

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 21/25 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710056049.9

[43] 公开日 2008 年 1 月 30 日

[11] 公开号 CN 101113949A

[22] 申请日 2007.9.7

[21] 申请号 200710056049.9

[71] 申请人 中国科学院长春光学精密机械与物理研究所

地址 130033 吉林省长春市东南湖大路 16 号

[72] 发明人 郑著宏

[74] 专利代理机构 长春菁华专利商标代理事务所
代理人 赵炳仁

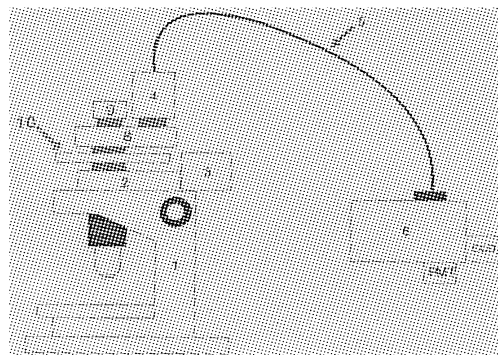
权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 3 页

[54] 发明名称

微区光谱测量系统

[57] 摘要

本发明微区光谱测量系统，属于光学领域中微区显微光谱与显微图像测量系统。该系统是在显微镜上建立针孔单元和显微镜光学耦合聚焦系统制造共聚焦光学显微系统，由这样的显微系统与光谱测量系统构建的微区共聚焦显微光谱与显微图像测量系统，包括显微物镜，汞灯和氙灯的反射激发光路，显微镜光学耦合聚焦系统，光纤，光接收器，三目通光口，成像 CCD 或数码相机，针孔单元，分为四种类型，在捕获微区共聚焦显微图像的同时，可实现与共聚焦显微图像相对应的荧光光谱或吸收及反射光谱。这套检测系统适合于光生物学、临床医学和纳米材料等领域的应用。



1、一种微区光谱测量系统，其特征在于包括显微镜光学接口和坐落在其上的显微物镜托架及显微物镜（1）、汞灯或氙灯的反射激发光路（2）、汞灯或氙灯（3）、显微镜光学耦合聚焦系统（4）、光纤（5）、光接收器（6）、三目通光口（7）、光学通光接口单元（8）、成像 CCD 或数码相机（9）、针孔单元（10）；分为四种连接方式：

第一种是在三目落射式显微镜的三目通光出口上安装的显微镜光学耦合聚焦系统与光谱仪相连所构成的微区光谱测量系统；

第二种是在倒置式显微镜的三目通光出口上安装的显微镜光学耦合聚焦系统与光谱仪相连所构成的微区光谱测量系统；

第三种是在三目落射式光学显微镜的三目通光口上建立光学通光接口单元与光谱仪相连所构成的微区光谱检测系统；

第四种是在三目落射式光学显微镜的三目通光出口上加装针孔单元，在此单元之上建立显微镜光学耦合聚焦系统与光谱仪相连所构成的微区光谱测量系统。

2、根据权力要求 1 所述的一种微区光谱测量系统，其特征在于：显微镜光学耦合聚焦系统（4）其光纤的一端嵌入多维精密光学调整架，另一端与光接收器（6）相连。

3、根据权力要求 1 和 2 所述的一种微区光谱测量系统，其特征在于光接收器（6）可以是光谱仪、单色仪 或光电倍增管。

4、根据权力要求 1 所述的一种微区光谱测量系统，其特征在于

与显微镜相连接的显微镜光学耦合聚焦系统（4）不仅适用于落射式光学显微镜的通光出口，而且同样适用于倒置式显微镜的通光出口。

5、根据权力要求 1 所述的一种微区光谱测量系统，其特征在于在三目通光出口（7）上加装针孔单元（10），针孔单元中的针孔包括两种类型：第一种是由不同尺径的固定针孔组组成的针孔滑板，第二种是为了获取大视场的全裸孔。

6、根据权力要求 1 所述的一种微区光谱测量系统，其特征在于共聚焦系统使用的光源可以是非激光光源汞灯或氙灯。

微区光谱测量系统

技术领域

本发明微区光谱检测系统,涉及由显微镜和显微镜光学耦合聚焦系统与光谱仪系统所构成的微区显微光谱测量技术,属于微区光谱测量技术领域。

背景技术

微区光谱检测技术是近年来随着纳米材料科学,如低维结构半导体量子点、量子线、量子阱以及纳米管、纳米带、纳米微晶尤其是量子点标记的生物学光子学荧光探针和传感器的发展而发展起来的一种研究和检测纳米光物性和生物学光子学的强有力的仪器手段。但是由于涉及到较复杂的光学系统,所以有关这方面的检测及研究大多由国外的大学或研究机构的大型实验室根据其自身研究的需要,利用自己实验室的激光系统、光谱测试系统和显微物镜及检测设备搭建起来的机构庞杂的微区光谱检测系统。这种自己搭建的系统既需要大型的仪器设备,同时也需要专门的光物理及相关光学技术的支持,而且其致命的弱点是设备不规范、价格昂贵,且无法实现商品化的检测仪器。目前,随着纳米材料在光电子领域、生物光子学和临床医学等方面的快速发展,有必要在这些领域推出操作简单、灵活适用的微区显微光谱检测系统,不需要专门的光学技术就可以开展相关领域的测

试及研究。

现在,大多数实验室和相关的科研机构开展光谱检测采用的往往还是传统的宏观尺度样品的光谱测量。它虽然能为我们提供物理、化学、医学和生物学方面有关材料、器官组织和细胞生物学等方面的光物理和光生物学等方面的信息,但是由于检测样品的宏观尺度,所以只能提供待测样品的大范围的整体特性。因此,我们很难了解和分辨在局部微小的空间区域的行为、物性及其差异。随着纳米材料科学、医用生物光子学和半导体低维结构材料与器件及其相关领域不断深入的发展,微区光谱测量系统成为检测和研究这些新兴领域必不可少的手段。

发明内容

本发明的目的是为了使微区光谱检测系统实现商品化、简单化、一体化、灵活化,价格便宜,不需要昂贵的的大型实验室设备即可实现微区显微光谱或光谱与显微图像相对应的检测系统,使该项技术走出专门化实验室,勿需专业技术人员即可对临床医学、光生物学、纳米材料科学以及半导体器件等领域的相关微区显微图像和光谱特性进行实时在线检测。

本发明的技术方案是由显微镜与显微镜光学耦合聚焦系统和光谱仪系统结合在一起所形成的微区光谱测量系统。其中包括显微镜光学接口和坐落在其上的显微物镜托架和显微物镜,汞灯或氙灯的反射激发光路, 汞灯或氙灯的 显微镜光学耦合聚焦系统, 光纤, 光谱仪、单色仪 或光电倍增管, 三目通光口, 成像 CCD 或数码相机,

针孔单元；分为四种连接方式：

第一种类型是在三目落射式显微镜或倒置式显微镜的三目通光出口上安装的显微镜光学耦合聚焦系统与光谱仪相连所构成的微区光谱测量系统。显微镜光学耦合聚焦系统包括显微镜光学接口和坐落在其上的显微物镜托架、显微物镜、多维精密光学调整架支撑体和多维精密光学调整架及光纤，，光纤的一端嵌入多维精密光学调整架，另一端与光谱仪相连即构成显微镜与光谱仪相连接实施微区光谱检测所必需的显微镜光学耦合聚焦系统，其中光谱仪可配备 CCD 或光电倍增管。本发明的微区光谱测量系统中使用的三目落射式显微镜及倒置式显微镜均包括荧光显微镜。

第二种类型是在三目落射式显微镜或倒置式显微镜的三目通光出口上建立光学通光接口单元，并在此单元所增加的通光口上建立的上述显微镜光学耦合聚焦系统与光谱仪相连所构成的微区光谱测量系统。建立多端光学通光接口单元的目的在于可在其中增加的任意通光口上再连接 CCD 或数码相机以及电视摄像装置，实现光谱和与其对应图像的实时在线测量。

第三种类型是在三目落射式光学显微镜的三目通光口上建立光学通光接口单元的微区光谱检测系统。

第四种类型是在三目落射式荧光显微镜的三目通光口上建立针孔单元的微区光谱测量系统。

这样，通过调节针孔的大小，在观测光学图像的同时既能捕获感兴趣的微区共焦显微光学图像又能检测与此图像相对应的微区共焦

显微光谱,从而使本项发明广泛地应用于临床医学、生物光子学、纳米材料科学、半导体材料与器件的检测等领域。

本发明的一个主要应用是在临床医学检测与研究领域,比如对生物组织器官癌症诊断与研究。采用本发明的第一种类型的微区光谱测量系统,在光激发下将观测到微区局部癌变组织自发的特征荧光,由微区探测光谱仪的 CCD 或光电倍增管接收这样的荧光信号,可获得微区局部癌变组织所具有的特征荧光光谱,从而做出诊断结果。为了更好地分析诊断结果,可采用本发明的第二种类型的微区光谱测量系统,实现光谱和与其对应的荧光图像的实时在线测量。通过显微镜光学通光接口单元上的 CCD 或数码相机同时获取癌变组织的荧光图像,使荧光光谱与癌变组织的荧光图像相对应。采用本发明的第四种类型的激光共聚焦显微图像与共聚焦显微光谱系统,可进一步获得癌变组织任意一点上的自发癌变特征荧光图像和与其相对应的共焦荧光光谱,从而作出精准的定位。采用本发明的第三种类型的微区共焦光谱检测系统可获取包括荧光、发光、反射和透射图像在内的共焦图像与相应图像的共焦显微光谱。

由于本发明的第四种类型的激光共聚焦显微图像与共聚焦显微光谱系统采用共聚焦设计,其针孔单元针孔的尺径大小可依据所研究和检验的样品区域的大小随意改变,从而可捕获激光激发的荧光共聚焦图像结构以及与此图像相对应的微区显微光谱,而且提高了共焦显微图像和显微光谱二者的分辨率。本发明的第三种类型的微区共焦光谱检测系统除了所用光源非激光外,其功能与本发明的第四种类型的

激光共聚焦显微图像与共聚焦显微光谱系统类似。

尽管共聚焦图像结构可以用激光扫描共聚焦显微镜检测，但与本发明的激光共聚焦图像和光谱系统比较，其缺点也是显而易见的。其一，由于激光扫描共聚焦显微镜是通过逐点扫描的方式获取样品的荧光图像，因此，获取图像需要耗费较长的时间。对于一幅1024X1024分辨率的激光扫描图像，每秒钟只能获取1到3幅图像（参见Nicolas George, Bioscience Technology 11 • 2003），这对于光发射过程只有十分之一秒或更短时间的生物过程，激光扫描共聚焦显微镜则难以获取其图像。其二，由于生物发光一般都很弱，所以，难以用激光扫描共聚焦显微镜获取其图像。另外一个限制其使用的重要原因是激光扫描共聚焦显微镜价格昂贵（比如中国科技大学和第三军医大学各自购置的德国zeiss公司和Leica公司的激光扫描共聚焦显微镜的价格均在300万元人民币，详见

<http://202.38.65.108/ylb/yqsb/smkx/2005052701.htm> 和

<http://www.tmmu.com.cn/department/gyx/sys.htm#>），因而使大多研究和检测机构难以承受。为便于光物理、光生物学和临床医学等领域的检测与研究，我们发明的这套激光共聚焦显微图像与共聚焦显微光谱系统是采用针孔单元来实现共聚焦显微图像和共焦显微光谱，其中的针孔单元包括可连续调谐尺径的针孔单元和由不同尺径的针孔组成尺径不同的固定针孔单元。本发明的系统与激光扫描共聚焦显微镜相比较，具有操作简便、应用广泛，且没有激光扫描共聚焦显微镜的上述缺点，是一套价格便宜、性能优越的微区激光共聚焦显微图像与光谱

检测分析系统。

对于重量较轻、稳定性较差的显微镜，在构建针孔单元、激光激发单元、三孔目镜接口单元和光学耦合聚焦系统时，为维持整个显微系统的稳定性，可增加具有固定底板的支撑柱单元。

本发明的第二个主要应用方面是对纳米材料光物性的研究。它包括半导体量子点、量子线、量子阱、纳米管、纳米带和纳米粒子等低维结构体系光学过程与特性研究，从而得到单独结构或尺寸相近的纳米结构材料的光谱特性，由微区光谱特性提供有关纳米材料的生长质量、缺陷、界面特性和量子限制效应等光物理信息。虽然本发明的微区光谱系统是在微米尺度上的光谱检测，由于光学显微镜衍射极限的限制，我们难以直接观测到尺寸较小的纳米结构材料，但是通过我们设计的共聚焦光学系统，可以根据纳米结构的分布密度和尺寸的均匀性直接检测到单个量子点或尺寸相近的纳米结构材料的发光光谱。

本发明的第三个主要应用方面是在光生物学领域开展荧光染料、稀土配合物、FITC、CY 系列荧光团、绿色荧光蛋白、红外荧光上转换纳米材料和新一代量子点荧光标记物标记的抗体、抗原、病毒的荧光光谱检测，由荧光标记物的发光光谱直接获得生物体的医学和生物学相关信息。为细胞生物学、临床医学和药物学等领域的检测与研究提供必要的手段。此外，本发明的微区光谱测量系统还可广泛用于化学发光、半导体材料和器件结构的检验和光谱特性研究。

在本发明的落射式荧光显微镜微区显微光谱检测系统上除了可以开展荧光和发光光谱以及与光谱特性相对应的图像检测外，还可以

进行反射谱与其显微图像的检测。我们这里所说的荧光与发光的概念是有所差异的。荧光是指发光波长比激发光的波长长的斯托克发光，而发光则既包括斯托克发光也包括反斯托克发光。在本发明的倒置式微区光谱检测系统上除了具有荧光和发光光谱以及与其光谱特性相对应的显微图像检测功能外，还可以进行透射谱与其显微图像的检测。

为了便于开展微区显微光谱与显微图像检测，本发明的微区显微光谱与显微图像测量系统中的显微镜系统与光谱仪系统，也有显微镜系统和光谱仪系统分立式的微区显微光谱测量系统。后者，是通过显微镜光学耦合聚焦系统中光纤的长度实现的，从而使本发明的微区显微光谱测量系统在实验布局和排列上具有充分的灵活性。

附图说明

图 1 是本发明的微区光谱检测系统在三目落射式显微镜上的结构示意图。

图 2 是本发明的微区光谱检测系统在倒置式显微镜上的结构示意图。

图 3 是本发明的微区光谱检测系统在三目落射式光学显微镜的三目通光口上建立光学通光接口单元的微区光谱检测系统结构示意图。

图 4 是在三目落射式荧光显微镜的三目通光口上建立针孔单元的微区光谱测量系统。

图 5 是本发明的针孔单元上的针孔滑板示意图

其中显微物镜(1)、汞灯或氙灯的反射激发光路(2) 汞灯或氙灯(3) 显微镜光学耦合聚焦系统(4)、光纤(5)、光接收器(6)、三目通光口(7)、光学通光接口单元(8)、成像 CCD 或数码相机(9)、针孔单元(10);

具体实施方式

实施例 1:

如图 1 所示,来自汞灯或氙灯 3 的激发光,被置于激发光路 2 中的双色镜反射后,由物镜聚焦在置于载物台的样品上,激发样品,观察样品微区的发光,通过调整载物台的位置获取感兴趣的微区的发光。这部位的微区发光再由物镜收集、滤光片和三目通光出口 7 入射到显微镜光学耦合聚焦系统 4,该聚焦系统的光纤 5 将微区发光输入光接收器(6),光接收器(6)可以是光谱仪、CCD 或光电倍增管,微区光谱的获取均由计算机控制处理。

实施例 2:

如图 2 所示,来自汞灯的激发光激发置于倒置式显微镜载物台上的样品,基于与实施例 1 同样的原理,并由显微镜光学耦合聚焦系统 4 和光纤 5 将微区发光输入光接收器(6)即光谱仪,再由 CCD 探测器或光电倍增管 PMT 接收光信号。除此之外,由卤素灯照射样品产生的微区透射光谱的获取也由计算机控制处理。

实施例 3:

如图 3 所示,本实施例是在图 1 的基础上通过在三目通光出口上建立光学通光接口单元 8 来实现光谱和与其对应图像的实时在线测

量。光学通光接口单元的光路部分是由分束镜和全反射镜实现的。在光学通光接口上除了可以安装 CCD 或数码相机 9 捕获显微图像外，还可以安装如图 1 所示的显微镜光学耦合聚焦系统与光谱仪相连接构成微区显微图像和显微光谱测量系统。在获取图像的同时，还可以检测与显微图像相对应的显微光谱。

实施例 4:

如图 1 和图 2 所示，本实施例是在图 1 和图 2 的基础上通过在落射式光学显微镜与倒置式显微镜的三目通光出口上建立针孔单元 10 和多端光学通光接口单元并通过在多端光学通光接口单元上安装 CCD 或数码相机以及由显微镜光学耦合聚焦系统的光纤与光谱仪相连所构成的微区共聚焦显微图像和显微光谱测量系统。由本实施例构建的共聚焦系统使用的光源可以是汞灯或氙灯之类的非激光光源，通过可调谐针孔和如图 7 所示的固定针孔来获取感兴趣的共聚焦显微图像和显微光谱。

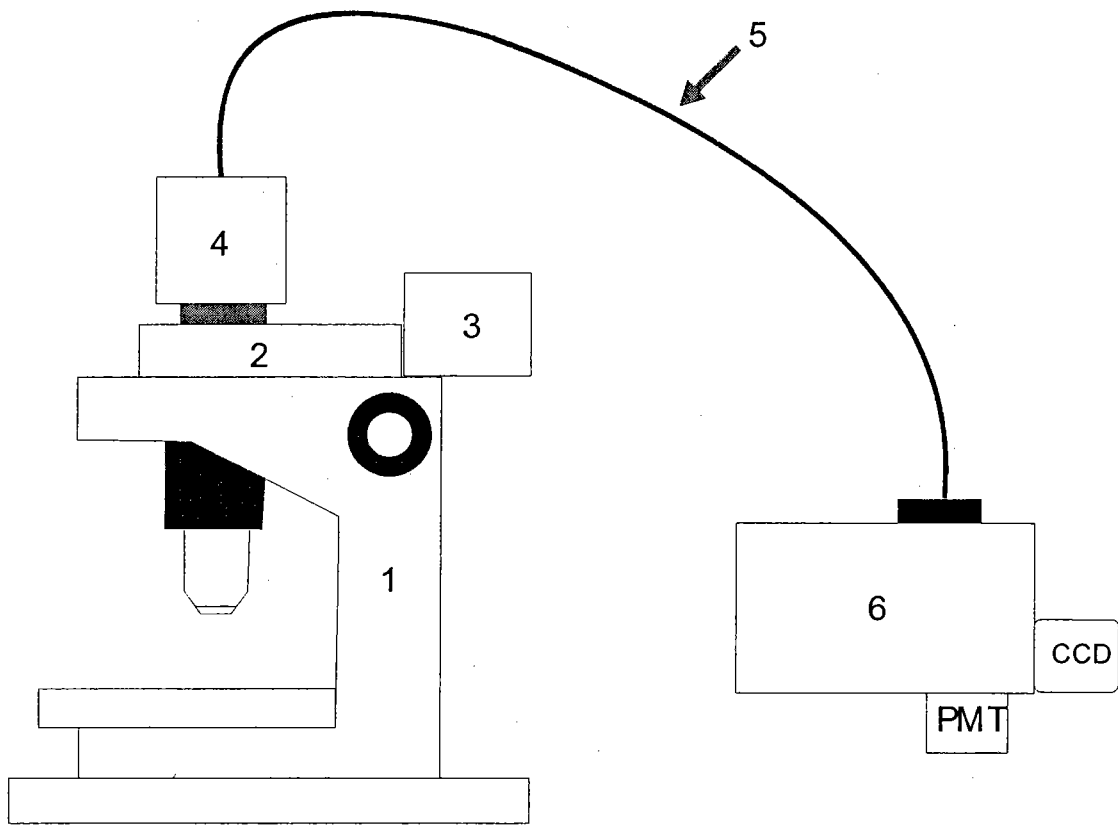


图 1

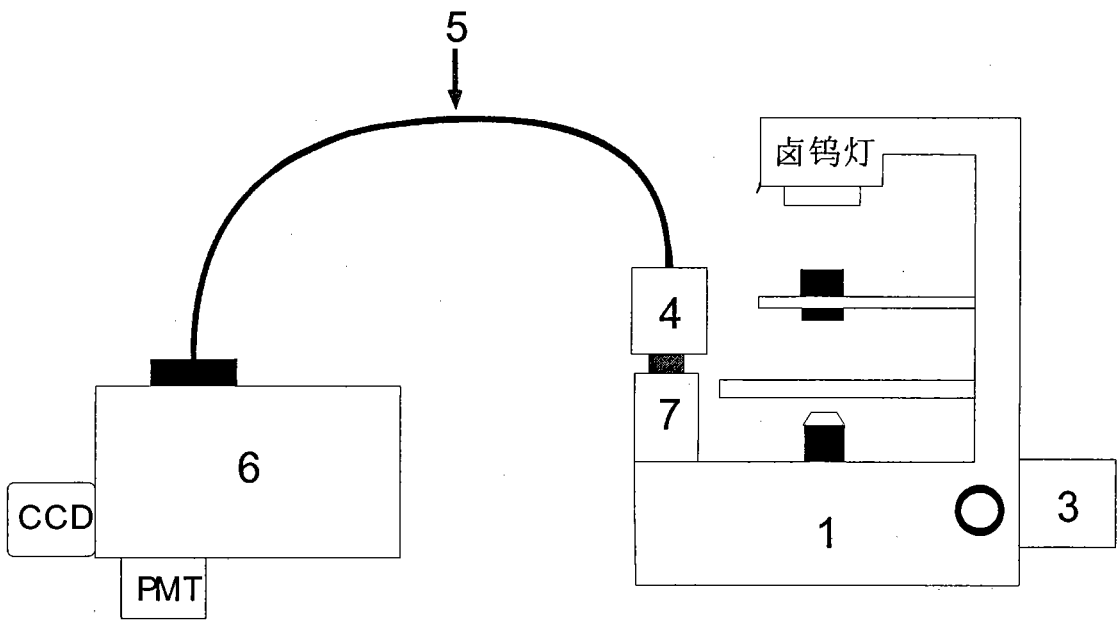


图 2

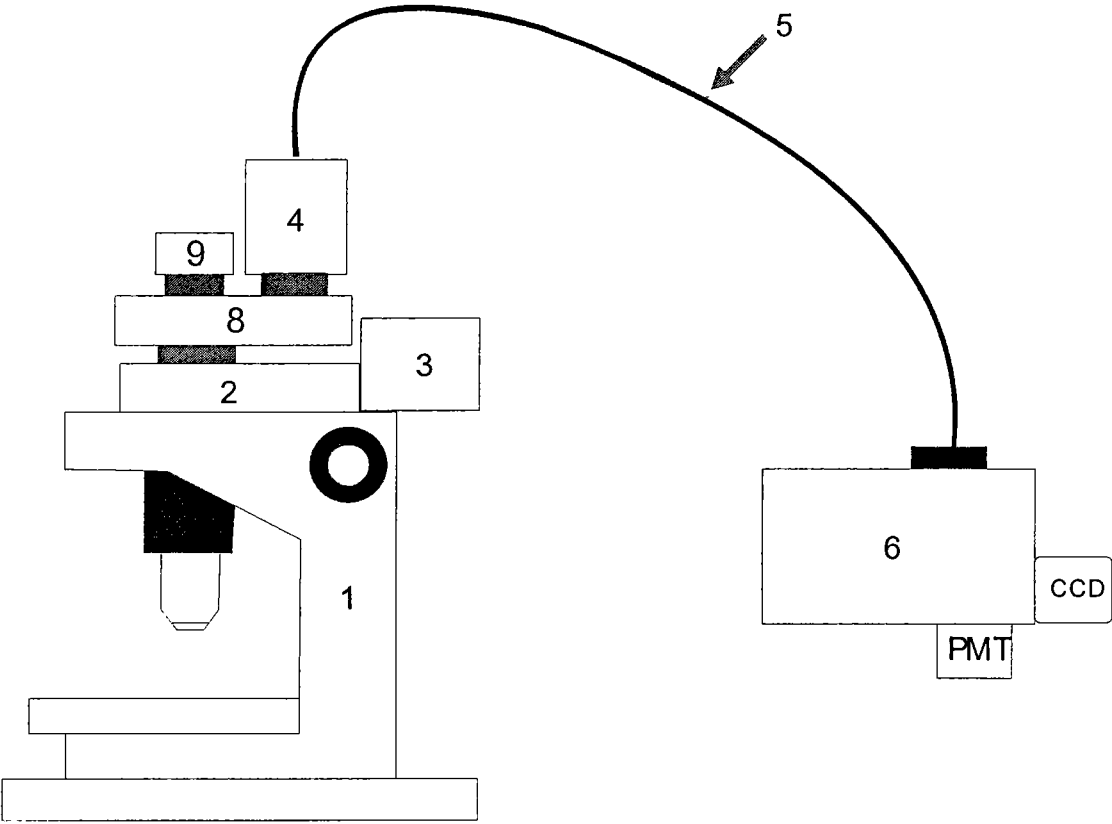


图 3

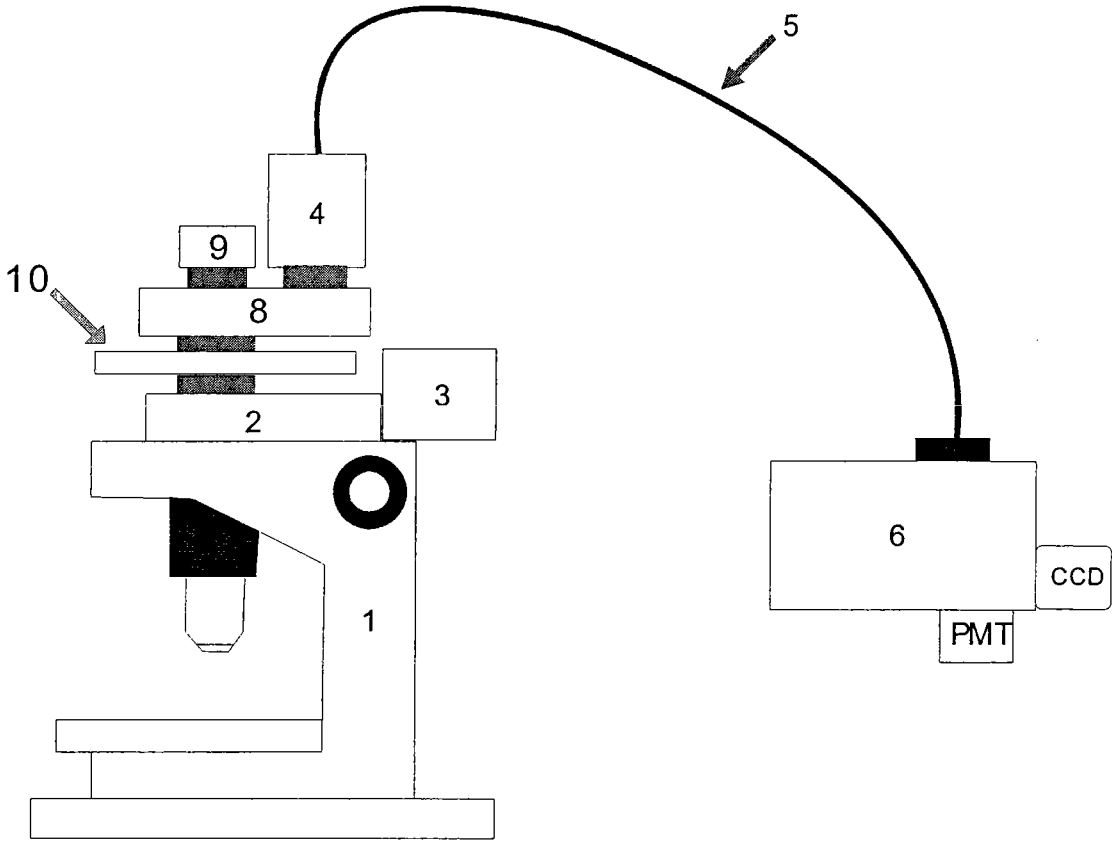


图 4

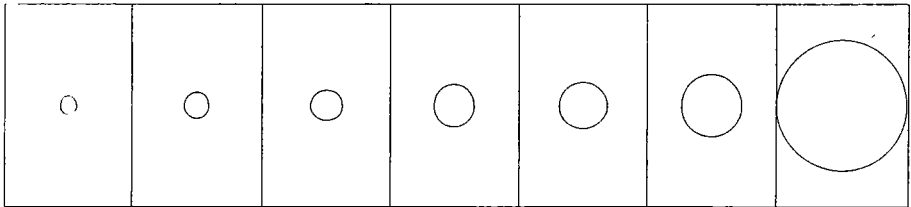


图 5