

19



LE GOUVERNEMENT
DU GRAND-DUCHÉ DE LUXEMBOURG
Ministère de l'Économie

11

N° de publication :

92925

12

BREVET D'INVENTION

B1

21

N° de dépôt: 92925

51

Int. Cl.:

G02B 21/00, G02B 21/36, G02B 27/00

22

Date de dépôt: 23/12/2015

30

Priorité:

72

Inventeur(s):

FAHRBACH FLORIAN –
69115 HEIDELBERG (Allemagne), KNEBEL WERNER –
76709 KRONAU (Allemagne)

43

Date de mise à disposition du public: 07/08/2017

47

Date de délivrance: 25/09/2017

74

Mandataire(s):

BRADL Joachim - Leica Microsystems GmbH –
35578 WETZLAR (Allemagne)

73

Titulaire(s):

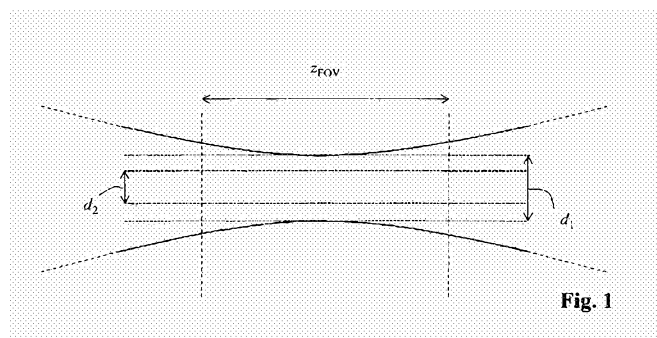
LEICA MICROSYSTEMS CMS GMBH –
35578 WETZLAR (Allemagne)

54

Verfahren zum Untersuchen einer Probe mittels Lichtblatt-Mikroskopie und Lichtblatt-Mikroskop.

57

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Untersuchen einer Probe mittels Lichtblatt- Mikroskopie, wobei eine in einer Beleuchtungsebene befindliche Probenfläche mittels eines sich in der Beleuchtungsebene ausbreitenden Lichtblattes beleuchtet und von der Beleuchtungsebene ausgehendes Detektionslicht detektiert wird. Das Verfahren zeichnet sich dadurch aus, dass eine Position eines Lichtblattfokus des Lichtblattes in der Beleuchtungsebene (26) durch Verändern der optischen Länge des Lichtweges des das Lichtblatt bildenden Beleuchtungslichtes bewegt wird.



BeschreibungNo 9 2 9 2 5
92925

Titel: Verfahren zum Untersuchen einer Probe mittels Lichtblatt-Mikroskopie und Lichtblatt-Mikroskop

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Untersuchen einer Probe mittels Lichtblatt-Mikroskopie, wobei eine in einer Beleuchtungsebene befindliche Probenfläche mittels eines sich in der Beleuchtungsebene ausbreitenden Lichtblattes beleuchtet und von der Beleuchtungsebene ausgehendes Detektionslicht detektiert wird.

10

Die Erfindung betrifft außerdem ein Lichtblatt-Mikroskop mit einem Beleuchtungsobjektiv, das ein Lichtblatt fokussiert, um eine Probenfläche mittels des sich in der Beleuchtungsebene ausbreitenden Lichtblattes zu beleuchten, und mit einem Detektionsobjektiv, durch das von der Beleuchtungsebene ausgehendes Detektionslicht zu einem Detektor gelangt.

15

Die Lichtblatt-Mikroskopie, auch SPIM-Technik (Single Plane Illumination Microscopy) genannt, bei der eine schichtweise Beleuchtung der Probe erfolgt, erlaubt eine schnellere und probenschonendere Erfassung von Bilddaten, als beispielsweise bei einer punkweisen Abtastung einer Probe. Ein bekanntes Einsatzgebiet der SPIM-Technologie ist der Bereich der Fluoreszenz-Mikroskopie, wobei Fluorophore in der Probe mit Laserlicht angeregt werden. Bei der SPIM-Technologie findet hierbei eine Anregung nur in einer von einem Beleuchtungslichtblatt beleuchteten Ebene statt. Eine Schädigung der Probe durch Beleuchtungslicht in anderen Ebenen ist hierdurch vermieden.

20

25

Eine nach dem SPIM-Verfahren arbeitende optische Vorrichtung ist in DE 102 57 423 A1 beschrieben. Bei diesem Mikroskop wird eine Probe mit einem dünnen Lichtblatt beleuchtet, während die Beobachtung senkrecht zu der Ebene des beleuchtenden Lichtblattes erfolgt. Hierbei erfolgen die Beleuchtung und die Detektion über zwei separate optische Strahlengänge mit jeweils separater Optik, insbesondere mit zwei separaten, zueinander senkrechten Objektiven.

30

Aus DE 10 2009 044 983 A1 ist ein Mikroskop bekannt, das eine Beleuchtungseinrichtung aufweist, mit der ein Lichtblatt zur Beleuchtung eines Probenbereichs erzeugt wird, welches in Richtung einer Beleuchtungsachse eines

35

Beleuchtungsstrahlenganges und in Richtung einer Querachse, welche quer zur Beleuchtungsachse liegt, annähernd flächig ausgedehnt ist. Das Mikroskop weist außerdem eine Detektierungseinrichtung auf, mit der Licht detektiert wird, welches entlang einer Detektierungsachse eines Detektierungsstrahlengangs aus dem Probenbereich abgestrahlt wird, wobei Beleuchtungsachse und Detektierungsachse sowie Querachse und Detektierungsachse in einem von Null verschiedenen Winkel aufeinander stehen, und wobei die Detektierungseinrichtung außerdem im Detektierungsstrahlengang ein Detektierungsobjektiv umfasst. Bei einem solchen Mikroskop umfasst die Detektierungseinrichtung außerdem ein von einer Frontlinse des Detektierungsobjektivs räumlich getrennt angeordnetes und von dieser unabhängig verstellbares optisches Detektierungselement, mittels dessen die Größe eines Detektierungsbildfeldes stufenlos variierbar ist, und/oder mittels dessen eine Detektierungsfokusebene im Probenbereich stufenlos verschiebbar ist.

- 15 Aus Dean, K. & Fiolka, R., "Uniform and scalable light-sheets generated by extended focusing", Opt. Express 22, 26141-26152 (2014), ist ein System bekannt, bei dem ein dünner, kurzer Beleuchtungsstrahl mit einer schnell durchstimmbaren Linse entlang der optischen Achse vor und zurück geschoben wird. Durch die geringere Schärfentiefe des Strahls kann dieser dünner sein, was den Bildkontrast steigern soll.
- 20 Da allerdings auch der out-of-focus Bereich des Strahls Fluoreszenz anregt wird, wird eine Schlitzzblende verwendet, um den gewünschten Effekt zu erreichen. Diese Schlitzzblende verläuft in einer konjugierten Ebene im Detektionsstrahlengang kollinear mit dem Beleuchtungsstrahl. Trotz der Nutzung der Schlitzzblende fällt die Steigerung des Bildkontrastes relativ klein aus, insbesondere weil viel Fluoreszenzlicht
- 25 detektiert wird, das nicht vom Fokus des Beleuchtungsstrahls angeregt wurde.

- Aus Zong, W. et al. „Large-field high-resolution two-photon digital scanned light-sheet microscopy" Cell Res. (2014), ist ein ähnliches Mikroskop bekannt, wobei dort allerdings eine nichtlineare Fluoreszenz-Anregung erfolgt. Auch in CN 10 440 74 36 ist ein solches Mikroskop beschrieben.

- Verfahren, bei denen durchstimmbare Linsen verwendet werden, haben den Nachteil, dass sie in der Praxis bereits auf Grund der bei üblichen Mikroskopen vorliegenden Platzverhältnisse nicht umsetzbar sind. Außerdem ist die Verwendung von durchstimmbaren Linsen insbesondere aus folgendem Grund problematisch: Zur Zeit gibt es vor allem zwei Typen von durchstimmbaren Linsen: „Electrically tunable

lenses" (ETL) bei denen das Volumen der Linse zur Veränderung der Brechkraft durch Verschiebung einer Flüssigkeit physisch verändert wird, oder „Tunable acoustic gradient index lenses“, bei denen mittels Dichteschwankungen eine Änderung des Brechungsindex und damit der Brechkraft verursacht wird. Während ETLs mit Grenzfrequenzen im Bereich von 100Hz nachteiliger Weise langsam sind, werden TAG-Linsen resonant bei Frequenzen von mindestens einigen 10^5 Hz betrieben. Beide Linsentypen sind durch ihr Frequenzspektrum nicht geeignet, eine sägezahnförmige Bewegung eines Fokus zu ermöglichen. Bei TAG-Linsen ist die statische Positionierung an beliebigen Positionen gänzlich unmöglich, bei ETLs unterliegt sie nachteiliger Weise einer zeitlichen Drift.

Es ist daher die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren anzugeben, das es erlaubt, schnell und zuverlässig Abbildungen einer Probenschicht mit einer erhöhten Auflösung zu erzeugen.

Die Aufgabe wird durch ein Verfahren gelöst, das dadurch gekennzeichnet ist, dass eine Position eines Lichtblattfokus des Lichtblattes in der Beleuchtungsebene durch Verändern der optischen Länge des Lichtweges des das Lichtblatt bildenden Beleuchtungslichtes bewegt wird.

Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Lichtblatt-Mikroskop anzugeben, das es erlaubt, schnell und zuverlässig Abbildungen mit einem erhöhten Auflösungsvermögen zu erzeugen.

Diese Aufgabe wird durch ein Lichtblatt-Mikroskop gelöst, das gekennzeichnet ist durch ein im Strahlengang des das Lichtblatt bildenden Beleuchtungslichtes angeordnetes Lichtblattfokusschiebemittel, mittels dem eine Position eines Lichtblattfokus des Lichtblattes in der Beleuchtungsebene durch Verändern der optischen Länge des Lichtweges des Beleuchtungslichtes bewegbar ist.

Die aus dem Stand der Technik bekannte, bei der Lichtblatt-Mikroskopie zumeist übliche, statische Beleuchtung mit einem Lichtblatt, dessen Fokus in der Mitte des Bildfeldes angeordnet ist und dessen Schärfentiefe an die Größe des Bildfeldes entlang der Beleuchtungsachse angepasst ist führt dazu, dass die Dicke des Lichtblattes größer ist als notwendig wenn lediglich kleinere, insbesondere nicht zentral liegende, Ausschnitte aus dem Bildbereich von Interesse sind. Wie weiter

- unten noch im Detail erläutert ist, ermöglicht es die vorliegende Erfindung in einfacher und dennoch sehr zuverlässiger Weise, stets ein dünneres Lichtblatt zu verwenden und dies im Hinblick auf die Erzeugung kontrastreicherer Bilder auszunutzen. Dies kann, was weiter unten noch im Detail erläutert ist, insbesondere dadurch realisiert werden, dass das Lichtblatt stärker fokussiert wird, was einen dünneren und in Lichtausbreitungsrichtung kürzeren Lichtblattfokus, jedoch auch eine größere Dicke des Beleuchtungslichtbündels außerhalb des Fokusbereichs zur Folge hat, wobei allerdings ausschließlich das Detektionslicht, das aus dem mittels des Lichtblattfokus beleuchteten Bereich entstammt detektiert wird. Durch axiales Verschieben des Lichtblattfokusses entlang der Lichtausbreitungsrichtung innerhalb der Beleuchtungsebene und kann ein größeres die gesamte in der Beleuchtungsebene liegende, interessierende Probenschicht sukzessive kontrastreich abgebildet werden.
- Die Erfindung hat den ganz besonderen Vorteil, dass eine Möglichkeit zum Schieben des Lichtblattfokusses innerhalb der Beleuchtungsebene in Lichtausbreitungsrichtung oder entgegen der Lichtausbreitungsrichtung auf einfache, jedoch sehr zuverlässige und störungsunanfällige Weise realisierbar ist. Darüber hinaus kann die Erfindung in äußerst vorteilhafter Weise auch bei üblichen Mikroskopaufbauten, insbesondere bei Mikroskopaufbauten, die ein handelsübliches Mikroskopstativ aufweisen, realisiert werden, weil die bei derartigen Mikroskopaufbauten üblicherweise freien Bauraumbereiche für das, weiter unten im Detail beschriebene, Lichtblattfokusschiebemittel genutzt werden können.
- Durch das Verändern der optischen Länge des Lichtweges des Beleuchtungslichtes wird insbesondere eine Veränderung der Position des Lichtblattfokus dann erzielt, wenn das Lichtblattfokusschiebemittel in einem nicht kollimierten Teil des Beleuchtungslichtstrahls angeordnet ist.
- Bei einer besonderen Ausführung werden zum Verändern der optischen Länge des Lichtweges des Beleuchtungslichtes, insbesondere motorisch gesteuert, sukzessive durchsichtige Blöcke unterschiedlicher Dicke und/oder mit unterschiedlichem Brechungsindex in den Lichtweg eingebracht. Dies kann beispielsweise in der Weise erfolgen, dass ein für ein erstes Schieben des Lichtblattfokusses bereits eingebrachter Block im Strahlengang verbleibt und dass für ein weiteres Schieben ein weiterer Block zusätzlich in den Strahlengang eingebracht wird.

92925

Alternativ ist es insbesondere auch möglich, ein stufenweises Schieben dadurch zu realisieren, dass sukzessive und jeweils im Austausch gegeneinander durchsichtige Blöcke unterschiedlicher Dicke und/oder mit unterschiedlichem Brechungsindex in den Lichtweg eingebracht werden. Ein hierfür besonderes prädestiniertes Lichtblattfokusschiebemittel kann mehrere Blöcke unterschiedlicher Dicke und/oder mit unterschiedlichem Brechungsindex aufweisen.

Besonders präzise und schnell einstellbar ist eine hierfür ausgebildete Ausführung, bei der die Blöcke einen Bogen oder einen geschlossenen Ring bildend miteinander verbunden sind, wobei der Bogen oder der Ring zum Verändern der optischen Länge, insbesondere um die optische Achse oder um eine zur optischen Achse parallele Ache, gedreht wird. Auf diese Weise kann nämlich schnell der jeweils im Strahlengang befindliche Block gegen einen anderen Block ausgetauscht werden, wobei die Dicke und/oder der Brechungsindex des durchstrahlten Bereichs des Rings von der jeweiligen Drehstellung des Bogens oder des Rings abhängt. Vorzugsweise erfolgt das Drehen motorisch gesteuert.

Der Ring der Blöcke kann vorteilhaft insbesondere als Stufenring mit einer entlang einer Schraubenlinie ansteigenden Dicke der Blöcke, die nach 360 Grad stufenweise von dem dicksten Block auf den dünnsten Block abfällt, ausgebildet sein. Mit einer derartigen Ausführung kann der Lichtblattfokus durch ein, insbesondere motorisch gesteuertes, Rotieren des Stufenrings vergleichsweise langsam in Lichtausbreitungsrichtung oder gegen die Lichtausbreitungsrichtung verschoben werden, wobei auf das langsame Schieben ein schneller Rücksprung erfolgt, bevor sich der Vorgang des langsamen Schiebens wiederholt.

Die Blöcke können als voneinander zerstörungsfrei separierbare Blöcke ausgebildet sein. Besonders robust und einfach handhabbar ist eine Ausführung, bei der die Blöcke unterschiedliche Bereiche eines einstückig hergestellten Körpers sind.

Alternativ zu den o.g. Ausführungen kann auch vorgesehen sein, dass ein von dem Beleuchtungslicht durchleuchtetes Element mit einer entlang einer Bahn kontinuierlich ansteigenden Dicke und/oder kontinuierlich ansteigendem Brechungsindex zum Verändern der optischen Länge des Lichtweges relativ zum Strahlengang des Beleuchtungslichtes bewegt wird. Das Element kann insbesondere

ringförmig ausgebildet und so drehbar gelagert sein, dass die Dicke und/oder der Brechungsindex des jeweils durchstrahlten Bereichs von der Drehstellung des Elements abhängt. Insbesondere kann das Element um die optische Achse des Strahlengangs des Beleuchtungslichtbündels bzw. der Ausbreitungsrichtung des Beleuchtungslichtbündels oder um eine zur optischen Achse parallele Achse drehbar gelagert sein. 92925

Bei einer weiteren Alternative werden zwei im Strahlengang des Beleuchtungslichtes angeordnete, durchsichtige Keil- oder Ringelemente zum Verändern der optischen Länge des Lichtweges relativ zueinander, insbesondere motorisch gesteuert, verschoben. Hierbei kann vorteilhaft insbesondere vorgesehen sein, dass eines der Keil- oder Ringelemente eine Eintrittsfläche und das andere der Keil- oder Ringelemente eine Austrittsfläche für das Beleuchtungslicht aufweist, wobei die Eintrittsfläche und die Austrittsfläche parallel zueinander angeordnet sind. Die Keil- oder Ringelemente können in einer Kontaktebene, insbesondere über eine Immersionsflüssigkeit, wie beispielsweise eine Ölimmersion, miteinander in Kontakt stehen. Eine solche Ausführung vermeidet einen Strahlversatz zwischen dem einfallenden und dem ausfallenden Beleuchtungslicht wenn die Eintrittsfläche und die Austrittsfläche senkrecht auf der optischen Achse der Beleuchtungsoptik stehen.

Wie bereits erwähnt kann vorteilhaft vorgesehen sein, dass jeweils ausschließlich Detektionslicht aus dem jeweils mit dem Lichtblattfokus beleuchteten Bereich detektiert wird. Dies insbesondere derart, dass die hierbei sukzessive gewonnen Bilddaten zu einer Gesamtabbildung der so abgetasteten Probenschicht zusammengesetzt werden.

Um zu erreichen, dass jeweils ausschließlich Detektionslicht aus dem jeweils mit dem Lichtblattfokus beleuchteten Bereich detektiert wird, bei einer besonderen Ausführung ein Detektionsbereich eines Detektors synchron zur Bewegung des Lichtblattfokus bewegt. Der Detektionsbereich kann insbesondere der jeweils aktiv geschaltete Teil eines Flächendetektors, beispielsweise eines CMOS-Detektors oder sCMOS-Detektors, sein. Es ist beispielsweise vorteilhaft möglich, lediglich einen Teil des Flächendetektors, nämlich den Teil, der gerade dem Spaltdetektor entspricht, auszulesen (aktiv geschalteter Teil), während die übrigen Teile des Flächendetektors, nämlich die Teile, die außerhalb des Spaltdetektors liegen, nicht ausgelesen werden (nicht aktiv geschalteter Teil).

Bei einer solchen Ausführung sind mechanische Bauteile, wie beispielsweise eine Spaltblende, vermieden. Insoweit hat eine solche Ausführung den besonderen Vorteil einer großen Langlebigkeit, weil ein bewegungsbedingter Verschleiß, beispielsweise von mechanischen Blenden, vermieden ist. Es ist alternativ jedoch auch möglich dem Detektor eine mechanische Spaltblende vorzuschalten, die synchron zu dem Lichtblatt vor dem Detektor verschoben wird, um zu erreichen, dass jeweils nur das Detektionslicht aus dem Bereich des Lichtblattfokus zu dem Detektor gelangt.

10

Bei einer besonders vorteilhaften Ausführung ist wenigstens eine einstellbare, zur Bewegung des Lichtblattes synchronisierte Strahlableitvorrichtung im Detektionsstrahlengang angeordnet, die es ermöglicht, die Abbildung des interessierenden Bereichs in das Zentrum und/oder in den Auslesebereich des Flächendetektors zu verschieben. Dies hat den ganz besonderen Vorteil, dass die Auslesegeschwindigkeit auf diese Weise erheblich erhöht wird. Hierbei geht es nicht lediglich darum (auch wenn dies möglich ist), mit Zoom- und Schiebe-Optik lediglich den zentralen Bereich des Bildfeldes herauszuvergrößern. Vielmehr geht es insbesondere darum, verschiedene interessierende Bereiche der Probe mit hoher Auflösung abzubilden, was mit den aus dem Stand der Technik bekannten Vorrichtungen auf Grund der eingangs erwähnten Dicke des Lichtblattes dieser Vorrichtungen nicht möglich ist. Vielmehr ermöglicht es die vorliegende Erfindung einen interessierenden Bereich oder sukzessive mehrere interessierende Bereiche mit hoher Auflösung zu untersuchen, ohne die Probe hierfür verschieben zu müssen.

15

20

Ein Verschieben der Abbildung des interessierenden Bereichs in das Zentrum und/oder in den Auslesebereich des in der Detektionsebene angeordneten Flächendetektors ist insbesondere dann von Vorteil, wenn die Auslesegeschwindigkeit (beispielsweise die Kameraauslesegeschwindigkeit und/oder die *Framerate*, für gleich große interessierende Bereiche von der Position der Abbildung der interessierenden Bereiche auf dem Flächendetektor abhängt, wie beispielsweise bei derzeit üblichen sCMOS-Detektoren.

25

30

Das Lichtblatt kann, insbesondere mit einer Zylinderoptik, beispielsweise aus einem im Querschnitt ursprünglich runden Beleuchtungslichtbündel erzeugt werden. Im Sinne der vorliegenden Erfindung wird unter einer Zylinderoptik jegliche astigmatische

35

Optik und/oder jegliche Optik verstanden, die in einer Richtung senkrecht zur Ausbreitungsrichtung des Beleuchtungslichtbündels stärker fokussiert, als in einer anderen Richtung senkrecht zur Ausbreitungsrichtung des Beleuchtungslichtbündels. Es sind aber auch andere Formen des Lichtblattes möglich. Dazu gehören durch Bessel-Strahlen, Mathieu-Strahlen, Airy-Strahlen, sowie die kohärente Superposition der genannten Strahlen geformte Lichtblätter.

92925

Es ist auch möglich, dass das Lichtblatt ein Quasi-Lichtblatt ist, das aus einem kontinuierlich in der Beleuchtungsebene hin- und her bewegten Beleuchtungslichtbündel besteht. Insbesondere kann vorgesehen sein, dass eine hinsichtlich des Ablenk winkels einstellbare Strahlablenkeinrichtung verwendet wird, die ein Primärbeleuchtungslichtbündel zum Erzeugen eines Quasi-Lichtblattes in der Beleuchtungsebene so schnell hin- und her bewegt (scannt), dass beispielsweise innerhalb eines Detektionszyklus bzw. innerhalb der Belichtungszeit des Detektors der Beleuchtungslichtstrahl das Objektfeld zumindest einmal vollständig überstreift. Die Hin- und Herbewegung des Primärbeleuchtungslichtbündels kann beispielsweise durch mindestens einen von einem Aktuator bewegten kippbar bzw. verschwenkbar angeordneten Spiegel oder von einem optischen – vorzugsweise akustooptischen – Deflektor einer Scaneinheit erzeugt werden.

20

Bei einer ganz besonders vorteilhaften Ausführung ist das Lichtblattfokusschiebemittel dem Beleuchtungsobjektiv nachgeschaltet und/oder räumlich zwischen dem Beleuchtungsobjektiv und der Probe angeordnet. Eine solche Ausführung ist nicht auf den Bauraum innerhalb eines Mikroskopstatives angewiesen, sondern nutzt vorteilhaft den Freiraum vor dem Beleuchtungsobjektiv und damit den großen Arbeitsabstand der üblicherweise in der Lichtblattmikroskopie verwendeten Beleuchtungsobjektive. Insbesondere kann Lichtblattfokusschiebemittel der oben beschriebene Ring aus Blöcken oder das ringförmig ausgebildete Element vorteilhaft und platzsparend koaxial zu dem Beleuchtungsobjektiv, insbesondere vor der Frontlinse des Beleuchtungsobjektivs, angeordnet sein.

30

Das Lichtblattfokusschiebemittel kann beispielsweise an einem Mikroskopstativ befestigt sein. Bei einer besonders kompakten Ausführung ist das Lichtblattfokusschiebemittel an dem Beleuchtungsobjektiv befestigt.

35

Das Lichtblatt-Mikroskop kann beispielsweise derart aufgebaut sein, dass die

optische Achse des Beleuchtungsobjektivs senkrecht zur optischen Achse des Detektionsobjektivs ausgerichtet ist. 92925

Bei einer besonders vorteilhaften, anderen Ausführung sind die optische Achse des
5 Beleuchtungsobjektivs und die optische Achse des Detektionsobjektivs zueinander
parallel oder koaxial ausgerichtet. Alternativ oder zusätzlich kann auch vorgesehen
sein, dass das Detektionsobjektiv und das Beleuchtungsobjektiv einander
entgegengesetzt und einander gegenüberliegend ausgerichtet sind und/oder dass
10 räumlich zwischen dem Detektionsobjektiv und dem Beleuchtungsobjektiv ein
Probenhalter angeordnet ist, der eine Untersuchungsposition für eine zu
untersuchende Probe definiert. Eine solche Ausführung hat den besonderen Vorteil,
dass das Lichtblatt-Mikroskop besonders kompakt und robust ausgeführt werden
kann, und dass die Untersuchungsposition für die Probe besonders einfach
15 zugänglich ist, so dass ein schnelles und präzises, sukzessives Verbringen der Proben in
die Untersuchungsposition ermöglicht ist.

Das Lichtblatt-Mikroskop kann vorteilhaft ein Umlenkmittel aufweisen, das das
Beleuchtungslicht, nachdem es das Beleuchtungsobjektiv durchlaufen hat, derart
umlenkt, dass es in der Beleuchtungsebene verläuft. Insbesondere kann das
20 Umlenkmittel derart angeordnet sein, dass das umgelenkte Beleuchtungslichtbündel
einen von Null Grad verschiedenen Winkel zur optischen Achse des
Beleuchtungsobjektivs und/oder des Detektionsobjektivs aufweist. Insbesondere kann
die Beleuchtungsebene senkrecht zur optischen Achse des Beleuchtungsobjektivs
ausgerichtet sein.

25

Insbesondere kann vorteilhaft vorgesehen sein, dass das Beleuchtungslicht zunächst
in vertikaler Richtung durch das Beleuchtungsobjektiv verläuft und anschließend in
horizontale Richtung mit der Umlenkeinrichtung umgelenkt wird, um die Probe in der
Beleuchtungsebene entlang des Beleuchtungsstreifens zu beleuchten. Vorzugsweise
30 verläuft das von dem beleuchteten Probenbereich ausgehende Detektionslicht,
insbesondere Fluoreszenzlicht, in vertikaler Richtung durch ein Detektionsobjektiv. Ein
solcher Aufbau ermöglicht die Verwendung von aufrechten oder inversen Standard-
Mikroskopstativen zur Herstellung des erfindungsgemäßen Lichtblatt-Mikroskops.

35 Bei einer ganz besonders vorteilhaften Ausführung ist vorgesehen, dass das
Beleuchtungsobjektiv und die Umlenkeinrichtung, die beispielsweise einen oder

mehrere Umlenkspiegel aufweisen kann, relativ zueinander beweglich angeordnet sind, um das Lichtblatt relativ zur Probe bewegen zu können. Alternativ oder ⁹²⁹²⁵ zusätzlich kann auch vorgesehen sein, dass die Umlenkeinrichtung, insbesondere beweglich, an dem Detektionsobjektiv befestigt ist.

5

Ein Lichtblatt-Mikroskop, das insbesondere geeignet ist, das erfindungsgemäße Verfahren auszuführen, kann vorteilhaft auf der Basis eines Rastermikroskops, insbesondere eines konfokalen Rastermikroskops, aufgebaut sein. Hierbei bietet sich insbesondere die Verwendung eines inversen Mikroskopstatives an. Von besonderem

10 Vorteil ist insoweit die Verwendung eines (möglicherweise in einem Labor ohnehin vorhandenen) Rastermikroskops zur Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

15

Bei einer ganz besonders vorteilhaften Ausführung wird das oben beschriebene Verfahren zeitgleich mehrmals bei ein und derselben Probe ausgeführt. Dies hat beispielsweise den ganz besonderen Vorteil, dass gleichzeitig unterschiedliche Probenbereiche untersucht werden können. Diese Probenbereiche können sich in derselben Beleuchtungsebene oder auch in unterschiedlichen Beleuchtungsebenen befinden.

20

Es könnten Mittel zur Kompensation der durch das Lichtblattfokusschiebemittel – welches beispielsweise in Form eines Glasblocks ausgeführt ist – hervorgerufenen Aberrationen (Korrekturplatten) in den Strahlengang eingefügt werden.

25

Insbesondere könnten Korrekturplatten mit einem Profil zur Korrektur von sphärischen Aberrationen eingebracht werden, wie sie auch kommerziell erhältlich sind. Eine Möglichkeit besteht darin, für jede Dicke des Lichtblattfokusschiebemittels eine passende Korrekturplatte vorzusehen. Eine solche Anordnung von Korrekturplatten kann mit dem Ring der Blöcke bzw. des Stufenrings rotiert werden. Die Korrekturplatten könnten auch in die Blöcke integriert werden. Einfacher kann auch

30 die mittlere Dicke des Stufenrings mit einer festen Korrekturplatte kompensiert werden, um so die (sphärischen) Aberrationen zumindest zu reduzieren.

35

Alternativ kann das Objektiv auch entsprechend so ausgelegt sein, dass die Transmission durch einen Glasblock mit mittlerer Dicke zu einem korrigierten Fokus führt. Dies entspricht einer Deckglaskorrektur oder der Korrektur, die für eine bestimmte Eindringtiefe in ein Medium mit einem höherem Brechungsindex als dem

von Luft benötigt wird. Es sind auch Objektive verfügbar, die auf verschiedene Deckglasdicken oder verschiedene Eindringtiefen über einen sogenannten Korr-Ring 92925 einstellbar sind. Diese Korr-Ringe können auch motorisiert verstellbar sein. Ein (weitgehend) aberrationsfreier Fokus kann auch durch eine Synchronisation der Bewegung eines Korr-Rings eines Objektivs mit der Bewegung eines Lichtblatfokusschiebemittels erzielt werden, so dass immer die zum jeweils verwendeten Glasblock passende Korrektur genutzt wird.

Das Lichtblatfokusschiebemittel und die Korrekturplatten müssen nicht zwischen 10 Objektiv und Objekt liegen, sondern können auch in dazu konjugierten Ebenen näher an der Lichtquelle liegen, idealerweise noch vor einer Scaneinheit zum Erzeugen eines Quasi-Lichtblattes. Sollte allerdings die Korrektur hinter der Scaneinheit notwendig werden, tritt aufgrund der Bewegung des Strahls ein Problem bei der Korrektur auf. Hier ist es sinnvoll, auf die Korrektur entlang der Scanachse zu 15 verzichten, da die Strahlausbreitung bzw. Aberrationen entlang dieser Achse ja auch keine nachteiligen Auswirkungen auf die Dicke des Lichtblatts und damit die Bildqualität haben sollten. Die Korrekturplatten müssen grundsätzlich (bei Erzeugung des Lichtblatts mit einer Zylinderlinse oder über das Scannen des Strahls) nicht polar symmetrisch sein, da die sphärischen Aberrationen nur senkrecht zur Lichtblattebene 20 korrigiert werden müssen und nicht innerhalb der Lichtblattebene. Ein y^4 -Profil reicht beispielsweise also aus, wenn die Ausbreitung des Lichtblatts entlang der x-Achse verläuft.

Der Glasblock kann auch aus mehreren Teilen ausgebildet sein, die unter Umständen 25 auch auf den einander zugewandten Flächen nicht plan sondern gekrümmt sind und verkittet sein könnten (Korrektur von Aberrationen).

In der Zeichnung ist der Erfindungsgegenstand beispielhaft und schematisch dargestellt und wird anhand der Figuren nachfolgend beschrieben, wobei gleiche 30 oder gleich wirkende Elemente zumeist mit denselben Bezugszeichen versehen sind. Dabei zeigen:

Fig. 1 und 2 eine Illustration des Vorgehens zum Erzielen einer Auflösungssteigerung,

- Fig. 3 eine Illustration des Prinzips der Verwendung von durchsichtigen Blöcken zum Verschieben des Lichtblattfokus,
- 5 Fig. 4 ein erstes Ausführungsbeispiel eines Lichtblattfokusschiebemittels in einer Frontalansicht,
- Fig. 5 das erste Ausführungsbeispiel eines Lichtblattfokusschiebemittels in einer Seitenansicht,
- 10 Fig. 6 und 7 eine mögliche Anordnung des ersten Ausführungsbeispiels des Lichtblattfokusschiebemittels in einer Seitenansicht und in einer Aufsicht auf die Frontlinse,
- 15 Fig. 8 und 9 eine andere mögliche Anordnung des ersten Ausführungsbeispiels des Lichtblattfokusschiebemittels in einer Seitenansicht und in einer Aufsicht auf die Frontlinse,
- 20 Fig. 10 und 11 eine mögliche Anordnung eines zweiten Ausführungsbeispiels des Lichtblattfokusschiebemittels in einer Seitenansicht und in einer Aufsicht auf die Frontlinse,
- Fig. 12 und 13 ein drittes Ausführungsbeispiel eines Lichtblattfokusschiebemittels in einer Frontalansicht und einer Seitenansicht,
- 25 Fig. 14 eine mögliche Beleuchtungsanordnung eines erfindungsgemäßen Lichtblatt-Mikroskops,
- Fig. 15 eine andere mögliche Beleuchtungsanordnung eines erfindungsgemäßen Lichtblatt -Mikroskops,
- 30 Fig. 16 ein viertes Ausführungsbeispiel eines Lichtblattfokusschiebemittels in einer Seitenansicht, und
- Fig. 17 und 18 ein fünftes Ausführungsbeispiel eines Lichtblattfokusschiebemittels jeweils in einer Seitenansicht.
- 35

Die Fig. 1 und 2 zeigen eine Illustration des Vorgehens zum Erzielen einer Auflösungssteigerung, wobei Fig. 1 eine übliche Beleuchtung mit einem Lichtblatt mit einer großen Fokusslänge z_{FOV} darstellt, während Fig. 2 das Abtasten des interessierenden Probenbereichs durch sukzessives Verschieben eines Lichtblattes mit einer kleineren Fokusslänge z_S darstellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die effektive Dicke d_1 des Lichtblattes mit der großen Fokusslänge z_{FOV} (Fig. 1) wesentlich größer ist, als die (zum Vergleich auch in Fig. 1 eingezeichnete) effektive Dicke d_2 des Lichtblattes mit der kleineren Fokusslänge z_S .

- Am einfachsten ist es, wenn für jede Fokusposition ein Bild aufgenommen wird und in einem post-processing Schritt aus diesen Bildern die Streifen ausgeschnitten werden, die innerhalb der Schärfentiefe des Fokus lagen, da dort das Lichtblatt am schmalsten/dünnsten ist. Da für diesen Modus unnötige Daten von der Kamera aufgenommen und zum PC übertragen werden, ist es besser, synchron mit dem Verschieben des Lichtblattfokuss den Auslesebereich der Kamera mit zu verschieben. Das eigentliche Bild des gesamten abzubildenden Bereichs wird aus diesen Streifen zusammengesetzt, deren Zahl n sich aus dem Quotienten $n = z_{FOV}/z_S$ ergibt.

- Fig. 3 zeigt eine Illustration des Prinzips der Verwendung von durchsichtigen Blöcken 1, 2, 3, 4 zum Verändern der optischen Länge des Lichtweges des Lichtblattes und damit zum Verschieben des Lichtblattfokuss im Vergleich zur Fokusslage bei einem Strahlengang ohne Block. (ganz linke Darstellung).

- Der Block 1 der Dicke Δ und mit Brechungsindex n_G sowie mit planparallelen Oberflächen senkrecht zur Ausbreitungsrichtung bewirkt im Strahlengang eines konvergenten Lichtblattes einen Versatz des Lichtblattfokusses um $\Delta(n_G - n)/n$ entlang der optischen Achse, wobei n der Brechungsindex des Umgebungsmedium ist. Der Block 2 mit der doppelten Dicke bewirkt folglich den doppelten Versatz. Fügt man nun nacheinander verschiedene Blöcke 1, 2, 3, 4 in den Strahlengang ein, so kann man den Lichtblattfokuss in diskreten Schritten axial verschieben.

- Fig. 4 zeigt ein erstes Ausführungsbeispiel eines Lichtblattfokusschiebemittels 6 in einer Frontalansicht und in Figur 5 in einer Seitenansicht. Das Lichtblattfokusschiebemittel 6 weist einen ersten Block 7 der Dicke Δ , einen zweiten Block 8 der Dicke 2Δ , einen dritten Block 9 der Dicke 3Δ , einen vierten Block 10 der Dicke 4Δ , einen fünften Block

11 der Dicke 5Δ , einen sechsten Block 12 der Dicke 6Δ , einen siebenten Block 13 der Dicke 7Δ und einen achten Block 14 der Dicke 8Δ auf. Die Blöcke 7-14 bilden einen geschlossenen Ring 15, wobei der Ring 15 zum Verändern der optischen Länge, insbesondere um die optische Achse 16 (senkrecht zur Zeichenebene) oder um eine zur optischen Achse 16 parallele Achse, drehbar gelagert ist. Auf diese Weise kann nämlich schnell der jeweils im Strahlengang befindliche Block 7-14 gegen einen anderen Block 7-14 ausgetauscht werden, wobei die Dicke und/oder der Brechungsindex des durchstrahlten Bereichs des Rings 15 von der jeweiligen Drehstellung ϕ des Rings 15 abhängt. Der Ring 15 kann, wie die Figuren 6 und 7 zeigen, vor der Frontlinse 17 des Beleuchtungsobjektivs 18 um die optische Achse 16 drehbar gelagert sein. Der Ring könnte auch aus einzelnen Blöcken gleicher Dicke, jedoch unterschiedlicher Brechungsindizes ausgebildet sein, so dass hierdurch unterschiedliche optische Längen der Lichtwege erzielt werden.

Es ist auch möglich, dass der Ring 15 lateral versetzt vor dem Beleuchtungsobjektiv 18 derart angeordnet wird, dass er um eine zur optischen Achse 16 parallele Achse 19 drehbar ist, was die Figuren 8 und 9 illustrieren.

Alternativ können die durchsichtigen Blöcke 1, 2, 3, 4 auch in einer Reihenanordnung angeordnet und miteinander verbunden sein, die linear verschiebbar vor dem Beleuchtungsobjektiv 18 gelagert ist, was die Figuren 10 und 11 illustrieren. Zum Bewegen kann, wie bei den anderen Ausführungen auch, beispielsweise eine (nicht dargestellte) elektronische Steuerungsvorrichtung vorhanden sein, die einen (nicht dargestellten) Antriebsmotor zum Bewegen der Blöcke 1-4 steuert.

Die Figuren 12 und 13 zeigen ein drittes Ausführungsbeispiel eines Lichtblattfokusschiebemittels 6 in einer Frontalansicht und einer Seitenansicht. Das Lichtblattfokusschiebemittel 6 weist ein von dem (sich senkrecht zur Zeichenebene ausbreitenden und in dieser Figur nicht dargestellten) Beleuchtungslicht durchleuchtetes, ringförmiges Element 21 mit einer entlang einer kreisförmigen Bahn 22 kontinuierlich ansteigenden Dicke auf. Zum Verändern der optischen Länge wird das Element um seine Mittelsymmetrieachse 23 (senkrecht zur Zeichenebene) gedreht.

Die Dicke des ringförmigen Elements 21 hängt kontinuierlich von Winkel

$\phi = \arctan(x/y)$ ab, wobei die Ausbreitungsrichtung des Beleuchtungslichtes die z-
Richtung ist und x und y senkrecht dazu stehen. Die Mittelsymmetrieachse 23 ist in z-
Richtung ausgerichtet, also gilt $\Delta = d_{\max}/2\pi \cdot \phi$ oder auch ein Keil $\Delta = x \cdot d_{\max}/2\pi r$ wobei r
der Radius der oben genannten Bahn des ringförmigen Elements 21 ist.

5

Für den Fall, dass ein Beleuchtungsobjektiv 18 mit einer niedrigen NA und einem
großen Bildfeld genutzt wird ist es möglich, den Bereich des Bildfeldes des
Beleuchtungsobjektivs 18, der nicht durch das ringförmige Element 21 verdeckt wird,
noch zur Detektion zu verwenden.

10

Die Figuren 14 und 15 zeigen Ausführungen, bei denen jeweils ein Umlenkmittel 24,
das das Beleuchtungslicht nach dem Durchlaufen des Beleuchtungsobjektivs 18 und
nach dem Passieren eines Lichtblatffokusschiebemittels 6 in die Beleuchtungsebene
26, die gleichzeitig die Fokusebene des Detektionsobjektivs 27 ist, umlenkt. Das
Detektionsobjektiv 27 ist dem Beleuchtungsobjektiv 18 gegenüberliegend
angeordnet, wobei die optischen Achsen coaxial oder parallel zueinander
ausgerichtet sind. Wie im vorhergehenden Absatz erwähnt kann das
Beleuchtungsobjektiv ebenfalls zur Abbildung von Licht aus der Ebene 26 auf einen
Kamera-Sensor verwendet werden.

20

Bei der in Figur 14 gezeigten Ausführung ist ein Ring 15 vor der Frontlinse 17 des
Beleuchtungsobjektivs 18 um die optische Achse 16 drehbar gelagert.

Bei der in Figur 15 gezeigten Ausführung ist ein Ring 15 vor der Frontlinse 17 des
Beleuchtungsobjektivs 18 um eine zur optischen Achse 16 parallele Achse 19 drehbar
gelagert.

Sollte der Lichtblatffokus 5 durch das Beleuchtungsobjektiv 18 derart erzeugt werden,
dass nicht ein kollimierter Strahl in die Eintrittspupille des Beleuchtungsobjektivs
eingestrahlt wird, sondern ein divergenter oder konvergenter Strahl, so kann das
Lichtblatffokusschiebemittel 6 auch hinter dem Beleuchtungsobjektiv 18 angebracht
werden und ist somit weiter entfernt vom eventuell schwer zugänglichen Bereich
zwischen Beleuchtungsobjektiv 18 und der Fokusebene 26 des Detektionsobjektivs 27,
was analog auch für die anderen dargestellten Ausführungen gilt.

35

Ganz allgemein kann das Lichtblattfokusschiebemittel an einer Stelle im Beleuchtungsstrahlengang angeordnet werden, an welcher der⁹²⁹²⁵ Beleuchtungslichtstrahl nicht kollimiert ist, als z.B. konvergiert oder divergiert.

- 5 Fig. 16 zeigt ein viertes Ausführungsbeispiel eines Lichtblattfokusschiebemittels 6 in einer Seitenansicht. Das Lichtblattfokusschiebemittel 6 weist zwei im Strahlengang des Beleuchtungslichtes 30 angeordnete, durchsichtige Keilelemente 28, 29 auf, die zum Verändern der optischen Länge des Lichtweges relativ zueinander verschoben werden. Allerdings entsteht hierbei nachteiliger Weise ein Strahlversatz.

10

Die Figuren 17 und 18 zeigen ein fünftes Ausführungsbeispiel eines Lichtblattfokusschiebemittels 6 jeweils in einer Seitenansicht. Das Lichtblattfokusschiebemittel 6 weist zwei im Strahlengang des Beleuchtungslichtes 30 angeordnete und miteinander über ein Immersionsöl in Kontakt stehende,
15 durchsichtige Keilelemente 28, 29 auf, die zum Verändern der optischen Länge des Lichtweges relativ zueinander verschoben werden. In vorteilhafter Weise entsteht hierbei kein Strahlversatz.

Bezugszeichenliste:

	1	Durchsichtiger Block
5	2	Durchsichtiger Block
	3	Durchsichtiger Block
	4	Durchsichtiger Block
	5	Lichtblattfokus
	6	Lichtblattfokusschiebemittel
10	7	erster Block
	8	zweiter Block
	9	dritter Block
	10	vierter Block
	11	fünfter Block
15	12	sechster Block
	13	siebenter Block
	14	achter Block
	15	Ring
	16	optische Achse
20	17	Frontlinse
	18	Beleuchtungsobjektiv
	19	zu (16) parallele Achse
	20	Reihenanzordnung
	21	ringförmiges Element
25	22	Bahn
	23	Mittelsymmetrieachse
	24	Umlenkmittel
	25	Lichtblatt
	26	Beleuchtungsebene
30	27	Detektionsobjektiv
	28	Keilelement
	29	Keilelement
	30	Beleuchtungslicht

Patentansprüche

92925

1. Verfahren zum Untersuchen einer Probe mittels Lichtblatt-Mikroskopie, wobei eine in einer Beleuchtungsebene (26) befindliche Probenfläche mittels eines sich in der Beleuchtungsebene (26) ausbreitenden Lichtblattes (25) beleuchtet und von der Beleuchtungsebene (26) ausgehendes Detektionslicht detektiert wird, dadurch gekennzeichnet, dass eine Position eines Lichtblattfokus (5) des Lichtblattes (25) in der Beleuchtungsebene (26) durch Verändern der optischen Länge des Lichtweges des das Lichtblatt (25) bildenden Beleuchtungslichtes (30) bewegt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass
- a. sukzessive durchsichtige Blöcke (1-5, 7-14) unterschiedlicher Dicke und/oder mit unterschiedlichem Brechungsindex in den Lichtweg eingebracht werden, und/oder dass
- b. sukzessive und im Austausch gegeneinander durchsichtige Blöcke (1-5, 7-14) unterschiedlicher Dicke und/oder mit unterschiedlichem Brechungsindex in den Lichtweg eingebracht werden.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass
- a. die Blöcke (1-5, 7-14) einen Bogen oder einen Ring (15) bildend miteinander verbunden sind und dass der Bogen oder der Ring (15) zum Verändern der optischen Länge derart, insbesondere um die optische Achse oder um eine zur optischen Achse parallele Achse, gedreht wird, dass das Beleuchtungslicht jeweils einen anderen Block (1-5, 7-14) durchläuft, und/oder dass
- b. die Blöcke (1-5, 7-14) einen Stufenring mit einer entlang einer Schraubenlinie ansteigenden Dicke bilden, die nach 360 Grad steil von dem dicksten Block auf den dünnsten Block abfällt, wobei der Stufenring zum Verändern der optischen Länge, insbesondere um die optische Achse (16) oder um eine zur optischen Achse (16) parallele Achse (19), gedreht wird, und/oder dass
- c. die Blöcke (1-5, 7-14) unterschiedliche Bereiche eines einstückig hergestellten Körpers sind.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass ein von dem Beleuchtungslicht (30) durchleuchtetes Element mit einer entlang einer Bahn⁹²⁹²⁵ kontinuierlich ansteigenden Dicke und/oder kontinuierlich ansteigendem Brechungsindex zum Verändern der optischen Länge des Lichtweges relativ zum Strahlengang des Beleuchtungslichtes (30) bewegt wird.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Element ringförmig ausgebildet ist und drehbar gelagert ist und dass das Element zum Verändern der optischen Länge, insbesondere um die optische Achse (16) oder um eine zur optischen Achse (16) parallele Achse (19), gedreht wird.
- 10 6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass
- a. zwei im Strahlengang des Beleuchtungslichtes (30) angeordnete, durchsichtige Keilelemente (28, 29) zum Verändern der optischen Länge des Lichtweges relativ zueinander verschoben werden, oder dass
- 15 b. zwei im Strahlengang des Beleuchtungslichtes (30) angeordnete, durchsichtige Keilelemente (28, 29), die in einer Kontaktebene, insbesondere über eine Immersionsflüssigkeit, miteinander in Kontakt stehen, zum Verändern der optischen Länge des Lichtweges relativ zueinander verschoben werden.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass
- 20 a. jeweils ausschließlich Detektionslicht aus dem jeweils mit dem Lichtblattfokus (5) beleuchteten Bereich detektiert wird, und/oder dass
- b. jeweils ausschließlich Detektionslicht aus dem jeweils mit dem Lichtblattfokus (5) beleuchteten Bereich detektiert wird, wobei die sukzessive gewonnen Bilddaten zu einer Gesamtabbildung
- 25 c. ein Detektionsbereich eines Detektors synchron zur Bewegung des Lichtblattfokus (5) bewegt wird.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass
- a. das Lichtblatt (25) mittels einer Zylinderoptik erzeugt wird, oder dass
- 30 b. das Lichtblatt (25) ein Quasi-Lichtblatt ist, das aus einem kontinuierlich in der Beleuchtungsebene (26) hin- und her bewegten Beleuchtungslichtbündel besteht, oder dass

c. das Lichtblatt (25) ein Quasi-Lichtblatt ist, das aus einem kontinuierlich mit einer hinsichtlich des Abklenkwinkels einstellbaren Strahlableitvorrichtung⁹²⁹²⁵ in der Beleuchtungsebene (26) hin- und her bewegten Beleuchtungslichtbündel besteht.

- 5 9. Lichtblatt-Mikroskop mit einem Beleuchtungsobjektiv (18), das ein Lichtblatt fokussiert, um eine Probenfläche mittels des sich in der Beleuchtungsebene ausbreitenden Lichtblattes zu beleuchten, und mit einem Detektionsobjektiv, durch das von der Beleuchtungsebene (26) ausgehendes Detektionslicht zu einem Detektor gelangt, gekennzeichnet durch ein im Strahlengang des das
- 10 Lichtblatt (25) bildenden Beleuchtungslichtes (30) angeordnetes Lichtblattfokusschiebemittel (6), mittels dem eine Position eines Lichtblattfokus (5) des Lichtblattes (25) in der Beleuchtungsebene (26) durch Verändern der optischen Länge des Lichtweges des Beleuchtungslichtes (30) bewegbar ist.
10. Lichtblatt-Mikroskop nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das
- 15 Lichtblattfokusschiebemittel (6) mehrere durchsichtige Blöcke (1-5, 7-14) unterschiedlicher Dicke und/oder mit unterschiedlichem Brechungsindex aufweist.
11. Lichtblatt-Mikroskop nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die
- 20 Blöcke (1-5, 7-14) einen Bogen oder einen geschlossenen Ring (15) bildend miteinander verbunden sind.
12. Lichtblatt-Mikroskop nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass
- a. der Bogen oder der Ring (15) drehbar gelagert ist, oder dass
- b. der Bogen oder der Ring (15) um die optische Achse (16) oder um eine zur optischen Achse (16) parallele Achse (19) drehbar gelagert ist, oder dass
- 25 c. der Bogen oder der Ring (15) drehbar gelagert ist, wobei die optische Dicke des durchstrahlten Bereichs von der Drehstellung des Bogens oder des Rings (15) abhängt.
13. Lichtblatt-Mikroskop nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das
- 30 Lichtblattfokusschiebemittel (6) ein von dem Beleuchtungslicht (30) durchleuchtetes Element mit einer entlang einer Bahn (22) kontinuierlich ansteigender Dicke und/oder kontinuierlich ansteigendem Brechungsindex aufweist.
14. Lichtblatt-Mikroskop nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass

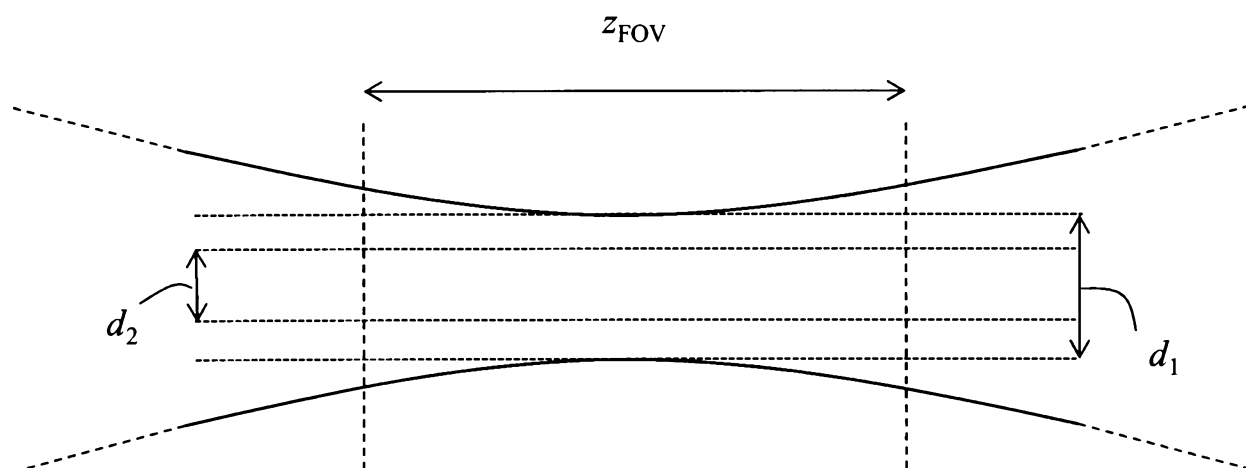
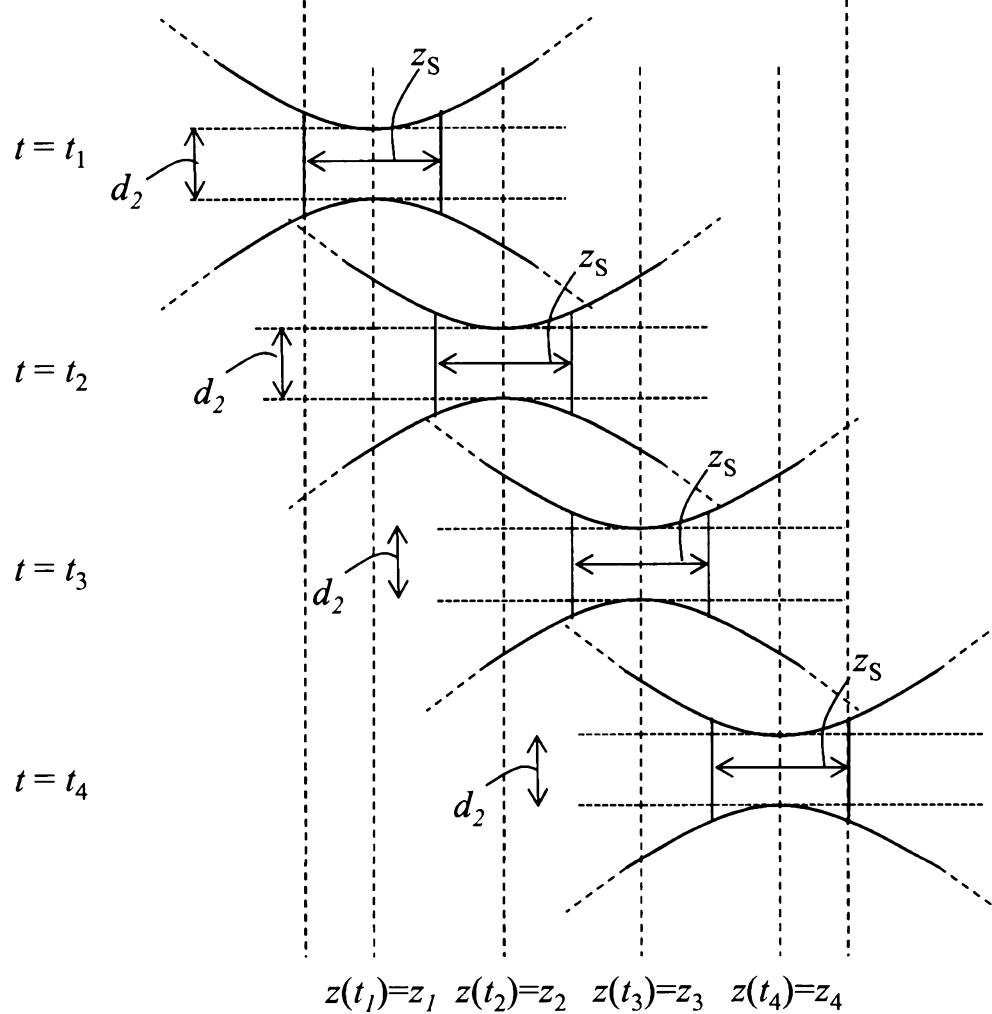
- a. das Element linear verschiebbar gelagert ist, oder dass
- b. das Element drehbar gelagert ist, oder dass
- c. das Element um die optische Achse (16) oder um eine zur optischen Achse (16) parallele Achse (19) drehbar gelagert ist, oder dass
- 5 d. das Element drehbar gelagert ist, wobei die optische Dicke des durchstrahlten Bereichs von der Drehstellung des Elements abhängt.
- 15. Lichtblatt-Mikroskop nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass
 - a. das Lichtblattfokusschiebemittel (6) zwei im Strahlangang des Beleuchtungslichtes (30) angeordnete, durchsichtige Keilelemente (28, 29)
10 aufweist, die zum Verändern der der optischen Länge des Lichtweges relativ zueinander verschiebbar gelagert sind, oder dass
 - b. das Lichtblattfokusschiebemittel (6) zwei im Strahlangang des Beleuchtungslichtes angeordnete, durchsichtige Keilelemente (28, 29)
15 aufweist, die in einer Kontaktebene, insbesondere über eine Immersionsflüssigkeit, miteinander in Kontakt stehen, und die zum Verändern der der optischen Länge des Lichtweges relativ zueinander verschiebbar gelagert sind.
- 16. Lichtblatt-Mikroskop nach einem der Ansprüche 9 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass
 - 20 a. das Lichtblattfokusschiebemittel (6) dem Beleuchtungsobjektiv (18) nachgeschaltet ist und/oder dass
 - b. das Lichtblattfokusschiebemittel (6) räumlich zwischen dem Beleuchtungsobjektiv (18) und der Probe angeordnet ist und/oder dass
 - 25 c. das der Ring oder das Element des Lichtblattfokusschiebemittels (6) koaxial zu dem Beleuchtungsobjektiv (18) angeordnet ist.
- 17. Lichtblatt-Mikroskop nach einem der Ansprüche 9 bis 16, gekennzeichnet durch eine Zylinderoptik zum Formen des Lichtblattes aus einem Primärbeleuchtungslichtbündel.
- 18. Lichtblatt-Mikroskop nach einem der Ansprüche 9 bis 16, gekennzeichnet
30 durch

- a. eine hinsichtlich des Ablenk winkels einstellbare Strahlablenkeinrichtung, die ein Primärbeleuchtungslichtbündel zum Erzeugen eines Quasi-Lichtblattes⁹²⁹²⁵ in der Beleuchtungsebene (26) hin- und her bewegt, oder durch
- 5 b. eine hinsichtlich des Ablenk winkels einstellbare Strahlablenkeinrichtung, die ein Primärbeleuchtungslichtbündel zum Erzeugen eines Quasi-Lichtblattes in der Beleuchtungsebene (26) so schnell hin- und her bewegt, dass die von einem Detektor erzeugten Detektionssignale von Detektionssignalen nicht unterscheidbar sind, die unter Verwendung eines mittels einer Zylinderoptik erzeugten Lichtblattes (25) erzeugbar sind.
- 10 19. Lichtblatt-Mikroskop nach einem der Ansprüche 9 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass
- a. ein Detektor vorhanden ist, der jeweils ausschließlich das Detektionslicht aus dem jeweils mit dem Lichtblattfokus (5) beleuchten Bereich detektiert, und/oder dass
- 15 b. ein Detektor vorhanden ist, dessen jeweils aktiv geschalteter Detektionsbereich von einer Steuerungsvorrichtung synchron zur Bewegung des Lichtblattfokus (5) bewegt wird.
20. Lichtblatt-Mikroskop nach einem der Ansprüche 9 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass
- 20 a. die optische Achse des Beleuchtungsobjektivs (18) und die optische Achse des Detektionsobjektivs (27) zueinander parallel oder coaxial ausgerichtet sind und/oder dass
- b. das Detektionsobjektiv (27) und das Beleuchtungsobjektiv (18) einander entgegengesetzt und einander gegenüberliegend ausgerichtet sind, und/oder dass
- 25 c. dem Beleuchtungsobjektiv (18) ein Umlenkmittel (24) nachgeschaltet ist, das das Beleuchtungslicht nach Durchlaufen des Beleuchtungsobjektivs (18) in die Beleuchtungsebene (26) umlenkt, und/oder dass
- d. dem Beleuchtungsobjektiv (18) ein Umlenkmittel (24) nachgeschaltet ist, das das Beleuchtungslicht, nachdem es das Beleuchtungsobjektiv (18) durchlaufen hat, derart umlenkt, dass das umgelenkte Beleuchtungslicht
- 30 (30) einen von Null Grad verschiedenen Winkel zur optischen Achse (16)

des Beleuchtungsobjektivs (18) und/oder des Detektionsobjektivs (27)
aufweist, und/oder dass 92925

- 5 e. die Beleuchtungsebene (26) senkrecht zur optischen Achse (16) des
Beleuchtungsobjektivs (18) und/oder senkrecht zur optischen Achse des
Detektionsobjektivs (27) ausgerichtet ist.

21. Lichtblatt-Mikroskop nach einem der Ansprüche 9 bis 20, dadurch
gekennzeichnet, dass das Lichtblatt-Mikroskop ein Rastermikroskop oder ein
konfokales Rastermikroskop aufweist und/oder dass die Vorrichtung durch
Umrüsten eines ein Rastermikroskops oder eines konfokalen Rastermikroskops
10 hergestellt ist.

**Fig. 1****Fig. 2**

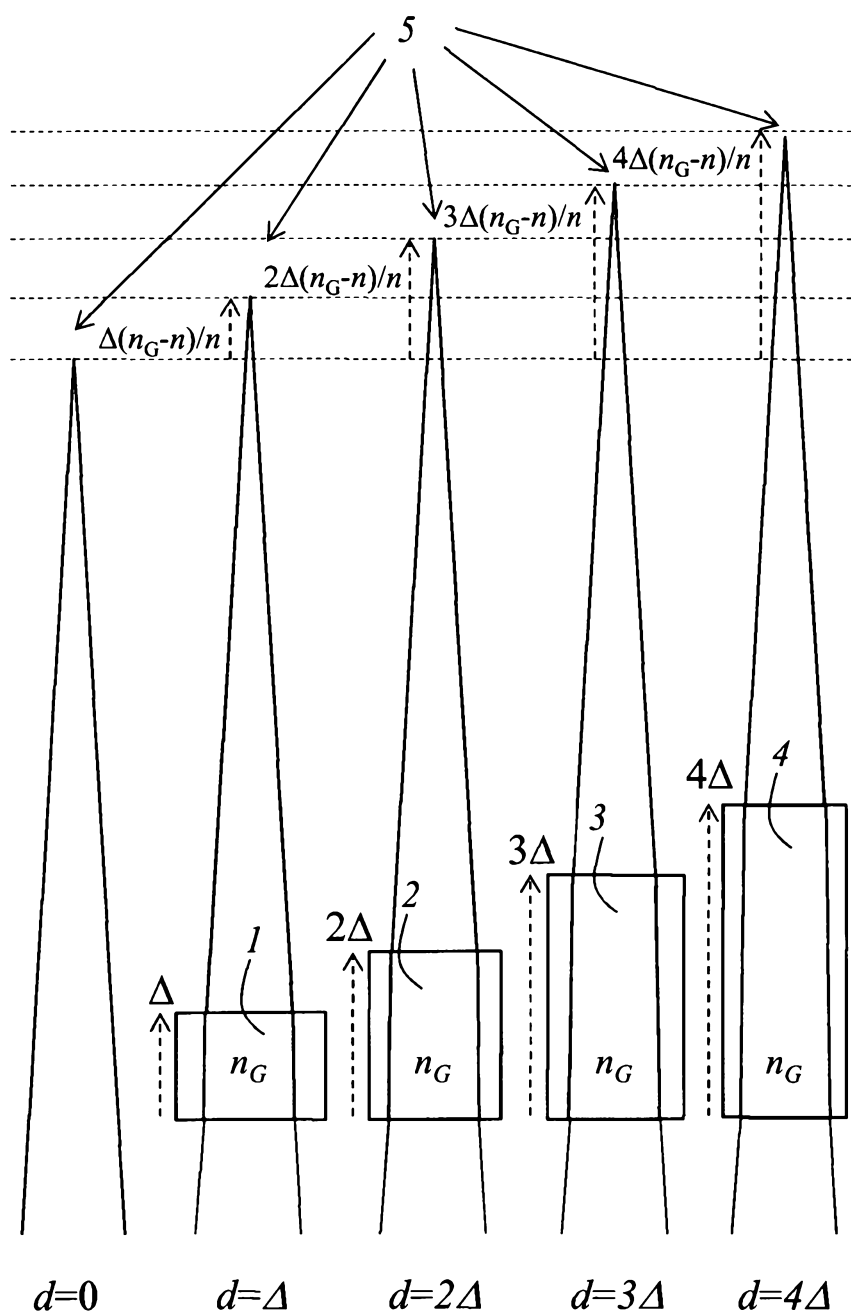
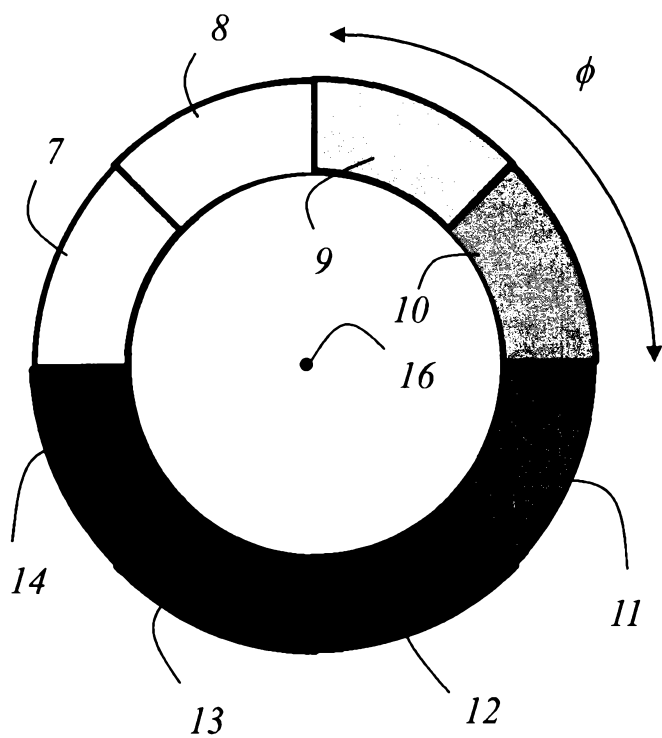
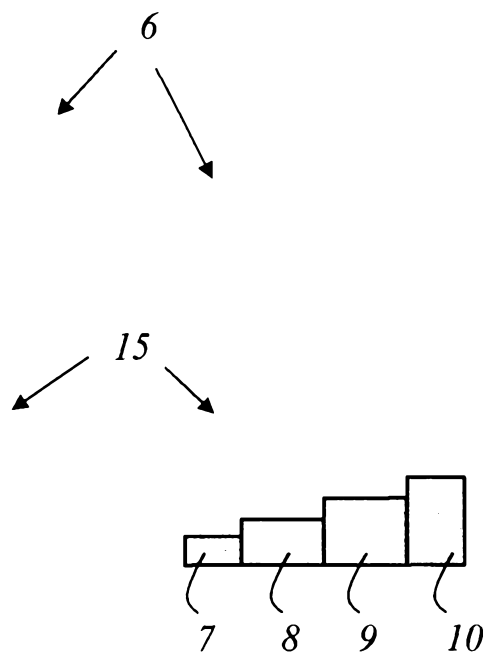


Fig. 3

**Fig. 4****Fig. 5**

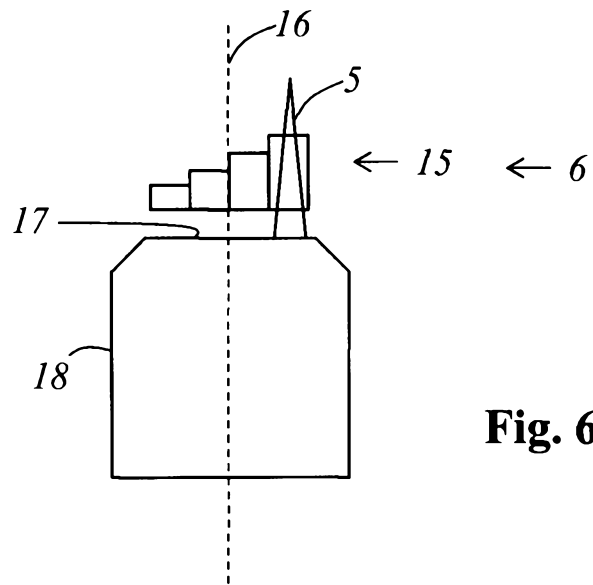


Fig. 6

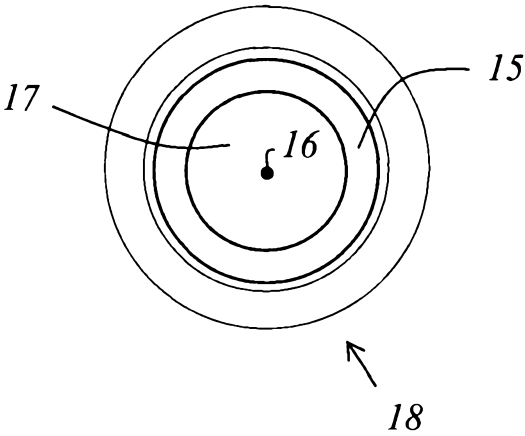
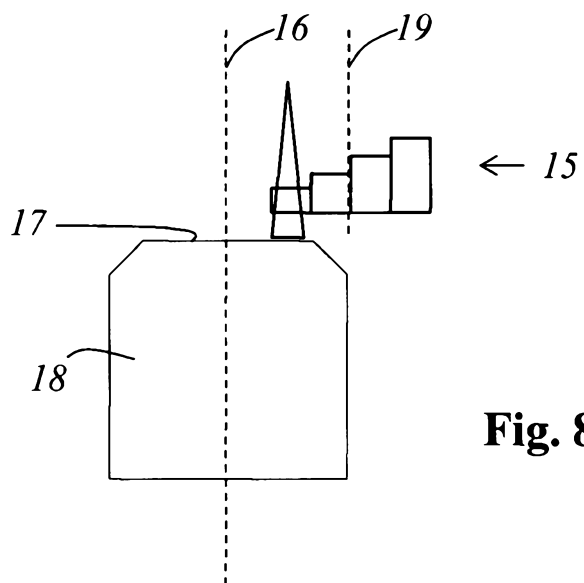
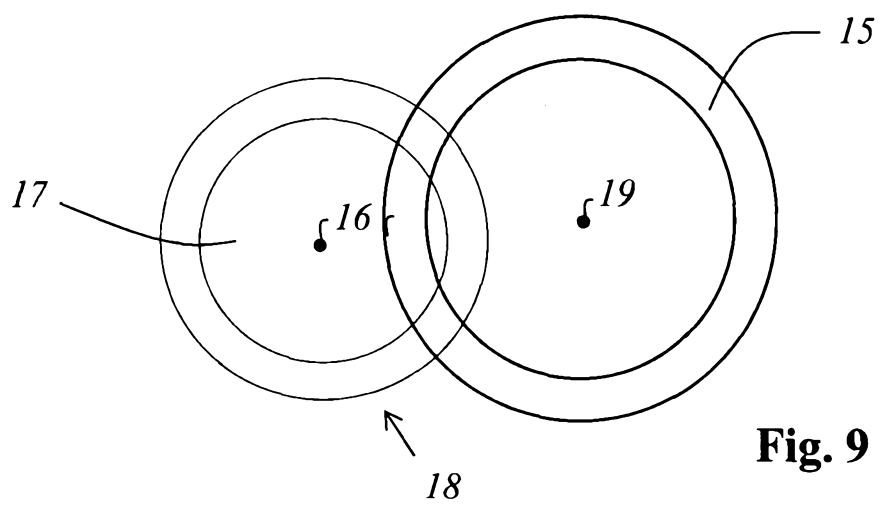
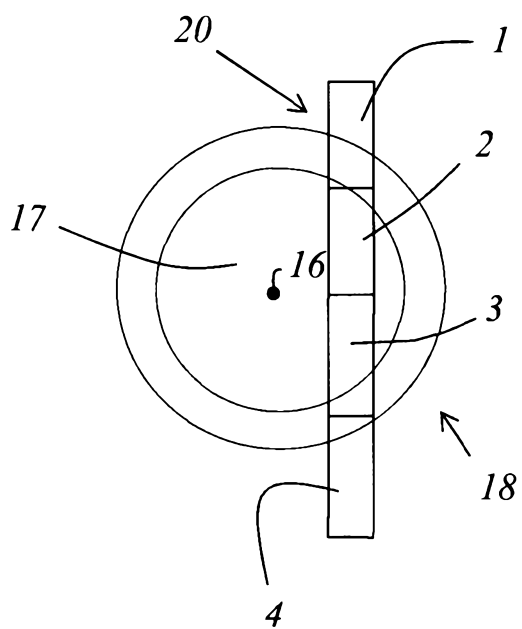
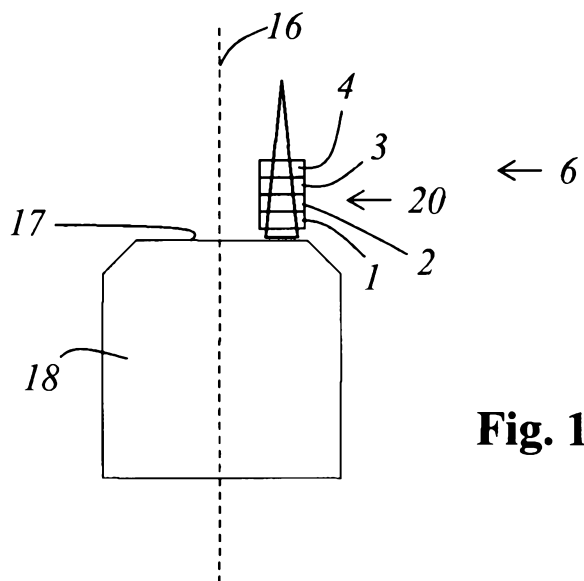
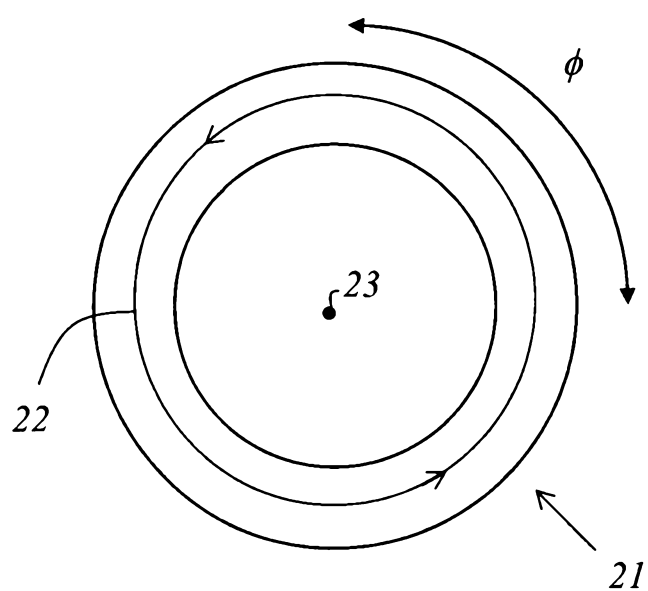
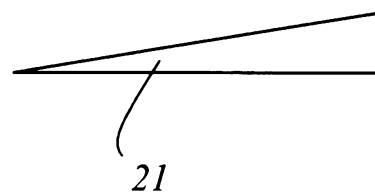
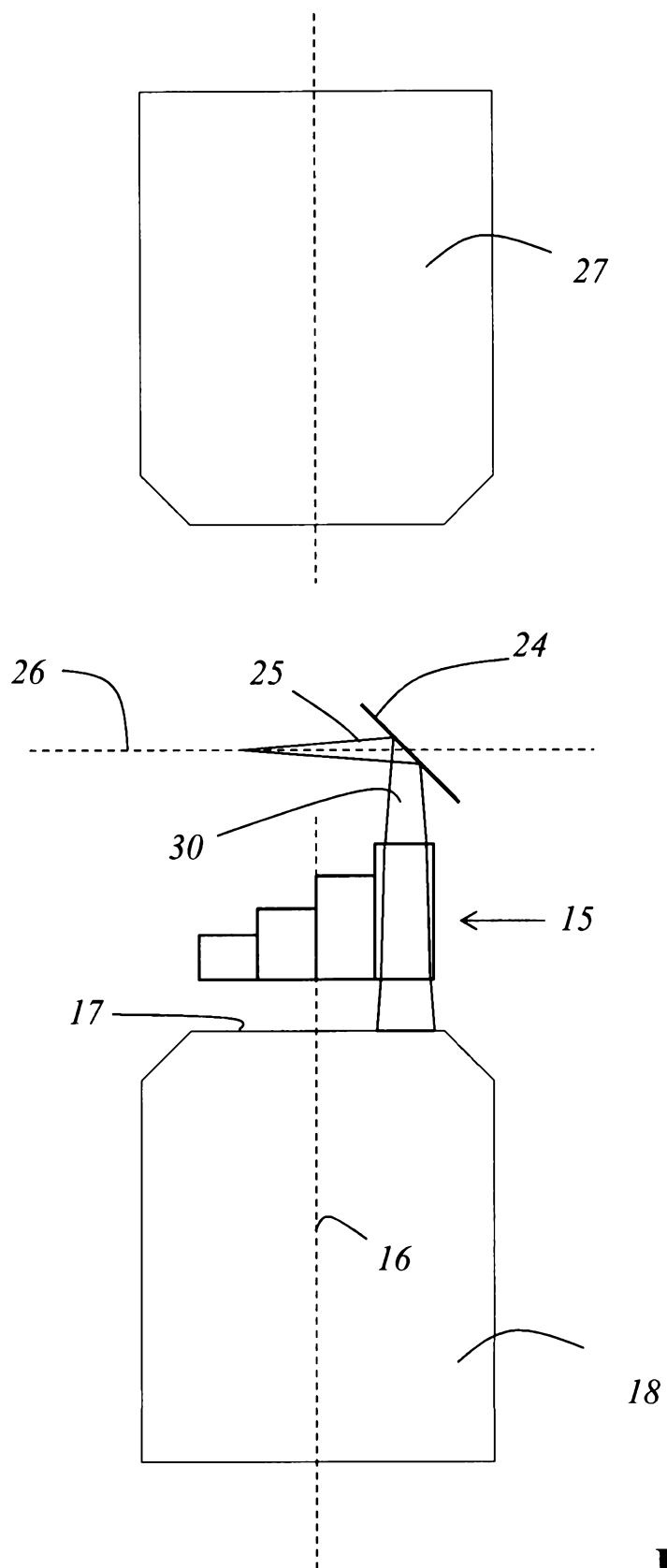


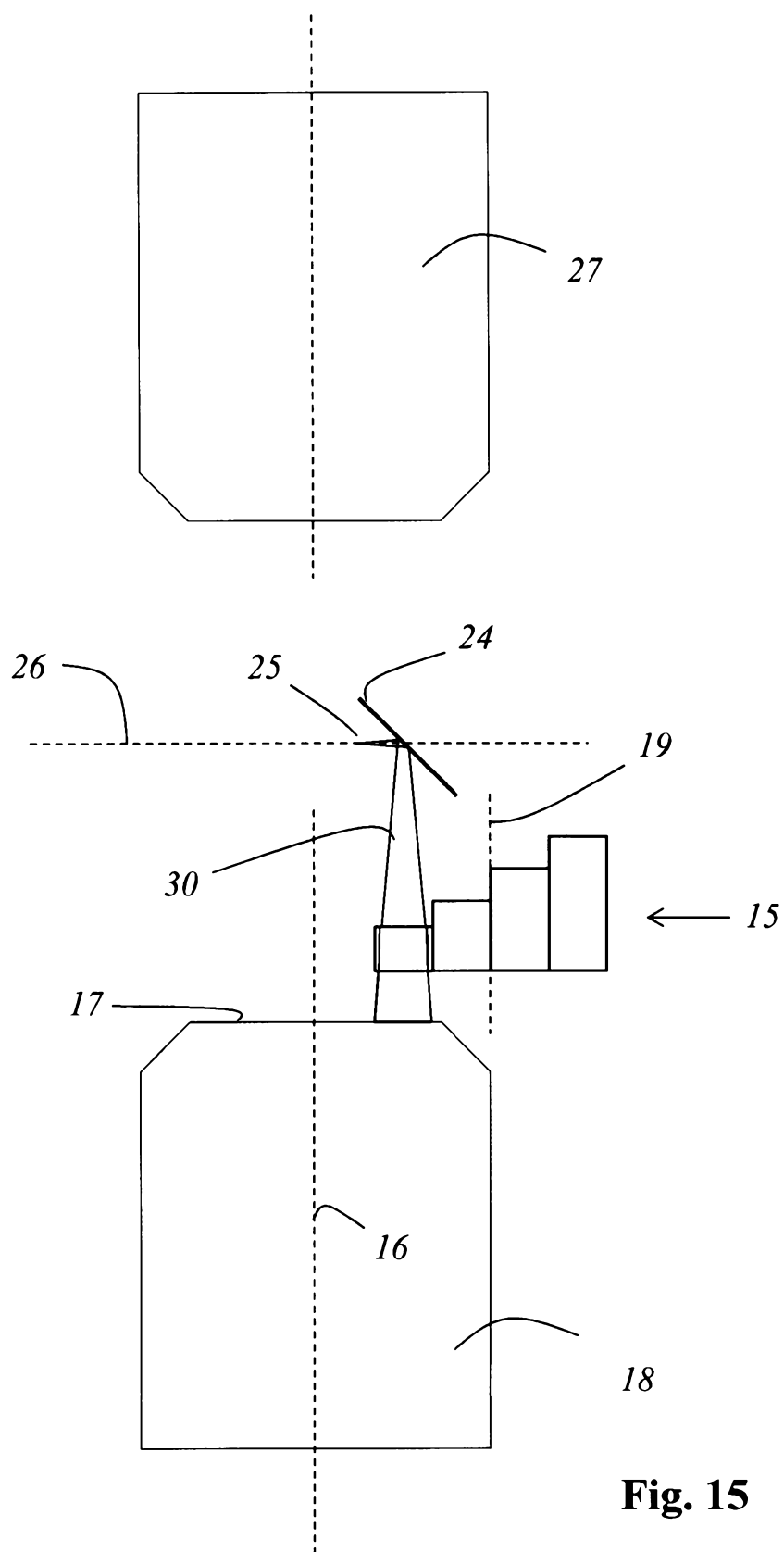
Fig. 7

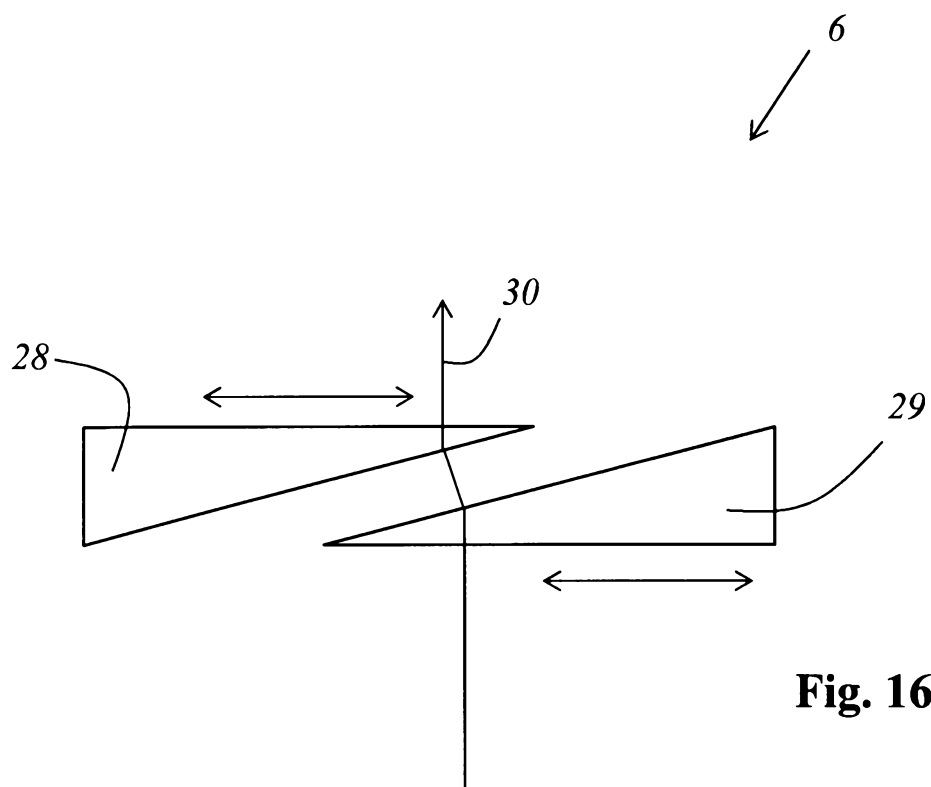
**Fig. 8****Fig. 9**

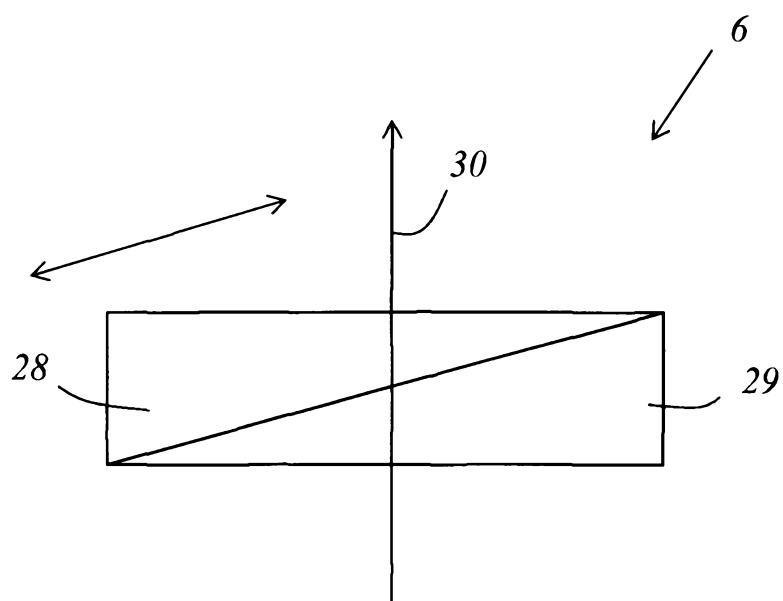
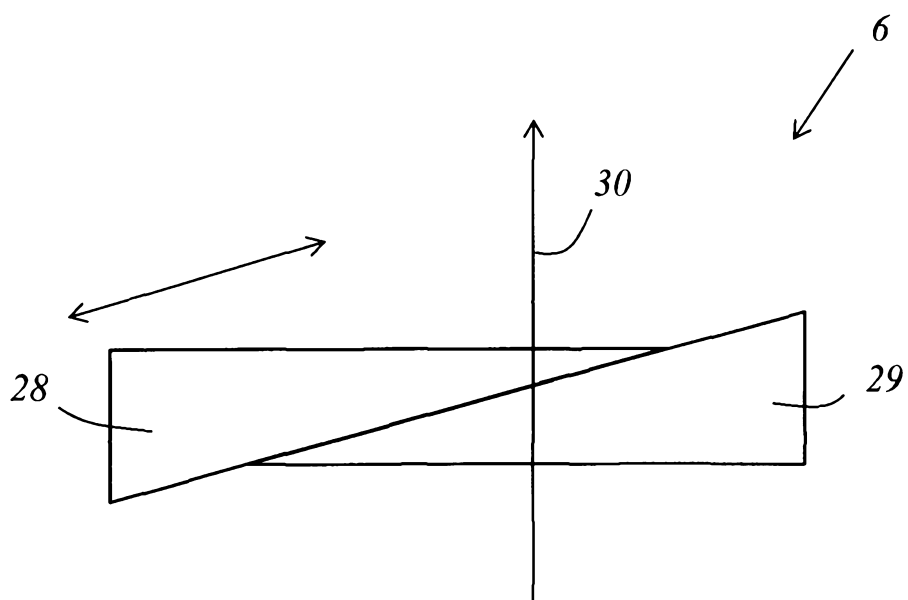


**Fig. 12****Fig. 13**

**Fig. 14**





**Fig. 17****Fig. 18**

Zusammenfassung

92925

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Untersuchen einer Probe mittels Lichtblatt-Mikroskopie, wobei eine in einer Beleuchtungsebene befindliche Probenfläche
5 mittels eines sich in der Beleuchtungsebene ausbreitenden Lichtblattes beleuchtet und von der Beleuchtungsebene ausgehendes Detektionslicht detektiert wird. Das Verfahren zeichnet sich dadurch aus, dass eine Position eines Lichtblattfokus des Lichtblattes in der Beleuchtungsebene (26) durch Verändern der optischen Länge des Lichtweges des das Lichtblatt bildenden Beleuchtungslichtes bewegt wird.

10

(Fig. 1)



RECHERCHENBERICHT
nach Artikel 35.1 a)
des luxemburgischen Gesetzes über Erfindungspatente
vom 20. Juli 1992

LO 1263
LU 92925

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (IPC)
Y	DE 10 2013 213781 A1 (LEICA MICROSYSTEMS [DE]) 25. September 2014 (2014-09-25) * Abbildungen 1-3 * * Absatz [0066] - Absatz [0070] * -----	1-21	INV. G02B21/00 G02B21/36 G02B27/00
Y	DE 10 2012 214568 A1 (LEICA MICROSYSTEMS [DE]) 20. Februar 2014 (2014-02-20) * Abbildung 1 * * Absatz [0039] - Absatz [0068] * -----	1-21	ADD. G02B7/04
Y	DE 10 2013 205115 A1 (LEICA MICROSYSTEMS [DE]) 25. September 2014 (2014-09-25) * Abbildungen 1-6 * * Absatz [0025] - Absatz [0041] * -----	1-21	
Y	US 6 052 223 A (YONEYAMA TAKASHI [JP] ET AL) 18. April 2000 (2000-04-18) * Abbildungen 6-20 * * Spalte 4 - Spalte 14 * -----	1-4, 6-12,14, 15,17-21	
Y	US 6 320 699 B1 (MAEDA TAKANORI [JP] ET AL) 20. November 2001 (2001-11-20) * Abbildungen 2-27 * -----	1,4-9, 13-21	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (IPC) G02B
Y	EP 2 648 029 A2 (MITUTOYO CORP [JP]) 9. Oktober 2013 (2013-10-09) * Abbildungen 2-5 * * Absatz [0010] - Absatz [0032] * -----	1,2, 7-10, 16-21	
Y	DE 2 746 C (E. GUNDLACH ET AL) 1. Januar 1878 (1878-01-01) * das ganze Dokument *	1,6,9,15	
Y	DE 10 2013 112601 A1 (ZEISS CARL MICROSCOPY GMBH [DE]) 21. Mai 2015 (2015-05-21) * Abbildungen 2-7 * -----	1,6,9,15	
Abschlußdatum der Recherche		Prüfer	
14. September 2016		Beutter, Matthias	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument ----- & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

**ANHANG ZUM RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE LUXEMBURGISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

LO 1263
LU 92925

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

14-09-2016

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 102013213781 A1	25-09-2014	CN 105283792 A	27-01-2016
		DE 102013213781 A1	25-09-2014
		EP 2976669 A1	27-01-2016
		JP 2016519331 A	30-06-2016
		US 2016048012 A1	18-02-2016
		WO 2014147207 A1	25-09-2014
DE 102012214568 A1	20-02-2014	CN 104541194 A	22-04-2015
		DE 102012214568 A1	20-02-2014
		EP 2885669 A1	24-06-2015
		JP 2015526764 A	10-09-2015
		US 2015205087 A1	23-07-2015
		WO 2014026683 A1	20-02-2014
DE 102013205115 A1	25-09-2014	DE 102013205115 A1	25-09-2014
		US 2016048014 A1	18-02-2016
		WO 2014147261 A1	25-09-2014
US 6052223 A	18-04-2000	KEINE	
US 6320699 B1	20-11-2001	JP 3640059 B2	20-04-2005
		JP 2000235725 A	29-08-2000
		US 6320699 B1	20-11-2001
EP 2648029 A2	09-10-2013	CN 103364914 A	23-10-2013
		EP 2648029 A2	09-10-2013
		JP 2013218020 A	24-10-2013
		US 2013265663 A1	10-10-2013
DE 2746 C	01-01-1878	KEINE	
DE 102013112601 A1	21-05-2015	DE 102013112601 A1	21-05-2015
		WO 2015071359 A1	21-05-2015



SCHRIFTLICHER BESCHEID

Dossier Nr. LO1263	Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 23.12.2015	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen Nr. LU92925
Internationale Patentklassifikation (IPK) INV. G02B21/00 G02B21/36 G02B27/00 ADD. G02B7/04			
Anmelder Leica Microsystems CMS GmbH			

Dieser Bescheid enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- ☒ Feld Nr. I Grundlage des Bescheids
- ☐ Feld Nr. II Priorität
- ☐ Feld Nr. III Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- ☐ Feld Nr. IV Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- ☒ Feld Nr. V Begründete Feststellung hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- ☐ Feld Nr. VI Bestimmte angeführte Unterlagen
- ☐ Feld Nr. VII Bestimmte Mängel der Anmeldung
- ☐ Feld Nr. VIII Bestimmte Bemerkungen zur Anmeldung

Formblatt LU237A (Deckblatt) (January 2007)	Prüfer Beutter, Matthias
---	-----------------------------

SCHRIFTLICHER BESCHEID

Aktenzeichen Nr.

LU92925

Feld Nr. I Grundlage des Bescheids

1. Dieser Bescheid wurde auf der Grundlage des letzten vor dem Beginn der Recherche eingereichten Satzes von Ansprüchen erstellt.
2. Hinsichtlich der **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz**, die in der Anmeldung offenbart wurde und für die beanspruchte Erfindung erforderlich ist, ist der Bescheid auf folgender Grundlage erstellt worden:
 - a. Art des Materials
 - ☐ Sequenzprotokoll
 - ☐ Tabelle(n) zum Sequenzprotokoll
 - b. Form des Materials
 - ☐ in Papierform
 - ☐ in elektronischer Form
 - c. Zeitpunkt der Einreichung
 - ☐ in der eingereichten Anmeldung enthalten
 - ☐ zusammen mit der Anmeldung in elektronischer Form eingereicht
 - ☐ nachträglich eingereicht
3. ☐ Wurden mehr als eine Version oder Kopie eines Sequenzprotokolls und/oder einer dazugehörigen Tabelle eingereicht, so sind zusätzlich die erforderlichen Erklärungen, dass die Information in den nachgereichten oder zusätzlichen Kopien mit der Information in der Anmeldung in der eingereichten Fassung übereinstimmt bzw. nicht über sie hinausgeht, vorgelegt worden.
4. Zusätzliche Bemerkungen:

SCHRIFTLICHER BESCHEID

Aktenzeichen Nr.

LU92925

Feld Nr. V Begründete Feststellung hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit	Ja: Ansprüche 1-21 Nein: Ansprüche
Erfinderische Tätigkeit	Ja: Ansprüche Nein: Ansprüche 1-21
Gewerbliche Anwendbarkeit	Ja: Ansprüche: 1-21 Nein: Ansprüche:

2. Unterlagen und Erklärungen:

siehe Beiblatt

Zu Punkt V

Begründete Feststellung hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

- 1 sd
- 2 Die vorliegende Anmeldung erfüllt nicht die Erfordernisse der Patentierbarkeit, weil der Gegenstand der Ansprüche 1-21 nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit beruht.
- 2.1 Das Dokument D1 offenbart ein Verfahren zum Untersuchen einer Probe mittels Lichtblatt-Mikroskopie (siehe Abb. 1-3), wobei eine in einer Beleuchtungsebene befindliche Probenfläche mittels eines sich in der Beleuchtungsebene ausbreitenden Lichtblattes ("Beleuchtungslichtblatt 5") beleuchtet (siehe Par. 66-68 und 70) und von der Beleuchtungsebene ausgehendes Detektionslicht detektiert (siehe Par. 69) wird.
- 2.1.1 Die Dokumente D2 und D3 offenbaren ebenfalls diesen Gegenstand (siehe D2: Abb. 1 und Par. 39-51 oder D3: Abb. 1-6 und Par. 25-30).
- 2.1.2 D1 offenbart nicht, dass eine Position eines Lichtblattfokus des Lichtblattes in der Beleuchtungsebene durch Verändern der optischen Länge des Lichtweges des das Lichtblatt bildenden Beleuchtungslichtes bewegt wird.
- 2.1.3 Die zu lösende Aufgabe ergibt sich somit, den Fokus des Lichtblattes längs einer Erstreckung des Lichtblattes zu verschieben.
- 2.1.4 Dem Fachmann sind zur Lösung dieser Aufgabe verschiedene Möglichkeiten bekannt. Diese sind in den Dokumenten D4-D8 exemplarisch beschrieben. Das Dokument D4 offenbart eine Einheit zur Justage des Fokuspunkts ("focal point adjusting unit 101" (siehe Abb. 6, 9), mit der der Fokus eines Strahlengangs durch die Änderung der optischen Weglänge verschoben wird (siehe Spalte 5, Zeile 30 bis Spalte 6, Zeile 32).
- 2.1.5 Die Anwendung dieser Lehre auf das aus D1 (oder D2 bzw. D3) bekannte Verfahren führt einen Fachmann direkt zum Gegenstand des Anspruchs 1, ohne dass es nötig wird, erfinderisch tätig zu werden.
- 2.2 Aus der obigen Argumentation folgt direkt, dass der Gegenstand des unabhängigen Vorrichtungsanspruchs 9 ebenfalls nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit beruht.

- 2.3 D4 offenbart die zusätzlichen Merkmale der abhängigen Ansprüche 2a, 2b (siehe Abb. 15-20), 3a-c (siehe Abb. 15, 16 und 19), 4 (siehe Abb. 6, 9), 6a (siehe Abb. 6, 9), 10 (siehe siehe z. B. Abb. 19), 11 (siehe siehe z. B. Abb. 19), 12a-c (siehe Abb. 15, 16 und 19), 14a (siehe Abb. 15, 16 und 19) und 15a (siehe Abb. 6 oder 9). Dabei werden lineare Keil- oder Stufenelemente als äquivalent zu ringförmigen Keil- oder Stufenelementen angesehen.
- 2.4 D5 offenbart alternative Einheiten zur Justage des Fokuspunkts (siehe Abb. 2-27 und die zugehörige Beschreibung), so dass der Gegenstand der Ansprüche 1, 4, 5, 6a, 9, 13, 14b-d, 15a und 16c ebenfalls nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit gegenüber der Kombination der Lehren der Dokumente D1 (oder D2 oder D3) und D5 beruht.
- 2.5 D6 offenbart alternative Einheiten zur Justage des Fokuspunkts (siehe Abb. 2-5 und die zugehörige Beschreibung, insbesondere Par. 10-20 und 27-32), so dass der Gegenstand der Ansprüche 1, 2a, 2b, 9, 10 und 16c ebenfalls nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit gegenüber der Kombination der Lehren der Dokumente D1 (oder D2 oder D3) und D6 beruht.
- 2.6 Auch D7 offenbart alternative Einheiten zur Justage des Fokuspunkts (siehe Abb. 1 und die zugehörige Beschreibung), so dass der Gegenstand der Ansprüche 1, 6b und 15b ebenfalls nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit gegenüber der Kombination der Lehren der Dokumente D1 (oder D2 oder D3) und D7 beruht.
- 2.7 D8 offenbart ebenfalls alternative Einheiten zur Justage des Fokuspunkts (siehe Abb. 2-7 und die zugehörige Beschreibung), so dass der Gegenstand der Ansprüche 1, 6a, 6b, 15a und 15b ebenfalls nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit gegenüber der Kombination der Lehren der Dokumente D1 (oder D2 oder D3) und D8 beruht.
- 2.8 Die das Lichtblatt-Mikroskop betreffenden Merkmale der abhängigen Ansprüche 7, 8 und 17-21 sind fachüblich und dem Fachmann wohlbekannt und werden von D1, D2 oder D3 beispielhaft offenbart. Da D1-D3 frühere Patentanmeldungen der Anmelderin sind, wird auf eine detaillierte Diskussion verzichtet.