

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 787 999**

51 Int. Cl.:

**G01N 21/27** (2006.01)

**G02B 21/00** (2006.01)

**G01N 21/64** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2006 E 06111147 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020 EP 1703273**

54 Título: **Equipo de calibración multifuncional y kit así como sus usos para la caracterización de sistemas de medición de luminiscencia**

30 Prioridad:

**18.03.2005 DE 102005013229**

**11.10.2005 DE 102005049364**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**20.10.2020**

73 Titular/es:

**BAM BUNDESANSTALT FÜR  
MATERIALFORSCHUNG UND -PRÜFUNG  
(100.0%)**

**Unter den Eichen 87  
12205 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**RESCH-GENGER, UTE;  
HOFFMANN, KATRIN;  
NITSCHKE, ROLAND y  
ENGEL, AXEL**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 787 999 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Equipo de calibración multifuncional y kit así como sus usos para la caracterización de sistemas de medición de luminiscencia

5 La invención se refiere a un equipo de calibración multifuncional para la caracterización de sistemas de medición de luminiscencia, en particular de sistemas de obtención de imágenes de resolución espectral, amplio campo y/o confocales, a un kit que comprende el equipo de calibración multifuncional así como usos del equipo de calibración o del kit.

10 Los aparatos de medición de fotoluminiscencia se componen de un canal de excitación, que contiene, entre otras cosas, una fuente de luz de excitación y un elemento constructivo óptico de selección de longitud de onda, y un canal de emisión generalmente dispuesto en ángulo recto con respecto a la trayectoria del haz de la luz de excitación, con el que se registra la luz emitida por el cromóforo que se encuentra en el espacio de muestra después de la absorción de luz (fotoluminiscencia). Una parte definida de la luz de excitación a menudo se acopla a través de un divisor de haz con un canal de referencia que contiene un elemento constructivo óptico como un espejo o un difusor y un detector (de referencia). Con el canal de referencia se registra la intensidad de luz de excitación actual en la longitud de onda de excitación, para detectar así fluctuaciones a corto plazo de la intensidad de la luz de excitación.

15 La publicación US 2003/015668 A1 describe dispositivos, procedimientos y herramientas para microscopía de fluorescencia cuantificada. El documento WO 2004/065995 A describe marcas de identificación y un objetivo de enfoque. El documento US 6 407 858 B1 describe el enfoque de microscopios y la lectura de micromatrices. El documento US 2005/0030601 A1 divulga un sistema y un procedimiento para la calibración de instrumentos con un patrón de calibración.

20 Cada tecnología de medición de luminiscencia proporciona datos de medición que se componen de contribuciones analíticas y específicas del aparato. Las contribuciones específicas del aparato no deseadas reflejan la dependencia de la longitud de onda y de la polarización de los componentes del aparato del aparato de medición usado. En particular son responsables de estas dependencias los elementos constructivos ópticos contenidos en el canal de excitación y emisión del aparato, la fuente de luz de excitación y los sistemas de detección empleados. La comparabilidad de datos de luminiscencia más allá de los límites del aparato y del laboratorio, la detección del envejecimiento del aparato, el requisito de trazabilidad de los datos de luminiscencia a los estándares primarios radiométricos (de acuerdo con el requisito general en la norma EN ISO / IEC 17025), así como muchas declaraciones de fluorescencia cuantitativas, la determinación de los rendimientos cuánticos de fluorescencia relativos y la optimización de métodos de luminiscencia requieren la determinación de estas contribuciones específicas del aparato. Esto se cumple en particular para evaluaciones comparativas de perfiles de luminiscencia desplazados espectralmente o para mediciones de emisiones a distintas longitudes de onda de excitación.

25 El registro de las contribuciones específicas del aparato mencionadas anteriormente a la señal de fluorescencia pueden tener lugar determinando las denominadas funciones de corrección de emisión y excitación, que describen la sensibilidad espectral de los sistemas de detección utilizados y la dependencia de la longitud de onda de la iluminancia espectral o la intensidad de la luz de excitación en la ubicación de la muestra para la emisión y el canal de excitación del aparato respectivo. Además, la determinación de la linealidad de los sistemas de detección es en general importante en el caso de los sistemas de medición de fluorescencia, en particular para la calibración del aparato y las mediciones cuantitativas de fluorescencia, la caracterización de la estabilidad y el rendimiento a largo plazo del aparato ("day-to-day performance"), la homogeneidad de la iluminación y la posibilidad de comparar datos de medición entre sí más allá de los límites del aparato y del laboratorio. En el caso de sistemas de formación de imágenes (confocales o de campo amplio) de resolución espectral (sistemas de obtención de imágenes), que se emplean generalmente PMT como detectores, más raramente detectores basados en CCD, tienen que determinarse además parámetros de aparato como la homogeneidad de la iluminación, la resolución espectral y espacial (x, y, z). Un campo de uso importante de microscopios confocales con detectores de resolución espectral es la separación píxel por píxel de las emisiones de colorante superpuestas en preparaciones marcadas con fluorescencia múltiple. Para comprobar la robustez frente a interferencias, tales como relaciones de señal / ruido escasas y precisión de cuantificación a concentraciones muy diferentes, no hay hasta el momento preparaciones estándar.

35 Se conoce el uso de estándares de transferencia físicos certificados para registrar los efectos específicos del aparato. Los estándares certificados del receptor se usan típicamente a este respecto para calibrar el canal de excitación, y las lámparas estándar se usan para calibrar el canal de emisión. Para el uso de estándares de transferencia físicos son desventajosos los buenos conocimientos ópticos del usuario requeridos para la aplicación, recalibraciones costosas, variaciones dependientes del tiempo de combustión en la intensidad específica de radiación espectral de lámparas estándar, y en el caso de la corrección de emisiones con lámparas estándar, las diferentes características de emisión de la lámpara y la muestra y las intensidades específicas de radiación espectral del estándar de transferencia y una muestra luminiscente típica que difieren en al menos más de tres órdenes de magnitud. Los llamados contadores cuánticos también se utilizan para la corrección de la excitación. Estas son

soluciones colorantes altamente concentradas, que absorben por completo los cuantos de luz incidentes y los emite con un rendimiento cuántico de fluorescencia independiente de la longitud de onda. Los contadores cuánticos proporcionan datos de medición dependientes de la concentración y de la geometría y son susceptibles además a los efectos de polarización. Procedimientos de calibración estandarizados con concentraciones definidas en combinación con geometrías de medición definidas no están disponibles para contadores cuánticos.

También se conocen los llamados estándares de fluorescencia, que normalmente se basan en la fotoluminiscencia de un compuesto químico. Estándares de fluorescencia espectrales o los denominados estándares de emisión y excitación con espectros de emisión o excitación conocidos, corregidos (para efectos específicos del aparato) se pueden usar para determinar las características espectrales de los sistemas de medición de fotoluminiscencia en el contexto de una calibración del aparato. Tales estándares de fluorescencia se emplean en distintas formas, en particular en forma de soluciones o incrustados en matrices de polímero sólido o de vidrio. La ventaja de los estándares de fluorescencia es que son muy similares a las muestras luminiscentes que van a examinarse en cuanto a su intensidad de luminiscencia y características de emisión. Los estándares de fluorescencia permiten así la calibración (espectral) en las condiciones utilizadas en las mediciones de muestra típicas. Los estándares de fluorescencia se pueden encontrar en muchos tipos diferentes de aparatos, formatos y geometrías de medición y, por lo tanto, también son adecuados para la calibración de sistemas de medición de fluorescencia con geometrías o formatos de muestra especiales, por ejemplo con microcubetas, placas de microtitulación o sistemas de criostato. Los patrones de fluorescencia por sí solos permiten que la calibración se realice en la misma disposición de cubeta y de medición que la medición de muestra real y, por lo tanto, ofrecen de esta manera resultados de calibración óptimos. El requisito previo para la idoneidad de un estándar de transferencia es la caracterización completa de todas las propiedades relevantes para la aplicación, incluido el método usado y la indicación de la incertidumbre de medición y suficiente estabilidad a largo plazo en estado sólido, puro y en solución o incrustado en una matriz.

Numerosas recomendaciones sobre estándares de fluorescencia se discuten ampliamente en la bibliografía especializada, también sobre estándares de emisión y excitación, así como sobre estándares de eficiencia cuántica de fluorescencia (por ejemplo, U. Resch-Genger et al., *J. Fluoresc.* 2005, 15(3), 315 y sig.; U. Resch-Genger et al., *J. Fluoresc.* 2005, 15(3), 337 y sig. Dihidrato de sulfato de quinina (SRM936) ha sido hasta ahora el único estándar de emisión cuyo espectro de emisión corregido por un instituto estatal, en este caso por el National Institut for Standards and Technology (NIST, USA), con un fluorómetro de referencia trazablemente caracterizado con incertidumbre de medición conocida (R.A. Velapoldi, K.D. Mielenz, *NBS Spec. Publ.* 1980, 260-264, PB 80132046, Springfield, VA). Solo con respecto a este estándar se encuentran disponibles datos sobre la pureza de colorante, calibración del espectrómetro utilizado, parámetros de medición usados y para la incertidumbre de medición. Para calibrar un sistema de medición de fotoluminiscencia en todo el intervalo espectral UV / vis / NIR, es por lo tanto, necesario la combinación de varios cromóforos que estén coordinados entre sí con respecto a sus espectros de fluorescencia. Hasta el momento hay muy pocos ejemplos de combinaciones estándar. Por ejemplo, se conoce una combinación de estándares de emisión, que se componen de películas de polímeros que contienen fluoróforo con espectros de emisión certificados por NIST (A. Thompson, K. L. Eckerle, *SPIE* 1989, 1054, 20. J.W. Hofstraat & M.J. Latuhihin, *Appl. Spectrosc.* 1994, 48, 436). Además bloques de poli(metacrilato de metilo) que contienen fluoróforos en forma de cubeta también se conocen como estándares de emisión y excitación. Un planteamiento estadístico para vincular las funciones de corrección parcial de diferentes estándares de colorante a una función de corrección general utilizando una estadística de tasa de recuento (estadística de Poisson) se describe por J.A. Gardecki y M. Maroncelli (*Appl. Spectrosc.* 1998, 52 1179).

Algunas sustancias presentan fotoestabilidades demasiado bajas y forman fotoproductos con sus propias contribuciones espectrales en condiciones típicas de excitación y medición. Esto se cumple especialmente para su uso en aparatos con altas intensidades de iluminación, en particular en sistemas de medición basados en láser y para microscopios de fluorescencia confocales. La baja estabilidad térmica y fotoquímica de la mayoría de los estándares de fluorescencia concebidos para aplicaciones macroscópicas limita su uso para microscopios. Muchas sustancias utilizadas presentan una anisotropía de fluorescencia demasiado grande, lo que significa una fuente adicional de error en la calibración y requiere el uso de polarizadores. En general, los espectros indicados no son trazables, faltan datos sobre la incertidumbre de medición y los espectros solo están certificados por un organismo autorizado en casos excepcionales (dihidrato de sulfato de quinina). En muchos casos, la caracterización de las propiedades espectroscópicas relevantes para la aplicación es incompleta y en la mayoría de los casos falta información sobre la pureza del colorante.

Además de la necesidad insatisfecha de estándares de colorante adecuados para la calibración espectral y cuantitativa de los sistemas de medición de fotoluminiscencia, existen otros obstáculos para la caracterización del aparato en el caso de los sistemas de imagen espectral confocal. En particular, diferentes ajustes de enfoque de diferentes usuarios conducen a que la medición se lleve a cabo a diferentes profundidades de muestra. Esto conduce a influencias espectrales apenas reproducibles y de artefactos, que se provocan, por un lado, por los efectos de pared del recipiente y, por otro lado, por los efectos de extinción interna del colorante. Por el documento 6.635.487 B1 se conoce un dispositivo para la calibración de sistemas de medición de fluorescencia con cámaras de muestra de microfluidos, que hace uso de un estándar fluorescente de cuerpo sólido. El haz de medición se enfoca fuera de la muestra con una hendidura. El documento US 2003/0030797 A describe un dispositivo para la calibración

de lectores de fluorescencia para placas de microtitulación, prevé el uso de estándares fijos de fluorescencia en las cavidades de la placa de titulación. Los insertos se componen, por ejemplo, de en una óptica, idealmente cuerpos de cuarzo o vidrio de baja fluorescencia, que está recubierto con un material fluorescente, tal como sulfato de quinina. No está prevista una ayuda de enfoque.

- 5 La invención se basa, por tanto, en el objetivo de proporcionar un dispositivo fácil de usar para la caracterización integral de sistemas de medición de luminiscencia, en particular de sistemas de obtención de imágenes de resolución espectral, confocales y/o de campo amplio, que permite una caracterización flexible y reproducible de una pluralidad de parámetros del aparato.

Este objetivo se consigue mediante un equipo de calibración con las características de la reivindicación 1.

- 10 La al menos una ayuda de enfoque integrada definida en la reivindicación 1 permite un ajuste de enfoque fiable e idéntico del haz de medición (haz de excitación) para todos los usuarios y, por lo tanto, la medición de volúmenes de medición iluminados prácticamente idénticos en o dentro de los módulos de calibración del equipo de calibración. De esta manera se garantiza que las influencias espectrales, que se provocan por diferentes profundidades de medición, tales como los efectos de pared o los efectos de filtro internos se minimizan y estandarizan. De esta forma, se obtienen datos de medición reproducibles que son comparables y trazables más allá de los límites del aparato y del laboratorio.

- 20 En una realización preferida, están previstos al menos dos equipos de enfoque (ayudas de enfoque) integrados en la placa base, que están distribuidos preferentemente sobre la placa base, están dispuestos en particular en zonas de borde opuestas entre sí de la placa base. Esto permite la detección de una planaridad o una desviación de esto y una compensación correspondiente por medio de la interpolación aritmética a las ubicaciones de medición de los módulos de calibración.

- 25 El equipo de enfoque se puede diseñar de diferente manera. En principio, presenta una superficie de enfoque elevada, cuya rugosidad está muy por debajo de la resolución óptica del sistema de medición de luminiscencia que va a calibrarse. Para ello, preferentemente comprende un sustrato elevado, tal como una oblea de cristal único de silicio o similar, sobre el que está pulverizada una capa muy delgada de material reflectante y/o fluorescente. Para ello es adecuada por ejemplo una capa metálica delgada (por ejemplo, capa de cromo) con un espesor de capa entre 10 y 100 nm, en particular entre 30 y 50 nm. Como alternativa o adicionalmente, la superficie de enfoque puede estar diseñada de manera luminiscente, en particular fluorescente. Además de los materiales fluorescentes habituales, se prefieren en particular puntos cuánticos fluorescentes que se caracterizan por una estabilidad fototérmica especialmente alta. Se usan de manera especialmente preferente diferentes materiales fluorescentes en una o diferentes obleas, cuyas diferentes propiedades espectrales cubren el intervalo espectral de excitación o emisión típico del sistema de medición en cuestión. De esta manera, el equipo de enfoque permite, entre otras cosas, una determinación de la parafocalidad (por ello se entiende un ajuste de enfoque idéntico generado a través de la longitud de alineación de la lente) de una lente del sistema de medición utilizado y una alineación de imagen parafocal mediante métodos computacionales o usando lentes auxiliares en el microscopio.

- 40 De acuerdo con la invención, los módulos de calibración se pueden colocar de manera separable sobre la placa base, pudiendo introducirse estos en los alojamientos previstos para ello de la placa base. Esto permite una adaptación muy flexible del equipo de calibración a diferentes tipos de aparatos, geometrías de medición o problemas de calibración o caracterización. Por ejemplo, pueden estar previstos insertos para determinar la sensibilidad espectral, la linealidad del detector, la homogeneidad de la iluminación, el rendimiento de intensidad dependiente del día ("day-to-day performance"), la resolución espectral y/o la resolución espacial. La constancia en dirección x, y y z de la placa base y el inserto se garantiza preferentemente mediante el uso de materiales con baja dilatación térmica para estos elementos. Para ello son adecuados en particular vidrio y los materiales de vitrocerámica, que presentan un coeficiente de dilatación térmica  $\alpha$  inferior a  $5 \times 10^{-6} \text{ K}^{-1}$  a temperatura ambiente. Igualmente adecuados pero menos preferidos son polímeros con coeficientes de dilatación térmica  $\alpha$  de normalmente menos de  $5 \times 10^{-6} \text{ K}^{-1}$ .

- 50 El sistema de calibración se adapta en cuanto a sus dimensiones (tamaño de la placa base, tamaño y distancia de los módulos de calibración y equipos de enfoque) y su material (vidrio, vidrio de cuarzo, plástico) así como la configuración y posicionamiento de los equipos de enfoque y los módulos de calibración al sistema de medición de luminiscencia que va a calibrarse, por ejemplo a un sistema de obtención de imágenes de campo amplio con resolución espectral o un microscopio de fluorescencia confocal con resolución espectral. Para aplicaciones relacionadas con calibraciones de microscopios de fluorescencia de resolución espectral, confocales se consigue mediante la integración de las ayudas de enfoque, por ejemplo, en ambos lados de un equipo de calibración con dimensiones típicas de portaobjetos de microscopio, que cada usuario mide casi el mismo volumen iluminado, lo que permite una caracterización del aparato comparable y reproducible y, por lo tanto, datos de medición obtenidos en condiciones de medición relevantes para la aplicación, específicas de muestra.

La invención se refiere además a un kit, tal como se define en la reivindicación 17, que comprende una placa base con al menos un equipo de enfoque de acuerdo con la descripción anterior así como un conjunto de diferentes módulos de calibración con diferentes funciones de calibración y/o caracterización. El kit permite a un usuario configurar el equipo de calibración de acuerdo con los requisitos individuales. El kit puede, naturalmente, contener otros componentes, como por ejemplo espectros de fluorescencia corregidos (idealmente certificados) de los estándares de fluorescencia contenidos en los módulos de calibración en forma digital o en un manual de instrucciones.

Algunos módulos de calibración ventajosos del equipo de calibración o del kit se explican con más detalle a continuación.

De acuerdo con una configuración preferida de la invención, el equipo de calibración comprende al menos un módulo de calibración para determinar la sensibilidad espectral, la precisión de longitud de onda, la linealidad y/o el intervalo dinámico de un sistema de detección, el "day-to-day performance" (estándar de intensidad) y/o para determinar la homogeneidad de iluminación de la fuente de luz del sistema de medición de luminiscencia. Todas estas funciones pueden realizarse mediante un material que contiene al menos un fluoróforo. A este respecto, el término "fluoróforo" se entiende en el presente caso ampliamente y abarca cualquier sustancia (átomos, iones o compuestos), que proporcionan una señal de fluorescencia característica después de la excitación correspondiente. Además de los compuestos fluorescentes orgánicos clásicos, esto también incluye los puntos cuánticos u otros nanocristales fluorescentes ya mencionados como parte de las superficies de enfoque, así como iones de tierras raras y metales de transición. El fluoróforo está contenido preferentemente en una matriz ópticamente transparente, es decir, el módulo de calibración es en particular un material ópticamente transparente dopado con fluoróforo, tal como, por ejemplo, un vidrio, una vitrocerámica o un plástico. Se debe tener cuidado de que se dé una alta homogeneidad de la distribución del fluoróforo en la matriz, para que se obtengan los espectros fluorescentes dependientes de la ubicación hasta la resolución espacial máxima del sistema de medición. En principio, puede emplearse un módulo que contiene fluoróforo también como estándar de vida útil de fluorescencia en mediciones de resolución temporal.

Según una configuración especialmente preferida de la invención, el al menos un módulo de calibración para determinar la sensibilidad espectral comprende un material de base ópticamente transparente de un vidrio de lantano-fosfato, un vidrio de flúor-fosfato, un vidrio flúor-vidrio sin plomo, un vidrio de lantano, una vitrocerámica formada a partir de estos o una vitrocerámica de silicato de litio-aluminio. Este material de base vídrio está dopado preferentemente con al menos un elemento, en particular con un ion metálico, que se selecciona del grupo de los metales de tierras raras (que comprende escandio, itrio, lantano así como los lantánidos), en particular los lantánidos (que comprenden los 14 elementos del número atómico 58 a 71). De estos, se prefieren cerio (Ce), europio (Eu), terbio (Tb), tulio (Tm), erbio (Er), samario (Sm). Estos elementos o una mezcla de estos se añade a los vidrios preferentemente en forma de óxidos de acuerdo con  $M_2O_3$ . Los metales de tierras raras mencionados se caracterizan por espectros altamente estructurados, de banda estrecha. De acuerdo con una configuración preferida adicional, los materiales de base mencionados se dopan con al menos un ion metálico del grupo de metales de transición, tales como, por ejemplo, cobalto (Co), cromo (Cr) y Manganeso (Mn) u otros. En el caso de los fluoróforos orgánicos clásicos, se prefiere una matriz de un polímero orgánico (plástico) o especialmente silicato. Para los puntos cuánticos u otros nanocristales fluorescentes, los vidrios o las vitrocerámicas, así como también plásticos, son adecuados como material de base transparente.

Otro tipo de función de módulos de calibración preferentemente contenidos se refiere a módulos para determinar la intensidad de luz de excitación (absoluta), que les permiten una estandarización. Para ello, se utilizan difusores, por ejemplo, que reflejan la luz incidente difusamente en todas las direcciones espaciales, o fluoróforos desvanecibles de cinética de desvanecimiento conocida, por ejemplo, una matriz de vidrio o plástico dopada de este tipo. Difusores, por ejemplo, objetos de vidrio esmerilado, también pueden servir como módulo de calibración para determinar la supresión de la longitud de onda de excitación en el canal de emisión del sistema de medición de luminiscencia.

Un módulo de calibración previsto de acuerdo con la invención en el equipo de calibración o el kit es un módulo para determinar la resolución espacial en dirección x, y y/o z y/o la homogeneidad de la iluminación. Para estas funciones se emplea una superficie reflectante y/o fluorescente, preferentemente un plano inclinado reflectante o fluorescente. Como alternativa o adicionalmente, como módulo de calibración para determinar la resolución espacial en el plano y/o la profundidad se puede usar un plano estructurado tridimensionalmente, que preferentemente presenta un revestimiento fluorescente.

El equipo de calibración o el kit de acuerdo con la invención puede usarse, dependiendo del equipo modular, para una pluralidad de aplicaciones de calibración y/o caracterización, en particular para las funciones mencionadas en el contexto de los módulos de calibración.

Además, el equipo de calibración o el kit también se pueden usar como un estándar de intensidad de fluorescencia para determinar las intensidades de fluorescencia relativas en el intervalo espectral UV / vis / NIR, es decir, para la calibración cuantitativa de las intensidades. Además, el equipo de calibración es adecuado para caracterizar la

estabilidad a largo plazo y las fluctuaciones de rendimiento dependientes del día con respecto a las intensidades de medición del sistema de medición ("day-to-day instrument performance") y para comparar sistemas de medición de luminiscencia. Otros campos de aplicación son la caracterización de la homogeneidad de la iluminación a diferentes longitudes de onda de excitación y emisión, el uso como estándar de vida útil de fluorescencia, la comparabilidad de los datos e intensidades de luminiscencia, la determinación de la intensidad de iluminación espectral relativa en la ubicación de la muestra, así como la mezcla espectral de mezclas de cromóforos y la revisión del software de evaluación utilizado para este propósito. El equipo de calibración o el kit son particularmente adecuados para realizar las aplicaciones mencionadas anteriormente en un intervalo de longitud de onda de aplicación típica de 200 a 2500 nm, preferentemente en el intervalo UV-vis de 350 a 850 nm.

10 Otras configuraciones preferidas de la invención resultan de las características restantes, mencionadas en las reivindicaciones dependientes.

La invención se explica con más detalle a continuación en ejemplos de realización por medio de los dibujos asociados. Muestran:

15 la figura 1A vista en planta de un equipo de calibración multifuncional de acuerdo con la invención sin cubreobjetos,

La figura 1B vista en planta del equipo de calibración de acuerdo con la invención de la figura 1A con cubreobjetos colocado y

la figura 1C sección longitudinal del equipo de calibración de acuerdo con la invención de acuerdo con la vista en sección de la figura 1B.

20 Las figuras 1A a 1C muestran distintas vistas de un equipo de calibración multifuncional de acuerdo con la invención, designado globalmente con 10, de acuerdo una configuración ventajosa de la invención para calibrar en particular un microscopio de fluorescencia confocal. El equipo de calibración 10 comprende una placa base plana 12 con un lado superior 14 y un lado inferior 16. La placa base 12 puede componerse de un polímero adecuado, vidrio o vidrio de cuarzo o estar fabricada en una o varias piezas, también con el uso de diferentes materiales. Las dimensiones de la placa base 12 ascienden, de acuerdo con el ejemplo mostrado, a 76,0 mm X 26,0 mm y, por lo tanto, corresponden a las dimensiones estándar de los portaobjetos para microscopios.

30 En el lado superior 14 de la placa base 12 está prevista una pluralidad de, en este caso, seis alojamientos 18 en forma de entalladuras de material rectangulares (figura 1C). En los dos alojamientos exteriores 18, es decir, en zonas de borde opuestas entre sí de la placa base 12 está dispuesto en cada caso un equipo de enfoque 20. A diferencia de la realización representada, también pueden estar previstos más de dos equipos de enfoque 20 distribuidos en la placa base 12 o solo uno. En el caso de un solo equipo de enfoque 20, este está dispuesto ventajosamente en la zona central de la placa base 12. Los equipos de enfoque 20 presentan en cada caso una superficie de enfoque 22 en cada caso por encima.

35 En el ejemplo representado, los equipos de enfoque 20 están configurados como obleas elevadas de monocristales de silicio, que en cada caso presentan una superficie de enfoque reflectante 22. La superficie de enfoque 22 se compone de una capa de cromo delgada, pulverizada catódicamente sobre la oblea que sirve como sustrato, con un espesor de capa de 40 nm. La rugosidad de la superficie de enfoque 22 está muy por debajo de la resolución óptica del microscopio de luminiscencia que va a calibrarse. Otros materiales de oblea o capas metálicas reflectantes también son concebibles. Como alternativa, los equipos de enfoque 20 también pueden presentar superficies de enfoque luminiscentes elevadas 22. Estas están configuradas por ejemplo como capas muy finas de nanopartículas de semiconductor fluorescentes, que se componen de algunos cientos a algunos miles de átomos, los denominados puntos cuánticos, que a su vez están aplicadas sobre una oblea de Si o similar, por ejemplo mediante pulverización catódica. Materiales fluorescentes conocidos para puntos cuánticos son, por ejemplo, seleniuros de cadmio, telururos de cadmio, indio-fósforo, seleniuros de plomo y otros. Dado el caso, los puntos cuánticos también pueden estar recubiertos con una envuelta. Los puntos cuánticos tienen la ventaja de ser muy estables en comparación con materiales fluorescentes convencionales, en particular para no desvanecer. El grosor de capa de la superficie de enfoque fluorescente 22 corresponde preferentemente a una monocapa de puntos cuánticos y se encuentra, por ejemplo, con ello en el orden de magnitud de 7 a 10 nm. En el caso de otras sustancias fluorescentes o reflectantes, preferentemente asciende a solo algunas capas atómicas o moleculares del material en cuestión, de manera especialmente preferente está configurada en un solo átomo.

50 En los alojamientos 18 restantes están introducidos distintos módulos de calibración 24, que presentan en cada caso al menos una función de calibración y/o una función para caracterizar el sistema de medición de luminiscencia. En la figura 1C puede apreciarse que las superficies de enfoque 22 de los equipos de enfoque 20 están dispuestas en un plano con las superficies de los módulos de calibración 24. Los módulos de calibración 24 y los equipos de enfoque 20 también están dispuestos a una distancia definida, equidistantes entre sí. En una configuración preferida, los

módulos de calibración 24 están introducidos sin apretar en los alojamientos 18 como insertos. Esto permite que los módulos 24 se intercambien fácilmente, para equipar el equipo de calibración 10 para distintas aplicaciones. De esta forma, el equipo se puede adaptar a una amplia variedad de problemas de calibración y cuestiones de caracterización, por ejemplo la determinación de la sensibilidad espectral del sistema de medición, determinación de la linealidad o del intervalo dinámico del sistema de detector usado, determinación de la resolución espectral o resolución espacial, determinación de la homogeneidad de la iluminación, etc. Además, el equipo modular del equipo de calibración 10 y así como también su formato, sus dimensiones y la distancia de los módulos 24 están orientados con diferentes sistemas y geometrías de medición, por ejemplo en sistemas de obtención de imágenes confocales, de resolución espectral, como por ejemplo microscopios de fluorescencia confocales y escáneres de micromatrices, así como microscopios de fluorescencia de campo amplio, espectrómetros Raman y microscopios Raman. Mediante la elección de los módulos de inserción 24 y combinaciones de los mismos, es posible una adaptación amplia y flexible del problema, por ejemplo a longitudes de onda de excitación específicas del aparato e intervalos de emisión detectables, así como una variación de la magnitud de señal o intensidad de fluorescencia o de relaciones de intensidad. Algunos módulos de calibración preferidos 26, 28, 30, 32 se explican en detalle a continuación. El equipo de calibración 10 de acuerdo con la invención es fácil de manejar y está adaptado para su uso por personal técnico.

Como se representa en las figuras 1B y 1C, la placa base 12 con los equipos de enfoque 20 y los módulos de calibración 24 también se pueden cubrir total o parcialmente con un cubreobjetos transparente 34, que está conectado con la placa base 12, por ejemplo a través de uniones roscadas 36. De esta manera, pueden usarse también medios de inmersión y/o corregidos según cubreobjetos. En la realización representada, tanto la placa base 12 (figura 1A) como el cubreobjetos 34 presentan una ventana de visualización 38. El área restante, representada en este caso en gris está oculta, por ejemplo, por una capa de laca o similar.

Como un primer tipo de módulo de calibración 24 están previstos los módulos 26 y 28, que son en cada caso un material ópticamente transparente (por ejemplo un vidrio, una vitrocerámica o un plástico transparente), que están dopados en volumen con un fluoróforo. Los fluoróforos adecuados para las aplicaciones mencionadas a continuación se excitarán con fuentes de luz relevantes para la aplicación, se caracterizan por las propiedades espectroscópicas mencionadas a continuación, presentan un rendimiento cuántico de luminiscencia suficiente así como una anisotropía lo más baja posible de la fluorescencia, presentan homogeneidad suficiente de la distribución de cromóforos y una alta estabilidad térmica y fotoquímica en condiciones relevantes para la aplicación.

De acuerdo con una configuración ventajosa de la invención, el módulo de calibración 26 es un material ópticamente transparente dopado con un ion metálico del grupo de los metales de tierras raras, en particular de los lantánidos, o una mezcla de los mismos. En el presente ejemplo, el módulo de calibración 26 es un vidrio de lantano (por ejemplo, 9 % de  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , 70 % de  $\text{P}_2\text{O}_5$ , 8 % de  $\text{K}_2\text{O}$ , 13 % de  $\text{La}_2\text{O}_3$ ), que con un total del 1 al 6 % de al menos un óxido lantanoide, en particular  $\text{Ce}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Eu}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Tb}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Tm}_2\text{O}_3$  es simple o dopado de manera múltiple. Debido a espectros fuertemente estructurados, de banda estrecha, de los lantánidos, el módulo de calibración 26 es especialmente adecuado para la determinación de la resolución espectral, comprobándose si dos bandas espectralmente adyacentes estrechamente aún parecen estar resueltas. Además, la precisión de la longitud de onda del sistema de medición se puede comprobar comparando las posiciones de banda conocidas con las medidas. Sin embargo, el módulo de calibración 26 también sirve para determinar la sensibilidad espectral (sensibilidad espectral), es decir, la combinación de precisión de longitud de onda y de intensidad en función de la longitud de onda, comparando las relaciones de intensidad de las bandas de emisión seleccionadas.

Por el contrario, el módulo de calibración dopado con fluoróforo 28 también está dopado preferentemente con un ion de metal de transición. Por ejemplo, se trata de es un vidrio de lantano-fosfato dopado con del 0,1 al 0,01 % de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  (véase anteriormente) o un vidrio de lantano dopado con del 1 al 15 % de  $\text{ZnO}$  (30-60 % de  $\text{La}_2\text{O}_3$ , 30-50 % de  $\text{B}_2\text{O}_3$ , 1-5 % de  $\text{SiO}_2$ , 2-10 % de  $\text{CaO}$ ). Debido a los espectros débilmente estructurados, de banda ancha, el módulo de calibración dopado con metal de transición 28 es especialmente ventajoso para determinar la sensibilidad espectral (sensibilidad) del sistema de detección en un amplio intervalo espectral.

Ambos módulos de calibración 26, 28 también pueden usarse de manera especialmente preferente para comprobar la homogeneidad de la iluminación. Para ello, el área de medición observada se comprueba en la dimensión x,y con respecto a la intensidad en las longitudes de onda seleccionadas, es decir, si aproximadamente en el centro de la superficie iluminada se mide la misma intensidad que en las zonas de borde. La determinación de la homogeneidad de iluminación es extremadamente importante en todos los procedimientos de formación de imágenes de resolución espacial, para interpretar correctamente y tener en cuenta las diferencias de intensidad en diferentes posiciones de imagen. Los módulos de calibración 26, 28 también pueden usarse para caracterizar la estabilidad a largo plazo, la validación del rendimiento, para comparar diferentes aparatos. Ambos también permiten declaraciones sobre la influencia de los parámetros del aparato sobre las señales de fluorescencia generadas, por ejemplo, el tamaño del orificio (en sistemas de obtención imágenes confocales y microscopios de fluorescencia) o la tensión PMT (en sistemas de imágenes confocales, microscopios de fluorescencia y lectores de micromatrices). De acuerdo con una configuración (no representada), está prevista una serie de módulos de calibración que están dopados con diferentes concentraciones del mismo fluoróforo. Una serie de concentraciones de este tipo permite la determinación de la linealidad del sistema de detector del canal de emisión, es decir, del intervalo de intensidad en el que la señal

de detector aumenta linealmente con la intensidad irradiada, es decir, en el que es posible una declaración cuantitativa fiable sobre una concentración de un cromóforo en la muestra. También con ayuda de la serie de concentraciones puede determinarse el intervalo dinámico del sistema de detector, es decir, la cantidad de luz más pequeña y más grande aún detectable. Igualmente con ello puede determinarse la respuesta del detector con la variación del refuerzo.

En el caso del módulo de calibración 30 de acuerdo con la invención se trata de un inserto, que presenta un plano inclinado, es decir, inclinado con respecto a la placa base 12, que o bien es reflectante (como un espejo) o bien fluorescente. En principio, como capas reflectantes y fluorescentes se tienen en cuenta los materiales mencionados para las superficies de enfoque 22. El módulo de calibración 30 con un plano inclinado permite la medición de la resolución espacial en la dimensión z, ajustando, con inclinación conocida del plano, el haz de medición un tamaño de paso definido en la dimensión x,y con enfoque constante (dimensión z) y observándose la variación en la señal de reflexión o de fluorescencia. De manera análoga puede determinarse también la resolución espacial en la dirección x,y. Como alternativa, pero no requerido, la resolución espacial en la dimensión z puede determinarse también con un plano simple (no inclinado) reflectante o fluorescente en el modo de reflexión por medio de un escaneo z. También, una superficie reflejante o fluorescente también se puede usar para determinar la homogeneidad de iluminación.

Como cuarto módulo de calibración 32, en el ejemplo representado, está previsto un objeto con una superficie estructurada tridimensionalmente, que a su vez está recubierto con una capa fluorescente o reflectante. Un objeto de este tipo también puede usarse para determinar la resolución espacial en la dirección x,y y/o z. Por ejemplo, si la superficie presenta un perfil de diente de sierra con una altura de diente de  $1\ \mu\text{m}$ , entonces la señal medida en el punto más alto se puede comparar con la señal medida en el punto más bajo. Si las dos señales difieren entre sí, la resolución z es de al menos  $1\ \mu\text{m}$  o mejor.

Para los módulos 24 descritos anteriormente, en particular los determinados para determinar la resolución espacial en la dirección x,y y/o z de un sistema de medición de fotoluminiscencia, y para la placa base 12, se usan preferentemente materiales con coeficientes de dilatación térmica muy bajos, en particular vidrio y materiales de vitrocerámica, que presentan un coeficiente de dilatación térmica  $\alpha$  inferior a  $5 \times 10^{-6}\ \text{K}^{-1}$  a temperatura ambiente. Esto permite la verificación fiable de la resolución espacial medida. Un módulo adicional, no representado en este caso, puede servir para determinar la intensidad de la luz de excitación. Para este fin, por ejemplo, puede recurrirse a un fluoróforo desvanecible con cinética de desvanecimiento conocida, dependiente de la intensidad de la película de polímero dopada. Si esta se ilumina con la fuente de radiación que va a caracterizarse y se mide la cinética de desvanecimiento, entonces permite sacar conclusiones sobre la intensidad de la luz incidente. La película de polímero dopada con el fluoróforo desvanecible está dotada preferentemente de una matriz de coordenadas x,y, que permite la localización definida de la luz de excitación sobre el objeto. Aún más preferentemente, para el fin de la determinación de la luz de excitación se emplea un difusor, por ejemplo un objeto de vidrio esmerilado, que refleja difusamente la luz incidente en todas las direcciones espaciales y por lo tanto dirige una pequeña proporción hacia el detector. Conociendo el grado de dispersión porcentual del difusor, la medición de la intensidad medida en el detector permite a su vez sacar conclusiones sobre la intensidad de la luz de excitación incidente. La determinación de la intensidad de la luz de excitación absoluta permite, por ejemplo, la estandarización de la excitación más allá de los aparatos y los límites de laboratorio. El objeto de vidrio esmerilado (difusor) también puede usarse para determinar la calidad de la supresión de la longitud de onda de excitación en el canal de emisión, en particular en el caso de sistemas de obtención imágenes de resolución espectral confocales. Esto tiene lugar iluminando el objeto en sí, que no es fluorescente, con la longitud de onda de excitación en cuestión y detectándose con el sistema de detección la cantidad de luz de excitación dispersa en el canal de emisión y no suprimida por los filtros provistos allí. A este respecto, se ajustan preferentemente las intensidades de luz de excitación necesarias en las aplicaciones de fluorescencia típicas y la sensibilidad de PMT o el tiempo de exposición de la cámara.

Para enfocar el microscopio de fluorescencia por medio de los equipos de enfoque 20 previstos de acuerdo con la invención, se procede tal como sigue. En primer lugar, se coloca el equipo de calibración 10 sobre en una platina del microscopio de fluorescencia. El haz de medición (haz de excitación) del aparato se desplaza entonces en uno de los equipos de enfoque 20 en la dirección x,y por medio de la platina que puede ajustarse en tres dimensiones por motor. (Como alternativa, dependiendo de la realización del microscopio, el haz de excitación también puede desplazarse al sitio de medición deseado mediante una óptica ajustable del aparato en el caso de una platina fija). Allí, el haz se enfoca en la dirección z exactamente sobre la superficie de enfoque 22 del equipo de enfoque 20, moviéndose la platina a motor en la dirección z (o ajustándose la óptica del microscopio de manera correspondiente). Se determina la posición en la que se detecta la señal de reflexión máxima (o señal de fluorescencia en el caso de una superficie de enfoque fluorescente 22). Este proceso puede tener lugar de manera completamente automatizada. El ajuste de enfoque encontrado se almacena como la coordenada z, o como la distancia frontal entre la preparación (superficie de enfoque 22) y la lente frontal de la óptica. Si están presentes varios equipos de enfoque 20, se procede asimismo con los equipos de enfoque adicionales 20. Si se encuentran para los diferentes equipos de enfoque 20 diferentes ajustes de enfoque (coordenadas z o distancias frontales), esto significa que la placa base 12 no es completamente plana. En este caso, las coordenadas z para las posiciones x,y de los módulos de calibración 24 dispuestos entre los equipos de enfoque 20 se interpolan aritméticamente. A

5 continuación se desplaza el haz de medición sucesivamente a los módulos de calibración correspondientes 24 y se enfoca en la correspondiente coordenada z almacenada o interpolada. Si la medición tendrá lugar exactamente sobre la superficie del módulo de calibración 24 en cuestión, por ejemplo en el caso de un espejo, el ajuste de enfoque necesario corresponde al determinado en la superficie de enfoque 22. En cambio, si, como en el caso de un objeto de vidrio esmerilado o los módulos de vidrio dopados con fluoróforo 16, 28, se mide un volumen a una profundidad definida, por ejemplo a una profundidad de 30 µm, de modo que el enfoque de la óptica se ajusta esta profundidad en comparación con el ajuste de enfoque cero determinado para el módulo de calibración en cuestión. La determinación del enfoque por medio de los equipos de enfoque 20 sirve por lo tanto como valor de referencia para las superficies respectivas del módulo de calibración 24. Mediante los equipos de enfoque integrados 20 se consigue que en cada módulo de calibración 24 del equipo de calibración 10, en particular en módulos transparentes, dopados con fluoróforo o de dispersión, se mide el mismo volumen de muestra. En particular, esto también se puede garantizar de esta manera más allá de los límites del aparato y del laboratorio, de modo que se estandarizan influencias espectrales, que se provocan por diferentes profundidades de medición en los módulos 24, por ejemplo, efectos de filtro de pared e interior, y con ello conseguirse resultados de calibración y medición comparables y rastreables.

**Lista de referencias**

- 10 equipo de calibración
- 12 placa base
- 14 lado superior
- 16 lado inferior
- 18 alojamiento
- 20 equipo de enfoque
- 22 superficie de enfoque
- 24 módulo de calibración
- 26 módulo de calibración dopado de metal de tierras raras
- 28 módulo de calibración dopado de metal de transición
- 30 módulo de calibración con plano inclinado, reflectante o fluorescente
- 32 módulo de calibración tridimensionalmente estructurado
- 34 cubreobjetos
- 36 unión roscada
- 38 ventana de visualización

**REIVINDICACIONES**

1. Equipo de calibración multifuncional (10) para la caracterización de sistemas de medición de luminiscencia, en particular de sistemas de obtención de imágenes de resolución espectral, amplio campo y/o confocales, que comprende
- 5 (a) una placa base (12),  
 (b) al menos un módulo de calibración (24) dispuesto en la placa base (12), que presenta al menos una función de calibración y/o caracterización así como  
 (c) al menos un equipo de enfoque (20) dispuesto sobre la placa base (12) con una superficie de enfoque (22) elevada, reflectante y/o luminiscente para ajustar un foco de haz de medición definido del sistema de medición de luminiscencia que va a calibrarse, en el que la superficie de enfoque (22) está dispuesta en un plano con una superficie del al menos un módulo de calibración (24) y presenta una rugosidad por debajo de la resolución óptica del sistema de medición de luminiscencia que va a calibrarse, y  
 10 (d) un módulo de calibración (30) para determinar la resolución espacial en dirección x, y y z que comprende un plano inclinado reflectante y/o fluorescente,  
 15 en el que la placa base (12) comprende alojamientos (18) para el al menos un módulo de calibración (24) que presenta la función de calibración y/o caracterización, y el módulo de calibración (30) para determinar la resolución espacial en dirección x, y y z, de modo que el equipo de calibración multifuncional (10) puede configurarse de manera correspondiente a los requisitos individuales.
2. Equipo de calibración (10) según la reivindicación 1,  
 20 **caracterizado por que**  
 están previstos al menos dos equipos de enfoque (20) dispuestos sobre la placa base (12), que están dispuestos en particular en zonas de borde opuestas entre sí de la placa base (12).
3. Equipo de calibración (10) según la reivindicación 1 o 2,  
 25 **caracterizado por que**  
 el al menos un equipo de enfoque (20) es un sustrato recubierto con una capa de metal reflectante, en particular, una oblea de silicio cromada por chisporroteo.
4. Equipo de calibración (10) según una de las reivindicaciones precedentes,  
 30 **caracterizado por que**  
 el equipo de calibración (10) presenta al menos un equipo de enfoque adicional (20) dispuesto sobre la placa base (12) con una superficie de enfoque luminiscente elevada (22) para ajustar un foco de haz de medición definido del sistema de medición de luminiscencia que va a calibrarse, que está dispuesto en un plano con el al menos un módulo de calibración (24) y presenta una rugosidad por debajo de la resolución óptica del sistema de medición de luminiscencia que va a calibrarse.
5. Equipo de calibración (10) según una de las reivindicaciones precedentes 4,  
 35 **caracterizado por que**  
 el al menos un equipo de enfoque adicional (20) es un sustrato recubierto con un material luminiscente, en particular una oblea sometida a chisporroteo con un material fluorescente, preferentemente con puntos cuánticos.
6. Equipo de calibración (10) según una de las reivindicaciones precedentes,  
 40 **caracterizado por que**  
 el al menos un módulo de calibración (24) puede conectarse de manera separable con la placa base (12), en particular puede introducirse de manera separable en un alojamiento (18) de la placa base (12).
7. Equipo de calibración (10) según una de las reivindicaciones precedentes,  
 45 **caracterizado por que**  
 está prevista una pluralidad de módulos de calibración (24) de diferente función dispuestos en la placa base (12).
8. Equipo de calibración (10) según una de las reivindicaciones precedentes,  
 50 **caracterizado por que**  
 el al menos un módulo de calibración (24) comprende un módulo para determinar la sensibilidad espectral, la precisión de longitud de onda, la linealidad y/o el intervalo dinámico de un sistema de detección y/o para determinar la homogeneidad de iluminación de la fuente de luz del sistema de medición de luminiscencia.
9. Equipo de calibración (10) según la reivindicación 8,  
**caracterizado por que**  
 el al menos un módulo de calibración (24) es un material que contiene al menos un fluoróforo, en particular un material ópticamente transparente dopado con fluoróforo.

10. Equipo de calibración (10) según una de las reivindicaciones 8 o 9,  
**caracterizado por que**  
al menos un fluoróforo es al menos un ion metálico, seleccionado del grupo de metales de tierras raras, en particular de los lantánidos, o una mezcla de los mismos.
- 5 11. Equipo de calibración (10) según una de las reivindicaciones 8 a 10,  
**caracterizado por que**  
el al menos un fluoróforo es al menos un ion metálico, seleccionado del grupo de metales de transición, en particular cobalto, cromo y manganeso.
- 10 12. Equipo de calibración (10) según una de las reivindicaciones 8 a 10,  
**caracterizado por que**  
el fluoróforo se selecciona del grupo de los compuestos orgánicos fluorescentes, de los puntos cuánticos o nanocristales fluorescentes.
- 15 13. Equipo de calibración (10) según una de las reivindicaciones 9 a 12,  
**caracterizado por que**  
el material ópticamente transparente es un vidrio, una vitrocerámica o un plástico, en particular un vidrio de lantano-fosfato, un vidrio de flúor-fosfato, un vidrio flúor-vidrio sin plomo, un vidrio de lantano, es una cerámica de vidrio formada a partir de los mismos o una cerámica de vidrio de silicato de litio-aluminio.
- 20 14. Equipo de calibración (10) según una de las reivindicaciones precedentes,  
**caracterizado por que**  
el al menos un módulo de calibración (24) comprende un módulo para determinar la intensidad de la luz de excitación, en particular un difusor o una matriz de vidrio o plástico dopada con un fluoróforo desvanecible de cinética de desvanecimiento conocida.
- 25 15. Equipo de calibración (10) según una de las reivindicaciones precedentes,  
**caracterizado por que**  
el al menos un módulo de calibración (24) comprende un módulo para determinar la supresión de la longitud de onda de excitación en el canal de emisión del sistema de medición de luminiscencia, en particular un difusor.
- 30 16. Equipo de calibración (10) según una de las reivindicaciones precedentes,  
**caracterizado por que**  
el al menos un módulo de calibración (24) comprende un módulo para determinar la resolución espacial en dirección x, y y/o en dirección z, en particular un plano estructurado tridimensionalmente.
- 35 17. Kit para la caracterización de sistemas de medición de luminiscencia que comprende al menos una placa base (12), que presenta al menos un equipo de enfoque (20) dispuesto sobre la placa base (12) con una superficie de enfoque (22) elevada, reflectante y/o luminiscente para ajustar un foco de haz de medición definido del sistema de medición de luminiscencia que va a calibrarse, que presenta una rugosidad por debajo de la resolución óptica del sistema de medición de luminiscencia que va a calibrarse, así como un conjunto de diferentes módulos de calibración (22) con distintas funciones de calibración y/o caracterización que pueden disponerse sobre la placa base (12), estando dispuesta la superficie de enfoque (22) en un plano con una superficie del al menos un módulo de calibración (24) dispuesto sobre la placa base (12), comprendiendo el conjunto además un módulo de calibración (30) para determinar la resolución espacial en la dirección x, y y z, que comprende un plano inclinado reflectante y/o fluorescente, la placa base (12) comprende alojamientos (18) para el al menos un módulo de calibración (24) que presenta la función de calibración y/o caracterización, y el módulo de calibración (30) para determinar la resolución espacial en dirección x, y y z, de modo que el equipo de calibración multifuncional (10) puede configurarse de manera correspondiente a los requisitos individuales.
- 40 18. Uso de un equipo de calibración (10) según una de las reivindicaciones 1 a 16, o de un kit según la reivindicación 17 para determinar la sensibilidad espectral y/o la linealidad y/o el intervalo dinámico de un sistema de detección de un sistema de medición de luminiscencia y/o para determinar la homogeneidad de iluminación de un sistema de medición de luminiscencia y/o para determinar la resolución espacial en dirección x, y y z.
- 45 19. Uso de un equipo de calibración (10) según una de las reivindicaciones 1 a 16 o de un kit según la reivindicación 17 para determinar la intensidad de la luz de excitación de un sistema de medición de luminiscencia y/o para determinar la resolución espacial en la dirección x, y y z.
- 50 20. Uso de un equipo de calibración (10) según una de las reivindicaciones 1 a 16 o de un kit según la reivindicación 17 para determinar la supresión de la longitud de onda de excitación en el canal de emisión de un sistema de medición de fotoluminiscencia y/o para determinar la resolución espacial en dirección x, y y z.

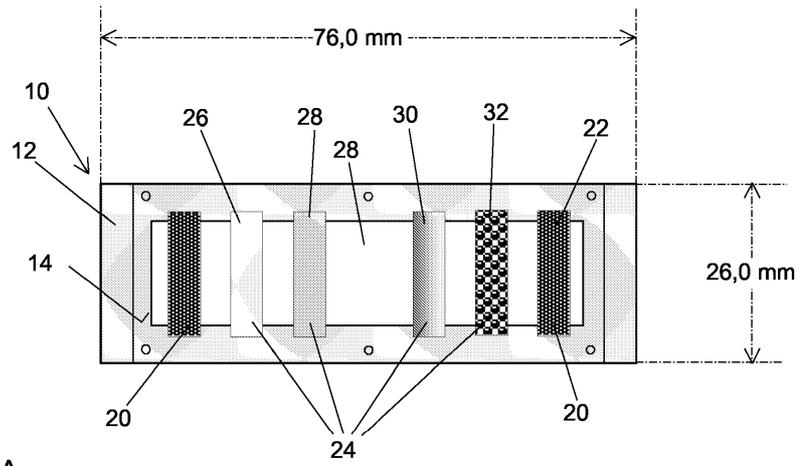


Fig. 1A

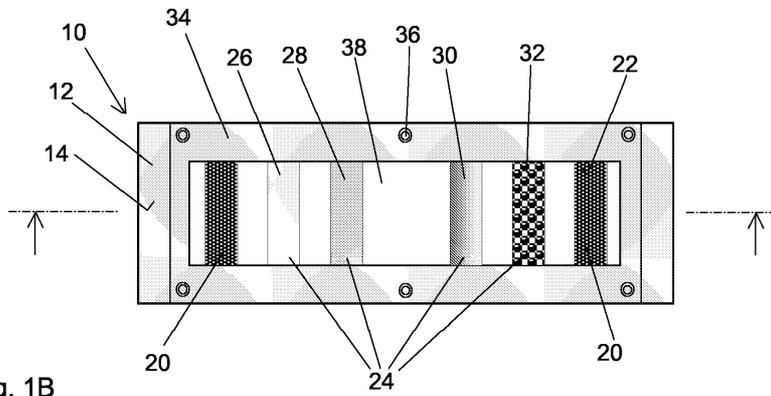


Fig. 1B

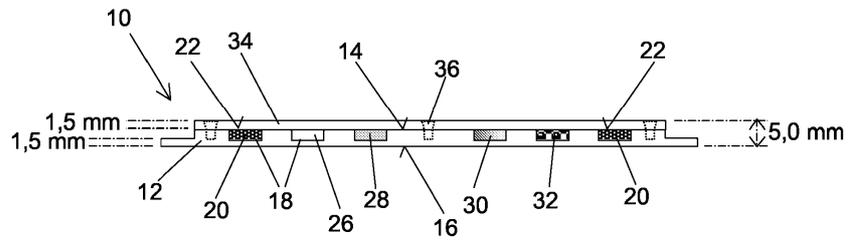


Fig. 1C