

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01B 11/00 (2006.01)

G02B 21/00 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680024845.8

[43] 公开日 2008年7月9日

[11] 公开号 CN 101218483A

[22] 申请日 2006.6.29

[21] 申请号 200680024845.8

[30] 优先权

[32] 2005.7.6 [33] JP [31] 197049/2005

[86] 国际申请 PCT/JP2006/312958 2006.6.29

[87] 国际公布 WO2007/004497 日 2007.1.11

[85] 进入国家阶段日期 2008.1.7

[71] 申请人 独立行政法人科学技术振兴机构

地址 日本琦玉县

[72] 发明人 西坂崇之 水谷佳奈

[74] 专利代理机构 北京市德恒律师事务所

代理人 梁永

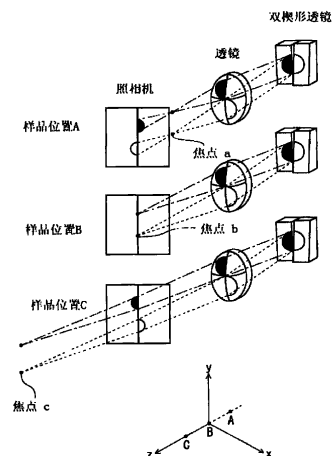
权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 10 页

[54] 发明名称

三维位置观测方法和装置

[57] 摘要

本发明提供以三维方式检测观测对象物的位置、也有助于以高精度检测在显微镜下运动的单个蛋白质分子的三维运动的三维位置观测方法和装置。在配备有包括对焦和光阑机构的透镜系统并将来自观测对象物的光成像在摄像面上的观测装置中，在从观测对象物至摄像面的光路上配置了将该观测光的行进方向改变为多个不同的方向的偏转构件，利用图像分析单元根据经偏转构件到达了摄像面的多个像之间的位置关系分析观测对象物的位置。也可在从观测对象物至摄像面的光路上配置了改变该观测光的一部分的行进方向的偏转构件，利用图像分析单元根据经偏转构件到达了摄像面的像和不经偏转构件到达了摄像面的像的位置关系分析观测对象物的位置。



1. 一种三维位置观测装置，配备有包括对焦和光阑机构的透镜系统，并利用来自观测对象物的光在一摄像面上成像，其特征在于，该观测装置包括：

在从观测对象物至摄像面的光路上配置的、用于将该观测光的行进方向改变为多个不同的方向的偏转构件，和

根据经该偏转构件到达了摄像面的多个像之间的位置关系分析观测对象物的位置的图像分析单元。

2. 一种三维位置观测装置，配备有包括对焦和光阑机构的透镜系统，并利用来自观测对象物的光在一摄像面上成像，其特征在于，该观测装置包括：

在从观测对象物至摄像面的光路上配置的、用于改变该观测光的一部分的行进方向的偏转构件，和

根据经该偏转构件到达了摄像面的像和不经该偏转构件到达了摄像面的像的位置关系分析观测对象物的位置的图像分析单元。

3. 如权利要求 1 或 2 中所述的三维位置观测装置，其特征在于：

所述偏转构件是楔形棱镜。

4. 如权利要求 1 或 3 中所述的三维位置观测装置，其特征在于：

所述偏转构件是具有同一倾斜角的两个楔形棱镜，

该两个楔形棱镜以把各倾斜面的倾斜方向相反取向的形式被组合配置。

5. 如权利要求 3 或 4 中所述的三维位置观测装置，其特征在于：

将至少一个该楔形棱镜的倾斜面配置在与摄像面对置的一侧。

6. 如权利要求 1 至 5 中任一项所述的三维位置观测装置，其特征在于：

所述摄像面是摄像单元的受光部。

7. 如权利要求 1 至 6 中任一项所述的三维位置观测装置，其特征在于：

该三维位置观测装置具备荧光显微镜结构。

8. 如权利要求 7 中所述的三维位置观测装置，其特征在于：

所述观测对象物是结合荧光色素在水溶液中存在的微粒子。

9. 如权利要求 1 至 8 中任一项所述的三维位置观测装置，其特征在于：

所述图像分析单元对于摄像面中的多个像独立地计算关于亮度的中心。

10. 如权利要求 1 至 9 中任一项所述的三维位置观测装置，其特征在于：

所述图像分析单元根据摄像面中的多个像的朝向同一方向的移动量求出朝向与摄像面平行的方位的观测对象物的位移。

11. 如权利要求 1 至 10 中任一项所述的三维位置观测装置，其特征在于：

所述图像分析单元根据摄像面中的多个像的朝向相反方向的移动量求出朝向与摄像面垂直的方位的观测对象物的位移。

12. 一种三维位置观测方法，使用配备有包括对焦和光阑机构的透镜系统并将来自观测对象物的光成像在摄像面上的三维位置观测装置，其特征在于，该方法包括以下步骤：

在从观测对象物至摄像面的光路上配置了将该观测光的行进方向改变为多个不同的方向的偏转构件，

利用图像分析单元根据经该偏转构件到达了摄像面的多个像之间的位置关系分析观测对象物的位置。

13. 一种三维位置观测方法，使用配备有包括对焦和光阑机构的透镜系统并将来自观测对象物的光成像在摄像面上的三维位置观测装置，其特征在于，该方法包括以下步骤：

在从观测对象物至摄像面的光路上配置了改变该观测光的一部分的行进方向的偏转构件，

利用图像分析单元根据经该偏转构件到达了摄像面的像和不经偏转构件到达了摄像面的像的位置关系分析观测对象物的位置。

三维位置观测方法和装置

技术领域

本发明涉及观测对象物的三维位置、特别是涉及以高的精度检测显微镜下的微粒子的三维运动的三维位置观测方法和装置。

背景技术

近年来的关于光学显微镜的技术的发展是惊人的，现在达到了能将水溶液中的单个蛋白质分子作为对象进行研究的阶段。之所以能实现这样的发展，是由于全反射照明等光学系统的新技术、各种类型的高灵敏度照相机的开发、光学滤波器特性的提高等的帮助。制定了很多实验的方法，现在正在出现「单分子生理学」这样的新潮流。

例如，对于分子电机或蛋白质分解酶来说，可认为由于基质的结合的缘故而伴随动态的结构变化，该结构变化与功能有密切的关系。

目前越来越要求以分子水平在活体状态下能用显微镜使这样的在单个生物体分子中发生的结构变化可视化的技术。为了将这样的大潮流推进到下一个新的阶段，基于新的视点的革新的方法越来越成为必要。

观察单个分子的蛋白质的方法之一是，以特异的方式用荧光色素对蛋白质加以标记并取得来自该单个荧光色素分子的信号。

荧光显微镜具备组合了照射利用若遇上某个特定波长的光就发出比该光的波长长的光的色素来使荧光色素发光用的激励光的光学系统与观察由此产生的荧光的光学显微镜的结构。

如果使结合了荧光色素的化学药品结合到打算观察的细胞内的结构中，并对该荧光色素分子照射既定波长的光，则作为观察对象的细胞内的结构以暗黑为背景发出荧光。

用一般的荧光显微镜能观察的荧光色素分子的数目在几十个以上，因此不能识别单个荧光色素分子。

这是由于噪声、即来自周围的光信号强度比从单个荧光色素分子得到的光信号强度高。

相对于此，为了提高性能而进行改良，开发了利用滤波器的性质、物镜的品质的提高等能使单个荧光色素分子可视化的荧光显微镜。

为了观察单个荧光色素分子，利用荧光色素分子因消逝场的照明而发出荧光的现象。

具体地说，对包含对象样品的水溶液与玻璃的界面从玻璃一侧以大于等于全反射角的角度照射激光（全反射照明），通过利用作为在界面附近发生的非传播光的消逝场照明对象样品，使荧光色素分子发生荧光。

由于衰逝场关于与边界面垂直的方向以指数函数的方式衰减，因此仅照明接近于边界面的局部区域，故与通常光的照明相比，具有背景光极端地少的优点。

此外，即使在包含对象样品的水溶液中存在多个荧光色素分子这样的条件下，由于在边界面附近的水溶液一侧存在荧光色素分子的概率小，故从除在边界面上固定了的单个目标荧光色素分子以外的荧光色素分子发出的荧光少。因此，背景光或因其它的荧光色素分子的荧光产生的噪声极端地少，可观察来自单个所希望的目标荧光色素分子的荧光。

在利用全反射照明的单个分子观察中，例如用荧光色素使目标的蛋白质或 DNA、作为基质的 ATP 等的生物体分子与玻璃面结合，以作为独立的亮点检测各个单个分子。

而且，为了将来自单个分子的微弱的信号作为二维影像使之图像化，可使用图像增强器或冷 CCD 等的高灵敏度照相机。

本发明者为了实时地检测单个生物体分子的特定部分的结构变化，制作全反射型荧光显微镜进行了观察。

例如，本发明者提出的专利文献 1 的「全反射型荧光显微镜」涉及其技术的基本概念和光学系统，并公开了可观察振动面为任意的方向的色素分子的全反射型荧光显微镜的结构。

专利文献 1：专利 3577514

本发明者提出的专利文献 2 的「全反射型荧光显微镜和照明光学系统」公开了不管与荧光色素分子结合的样品的振动动量方向如何都可观察该对象色素分子的全反射荧光显微镜。

专利文献 2：专利 3671227

这样，虽然迄今为止已经能观察单个生物体分子，但在现有技术中得到的位置信息是二维信息。即，不能得到关于显微镜的物镜上下方向的信息。

如果能观察在显微镜下运动的原子分子的三维位置信息，则可获得准确地检测单个蛋白质分子的位移等的飞跃性的进步。

例如，在与荧光显微镜关联的现有技术中，还有以下的文献。

专利文献 3：日本专利申请特开 2005—37572「荧光显微镜用照明装置和荧光显微镜」

专利文献 4：日本专利申请特开 2000—56233「用于在调整下使显微镜的照射光路中的波长或波长区域聚束化的装置」

专利文献 5：PCT 国家公开特表平 11—513145「具有二重物镜系统的共焦点显微镜」

此外，明视野显微镜法、暗视野显微镜法、相位差显微镜法、微分干涉显微镜法、激光器共焦点显微镜法等显微镜技术的进展也是显著的。但用以前的显微镜观察得到的位置信息是与相当于观测面的滑动玻璃平行的面（x-y 平面）内的二维信息，不能得到与其垂直的方

位（z轴）的位置信息。

发明内容

因此，本发明的目的在于提供一种同时检测观测对象物的三维方向的位置并也有助于以高精度检测在显微镜下运动的单个蛋白质分子的三维运动的三维位置观测方法和实施该方法的装置。

本发明的三维位置观测方法使用配备有包括对焦和光阑机构的透镜系统并将来自观测对象物的光成像在摄像面上的三维位置观测装置，在从观测对象物至摄像面的光路上配置了将该观测光的行进方向改变为多个不同的方向的偏转构件，并利用图像分析单元根据经偏转构件到达了摄像面的多个像之间的位置关系分析观测对象物的位置。

同样，本发明还提出了一种使用配备有包括对焦和光阑机构的透镜系统并将来自观测对象物的光成像在摄像面上的三维位置观测装置的三维位置观测方法，也可在从观测对象物至摄像面的光路上配置了改变该观测光的一部分的行进方向的偏转构件，利用图像分析单元根据经偏转构件到达了摄像面的像和不经偏转构件到达了摄像面的像的位置关系分析观测对象物的位置。

本发明的三维位置观测装置配备有包括对焦和光阑机构的透镜系统，并将来自观测对象物的光成像在摄像面上，该观测装置包括在从观测对象物至摄像面的光路上配置的、用于将该观测光的行进方向改变为多个不同的方向的偏转构件和根据经该偏转构件到达了摄像面的多个像之间的位置关系分析观测对象物的位置的图像分析单元。

同样，本发明配备有包括对焦和光阑机构的透镜系统并将来自观测对象物的光成像在摄像面上的三维位置观测装置，也可包括在从观测对象物至摄像面的光路上配置的、用于改变该观测光的一部分的行进方向的偏转构件和根据经该偏转构件到达了摄像面的像和不经偏转构件到达了摄像面的像的位置关系分析观测对象物的位置的图像分析单元。

在此，使用楔形棱镜作为偏转构件可有助于结构的简化。

可将偏转构件作成具有同一倾斜角的两个楔形棱镜，以把各倾斜面的倾斜方向相反取向的形式来组合配置该两个楔形棱镜，以此方式从而将像简易地分成两个。

将至少一个楔形棱镜的倾斜面配置在与摄像面对置的一侧，可容易简化光学系统的结构。

将摄像面定为摄像机等摄像单元的受光部，可有助于提高图像分析处理的便利性。

在三维位置观测装置中设置荧光显微镜结构，可用于荧光色素的观测。

使用结合至荧光色素并包含在水溶液中的微粒子作为观测对象物，可用于蛋白质等的三

维位移的高精度检测。

可用图像分析单元对摄像面中的多个像独立地计算其亮度的中心，进行运算处理。

如果分析摄像面中的多个像的朝向同一方向的移动量，则可求出朝向与摄像面平行的方位的观测对象物的位移。

如果分析摄像面中的多个像的朝向相反方向的移动量，则可求出朝向与摄像面垂直的方位的观测对象物的位移。

按照本发明，由于在原理上可用埃数量级精度检测微粒子的三维位移，故可实现蛋白质等的动态特征的图像化，有助于阐明分子电机或蛋白质分解酶等的工作原理。

附图说明

图 1 是表示作为本发明实施例的观测装置的主要部分的结构说明图。

图 2 是表示观测对象物朝向 z 方向位移时的像的说明图。

图 3 是表示观测对象物朝向 x 方向位移时的像的说明图。

图 4 是表示观测对象物朝向 y 方向位移时的像的说明图。

图 5 是表示 x 方向的位移与物镜的位移的关系的曲线图。

图 6 是表示了荧光单粒子的朝向 x 方向的时间位移的曲线图。

图 7 是表示了荧光单粒子的朝向 y 方向的时间位移的曲线图。

图 8 是表示了荧光单粒子的朝向 z 方向的时间位移的曲线图。

图 9 是以立体的方式表示了荧光单粒子的时间位移的曲线图。

图 10 是表示输入了矩形波时的 z 方向的位移的曲线图。

具体实施方式

以下根据附图说明本发明的实施方式。

再有，在此举出利用荧光显微镜观察结合荧光色素在水溶液中存在的微粒子的例子，但只要是将样品作为像而使之成像的装置，就可利用于具有任意的照明装置的显微镜。此外，本发明不限于微小的物质，也可适当地应用于大的物体。关于微小物质，例如也可应用于约 10nm 的微粒或单个荧光色素分子。

图 1 是表示作为本发明实施例的观测装置的主要部分的结构说明图，图 2~4 是该装置的作用的示意图。

在多个玻璃板之间保持包含具有荧光色素的观测对象样品的水溶液。

在从观测对象物至 CCD 照相机等的摄像面的光路的中途配置了将该观测光的行进方向改变为多个不同的方向的偏转构件。

在图示的例子中，采用了双楔形棱镜作为偏转构件。一般来说，将楔形棱镜作为光学的隔离用元件来使用。

在本实施例中，两个同一形状的楔形棱镜被组合配置在光路的中央。但是，楔形棱镜的数目不限于两个，可以大于等于3个，也可如后述那样是1个。此外，该多个楔形棱镜的形状也可以不是相同的。

两个楔形棱镜使用具有同一倾斜角的楔形棱镜，以把该两个楔形棱镜的各倾斜面的倾斜方向相反取向的形式来组合配置。再者，最好将该倾斜面配置成处于与照相机对置的一侧。

再有，偏转构件只要是具有改变亮点信号的行进方向的作用的构件即可，也可利用镜子或以电的方式控制光的方向的元件来代替棱镜。

观测对象物在该水溶液中能以三维方式移动。在图1和图2中表示的例子中，表示了沿物镜上下的方位（z轴方向）排列了3种样品位置A~C。在图2中，示意性地表示了观测对象物在朝向与观测面垂直的方向（z方向）位移时摄像面中的2个像的位移。

位于沿物镜上下的方位（z轴方向）的各样品位置A~C的观测对象物的像分别与焦点a~c相对应。

透过了各楔形棱镜的观测光，由于行进方向被改变，故如图示那样被分割而结成两个像。

而且，由于焦点a~c的位置也根据样品位置A~C在相同的方向上偏移，故在照相机的摄像面中两个像也呈现与样品位置A~C对应的位置和形状。

此时，在观测对象物朝向与观测面垂直的方向发生位移时，摄像面中的两个像的亮度的中心朝向反方向对称地位移。

因此，根据该移动量可求出朝向与观测面平行的方位的位移作为相对量。

图3是同样地表示观测对象物朝向与观测面平行的横方向（x方向）位移了时摄像面中的两个像的位移的说明图。

在观测对象物朝向与观测面平行的水平横方向发生位移时（对应样品位置B、D、E），摄像面中的两个像也朝向同一横方向一致地位移。

因此，根据该移动量可求出朝向与观测面平行的方位的位移作为绝对量。

此时，对于照相机的摄像面中的各像的位置来说，利用图像分析独立地计算并求出关于亮度的中心。

图4表示观测对象物朝向与观测面平行的垂直纵方向（y方向）位移了时摄像面中的两个像的位移的说明图。

在该情况下，与上述同样，由于在观测对象物朝向与观测面平行的纵方向发生位移时（对

应样品位置 B、F、G)，摄像面中的两个像朝向同一纵方向一致地位移，故根据该移动量可求出朝向与观测面平行的方位的位移作为绝对量。

图 5 是表示 x 方向的位移与物镜的位移的关系的曲线图。实线表示了代表性的实验值的一个例子，点线表示了平均值。

为了求出 z 方向的位移的绝对量，通过使物镜上下移动间接地求出物镜位移与 x 方向的位移的关系。

即，对于在观测面上固定了的荧光粒子，使物镜逐次各移动 $0.1\mu\text{m}$ ，测定了两个像位置的相对变化。其结果，在本实施例中，得到了与「x 方向的相对位移 = $0.46 \times z$ 方向的位移」的关系。

利用该系统，进行了布朗运动的分析。

图 6~8 是分别表示了 8 秒间的直径 $0.5\mu\text{m}$ 的荧光单粒子的朝向 x、y、z 方向的位移的曲线图。图 9 是以三维立体的方式表示了该位移的曲线图。每 33ms 对图 9 中的点进行了作图。

由此，以三维方式检测了布朗运动的粒子的轨迹。

图 10 是表示输入了振幅 20nm、频率 0.5Hz 的矩形波时的 z 方向的位移的曲线图。

在使荧光单粒子吸附在玻璃面上的状态下，在求出了位置精度时，在 x-y 方向上得到了 ~4nm 的值，在 z 方向上得到了 ~15nm 的值。根据这些结果可明白，在与观测面平行的方位中能以三维方式以纳米数量级检测荧光单粒子的运动，在与观测面垂直的方位中能以三维方式以 10 纳米数量级检测荧光单粒子的运动。

此外，按照本发明，也有可从一幅摄像图像得到三维的位置信息的优点。

如果保持台的稳定性、加长一幅摄像的曝光时间并提高摄像数据的过滤性，则能以埃数量级的精度得到位置信息。

可不一定必须如上述那样地设置多个楔形棱镜。虽然可使用多个楔形棱镜，但可不使全部的观测光透过棱镜，而是生成不使其偏转地直进的观测光。

在该情况下，与上述的情况同样，在摄像面中可检测两个像的位移。因此，根据经偏转构件到达了摄像面的像和不经偏转构件到达了摄像面的像的位置关系可分析观测对象物的位置。

与上述实施例的差别是下述的两点，一点是光学元件变得简便，另一点是摄像面中的两个像的相对距离减少为一半。

按照本发明，能够以简易的结构得到观测对象物的三维位置信息。如果使用由荧光单粒子得到的标识，则本发明可应用于所有的蛋白质，并能以埃数量级的精度跟踪单个分子的动

态行为。

由此，能够实时地以三维方式显示生物体分子的结构变化，成为促进单分子生理学的推进力，用途广泛并在产业上是非常有用的。

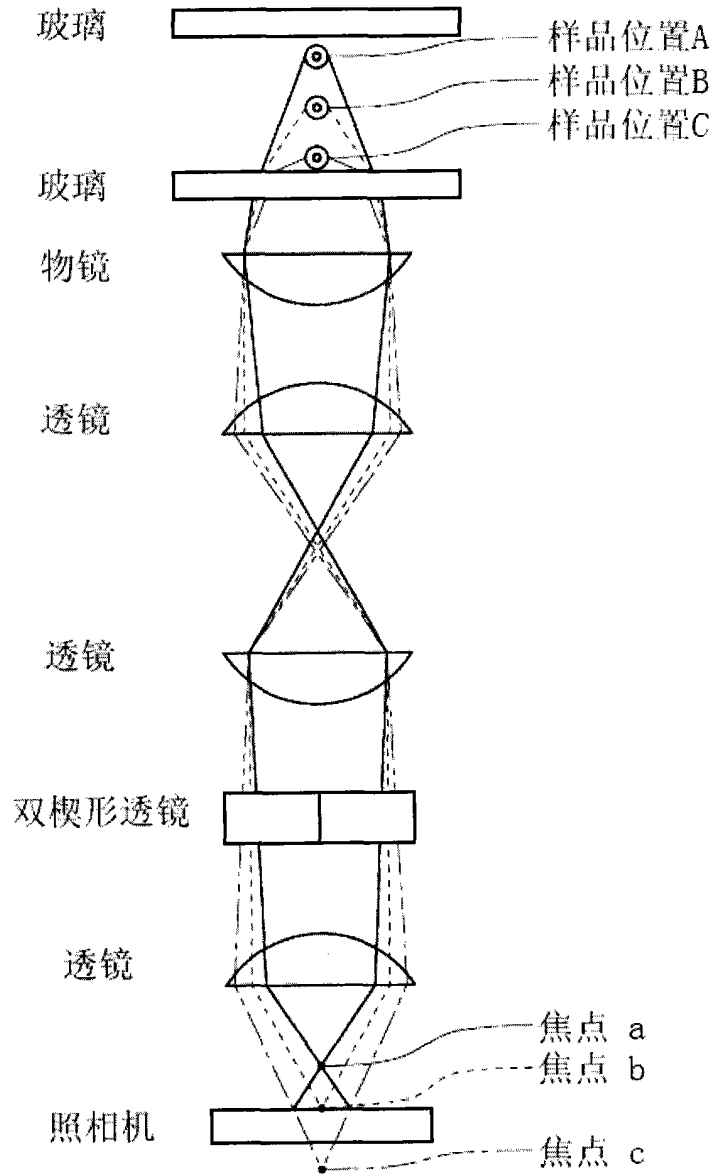


图1

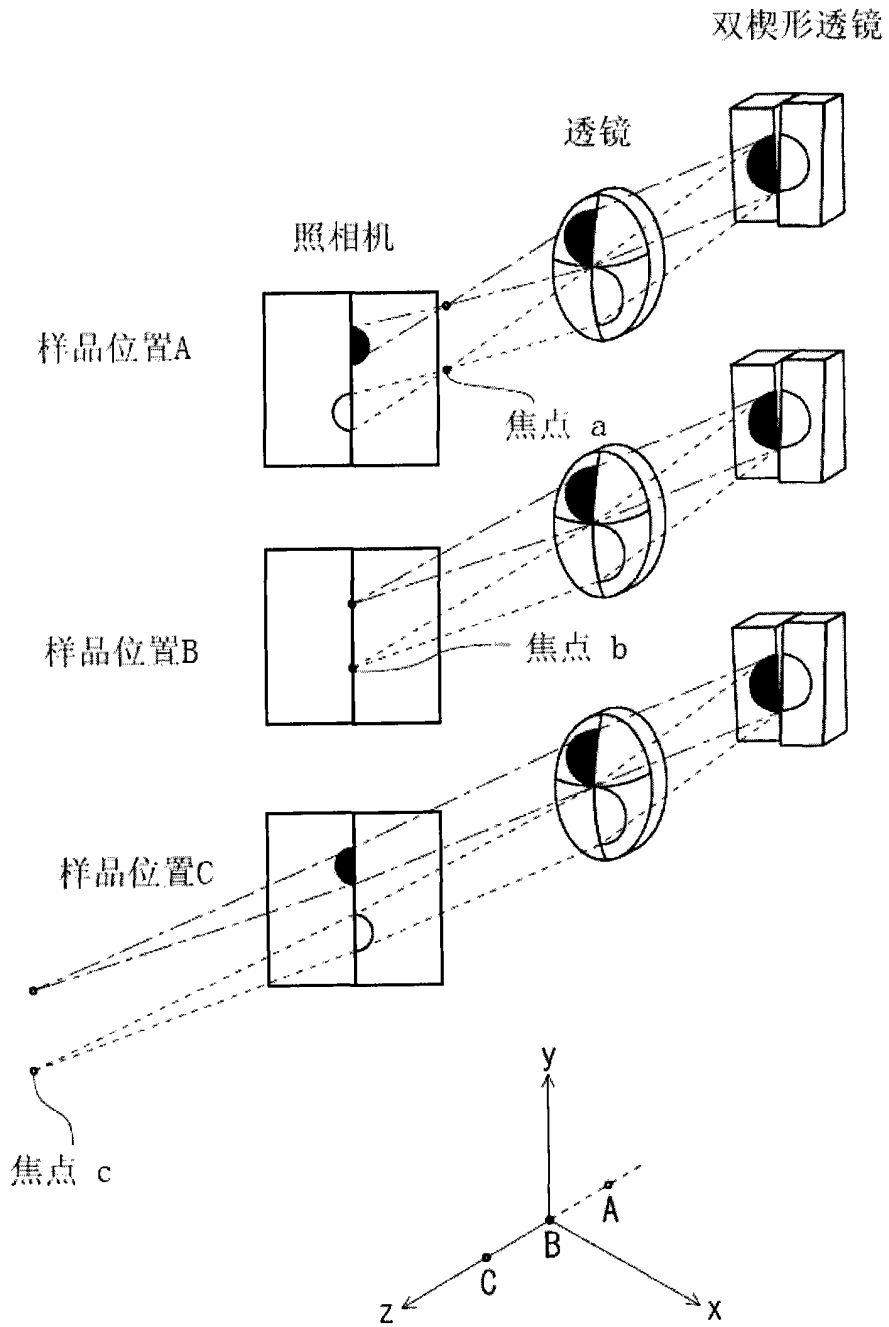


图2

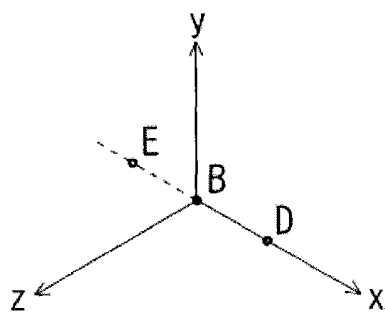
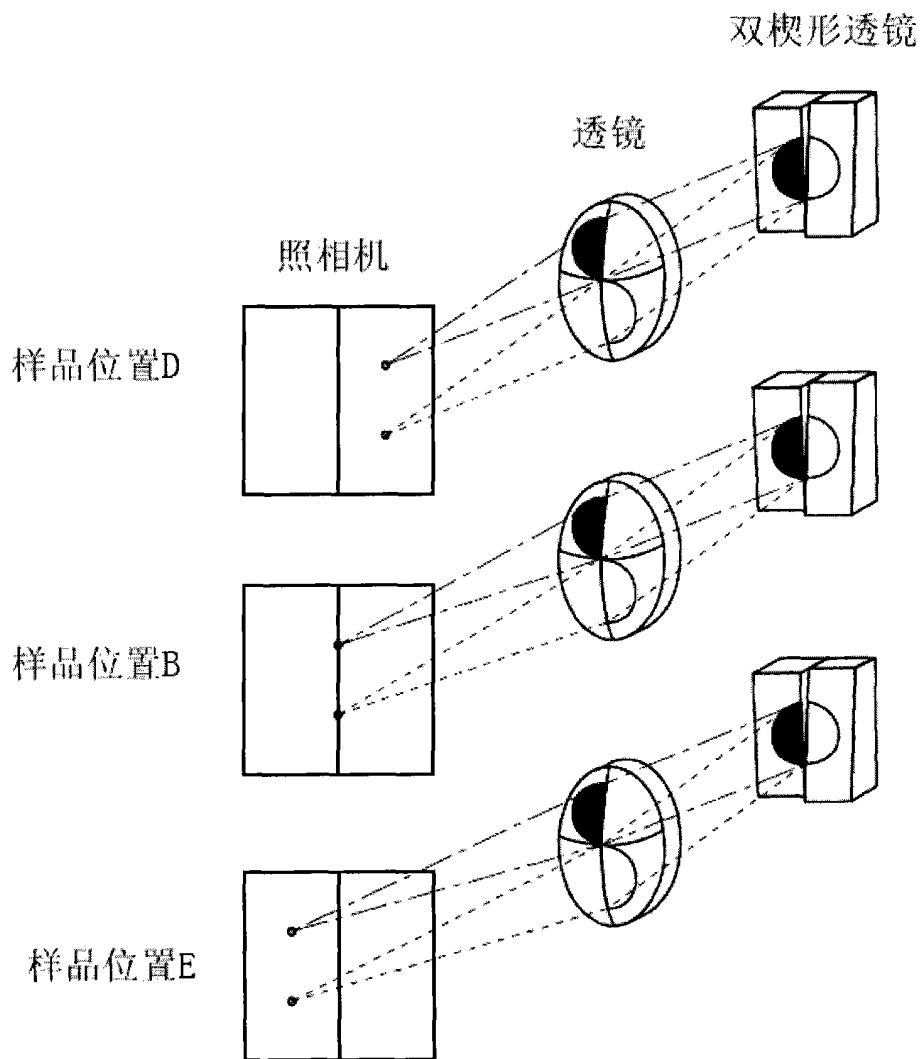


图3

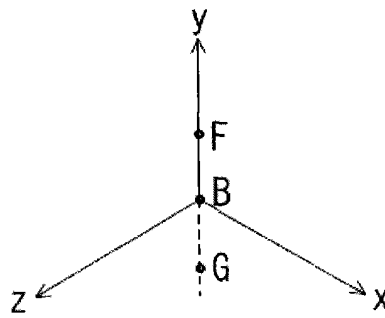
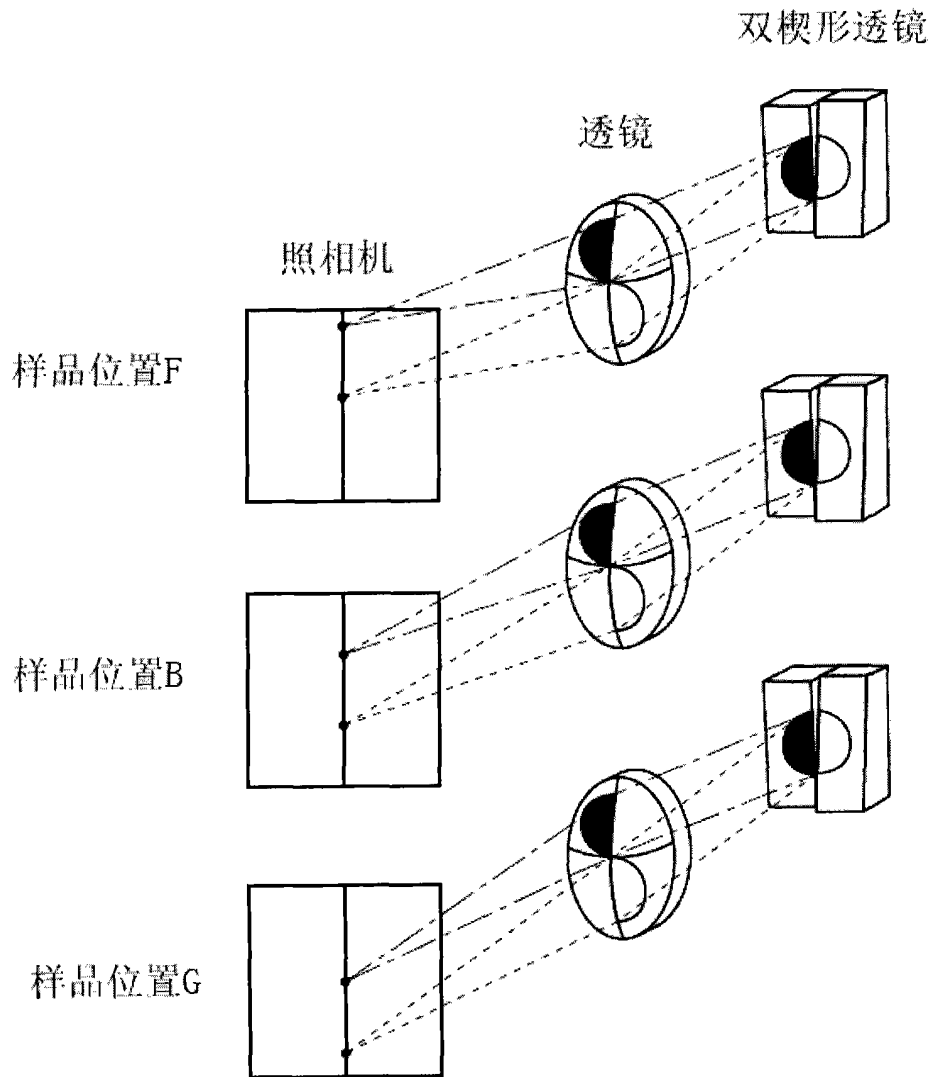


图4

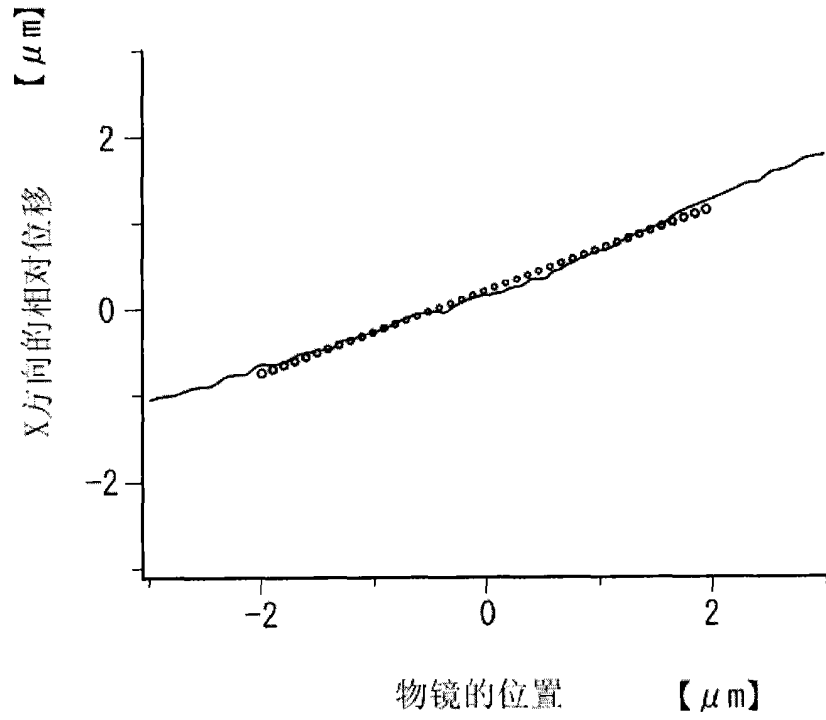


图5

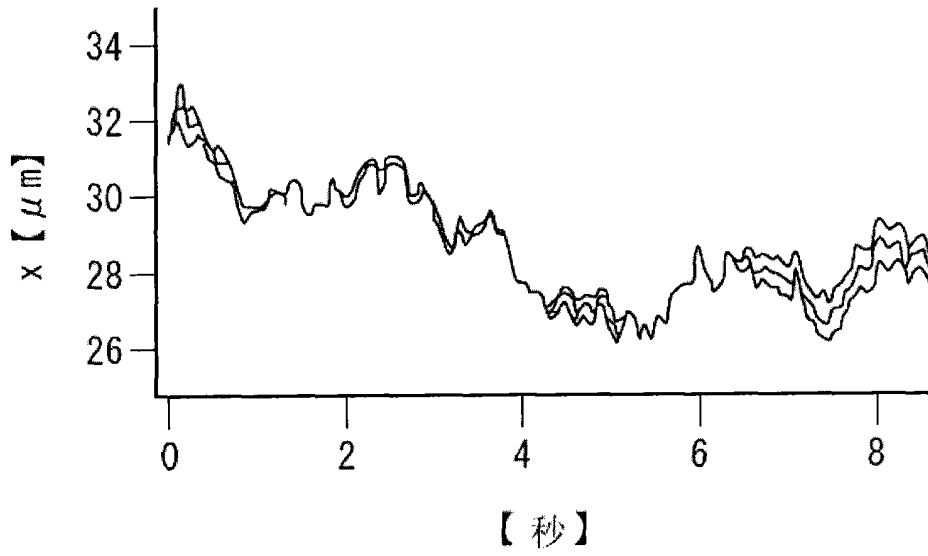


图6

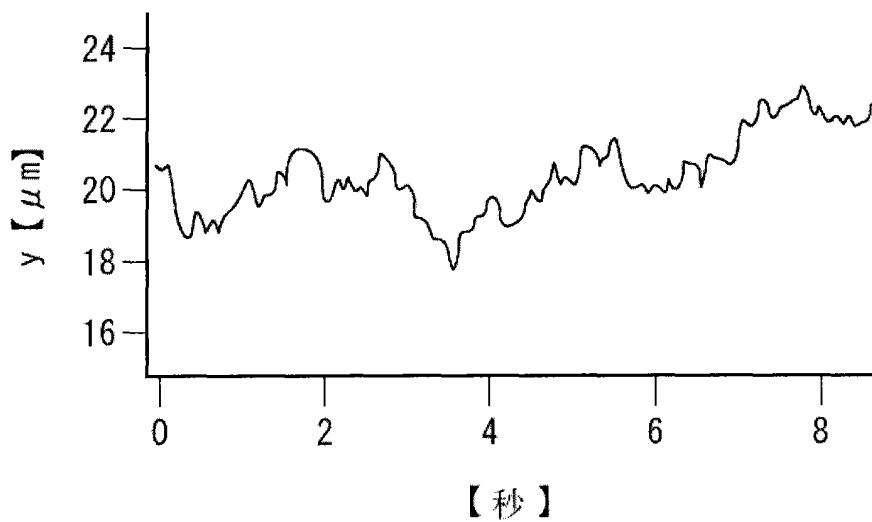


图7

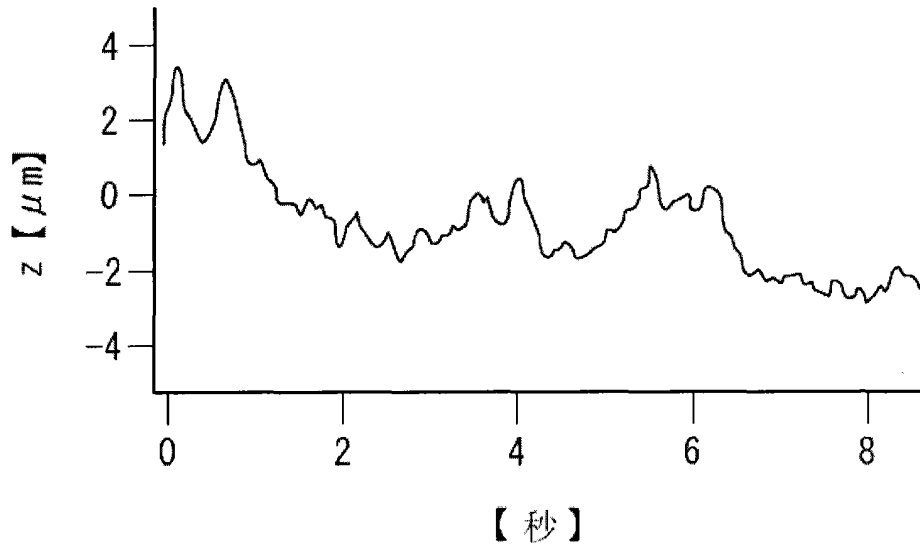


图8

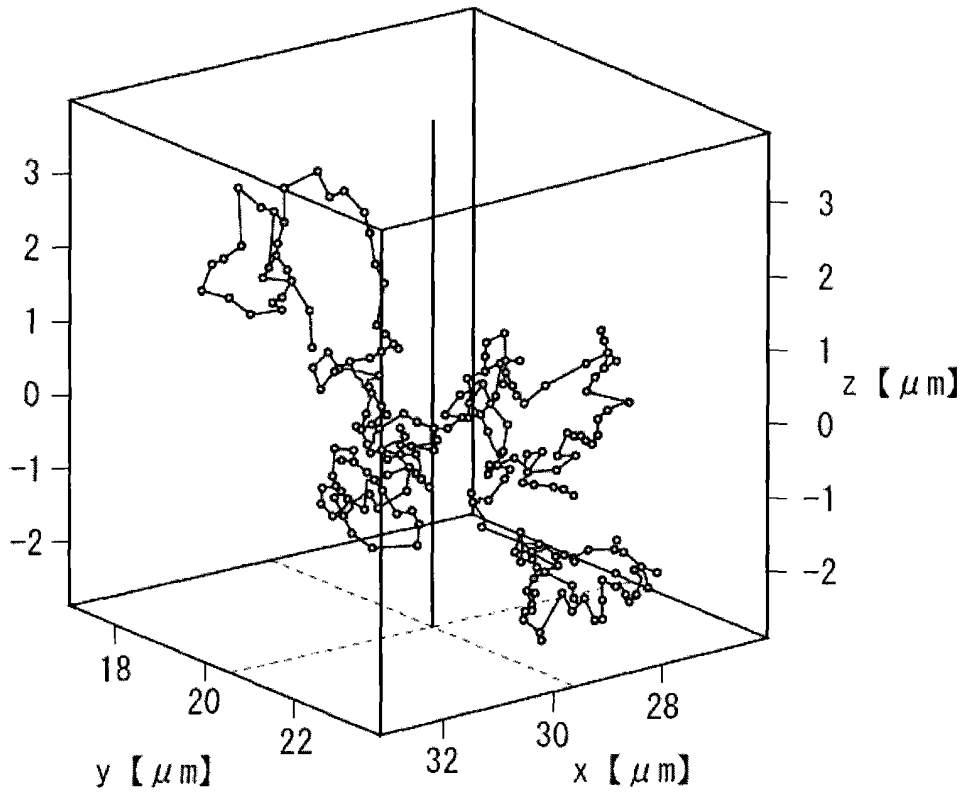


图9

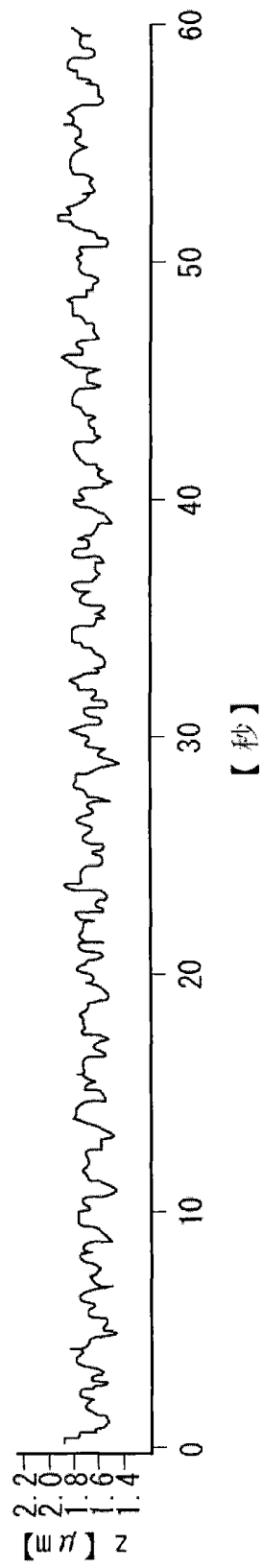


图10