Delta h(\lambda)$ 为 0.0989mm。当具有这样两种波长的光辐射线束 15 以 37.149° 的 γ 角遇到平板 17 时获得这样的高度差。由于光辐射依赖于其波长而发生不同的折射,具有不同波长的光线以平行偏移方式离开平板 17 不同的高度 $h(\lambda)$ 。这里所需的高度差由平板 17 的 17.775mm 的厚度 D 来达到。

[0076] 图 4 表示不同情况下瞬逝照明中的穿透深度。曲线 K1 表示没有依照本发明校正的依赖于波长的穿透深度。曲线 K2 表示图 1 实施例的穿透深度。采用虚线的曲线 K3 表示对于校正光学器件 (未示出) 的穿透深度,其中使用 400 至 650nm 之间的八种波长实现光瞳高度的最优化。这样的校正光学器件与图 1 的校正光学器件 3 相比包括额外的透镜。最后,93nm 的依赖于波长的穿透深度如曲线 K4 所示。

[0077] 所获得的穿透深度的调整可以从穿透深度的图例中清楚地看到。

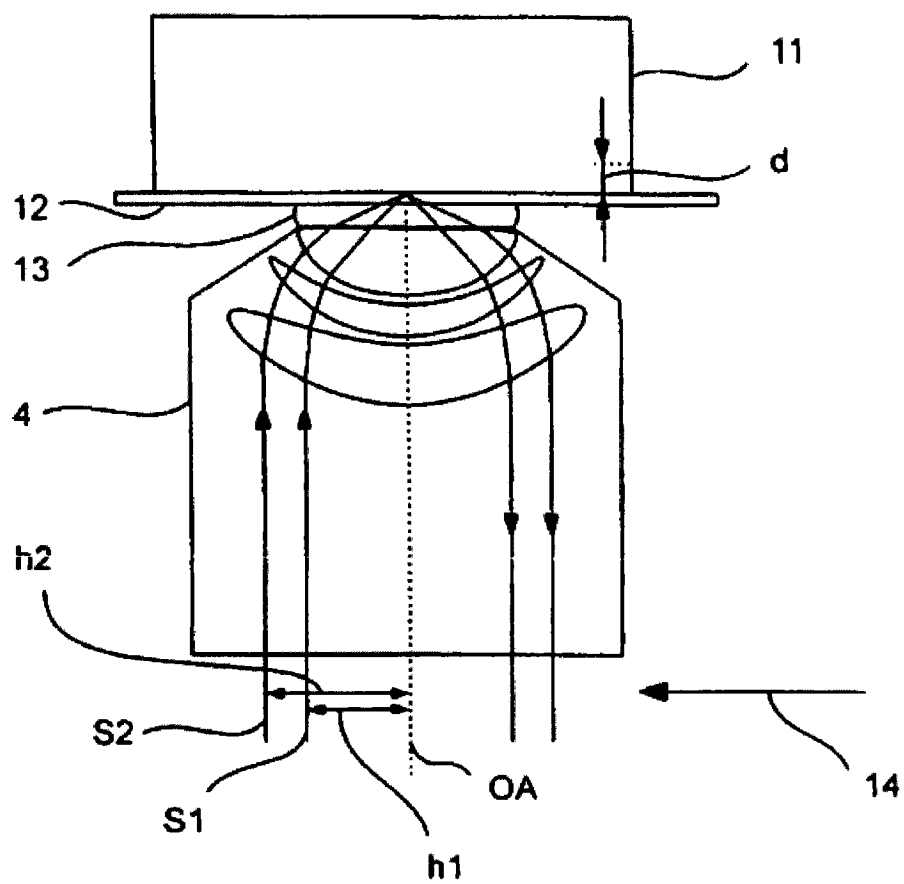


图 2

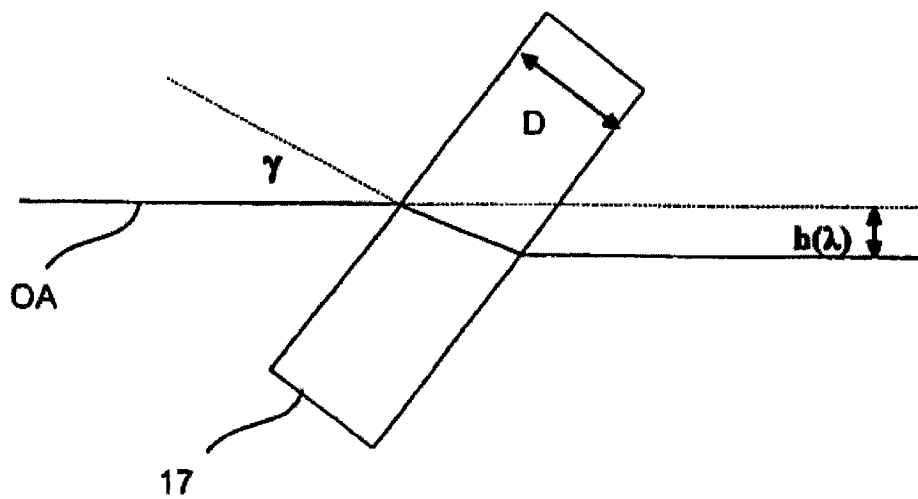


图 3

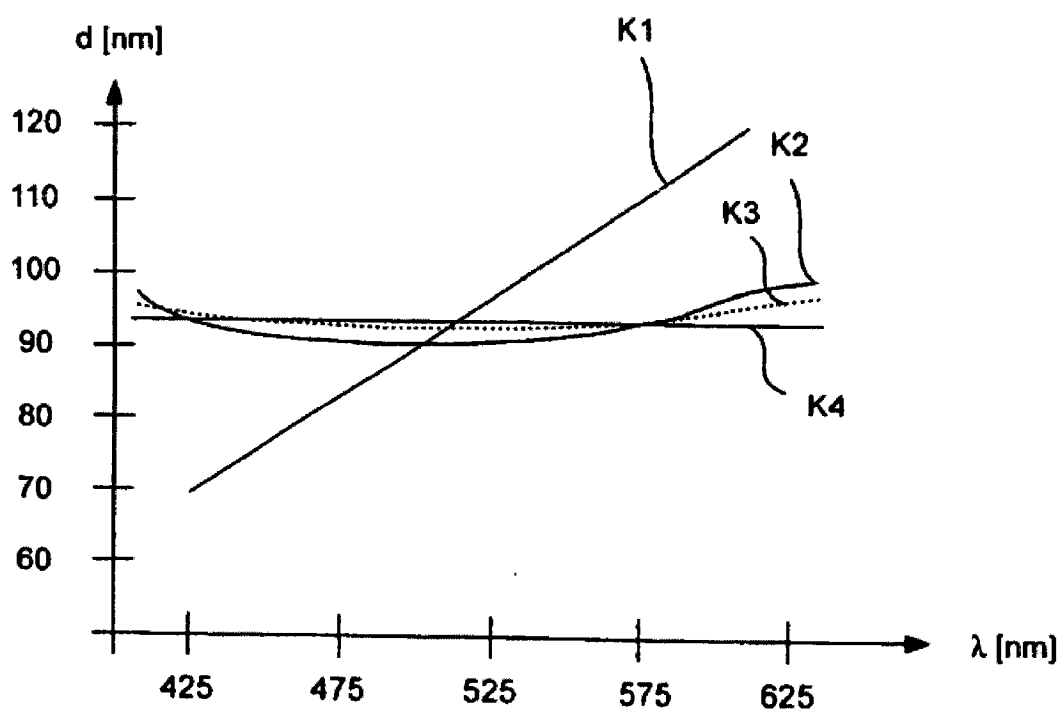


图 4

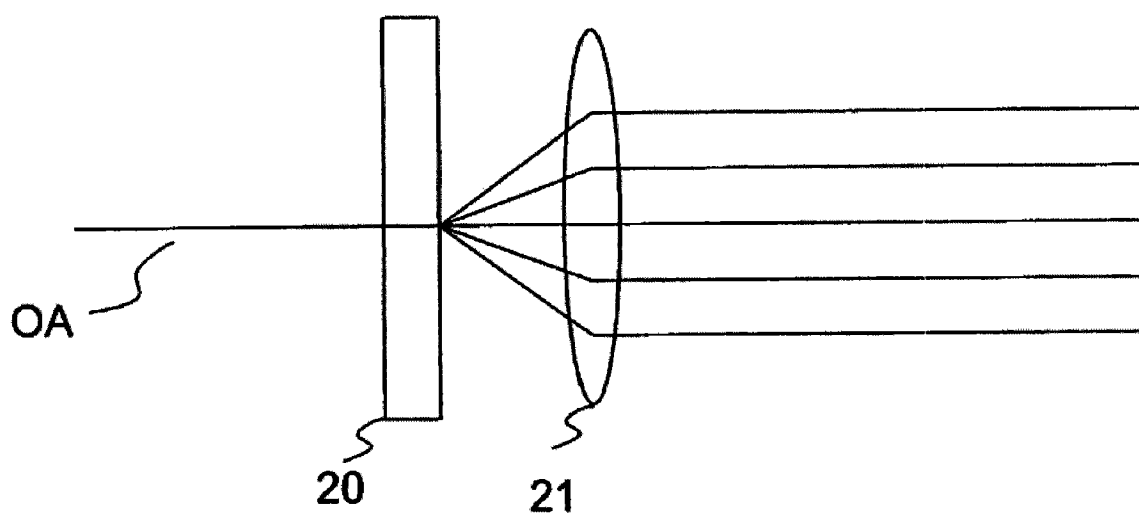


图 5

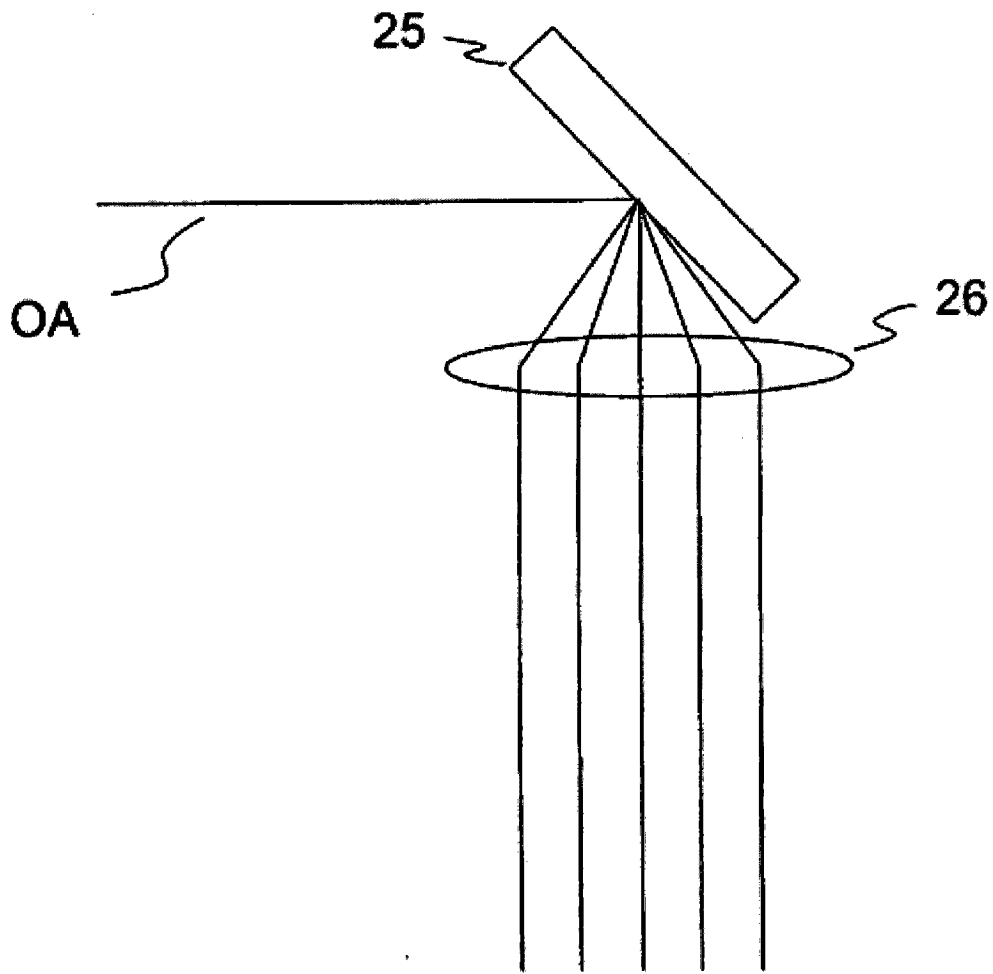


图 6