

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges
Eigentum

Internationales Büro

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum

25. September 2014 (25.09.2014)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer

WO 2014/147257 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

G02B 21/16 (2006.01) G02B 21/36 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01) G02B 27/58 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2014/055800

(22) Internationales Anmeldedatum:
24. März 2014 (24.03.2014)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2013 102 988.4 22. März 2013 (22.03.2013) DE

(71) Anmelder: LEICA MICROSYSTEMS CMS GMBH
[DE/DE]; CPTD, Ernst-Leitz-Strasse 17-37, 35578
Wetzlar (DE).

(72) Erfinder: FÖLLING, Jonas; Alte Eppelheimer Straße 18,
69115 Heidelberg (DE).

(74) Anwalt: BRADL, Joachim; Leica Microsystems GmbH,
CPTD, Ernst-Leitz-Strasse 17-37, 35578 Wetzlar (DE).

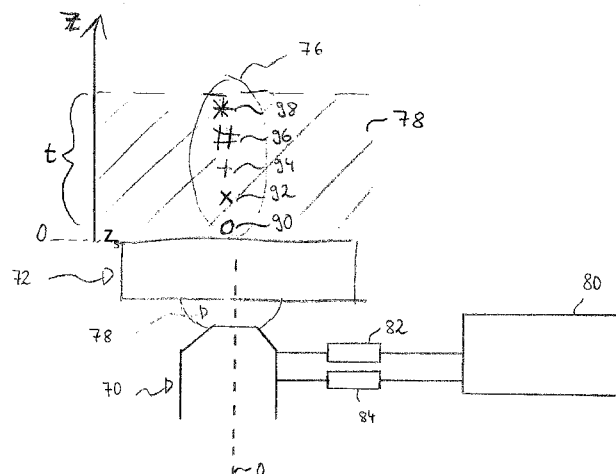
(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,
RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ,
TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ,
RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE,
SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: LIGHT-MICROSCOPY METHOD FOR LOCATING POINT OBJECTS

(54) Bezeichnung : LICHTMIKROSKOPISCHES VERFAHREN ZUR LOKALISIERUNG VON PUNKTOBJEKTEN



(57) Abstract: The invention relates to a light-microscopy method for locating point object in a sample (76), wherein the sample (76) is imaged onto a detector (14, 56) by means of an imaging optical unit (70) and the point objects contained in the sample (76) are located within the depth of field (78) by evaluating a first sample image produced by the imaging of the sample (76) on the detector (14, 56). In order to locate the particular point object in the direction of the optical axis (O), a characteristic value (d) of a light spot (38, 40, 42, 44, 60) of the first sample image representing the point object is determined and an axial z position related to the point object is associated with said characteristic value (d) in dependence on predetermined association information. The depth of field (78) is shifted in relation to the sample (76) along the optical axis (O) by a predetermined axial displacement that is less than the axial extent (t) of the depth of field (78). While the axially depth of field (78) is shifted, the sample (76) is imaged onto the detector again by means of the imaging optical unit (70) and at least one second sample image is produced. In the second sample image, the z positions of the point objects are determined in dependence on the predetermined axial displacement. The z positions of the point objects determined in the first sample image are compared with the z positions of the same point

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2014/147257 A1



Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

objects determined in the second sample image. In dependence on this comparison, correction information is produced, on the basis of which the z positions of the point objects determined in dependence on the association information are corrected.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben ist ein lichtmikroskopisches Verfahren zur Lokalisierung von Punktobjekten in einer Probe (76), bei dem die Probe (76) mittels einer Abbildungsoptik (70) auf einen Detektor (14, 56) abgebildet wird, und die in der Probe (76) enthaltenen Punktobjekte innerhalb des Schärfentiefenbereichs (78) lokalisiert werden, indem ein erstes Probenbild, das durch die Abbildung der Probe (76) auf dem Detektor (14, 56) erzeugt wird, ausgewertet wird. Zur Lokalisierung des jeweiligen Punktobjektes in Richtung der optischen Achse (O) wird eine Kenngröße (d) eines das Punktobjekt darstellenden Lichtflecks (38, 40, 42, 44, 60) des ersten Probenbildes ermittelt und dieser Kenngröße (d) in Abhängigkeit einer vorbestimmten Zuordnungsinformation eine auf das Punktobjekt bezogene axiale z-Position zugeordnet. Der Schärfentiefenbereich (78) wird relativ zur Probe (76) längs der optischen Achse (O) um einen vorbestimmten axialen Verstellweg verschoben, der kleiner als die axiale Ausdehnung (t) des Schärfentiefenbereichs (78) ist. Bei axial verschobenem Schärfentiefenbereich (78) wird die Probe (76) mittels der Abbildungsoptik (70) erneut auf den Detektor abgebildet und mindestens ein zweites Probenbild erzeugt. In dem zweiten Probenbild werden die z-Positionen der Punktobjekte in Abhängigkeit des vorbestimmten axialen Verstellwegs ermittelt. Die in dem ersten Probenbild ermittelten z-Positionen der Punktobjekte werden mit den in dem zweiten Probenbild ermittelten z-Positionen derselben Punktobjekte verglichen. In Abhängigkeit dieses Vergleichs wird eine Korrekturinformation erzeugt, an Hand der die in Abhängigkeit der Zuordnungsinformation ermittelten z-Positionen der Punktobjekte korrigiert werden.

Lichtmikroskopisches Verfahren zur Lokalisierung von Punktoobjekten

Die Erfindung betrifft ein lichtmikroskopisches Verfahren zur Lokalisierung von
5 Punktoobjekten in einer Probe, bei dem die in einem Objektraum angeordnete Probe
mittels einer Abbildungsoptik, die in dem Objektraum einen Schärfentiefenbereich
vorbestimmter axialer Ausdehnung längs ihrer optischen Achse hat, einen Detektor
abgebildet wird, und die in der Probe enthaltenen Punktoobjekte innerhalb des
Schärfentiefenbereichs lokalisiert werden, indem ein erstes Probenbild, das durch die
10 Abbildung der Probe auf dem Detektor erzeugt wird, ausgewertet wird, wobei zur
Lokalisierung des jeweiligen Punktoobjektes in Richtung der optischen Achse eine
Kenngröße eines das Punktoobjekt darstellenden Lichtflecks des ersten Probenbildes
ermittelt wird und dieser Kenngröße in Abhängigkeit einer vorbestimmten
Zuordnungsinformation eine auf das Punktoobjekt bezogene axiale z-Position zugeordnet
15 wird.

In jüngerer Vergangenheit wurden lichtmikroskopische Abbildungsverfahren entwickelt,
mit denen sich basierend auf einer sequentiellen, stochastischen Lokalisierung von
einzelnen Markern, insbesondere Fluoreszenzmolekülen, Probenstrukturen darstellen
lassen, die kleiner sind als die beugungsbedingte Auflösungsgrenze klassischer
20 Lichtmikroskope. Solche Verfahren sind beispielsweise beschrieben in WO 2006/127692
A2; DE 10 2006 021 317 B3; WO 2007/128434 A1, US 2009/0134342 A1; DE 10 2008 024
568 A1; WO 2008/091296 A2; „Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical
reconstruction microscopy (STORM)“, Nature Methods 3, 793-796 (2006), M. J. Rust, M.
Bates, X. Zhuang; „Resolution of Lambda/10 in fluorescence microscopy using fast single
25 molecule photo-switching“, Geisler C. et al, Appl. Phys. A, 88, 223-226 (2007). Dieser neue
Zweig der Mikroskopie wird auch als Lokalisierungsmikroskopie bezeichnet. Die
angewandten Verfahren sind in der Literatur z.B. unter den Bezeichnungen (F)PALM
((Fluorescence) Photoactivation Localization Microscopy), PALMIRA (PALM with
Independently Running Acquisition), GSD(IM) (Ground State Depletion Individual
30 Molecule Return) Microscopy) oder (F)STORM ((Fluorescence) Stochastic Optical
Reconstruction Microscopy) bekannt.

Den neuen Verfahren ist gemein, dass die abzubildenden Probenstrukturen mit Punktoobjekten, sogenannten Markern präpariert werden, die über zwei unterscheidbare Zustände verfügen, nämlich einen „hellen“ Zustand und einen „dunklen“ Zustand.

Werden beispielsweise Fluoreszenzfarbstoffe als Marker verwendet, so ist der helle Zustand ein fluoreszenzfähiger Zustand und der dunkle Zustand ein nicht fluoreszenzfähiger Zustand.

In bevorzugten Ausführungsformen werden, wie z.B. in der WO 2008/091296 A2 und der WO 2006/127692 A2, photoschaltbare oder photoaktivierbare Fluoreszenzmoleküle verwendet. Alternativ können, wie z.B. in der DE 10 2006 021 317 B3, inhärente

10 Dunkelzustände von Standard-Fluoreszenzmolekülen genutzt werden.

Zur Abbildung von Probenstrukturen mit einer Auflösung, die höher als die klassische Auflösungsgrenze der Abbildungsoptik ist, wird nun wiederholt eine kleine Teilmenge der Marker in den hellen Zustand überführt. Dabei ist im einfachsten Falle die Dichte der diese aktive Teilmenge bildenden Marker so zu wählen, dass der mittlere Abstand

15 benachbarter Marker im hellen und damit lichtmikroskopisch abbildbaren Zustand größer als die Auflösungsgrenze der Abbildungsoptik ist. Die die aktive Teilmenge bildenden Marker werden auf einem räumlich auflösenden Lichtdetektor, z.B. eine CCD-Kamera, abgebildet, so dass von jedem punktförmigen Marker eine Lichtverteilung in Form eines Lichtflecks erfasst wird, dessen Größe durch die Auflösungsgrenze der Optik bestimmt ist.

20 Auf diese Weise wird eine Vielzahl von Rohdaten-Einzelbildern aufgenommen, in denen jeweils eine andere aktive Teilmenge abgebildet ist. In einem Bildauswerteprozess werden dann in jedem Rohdaten-Einzelbild die Schwerpunktpositionen der Lichtverteilungen bestimmt, die die im hellen Zustand befindlichen, punktförmigen Marker darstellen. Die aus den Rohdaten-Einzelbildern ermittelten

25 Schwerpunktpositionen der Lichtverteilungen werden dann in einer Gesamtdarstellung in Form eines Gesamtbild-Datensatzes zusammengetragen. Das durch diese Gesamtdarstellung entstehende hochaufgelöste Gesamtbild spiegelt die Verteilung der Marker wider.

Für eine repräsentative Wiedergabe der abzubildenden Probenstruktur müssen

30 ausreichend viele Markersignale detektiert werden. Da jedoch die Anzahl an Markern in

der jeweils aktiven Teilmenge durch den minimalen mittleren Abstand, den zwei Marker im hellen Zustand voneinander haben müssen, limitiert ist, müssen sehr viele Rohdaten-Einzelbilder aufgenommen werden, um die Probenstruktur vollständig abzubilden.

Typischerweise liegt die Anzahl an Rohdaten-Einzelbildern in einem Bereich von 10.000 bis 100.000.

Neben der vorstehend beschriebenen lateralen Positionsbestimmung der Marker in der Objektebene (im Folgenden auch als x-y-Ebene bezeichnet) kann auch eine Positionsbestimmung in axialer Richtung (im Folgenden auch als z-Richtung bezeichnet) erfolgen. Mit axialer Richtung ist dabei die Richtung in der optischen Achse der Abbildungsoptik, also die Hauptausbreitungsrichtung des Lichtes gemeint.

Dreidimensionale Lokalisierungen sind aus so genannten „Particle-Tracking“-Experimenten bekannten, wie sie in Kajo et. al., 1994, Biophysical Journal, 67, Holtzer et. al., 2007, Applied Physics Letters, 90 und Toprak et al., 2007, Nano Letters, 7(7) beschrieben sind. Sie wurden auch schon in bildgebenden Verfahren angewandt, die auf dem oben beschriebenen Schalten und Lokalisieren von Einzelmolekülen basieren. Hierzu wird auf Huang et al, 2008, Science, 319 und Juetten et al., 2008, Nature Methods, verwiesen. Zum Stand der Technik wird ferner auf Pavani et al., 2009, PNAS, 106, verwiesen.

Eine Lokalisierung eines punktförmigen Objektes in z-Richtung kann grundsätzlich dadurch erfolgen, dass man die Veränderung eines auf der Detektionsfläche der Kamera erfassten Lichtflecks auswertet, die sichtbar wird, wenn sich das Punktobjekt aus der zur Detektionsfläche optisch konjugierten Schärfe- oder Fokalebene herausbewegt. Dabei ist im Folgenden unter einem Punktobjekt ein Objekt zu verstehen, dessen Abmessungen kleiner als die beugungsbedingte Auflösungsgrenze der Abbildungsoptik, insbesondere des Detektionsobjektivs sind. In diesem Fall bildet das Detektionsobjektiv ein solches Objekt in Form einer dreidimensionalen Fokuslichtverteilung in den Bildraum ab. Die Fokuslichtverteilung erzeugt auf der Detektionsfläche der Kamera einen Lichtfleck, der durch die sogenannte „Point-Spread-Function“, also Punktabbildungsfunktion oder kurz PSF, charakterisiert ist. Wird nun das Punktobjekt in z-Richtung durch den Fokus, d.h. senkrecht zur Schärfenebene bewegt, so ändern sich Größe und Form der PSF. Analysiert

man das dem erfassten Lichtfleck entsprechende Detektionssignal im Hinblick auf Größe und Form der PSF, so kann man dadurch Rückschlüsse auf die tatsächliche z-Position des Objekts erhalten.

5 Befindet sich das Punktojekt zu weit von der Schärfenebene entfernt, so ist der auf der Detektionsfläche der Kamera erzeugte Lichtfleck so verschwommen, dass das entsprechende Messsignal innerhalb des üblichen Messrauschens nicht mehr wahrnehmbar ist. Es gibt also in dem Objektraum in z-Richtung einen Bereich um die zentrale Fokal-oder Schärfenebene, innerhalb dessen ein Punktojekt auf der Detektionsfläche einen Lichtfleck erzeugt, der noch scharf genug ist, um zur Lokalisierung
10 des Punktojektes in z-Richtung ausgewertet werden zu können. Dieser die Schärfenebene enthaltende Bereich in z-Richtung wird im Folgenden als „Schärfentiefenbereich“ bezeichnet.

Bei einer dreidimensionalen Lokalisierung besteht allerdings das grundsätzliche Problem, dass die von einem Punktojekt herrührende PSF bezüglich der Detektionsfläche
15 symmetrisch ist. Dies bedeutet, dass sich die PSF zwar ändert, wenn das Punktojekt aus der Schärfenebene heraus bewegt wird, so dass sich der Abstand des Punktojektes zur Schärfenebene bestimmen lässt. Jedoch ist die Änderung der PSF symmetrisch zu beiden Seiten der Schärfenebene, so dass sich nicht entscheiden lässt, auf welcher Seite der Schärfenebene sich das Punktojekt innerhalb des Schärfentiefenbereichs befindet.

20 Es sind verschiedene Verfahren bekannt, wie mit dem vorstehend erläuterten Problem umgegangen werden kann. Beispiele sind Verfahren, die in Fachkreisen als „Astigmatismusverfahren“ (die oben genannten Dokumente Kajo et al., Holtzer et al. und Huang et al.), „Bi-Plane-Verfahren“ (vgl. Toprak et al. und Juetten et al.) und „Doppelhelixverfahren“ (vgl. Pavani et al.) bezeichnet werden. Diesen Verfahren ist
25 gemein, dass zur Lokalisierung des Punktojektes in z-Richtung der auf einem Detektor erzeugte Lichtfleck zur Bestimmung einer Kenngröße analysiert wird und dieser Kenngröße eine z-Position des Punktojektes zugeordnet wird. Diese Zuordnung erfolgt anhand einer im Vorfeld bestimmten Zuordnungsinformation, welche die Kenngröße mit der z-Position des Punktojektes in Beziehung setzt. Als Kenngröße kommt
30 beispielsweise wie in dem Astigmatismusverfahren eine Größe in Betracht, welche die

Form des Lichtflecks charakterisiert, oder, wie im Falle des Bi-Plane-Verfahrens eine Größe, welche die Ausdehnungen zweier Lichtflecke miteinander in Beziehung setzt, die von ein- und demselben Lichtfleck herrühren und Detektionsflächen erzeugt werden, deren zugeordnete Schärfenebenen im Objektraum in z-Richtung zueinander versetzt sind.

Ein Problem besteht nun darin, dass sich die im Vorfeld der eigentlichen lichtmikroskopischen Messung bestimmte Zuordnungsinformation, die eine Zuordnung zwischen der in der Messung ermittelten Kenngröße und einer axialen z-Position des Punktojektes ermöglicht, häufig so ungenau ist, dass eine präzise Bestimmung der z-Position nicht möglich ist. So ist die Zuordnungsinformation abhängig von Veränderungen der optischen Eigenschaften der Probe. Schon geringe Veränderungen der optischen Eigenschaften führen bei den in der Lokalisierungsmikroskopie benötigten Hochleistungsoptiken zu Abbildungsfehlern, z.B. zu sphärischen Aberrationen. Dies hat zur Folge, dass sich die Form der durch den Lichtfleck gegebenen PSF verändert und somit die beispielsweise in Form einer Kalibrierkurve ermittelte Zuordnungsinformation für die neuen optischen Bedingungen nicht mehr korrekt ist. In diesem Fall wird dem auf dem Detektor erfassten Lichtfleck die falsche z-Position zugeordnet.

Für den Anwender ist es häufig schwierig, in eine biologische Probe, die letztendlich gemessen werden soll, Kalibrierelemente, wie z.B. fluoreszierende Kügelchen, einzubringen, an Hand derer die oben erwähnte Kalibrierkurve erstellt werden kann. Dies gilt insbesondere dann, wenn diese Kalibrierelemente in verschiedenen Farben fluoreszieren sollen, um Fehler durch die chromatische Aberration zu vermeiden. Daher ist eine in der Praxis bevorzugte Variante, die Kalibrierung, d.h. die Festlegung der Zuordnungsinformation, mit einer eigenen Kalibrierprobe vorzunehmen. Hierbei wirkt sich jedoch das Problem der fehlerhaften Kalibrierung besonders stark aus, da die optischen Eigenschaften der Kalibrierprobe nie exakt identisch mit denen der eigentlichen Messprobe sind. Bereits geringe Unterschiede in der Dicke des Deckglases oder Unterschiede im Einbettmedium der Probe können zu einer deutlichen Abweichung der Form der Kalibrierkurve führen.

Selbst wenn direkt in der zu messenden Probe unter großem experimentellen Aufwand Kalibrierproben eingebracht wurden, kann die so ermittelte Kalibrierkurve fehlerhaft sein. So führen beispielsweise schon geringe Temperaturänderungen dazu, dass typische Immersionsöle ihren Brechungsindex ändern, was wiederum zu sphärischen

- 5 Aberrationen in der Abbildung führt. Somit kann auch in ein- und derselben Probe eine Änderung der Kalibrierkurve zwischen dem Zeitpunkt der Aufnahme der Kalibrierprobe und dem Zeitpunkt der eigentlichen Messung auftreten. Zudem unterscheidet sich das Signal eines als Kalibrierprobe verwendeten Fluoreszenzkügelchens gewisser Größe stets von dem Signal eines das Punktojekt bildenden Einzelmoleküls, was wiederum zu einer
10 fehlerhaften Kalibrierkurve führt.

- In der Praxis führen diese Probleme dazu, dass genaue absolute Bestimmungen der z-Position eines Punktojektes häufig nicht möglich sind. So ist es zwar durchaus möglich, relative Unterschiede in der z-Position zu bestimmen und somit auch benachbarte Strukturen mit hoher Auflösung voneinander zu trennen. Eine Aussage, wie weit etwaige
15 benachbarte Strukturen genau voneinander entfernt sind, ist jedoch schwierig. Dabei ist wichtig, zwischen der Auflösung, d.h. der Möglichkeit, eng beieinander liegende Strukturen voneinander zu trennen, und der absoluten Positionsbestimmung zu unterscheiden. So ermöglicht die im Stand der Technik angewandte Zuordnungsinformation beispielsweise in Form einer Kalibrierkurve zwar regelmäßig die
20 gewünschte Auflösung, jedoch nicht eine präzise Bestimmung der absoluten z-Position des Punktojektes. Man kann diesen Sachverhalt auch als eine beträchtliche (üblicherweise nichtlineare) Verzerrung des dreidimensionalen Bildes in z-Richtung beschreiben, die aus den optischen Aberrationen herrührt. Gerade in der modernen Biologie ist dies ein großes Problem. So beeinflussen beispielsweise die genaue Form und
25 Anordnung von Proteinen deren Funktionsweise dramatisch. Um Informationen über die strukturelle Anordnung zu erhalten, ist man also auf exakte und absolute Messungen in allen drei Raumrichtungen angewiesen. Die unzureichenden Kalibriermöglichkeiten, die im Stand der Technik für die Lokalisierung in z-Richtung existieren, erlauben keine ausreichende Zuverlässigkeit.

Aufgabe der Erfindung ist es deshalb, ein lichtmikroskopisches Verfahren zur Lokalisierung von Punktoobjekten eingangs genannter Art so weiterzubilden, dass sich die Punktoobjekte präziser als bisher in z-Richtung lokalisieren lassen.

Die Erfindung löst diese Aufgabe gemäß Anspruch 1 dadurch, dass der Schärfentiefenbereich, innerhalb dessen die Punktoobjekte lokalisiert werden, in dem Objektraum
5 relativ zur Probe längs der optischen Achse um einen vorbestimmten axialen Verstellweg verschoben wird, der kleiner als die axiale Ausdehnung des Schärfentiefenbereichs ist; bei axial verschobenem Schärfentiefenbereich die Probe mittels der Abbildungsoptik erneut auf den Detektor abgebildet und mindestens ein zweites Probenbild erzeugt wird;
10 in dem zweiten Probenbild die z-Positionen der Punktoobjekte in Abhängigkeit des vorbestimmten axialen Verstellwegs ermittelt werden; die in dem ersten Probenbild ermittelten z-Positionen der Punktoobjekte mit den in dem zweiten Probenbild ermittelten z-Positionen derselben Punktoobjekte verglichen werden; und in Abhängigkeit dieses Vergleichs eine Korrekturinformation erzeugt wird, anhand der die in Abhängigkeit
15 der Zuordnungsinformation ermittelten z-Positionen der Punktoobjekte korrigiert werden.

Wie schon eingangs erwähnt, ist unter dem erfindungsgemäßen Schärfentiefenbereich in dem Objektraum ein Bereich in z-Richtung um die zentrale Fokal- oder Schärfenebene zu verstehen, innerhalb dessen ein Punktoobjekt auf dem Detektor einen Lichtfleck erzeugt, der noch scharf genug ist, um zur Lokalisierung des Punktoobjektes in z-Richtung
20 ausgewertet werden zu können. Dabei ist es nicht erforderlich, diesen maximal möglichen Schärfentiefenbereich voll auszuschöpfen. So kann es sinnvoll sein, in Abhängigkeit der gewünschten Lokalisierungsgenauigkeit den Schärfentiefenbereich bewusst zu verkleinern und somit schon recht verschwommene, aber an sich noch auswertbare Lichtflecken von der Auswertung auszunehmen.

25 Die erfindungsgemäße Lösung sieht vor, eine etwa in Folge von optischen Abbildungsfehlern fehlerhafte Zuordnungsinformation, die z.B. in Form einer gespeicherten Kalibrierfunktion vorliegt, während der Messung zu korrigieren. Hierzu wird der Schärfentiefenbereich der Abbildungsoptik, dessen axiale Ausdehnung längs der optischen Achse bekannt ist, relativ zur Probe um einen axialen Verstellweg verschoben,
30 der kleiner als die axiale Ausdehnung des Schärfentiefenbereichs ist. Die Verschiebung

erfolgt mit anderen Worten so, dass es zwischen dem ursprünglichen Schärfentiefenbereich und dem verschobenen Schärfentiefenbereich in dem Objektraum eine gewisse Überlappung längs der optischen Achse gibt.

Diese Überlappung wird also dadurch erreicht, dass der axiale Verstellweg, um den

- 5 Schärfentiefenbereich längs der optischen Achse bewegt wird, kleiner als die axiale Ausdehnung des Schärfentiefenbereichs ist. So liegt der Verstellweg beispielsweise in einem Bereich von 5 bis 90 %, 10 bis 80 %, 15 bis 70 %, 20 bis 60 % oder 25 bis 50 % der axialen Ausdehnung des Schärfentiefenbereichs. Es versteht sich von selbst, dass diese Wertebereiche nur beispielhaft zu verstehen sind.
- 10 Die erfindungsgemäße Verschiebung des Schärfentiefenbereichs um einen axialen Verstellweg, der kleiner ist als die axiale Ausdehnung des Schärfentiefenbereichs, ist so zu verstehen, dass die beiden betrachteten Schärfentiefenbereiche, nämlich der ursprüngliche und der verschobene Schärfentiefenbereich, längs der optischen Achse eine Überlappung aufweisen. Dies bedeutet, dass die Erfindung auch eine Schrittfolge
- 15 von Verschiebungen des Schärfentiefenbereichs abdeckt, bei der in einem einzelnen Schritt der Schärfentiefenbereich um einen Verstellweg verschoben wird, der größer als die Ausdehnung des Schärfentiefenbereichs ist, sofern die Schrittfolge insgesamt dazu führt, dass zwischen den betrachteten Schärfentiefenbereichen die vorstehend genannte axiale Überlappung realisiert ist.
- 20 Der Umstand, dass der axiale Verstellweg, um den der Schärfentiefenbereich in einem oder mehreren Schritten in dem Objektraum verschoben wird, kleiner ist als die axiale Ausdehnung des Schärfentiefenbereichs, bedeutet, dass das Verschieben des Schärfentiefenbereichs in z-Richtung mit einer Genauigkeit erfolgt, welche die Auflösungsgenauigkeit der Abbildungsoptik in z-Richtung übersteigt. Dies lässt sich
- 25 beispielsweise über einen Piezoaktor erreichen, der entweder die Abbildungsoptik oder die Probe in z-Richtung verschiebt. Ebenso ist es möglich, zum Verschieben des Schärfentiefenbereichs ein geeignetes optisches Element zu verwenden, z.B. eine deformierbare Linse, einen deformierbaren oder verfahrbaren Spiegel oder einen räumlichen Lichtmodulator.

Die erfindungsgemäße Korrektur ermöglicht eine dreidimensionale mikroskopische Abbildung über den Schärfentiefenbereich hinaus, was bisher aufgrund der Verzerrung des Bildes in z-Richtung nicht ohne weiteres möglich war. Zwar ist es im Prinzip auch schon bei herkömmlichen Verfahren denkbar, nach der Aufnahme eines Bildes die

5 Abbildung in z-Richtung genau um einen Betrag zu verschieben, welche der axialen Ausdehnung des Schärfentiefenbereichs entspricht, und dann ein weiteres Bild aufzunehmen, um schließlich diese beiden Bilder in z-Richtung zusammenzufügen.

Daraus ergäbe sich dann ein Gesamtbild, das sich in z-Richtung über zwei Schärfentiefenbereiche erstreckt. Dieses Vorgehen erfordert jedoch eine Lokalisierung

10 der Punktoobjekte in z-Richtung mit einer Präzision, die bisher nicht gegeben war. Erst die durch das erfindungsgemäße Verfahren erzielte Präzision erlaubt ein Zusammenfügen mehrerer Bilder in z-Richtung, ohne dass zwischen den Bildern verfälschende Überlagerungen oder Lücken auftreten.

Wird die Korrekturinformation, anhand der die z-Positionen der Punktoobjekte korrigiert

15 werden, in Form einer Korrekturvorschrift bereit gestellt, durch die den mit der ursprünglichen (fehlerhaften) Zuordnungsinformation ermittelten z-Positionen der Punktoobjekte erfindungsgemäß korrigierte z-Positionen zugeordnet werden, so wird gegebenenfalls in dem vorstehend beschriebenen Fall für jeden der in z-Richtung aufeinander folgenden Schärfentiefenbereiche eine eigene Korrekturvorschrift ermittelt

20 und zur Lokalisierung der Punktoobjekte in diesem Schärfentiefenbereich angewandt.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist insbesondere in solchen Fällen gewinnbringend einsetzbar, in denen die Kalibrierkurve durch Änderung der optischen Eigenschaften der Probe bzw. des Lichtwegs durch die Probe veränderlich ist. Somit können für verschiedene Bereiche der Probe unterschiedliche Kalibrierungen gelten. Ein Beispiel

25 hierfür sind in wässrigen Medien eingebettete Proben. Je tiefer man die Schärfenebene der Abbildung in die Probe hineinfährt, desto mehr Wasser muss das Licht durchqueren, welches einen anderen Brechungsindex als die übrigen optischen Materialien wie Immersionsöl und Glas hat. Somit ändert sich die optische Abbildung und damit auch die Kalibrierkurve in Abhängigkeit der z-Position des Schärfentiefenbereichs.

Erfindungsgemäß ist unter dem ersten bzw. dem zweiten Probenbild jeweils ein Bilddatensatz zu verstehen, wie er beispielsweise durch das oder die eingangs erläuterten Rohdaten-Einzelbilder realisiert ist.

Vorzugsweise wird innerhalb des Schärfentiefenbereichs längs der optischen Achse

- 5 mindestens eine z-Differenzposition definiert, die relativ zum Schärfentiefenbereich ortsfest ist. Es wird mindestens einer derjenigen Lichtflecke aus dem mindestens einen mit axial verschobenem Schärfentiefenbereich auf dem Detektor erzeugten zweiten Probenbild, welche die in dem axial verschobenen Schärfentiefenbereich in der z-Referenzposition angeordneten Punktoobjekte darstellen, als Referenzlichtfleck definiert.
- 10 Die z-Position des Punktoobjektes, das durch den Referenzlichtfleck dargestellt ist, wird in dem Objektraum in Abhängigkeit des axialen Verstellwegs des Schärfentiefenbereichs und der z-Referenzposition bestimmt. Einer der Lichtflecke, aus dem ersten Probenbild, der dasselbe Punktoobjekt wie der Referenzlichtfleck des zweiten Probenbildes darstellt, wird als Vergleichslichtfleck identifiziert. In Abhängigkeit einer Abweichung der z-Position
- 15 des Punktoobjektes, das durch den Vergleichslichtfleck dargestellt ist, gegenüber der z-Position desselben Punktoobjektes, das durch den Referenzlichtfleck dargestellt ist, wird die Korrekturinformation erzeugt, anhand der die in Abhängigkeit der Zuordnungsinformation ermittelten z-Positionen der Punktoobjekte korrigiert werden.

Innerhalb des Schärfentiefenbereichs wird also mindestens eine z-Referenzposition

- 20 definiert, die relativ zu dem Schärfentiefenbereich ortsfest ist. Letzteres bedeutet, dass die z-Referenzposition gleichsam mit dem Schärfentiefenbereich in dem Objektraum bewegt wird. Als z-Referenzposition kann beispielsweise die in dem Objektraum axial obere oder axial untere Grenze des Schärfentiefenbereichs definiert werden. Auch die z-Position, in der sich die zentrale Schärfenebene des Schärfentiefenbereichs befindet, ist
- 25 als z-Referenzposition geeignet. Ferner ist es möglich, nicht nur eine einzige, sondern mehrere z-Referenzpositionen innerhalb des Schärfentiefenbereichs zu definieren, deren Lagen im Objektraum bekannt sind und die es deshalb ermöglichen, die z-Positionen derjenigen Punktoobjekte, die sich in den z-Referenzpositionen befinden, fehlerfrei zu bestimmen.

Diese Ausführungsform sieht also vor, die präzise Verschiebung des Schärfentiefenbereichs, die unbeeinflusst von optischen Abbildungsfehlern möglich ist, zu nutzen, um während der aktuellen Messung z.B. in bestimmten zeitlichen Abständen Referenzmessungen in der Probe durchzuführen, anhand derer eine fehlerhafte

- 5 Kalibrierung korrigiert werden kann. Diese Korrektur beruht darauf, dass in dem Probenbild, welches mit axial verschobenem Schärfentiefenbereich aufgenommen wird, diejenigen Punktoobjekte, die sich innerhalb des verschobenen Schärfentiefenbereichs in den z-Referenzpositionen befinden, fehlerfrei bestimmt werden können, da die z-Referenzpositionen bekannt sind. In Kenntnis dieser korrekten z-Positionen lässt sich
- 10 erfindungsgemäß eine Korrekturinformation erzeugen, die dann genutzt werden kann, in einem vor Verschieben des Schärfentiefenbereichs aufgenommenen Probenbild die in diesem Probenbild ermittelten z-Positionen der Punktoobjekte zu korrigieren. Wird durch sukzessives Verschieben des Schärfentiefenbereichs die Korrekturinformation nach und nach vervollständigt, so lässt sich auf diese Weise eine durch falsche Kalibrierung
- 15 verursachte Verzerrung des Gesamtbildes korrigieren.

- Vorzugsweise wird der Schärfentiefenbereich in mehreren Schritten axial verschoben. In jedem dieser Schritte wird dann die Korrekturinformation anhand des jeweiligen Referenzlichtflecks und des jeweiligen Vergleichslichtflecks erzeugt. Die in Abhängigkeit der Zuordnungsinformation ermittelten z-Positionen der Punktoobjekte werden schließlich
- 20 anhand der schrittweise erzeugten Korrekturinformation korrigiert. Durch das schrittweise Verschieben des Schärfentiefenbereichs wird der ursprüngliche, d.h. nicht verschobene Schärfentiefenbereich gleichsam mit der z-Referenzposition abgetastet. Da die z-Referenzposition in jedem Schritt bekannt ist, können innerhalb des ursprünglichen Schärfentiefenbereichs diejenigen Punktoobjekte, die in den mit der jeweils verschobenen
- 25 z-Referenzposition zusammenfallenden z-Positionen identifiziert werden, exakt lokalisiert werden. Auf Grundlage dieser exakt bestimmten z-Positionen können dann anhand der Korrekturinformation auch die zwischen diesen Positionen liegenden z-Positionen innerhalb des ursprünglichen Schärfentiefenbereichs ermittelt werden.

- Vorzugsweise wird in jedem Schritt die in Abhängigkeit der Zuordnungsinformation für
- 30 den jeweiligen Vergleichslichtfleck ermittelte z-Position durch die für den entsprechenden Referenzlichtfleck ermittelte z-Position ersetzt und durch diese

Ersetzung eine die Korrekturinformation bildende Korrekturfunktion erzeugt. Dabei deckt diese Korrekturfunktion vorzugsweise den gesamten Schärfentiefenbereich ab, mit dem das erste Probenbild aufgenommen worden ist.

In einer besonders bevorzugten Ausführung werden Zwischenwerte der

- 5 Korrekturfunktion, für die durch die schrittweise Verschiebung des Schärfentiefenbereichs keine Vergleichslichtflecke und Referenzlichtflecke verfügbar sind, durch Interpolation ermittelt. Dabei bilden die z-Positionen, die durch Verschieben der z-Referenzposition exakt ermittelt werden, Stützstellen, auf deren Grundlage die Interpolation, beispielsweise eine einfache Spline-Interpolation, durchgeführt werden
- 10 kann. So wird beispielsweise eine geeignete Modellfunktion gewählt, die typische Kalibrierfehler berücksichtigt, und diese Modellfunktion an die vorstehend genannten Stützstellen angepasst, um die gewünschte Korrekturfunktion zu erhalten.

Vorzugsweise werden die durch schrittweises Verschieben des Schärfentiefenbereichs ermittelten z-Positionen der Punktobjekte zu einem Gesamtlokalisierungsbild überlagert.

- 15 Demnach werden die (zweiten) Probenbilder nicht allein zur Korrektur der in dem ursprünglichen (ersten) Probenbild ermittelten z-Positionen genutzt, sondern zum Aufbau eines Gesamtlokalisierungsbildes, das sich in z-Richtung über einen Bereich erstreckt, der größer als der ursprüngliche Schärfentiefenbereich ist.

Vorzugsweise wird der axiale Verstellweg, um den der Schärfentiefenbereich in dem

- 20 Objektraum verschoben wird, mittels eines Sensors erfasst. Dadurch ist sichergestellt, dass der axiale Verstellweg, der in die Korrektur der ermittelten z-Positionen der Punktobjekte eingeht, stets genau bekannt ist. Das Verschieben des Schärfentiefenbereichs relativ zur Probe kann dadurch erfolgen, dass entweder die Probe relativ zu der Abbildungsoptik oder die Abbildungsoptik relativ zu der Probe längs der
- 25 optischen Achse bewegt wird. Jedoch ist die Erfindung hierauf nicht beschränkt. So ist es beispielsweise ebenso möglich, eine deformierbare Linse, einen deformierbaren Spiegel, einen räumlichen Lichtmodulator oder dergleichen zu verwenden, um den Schärfentiefenbereich in dem Objektraum längs der optischen Achse der Abbildungsoptik zu verschieben.

In einer speziellen Ausführungsform wird eine dem Detektor vorgeordnete Zylinderlinse verwendet, die zu einer unterscheidbaren Formveränderung des auf dem Detektor erzeugten Lichtflecks führt, wenn das dem Lichtfleck zugeordnete Punktojekt längs der optischen Achse von einer Seite auf die andere Seite einer in dem Schärfentiefenbereich
5 liegenden Schärfenebene bewegt wird. Die Formveränderung des Lichtflecks kann dann als Kenngröße zur Lokalisierung in z-Richtung genutzt werden.

Dabei ist an dieser Stelle darauf hinzuweisen, dass der Begriff „Form des Lichtflecks“ erfindungsgemäß so zu verstehen ist, dass er nicht allein auf die Form eines Einzellichtflecks Bezug nimmt, sondern auch die Form einer aus mehreren Lichtflecken
10 gebildeten Gesamtheit einschließt, wie sie beispielsweise in dem eingangs genannten Doppelhelixverfahren anzutreffen ist. Dort werden beispielsweise zwei Lichtflecke betrachtet, die gleichsam eine Rotationsbewegung relativ zueinander ausführen.

Vorzugsweise wird die durch die Vergleichslichtflecke gebildete Vergleichsstruktur unter Berücksichtigung ihrer Helligkeit identifiziert, d.h. unter Berücksichtigung der Gesamtzahl
15 an Einzelflecken, die zu dieser Struktur beitragen. Diese Ausführungsform ist insbesondere dann von Vorteil, wenn die bei verschobenem Schärfentiefenbereich ermittelten z-Positionen nicht nur zur Korrektur vorher anhand der Zuordnungsinformation bestimmter z-Positionen genutzt werden, sondern auch zur Erzeugung eines Gesamtlokalisierungsbildes herangezogen werden. Durch diese
20 Weiterbildung werden störende Helligkeitsunterschiede in dem Gesamtlokalisierungsbild vermieden.

Die Zuordnungsinformation kann beispielsweise gewonnen werden, indem ein Kalibrierpunktojekt innerhalb des Schärfentiefenbereichs längs der optischen Achse bewegt und die Kenngröße eines das Kalibrier-Punktojekt darstellenden Lichtflecks
25 eines auf dem Detektor erzeugten Kalibrierbildes in Abhängigkeit der z-Position des Kalibrier-Punktobjektes erfasst wird. Als Kenngröße wird beispielsweise die Form und/oder die Ausdehnung des Lichtflecks auf dem Detektor herangezogen.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist gemäß Anspruch 14 eine lichtmikroskopische Einrichtung zur Lokalisierung von Punktojekten in einer Probe
30 vorgesehen.

Die Erfindung wird im Folgenden anhand der Figuren näher erläutert. Darin zeigen:

Fig. 1 eine schematische Darstellung, die eine Ausführungsform zur Lokalisierung eines Punktoresktes in z-Richtung zeigt;

5 Fig. 2 eine schematische Darstellung, die eine alternative Ausführungsform zur Lokalisierung eines Punktoresktes in z-Richtung zeigt;

Fig. 3 eine Zuordnungsvorschrift, durch welche die Form des auf einer Detektionsfläche erfassten Lichtflecks in Bezug zur z-Position eines Punktoresktes relativ zu einer Schärfenebene gesetzt ist;

10 Fig. 4 eine schematische Darstellung, in welcher der erfindungsgemäß genutzte Schärfentiefenbereich veranschaulicht ist;

Fig. 5 eine schematische Darstellung, welche die durch eine fehlerhafte Zuordnungsinformation verursachte Verzerrung des Probenbildes in z-Richtung veranschaulicht;

15 Fig. 6 eine schematische Darstellung zur Veranschaulichung, wie durch die erfindungsgemäße Verschiebung des Schärfentiefenbereichs die z-Positionen der Punktoresktes korrigiert werden; und

Fig. 7 eine grafische Darstellung, der beispielhaft eine durch das Verfahren gemäß Figur 6 erzeugte Korrekturfunktion zeigt.

20 Zunächst werden unter Bezugnahme auf die Figuren 1 bis 3 zwei Ausführungsformen erläutert, in denen auf unterschiedliche Weise eine Kenngröße ermittelt wird, die eine Lokalisierung von Punktoresktes in z-Richtung erlaubt.

25 Figur 1 zeigt eine lichtmikroskopische Einrichtung 10 mit einem Objektiv 12 als Abbildungsoptik und einer Detektionsfläche 14. Die Anordnung nach Figur 1 verfügt über zwei separate Detektionskanäle, von denen ein in Figur 1 linker Kanal im Wesentlichen durch das Objektiv 12 und eine erste Tubuslinse 16 gegeben ist, während ein in Figur 1 rechter Kanal aus dem Objektiv 12 und einer zweiten Tubuslinse 18 gebildet ist. Das von

einem Punktobjekt 20 ausgehende Licht wird durch einen Strahlteiler 22 sowie Umlenkspiegel 24, 26 und 28 zu gleichen Teilen in die beiden Detektionskanäle geleitet.

Die beiden Detektionskanäle unterscheiden sich geringfügig in ihrer Fokusslage. Dies bedeutet, dass der erste Detektionskanal eine erste Bildebene 30 aufweist, die zu einer ersten Schärfenebene 32 optisch konjugiert ist, während der andere Detektionskanal eine gegenüber der ersten Bildebene 30 in einer Richtung parallel zur optischen Achse O des Objektivs 12, d.h. in z-Richtung versetzte zweite Bildebene 34 aufweist, die zu einer zweiten Schärfenebene 36, die wiederum in z-Richtung gegenüber der ersten Schärfenebene 32 versetzt ist, optisch konjugiert ist.

10 Befindet sich das zu lokalisierende Punktobjekt 20 in der Schärfenebene des einen Detektionskanals, so wird es durch das Objektiv 12 dort scharf abgebildet, während es im anderen Detektionskanal unscharf abgebildet wird. Befindet es sich zwischen den beiden Schärfenebenen 32 und 36, so wird es in beiden Detektionskanälen unscharf abgebildet.

15 In Figur 1 ist der vorstehend erläuterte Sachverhalt durch Lichtflecke 38, 40, 42 und 44 veranschaulicht, die in Abhängigkeit der z-Position des Punktobjektes 20 relativ zu den Schärfenebenen 32 und 36 auf der Detektionsfläche 14 erzeugt werden. Die Lichtflecke 38, 40, 42, 44 sind in Figur 1 demnach in der Draufsicht auf die x-y-Ebene dargestellt. Die Lichtflecke 38, 40, 42 und 44 sind jeweils durch die PSF charakterisiert, die sich aus der durch das Objektiv 12 erzeugten Fokuslichtverteilung auf der Detektionsfläche 14 ergibt.

20 Befindet sich das Punktobjekt 20 in der ersten Schärfenebene 32, so ergibt sich auf der Detektionsfläche 14 in dem linken Detektionskanal der vergleichsweise kleine Lichtfleck 38 und in dem rechten Detektionskanal der demgegenüber große Lichtfleck 42. Ist dagegen das Punktobjekt 20 in der Schärfenebene 36 angeordnet, so entsteht auf der Detektionsfläche 14 in dem linken Detektionskanal der große Lichtfleck 40 und in dem
25 rechten Detektionskanal der kleine Lichtfleck 44.

Aus den auf der Detektionsfläche 14 erzeugten Lichtflecken 38, 40, 42, 44 lässt sich nun eine Kenngröße ableiten, die ein Maß für die z-Position des Punktobjektes 20 relativ zu den Schärfenebenen 32 und 36 ist. Beispielsweise kann als Kenngröße die Ausdehnung des in dem linken Detektionskanal erzeugten Lichtflecks 38 bzw. 44 ins Verhältnis gesetzt

werden zur Ausdehnung des in dem rechten Detektionskanal erzeugten Lichtflecks 42 bzw. 44.

Figur 2 zeigt eine Ausführungsform, in der die vorstehend genannte Kenngröße, die die Ermittlung der z-Position des Punktores ermöglicht, in anderer Weise erfasst wird.

5 Dabei zeigt Figur 2 in Teilbild a) zunächst eine herkömmliche Anordnung, bei der das Punktores 20 über eine aus einer Objektlinse 50 und einer Tubuslinse 52 gebildete Abbildungsoptik 54 auf eine Detektionsfläche 56 abgebildet wird. Dabei soll sich das Punktores 20 in einer Schärfeebene 58 befinden, die eine zu der Detektionsfläche 56 optisch konjugierte Fläche ist.

10 Die Abbildungsoptik 54 formt das von dem Punktores 20 ausgehende Licht in eine dreidimensionale Fokuslichtverteilung, die auf die Detektionsfläche 56 fällt. Die Detektionsfläche 56 erfasst so einen Lichtfleck 60, der einen ebenen, senkrecht zur z-Richtung liegenden Schnitt durch die Fokuslichtverteilung darstellt. Um den Sachverhalt besser zu veranschaulichen, ist in Figur 2 der Lichtfleck 60 in der Draufsicht auf die
15 Detektionsfläche 56, d.h. in der x-y-Ebene dargestellt.

In dem in Teilbild a) der Figur 2 dargestellten Fall, in dem sich das Punktores 20 in der Schärfeebene 58 befindet, hat der Lichtfleck 60 auf der Detektionsfläche 56 eine kreisrunde Form, also eine Form, die symmetrisch bezüglich Spiegelungen an der x-z-Ebene und der y-z-Ebene ist.

20 Figur 2 zeigt in Teilbild b) eine erfindungsgemäß abgewandelte Ausführung, bei der zusätzlich zu dem Objekt 50 und der Tubuslinse 52 eine Zylinderlinse 62 vorgesehen ist. Die Zylinderlinse 62 weist in x- und y-Richtung unterschiedliche Brechkräfte und damit verschiedene Fokuslagen für die x- und y-Richtung auf. Dementsprechend ist der Lichtfleck 60 auf der Detektionsfläche 56 in x- und y-Richtung kreuzförmig deformiert.

25 Das Punktores 20 befindet sich in dem in Teilbild b) genau in der Mitte der beiden nun unterschiedlichen Schärfeebenen, wobei diese Mittenposition wieder mit 58 bezeichnet ist. Der kreuzförmige Lichtfleck 60 bleibt jedoch symmetrisch in vorstehend angegebenem Sinne.

Figur 2 zeigt in Teilbild c) einen Fall, in dem das Punktojekt 20 oberhalb der Schärfenebene 58 angeordnet ist. Dieser Versatz aus der Schärfenebene 58 führt dazu, dass der Lichtfleck 60 auf der Detektionsfläche 56 asymmetrisch zu einer Ellipse verformt wird. Dabei wird die elliptische Form des Lichtflecks 60 umso ausgeprägter, je weiter sich
5 das Punktojekt 20 von der Schärfenebene 58 entfernt.

Figur 2 zeigt in Teilbild d) einen Fall, in dem sich das Punktojekt 20 unterhalb der Schärfenebene 58 befindet. Auch hier wird der Lichtfleck 60 auf der Detektionsfläche 56 elliptisch verformt, jedoch in einer Ausrichtung, die von der Ausrichtung des Lichtflecks 60 in Teilbild c) verschieden ist. Dementsprechend lässt sich anhand der Form des

10 Lichtflecks 60 erkennen, ob das Punktojekt 20 oberhalb oder unterhalb der Schärfenebene 40 angeordnet ist. Wie aus den Darstellungen nach Figur 2 hervorgeht, kann die z-Position des Punktojektes 20 relativ zur Schärfenebene 58 anhand der Form und der Ausdehnung des Lichtflecks 60 auf der Detektionsfläche 56 bestimmt werden. Dies erfolgt in der vorliegenden Ausführung anhand einer Zuordnungsvorschrift, die
15 beispielhaft in Figur 3 dargestellt ist. Eine solche Zuordnungsvorschrift lässt sich durch Kalibriermessungen gewinnen, in denen sich ein Kalibrier-Punktojekt in z-Richtung von einer Seite auf die andere Seite der Schärfenebene 58 bewegt und dabei die Form des Lichtflecks für die nun bekannten z-Positionen bestimmt wird. Damit erhält man eine Zuordnungsvorschrift, die es bei der späteren Messung ermöglicht, dem gemessenen
20 Lichtfleck die richtige z-Position zuzuordnen. In der Praxis wird hierzu eine spezielle Kalibrierprobe verwendet, z.B. eine Probe mit fluoreszierenden Kügelchen oder beleuchteten und streuenden Nanopartikeln als Kalibrier-Punktojekte.

Figur 3 zeigt eine entsprechend obigen Ausführungen erstellte Zuordnungsvorschrift. Dort ist als Kenngröße d die Differenz der mit s_x bezeichneten Ausdehnung des Lichtflecks
25 in x-Richtung und der mit s_y bezeichneten Ausdehnung des Lichtflecks PSF in y-Richtung definiert. Somit ergibt sich eine Zuordnungsvorschrift $d(z)$, die es ermöglicht, in der eigentlichen Bildaufnahme für jeden gemessenen Lichtfleck eine z-Position zu bestimmen. Diese Position wird dann gemeinsam mit der x-y-Position gespeichert und steht für die Erzeugung eines hochaufgelösten dreidimensionalen Bildes zur Verfügung.

Die Bestimmung einer Zuordnungsvorschrift, anhand der die z-Positionen der Punktoobjekte erfasst werden können, ist nicht auf die vorstehend erläuterten Ausführungsformen beschränkt. So ist beispielsweise auch das eingangs genannte Doppelhelixverfahren geeignet, eine solche Zuordnungsvorschrift zu erzeugen.

- 5 Außerdem ist darauf hinzuweisen, dass eine Zuordnungsvorschrift in Funktionsform der in Figur 3 gezeigten Art nur eine beispielhafte Ausführung darstellt. So ist es z.B. ebenso möglich, Bildvergleiche in Form von Korrelationen zwischen den gemessenen PSFs und vorab gespeicherten oder berechneten PSFs anzustellen. Die z-Position der gespeicherten oder berechneten PSF, welche die größte Ähnlichkeit mit der gemessenen PSF aufweist, wird dann als korrekte z-Position angesehen. Ist eine gemessene PSF im Hinblick auf ihre Form nicht identisch mit einer der gespeicherten oder berechneten PSFs, so kann ihr beispielsweise durch Interpolation eine z-Position zugewiesen werden, die zwischen den z-Positionen der gespeicherten oder berechneten PSFs liegt, die der gemessenen PSF am ähnlichsten sind.
- 10
- 15 Unter Bezugnahme auf die Figuren 4 bis 7 wird im Folgenden beispielhaft erläutert, wie die Lokalisierung von Punktoobjekten auf Grundlage einer Zuordnungsvorschrift vorstehend beschriebener Art erfindungsgemäß korrigiert werden kann.

Figur 4 zeigt in rein schematischer Darstellung ein Ausführungsbeispiel der mikroskopischen Einrichtung nach der Erfindung, wobei in Figur 4 nur diejenigen Komponenten angedeutet sind, die der Erläuterung des erfindungsgemäßen Korrekturverfahrens dienen. Insbesondere ist in Figur 4 der Detektor weggelassen.

20

In der Anordnung nach Figur 4 bildet ein Objektiv 70 eine auf einem Deckgläschen 72 angebrachte Probe 76 durch ein Immersionsmedium 78 auf den Detektor ab. Das Objektiv 70 hat einen Schärfentiefenbereich 78, der längs der optischen Achse O des

25

Objektivs 70, d.h. in z-Richtung, eine axiale Ausdehnung t aufweist. Der Schärfentiefenbereich 78 ist so festgelegt, dass Punktoobjekte, die sich innerhalb des Schärfentiefenbereichs 78 befinden, durch das Objektiv 70 in Form von Lichtflecken auf den Detektor abgebildet werden, die scharf genug sind, um beispielsweise unter Berücksichtigung einer Zuordnungsvorschrift der in Figur 3 gezeigten Art eine

30

Lokalisierung in z-Richtung zu ermöglichen. Lage und Ausdehnung des

Schärfentiefenbereichs 78 innerhalb des Objektraums sind somit vorbestimmt und bekannt.

Die Einrichtung nach Figur 4 umfasst ferner eine Steuereinheit 80, die den Gesamtbetrieb der Einrichtung steuert. Insbesondere verfügt die Steuereinheit 80 über Rechenmittel, welche die zur Lokalisierung der Punktoobjekte erforderlichen Berechnungen und Auswertungen vornimmt. Die Steuereinheit 80 steuert ferner einen Piezoaktor 82 an, mit dem sich das Objektiv 70 längs der optischen Achse O bewegen lässt, um den Schärfentiefenbereich 78 in definierter Weise längs der optischen Achse O zu verschieben. Ein mit der Steuereinheit 80 gekoppelter Sensor 84 erfasst den Verstellweg, um den das Objektiv 70 und damit der Schärfentiefenbereich 78 innerhalb des Objektraums verschoben werden.

Die Probe 76 enthält verschiedene Strukturen 90, 92, 94, 96 und 98, die in dem Schärfentiefenbereich 78 in unterschiedlichen z-Positionen angeordnet sind. Die Strukturen 90, 92, 94, 96 und 98 sind mit Markern behaftet, welche die zu lokalisierenden Punktoobjekte bilden. Während der Aufnahme werden die Marker, die sich in den Strukturen 90, 92, 94, 96 und 98 befinden, einzeln als Lichtflecke auf den Detektor abgebildet und die Lichtflecke im Hinblick auf ihre Position und Form von der Steuereinheit 80 ausgewertet. Auf diese Weise wird ein in z-Richtung hochaufgelöstes Bild erzeugt.

Figur 5 ist eine Darstellung, in der veranschaulicht ist, wie eine fehlerhafte Zuordnungsvorschrift zu einer Verzerrung des Bildes in z-Richtung führt. So ist im linken Teil der Figur 5 der Objektraum mit dem Schärfentiefenbereich 78 dargestellt, in dem die Strukturen 90, 92, 94, 96 und 98 angeordnet sind, während im rechten Teil der Figur 5 die Abbildung dieser Strukturen in dem Bildraum veranschaulicht ist. Die z-Positionen innerhalb des Bildraums, die den z-Positionen des Objektraums entsprechen, sind mit dem Symbol „ ‘ „ gekennzeichnet.

In dem Beispiel nach Figur 5 führt die fehlerhafte Zuordnungsvorschrift zu einer Stauchung des Bildes in z'-Richtung.

In Figur 6 ist dargestellt, wie diese durch die fehlerhafte Zuordnungsvorschrift verursachte Stauchung des Bildes sukzessiv beseitigt wird, indem der Schärfentiefenbereich 78 in mehreren Schritten in z-Richtung verschoben wird. Dabei entspricht Teilbild a) der Figur 6 der in Figur 5 dargestellten Situation.

- 5 Zunächst wird in dem Schärfentiefenbereich 78 eine z-Referenzposition definiert, die relativ zu dem Schärfentiefenbereich 78 ortsfest ist, d.h. zusammen mit dem Schärfentiefenbereich 78 in dem Objektraum verschoben wird. In dem vorliegenden Beispiel wird die mit z_s bezeichnete untere Grenze des Schärfentiefenbereichs 78 als z-Referenzposition festgelegt. Da diese z-Referenzposition bekannt ist, kann man die z-Position derjenigen Struktur innerhalb der Probe, die sich in der z-Referenzposition befindet, exakt und fehlerfrei erfassen. In Teilbild a) der Figur 6, in der der Schärfentiefenbereich 78 noch nicht verschoben ist, trifft dies auf die Struktur 90 zu.

- Bildet man nun die Probe auf den Detektor ab und verfährt anschließend den Schärfentiefenbereich 78 mitsamt seiner z-Referenzposition auf die Position $z_s=z_1$, so ergibt sich die im Teilbild b) der Figur 6 dargestellte Situation. Dort befindet sich die Struktur 92 in der z-Referenzposition des Schärfentiefenbereichs 78. Für diejenigen Punktoobjekte, die in der in der z-Referenzposition angeordneten Struktur 92 enthalten sind, lässt sich nun die z-Position exakt bestimmen. Die Lichtflecke, die von den in der z-Referenzposition angeordneten Punktoobjekten auf dem Detektor erzeugt werden, sind im Folgenden als Referenzlichtflecke bezeichnet. Anhand dieser Referenzlichtflecke werden nun in dem zuvor aufgenommenen ersten Probenbild (Teilbild a der Figur 6) Lichtflecke identifiziert, die den Referenzlichtflecken des mit verschobenen Schärfentiefenbereich 78 aufgenommenen zweiten Probenbildes entsprechen. Diese in dem ersten Probenbild enthaltenen Lichtflecke werden im Folgenden als Vergleichslichtflecke bezeichnet.

- Wie ein Vergleich der Teilbilder a) und b) der Figur 6 zeigt, ist in dem ersten Probenbild die z-Position der in der Struktur 92 enthaltenen Punktoobjekte infolge der fehlerhaften Zuordnungsvorschrift falsch, nämlich mit einem zu kleinen Wert z_x' ermittelt worden. Dieser falsche Wert kann nun durch den in dem zweiten Probenbild korrekt ermittelten Wert ersetzt und so korrigiert werden. Dieser korrekte Wert ist als $z_1=z_1'$ bekannt.

Wie in Figur 7 gezeigt, kann man nun in einem Graphen die richtige Position z_1 der Struktur 92 gegen die fehlerhafte Position z'_x auftragen, nämlich diejenige Position, die man für die Struktur 92 in dem ersten Probenbild Teilbild a) gefunden hat.

Nun verfährt man die Schärfentiefebene 78 wiederum um einen definierten

- 5 Verstellweg, der kleiner ist als die axiale Ausdehnung t der Schärfentiefebereichs 78. In diesem Beispiel ist der in dem zweiten Verschiebeschritt vorgesehene Verstellweg wieder gleich dem Betrag D_z , so dass die z-Referenzposition in die Position z_2 verschoben wird. Wiederum wird ein Probenbild aufgenommen und es wird wieder diejenige Struktur betrachtet, die in der z-Referenzposition, d.h. an der unteren Grenze des
- 10 Schärfentiefebereichs 78, angeordnet ist. Gemäß dem Teilbild c) der Figur 6 ist dies vorliegend die Struktur 94, deren Punktobjekte auf dem Detektor die zugehörigen Referenzflecke erzeugen. Anhand dieser Referenzlichtflecke werden wiederum in dem ersten Probenbild (Teilbild a der Figur 6) die zugehörigen Vergleichslichtflecke identifiziert, d.h. es wird in dem ersten Probenbild nach der Struktur 94 gesucht. In dem
- 15 ersten Probenbild ist der Struktur 94 die z-Position z'_+ zugeordnet. In dem Graphen nach Figur 7 wird gegen diese Position z'_+ die korrekte Position z_2 aufgetragen.

- In der vorstehend beschriebenen Weise verfährt man in einer geeigneten Anzahl von Schritten, wie in Figur 6 durch die Teilbilder d) und e) angedeutet ist, bis der gesamte ursprüngliche Schärfentiefebereich, der im Teilbild a) der Figur 6 gezeigt ist, abgedeckt
- 20 ist.

- Für alle Strukturen, die man in dem ersten Probenbild wiedergefunden hat, lässt sich nun anhand des Graphen nach Figur 7 die richtige Position an der Ordinate ablesen. Auf Grundlage der dargestellten Messpunkte lässt sich mit Hilfe einer geeigneten Modellfunktion, die typische Kalibrierfehler berücksichtigt, eine Korrekturvorschrift
- 25 erhalten. Wahlweise kann auch eine einfache Spline-Interpolation oder eine Interpolation anderer Art angewandt werden, um die Korrekturvorschrift zu erhalten. Diese Korrekturvorschrift, die in Figur 7 mit $c(z')$ bezeichnet ist, kann nun genutzt werden, um das erste Probenbild (Teilbild a der Figur 6) zu korrigieren. So wird für alle in dem ersten Probenbild ermittelten Positionen z' aus der Korrekturvorschrift $c(z')$ die
- 30 jeweils korrekte z-Position gewonnen.

Es ist darauf hinzuweisen, dass das vorstehend erläuterte Verfahren rein beispielhaft zu verstehen ist. Selbstverständlich können auch andere Algorithmen als der beschriebene angewandt werden. Insbesondere ist es in der praktischen Umsetzung geschickt, nicht nur eine einzige ortsfeste z-Referenzposition innerhalb des Schärfentiefenbereichs festzulegen, wie dies in dem in den Figuren 4 bis 7 gezeigten Beispiel der Fall ist. So können weitere z-Referenzpositionen an anderen Stellen des Schärfentiefenbereichs definiert werden.

Auch ist es denkbar, nicht nur die Abweichungen des n-ten Bildes gegenüber dem ersten Probenbild zu betrachten, sondern auch Positionsabweichungen von Strukturen aus dem n-ten Bild gegenüber Strukturen aus dem m-ten Bild zu ermitteln, wobei n und m natürliche Zahlen gleich oder größer 1 sind. Damit ergeben sich mehr Messpunkte, so dass sich eine präzisere Korrekturvorschrift ermitteln lässt. Auch können Bildbearbeitungsalgorithmen angewandt werden, die direkt die Verzerrungen des n-ten Bildes im Vergleich zu den in dem m-ten Bild ebenfalls vorkommenden Strukturen bestimmen. Wesentlich ist lediglich, dass über ein hochgenaues Verschieben des Schärfentiefenbereichs eine zusätzliche Information bezüglich der z-Position der betrachteten Struktur vorliegt, die geschickt zur Lokalisierung der Punktoobjekte genutzt wird.

Auch können innerhalb des Objektraums und des Bildraums die Wertebereiche von z bzw. z' , d.h. der Schärfentiefenbereich und der entsprechende Bildbereich, flexibel angepasst werden, wenn die Korrekturvorschrift nicht auf den jeweiligen ganzen Probenbereich angewandt werden kann.

Ferner ist auch möglich, die Positionsinformationen, die man mit verschobenem Schärfentiefenbereich gewonnen hat, nicht nur zur Korrektur der in dem ersten Probenbild ermittelten z-Positionen zu nutzen, sondern diese Positionsinformation in die Bilderzeugung selbst einfließen zu lassen.

Ansprüche

1. Lichtmikroskopisches Verfahren zur Lokalisierung von Punktoobjekten in einer Probe (76), bei dem
- 5 die in einem Objektraum angeordnete Probe (76) mittels einer Abbildungsoptik (70), die in dem Objektraum einen Schärfentiefenbereich (78) vorbestimmter axialer Ausdehnung (t) längs ihrer optischen Achse (O) hat, auf einen Detektor (14, 56) abgebildet wird; und die in der Probe (76) enthaltenen Punktoobjekte innerhalb des Schärfentiefenbereichs (78) lokalisiert werden, indem ein erstes Probenbild, das durch die Abbildung der Probe (76)
- 10 auf dem Detektor (14, 56) erzeugt wird, ausgewertet wird;
- wobei zur Lokalisierung des jeweiligen Punktoobjektes in Richtung der optischen Achse (O) eine Kenngröße (d) eines das Punktoobjekt darstellenden Lichtflecks (38, 40, 42, 44, 60) des ersten Probenbildes ermittelt wird und dieser Kenngröße (d) in Abhängigkeit einer vorbestimmten Zuordnungsinformation eine auf das Punktoobjekt bezogene axiale z-
- 15 Position zugeordnet wird;
- dadurch gekennzeichnet, dass
- der Schärfentiefenbereich (78), innerhalb dessen die Punktoobjekte lokalisiert werden, in dem Objektraum relativ zur Probe (76) längs der optischen Achse (O) um einen vorbestimmten axialen Verstellweg verschoben wird, der kleiner als die axiale
- 20 Ausdehnung (t) des Schärfentiefenbereichs (78) ist;
- bei axial verschobenem Schärfentiefenbereich (78) die Probe (76) mittels der Abbildungsoptik (70) erneut auf den Detektor abgebildet und mindestens ein zweites Probenbild erzeugt wird;
- in dem zweiten Probenbild die z-Positionen der Punktoobjekte in Abhängigkeit des
- 25 vorbestimmten axialen Verstellwegs ermittelt werden;
- die in dem ersten Probenbild ermittelten z-Positionen der Punktoobjekte mit den in dem zweiten Probenbild ermittelten z-Positionen derselben Punktoobjekte verglichen werden; und
- in Abhängigkeit dieses Vergleichs eine Korrekturinformation erzeugt wird, an Hand der
- 30 die in Abhängigkeit der Zuordnungsinformation ermittelten z-Positionen der Punktoobjekte korrigiert werden.

2. Lichtmikroskopisches Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass innerhalb des Schärfentiefenbereichs (78) längs der optischen Achse (O) mindestens eine z-Referenzposition (z_s) definiert wird, die relativ zu dem Schärfentiefenbereich (78) ortsfest ist;

mindestens einer derjenigen Lichtflecke (38, 40, 42, 44, 60) aus dem mindestens einen mit axial verschobenem Schärfentiefenbereich (78) auf dem Detektor erzeugten zweiten Probenbild, welche die in dem axial verschobenen Schärfentiefenbereich in der z-Referenzposition (z_s) angeordneten Punktoobjekte darstellen, als Referenzlichtfleck definiert wird;

die z-Position des Punktoobjektes, das durch den Referenzlichtfleck dargestellt ist, in dem Objektraum in Abhängigkeit des axialen Verstellwegs des Schärfentiefenbereichs (78) und der z-Referenzposition (z_s) bestimmt wird;

einer der Lichtflecke (38, 40, 42, 44, 60) aus dem ersten Probenbild, der dasselbe Punktoobjekt wie der Referenzlichtfleck des zweiten Probenbildes darstellt, als Vergleichslichtfleck identifiziert wird; und

in Abhängigkeit einer Abweichung der z-Position des Punktoobjektes, das durch den Vergleichslichtfleck dargestellt ist, gegenüber der z-Position desselben Punktoobjektes, das durch den Referenzlichtfleck dargestellt ist, die Korrekturinformation erzeugt wird, an Hand der die in Abhängigkeit der Zuordnungsinformation ermittelten z-Positionen der Punktoobjekte korrigiert werden.

3. Lichtmikroskopisches Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Schärfentiefenbereich (78) in mehreren Schritten axial verschoben wird, in jedem dieser Schritte die Korrekturinformation an Hand des jeweiligen Referenzlichtflecks und des entsprechenden Vergleichslichtflecks erzeugt wird und die in Abhängigkeit der Zuordnungsinformation ermittelten z-Positionen der Punktoobjekte an Hand der schrittweise erzeugten Korrekturinformation korrigiert werden.

4. Lichtmikroskopisches Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass in jedem Schritt die in Abhängigkeit der Zuordnungsinformation für den jeweiligen Vergleichslichtfleck ermittelte z-Position durch die für den entsprechenden

Referenzlichtfleck ermittelte z-Position ersetzt wird und durch diese Ersetzung eine Korrekturfunktion als Korrekturinformation erzeugt wird.

5. Lichtmikroskopisches Verfahren nach einem der Ansprüche 4, dadurch gekennzeichnet, dass Zwischenwerte der Korrekturfunktion, für die durch die schrittweise Verschiebung des Schärfentiefenbereichs (78) keine Vergleichslichtflecke und Referenzlichtflecke verfügbar sind, durch Interpolation ermittelt werden.

6. Lichtmikroskopisches Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die durch schrittweises Verschieben des Schärfentiefenbereichs (78) ermittelten z-Positionen der Punktobjekte zu einem Gesamtlokalisierungsbild überlagert werden.

7. Lichtmikroskopisches Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass eine durch die Vergleichslichtflecke gebildete Vergleichsstruktur der Vergleichslichtflecke unter Berücksichtigung ihrer Helligkeit identifiziert wird.

8. Lichtmikroskopisches Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Summe der einzelnen, vorzugsweise gleich langen axialen Verstellwege im Wesentlichen gleich der axialen Ausdehnung (t) des Schärfentiefenbereichs (78) ist.

9. Lichtmikroskopisches Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der axiale Verstellweg mittels eines Sensors (84) erfasst wird.

10. Lichtmikroskopisches Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Schärfentiefenbereich (78) in dem Objektraum relativ zur Probe (76) längs der optischen Achse (O) um den axialen Verstellweg verschoben wird, indem die Probe (76) relativ zu der Abbildungsoptik (70) oder die Abbildungsoptik (70) relativ zu der Probe (76) längs der optischen Achse (O) verschoben wird.

11. Lichtmikroskopisches Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Zuordnungsinformation gewonnen wird, indem ein Kalibrier-Punktobjekt innerhalb des Schärfentiefenbereichs (78) längs der optischen Achse (O) bewegt und die Kenngröße (d) eines das Kalibrier-Punktobjekt darstellenden Lichtflecks (38, 40, 42, 44, 60) eines auf dem Detektor erzeugten Kalibrierbildes in Abhängigkeit der z-Position des Kalibrier-Punktobjektes erfasst wird.

12. Lichtmikroskopisches Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass als Detektor eine Anordnung mit zwei Detektionskanälen verwendet wird, von denen ein erster Detektionskanal eine erste Bildebene (30) aufweist, die zu einer ersten Schärfenebene (32) optisch konjugiert ist, während ein zweiter Detektionskanal eine gegenüber der ersten Bildebene (30) längs der optischen Achse (O) versetzte zweite Bildebene (34) aufweist, die zu einer zweiten Schärfenebene (36), die längs der optischen Achse (O) gegenüber der ersten Schärfenebene (32) versetzt ist, optisch konjugiert ist.

13. Lichtmikroskopisches Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, gekennzeichnet durch die Verwendung einer dem Detektor vorgeordneten Zylinderlinse, die zu einer unterscheidbaren Formveränderung des auf dem Detektor erzeugten Lichtflecks führt, wenn das dem Lichtfleck (38, 40, 42, 44, 60) zugeordnete Punktobjekt längs der optischen Achse (O) von einer Seite auf die andere Seite einer in dem Schärfentiefenbereich liegenden Schärfenebene bewegt wird.

14. Lichtmikroskopisches Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass als Kenngröße die Form und/oder die Ausdehnung des das jeweilige Punktobjekt auf dem Detektor darstellenden Lichtflecks (38, 40, 42, 44, 60) genutzt wird.

15. Lichtmikroskopische Einrichtung zur Lokalisierung von Punktobjekten in einer Probe, mit einer Abbildungsoptik (70), die in einem Objektraum einen Schärfentiefenbereich (78) vorbestimmter axialer Ausdehnung (t) längs ihrer optischen Achse (O) hat,

einem Detektor, auf den die Abbildungsoptik (70) eine in dem Objektraum angeordnete Probe (76) abbildet; und

eine Steuereinheit (80), die in der Probe (76) enthaltene Punktoobjekte innerhalb des Schärfentiefenbereichs (78) lokalisiert, indem sie ein erstes Probenbild, das die Abbildungsoptik (70) auf dem Detektor erzeugt, auswertet;

wobei die Steuereinheit (80) zur Lokalisierung des jeweiligen Punktoobjektes in Richtung der optischen Achse (O) eine Kenngröße (d) eines das Punktoobjekt darstellenden Lichtflecks (38, 40, 42, 44, 60) des ersten Probenbildes ermittelt und dieser Kenngröße in Abhängigkeit einer vorbestimmten Zuordnungsinformation eine auf das Punktoobjekt bezogene axiale z-Position zuordnet;

dadurch gekennzeichnet, dass

eine durch die Steuereinheit (80) angesteuerte Verstelleinheit (82) den Schärfentiefenbereich (78), innerhalb dessen die Punktoobjekte lokalisiert werden, in dem Objektraum relativ zur Probe (76) längs der optischen Achse (O) um einen vorbestimmten axialen Verstellweg verschiebt, der kleiner als die axiale Ausdehnung (t) des Schärfentiefenbereichs ist;

die Abbildungsoptik (70) die Probe (76) bei axial verschobenem Schärfentiefenbereich (78) erneut auf den Detektor abbildet und ein zweites Probenbild erzeugt;

die Steuereinheit (80) in dem zweiten Probenbild die z-Positionen der Punktoobjekte in Abhängigkeit des vorbestimmten axialen Verstellwegs ermittelt:

die Steuereinheit (80) die in dem ersten Probenbild ermittelten z-Positionen der Punktoobjekte mit den in dem zweiten Probenbild ermittelten z-Positionen derselben Punktoobjekte vergleicht; und

die Steuereinheit (80) in Abhängigkeit dieses Vergleichs eine Korrekturinformation erzeugt, an Hand der die Steuereinheit (80) die in Abhängigkeit der Zuordnungsinformation ermittelten z-Positionen der Punktoobjekte korrigiert.

16. Lichtmikroskopische Einrichtung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Steuereinheit (80) in dem Schärfentiefenbereich (78) längs der optischen

Achse (O) mindestens eine ortsfeste z-Referenzposition (z_s) definiert;

die Steuereinheit (80) mindestens einen derjenigen Lichtflecke (38, 40, 42, 44, 60) aus dem mindestens einen mit axial verschobenem Schärfentiefenbereich (78) auf dem

Detektor erzeugten zweiten Probenbild, welche die in dem axial verschobenen Schärfentiefenbereich in der z-Referenzposition (z_s) angeordneten Punktoobjekte darstellen, als Referenzlichtfleck definiert;

die Steuereinheit (80) die z-Position des Punktoobjektes, das durch den Referenzlichtfleck dargestellt ist, in dem Objektraum in Abhängigkeit des axialen Verstellwegs des Schärfentiefenbereichs (78) und der z-Referenzposition (z_s) bestimmt;

die Steuereinheit (80) einen der Lichtflecke (38, 40, 42, 44, 60) aus dem ersten Probenbild, der dasselbe Punktoobjekt wie der Referenzlichtfleck des zweiten Probenbildes darstellt, als Vergleichslichtfleck identifiziert; und

die Steuereinheit (80) in Abhängigkeit einer Abweichung der z-Position des Punktoobjektes, das durch den Vergleichslichtfleck dargestellt ist, gegenüber der z-Position desselben Punktoobjektes, das durch den Referenzlichtfleck dargestellt ist, die Korrekturinformation erzeugt, an Hand der die Steuereinheit (80) die in Abhängigkeit der Zuordnungsinformation ermittelten z-Positionen der Punktoobjekte korrigiert.

17. Lichtmikroskopische Einrichtung nach Anspruch 15 oder 16, gekennzeichnet durch einen Sensor (84) zum Erfassen des axialen Verstellwegs des Schärfentiefenbereichs (78).

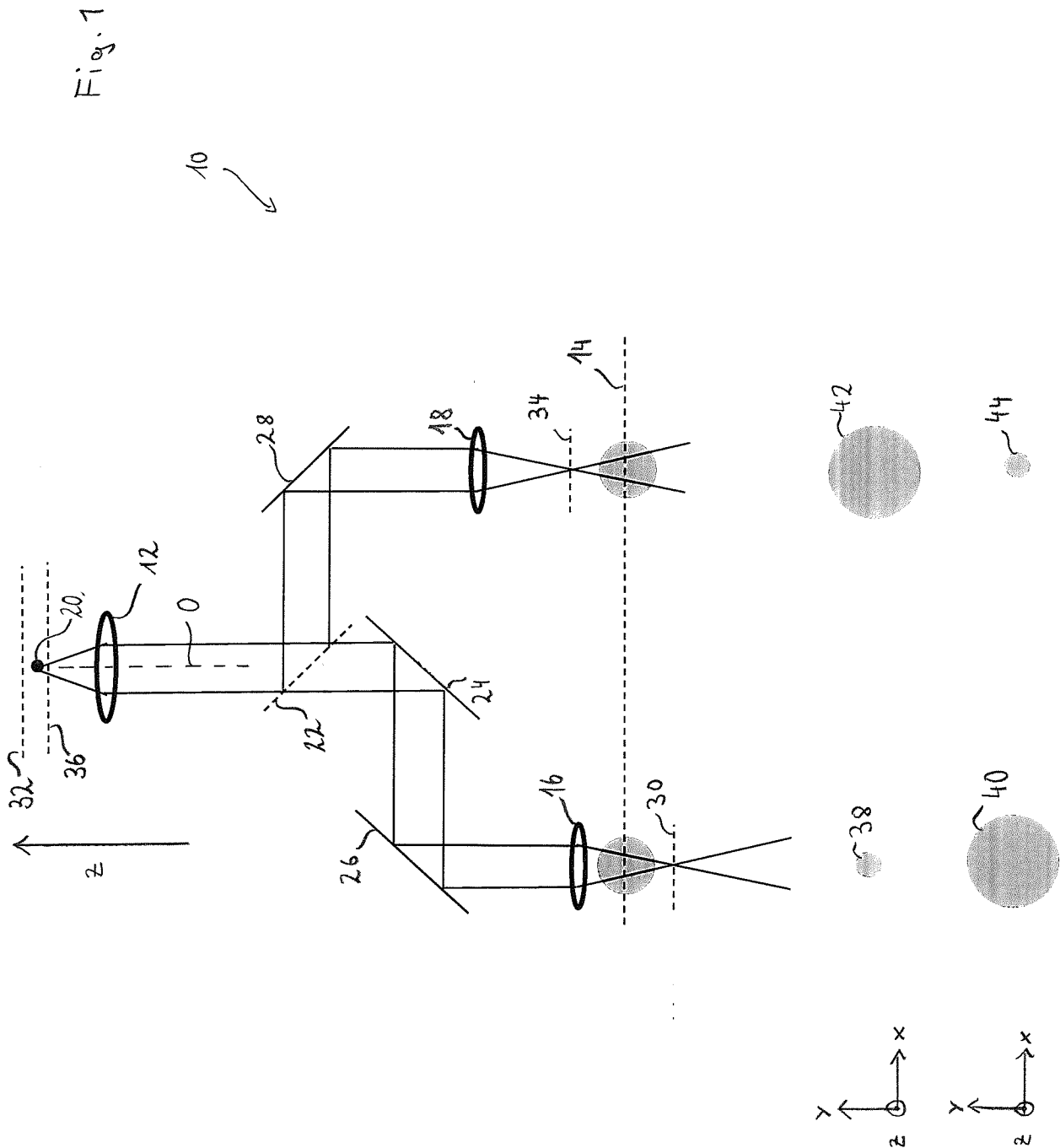
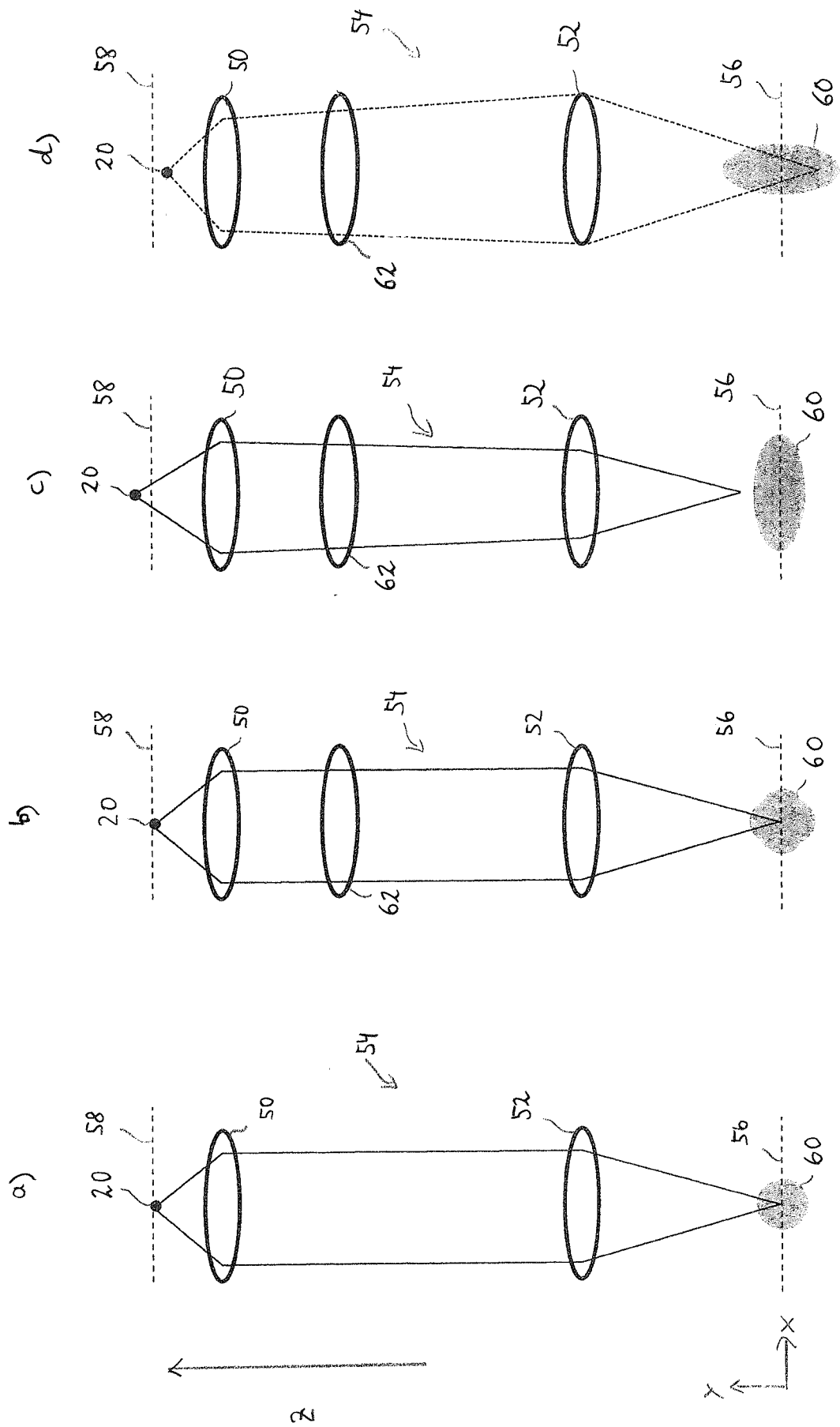


Fig. 2



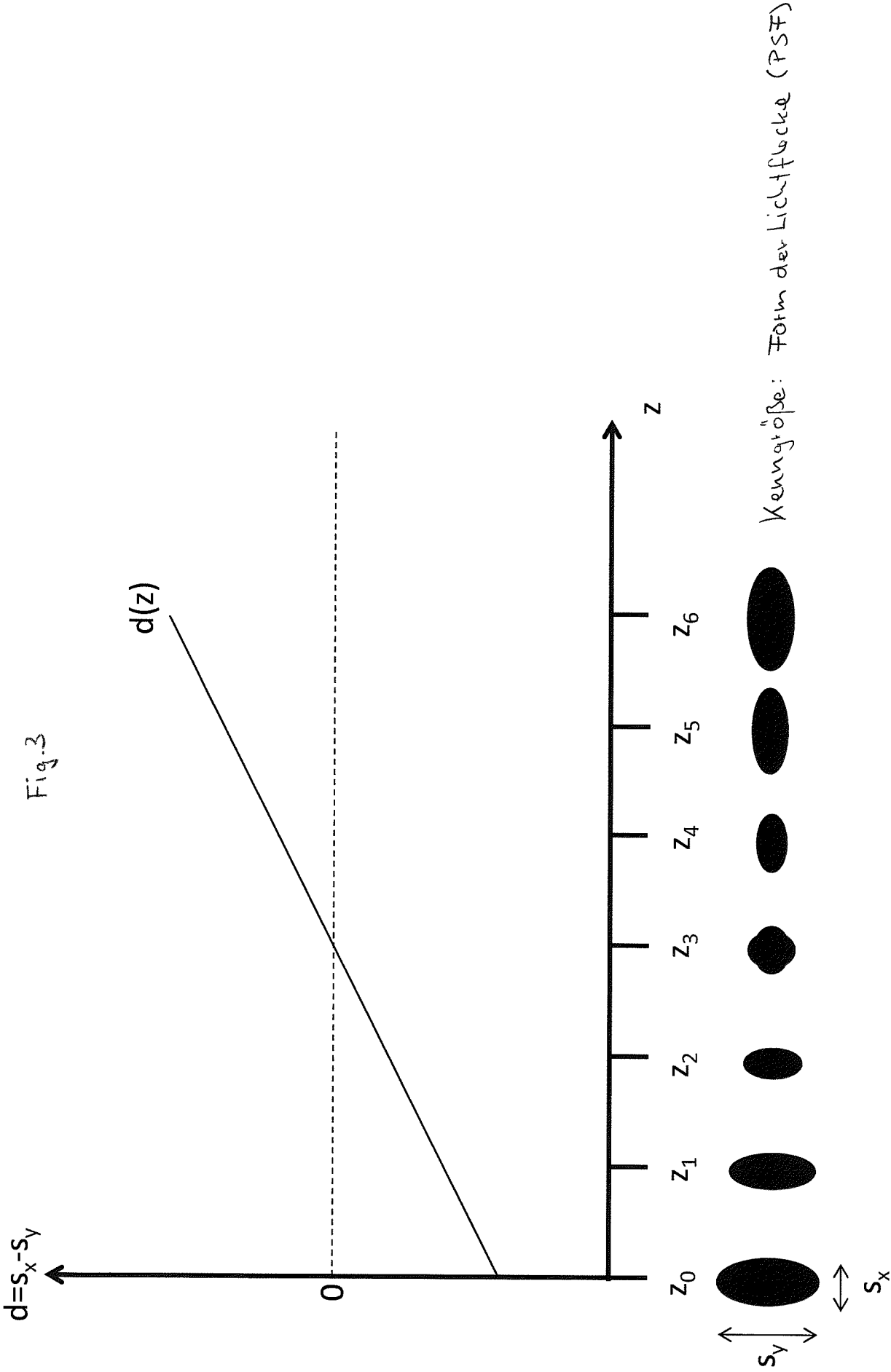


Fig. 4

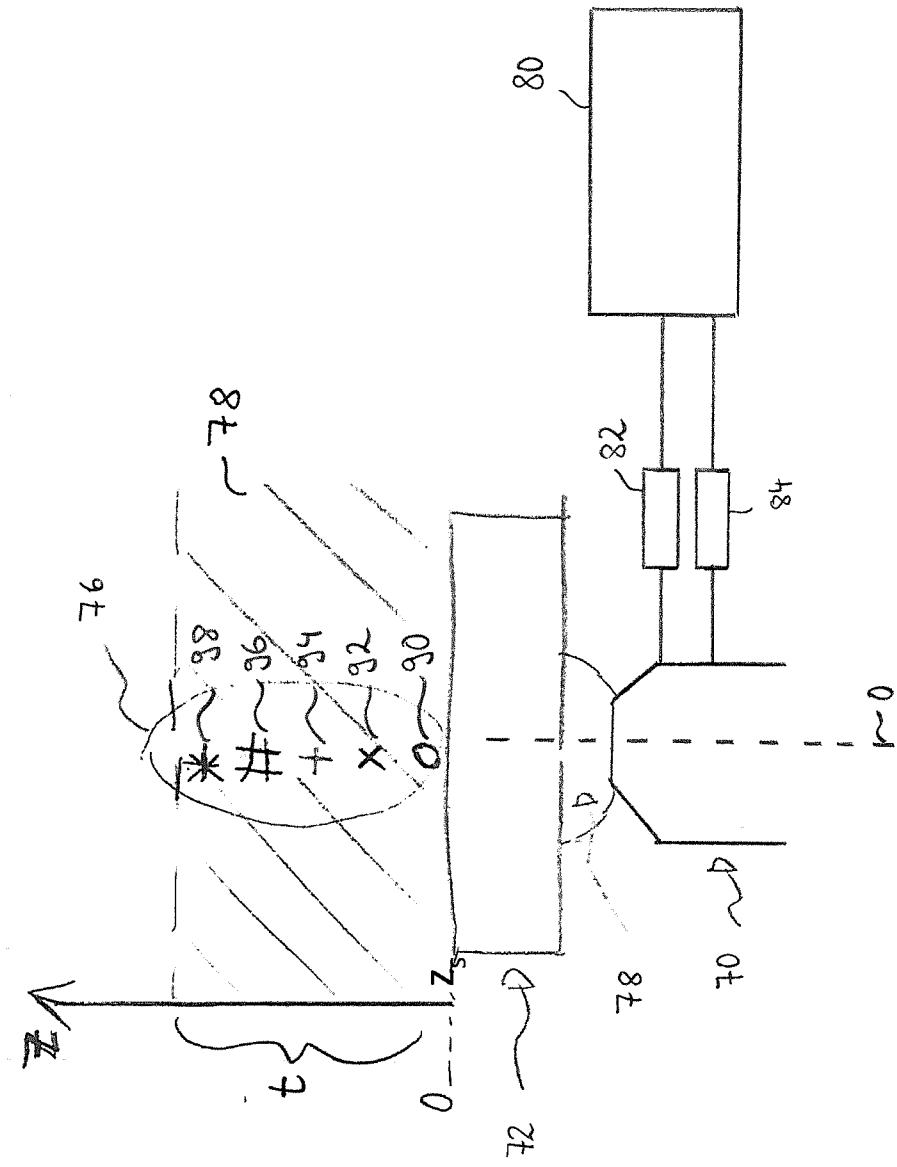


Fig. 5

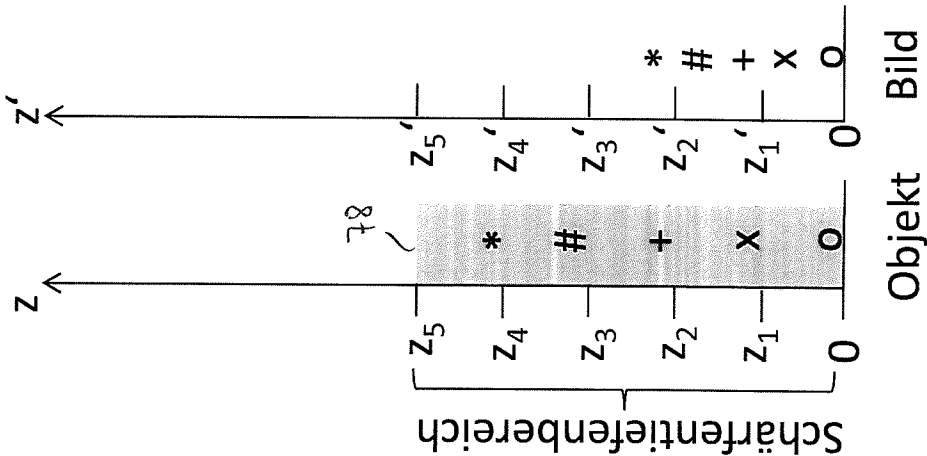


Fig. 6

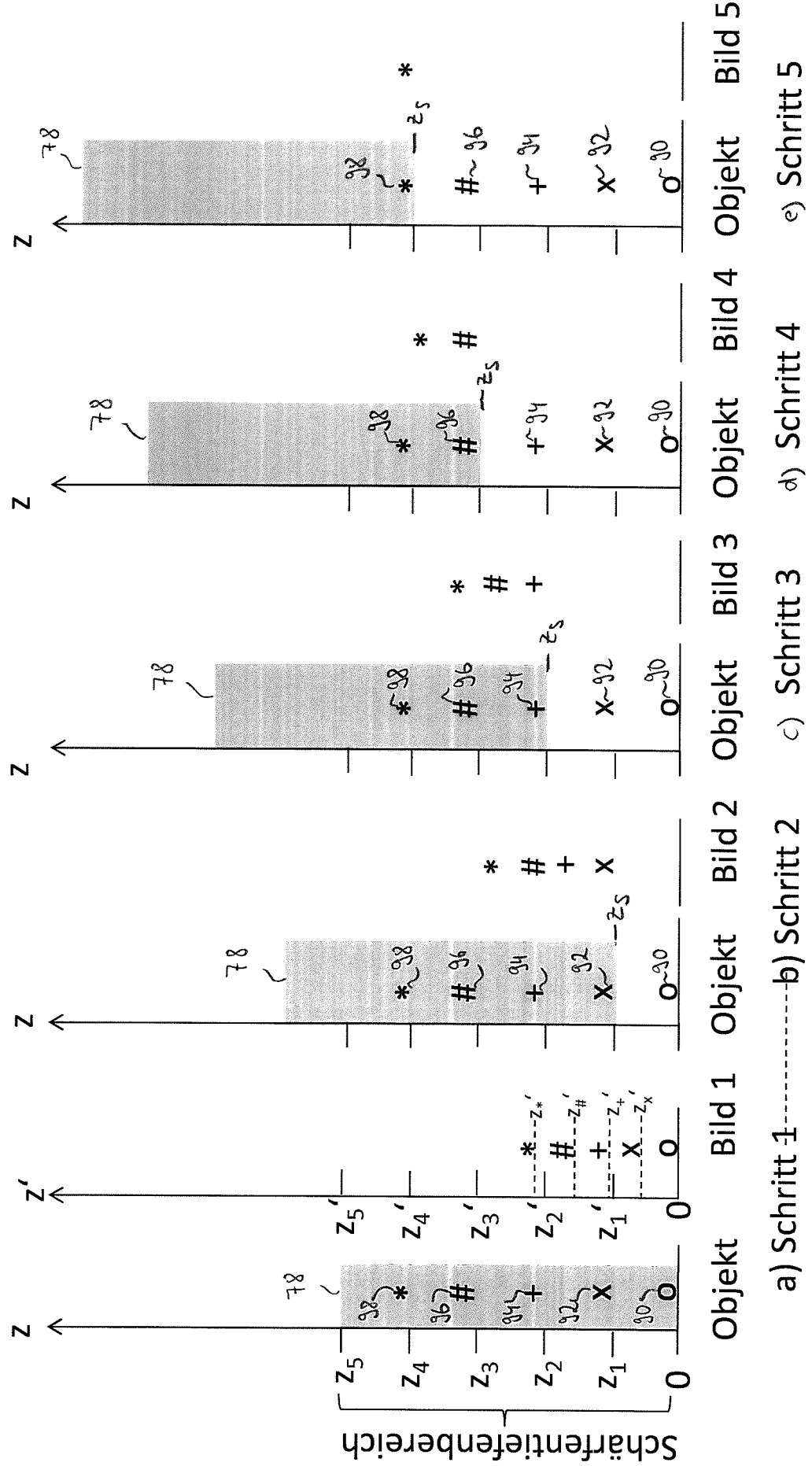
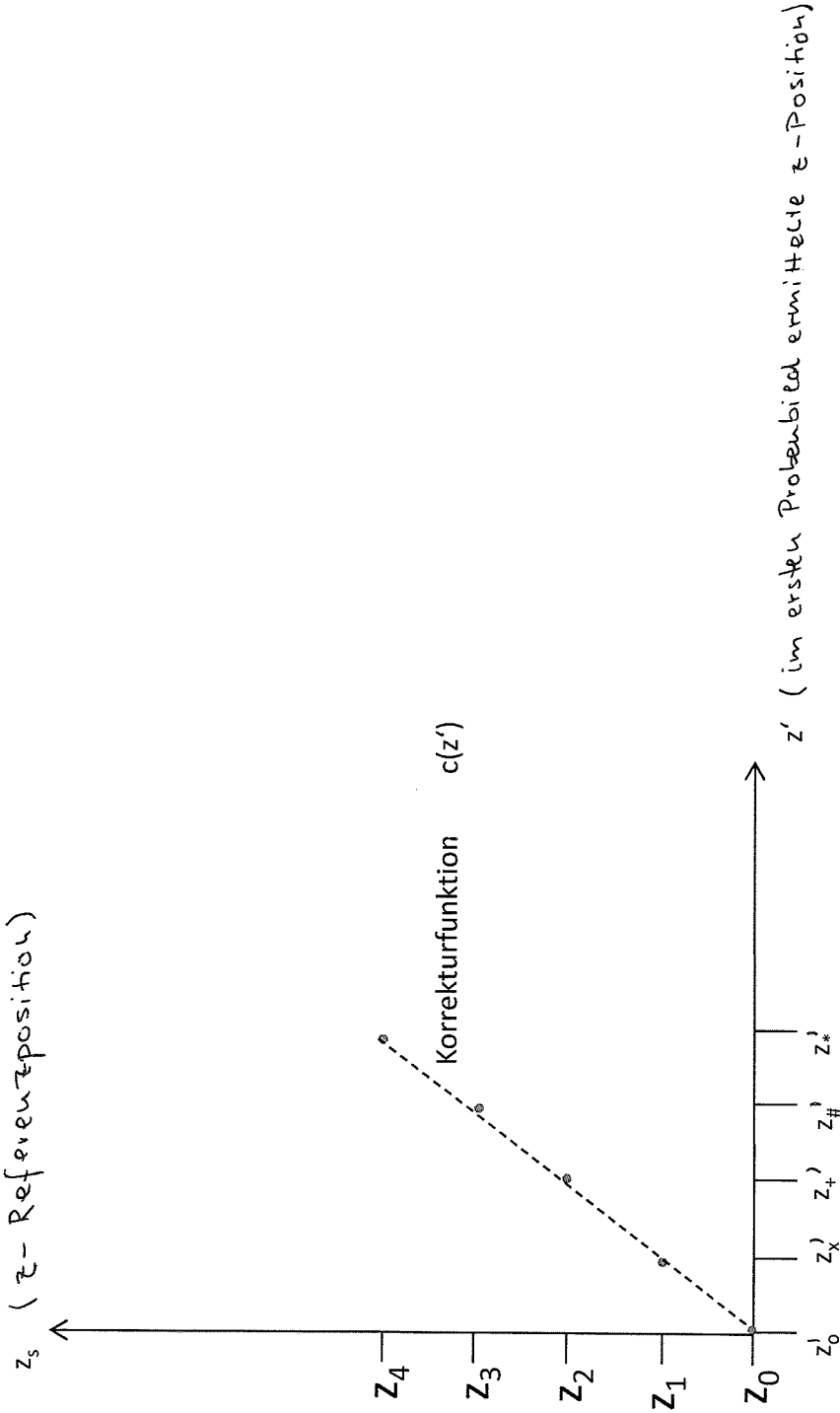


Fig. 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2014/055800

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G02B21/16 G01N21/64 G02B21/36 G02B27/58
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G02B G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KAO H P ET AL: "Tracking of Single Fluorescent Particles in Three Dimensions: Use of Cylindrical Optics to Encode Particle Position", BIOPHYSICAL JOURNAL, CELL PRESS, US, vol. 67, no. 3, 1 September 1994 (1994-09-01), pages 1291-1300, XP002523344, ISSN: 0006-3495, DOI: 10.1016/S0006-3495(94)80601-0 [retrieved on 2009-01-05] the whole document -----	1-11, 13-17
X	WO 2009/085218 A1 (HARVARD COLLEGE [US]; ZHUANG XIAOWEI [US]; HUANG BO [US]; BATES WILFRE) 9 July 2009 (2009-07-09) figures	1-11, 13-17
Y	page 27, line 27 - page 30, line 32 ----- -/--	12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 July 2014

Date of mailing of the international search report

09/07/2014

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Windecker, Robert

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2014/055800

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2010/278400 A1 (PIESTUN RAFAEL [US] ET AL) 4 November 2010 (2010-11-04) the whole document -----	1-17
A	US 2012/300293 A1 (SELVIN PAUL R [US] ET AL) 29 November 2012 (2012-11-29) the whole document -----	1-17
Y	DE 10 2011 053232 A1 (LEICA MICROSYSTEMS [DE]) 7 March 2013 (2013-03-07) abstract; figures -----	12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/055800

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009085218	A1	09-07-2009	CN 101918816 A 15-12-2010
			EP 2232244 A1 29-09-2010
			JP 2011508214 A 10-03-2011
			JP 2014066734 A 17-04-2014
			US 2011002530 A1 06-01-2011
			US 2014038201 A1 06-02-2014
			US 2014063194 A1 06-03-2014
			WO 2009085218 A1 09-07-2009

US 2010278400	A1	04-11-2010	NONE

US 2012300293	A1	29-11-2012	NONE

DE 102011053232	A1	07-03-2013	CN 102981260 A 20-03-2013
			DE 102011053232 A1 07-03-2013
			JP 2013057938 A 28-03-2013
			US 2013229494 A1 05-09-2013

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 INV. G02B21/16 G01N21/64 G02B21/36 G02B27/58
 ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 G02B G01N

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	KAO H P ET AL: "Tracking of Single Fluorescent Particles in Three Dimensions: Use of Cylindrical Optics to Encode Particle Position", BIOPHYSICAL JOURNAL, CELL PRESS, US, Bd. 67, Nr. 3, 1. September 1994 (1994-09-01), Seiten 1291-1300, XP002523344, ISSN: 0006-3495, DOI: 10.1016/S0006-3495(94)80601-0 [gefunden am 2009-01-05] das ganze Dokument	1-11, 13-17
X	WO 2009/085218 A1 (HARVARD COLLEGE [US]; ZHUANG XIAOWEI [US]; HUANG BO [US]; BATES WILFRE) 9. Juli 2009 (2009-07-09)	1-11, 13-17
Y	Abbildungen Seite 27, Zeile 27 - Seite 30, Zeile 32	12
	----- -/-	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

2. Juli 2014

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

09/07/2014

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Windecker, Robert

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 2010/278400 A1 (PIESTUN RAFAEL [US] ET AL) 4. November 2010 (2010-11-04) das ganze Dokument -----	1-17
A	US 2012/300293 A1 (SELVIN PAUL R [US] ET AL) 29. November 2012 (2012-11-29) das ganze Dokument -----	1-17
Y	DE 10 2011 053232 A1 (LEICA MICROSYSTEMS [DE]) 7. März 2013 (2013-03-07) Zusammenfassung; Abbildungen -----	12

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2014/055800

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2009085218	A1	09-07-2009	CN 101918816 A 15-12-2010
			EP 2232244 A1 29-09-2010
			JP 2011508214 A 10-03-2011
			JP 2014066734 A 17-04-2014
			US 2011002530 A1 06-01-2011
			US 2014038201 A1 06-02-2014
			US 2014063194 A1 06-03-2014
			WO 2009085218 A1 09-07-2009

US 2010278400	A1	04-11-2010	KEINE

US 2012300293	A1	29-11-2012	KEINE

DE 102011053232	A1	07-03-2013	CN 102981260 A 20-03-2013
			DE 102011053232 A1 07-03-2013
			JP 2013057938 A 28-03-2013
			US 2013229494 A1 05-09-2013
