



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102692702 A

(43) 申请公布日 2012. 09. 26

(21) 申请号 201110070671. 1

(22) 申请日 2011. 03. 23

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 罗志勇 孟涛 付彦辉 仓怀兴
纪伟 张翔 扈建琦 崔亚姬

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 宋焰琴

(51) Int. Cl.

G02B 21/06 (2006. 01)

G02B 21/00 (2006. 01)

G02B 21/36 (2006. 01)

G02B 27/00 (2006. 01)

G01N 21/17 (2006. 01)

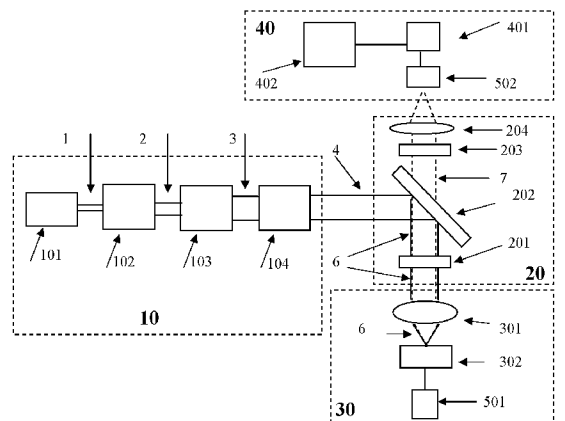
权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 6 页

(54) 发明名称

采用激光干涉场的共聚焦显微镜

(57) 摘要

本发明公开了采用激光干涉场的共聚焦显微镜。该共聚焦显微镜包括：激光干涉场系统、分光系统、物镜系统和成像系统，其中：激光干涉场系统，用于利用多束激光干涉产生空间周期性排列的激光干涉场；分光系统，用于将激光干涉场反射至物镜系统，并将从物镜系统透射的样品反射或激发的光透射或反射至成像系统；物镜系统，用于将激光干涉场成像至样品，并将从样品反射或激发的光透射至分光系统；成像系统，用于利用分光系统透射的样品反射或激发的光成像。本发明中，利用激光干涉元件形成空间周期分布的激光干涉场点光源阵列，从而简化了共聚焦显微镜的构造，减小了其加工的难度和成本。



1. 一种采用激光干涉场的共聚焦显微镜,其特征在于,该共聚焦显微镜包括:激光干涉场系统、分光系统、物镜系统和成像系统,其中:

所述激光干涉场系统,用于利用多束激光干涉产生空间周期性排列的激光干涉场;

所述分光系统,用于将所述激光干涉场反射至物镜系统,并将从所述物镜系统透射的所述样品反射或激发的光透射或反射至成像系统;

所述物镜系统,用于将所述激光干涉场成像至样品,并将从所述样品反射或激发的光透射至所述分光系统;

所述成像系统,用于利用所述分光系统透射的所述样品反射或激发的光成像。

2. 根据权利要求1所述的共聚焦显微镜,其特征在于:所述激光干涉场系统包括激光器和激光干涉元件,所述激光器和所述激光干涉元件的光轴重合,其中:

所述激光器,用于输出预设波长的准直激光;

所述激光干涉元件,用于将所述准直激光分为多束激光,并利用该多束激光相互干涉产生空间周期性排列的激光干涉场。

3. 根据权利要求2所述的共聚焦显微镜,其特征在于:所述激光干涉元件为棱锥或棱台。

4. 根据权利要求3所述的共聚焦显微镜,其特征在于:所述棱锥为三棱锥或四棱锥;所述棱台为三棱台或四棱台。

5. 根据权利要求4所述的共聚焦显微镜,其特征在于:对于所述三棱锥、四棱锥、三棱台和四棱台,其底面与侧面的夹角小于10度。

6. 根据权利要求5所述的共聚焦显微镜,其特征在于:制备所述棱锥或棱台的材料为光学玻璃或有机光学材料。

7. 根据权利要求6所述的共聚焦显微镜,其特征在于:制备所述棱锥或棱台的材料K9光学玻璃。

8. 根据权利要求2至7中任一项所述的共聚焦显微镜,其特征在于:所述激光干涉场系统还包括:扩束镜和望远镜,

所述扩束镜位于所述激光器和所述激光干涉元件之间,所述望远镜位于所述激光干涉元件的光路后端,所述激光器的光轴、扩束镜的光轴、激光干涉元件的光轴和所述望远镜的光轴重合;

所述扩束镜,用于调整所述准直激光的光束直径,以将所述准直激光匹配所述激光干涉元件;

所述望远镜,用于将所述点阵列光源沿所述重合的光轴平移或对所述点阵列光源的大小进行调整。

9. 根据权利要求8所述的共聚焦显微镜,其特征在于:

所述分光系统为二向色分光镜,该二向色分光镜的入射面的法线与所述激光干涉元件的光轴成45度;或所述分光系统为偏振分光棱镜和 $\lambda/4$ 波片,所述 $\lambda/4$ 波片位于偏振分光棱镜和所述物镜系统之间;

所述物镜系统包括物镜,该物镜将经所述分光系统的点阵列光源成像至所述样品,并将从所述样品反射或激发的光透射至所述分光系统。

10. 根据权利要求9所述的共聚焦显微镜,其特征在于:所述共聚焦显微镜还包括一个

或多个共聚焦针孔阵列，

所述共聚焦针孔阵列位于所述激光干涉场系统和 / 或所述分光系统，用于过滤所述物镜焦平面以外的散射光。

11. 根据权利要求 10 所述的共聚焦显微镜，其特征在于：所述共聚焦显微镜包括一个共聚焦针孔阵列；

该共聚焦针孔阵列位于所述物镜和所述分光系统之间，用于过滤从所述分光系统反射的所述点阵列光源的物镜焦平面以外的光，并过滤所述样品发出的或从所述样品反射的所述物镜焦平面以外的光。

12. 根据权利要求 10 所述的共聚焦显微镜，其特征在于：所述共聚焦显微镜包括一个共聚焦针孔阵列；

所述共聚焦针孔阵列位于所述分光系统和所述成像系统之间，用于过滤从所述分光系统透射的所述物镜焦平面之外的所述样品发出的或从所述样品反射的所述物镜焦平面以外的光。

13. 根据权利要求 10 所述的共聚焦显微镜，其特征在于：所述共聚焦显微镜包括两个共聚焦针孔阵列，该两个共聚焦针孔阵列为照明针孔阵列和探测针孔阵列，

所述照明针孔阵列，位于所述望远镜和所述分光系统之间，用于过滤从所述望远镜在物镜焦平面处形成的点阵列光源以外的光；

所述探测针孔阵列，位于所述分光系统和所述物镜之间，用于过滤所述样品发出的或从所述样品反射的所述物镜焦平面以外的光。

14. 根据权利要求 1 至 7 中任一项所述的共聚焦显微镜，其特征在于：所述成像系统包括像镜和 EMCCD，

所述像镜，将所述分光系统透射的所述样品反射或激发的光成像至所述电子倍增型光电耦合器件 EMCCD；

所述 EMCCD，用于所述分光系统透射的所述样品反射或激发的光成像。

15. 根据权利要求 2 至 7 中任一项所述的共聚焦显微镜，其特征在于：所述激光干涉场系统包括：多组的所述激光器和激光干涉元件，

该多组的激光器和激光干涉元件中，其光轴互相平行，通过一分光镜耦合进所述分光系统中，其激光波长彼此不同；

该多组的激光器和激光干涉元件所产生的激光干涉场干涉周期一致。

16. 根据权利要求 1 至 7 中任一项所述的共聚焦显微镜，其特征在于：所述共聚焦显微镜还包括：二维扫描系统，该二维扫描系统为分光系统扫描系统、样品台扫描系统、成像扫描系统，或位于激光干涉系统和所述分光系统之间的相位片扫描系统。

采用激光干涉场的共聚焦显微镜

技术领域

[0001] 本发明涉及光学行业显微镜技术领域,尤其涉及一种采用激光干涉场的共聚焦显微镜。

背景技术

[0002] 在传统的荧光显微镜中,来自汞灯或者氙灯的激发光照射视野中的全部样品。但是,传统显微镜得到的图片容易受到轴向干扰或侧向干扰的影响而显得模糊,尤其不利于观察具有一定厚度的样品。1955年,Marvin Minsky 利用共焦原理搭建了第一台共聚焦显微镜,用来在体观察人类大脑的神经网络。共聚焦显微镜很好的解决了传统荧光显微镜中焦面模糊的问题,解决了图像的轴向和侧向的干扰。目前,共聚焦显微镜已经成为当代生物学、医学及微观结构领域广泛应用的仪器之一。

[0003] 工业用的共聚焦显微镜是对样品反射或透射的光进行成像,荧光共聚焦显微镜是对样品发出的荧光成像,其基本工作原理是一致的,因此,下面的介绍仅针对荧光共聚焦显微镜进行说明,工业用的共聚焦显微镜可参考荧光共聚焦显微镜的说明。

[0004] 传统的激光扫描共聚焦显微镜利用激光束经照明针孔形成点光源对标本内焦平面的每一点扫描,标本上的被照射点发出荧光,在探测针孔处成像,由探测针孔后的光电倍增管接收转换为电信号,该电信号放大后对应于光强信号,并迅速在计算机显示器屏幕上形成样品的荧光图像。照明针孔与探测针孔相对于物镜焦平面是共轭的,焦平面上的点同时聚焦于照明针孔和探测针孔,焦平面以外的点不会在探测针孔处成像,这样得到的共聚焦图像是标本的光学横断面,同时还削弱了焦平面上焦点以外的散射光的影响,大大提高了系统的信噪比和成像分辨率。

[0005] 传统激光共聚焦成像技术是基于点扫描的,要获得一副完整的图像,需要对样品逐点扫描,因而极大地影响到成像速度。尽管利用共振扫描系统可以极大提高扫描速度,但由于速度太快,每个照明点的荧光基团被激发的时间太短,荧光采样时间短,信噪比下降,进而影响到图像质量。

[0006] 转盘共聚焦显微镜 (Spinning Disk Microscopy,简称 SDM) 很好地解决了共聚焦显微镜成像速度问题。该技术利用多束激发光同时照明样品并用针孔或狭缝阵列滤去非焦平面的荧光,再用电子倍增电荷耦合器件 (Electron Multiply CCD,简称 EMCCD) 成像,其核心部件为共聚焦扫描部件 (Confocal Scanning Unit,简称 CSU) 为上下两层同轴同步高速旋转的盘片。上盘片排列有 2 万多个菲涅耳微透镜组成的阵列,激发光每次只能照射到其中的小部分 (约 1/12)。下盘片为 2 万多个孔径为 50 μ m 的针孔组成的阵列,每个针孔都与上盘片的一个菲涅耳微透镜同轴安装。被激发光照射到的那部分微透镜组将入射光分解成点光源阵列并聚焦到对应的针孔对激发光滤波,显微镜物镜将通过针孔的激发光聚焦到样品,样品发出的荧光聚焦到针孔后通过分光系统滤去激发光,荧光进入 EMCCD 成像。由于精心设计菲涅耳微透镜和针孔的排列方式,盘片每旋转 30 度便可完整地形成一幅图。由于上下盘片高速旋转,最高可达 5000 转 / 分钟,因此可以高速成像。这样,整个 SDM 的成像速度

就取决于 EMCCD 的传输速度和荧光光强,实现了视频荧光图像采集。由于 SDM 采用了较大孔径的针孔,获得了较高的通光量,解决了共振扫描系统存在的信噪比差的缺点,同时对分辨率没有太大的影响。

[0007] 在实现本发明的过程中,申请人意识到现有技术存在如下技术缺陷:转盘共聚焦显微镜的光学元器件多,结构复杂,加工困难。

发明内容

[0008] (一)要解决的技术问题

[0009] 为解决上述缺陷,本发明提供了一种共聚焦显微镜,以简化共聚焦显微镜的构造,减小其加工的难度和成本。

[0010] (二)技术方案

[0011] 根据本发明的一个方面,提供了一种采用激光干涉场的共聚焦显微镜。该共聚焦显微镜包括:激光干涉场系统、分光系统、物镜系统和成像系统,其中:激光干涉场系统,用于利用多束激光干涉产生空间周期性排列的激光干涉场;分光系统,用于将激光干涉场反射至物镜系统,并将从物镜系统透射的样品反射或激发的光透射或反射至成像系统;物镜系统,用于将激光干涉场成像至样品,并将从样品反射或激发的光透射至分光系统;成像系统,用于利用分光系统透射的样品反射或激发的光成像。

[0012] 优选地,本共聚焦显微镜中,激光干涉场系统包括激光器和激光干涉元件,激光器和激光干涉元件的光轴重合,其中:激光器,用于输出预设波长的准直激光;激光干涉元件,用于将准直激光分为多束激光,并利用该多束激光相互干涉产生空间周期性排列的激光干涉场。

[0013] 优选地,本共聚焦显微镜中,激光干涉元件为棱锥或棱台。

[0014] 优选地,本共聚焦显微镜中,棱锥为三棱锥或四棱锥;棱台为三棱台或四棱台。

[0015] 优选地,本共聚焦显微镜中,对于三棱锥、四棱锥、三棱台和四棱台,其底面与侧面的夹角小于 10 度。

[0016] 优选地,本共聚焦显微镜中,制备棱锥或棱台的材料为光学玻璃或有机光学材料。

[0017] 优选地,本共聚焦显微镜中,制备棱锥或棱台的材料 K9 光学玻璃。

[0018] 优选地,本共聚焦显微镜中,激光干涉场系统还包括:扩束镜和望远镜,扩束镜位于激光器和激光干涉元件之间,望远镜位于激光干涉元件的光路后端,激光器的光轴、扩束镜的光轴、激光干涉元件的光轴和望远镜的光轴重合;扩束镜,用于调整准直激光的光束直径,以将准直激光匹配激光干涉元件;望远镜,用于将点阵列光源沿重合的光轴平移或对点阵列光源的大小进行调整。

[0019] 优选地,本共聚焦显微镜中,分光系统为二向色分光镜,该二向色分光镜的入射面的法线与激光干涉元件的光轴成 45 度;或分光系统为偏振分光棱镜和 $\lambda/4$ 波片, $\lambda/4$ 波片位于偏振分光棱镜和物镜系统之间;物镜系统包括物镜,该物镜将经分光系统的点阵列光源成像至样品,并将从样品反射或激发的光透射至分光系统。

[0020] 优选地,本共聚焦显微镜中,共聚焦显微镜还包括一个或多个共聚焦针孔阵列,共聚焦针孔阵列位于激光干涉场系统和 / 或分光系统,用于过滤物镜焦平面以外的散射光。

[0021] 优选地,本共聚焦显微镜中,共聚焦显微镜包括一个共聚焦针孔阵列;该共聚焦针

孔阵列位于物镜和分光系统之间,用于过滤从分光系统反射的点阵列光源的物镜焦平面以外的光,并过滤样品发出的或从样品反射的物镜焦平面以外的光。

[0022] 优选地,本共聚焦显微镜中,共聚焦显微镜包括一个共聚焦针孔阵列;共聚焦针孔阵列位于分光系统和成像系统之间,用于过滤从分光系统透射的物镜焦平面之外的样品发出的或从样品反射的物镜焦平面以外的光。

[0023] 优选地,本共聚焦显微镜中,共聚焦显微镜包括两个共聚焦针孔阵列,该两个共聚焦针孔阵列为照明针孔阵列和探测针孔阵列,照明针孔阵列,位于望远镜和分光系统之间,用于过滤从望远镜在物镜焦平面处形成的点阵列光源以外的光;探测针孔阵列,位于分光系统和物镜之间,用于过滤样品发出的或从样品反射的物镜焦平面以外的光。

[0024] 优选地,本共聚焦显微镜中,成像系统包括像镜和 EMCCD,像镜,将分光系统透射的样品反射或激发的光成像至电子倍增型光电耦合器件 EMCCD;EMCCD,用于分光系统透射的样品反射或激发的光成像。

[0025] 优选地,本共聚焦显微镜中,激光干涉场系统包括:多组的激光器和激光干涉元件,该多组的激光器和激光干涉元件中,其光轴互相平行,通过一分光镜耦合进分光系统中,其激光波长彼此不同;该多组的激光器和激光干涉元件所产生的激光干涉场干涉周期一致。

[0026] 优选地,本共聚焦显微镜中,共聚焦显微镜还包括:二维扫描系统,该二维扫描系统为分光系统扫描系统、样品台扫描系统、成像扫描系统,或位于激光干涉系统和分光系统之间的相位片扫描系统。

[0027] (三)有益效果

[0028] 本发明的共聚焦显微镜具有以下优点:

[0029] 1) 本发明中,利用激光干涉元件形成空间周期分布的激光干涉场点光源阵列,从而简化了共聚焦显微镜的构造,减小了其加工的难度和成本;

[0030] 2) 本发明中,采用棱台或棱锥作为激光干涉元件,配合常规扫描技术,结构简单可靠、工艺简单、成本低廉;

[0031] 3) 本发明中,激光干涉场形成的点光源为矩形,克服了圆形光源扫描过程中带来的照明重叠或未照明现象,获得更加客观的图像。

[0032] 4) 本发明中,激光干涉元件和共聚焦针孔阵列配合,可以实现高速精准成像。

附图说明

[0033] 图 1 为本发明实施例共聚焦显微镜的一种结构图;

[0034] 图 2 为本发明实施例共聚焦显微镜的另一种结构图;

[0035] 图 3 为本发明实施例共聚焦显微镜的又一种结构图;

[0036] 图 4 为本发明实施例共聚焦显微镜分光系统为偏振分光系统时的示意图;

[0037] 图 5a 为本发明实施例作为激光干涉元件的四棱锥的示意图;

[0038] 图 5b 为本发明实施例采用图 5a 所示四棱锥作为激光干涉元件所产生的激光干涉图样的示意图;

[0039] 图 6 为本发明实施例激光干涉元件为四棱锥时,所产生干涉场的光轴纵向剖面图;

- [0040] 图 7a 为本发明实施例作为激光干涉元件的四棱台的示意图；
- [0041] 图 7b 为本发明实施例采用图 7a 所示四棱锥作为激光干涉元件所产生的激光干涉图样的示意图；
- [0042] 图 8 为本发明实施例共聚焦显微镜中激光干涉场系统有多组激光器和激光干涉元件时,共聚焦显微镜结构图；
- [0043] 图 9 为本发明实施例共聚焦显微镜中一种共聚焦针孔阵列示意图；
- [0044] 图 10 为本发明实施例共聚焦显微镜中另一种共聚焦针孔阵列示意图；
- [0045] 图 11 为本发明实施例共聚焦显微镜中又一种针孔阵列示意图；
- [0046] 图 12 为本发明实施例共聚焦显微镜中采用振镜扫描系统的示意图；
- [0047] 图 13 为本发明实施例共聚焦显微镜中望远镜调节干涉场远近及大小及相位片 X-Y 扫描光路图；
- [0048] 图 14a 为图 13 中相位片绕轴旋转时,激光干涉场的一种示意图；
- [0049] 图 14b 为图 13 中相位片绕轴旋转时,激光干涉场的另一种示意图；
- [0050] 图 14c 为图 13 中相位片绕轴旋转时,激光干涉场的又一种示意图。
- [0051] **【主要元件符号说明】**
- [0052] 1- 激光； 2- 扩束后的激光；
- [0053] 3- 激光干涉场； 4- 激光干涉场系统输出的激光干涉场；
- [0054] 4a- 激光干涉场系统输出的一种波长激光干涉场；
- [0055] 4b- 激光干涉场系统输出的另一种波长激光干涉场；
- [0056] 5- 激光干涉场； 6- 混有其它光的成像光束；
- [0057] 7- 成像光束； 10- 激光干涉场部分；
- [0058] 20- 分光系统； 30- 物镜系统；
- [0059] 40- 成像系统； 50- 二维扫描系统；
- [0060] 10a- 一种波长激光干涉场部分；10b- 另一种波长激光干涉场部分；
- [0061] 101- 激光器； 102- 扩束镜；
- [0062] 103- 激光干涉元件； 104- 望远镜；
- [0063] 104a- 凸透镜； 104b- 凸透镜；
- [0064] 105- 照明针孔阵列； 106- 分色镜；
- [0065] 107- 反光镜； 201- 探测针孔阵列；
- [0066] 202- 分光元件； 202a- 偏振分光棱镜；
- [0067] 202b- $\lambda/4$ 波片； 203- 滤光片；
- [0068] 204- 凸透镜； 301- 物镜；
- [0069] 302- 样品台； 401- 二维光探测阵列；
- [0070] 402- 计算机； 501-X-Y 扫描系统；
- [0071] 501a-X-Y 振镜扫描系统； 501b- 平场镜；
- [0072] 501c- 相位片； 502- 成像扫描系统。

具体实施方式

[0073] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚明白,以下结合具体实施例,并参照

附图,对本发明进一步详细说明。

[0074] 在本发明的一个示例性实施例中,提供了一种共聚焦显微镜。该共聚焦显微镜包括:激光干涉场系统、分光系统、物镜系统和成像系统。激光干涉场系统,利用多束激光干涉产生空间周期性排列的激光干涉场。分光系统,其入射面的法线与所述激光干涉场系统的光轴成 45 度角,将激光干涉场反射至物镜系统;并将从物镜系统成像的样品反射或激发的光透射或反射至成像系统。物镜系统,其光轴与所述分光系统的入射面的法线成 45 度角,将激光干涉场成像至样品;并将从样品反射或激发的光成像至分光系统。成像系统,利用分光系统透射的样品反射或激发的光成像。

[0075] 众所周知,激光是良好的相干光源,用多束激光干涉产生的激光干涉场为光强周期点阵分布,具有很高的有序度的点阵列光源。通过改变激光的光束数、传播方向和偏振态,可以产生各种各样的一维、二维和三维光强分布的激光干涉场点阵列光源。

[0076] 本实施例中,分光系统、物镜系统和成像系统均可以采用现有技术中共聚焦显微镜的常规设计。其中,分光系统可以为分光镜、分光棱镜和偏振分光镜。物镜系统可以为简单的一块凸透镜物镜,也可以为带有色差校正等辅助元件的物镜。成像系统可以为像镜和 CCD 元件。本实施例的重点在于,采用多束激光干涉取代共聚焦显微镜的透镜阵列,采用该技术特征的共聚焦显微镜可以减少元器件、简化结构、降低技术难度、而且可以利用干涉场明暗周期变化的规律,利用 x-y 二维扫描系统进行简单几步扫描操作,就可形成完整的光断层图像,从而解决了高速旋转稳定性及同步等问题,不仅提高了成像速度,也提高了共聚焦显微镜的可靠性和可维护性。

[0077] 在本发明进一步的实施例中,激光干涉场系统包括激光器、激光干涉元件,激光器和激光干涉元件的光轴重合。激光器,输出预设波长的准直激光;激光干涉元件,将准直激光分为多束激光,利用该多束激光相互干涉产生空间周期性排列的点阵列光源。

[0078] 本实施例中,激光器的波长应对应相关的观测波长,或者是对应于样品产生荧光的波长。激光干涉元件可以为常规的激光干涉元件。但常规的激光干涉元件的调试、维护较为复杂,不推荐采用。优选地,激光干涉元件为由光学玻璃或其它透明有机光学材料制备的棱锥或棱台。如果棱锥或棱锥的边角太多,则所产生的激光干涉场比较复杂,不易于控制,也不推荐使用。优选地,激光干涉元件为 K9 光学玻璃制备的四棱锥或四棱台,其底面与侧面的夹角小于 10 度。

[0079] 在本发明优选的实施例中,利用多棱锥将一束激光分成几束,并让这些激光相互干涉,可以获得二维空间干涉图样;或利用多棱台将一束激光分成几束,通过这些激光相互干涉,可以获得三维空间干涉图样。因此,利用多棱锥或棱台,可以方便地获得周期性排列的激光干涉场。采用棱台或棱锥作为激光干涉元件,配合常规扫描技术,结构简单可靠、工艺简单、成本低廉。具体的扫描方法将在后面的实施例中详细描述。此外目前共聚焦显微镜,照明点光源为圆形光斑,要对样品完整扫描,不可避免地产生照明区域重叠的问题,否则就会有照明死角。而采用棱数为三或四的棱锥或棱台,产生的点光源是正方形或正六边形,因而可以实现对样品无重叠、无死角的照明,获得更客观的样品图像。

[0080] 在本发明优选的实施例中,共聚焦显微镜还包括一个或多个共聚焦针孔阵列,共聚焦针孔阵列位于激光干涉场系统和 / 或分光系统,用于过滤物镜焦平面以外的散射光。本实施例中,激光干涉元件和针孔阵列配合,可以实现高速精准成像。而具体的针孔阵列设

计和对应的扫描方式将在后续的实施例中详细说明。

[0081] 在本发明另一个优选的实施例中,激光干涉场系统包括:多组的激光器和激光干涉元件,该多组的激光器和激光干涉元件中,其光轴互相平行,通过一分光镜耦合进同一分光系统中,其激光波长彼此不同;该多组的激光器和激光干涉元件所产生的激光干涉场干涉周期一致。在利用多彩色标记技术在同一样品中同时检测多个被测对象,进行荧光成像时,需要利用波长不同的光去激发样品;在对分子进行精确定位的光敏定位显微技术(Photoactivation Localization Microscopy),需要一束激光激活荧光分子,另一束不同波长的激光激发荧光。为了适应此类情况,本实施例中采用了多组激光器和激光干涉元件的方法,利用分色镜将不同的激光干涉场耦合进同一分光系统中,极大地方便了用户的使用。

[0082] 下文将以上述实施例为基础,给出本发明的一种最优实施例。本发明激光干涉场共聚焦显微镜,包括以下部分:激光干涉场系统 10,分光系统 20,物镜系统 30,成像系统 40 和二维扫描系统 50。以下将分别进行描述。

[0083] 激光干涉场系统 10:

[0084] 激光干涉场部分 10 由激光器 101、扩束镜 102、激光干涉元件 103 和望远镜 104 组成。激光器 101 输出的准直激光 1 经扩束镜 102 得到光束大小与激光干涉元件 103 入射端大小匹配的激光 2,激光 2 垂直照射激光干涉元件 103 的入射面。激光干涉元件 103 将激光 2 分成多束激光,这些激光相互干涉产生明暗周期变化的空间激光干涉场 3。望远镜 104 将激光干涉场 3 沿光轴平移并对其大小进行调整,得到激光干涉场 4,激光干涉场 4 的亮点与针孔孔径相匹配。

[0085] 在激光干涉场与荧光分别使用不同的针孔阵列(如图 2 所示)的系统结构中,激光干涉场 4 通过激发光照明针孔阵列 105 得到滤波后的激光干涉场 5。

[0086] 本实施例中,激光干涉元件采用如图 5a 所示四棱锥。如图 5a 所示,棱锥采用 K9 玻璃。棱锥底面与侧面的夹角小于 10 度。激光光波 K 垂直底边入射,分成振幅相等的 K_1 、 K_2 、 K_3 、 K_4 四束光波相互干涉。由图 5a 所示四棱锥所产生的激光干涉场如图 5b 所示,其在光横切面为呈明暗相间周期变化的干涉图样。图 6 是干涉场的轴向纵向剖面图,其在光轴纵向切面也为呈明暗相间周期变化的干涉图样。

[0087] 此外,激光干涉元件也可以采用如图 7a 所示四棱台。图 7a 的 4 棱台采用 K9 玻璃,棱台底面与侧面的夹角小于 10 度。激光光波 K 垂直底边入射,分成振幅相等的 K_1 、 K_2 、 K_3 、 K_4 、 K_5 五束光波并相互干涉。由图 7a 所示四棱锥所产生的干涉场如图 7b 所示,其在光横切面为呈明暗相间周期变化的干涉图样。与图 6 不同,由图 7a 所示四棱锥所产生的干涉场,其在光传播方向也呈现周期变化。激光干涉元件也可以采用四棱台,容易获得的高质量的四棱台,从而获得高质量的干涉场,并还可以减少 Z 向扫描移动的次数,提高成像速度。

[0088] 激光干涉场系统 10 可以含有多个激光干涉场子系统的情况如图 8 所示,构成多波长激光干涉场共聚焦显微镜。全反镜 107 将激光干涉场部分 10b 输出的一种激光干涉场 4b 反射到分色镜 106 上,分色镜 106 继续反射激光干涉场 4b。激光干涉场部分 10a 输出另一种波长的激光干涉场 4a 则透射分色镜 106,调节激光干涉场部分 10b 的望远镜 104,使激光干涉场 4b 和 4a 的干涉周期一致,激光干涉场 4a 和 4b 同轴输出形成激光干涉场 4 进入分光系统 20。

[0089] 分光系统 20 :

[0090] 荧光显微镜实施例的分光系统 20 采用分光元件 202。在采用激光干涉场与荧光共用一个针孔阵列 (如图 1 所示) 的结构中,分光元件 202 位于滤光片 203 和探测针孔阵列 201 之间,并与激光干涉场系统 10 的光轴成 45 度夹角。分光元件 202 将望远镜 104 所成的激光干涉场 4 的像反射到探测针孔阵列 201,同时从混有其它光的成像光束 6 中分离出来得到成像光束 (荧光)7。

[0091] 在激光干涉场与荧光分别使用不同的针孔阵列 (如图 2 所示) 的系统结构中,分光元件 202 位于探测针孔阵列 201 和物镜 301 之间,并与激光干涉场系统 10 的光轴成 45 度夹角。分光元件 202 将经过照明针孔阵列 105 滤波后的激光干涉场 5 直接反射到样品台物镜 301,同时从混有其它光的成像光束 6 中分离出来得到成像光束 (荧光)7。成像光束 7 在探测针孔阵列 201 处成像。

[0092] 在仅使用探测针孔阵列 (如图 3 所示) 的系统结构中,分光元件 202 位于探测针孔阵列 201 和物镜 301 之间,并与激光干涉场系统 10 的光轴成 45 度夹角。分光元件 202 将激光干涉场系统 10 输出的激光干涉场 4 直接反射到物镜 301,同时从混有其它光的成像光束 6 中分离出来得到成像光束 7。成像光束 7 在探测针孔阵列 201 处成像。

[0093] 探测针孔阵列 201 滤去非焦平面的光后,成像光束 7 经滤光片 203 进一步滤掉激发光,被凸透镜成像到成像系统的二维光探测器阵列 401。

[0094] 工业用的共聚焦显微镜实施例的分光系统 20 如图 4 所示。激光干涉场 4 被偏振分束棱镜 202a 偏转 90 度出射,经过 $\lambda/4$ 波片 202b,样品反射的激光同样也经过 $\lambda/4$ 波片 202b,这样入射和出射的激光的偏振方向相差 90 度,样品反射的激光可以透过偏振分束棱镜 202a 被成像。

[0095] 在图 9 到图 11 为荧光共聚焦显微镜实施例中不同针孔阵列示意图,其中每一个小方格代表一个孔径大小,实心方格为针孔。针孔孔径为 50X50 平方微米。针孔间距是针孔的大小比的整数倍。如图 8 所示针孔阵列,针孔间距与针孔孔径的比为 1 : 2,仅需扫描 3 步便可得到一幅完整的图像。如图 10 所示针孔阵列,针孔间距与针孔孔径的比为 1 : 4,仅需扫描 7 步便可得到一幅完整的图像。如图 11 所示针孔阵列,针孔间距与针孔孔径的比为 1 : 6,仅需扫描 17 步便可得到一幅完整的图像。

[0096] 工业用的共聚焦显微镜实施例针孔阵列如荧光共聚焦显微镜,针孔小于 1 平方微米。

[0097] 物镜系统 30 :

[0098] 在激光干涉场子系统与物镜系统共用一个针孔阵列 (如图 1 所示) 的系统结构中,物镜 301 位于探测针孔阵列 201 和样品台 302 之间 (如图 1 所示),将穿过探测针孔阵列 201 的激光干涉场 4 成像到放置在样品台 302 的样品上,激发样品发出荧光。物镜 301 同时将荧光 (与激发光形成混合光 6) 成像于针孔阵列 201。

[0099] 或者物镜 301 位于分光元件 202 与样品台 302 之间,将穿过激发光端针孔阵列 105 的激光干涉场 5 (如图 2 所示),或者将激光干涉场 4 (如图 3 所示),成像到放置在样品台 302 的样品上,激发样品的发出荧光。混有其它光的成像光束 6 被物镜 301 成像于探测针孔阵列 201。

[0100] 成像系统 40 :

[0101] 本实施例的二维光探测器阵列可以采用 EMCCD。如图 1、图 2、图 3 所示，凸透镜 204 将经过滤光片 203 的荧光成像到 EMCCD 401 上，最后图像进入计算机 402 进行处理。

[0102] 二维扫描系统 50：

[0103] 二维扫描系统 50 可以是振镜扫描系统、X-Y 样品台，或其它二维扫描装置。图 12 是采用振镜扫描系统的示意图。振镜扫描系统 501a 将来自探测针孔阵列 201（图 1 所示结构）或分光元件 202（图 2、图 3 所示结构）的激光绕 X 轴、Y 轴发生偏转，通过平场镜 501b 后，进入物镜 301，实现 X-Y 平面的扫描。

[0104] 图 13 是望远镜调节干涉场远近及大小及相位片 X-Y 扫描光路图。透镜 104a 和透镜 104b 组成望远镜，将激光干涉元件 102 产生的激光干涉场沿光轴方向移动并其调节大小与针孔匹配。X-Y 扫描系统 501（如图 1、图 2、图 3 所示）由相位片 501c 及其运动控制部分（图中未标出）。相位片 501c 为镀了增透膜的玻璃片，可绕 X 轴和 Y 轴旋转，引起透过它的激光相位发生变化，引起激光干涉图样在光横断面发生平移，实现二维扫描。

[0105] 图 14a 至图 14c 为图 13 所示的相位片 501c 相位片绕 X 轴旋转，在 Y 方向产生平移的效果图。利用相位片扫描应与液晶空间光调制器等制成的可变针孔阵列配合使用。

[0106] 此外，二维扫描系统同时还可以增加成像扫描系统 502（如图 1、图 2、图 3 所示），该成像扫描系统与现有技术中的成像扫描系统相同。

[0107] 综上所述，本发明中，激光是良好的相干光源，用多束激光干涉产生的干涉图样为光强周期点阵分布且具有很高的有序度，而且通过改变激光的光束数、传播方向和偏振态，可以产生各种各样的一维、二维和三维光强分布的周期阵列。利用多束激光形成的干涉场已用于微加工制造，特别是利用多棱锥将一束激光分成几束，并让这些激光相互干涉，可以获得二维空间干涉图样；或利用多棱台将一束激光分成几束，并让这些激光相互干涉，可以获得三维空间干涉图样。因此利用多棱锥或棱台，都可以方便地获得周期性排列的激光干涉场。采用多束激光干涉激光干涉场取代透镜阵列，可以减少元器件、简化结构、降低技术难度、而且可以利用干涉场明暗周期变化的规律，利用 x-y 二维扫描系统进行简单几步扫描操作，就可形成完整的光断层图像，从而解决了高速旋转稳定性及同步等问题，不仅提高了成像速度，也提高了共聚焦显微镜的可靠性和可维护性。

[0108] 以上所述的具体实施例，对本发明的目的、技术方案和有益效果进行了进一步详细说明，所应理解的是，以上所述仅为本发明的具体实施例而已，并不用于限制本发明，凡在本发明的精神和原则之内，所做的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

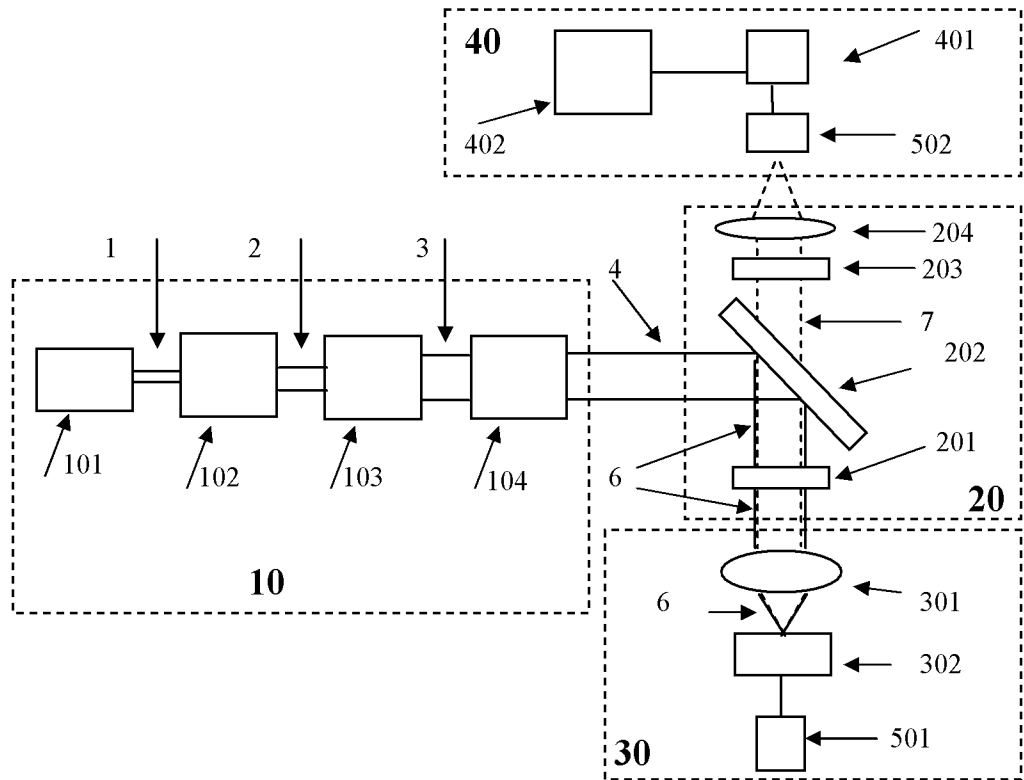


图 1

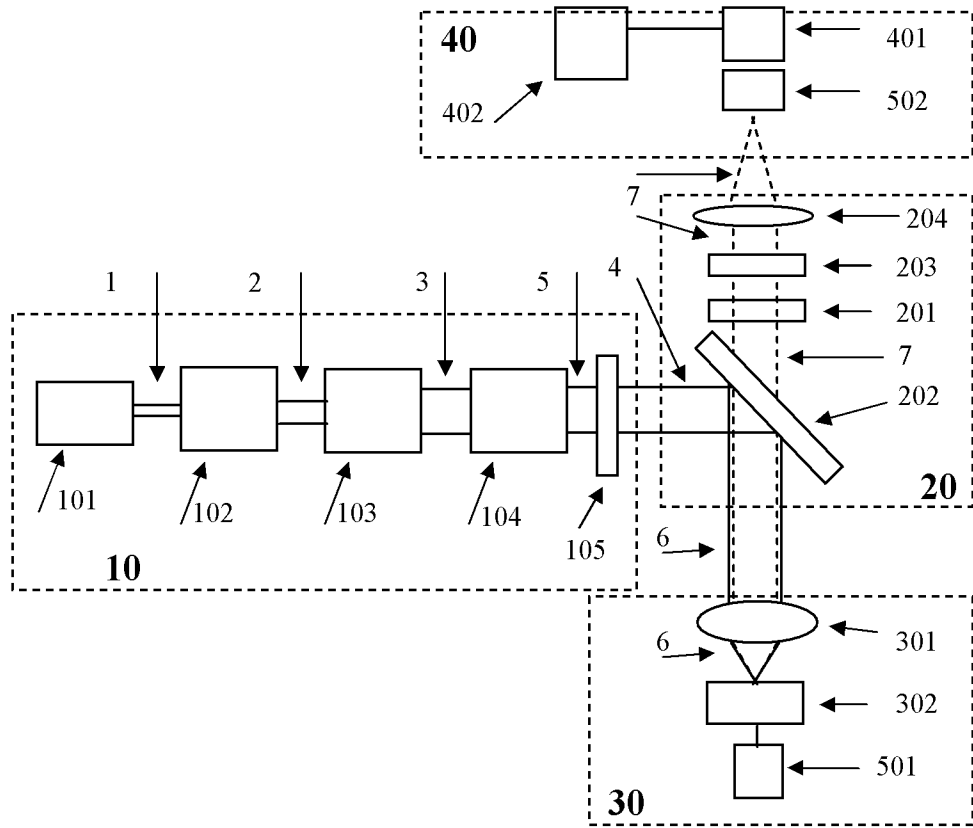


图 2

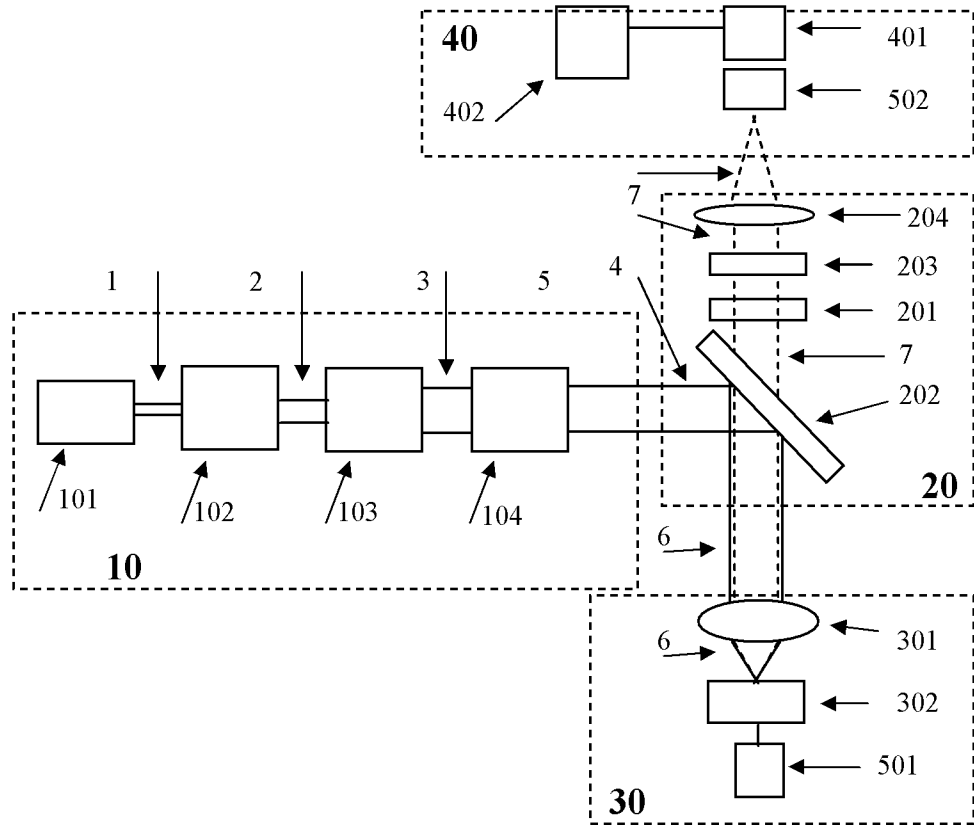


图 3

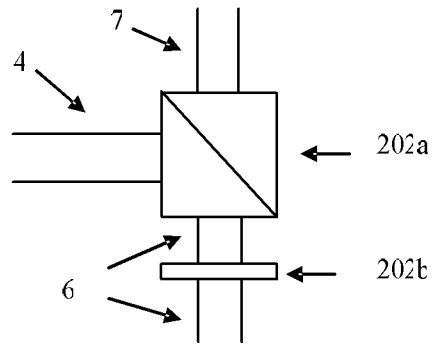


图 4

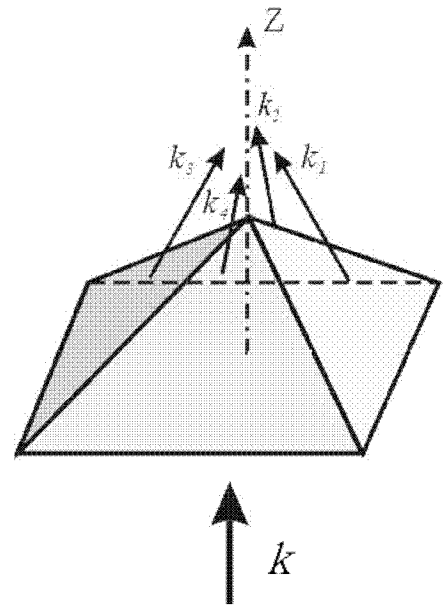


图 5a

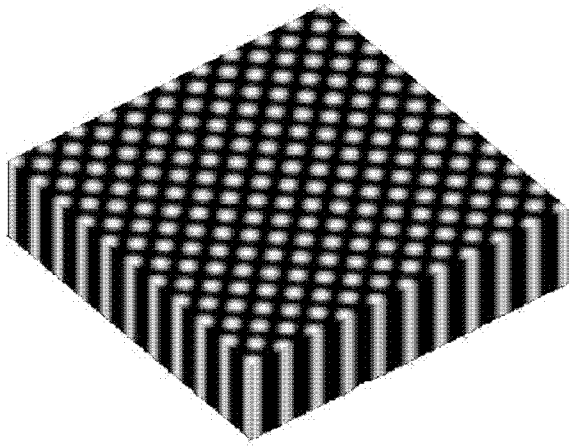


图 5b

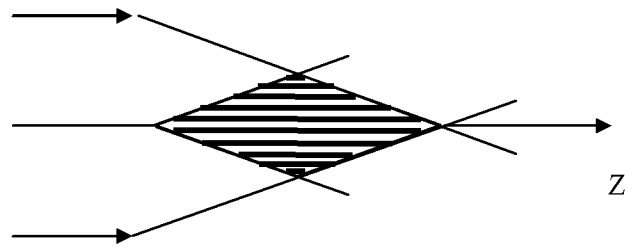


图 6

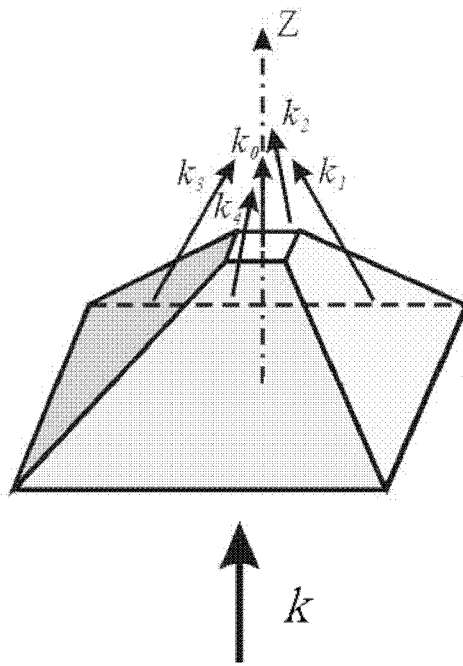


图 7a

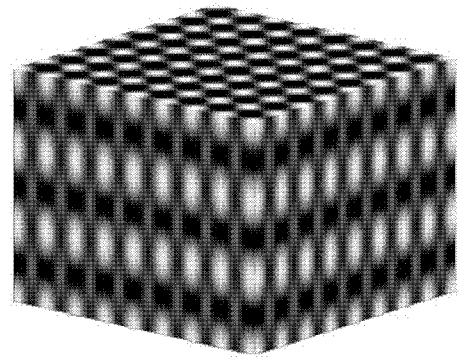


图 7b

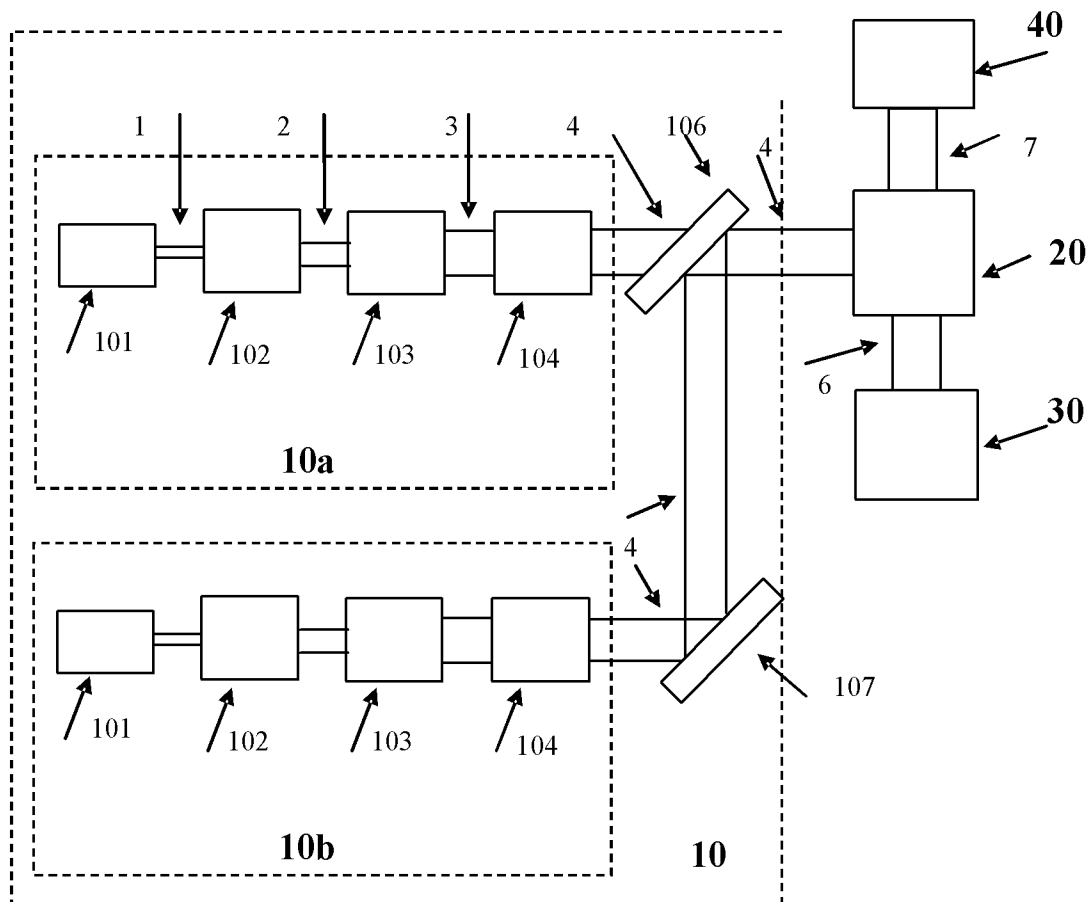


图 8

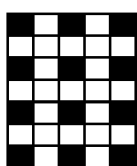


图 9

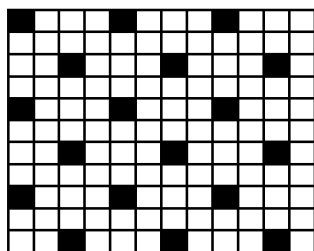


图 10

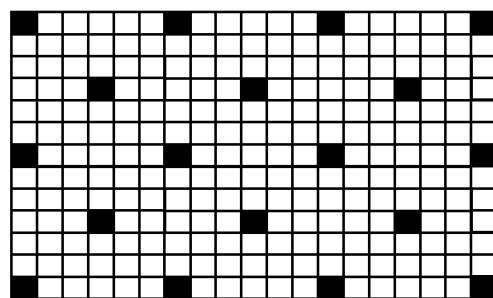


图 11

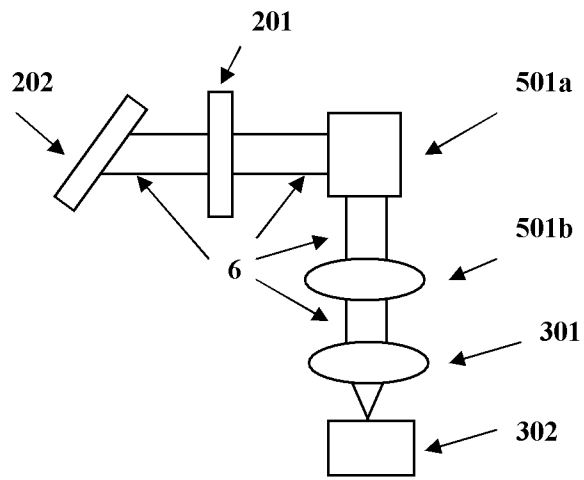


图 12

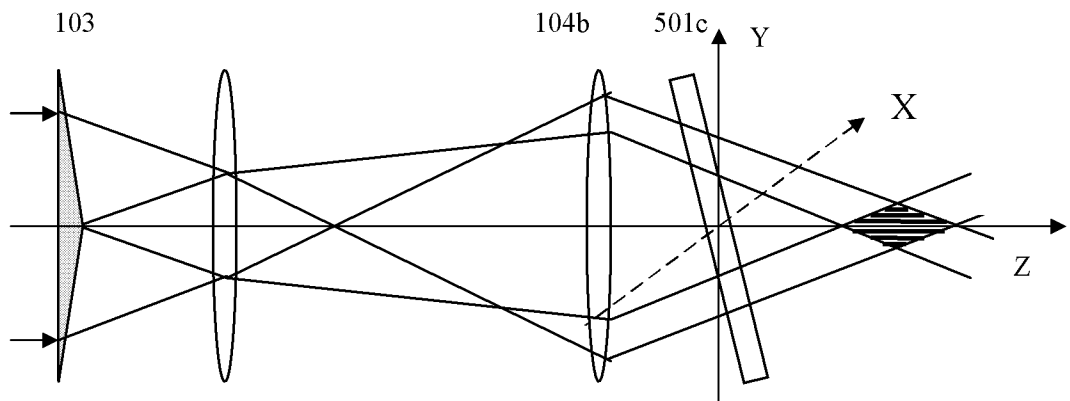


图 13

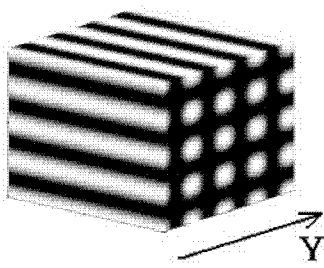


图 14a

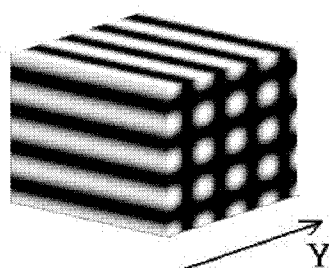


图 14b

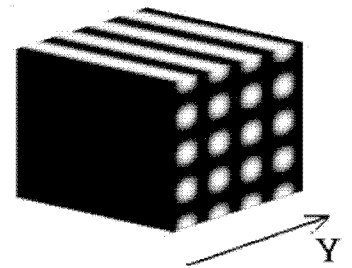


图 14c