



中华人民共和国国家标准

GB/T 44268.3—XXXX/ISO 19056-3:2022

显微镜 照明特性的定义和测量 第3部分： 使用非相干光源的入射光荧光显微术

Microscopes — Definition and measurement of illumination properties —
Part 3: Incident light fluorescence microscopy with incoherent light sources

(ISO 19056-3: 2022, IDT)

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件为GB/T 44268《显微镜 照明特性的定义和测量》的第3部分。GB/T 44268分为以下三个部分：

- 第1部分：明场显微镜的图像亮度和均匀性；
- 第2部分：明场显微镜中与颜色有关的照明特性；
- 第3部分：使用非相干光源的入射光荧光显微术。

本文件等同采用ISO 19056-3:2022《显微镜 照明特性的定义和测量 第3部分：使用非相干光源的入射光荧光显微术》。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国机械工业联合会提出。

本文件由全国光学和光子学标准化技术委员会（SAC/TC103）归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

显微镜 照明特性的定义和测量 第 3 部分：使用非相干光源的入射光 光荧光显微术

1 范围

本文件规定了入射光荧光显微术中照明亮度、时间稳定性和均匀性的测量程序。当图像平面或中间图像平面适合电子成像设备检测时，均匀性的测量仅在这些平面上进行。

本文件规定了如何测量照明亮度、时间稳定性和均匀性、以及如何向用户提供这些信息。

注：本文件的适用范围仅限于电子成像设备和(中间)图像平面。如果通过目镜进行目视测量，则需要采用不同的测量程序，这会导致测量程序的描述不清晰。尽管如此，本文件仍能为目视观测提供参考依据，例如，当使用目镜观测中间图像平面时（该场景属于本文件的范围），仍可获得有价值的参考数据。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

ISO 和 IEC 维护术语数据库用于标准化在以下地址：

——ISO 在线浏览平台：可在 <https://www.iso.org/obp>

——IEC 电子百科：可在 <https://www.electropedia.org/>

4 测量参量

4.1 总则

在使用光学显微镜时，为了获得理想的图像质量，图像的亮度、时间稳定性和均匀性指标至关重要，这些指标适用于各类应用场景和各种类型的仪器，其中照明亮度和均匀性指标是必须测量的，而时间稳定性指标只适用于某些类型的光源(如弧光灯)，因此该指标的测量是可选的。

4.2 照明亮度

照明的亮度应足够明亮，以便能够检测到被测物体的细节。

由于本文件以测量程序为基础，图像亮度应以相应的国际单位制（SI）单位表示。应采用辐射单位辐照度，因为该单位非常适合荧光显微镜使用的单色或窄带照明光谱范围。

辐照度用公式(1)表示：

$$E = \frac{P}{A} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

E —— 单位面积上的平均辐照度，单位为瓦每毫米平方（W/mm²）；

P —— 功率计记录的辐射通量，单位为瓦（W）；

A —— 所用单位面积，单位为毫米平方（mm²）。

4.3 时间稳定性

4.3.1 总则

辐射通量的时间稳定性是进行时间序列实验的一个重要因素。如果实验结果是由图像亮度的变化而得出的，则任何由于时间不稳定性引起的照明亮度变化都不应影响这些结果。

时间稳定性应至少在一个不同的时间尺度上进行表达。

4.3.2 辐射通量的短期稳定性

辐射通量的记录时间间隔为5min，在此时间间隔内，功率计的探测器被连续照明，并每秒记录一次功率读数。辐射通量的短期稳定性 S_{short} 用公式(2)的百分比表示：

$$S_{\text{short}} = 100 \times \left(1 - \frac{P_{\text{max}} - P_{\text{min}}}{P_{\text{max}} + P_{\text{min}}} \right) \quad (2)$$

式中：

S_{short} —— 短期稳定性的百分比；

P_{max} —— 在5min的时间间隔内记录的最大辐射通量；

P_{min} —— 在5min时间间隔内记录的最小辐射通量。

注意，光源应确保在5min的完整时间间隔内持续开启，因为有些光源仅在实际图像采集时才会启动。

4.3.3 辐射通量的长期稳定性

辐射通量的记录时间为120 min，在此时间内，功率计的探测器每30s点亮一次，每次持续1s。每次点亮期间，系统会记录功率读数。辐射通量的长期稳定性 S_{long} 用公式(3)的百分比表示：

$$S_{\text{long}} = 100 \times \left(1 - \frac{P_{\text{max}} - P_{\text{min}}}{P_{\text{max}} + P_{\text{min}}} \right) \quad (3)$$

式中：

S_{short} —— 短期稳定性的百分比；

P_{max} —— 在120min的时间间隔内记录的最大辐射通量；

P_{min} —— 在120min时间间隔内记录的最小辐射通量。

4.4 均匀性

显微镜的光学系统应确保图像均匀性，以便清晰呈现被测物体的细节。若图像亮度在边缘区域急剧下降，将导致亮度值不足，无法满足上述要求。

此外，在图像场上图像亮度的空间变化并不总是与被测物体属性的空间变化区分开来。

图像场中亮度 U 的均匀性用公式(4)的百分比表示：

$$U = 100 \times \frac{B_{\text{IF},\text{min}}}{B_{\text{IF},\text{max}}} \quad (4)$$

式中：
 U ——图像场中亮度的均匀性，以百分比表示；
 $B_{IF,min}$ ——图像场中的最小亮度；
 $B_{IF,max}$ ——图像场中的最大亮度。

注：根据图像场的大小、物镜放大率和传感器像素的大小，在计算均匀性时可能需要使用合适的平均方法。

5 测量程序

5.1 总则

除了定义测量的几何形状和程序外，还需要描述显微镜的基本设置，以消除它们对测量照明亮度、时间稳定性和均匀性的影响。

5.2 显微镜设置

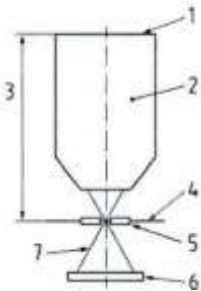
显微镜应按照激发波长（波段）、分色滤光片和/或发射滤光片的预期配置进行设置。
如果显微镜提供可调的视场光阑，则应将其调至5.5中成像传感器视场被完全照亮的最小光阑值。
如果显微镜提供可调孔径光阑，则应将其调至所使用的物镜孔径被充满的最小光阑。

为了测量照明亮度和时间稳定性，应根据制造商说明进行预热。如果制造商没有规定预热时间，则应在测量前至少预热1h。应将照明设备的输出亮度调至最大值，若测量时使用滤光片消光，则应明确标注该滤光片。

5.3 照明亮度

使用一个10×的物镜和一个校准功率计进行测量，将功率计的检测区域设置为略低于光强的分布区域。功率计的检测范围应在线性范围内，且功率计的探测器不应达到饱和状态。功率计的积分时间应控制在0.2s~1s之间。

物镜的焦平面应包括一个直径为（0.4±0.1）mm的圆形中心光阑。图1显示了测量过程中功率计的位置。



- 标引序号说明：
- 1——物镜定位面；
 - 2——10×物镜；
 - 3——物镜的对焦距离；
 - 4——焦平面；
 - 5——圆形光阑；
 - 6——功率计检测区域；
 - 7——边缘光线。

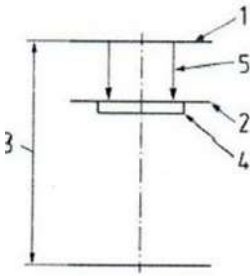
图1 测量时功率计的位置

注1：由于光阑面积的实际测量值会按4.2中的照明亮度计算，直径不需要有一个严格的公差。

注2：如果不使用光阑，辐射通量的测量值仍可用于对同一仪器在不同时间点的测量值。

5.4 时间稳定性

测量时使用 10 倍物镜和功率计，将功率计的检测区域置于光线不足的位置。功率表的检测范围应处于线性测量区间。如果无法使用 10×的物镜，则应在不使用物镜的情况下进行测量，此时应将功率计放置在照明光阑的位置并移除物镜。功率计应固定安装在物镜或物镜端面的对应位置。测量过程中应消除外部干扰因素，例如室温的变化或环境照明条件的变化。图 2 展示了不使用物镜时功率计的安装位置。



- 标引序号说明：
- 1——物镜定位面；
 - 2——照明光阑位置；
 - 3——对焦距离；
 - 4——功率计检测区域；
 - 5——照明边缘光线（箭头表示传播方向）。

图2 不使用物镜时功率计的安装位置

5.5 均匀性

应使用能够捕获指定图像场的电子图像传感器进行均匀性的测量。该电子图像传感器应由至少50行和列的像素单元（像素）组成。此外，图像传感器的设计应确保入瞳位于无限远处。

如果显微镜的机械设计不允许将图像传感器放置在图像场的平面上，则不应使用测量装置中的辅助光学设备。在这种情况下，不能根据本文件来测量均匀性值。

该图像传感器不需要以辐照度单位进行校准，因为它的输出可以与4.2中描述的亮度测量相关联。然而，为了保持辐照度和传感器信号之间的线性关系（因此 $\gamma=1$ ），不对来自图像传感器的信号应用伽马校正。

样品应为均匀的荧光试样，例如荧光标记物溶液或宽带荧光聚合物载玻片。标记物的溶液通常比固体样品更好，因为扩散作用会使物场中的漂白荧光团被未漂白的荧光团取代。

在进行测量时，应确保记录的完整数据来自试样的均匀荧光区域，以避免因光学系统曲率场或试样倾斜等因素导致的误判。信噪比应足以清楚地确定均匀性。当照明亮度增加至少1, 5倍时，如果均匀性变化小于5个百分点，则认为信噪比足够。

均匀性测量的示例见表1，其中信噪比足以确定均匀性。

表1 均匀性测量的示例

照明亮度 任意单位， 例如 “%” 或 “W/mm² ”	均匀性 U %	信噪比足以确定均匀性
------------------------------------	-----------------	------------

10	65	—
15	72	没有
22.5	75	是
33.75	76	是

5.6 光谱信息

照明亮度和均匀性的测定应参照特定光谱范围。该光谱范围应以最大亮度对应的波长为基准，并标注亮度达到最大值50%的两个波长。若存在多个波长可达到50%亮度值，则应同时标注所有相关光谱范围。该光谱信息既可通过物镜焦平面实测获得，也可以根据各个元件（光源、滤光片、光学元件的透射率）的理论值计算得出。具体示例详见附录A。

6 提供给用户的信息

如果向用户提供了照明特性信息，则应提供照明亮度和均匀性信息。时间稳定性信息是可选的。应根据4. 2、4. 3和4. 4中给出的定义提供信息，并应包含以下附加数据：

- a) 关于图像场的尺寸和形状的信息；
- b) 显微镜配置的信息，特别是附加的光学元件（如滤光片、物镜等）。这些元件可由用户更换，在测量照明亮度时这些元件本身是光路的一部分；
- c) 关于所使用的照明光源类型及其相关参数（光谱特性、电压或电流等）的信息；
- d) 显微镜的视场和孔径光阑设置；
- e) 报告中包含测量的照明亮度和均匀性所涉及的光谱范围信息；

光谱范围应至少包括下列波长范围之一：

- (385±25) nm；
- (475±25) nm；
- (550±30) nm；

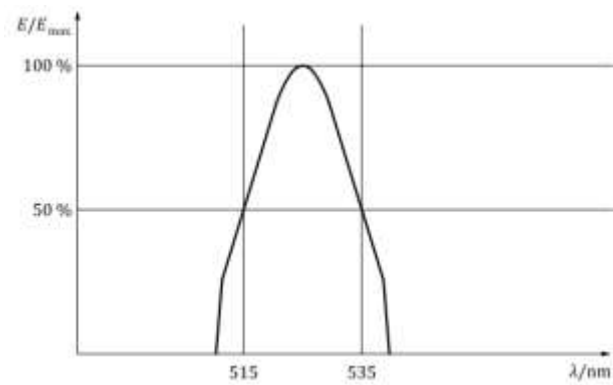
注：所列的波长范围可以包括比这里所指示的更多或其他波长范围。

向用户提供的信息示例见附录A。

附录 A
(资料性)
示例

A.1 光谱信息

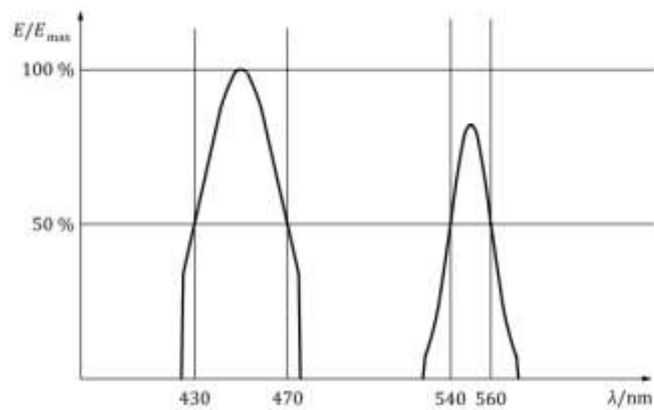
图 A.1 展示了显微镜光谱辐照度的示例（包括光源、滤光片及光学元件的透射率）：



标引符号说明：
 λ ——波长，单位为纳米（nm）；
 E/E_{\max} ——辐照度比；
注：根据本文件得出的光谱范围为：（525±10）nm。

图A.1 光谱辐照度示例 1

图A.2展示了显微镜的光谱辐照度示例（包含光源、滤光片及光学元件的透射率）：



标引符号说明：
 λ ——波长，单位为纳米（nm）；
 E/E_{\max} ——辐照度比；
注：根据本文件得出的光谱范围为：（450±20）nm和（550±10）nm。

图A.2 光谱辐照度示例 2

A.2 提供给用户的信息

信息示例如下：

- 照明亮度：1 W/mm²；
- 短期时间稳定性：95 %；
- 长期时间稳定性：80 %；
- 均匀性：80 %

在以下条件下：

- 图像场为边长 13.3mm 的正方形；
- 直立显微镜（123123¹⁾）带有成像管 1×（123234）和相机适配器 1×（123345）；
- 物镜 PLAN APO 10×/0.50（123456）；
- 滤光片组 DAPI（123567）；
- 氙气放电灯 200 W（123678）；
- 视场光阑设置：10；
- 孔径光阑设置：100 %；
- 光谱范围：（365 ± 10）nm。

1) 123xxx是各部件的零件编号示例。