

(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
16. Januar 2014 (16.01.2014)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2014/009080 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation:
G02B 21/06 (2006.01) **G02B 21/36** (2006.01)
G02B 21/16 (2006.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2013/061999
- (22) Internationales Anmeldedatum:
11. Juni 2013 (11.06.2013)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
10 2012 211 943.4 9. Juli 2012 (09.07.2012) DE
- (71) Anmelder: **CARL ZEISS MICROSCOPY GMBH**
[DE/DE]; Carl-Zeiss-Promenade 10, 07745 Jena (DE).
- (72) Erfinder: **LIPPERT, Helmut**; Forstweg 58, 07743 Jena (DE). **KALKBRENNER, Thomas**; An der Leutra 6, 07743 Jena (DE). **KLEPPE, Ingo**; Am Planetarium 12, 07743 Jena (DE). **WOLLESCHEFSKY, Ralf**; Ricarda-Huch-Weg 26, 07743 Jena (DE).
- (74) Anwalt: **GEYER, FEHNERS & PARTNER (G.B.R.)**;
Sellierstrasse 1, 07745 Jena (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, 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, 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,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: MICROSCOPE

(54) Bezeichnung : MIKROSKOP

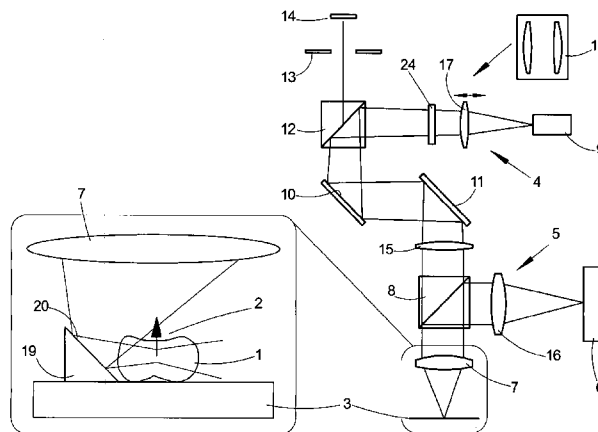


Fig.1

(57) Abstract: The invention relates to a microscope which comprises a specimen table having a table surface in a table plane at an angle different from zero with respect to an optical axis (Z), wherein a specimen (1) is mounted on the specimen table on a specimen carrier (3). The microscope comprises an excitation beam path (4) over which the specimen (1) is illuminated with excitation light, and a detection beam path (5) over which detection light coming from the specimen (1) is guided onto detection means. An objective (7), through which excitation light is routed in the direction of the specimen carrier (3) and detection light coming from the specimen (1) is routed in the direction of the detection means, is arranged along the optical axis (Z). The microscope further comprises beam splitting means for separating excitation light and detection light, means for generating a light sheet from excitation light and means for illuminating the specimen (1) with said light sheet, wherein the light sheet lies in a plane which encloses an angle different from zero with the optical axis (Z). In such a microscope the means for illuminating the specimen (1) comprise at least one optical deflection means, which is disposed on the specimen carrier (3) and is designed to deflect excitation light coming from the objective (7) by means of at least one optically effective surface into the plane of the light sheet.

(57) Zusammenfassung:

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2014/009080 A1



SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

Die Erfindung betrifft ein Mikroskop, welches einen Probentisch mit einer Tischfläche in einer Tischebene in einem von Null verschiedenen Winkel zu einer optischen Achse (Z) umfasst, wobei auf dem Probentisch auf einem Probenträger (3) eine Probe (1) gelagert ist. Das Mikroskop umfasst einen Anregungsstrahlengang (4), über den die Probe (1) mit Anregungslicht beleuchtet wird, sowie einen Detektionsstrahlengang (5), über den von der Probe (1) kommendes Detektionslicht auf Detektionsmittel gelenkt wird. Entlang der optischen Achse (Z) ist ein Objektiv (7) angeordnet, durch welches Anregungslicht in Richtung des Probenträgers (3) und von der Probe (1) kommendes Detektionslicht in Richtung der Detektionsmittel geleitet wird. Das Mikroskop umfasst weiter Strahlteilungsmittel zur Trennung von Anregungslicht und Detektionslicht, Mittel zur Erzeugung eines Lichtblatts aus Anregungslicht sowie Mittel zur Beleuchtung der Probe (1) mit diesem Lichtblatt, wobei das Lichtblatt in einer Ebene liegt, die mit der optischen Achse (Z) einen von Null verschiedenen Winkel einschließt. Bei einem solchen Mikroskop umfassen die Mittel zur Beleuchtung der Probe (1) mindestens ein optisches Ulenkmittel, welches auf oder am Probenträger (3) angeordnet ist und vom Objektiv (7) kommendes Anregungslicht mittels mindestens einer optisch wirksamen Fläche in die Ebene des Lichtblatts umlenkend ausgestaltet ist.

5

10 **Titel**

Mikroskop

Gebiet der Erfindung

15 Die Erfindung betrifft ein Mikroskop. Ein solches Mikroskop umfasst einen Probentisch mit einer Tischfläche in einer Tischebene, die mit einer optischen Achse Z einem von Null verschiedenen Winkel einschließt. Auf dem Probentisch ist ein Probenträger angeordnet, vorzugsweise gegen unabsichtliche Verschiebung gesichert, auf dem eine Probe gelagert ist. Das Mikroskop umfasst weiter einen Anregungsstrahlengang, über den die Probe mit Anregungslicht beleuchtet wird, 20 sowie einen Detektionsstrahlengang, über den von der Probe kommendes Detektionslicht auf Detektionsmittel gelenkt wird. Die Detektionsmittel umfassen beispielsweise eine Kamera oder ein Pixel-Array oder sonstige zur Bilddatenerfassung geeignete Aufzeichnungsgeräte. An die Bilderfassung ist in der Regel auch eine Auswerteeinheit angeschlossen, die die Bilddaten auswertet. Das Mikroskop umfasst außerdem ein entlang der optischen Achse Z angeordnetes 25 Objektiv, durch welches Anregungslicht in Richtung des Probentischs und von der Probe kommendes Detektionslicht in Richtung der Detektionsmittel geleitet wird. Mit Hilfe von Strahlteilungsmitteln im Mikroskop können das Anregungslicht und das Detektionslicht getrennt werden, so dass sie auf verschiedene Strahlengänge aufgeteilt werden. Schließlich umfasst das Mikroskop auch Mittel zur Erzeugung eines Lichtblattes bzw. eines Quasi-Lichtblattes – d.h. eines 30 Lichtblattes, welches durch Abtasten mit einem punkt- oder linienförmigen Strahl erzeugt wird – aus Anregungslicht und Mittel zur Beleuchtung der Probe mit diesem Lichtblatt, wobei das Lichtblatt in einer Ebene liegt, die mit der optischen Achse Z einen von null verschiedenen Winkel einschließt.

35

Stand der Technik

Die Beleuchtung von Proben mit einem Lichtblatt, dessen Ebene die optische Achse in einem von null verschiedenen Winkel schneidet, hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung

für die Untersuchung biologischer Proben gewonnen. Das Lichtblatt schließt dabei in der Regel mit der Detektionsrichtung, die meist der optischen Achse des Mikroskopobjektivs entspricht, einen rechten Winkel ein. Diese Technologie wird auch als SPIM (selective/single-plane illumination microscopy) bezeichnet. Die SPIM-Technologie wird seit einiger Zeit auch in der Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt, sie wird dann als auch als LFSM (light sheet fluorescence microscopy) bezeichnet. Gegenüber anderen etablierten Verfahren, wie der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie oder der Zwei-Photonen-Mikroskopie, weist die LFSM-Technologie mehrere Vorzüge auf. Da die Detektion im Weitfeld erfolgen kann, lassen sich größere Probenbereiche erfassen. Die Auflösung ist zwar etwas geringer als bei der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie und der Zwei-Photonen-Mikroskopie, jedoch lassen sich mit der LFSM-Technologie dickere Proben analysieren. Darüber hinaus ist bei diesem Verfahren die Lichtbelastung und das Ausbleichen der Proben am geringsten, da die Probe nur durch ein dünnes Lichtblatt beleuchtet wird. Mit dem LFSM-Verfahren lassen sich außerdem ohne besonderen Aufwand optische Schnitte herstellen, aus denen dreidimensionale Bilder rekonstruiert werden können.

Kommerzielle Mikroskope, die für SPIM oder LFSM geeignet sind, werden bislang nur beschränkt angeboten, so dass in den einzelnen Forschungsgruppen in der Regel eigene Konstruktionen entwickelt werden. Das Grundprinzip ist jedoch bei all diesen Anordnungen dasselbe. Zur Erzeugung des Lichtblatts für die Lichtblatt-Fluoreszenzmikroskopie wird üblicherweise ein Laser benutzt. Mittels spezieller optischer Elemente, beispielsweise einer Zylinderlinse, wird das Lichtblatt geformt und durch ein Beleuchtungsobjektiv auf die Probe gerichtet. Das Lichtblatt ist dabei nicht tatsächlich vollständig eben, sondern weist eine endliche Dicke auf, die am Fokuspunkt des Beleuchtungsobjektivs am dünnsten ist und zu den Rändern hin zunimmt. Üblicherweise wird der Fokuspunkt, also der dünnste Bereich des Lichtblattes, in die Mitte einer Probenkammer platziert. Die Probenkammer ist dazu aus optisch durchlässigem Material konstruiert und hat oben eine Öffnung, durch die die Probe in die Kammer gesetzt und aus dieser auch wieder entfernt werden kann. Die Probenkammer kann beispielsweise mit einem Gel gefüllt sein, in dem totes Probenmaterial gelagert ist oder aber mit einer Flüssigkeit, die geeignet ist, lebendes Zellmaterial zu erhalten.

Diese Anordnung von Probenkammer, Detektions- und Beleuchtungsstrahlengang in Relation zueinander führt zu komplexen und groß dimensionierten Aufbauten, was einer der Gründe dafür ist, dass es noch keine kommerziell erhältlichen Mikroskope für die SPIM-Technologie gibt. Insbesondere existiert bislang noch kein kommerzieller Ansatz zur Integration der Methode an bestehende Mikroskop-Systeme. Für die Fluoreszenzanregung, die nicht im Weitfeld erfolgen darf, sind weitere Randbedingungen einzuhalten.

Im Stand der Technik sind eine Reihe von Anordnung von Verfahren bekannt, die sich damit beschäftigen, die SPIM-Technologie für die Fluoreszenzmikroskopie vorteilhaft einzusetzen oder den Raum, den das Gerät insgesamt beansprucht, durch besondere technische Lösungen zu verringern.

5

In der DE 10 2008 009 216 A1 wird eine Vorrichtung beschrieben, die sowohl für Photoaktivierung und -deaktivierung (PALM-Verfahren, *photoactivated light microscopy*) als auch für Fluoreszenzanregung geeignet ist. Die Erzeugung des Lichtblattes erfolgt hier durch spezielle optische Mittel, die in üblicher Weise senkrecht zur Detektionsrichtung und zum Detektionsobjektiv angeordnet sind.

10

In dem Artikel „Rapid three-dimensional isotropic imaging of living cells using Bessel beam plane illumination“ von Thomas A. Planchon *et al.*, erschienen online in *Nature Methods* am 04. März 2011 (doi:10.1038/nmeth.1586), wird ein Verfahren zur Beleuchtung von lebenden Proben mit aus Bessel-Strahlen geformten Lichtblättern beschrieben, die besonders dünn im Verhältnis zu ihrer Ausdehnung in Strahlrichtung sind. Anregung und Detektion erfolgen über zwei im Winkel von 90° zueinander angeordneten Objektiven, welche teilweise von der mit Flüssigkeit gefüllten Probenkammer umschlossen werden. Zusätzlich zu diesen beiden Objektiven ist hier noch ein drittes, normales Beobachtungsobjektiv vorgesehen, welches einen Überblick über die Probe erlaubt und dessen optische Achse die optischen Achsen der beiden anderen Objektive in einem Punkt schneidet und mit diesen einen Winkel von 45° bzw. 135° einschließt.

15

20

In dem Artikel „Fast, high-contrast imaging of animal development with scanned light sheet-based structured-illumination microscopy“ von Phillipp J. Keller *et al.*, erschienen online in *Nature Methods* am 04. Juli 2010 (doi:10.1038/nmeth.1476) wird die Erzeugung eines „Quasi-Lichtblattes“ mit Hilfe eines Abtastspiegels im Zusammenhang mit fluoreszenzmikroskopischen Anwendungen und zur Erzeugung einer strukturierten Beleuchtung zur Kontrastoptimierung beschrieben. Dabei drückt der Zusatz „Quasi“ aus, dass der Anregungsstrahl nicht in einer Momentaufnahme, wohl aber über einen Zeitraum, welcher der Detektionszeit entspricht, als Lichtblatt wahrgenommen wird.

25

30

Im Artikel „Miniaturized selective plane illumination microscopy (mini SPIM) for endoscopic high-contrast fluorescence imaging“ von Christoph J. Engelbrecht *et al.*, erschienen 2010 in *Optics Letters* am 28. April 2010 (doi: 10.1364/OL.35.001413), wird eine Anordnung beschrieben, bei der das Beleuchtungslicht auf zwei Strahlengänge aufgeteilt wird, deren einer zur üblichen Beleuchtung der Probe entlang der Detektionsrichtung dient und deren anderer zur Beleuchtung der Probe mit einem Lichtblatt senkrecht zur Detektionsrichtung dient. Die Strahlen werden dabei jeweils über Fasern von den jeweiligen Objektiven in Richtung der Probe zu einem kom-

35

binierten Auskoppelstück geleitet, wo die beiden Strahlen über entsprechende Auskoppellemente auf die Probe gerichtet werden. Zur Auskopplung des Lichtblattes ist dabei ein Prismenelement vorgesehen, welches den Strahlengang aus der Detektionsrichtung um 90° ablenkt.

- 5 Auch bei der im Artikel „Fast Three-Dimensional Fluorescence Imaging of Activity in Neural Populations by Objective-Coupled Planar Illumination Microscopy“ von Terrence F. Holekamp *et al.*, erschienen 2008 in *Neuron*, Bd. 57, Seite 661-672, beschriebenen Methode erfolgt die Erzeugung des Lichtblattes über eine Faser, die hier mit einer Halterung direkt am Detektionsobjektiv bzw. dessen Halterung befestigt ist. Mittels Piezoelementen wird die Faser entlang der optischen Achse des Detektionsobjektivs verschoben, auf diese Weise kann der Abstand des
10 Lichtblattes zur vordersten Linse des Detektionsobjektivs variiert werden, so dass prinzipiell optische Schnitte erzeugt werden können.

- Im Artikel „Light Sheet Microscopy for Single Molecule Tracking in Living Tissue“ von Jörg G. Ritter *et al.*, erschienen in PLoS ONE 5 (7): e11639 im Jahr 2010 wird eine Vorrichtung für die
15 inverse Mikroskopie beschrieben, die insbesondere auch für die Analyse kleiner Proben geeignet ist.

- In der DE 10 2004 034 957 A1 wird eine spezielle Objektivanordnung beschrieben, bei der eine
20 Einspiegelung des Lichtblattes am Rand außerhalb des eigentlichen Beobachtungsobjektivs erfolgt, beispielsweise über abbildende Spiegel mit geringer numerischer Apertur. Der das Objektiv umschließende abbildende Spiegel ist mechanisch ein Teil des Objektivs um eine möglichst homogene Auflösung zu erzielen, die Einspiegeloptik kann beispielsweise ringförmig ausgestaltet sein.

- 25 In dem Artikel „Optically sectioned imaging by oblique plane microscopy“ von C. Dunsby, erschienen 2008 in *Optics Express* 16 (25), S. 20306-20316, wird eine Vorrichtung beschrieben, bei der eine Probe ebenfalls mit einem Lichtblatt beleuchtet wird, wobei Beleuchtung und Detektion hier jedoch durch dasselbe Objektiv erfolgen. In bezug auf die optische Achse des Anregungs- bzw. Detektionsobjektivs liegt die Ebene des Lichtblattes daher nicht in einem Winkel von 90° zu dieser optischen Achse, sondern in einem kleineren Winkel, beispielsweise 60°. Aufgrund der speziellen Konstruktion können für die Beleuchtung und die Detektion jeweils nur
30 kleine Bereiche des Objektivs, die einander gegenüberliegen, verwendet werden, da ansonsten die Detektion nicht in einer Ebene senkrecht zur Lichtblattebene erfolgen könnte.

- 35 Ein ähnlicher Aufbau wird auch in dem Artikel „High-speed 2D and 3D fluorescence microscopy of cardiac myocytes“ von Sunil Kumar *et al.*, erschienen 2011 in *Optics Express* 19 (15), S. 13839 –13847, beschrieben. Auch hier wird für die Detektion und die Beleuchtung mit einem

Lichtblatt dasselbe Objektiv verwendet, das Lichtblatt steht schräg zur optischen Achse des Detektionsobjektives in einem Winkel von deutlich weniger als 90° . Mit Hilfe eines Zweitmikroskops wird jedoch ein Zwischenbild der Probe erzeugt, dieses Zwischenbild wird über ein drittes Mikroskop auf eine Kamera abgebildet, die optische Achse des Objektivs des dritten Mikroskops und des zweiten Mikroskops schließen einen von null verschiedenen Winkel ein. Gleichzeitig erfolgt auch die Einstrahlung des Beleuchtungslichtes über das zweite Mikroskop, im Zwischenbild bildet das Beleuchtungslicht daher bereits ein Lichtblatt. Die Lichtblattebene und die optische Achse des Objektivs des dritten Mikroskops schließen einen Winkel von 90° zueinander ein.

Keine der beschriebenen Vorrichtungen erlaubt jedoch die einfache und problemlose Integration in bestehende Mikroskope. Allenfalls im Bereich der inversen Mikroskopie lässt sich die von T. A. Planchon *et al.* beschriebene Vorrichtung einsetzen, indem oberhalb des Objektträgers bzw. des Probenstückes ein entsprechendes Beleuchtungs- und Detektionsmodul anordnet wird, welches zwei Objektive umfasst, deren optische Achsen einen Winkel von 90° zueinander einschließen. Auch diese Vorrichtung ist jedoch sehr raumgreifend und aufgrund der zusätzlichen Optiken sehr aufwendig.

Beschreibung der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist es daher, ein Mikroskop der eingangs beschriebenen Art dahingehend weiterzuentwickeln, dass die Integration der SPIM-Technologie in bestehende Mikroskope, insbesondere was die Untersuchung kleiner Proben, insbesondere mit fluoreszenzspektroskopischen Methoden betrifft, erleichtert wird.

Diese Aufgabe wird bei einem Mikroskop der eingangs beschriebenen Art dadurch gelöst, dass die Mittel zur Beleuchtung der Probe mindestens ein optisches Umlenkmittel umfassen, welches auf oder am Probenträger angeordnet ist und vom Objektiv kommendes Anregungslicht mittels mindestens einer optisch wirksamen Fläche in die Ebene des Lichtblattes umlenkend ausgestaltet ist. Während bisher Umlenkmittel – bei der Verwendung von zwei verschiedenen Objektiven für die Beleuchtung und Detektion – gar nicht vorgesehen bzw. am Objektiv angeordnet waren, ermöglicht die Anordnung des mindestens einen optischen Umlenkmittels am oder auf dem Probenträger zum einen eine Entkopplung der Lichtblatteinstrahlung vom Beleuchtungs- und Detektionsobjektiv als letztem optischen Element im Strahlengang vor der Probe, so dass eine Detektion über die gesamte Öffnung des Objektivs möglich wird, und zum anderen hat diese Entkopplung zur Folge, dass weitestgehend die üblichen Mikroskopobjektive verwendet werden können, ohne spezielle Halterungen oder Strahlführungen für den Lichtblattstrahlengang vorzusehen. Eine Anordnung an oder auf dem Probenträger bedeutet dabei, dass

das mindestens eine optische Umlenkmittel auf dem Probenträger lösbar oder permanent befestigt sein kann, es kann aber einfach auf dem Probenträger abgelegt sein, ohne mit diesem eine kraft- oder formschlüssige Verbindung einzugehen. Auch kann das mindestens eine optische Umlenkmittel mit dem Probenträger einstückig gefertigt sein. Die Anordnung des mindestens einen optischen Umlenkmittels auf dem Probenträger erlaubt es auch, ein gemeinsames
5 Objektiv für die Beleuchtung und die Detektion zu verwenden und dennoch ein Lichtblatt oder Quasi-Lichtblatt zu erzeugen, welches mit der optischen Achse des Mikroskopobjektivs, durch welches das Anregungslicht auf die Probe bzw. das Detektionslicht von der Probe geführt wird, d.h. mit der Detektionsrichtung einen von Null Grad verschiedenen, in der Regel rechten Winkel
10 einschließt. Dazu ist die mindestens eine optisch wirksame Fläche entsprechend ausgerichtet, wobei Korrekturen über entsprechende Justiermittel im Mikroskop, beispielsweise eine Wackelplatte, vorgenommen werden können.

Beispielsweise kann das optische Umlenkmittel als Spiegelement mit mindestens einer als
15 Spiegelfläche ausgebildeten optisch wirksamen Fläche ausgestaltet sein, wobei bevorzugt die mindestens eine Spiegelfläche mit der optischen Achse Z einen Winkel von 45° einschließt. Vom Mikroskopobjektiv kommendes Beleuchtungslicht, welches beispielsweise bestimmte Fluorophore in der Probe zur Fluoreszenz anregen kann, wird dabei auf die Spiegelfläche gelenkt und dort in Richtung der Probe reflektiert, wobei die optischen Elemente im Anregungsstrahlengang so angeordnet sein müssen, dass das Lichtblatt nach der Reflexion im wesentlichen in der
20 XY-Ebene gebildet wird. Dies kann durch die Verwendung von anamorphotischen optischen Elementen wie Zylinderlinsen erfolgen, die an entsprechender Stelle im Strahlengang auch in Kombination mit dem mindestens einen optischen Umlenkmittel angeordnet sind. Besonders vorteilhaft ist jedoch das Mikroskop als Laser-Scanning-Mikroskop ausgebildet, das Lichtblatt ist
25 dann durch die bei diesem Mikroskop vorhandenen Abtastmittel zur Punktabtastung als Quasi-Lichtblatt erzeugbar. Durch die Bewegung des Abtastmittels, beispielsweise des Scannerspiegels, wird der Lichtstrahl in schneller Folge linienförmig über die Probe geführt, so dass sich effektiv bzw. im zeitlichen und räumlichen Mittel die Form eines Lichtblattes ergibt.

30 Während die Ausgestaltung des mindestens einen optischen Umlenkmittels als Spiegelement besonders für Mikroskope geeignet ist, bei denen das Objektiv oberhalb der Probe angeordnet ist, also auch oberhalb des Probentisches mit dem Probenträger, ist in einer anderen Variante das mindestens eine optische Umlenkmittel als Prismenelement ausgestaltet, mit einer als Innenseite eine Prismas ausgebildeten optisch wirksamen Fläche, welche bevorzugt mit der optischen Achse Z einen Winkel von 45° einschließt. Diese Variante ist besonderes für die Ver-
35 wendung bei inversen Mikroskopstativen geeignet, bei der Anregung und Detektion unterhalb des Probentisches erfolgen, kann jedoch selbstverständlich auch mit anderen Stativen verwendet werden. Das mindestens eine optische Umlenkmittel ist dabei so in den Tisch integriert bzw.

so an diesem angeordnet, dass es von unten kommendes Licht durchlässt. Anstelle eines Prismas kann auch ein Hohlraum-Lichtleiter verwendet werden, wobei dann die optisch wirksame Fläche wieder verspiegelt ist. Über eine Lichtaustrittsfläche wird das Licht dann zur Probe gelenkt.

5

In einer anderen Ausgestaltung kann die optisch wirksame Fläche auch aus einer Vielzahl von Mikroprismen zusammengesetzt sein, diese schließt dann bevorzugt im Mittel mit der optischen Achse Z einen Winkel von 45° ein. Der Winkel kann in diesem und den vorgenannten Fällen auch von 45° abweichen, solange über Justiermittel sichergestellt wird, dass die Ausbreitungsrichtung des Lichtblattes im Wesentlichen senkrecht zur Detektionsrichtung steht. Prinzipiell reicht es also aus, wenn der Winkel von Null abweicht, wobei ein Winkel von 45° den Vorteil einer besonders einfachen Ausrichtung bietet und in der Regel keine weiteren Justiermittel nötig sind. Die Verwendung einer aus Mikroprismen zusammengesetzten optisch wirksamen Fläche ist von Vorteil in Umgebungen wie Fluiden, die plane Spiegelflächen sonst verunreinigen könnten, dies wird durch die Mikroprismen verhindert, ein Kontakt der reflektierenden Fläche mit dem Umgebungsfluid oder der Probe wird unterbunden.

Die bevorzugte Ausgestaltung der optisch wirksamen Fläche mit einem Winkel von 45° zur optischen Achse Z bietet sich besonders dann an, wenn das Anregungslicht – in Strahlform – parallel zur optischen Achse in das bzw. auf die optisch wirksame Fläche des optischen Umlenkmittels geführt wird, was aufgrund der dann größtmöglichen numerischen Apertur für das Anregungslicht vorteilhaft ist. Hier reicht dann in der Regel auch eine optisch wirksame Fläche aus. Diese Strahlführung ist jedoch nicht zwingend notwendig und der Lichtstrahl des Anregungslichts kann auch unter einem von Null verschiedenen Winkel auf die optisch wirksame Fläche treffen. Insbesondere bei der Verwendung von Prismen oder Mikroprismen zur Formung der optisch wirksamen Fläche lässt sich auch das Prinzip der Totalreflexion ausnutzen, wozu bei der Verwendung von optisch wirksamen Flächen mit einem Winkel von 45° zur optischen Achse dann ein mit einem von Null verschiedenen Winkel einfallender Strahl von Anregungslicht verwendet werden kann, oder aber optische Umlenkmittel mit mehr als einer optisch wirksamen Fläche, die zur Strahllenkung unter flacheren Winkeln dienen.

Auch für die inverse Mikroskopie geeignet sind optische Umlenkmittel, bei denen die optisch wirksame Fläche trichterförmig die Probe umschließend ausgebildet ist. Beispielsweise lassen sich hier kegelstumpfförmige Hütchen mit verspiegelten Innenflächen verwenden, diese Hütchen können als Wegwerfartikel gestaltet sein und bieten den Vorteil, dass sie die Probe, sofern sie klein genug ist, vollständig umschließen können, so dass die Probe sich weiterhin in einer physiologisch wirksamen Flüssigkeit, die ihre Lebensfunktionen erhält, befindet. Das Hütchen kann zudem auf dem Probenträger oder dem Probentisch relativ einfach verschoben oder mit-

35

tels spezieller Manipulationsvorrichtungen gezielt in drei Raumdimensionen bewegt werden. Die Manipulationsvorrichtungen können auch bereits am Anfang verwendet werden um das Hütchen aus beliebigen Richtungen auf die Probe aufzusetzen.

- 5 In einer anderen Ausgestaltung ist das mindestens eine optische Umlenkmittel am Probenträger angeordnet, indem es direkt in diesen als trichterförmige Vertiefung integriert ist. Das Beleuchtungslicht wird dann an den Seitenwänden des Trichters umgelenkt. Für die Beobachtung von oben sind die Seitenwände vorteilhaft verspiegelt, für die inverse Mikroskopie übernehmen die Seitenwände die Funktion von Prismenflächen.

10

Für die Untersuchung vieler kleiner Proben von der Größe einzelner Zellen oder Zellverbünde ist es vorteilhaft, wenn auf dem Probenträger eine Vielzahl von optischen Umlenkmitteln angeordnet sind, bevorzugt in Form einer Raster. Diese Anordnung ist beispielsweise sowohl für die trichterförmigen Vertiefungen, als auch für die Spiegel- oder Prismenelemente möglich. Der

15 Probenträger kann beispielsweise als sogenannte *Multiwell*-Platte, d.h. als Mikrotiterplatte mit einer Vielzahl rasterförmig angeordneter Vertiefungen ausgestaltet sein. Diese Vertiefungen können beispielsweise trichterförmig sein und somit die optischen Umlenkmittel bilden.

20

Die optischen Umlenkmittel können aber auch in die Vertiefungen eingesetzt werden, bevor sie dort abgelegt werden, oder die Vertiefungen mit den Proben darin abschließen, indem sie nach der Probenablage dort nach Art von Hütchen oder Deckeln aufgesetzt werden.

25

In einer weiteren Ausgestaltung ist das mindestens eine optische Umlenkmittel relativ zum Probenträger, bevorzugt entlang der optischen Achse, von unten in eine entsprechende Öffnung des Probenträgers einbringbar. Diese Öffnung muss dabei nicht von vornherein vorhanden sein, sondern kann – auch unter Zuhilfenahme des optischen Umlenkmittels – erst in den Probenträger eingebracht werden. Beispielsweise kann der Probenträger mit einem Raster aus Stanzpunkten versehen sein, an denen sich durch das Umlenkmittel eine Öffnung stanzen lässt. Je nach Art der Probe und/oder der Umlenkmittel wird nur eine Öffnung gestanzt, oder es

30 werden mehrere Öffnungen gestanzt. Analog kann das mindestens eine Umlenkmittel auch von oben eingebracht werden, oder schräg von der Seite, auch mit Hilfe der oben erwähnten Manipulationsvorrichtungen.

35

Außerdem kann das mindestens eine optische Umlenkmittel auch lösbar mit einer Schutzvorrichtung ausgestattet sein, die insbesondere die optische wirksame Fläche während des Transports schützt. Falls die Proben über einen längeren Zeitraum beobachtet werden sollen, oder falls die Proben als Zellkulturen angelegt werden, die sich erst – natürlich oder künstlich beschleunigt – entwickeln müssen, können diese Schutzvorrichtungen auch auf den Umlenkit-

5 teln belassen werden, bzw. gesondert für diese Prozesse angebracht werden. Es kann sich beispielsweise um einfache Kappen handeln, die auf die Umlenkmittel aufgesetzt werden, um eine abziehbare Folie, etc. Die lösbare Verbindung kann auch über einen Clip-Verschluss erfolgen, so dass ein sicherer Halt der Schutzvorrichtung gewährleistet ist und ein Eindringen von Flüssigkeit in den Bereich der optisch wirksamen Fläche verhindert wird.

10 Zur Justierung des Lichtblattes sind im Strahlengang, wie oben schon erwähnt, bevorzugt Justiermittel angeordnet. Diese können beispielsweise eine Wackelplatte umfassen. Zur Variation der Lichtblattdicke kann im Anregungsstrahlengang eine gesonderte Zoomoptik angeordnet sein. Zur variablen Positionierung des Fokus des Lichtblattes relativ zur optischen Achse Z ist im Anregungsstrahlengang außerdem bevorzugt eine Kollimationsoptik angeordnet.

15 Ist das Mikroskop als Laser-Scanning-Mikroskop für eine Punktabtastung ausgestaltet, so lässt sich eine axiale Verschiebung des Lichtblattes entlang der Detektionsrichtung Z erreichen, indem die Position des Probenträgers senkrecht zur Abtastrichtung verschoben wird. Auf diese Weise lassen sich verschiedene Ebenen der Probe abtasten und ein Bildstapel für die dreidimensionale Bildauswertung erzeugen. Die gleiche Wirkung lässt sich erzielen, wenn die Position des Beleuchtungsstrahls mittels eines weiteren Abtastmittels, z.B. eines weiteren Abtastspiegels, senkrecht zur vorher beschriebenen Abtastrichtung variiert wird. Selbstverständlich ist
20 auch die Verwendung nur eines Abtastmittels in unterschiedlichen Operationsmodi denkbar.

Es versteht sich, dass die vorstehend genannten und die nachstehend noch zu erläuternden Merkmale nicht nur in den angegebenen Kombinationen, sondern auch in anderen Kombinationen oder in Alleinstellung einsetzbar sind, ohne den Rahmen der vorliegenden Erfindung zu verlassen.
25

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

30 Nachfolgend wird die Erfindung beispielsweise anhand der beigefügten Zeichnungen, die auch erfindungswesentliche Merkmale offenbaren, noch näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 eine Prinzipskizze des Gesamtaufbaus eines Mikroskops mit Lichtblattbeleuchtung,
Fig. 2 a), b) wie mit Hilfe einer Zoomoptik die Beleuchtungsapertur eingestellt werden kann,
Fig. 3 die Abtastung einer Probe in Z-Richtung und
35 Fig. 4 a)-d) verschiedene Ausgestaltungen von Probenträgern und/oder optischen Umlenkmitteln.

Ausführliche Beschreibung der Zeichnungen

In Figur 1 ist zunächst der grundsätzliche Aufbau eines Mikroskops gezeigt, mit welchem eine Probe 1 mit einem Lichtblatt senkrecht zu einer Detektionsrichtung 2 bestrahlt werden kann. Ein solches Mikroskop umfasst einen üblichen Probentisch mit einer Tischfläche in einer Tischebene senkrecht zu einer optischen Achse Z, die der Detektionsrichtung entspricht. Die Tischebene kann auch einen anderen, von Null verschiedenen Winkel zur optischen Achse Z haben. Auf der Tischfläche ist ein Probenträger 3 mit der Probe 1 gelagert. Bei dem Probenträger 3 handelt es sich dabei nicht um eine der bei SPIM-Untersuchungen häufig verwendeten Probenkammern, sondern um einen Träger, der auf üblichen Probentischen von Mikroskopen für die normale oder inverse Mikroskopie gelagert bzw. fixiert werden kann. Es kann sich auch um einen handelsüblichen Probenträger handeln.

Das Mikroskop verfügt über einen Anregungsstrahlengang 4, über den die Probe 1 mit Anregungslicht beleuchtet wird, und über einen Detektionsstrahlengang 5, über den von der Probe 1 kommendes Detektionslicht auf Detektionsmittel gelenkt wird. Im gezeigten Beispiel umfassen die Detektionsmittel eine übliche digitale Kamera 6, beispielsweise mit einem CCD- oder CMOS-Chip zur Registrierung der Intensitäten. Über den Anregungsstrahlengang 4 können beispielsweise in der Probe 1 vorhandene Fluorophore zur Fluoreszenz angeregt werden, diese Fluoreszenz wird dann über den Detektionsstrahlengang 5 detektiert. Das Mikroskop umfasst außerdem ein entlang der optischen Achse angeordnetes Objektiv 7, durch welches Anregungslicht in Richtung des Probentischs bzw. Probenträgers 3 und von der Probe 1 kommendes Detektionslicht in Richtung der Detektionsmittel geleitet wird. Zur Trennung von Anregungslicht und Detektionslicht umfasst das Mikroskop außerdem Strahlteilungsmittel, hier einen Strahlteiler 8, der beispielsweise als polarisationsoptischer Strahlteiler oder als dichroitischer Spiegel ausgeführt sein kann.

Das Mikroskop umfasst schließlich auch Mittel zur Erzeugung eines Lichtblatts aus Anregungslicht und Mittel zur Beleuchtung der Probe 1 mit diesem Lichtblatt, wobei das Lichtblatt in einer Ebene liegt, die mit der optischen Achse Z einen von Null verschiedenen Winkel einschließt. Das Anregungslicht selber entstammt einem Laser 9, es kann sich hierbei um einen schmal- oder breitbandigen oder auch um einen durchstimmbaren Laser handeln, mit dem insbesondere die in der Probe vorhandenen Fluorophore angeregt werden können. Dabei sind sowohl Ein- als auch Mehrphotonenprozesse denkbar, auch in Kombination. Auch eine Zusammenschaltung mehrerer Laser ist möglich.

35

Im gezeigten Beispiel ist das Mikroskop als Laser-Scanning-Mikroskop ausgebildet. Die Mittel zur Erzeugung des Lichtblatts umfassen daher Abtastmittel zur Abtastung der Probe, hier als Scannerspiegel 10 und 11 ausgeführt, mit denen ein punktförmiger Strahl im Betrieb als Scan-

ning-Mikroskop die Probe in X-Richtung und in Y-Richtung abtastend abgelenkt werden kann. Im vorliegenden Beispiel genügt grundsätzlich der Scannerspiegel 10, mit dem eine linienförmige Abtastung realisierbar ist. Vorteilhaft lassen sich aber beide Spiegel 10,11 kombiniert einsetzen um beide Abtastrichtungen ausnutzen zu können und so den Strahl zweidimensional positionieren zu können. Auch lässt sich auf diese Weise eine einfache Stapelaufnahme realisieren. Zudem ist die Orientierung der Abtastlinie und damit des Quasi-Lichtblatts frei wählbar und kann auch aus einer kombinierten Bewegung beider Scannerspiegel 10,11 resultieren. Aufgrund der hohen Geschwindigkeit des Abtastens wird effektiv, d.h. im zeitlichen und räumlichen Mittel ein Lichtblatt erzeugt. Anstelle ein Scanning-Mikroskop zu verwenden, können die Mittel zur Erzeugung des Lichtblatts auch so ausgestaltet sein, dass ein statisches Lichtblatt erzeugt wird, in diesem Fall umfassen die Mittel zur Erzeugung des Lichtblattes beispielsweise eine Zylinderlinse.

Im gezeigten Beispiel ist im Anregungsstrahlengang auch noch ein weiterer Strahlteiler 12 enthalten. Dieser dient hier dazu, optional eine zusätzliche konfokale Detektion zu ermöglichen, wozu dem Strahlteiler 12 ein Pinhole 13 und ein weiterer Detektor 14 nachgeordnet sind. Durch entsprechende Ansteuerung, beispielsweise des Strahlteilers 8 und der Scannerspiegel 10 und 11 lässt sich so zwischen konfokaler Detektion und SPIM-Verfahren hin- und herschalten. Tubuslinsen 15 und 16 dienen der Strahlformung im Anregungs- und Detektionsstrahlengang 4 bzw. 5.

Mittels einer Kollimationsoptik 17 im Anregungsstrahlengang 4 kann der Fokus des Lichtblattes axial positioniert werden, d.h. relativ zur optischen Achse Z in der Ebene des Lichtblattes. Diese Kollimationsoptik 17 kann durch eine Zoomoptik 18 ergänzt oder ersetzt werden. Mit dieser kann die Pupillenausleuchtung variiert werden und damit die Lichtblattdicke und die Divergenz des Lichtblattes beeinflusst werden. Dies ist in den Figuren 2a und 2b für zwei verschiedene Ausleuchtungen gezeigt.

Außerdem kann im Strahlengang zusätzlich mindestens ein gesondertes Strahlformungselement 24 angeordnet sein. Dieses kann beispielsweise als phasenmodulierendes Element oder als räumlicher Modulator für Licht (*spatial light modulator*, SLM) ausgestaltet sein. Mit Hilfe solcher Strahlformungselemente lassen sich verschiedene Strahlformen – beispielsweise Bessel-Strahlen – zur Lichtblatterzeugung einstellen. Als Strahlformungselement 24 lassen sich auch auf Mikrospiegelaktoren (*digital micromirror device*, DMD) basierende Optiken einsetzen, wenn beispielsweise parallele Strahlmuster eingestellt werden sollen.

Bei der Verwendung eines Laser-Scanning-Mikroskops zur Erzeugung des Lichtblattes kann der zweite Scannerspiegel 11 dazu verwendet werden, die Position der Abtastlinie relativ zur

optischen Achse zu variieren, so dass mittels der optischen Umlenkmittel das Lichtblatt entlang der Z-Richtung verschoben wird, so dass die Probe in mehreren Schichten abgetastet werden kann. Aus den so gewonnenen Daten lässt sich auch ein dreidimensionales Bild der Probe rekonstruieren. Das Abtasten der Probe in Z-Richtung ist beispielhaft in Figur 3 skizziert.

5

Die Mittel zur Beleuchtung der Probe umfassen insbesondere mindestens ein optisches Umlenkmittel, welches auf oder am Probenträger 3 angeordnet und vom Objektiv 7 kommendes Anregungslicht mittels mindestens einer optisch wirksamen Fläche in die Ebene des Lichtblattes umlenkend ausgestaltet ist. Bevorzugt ist das mindestens eine optische Umlenkmittel dabei so ausgestaltet, dass es das Anregungslicht an einer optisch wirksamen Fläche in ein Lichtblatt, welches in einer Ebene liegt, die mit der optischen Achse Z einen rechten Winkel einschließt, umlenkt. In diesem Fall kann nämlich der gesamte Öffnungsbereich des Objektivs 7 für die Detektion verwendet werden, da die Detektionsrichtung Z dann an jeder Stelle senkrecht zur Lichtblattebene ist.

15

Im in Figur 1 gezeigten Beispiel ist das mindestens eine optische Umlenkmittel als Spiegelement 19 ausgebildet, die optisch wirksame Fläche ist dann als Spiegelfläche 20 ausgebildet. Um ein zur Detektionsrichtung Z senkrecht liegendes Lichtblatt zu erzeugen, schließt die mindestens eine Spiegelfläche 20 des Spiegelements 19 mit der optischen Achse Z hier einen Winkel von 45° ein. Je nach Strahlführung können aber auch andere Winkel verwendet werden. Das Spiegelement 19 ist hier mit einer planen Spiegelfläche ausgebildet. Bei der Verwendung von mindestens zwei Abtastmitteln wie den Scannerspiegeln 10, 11 kann das Spiegelement 19 prinzipiell auch rotationssymmetrisch zur optischen Achse – beispielsweise in Form eines Kegelstumpfes oder einer Vertiefung im Probenträger – orientiert sein, da durch die Verwendung mindestens zweier Abtastspiegel die Lage des Lichtblatts entsprechend eingestellt werden kann. Mithilfe zusätzlicher Justiermittel wie Wackelplatten kann für eine Justierung der Lage des Lichtblatts in der Ebene senkrecht zur Detektionsrichtung Z gesorgt werden. Das Spiegelement 19 kann einfach auf dem Probenträger 3 abgelegt sein, es kann aber auch mit diesem dauerhaft oder lösbar verbunden sein. In diesem Fall lassen sich handelsübliche Probenträger 3 verwenden. Auch die einstückige Fertigung von speziellen Probenträgern, die bereits mit Spiegelementen 19 versehen sind, ist eine denkbare Variante. Die Spiegelfläche kann beispielsweise durch Aufdampfen erzeugt werden.

35

Für die inverse Mikroskopie besonders geeignet sind als Prismenelemente ausgestaltete optische Umlenkmittel, bei denen die optisch wirksame Fläche als Innenseite des Prismas ausgebildet ist. Die optisch wirksame Fläche kann auch aus einer Vielzahl von Mikroprismen zusammengesetzt sein, so dass die reflektierende bzw. brechende Oberfläche nicht direkt tangiert

wird, so dass Verschmutzungen beispielsweise durch Lösungen, in denen sich die Probe befindet, unterbunden werden.

Die Ausgestaltung der optischen Umlenkmittel ist dabei nicht auf die Gestaltung als Spiegel-
5 element 19 oder als Prismenelement beschränkt. In Figur 4a) bis Figur 4d) sind beispielhaft verschiedene Möglichkeiten der Realisierung für optische Umlenkmittel gezeigt.

Beispielsweise kann die optisch wirksame Fläche des mindestens einen optischen Umlenkmittels die Probe trichterförmig umschließend ausgebildet sein. Ein solches Beispiel ist in Fig.4a
10 gezeigt, hier ist das optische Umlenkmittel von oben auf den Tisch aufsetzbar ausgebildet, beispielsweise in Form einer die Probe umschließenden Struktur mit einer trichterförmigen optisch wirksamen Fläche. Das optische Umlenkmittel hat hier die Form eines Hütchens 21. Diese Art von optischen Umlenkmittels ist insbesondere für die inverse Mikroskopie geeignet, die inneren
15 Seitenwände des Hütchens 21 sind dann beispielsweise verspiegelt oder teilweise mit Spiegeln ausgelegt, der Vorteil von solchen trichterförmigen Strukturen liegt darin, dass sie an beliebiger Stelle auf den Proben Tisch aufgesetzt werden können, d.h., immer dort, wo sich eine Probe befindet, was insbesondere bei sehr kleinen Proben einzelnen Zellstrukturen vorteilhaft ist. Anschließend erfolgt eine entsprechende Ausrichtung des Mikroskops bzw. Anregungslichts. Die trichterförmige Struktur kann oben auch offen sein, sie kann mehrere Seitenwände umfassen,
20 oder aber eine einzige Seitenwand, beispielsweise eine runde. Umfasst die trichterförmige Struktur mehrere ebene Seitenwände, so muss davon nur eine verspiegelt sein. Handelt es sich andererseits um eine echte rotationssymmetrische Trichterform, so kann ein Quasi-Lichtblatt in der Detektionsebene beispielsweise auch durch eine kombinierte Bewegung der Scannerspiegel 10 und 11 im Sinne eines Zirkularscans denkbar.

25

Falls die Spiegelflächen der Hütchen 21 mit der Oberfläche des Probenträgers 3 nicht in einem Winkel von 45° einschließen, so kann dies dazu führen, dass das Lichtblatt nicht senkrecht zur optischen Achse Z ausgerichtet ist bzw. nicht parallel zur Oberfläche des Probenträgers 3, insbesondere wenn die Hütchen aus einem flexiblen Material gebildet sind. In diesem Fall ist es
30 vorteilhaft, Justiermittel vorzusehen, beispielsweise eine Wackelplatte oder Spiegel, mit denen der Einfallswinkel des Anregungslichts auf die verspiegelten Flächen variiert werden kann, um das Lichtblatt parallel zu stellen.

Anstelle trichterförmige Strukturen auf eine ebene Oberfläche des Probenträgers 3 aufzusetzen,
35 kann auch der Probenträger 3 mindestens eine Vertiefung aufweisen, die bevorzugt trichterförmig ausgestaltet ist. Für die Formvariationen dieser Vertiefungen gilt das für die trichterförmigen Strukturen oben erwähnte analog. In eine solche Vertiefung ist dann mindestens eine Seitenwand eingearbeitet, diese mindestens eine Seitenwand entspricht der optisch wirksamen

Fläche. Für die inverse Beobachtung übernimmt diese optische wirksame Fläche dann die Funktion der Prismenfläche, das Licht durch den Probenträger 3 geleitet. Im Falle der Beleuchtung und Detektion von oberhalb der Probe können die Seitenwände verspiegelt sein. Die Hütchen ebenso wie die Vertiefungen können dabei verschiedene Querschnittsformen aufweisen, beispielsweise können sie rund oder quadratisch geformt sein. Probenträger mit trichterförmigen Vertiefungen sind insbesondere geeignet, um das Aufwachsen einzelner Zellen zu untersuchen, da diese dann auf einen relativ engen Raum, nämlich die trichterförmige Vertiefung, beschränkt bleiben. Alternativ oder in Ergänzung ist es auch möglich, eine Vielzahl von optischen Umlenkmitteln auf dem Probenträger 3 anzuordnen, beispielsweise in Form eines Rasters. Eine solche Variante ist in Figur 4b) gezeigt, hier sind eine Vielzahl von optischen Umlenkmitteln in Form von Prismenelementen 22 und 23 angeordnet, zwischen diesen befinden sich zähförmige Proben 1. Die Prismenelemente 22 sind inaktiv und nur das Prismenelement 23, gekennzeichnet durch das Kreuz, ist aktiv, wird also beleuchtet, um mit Hilfe dieses Prismenelements 23 ein Lichtblatt zu erzeugen und die diesem Prismenelement 23 benachbarte Probe zu untersuchen. Die optischen Umlenkmittel müssen dabei nicht von vornherein auf dem Probenträger 3 angeordnet sein, in der in Figur 4c) gezeigten Ausgestaltung sind die optischen Umlenkmittel – hier wieder als Spiegelemente 19 ausgebildet – relativ zum Probenträger entlang der optischen Achse von unten in entsprechende Öffnungen des Probenträgers einbringbar. Dies ist durch die senkrechten Pfeile angedeutet. Dabei kann beim Probenträger 3 eine Siebstruktur vorgegeben sein, es ist aber auch denkbar, dass die Öffnungen für die optischen Umlenkmittel erst durch diese selbst beim Einbringen gestanzt werden.

In Figur 4d) schließlich ist die Verwendung eines Prismenelements 23 gezeigt, bei dem die optische wirksame Fläche aus Mikroprismen gebildet wird. Auf diese Weise tritt die reflektierende Oberfläche nicht direkt in Kontakt mit der umgebenden Flüssigkeit, die Oberfläche wird nicht verunreinigt.

Eine weitere (?) Ausgestaltung des mindestens einen optischen Umlenkmittels mit einer optisch wirksamen Fläche als (?) Mikroprismen ist in Fig. 5 a)-c) gezeigt. Während die in Fig. 4b) und Fig. 4d) gezeigten optischen Umlenkmittel 22, 23 Mikroprismen aufweisen, deren Flächen verspiegelt sind, kann auf eine solche Verspiegelung bei den in Fig. 5 gezeigten Anordnungen verzichtet werden, da hier das Prinzip der Totalreflexion ausgenutzt wird, was in äquivalenter Weise zu einer Verspiegelung der Flächen wirkt, sofern die entsprechenden Randbedingungen erfüllt sind. Dabei müssen die optisch wirksamen Flächen auch nicht notwendig als Mikroprismen ausgestaltet sein, auch mit glatten Flächen lassen sich die für das Eintreten von Totalreflexion notwendigen Bedingungen einstellen.

Überwiegend werden Proben, insbesondere Zellen, in einer wässrigen Lösung untersucht, so dass sich die Verwendung von optischen Umlenkmitteln, deren optisch wirksame Flächen in der für verspiegelte Flächen vorteilhaften Ausgestaltung einen Winkel von 45° mit der optischen Achse Z einschließen, aufgrund des Verhältnisses der Brechungsindizes – für Wasser 1,33 und
5 für Glas oder Kunststoff beispielsweise 1,52 – nicht ohne weiteres verwenden lassen. Vielmehr muss der Winkel bei etwa 60° liegen, um die Totalreflexion an der Wasser/Glas-Grenzfläche auszunutzen. In Fig. 5a) – c) sind drei Möglichkeiten gezeigt, wie unter solchen Bedingungen optische Umlenkmittel, die mit dem Prinzip der Totalreflexion arbeiten, gestaltet werden können.

10 Fig. 5a) zeigt ein Prismenelement 25, bei der die optisch wirksame Fläche mit der optischen Achse Z im Mittel einen Winkel von 45° einschließt, die Mikroprismen bzw. die optisch wirksame Fläche sind/ist allerdings nicht verspiegelt. Der Strahl des Anregungslichts tritt hier jedoch nicht parallel zur optischen Achse in das optische Umlenkmittel ein, wie bei den vorangehend be-
15 schriebenen Beispielen, sondern schließt mit der optischen Achse einen von Null verschiedenen Winkel ein, so dass an der optisch wirksamen Fläche die Bedingungen für Totalreflexion erfüllt sind.

Bei der in Fig. 5a) gezeigten Ausführung wird allerdings die numerische Apertur des Anregungslichts beeinträchtigt gegenüber einer Ausgestaltung mit senkrechtem Lichteinfall. In Fig.
20 5b) ist daher eine andere Ausführung gezeigt, bei der der Lichteinfall weiterhin senkrecht erfolgen kann, wobei jedoch besonders ausgestaltete Prismenelemente 26 verwendet werden müssen, bei denen die Umlenkung unter flacheren Winkel erfolgt und die mit mehreren optisch wirksamen Flächen versehen sind.

25 Bei der in Fig. 5c) gezeigten Ausgestaltung schließlich wird der Strahl des Anregungslichts ebenfalls unter einem von Null verschiedenen Winkel zur optischen Achse Z in ein Prismenelement 27 gelenkt. An einer ersten optisch wirksamen Fläche, die auf Mikroprismen basiert, wird das Anregungslicht totalreflektiert, an einer zweiten optisch wirksamen Fläche gebrochen, so dass im Endeffekt wieder ein Lichtblatt erzeugt wird, welches mit der optischen Achse Z annä-
30 hernd einen rechten Winkel einschließt.

Die vorangehend beschriebene Vorrichtung verwendet für die Erzeugung des Lichtblattes und die Detektion ein und dasselbe Objektiv, was eine wesentliche Voraussetzung ist für die Integration in bestehende Mikroskope. Durch die Entkopplung der optischen Umlenkmittel vom Ob-
35 jektiv 7 und die Ankopplung an die Probenträger 3 lässt sich zudem ohne größeren Aufwand ein Lichtblatt erzeugen, dass in einer Ebene senkrecht zur Detektionsrichtung Z liegt. Die Ausgestaltungen der optischen Umlenkmittel erlauben vorteilhaft insbesondere die Analyse sehr kleiner und kleinster Proben von der Größe einzelner Zellen. Eine Kombination mit Laser-Scanning-

Verfahren, PALM-Verfahren oder auch mit zahlreichen anderer Verfahren ist möglich. Mittels einer Verschiebung des Probenträgers 3 in der Tischebene oder der Abtastebene des Lichtblatts lassen sich auf einfache Weise Bildstapel der Probe aus verschiedenen Schnitten in Z-Richtung generieren.

Bezugszeichenliste

	1	Probe
5	2	Detektionseinrichtung
	3	Probenträger
	4	Anregungsstrahlengang
	5	Detektionsstrahlengang
	6	Kamera
10	7	Objektiv
	8	Strahlteiler
	9	Laser
	10, 11	Scannerspiegel
	12	Strahlteiler
15	13	Pinhole
	14	Detektor
	15, 16	Tubuslinse
	17	Kollimationsoptik
	18	Zoomoptik
20	19	Spiegelement
	20	Spiegelfläche
	21	Hütchen
	22	inaktives Prismenelement
	23	aktives Prismenelement
25	24	Strahlformungselement

Patentansprüche

- 5 1. Mikroskop, umfassend
- einen Probentisch mit einer Tischfläche in einer Tisebene, die mit einer optischen Achse (Z) einen von Null verschiedenen Winkel einschließt, auf dem auf einem Probenträger (3) eine Probe (1) gelagert ist,
 - einen Anregungsstrahlengang, über den die Probe (1) mit Anregungslicht beleuchtet
 - 10 wird,
 - einen Detektionsstrahlengang (5), über den von der Probe (1) kommendes Detektionslicht auf Detektionsmittel gelenkt wird,
 - ein entlang der optischen Achse (Z) angeordnetes Objektiv, durch welches Anregungslicht in Richtung des Probenträgers (3) und von der Probe (1) kommendes Detektionslicht
 - 15 in Richtung der Detektionsmittel geleitet wird,
 - Strahlteilungsmittel zur Trennung von Anregungslicht und Detektionslicht,
 - Mittel zur Erzeugung eines Lichtblatts aus Anregungslicht,
 - Mittel zur Beleuchtung der Probe (1) mit diesem Lichtblatt, wobei das Lichtblatt in einer Ebene liegt, die mit der optischen Achse (Z) einen von Null verschiedenen Winkel ein-
 - 20 schließt, **dadurch gekennzeichnet**, dass
 - die Mittel zur Beleuchtung der Probe mindestens ein optisches Ulenkmittel umfassen, welches auf oder am Probenträger (3) angeordnet ist und vom Objektiv (7) kommendes Anregungslicht mittels mindestens einer optisch wirksamen Fläche in die Ebene des Lichtblatts umlenkend ausgestaltet ist.
 - 25
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das mindestens eine optische Ulenkmittel das Anregungslicht an mindestens einer optisch wirksamen Fläche in ein Lichtblatt, welches in einer Ebene liegt, die mit der optischen Achse (Z) einen von Null verschiedenen, bevorzugt rechten Winkel einschließt, umlenkend ausgebildet ist.
- 30
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das mindestens eine optische Ulenkmittel als Spiegelement (19) mit mindestens einer als Spiegelfläche (20) ausgebildeten optisch wirksamen Fläche ausgestaltet ist, wobei bevorzugt die mindestens eine Spiegelfläche (20) mit der optischen Achse (Z) einen Winkel von 45° einschließt.
- 35
4. Mikroskop nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das mindestens eine optische Ulenkmittel als Prismenelement (22, 23) mit einer als Innenseite eines Pris-

mas ausgebildeten optisch wirksamen Fläche ausgestaltet ist, wobei bevorzugt die optisch wirksame Fläche mit der optischen Achse (Z) einen Winkel von 45° einschließt.

- 5 5. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die mindestens eine optisch wirksame Fläche aus einer Vielzahl von Mikroprismen zusammengesetzt ist, wobei die optisch wirksame Fläche im Mittel mit der optischen Achse (Z) bevorzugt einen Winkel von 45° einschließt.
- 10 6. Mikroskop nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die optisch wirksame Fläche trichterförmig ausgebildet ist, so dass sie die Probe mindestens teilweise umschließt.
- 15 7. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 6 dadurch gekennzeichnet, dass auf dem Probenträger (3) eine Vielzahl von optischen Umlenkmitteln angeordnet sind, bevorzugt in Form eines Rasters.
- 20 8. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das mindestens eine optische Umlenkmittel relativ zum Probenträger (3) von unten oder oben in entsprechende Öffnungen des Probenträgers (3) einbringbar ist.
- 25 9. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das mindestens eine optische Umlenkmittel auf den Probenträger oder auf den Probentisch aufsetzbar ausgebildet ist, bevorzugt in Form einer Struktur zur Umschließung der Probe mit einer trichterförmigen, optisch wirksamen Fläche.
- 30 10. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass das mindestens eine optische Umlenkmittel lösbar mit einer Schutzvorrichtung zum Schutz des Umlenkmittels bei der Kultivierung von Proben und / oder beim Transport ausgestattet ist.
- 35 11. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass in den Probenträger (3) mindestens eine, bevorzugt trichterförmige Vertiefung mit mindestens einer Seitenwand eingearbeitet ist, wobei die mindestens eine Seitenwand der optisch wirksamen Fläche entspricht.
12. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass zur Justierung des Lichtblattes im Strahlengang Justiermittel, bevorzugt umfassend eine Wackelplatte, angeordnet sind.

13. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Mikroskop als Laser-Scanning-Mikroskop ausgebildet ist, und das Lichtblatt durch Abtastmittel zur Punktabtastung, bevorzugt umfassend mindestens einen Scannerspiegel (10, 11), erzeugbar ist.

5

14. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass im Anregungsstrahlengang (4) eine Zoomoptik (18) zur Variation der Lichtblattdicke und / oder ein Strahlformungselement (24) zur Variation der Lichtblattform und/oder -struktur angeordnet ist.

10

15. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass im Anregungsstrahlengang eine Kollimationsoptik (17) zur Positionierung des Fokus des Lichtblattes relativ zur optischen Achse (Z) angeordnet ist.

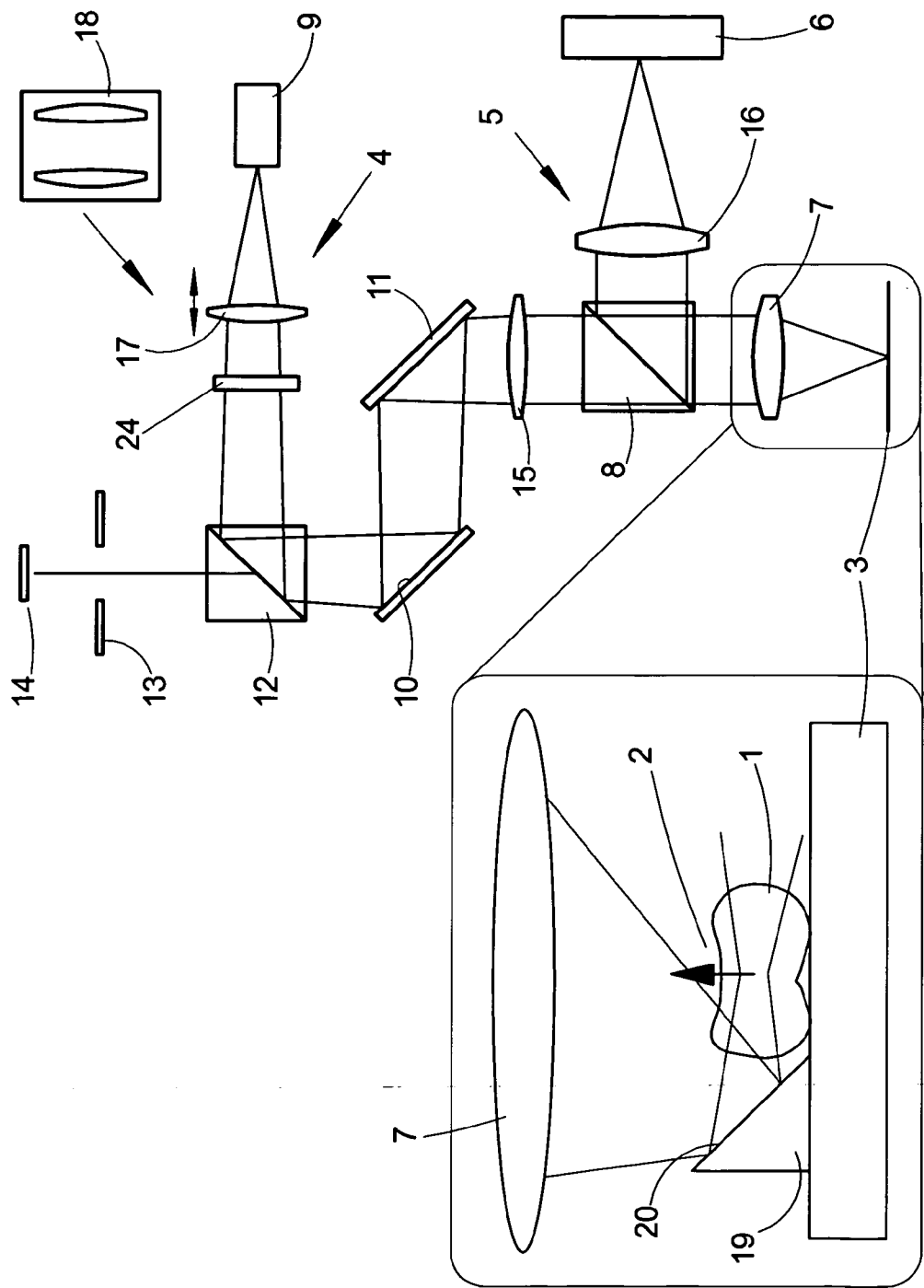


Fig.1

2/4

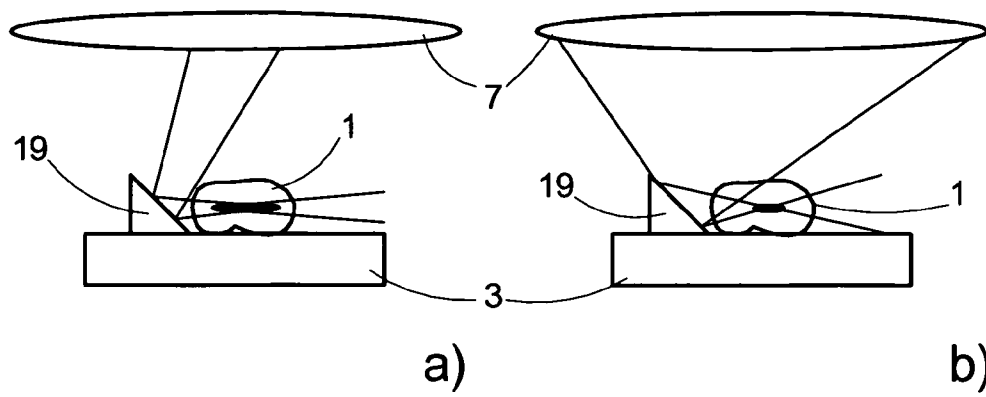


Fig.2

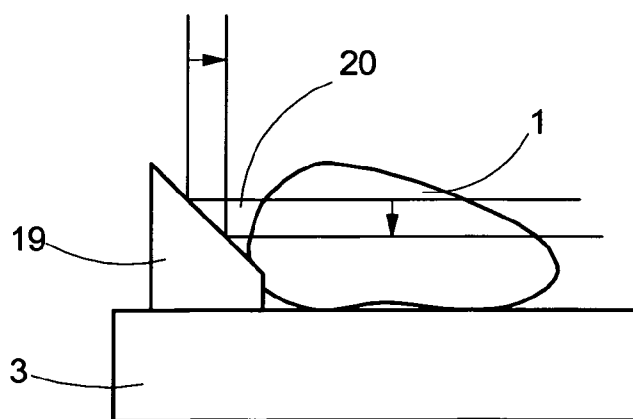


Fig.3

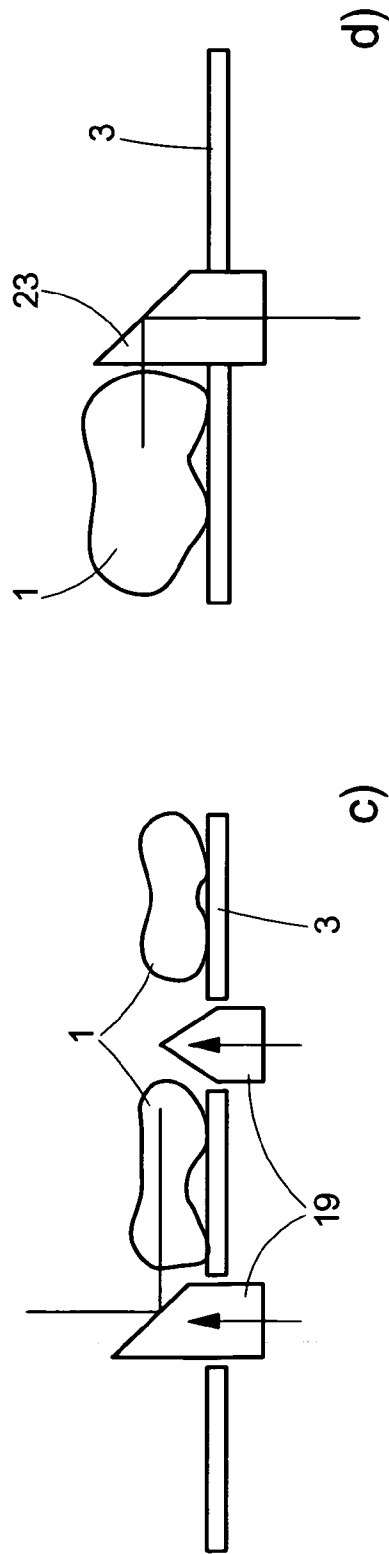
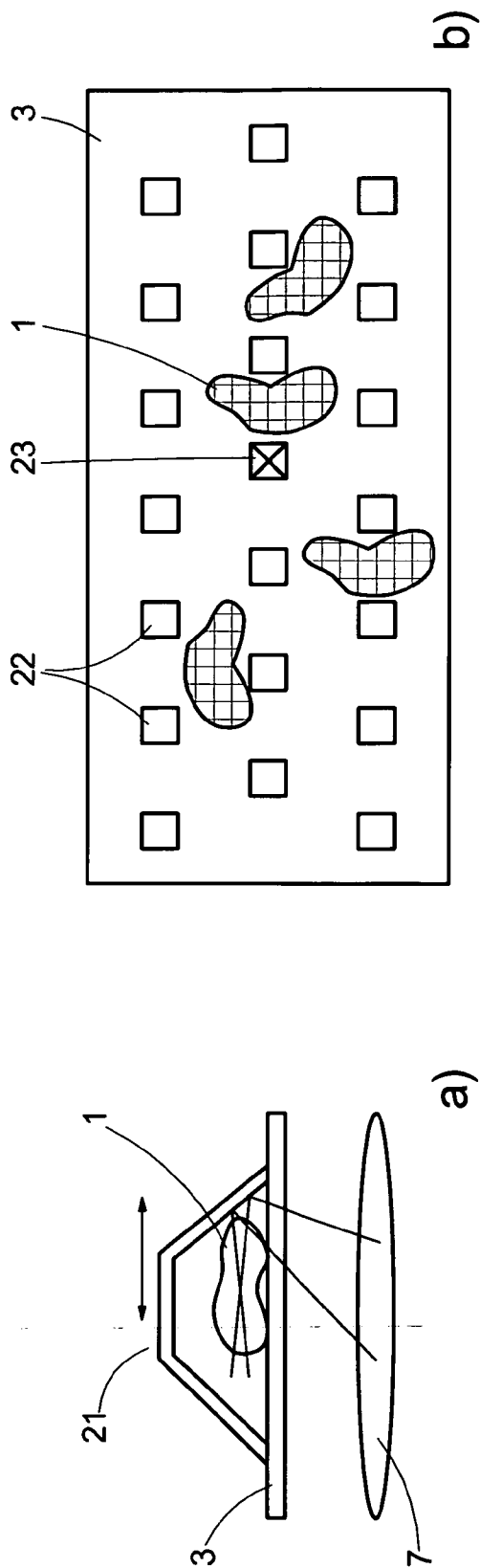


Fig.4

4/4

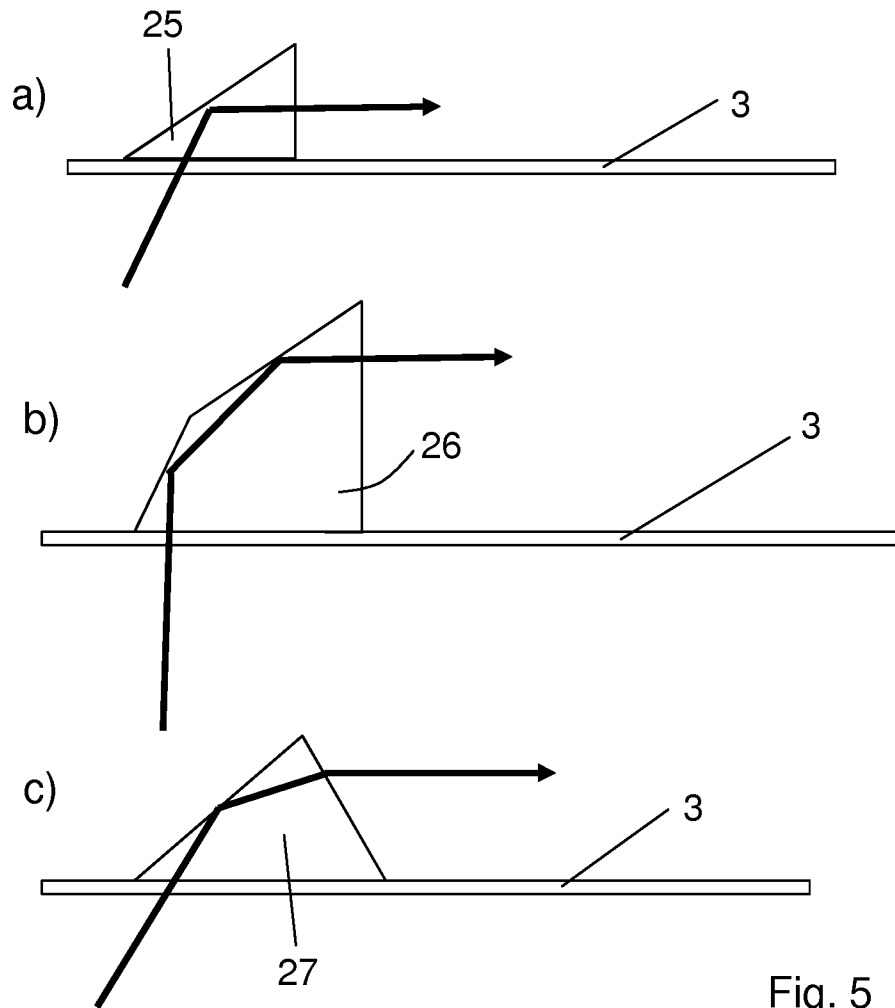


Fig. 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/061999

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. G02B21/06 G02B21/16 G02B21/36
 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

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.
Y	EP 1 617 274 A1 (ZEISS CARL JENA GMBH [DE]) 18 January 2006 (2006-01-18) figures 1, 2 paragraph [0001] - paragraph [0015] -----	1-15
Y	US 2003/076587 A1 (STELZER ERNST H K [DE] ET AL) 24 April 2003 (2003-04-24) figures 2, 3 paragraph [0007] - paragraph [0024] -----	1-15
Y	DE 198 34 279 A1 (EUROP LAB MOLEKULARBIOLOG [DE]) 2 March 2000 (2000-03-02) the whole document ----- -/-	1-15



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

6 August 2013

Date of mailing of the international search report

14/08/2013

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/EP2013/061999

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DE 196 32 040 A1 (EUROP LAB MOLEKULARBIOLOG [DE]) 19 February 1998 (1998-02-19) the whole document	1-15
A	----- KUMAR SUNIL ET AL: "Optically sectioned imaging by oblique plane microscopy", THREE-DIMENSIONAL AND MULTIDIMENSIONAL MICROSCOPY: IMAGE ACQUISITION AND PROCESSING XVIII, SPIE, 1000 20TH ST. BELLINGHAM WA 98225-6705 USA, vol. 7904, no. 1, 10 February 2011 (2011-02-10), pages 1-4, XP060007356, DOI: 10.1117/12.873471 [retrieved on 2011-02-28] the whole document -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/061999

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1617274	A1	18-01-2006	AT 366948 T 15-08-2007
		DE 102004034958 A1	09-02-2006
		EP 1617274 A1	18-01-2006
		GB 2416404 A	25-01-2006
		JP 4970747 B2	11-07-2012
		JP 2006030991 A	02-02-2006
		US 2006012855 A1	19-01-2006
		US 2008030850 A1	07-02-2008

US 2003076587	A1	24-04-2003	NONE

DE 19834279	A1	02-03-2000	DE 19834279 A1 02-03-2000
		EP 1019769 A1	19-07-2000
		HK 1031766 A1	29-07-2005
		JP 2002521733 A	16-07-2002
		WO 0007056 A1	10-02-2000

DE 19632040	A1	19-02-1998	DE 19632040 A1 19-02-1998
		DE 59711339 D1	01-04-2004
		EP 0859968 A1	26-08-1998
		JP 4069959 B2	02-04-2008
		JP 2000509842 A	02-08-2000
		US 6064518 A	16-05-2000
		WO 9807059 A1	19-02-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2013/061999

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. G02B21/06 G02B21/16 G02B21/36 ADD.		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) G02B		
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.
Y	EP 1 617 274 A1 (ZEISS CARL JENA GMBH [DE]) 18. Januar 2006 (2006-01-18) Abbildungen 1, 2 Absatz [0001] - Absatz [0015] -----	1-15
Y	US 2003/076587 A1 (STELZER ERNST H K [DE] ET AL) 24. April 2003 (2003-04-24) Abbildungen 2, 3 Absatz [0007] - Absatz [0024] -----	1-15
Y	DE 198 34 279 A1 (EUROP LAB MOLEKULARBIOLOG [DE]) 2. März 2000 (2000-03-02) das ganze Dokument -----	1-15
-/-		
☒ 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		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
6. August 2013		14/08/2013
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.
Y	DE 196 32 040 A1 (EUROP LAB MOLEKULARBIOLOG [DE]) 19. Februar 1998 (1998-02-19) das ganze Dokument	1-15
A	----- KUMAR SUNIL ET AL: "Optically sectioned imaging by oblique plane microscopy", THREE-DIMENSIONAL AND MULTIDIMENSIONAL MICROSCOPY: IMAGE ACQUISITION AND PROCESSING XVIII, SPIE, 1000 20TH ST. BELLINGHAM WA 98225-6705 USA, Bd. 7904, Nr. 1, 10. Februar 2011 (2011-02-10), Seiten 1-4, XP060007356, DOI: 10.1117/12.873471 [gefunden am 2011-02-28] das ganze Dokument -----	1-15

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2013/061999

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 1617274	A1	18-01-2006	AT 366948 T 15-08-2007
		DE 102004034958 A1	09-02-2006
		EP 1617274 A1	18-01-2006
		GB 2416404 A	25-01-2006
		JP 4970747 B2	11-07-2012
		JP 2006030991 A	02-02-2006
		US 2006012855 A1	19-01-2006
		US 2008030850 A1	07-02-2008

US 2003076587	A1	24-04-2003	KEINE

DE 19834279	A1	02-03-2000	DE 19834279 A1 02-03-2000
		EP 1019769 A1	19-07-2000
		HK 1031766 A1	29-07-2005
		JP 2002521733 A	16-07-2002
		WO 0007056 A1	10-02-2000

DE 19632040	A1	19-02-1998	DE 19632040 A1 19-02-1998
		DE 59711339 D1	01-04-2004
		EP 0859968 A1	26-08-1998
		JP 4069959 B2	02-04-2008
		JP 2000509842 A	02-08-2000
		US 6064518 A	16-05-2000
		WO 9807059 A1	19-02-1998
