

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102004307 B

(45) 授权公告日 2012. 06. 27

(21) 申请号 201010513282. 7

(22) 申请日 2010. 10. 20

(73) 专利权人 中国科学院西安光学精密机械研究所

地址 710119 陕西省西安市高新区新型工业园信息大道 17 号

(72) 发明人 雷铭 姚保利 严绍辉 叶彤

(74) 专利代理机构 西安智邦专利商标代理有限公司 61211

代理人 王少文

(51) Int. Cl.

G02B 21/18 (2006. 01)

G02B 21/36 (2006. 01)

G02B 17/06 (2006. 01)

G02B 23/02 (2006. 01)

G01N 21/64 (2006. 01)

(56) 对比文件

JP 2002202459 A, 2002. 07. 19,

CN 101216601 A, 2008. 07. 09,

CN 101403823 A, 2009. 04. 08,

CN 101387759 A, 2009. 03. 18,

审查员 李明卓

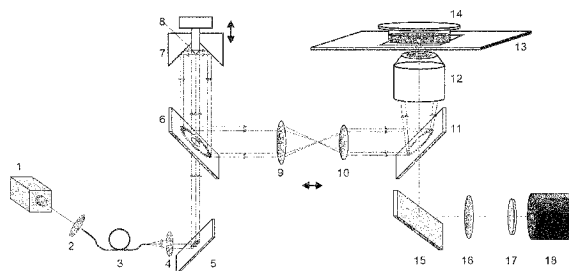
权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 3 页

(54) 发明名称

使用同心双锥面镜实现全内反射荧光显微的系统与方法

(57) 摘要

本发明涉及使用同心双锥面镜实现全内反射荧光显微的系统与方法,包括平行光发生装置以及依次设置在光路上的环形光束产生装置、荧光激发装置以及成像装置,平行光发生装置产生平行光,环形光束产生装置设置在平行光的光路上;环形光束产生装置包括与平行光入射方向成 45 度放置的中空反射镜、与平行光同轴设置的凹面锥镜、设置在凹面锥镜中心的凸面锥镜;本发明解决了现有的物镜型全内反射荧光显微方法透过率低的问题,具有光能利用率高接近 100% 的优点,并且可以方便地实现全内反射荧光显微与普通宽场荧光显微的切换。本发明完全可对单个细胞,甚至单个细胞器进行成像,满足大多数活体生物实验的要求。



1. 一种使用同心双锥面镜实现全内反射荧光显微的系统,包括平行光发生装置以及依次设置在光路上的环形光束产生装置、荧光激发装置以及成像装置,

所述平行光发生装置产生平行光,所述环形光束产生装置设置在平行光的光路上;

所述荧光激发装置包括设置在环形光束产生装置光路上的双色镜(11)、设置在双色镜(11)反射光路上的显微物镜(12)以及设置在显微物镜上方的载物台(13);

所述成像装置包括第二反射镜(15)、依次设置在第二反射镜(15)反射光路上的筒镜(16)、滤光片(17)以及 CCD 相机(18);所述第二反射镜(15)设置在载物台(13)的正下方;

其特征在于:所述环形光束产生装置包括与平行光入射方向成 45 度放置的中空反射镜(6)、与平行光同轴设置的凹面锥镜(7)、设置在凹面锥镜中心的凸面锥镜(8);所述凸面锥镜 8 的轴线正对中空反射镜(6)的中心;

所述双色镜(11)设置在中空反射镜(6)的环形光束的反射光路上并与反射光方向成 45 度角,

使凸面锥镜(8)沿着凹面锥镜(7)的轴线方向往返移动,调节环形光束在载物台与被测样品界面处的汇聚角,当环形光束在载物台与被测样品界面处的汇聚角小于临界角时为宽场荧光显微;当环形光束在载物台与被测样品界面处的汇聚角大于等于临界角时,则为全内反射荧光显微。

2. 根据权利要求 1 所述的使用同心双锥面镜实现全内反射荧光显微的系统,其特征在于:所述环形光束产生装置还包括望远镜系统,所述望远镜系统包括设置在中空反射镜(6)和双色镜(11)之间的第二透镜(9)和第三透镜(10)。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的使用同心双锥面镜实现全内反射荧光显微的系统,其特征在于:所述平行光发生装置包括激光器(1)、光纤耦合器(2)、多模光纤(3)、第一透镜(4)、以及设置在第一透镜(4)后的第一反射镜(5),所述中空反射镜(6)设置在第一反射镜(5)的反射光路上。

4. 一种使用同心双锥面镜实现全内反射荧光显微的方法,其特征在于:包括以下步骤:

1】产生平行光束;

2】产生环形光束:

将平行光穿过 45 度设置的中空反射镜(6),垂直入射到凸面锥镜(8)上,再被凸面锥镜(8)反射到凸面锥镜(8)外圆周侧的凹面锥镜(7)上,再被凹面锥镜 7 反射至中空反射镜(6),再被中空反射镜(6)反射形成环形光束;

3】环形光束经荧光激发装置后对样品进行荧光激发;

使凸面锥镜(8)沿着凹面锥镜(7)的轴线方向往返移动,调节环形光束在载物台与被测样品界面处的汇聚角,当环形光束在载物台与被测样品界面处的汇聚角小于临界角时为宽场荧光显微;当环形光束在载物台与被测样品界面处的汇聚角大于等于临界角时,则为全内反射荧光显微;

4】将激发出的荧光信号成像。

5. 根据权利要求 4 所述的使用同心双锥面镜实现全内反射荧光显微的方法,其特征在于:

所述步骤 3】还包括全内反射荧光显微与宽场荧光显微的切换。

6. 根据权利要求 4 或 5 所述的使用同心双锥面镜实现全内反射荧光显微的方法,其特征在于:所述步骤 2】还包括环形光束发散角的调节:

环形光束经过由第二透镜 (9) 和第三透镜 (10) 组成的望远镜系统后入射双色镜。

7. 根据权利要求 6 所述的使用同心双锥面镜实现全内反射荧光显微的方法,其特征在于:所述步骤 4】还包括图像清晰度的调节:

调节 CCD 相机 (18) 的增益系数、CCD 制冷温度以及曝光时间,得到清晰的显微图像。

8. 根据权利要求 7 所述的使用同心双锥面镜实现全内反射荧光显微的方法,其特征在于:所述步骤 3】的具体步骤如下:环形光束经过双色镜入射显微物镜,通过显微物镜汇聚至载物台,通过在载物台和被测样品的界面处产生的消逝波照射被测样品;在消逝波的激发下被测样品发出荧光信号经显微物镜收集后,再穿过双色镜 (11) 入射至第二反射镜 (15)。

9. 根据权利要求 8 所述的使用同心双锥面镜实现全内反射荧光显微的方法,其特征在于:所述步骤 4】的具体步骤如下:

入射至第二反射镜 (15) 的荧光信号经过筒镜 (16) 和滤光片 (17) 进入 CCD 相机 (18) 成像。

使用同心双锥面镜实现全内反射荧光显微的系统与方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种使用同心双锥面镜实现全内反射荧光显微的系统及方法,可广泛适用于生物学、医学,生物物理以及材料化学等领域的研究。

背景技术

[0002] 荧光探针是指在吸收特定波长的光后,可以把吸收光转换为不同波长的光发射出来的一类物质的统称。使用不同的荧光探针可以标记样品内部不同的位置,从而可以用来探测样品的微观结构,还可以实时观察荧光标记的基因及细胞在活体动物体内的活动及反应。荧光显微技术已经成为化学和生物样品成像的有力工具。

[0003] 困扰荧光显微技术的一个主要问题是样品离焦部分的荧光信号带来的背景干扰。如何消除背景噪声,提高显微图像的信噪比和分辨率是荧光显微技术领域的研究热点。激光共聚焦荧光显微术和全内反射荧光显微术是目前最常用的两种技术方案。

[0004] 激光共聚焦荧光显微利用高度聚焦的激光束对样品逐点扫描成像,荧光信号经过探测针孔滤波后被光电倍增管探测收集,通过计算机软件可以重新组合生成一个三维图像。激光共聚焦荧光显微具有三维成像能力而且还具有很好的空间分辨率,但是由于它采用点扫描成像方式,所以它的成像速度并不快而且也容易对样品产生光损伤。

[0005] 全内反射(又称全反射)是指当光线从光密介质进入到光疏介质,入射角大于临界角时,因为没有折射而都是反射,故称之为全内反射。从几何光学的角度来看,当发生全反射时,光线会在玻璃界面上完全反射而不进入液体溶液中。实际上,由于波动效应,有一部分光的能量会穿过界面渗透到溶液中,这部分光场就是所谓的消逝波。消逝波平行于界面传播,垂直于界面强度指数衰减。消逝场强度 E_z 可表示为:

$$[0006] \quad E_z = E_0 e^{-z/d_p}。$$

[0007] 其中 $d_p = \frac{\lambda}{4\pi} (n_1^2 \sin^2 \theta - n_2^2)^{-1/2}$ 定义为消逝场的穿透深度。

[0008] E_0 是界面处的电场强度, λ 是真空中光波长, n_1 是光密媒质的折射率, n_2 是光疏媒质的折射率。

[0009] 消逝场的穿透深度非常小,通常只有 200nm 左右。

[0010] 细胞内的很多重要的生命活动过程均存在于细胞表面。全内反射荧光显微利用全内反射产生的消逝波激发样品,激发区域被限定在样品表面的一薄层范围内(200nm),不受来自样品内深层区域信号的干扰,因此具有极高的信噪比和对比度,近年来已被生物物理学家们广泛应用于单分子的荧光成像中。另外,全内反射荧光显微成像法不再采用扫描成像而使用 CCD 相机,在一个时间点获得一幅完整的二维图像,大大提高了成像速度,减少了样品光损伤,从而成为研究细胞表面科学如生物化学动力学、单分子动力学的最有前途的光学成像技术。

[0011] 全内反射荧光显微成像根据其成像系统的不同可分为棱镜型和物镜型两种。棱镜型系统在实现上比较简单,也不容易受到入射光信号的干扰,激光经棱镜耦合照射在样品

与载玻片的界面处（棱镜与载玻片之间配以折射率匹配的浸没油），精确调整入射角使发生全反射，荧光信号由样品的另一面进入显微物镜并被 CCD 探测。棱镜型系统的缺点是样品的位置受到棱镜的限制，并且激发出的荧光要通过整个样品才能被探测到，降低了对比度。

[0012] 物镜型系统中样品的放置则非常方便，显微镜的物镜既作为收集样品荧光信号的接收器，同时又作为发生全内反射的光学器件。且可与多种其它技术相结合，例如激光微加工，光镊技术等，因此展现出更加诱人的应用前景。由于细胞的典型折射率约为 1.35，根据 snell 定律，要想实现全内反射，显微物镜的数值孔径 NA 必须大于 1.35，因此当我们使用为 $NA = 1.4$ 的物镜时，只有很小的一部分物镜孔径范围 ($1.4 - 1.35 = 0.05$) 可以被利用。在实验中，为了保证均匀的照明，激光束通常被调制成为很细的光环进入显微物镜后瞳。如图 1 所示，通常使用一个圆形挡光板挡住平行光束的中间部分，显然，挡光板挡住了大部分照明光，所以整个系统的透过率很低（小于 5%），导致照明亮度不够。

[0013] 针对现有物镜型全内反射荧光显微技术透过率低的缺点，本发明提出一种使用同心双锥面镜实现全内反射荧光显微的技术与装置。该装置具有光能利用率高（接近 100%）的优点，并且可以方便的实现全内反射荧光显微与普通宽场荧光显微的切换。

发明内容

[0014] 为了解决现有的物镜型全内反射荧光显微方法透过率低的问题，本发明提供一种使用同心双锥面镜实现全内反射荧光显微的系统及方法。

[0015] 本发明的技术解决方案为：

[0016] 一种使用同心双锥面镜实现全内反射荧光显微的系统，包括平行光发生装置以及依次设置在光路上的环形光束产生装置、荧光激发装置以及成像装置，

[0017] 所述平行光发生装置产生平行光，所述环形光束产生装置设置在平行光的光路上：

[0018] 所述荧光激发装置包括设置在环形光束产生装置光路上的双色镜 11、设置在双色镜 11 反射光路上的显微物镜 12 以及设置在显微物镜上方的载物台 13；

[0019] 所述成像装置包括第二反射镜 15、依次设置在第二反射镜 15 反射光路上的筒镜 16、滤光片 17 以及 CCD 相机 18；所述第二反射镜 15 设置在载物台 13 的正下方；

[0020] 其特殊之处在于：所述环形光束产生装置包括与平行光入射方向成 45 度放置的中空反射镜 6、与平行光同轴设置的凹面锥镜 7、设置在凹面锥镜中心的凸面锥镜 8；所述凸面锥镜 8 的轴线正对中空反射镜 6 的中心；

[0021] 所述双色镜 11 设置在中空反射镜 6 的环形光束的反射光路上并与反射光方向成 45 度角。

[0022] 上述环形光束产生装置还包括望远镜系统，所述望远镜系统包括设置在中空反射镜 6 和双色镜 11 之间的第二透镜 9 和第三透镜 10。

[0023] 上述平行光发生装置包括激光器 1、光纤耦合器 2、多模光纤 3、第一透镜 4、以及设置在第一透镜 4 后的第一反射镜 5，所述中空反射镜 6 设置在第一反射镜 5 的反射光路上。

[0024] 一种使用同心双锥面镜实现全内反射荧光显微的方法，其特殊之处在于：包括以下步骤：

[0025] 1】产生平行光束；

[0026] 2】产生环形光束；

[0027] 将平行光穿过 45 度设置的中空反射镜 6, 垂直入射到凸面锥镜 8 上, 再被凸面锥镜 8 反射到凸面锥镜 8 外圆周侧的凹面锥镜 7 上, 再被凹面锥镜 7 反射至中空反射镜 6, 再被中空反射镜 6 反射形成环形光束；

[0028] 3】环形光束经荧光激发装置后对样品进行荧光激发；

[0029] 4】将激发出的荧光信号成像。

[0030] 上述步骤 3】还包括全内反射荧光显微与宽场荧光显微的切换；

[0031] 使凸面锥镜 8 沿着凹面锥镜 7 的轴线方向往返移动, 调节环形光束在载物台与被测样品界面处的汇聚角, 当环形光束在载物台与被测样品界面处的汇聚角小于临界角时为宽场荧光显微；当环形光束在载物台与被测样品界面处的汇聚角大于等于临界角时, 则为全内反射荧光显微。

[0032] 上述步骤 2】还包括环形光束发散角的调节；

[0033] 环形光束经过由第二透镜 9 和第三透镜 10 组成的望远镜系统后入射双色镜。

[0034] 上述步骤 4】还包括图像清晰度的调节；

[0035] 调节 CCD 相机 18 的增益系数、CCD 制冷温度以及曝光时间, 得到清晰的显微图像。

[0036] 上述步骤 3】的具体步骤如下：环形光束经过双色镜入射显微物镜, 通过显微物镜汇聚至载物台, 通过在载物台和被测样品的界面处产生的消逝波照射被测样品；在消逝波的激发下被测样品发出荧光信号经显微物镜收集后, 再穿过双色镜 11 入射至第二反射镜 15。

[0037] 上述步骤 4】的具体步骤如下：

[0038] 入射至第二反射镜 15 的荧光信号经过筒镜 16 和滤光片 17 进入 CCD 相机 18 成像。

[0039] 本发明具有的优点：

[0040] 1、本发明使用同心双锥面镜产生环形光束并用于全内反射荧光显微, 与普通的全内反射荧光显微技术相比, 本发明光能几乎为零浪费, 光能利用率高 (接近 100%), 因而适用于微型的低功率半导体激光器作为照明光源, 便于全内反射荧光显微系统的集成。

[0041] 2、本发明通过沿轴向移动凸面锥镜与凹面锥镜内的相对位置, 改变平行光场场的占空比, 也就是改变环形光束在载物台与被测样品界面处的汇聚角, 从而可以方便地实现全内反射荧光显微与宽场荧光显微的切换。全内反射荧光显微只能观察到界面处非常薄的一层样品发出的荧光, 信噪比非常高；而宽场显微虽然信噪比较低, 但是它可以深入到样品内部观察, 比较方便。通常在进行全内反射荧光显微实验的同时, 都需要进行同一位置宽场显微图像的对比。如图 4 和图 5 所示。

[0042] 3、本发明所使用的激光功率密度很低, 对生物组织的破坏以及激光漂白效应非常小。首先, 与点扫描的激光共聚焦技术相比, 全内反射荧光显微是一种宽场显微技术, 宽场显微技术本身就具有弱的光漂白以及光损伤效应；另外, 本发明使用同心双锥面镜产生环形光束, 透过率接近 100%, 因此可以使用低功率的激光器, 进一步减小了光损伤的可能性。

附图说明

[0043] 图 1 是现有的使用挡光板产生环形光束的结构示意图；

[0044] 图 2 是本发明使用同心双锥面镜产生环形光束示意图；

[0045] 图 3 是本发明使用同心双锥面镜实现全内反射荧光显微的系统光路图；

[0046] 图 4 是直径 $1\ \mu\text{m}$ 荧光小球的宽场荧光显微与全内反射荧光显微的成像实验结果比较,其中 a 为宽场荧光显微图像,b 为全内反射荧光显微图像；

[0047] 图 5 是铃兰切片的宽场荧光显微与全内反射荧光显微的成像实验结果比较,其中 a 为宽场荧光显微图像,b 为全内反射荧光显微图像；

[0048] 附图标记为:1- 激光器,2- 光纤耦合器,3- 多模光纤,4- 第一透镜,5- 第一反射镜,6- 中空反射镜,7- 凹面锥镜,8- 凸面锥镜,9- 第二透镜,10- 第三透镜,11- 双色镜,12- 显微物镜,13- 载物台,14- 样品,15- 第二反射镜,16- 筒镜,17- 滤光片,18- CCD 相机。

具体实施方式

[0049] 如图 2 所示,本发明使用两个顶角 90° 的锥面反射镜(一个凸面镜 8,一个凹面镜 7)同心放置,凹面锥镜 7 中心有孔,凸面锥镜 8 可在凹面锥镜 7 中心孔内轴向移动。平行光束穿过一个与入射光方向成 45° 放置的中空反射镜 6 后,正入射凸面锥镜 8,光线经凸面锥 8 反射 90° 后,再由凹面锥 7 反射 90° ,最后再经由中空反射镜 6 反射 90° 后,可以产生一个平行的环形光束。移动凸面锥镜 8 与凹面锥镜 7 的相对位置可以改变环形光束的占空比。与图 1 的使用圆型挡光板产生空心光环的方法相比,本发明的技术方案显然具有非常高的光能利用率,而且可以很容易的改变光环的占空比。

[0050] 使用同心双锥面镜实现全内反射荧光显微的系统光路如图 3 所示。激光器 1 发出的光束通过光纤耦合器 2 耦合进入多模光纤 3。再通过多模光纤 3 去除空间相干性后,由第一透镜 4 准直为平行光束。调节第一反射镜 5 使平行光束穿过中空反射镜 6 后正入射凸面锥 8,光线经凸面锥镜 8 反射 90° 后,再由凹面锥镜 7 反射 90° ,最后再经由中空反射镜 6 反射 90° 后,可以产生一个平行的环形光束。移动凸面锥镜 8 与凹面锥镜 7 的相对位置可以改变环形光束的占空比。第二透镜 9 和第三透镜 10 组成的望远镜系统用来调整光环光场的发散角,从而可以调整作用在样品上消逝场的面积。环形光束由双色镜 11 反射进入显微物镜 12,由显微物镜 12 汇聚在载玻片的界面处产生消逝波。微调载物台 13 使得样品 14 位于消逝场中。消逝波激发出的荧光信号经显微物镜 12 收集后,再穿过双色镜 11,经第二反射镜 15 改变方向,最后经过筒镜 16 和滤光片 17 进入 CCD 相机 18。控制 CCD 相机 18 的增益系数、CCD 制冷温度以及曝光时间,从而得到清晰的全内反射荧光显微图像。平移凸面锥镜 8 改变凸面锥镜 8 与凹面锥镜 7 内的相对位置,可以改变平行光环光场的占空比,当环形光束在载玻片与溶液界面处的汇聚角小于临界角时,全反射条件将被破坏,一部分折射光线将会进入溶液及样品内部,从而可以实现全内反射荧光显微与宽场荧光显微的切换。

[0051] 实施例 1:图 4 是本发明装置对直径 $1\ \mu\text{m}$ 荧光小球进行宽场荧光显微与全内反射荧光显微的成像实验比较。标尺 $10\ \mu\text{m}$,实验中显微物镜为 63X, $\text{NA} = 1.4$ 显微物镜,激光器选用倍频 YAG 激光器,波长 532nm 。实验时调节凸面锥镜 8 在凹面锥镜 7 内的相对位置,可以实现全内反射荧光显微与宽场荧光显微的切换。图 4(a) 是宽场荧光显微图像,可以看到离焦位置的荧光小球带来的背景噪声。图 4(b) 是全内反射荧光显微图像,只能看到焦平面处的荧光小球,而且对比度很高。

[0052] 实施例 2:图 5 是本发明装置对铃兰切片进行宽场荧光显微与全内反射荧光显微

的成像实验比较。标尺 $10\ \mu\text{m}$, 实验中显微物镜为 100X, $\text{NA} = 1.45$ 显微物镜, 激光器选用倍频 YAG 激光器, 波长 532nm 。实验时调节凸面锥镜 8 在凹面锥镜 7 内的相对位置, 可以实现全内反射荧光显微与宽场荧光显微的切换。图 4(a) 是宽场荧光显微图像, 可以看到离焦位置的样品自发荧光。图 4(b) 是全内反射荧光显微图像, 只能看到界面处的荧光信号, 图像对比度很高。

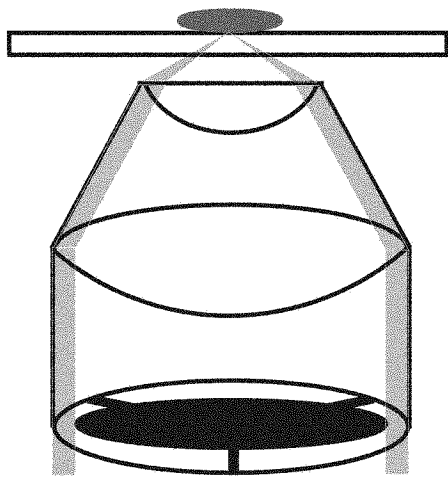


图 1

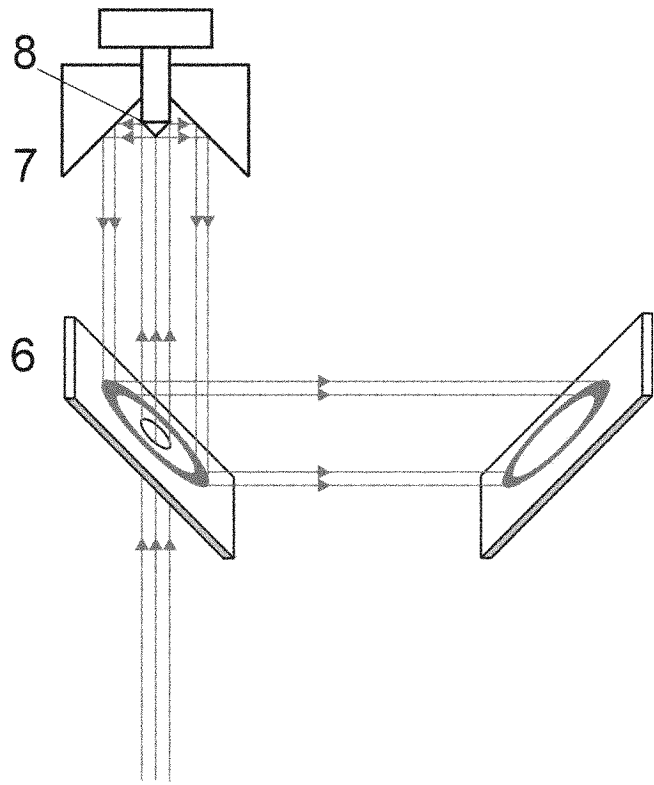


图 2

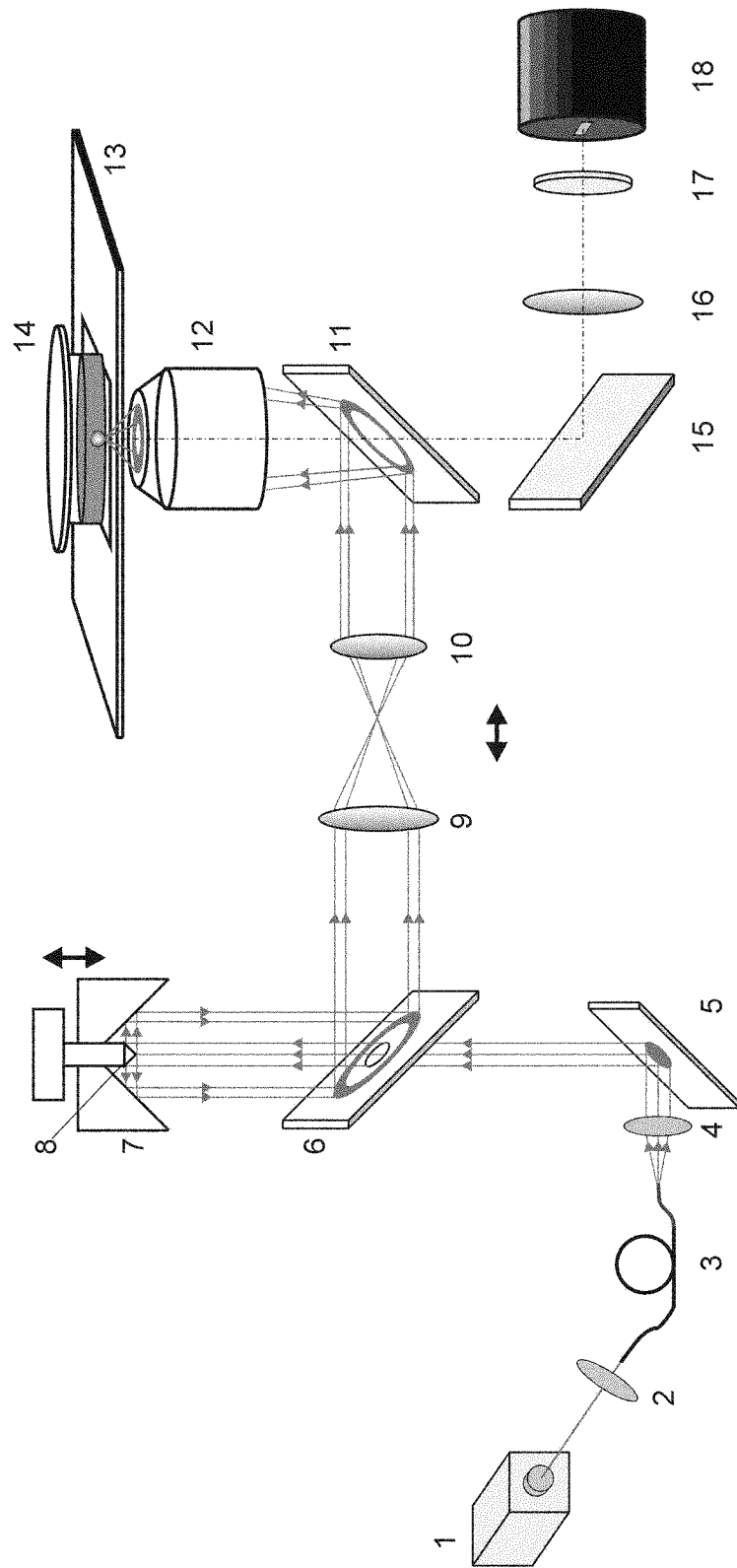


图 3

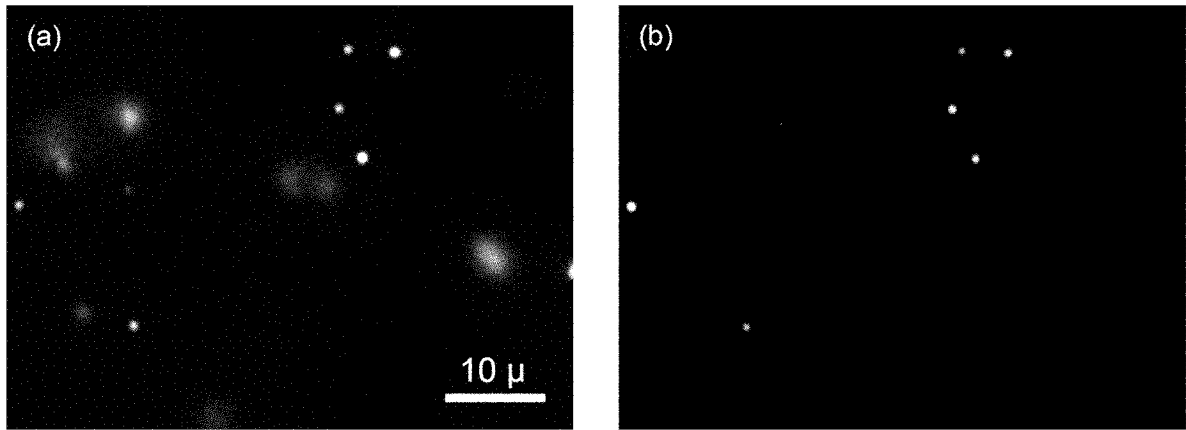


图 4

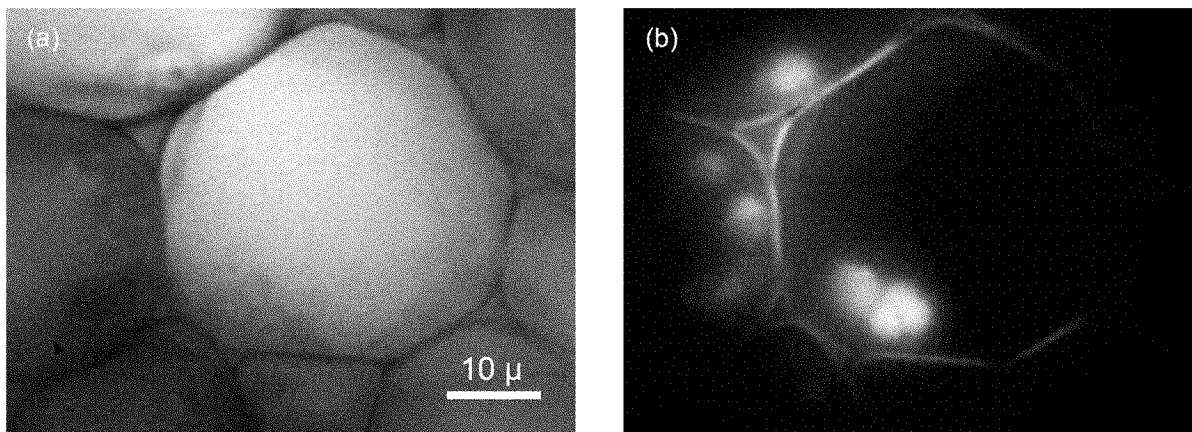


图 5