

(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  
29. Juni 2023 (29.06.2023)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2023/117236 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation:  
G02B 21/00 (2006.01) G02B 21/18 (2006.01)  
G02B 21/36 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2022/082544

(22) Internationales Anmeldedatum:  
21. November 2022 (21.11.2022)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
10 2021 134 427.1  
22. Dezember 2021 (22.12.2021) DE

(71) Anmelder: **CARL ZEISS MICROSCOPY GMBH**  
[DE/DE]; Carl-Zeiss-Promenade 10, 7745 Jena (DE).

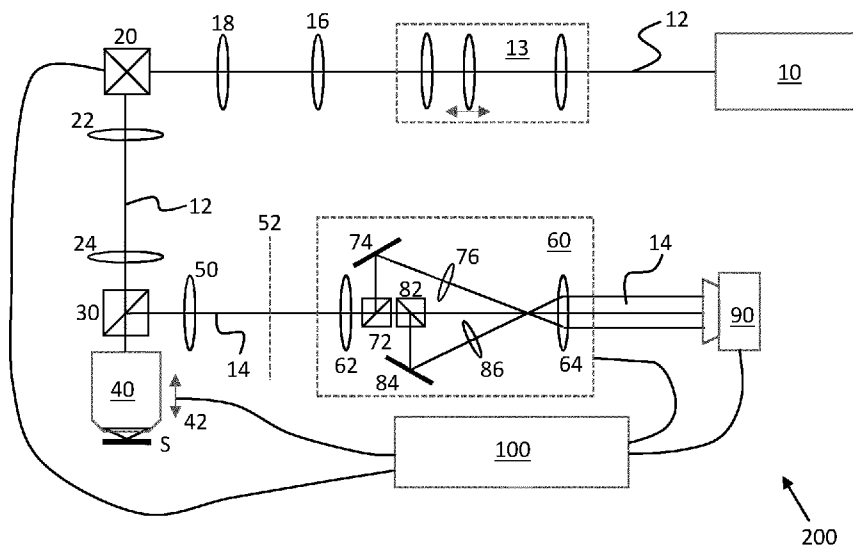
(72) Erfinder: **ANHUT, Tiemo**; Carl-Zeiss-Promenade 10, 7745 Jena (DE). **SCHWEDT, Daniel**; Carl-Zeiss-Promenade 10, 7745 Jena (DE). **WALD, Matthias**; Hinter dem Spielberge 1, 7751 Jena (DE).

(74) Anwalt: **SCHIFFER, Axel Martin**; Rundfunkplatz 2, 80335 München (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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV,

(54) Title: MICROSCOPE AND METHOD FOR MICROSCOPY

(54) Bezeichnung: MIKROSKOP UND VERFAHREN ZUR MIKROSKOPIE



**Fig. 1**

(57) Abstract: The invention relates to a microscope having: an illumination beam path with an illumination control device for illuminating a specimen; a detection beam path for directing radiated emission light toward a camera and having a control unit for controlling the illumination control device and the camera, wherein the control unit is designed to synchronise regions to be read of a sensor surface of the camera with a position of the excitation light, which position is defined by the illumination control device; and having an image splitter unit in the detection beam path for splitting the emission light into a plurality of partial beam paths which each produce a partial image of the specimen on the sensor surface of the camera, wherein the partial images lie next to one another such that linear regions in the partial images, which regions correspond to a position of the excitation light defined by the illumination control device on or in



**WO 2023/117236 A1**

SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,  
VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, 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, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Erklärungen gemäß Regel 4.17:**

- *Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv)*

**Veröffentlicht:**

- *mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)*

---

the sample, lie on the same line or the same lines of the sensor surface.

**(57) Zusammenfassung:** Mikroskop mit einem Beleuchtungsstrahlengang mit einer Beleuchtungssteuerungseinrichtung zum Beleuchten einer Probe, mit einem Detektionsstrahlengang zum Leiten von abgestrahltem Emissionslicht zu einer Kamera und mit einer Steuereinheit zum Ansteuern der Beleuchtungssteuerungseinrichtung und der Kamera, wobei die Steuereinheit dazu eingerichtet ist, auszu-lesende Bereiche einer Sensorfläche der Kamera mit einer durch die Beleuchtungssteuerungseinrichtung definierten Position des Anregungslichts zu synchronisieren, mit einer Bildteilereinheit im Detektionsstrahlengang zum Aufteilen des Emissionslichts in mehrere Teilstrahlengänge, die jeweils ein Teilbild der Probe auf der Sensorfläche der Kamera erzeugen, wobei die Teilbilder dergestalt nebeneinander liegen, dass linienförmige Bereiche in den Teilbildern, die einer durch die Beleuchtungssteuerungseinrichtung definierten Position des Anregungslichts auf oder in der Probe entsprechen, auf derselben Zeile oder denselben Zeilen der Sensorfläche liegen.

## MIKROSKOP UND VERFAHREN ZUR MIKROSKOPIE

Die vorliegende Erfindung betrifft in einem ersten Gesichtspunkt ein Mikroskop nach dem Oberbegriff des Anspruchs 1. Außerdem betrifft die Erfindung ein Verfahren zur  
5 Mikroskopie.

Ein gattungsgemäßes Mikroskop ist beispielsweise bekannt aus US7335898 und weist auf: einen Beleuchtungsstrahlengang mindestens mit einer Beleuchtungssteuerungs-  
einrichtung und einem Beleuchtungsobjektiv zum, insbesondere linienförmigen, Be-  
leuchten und Abtasten einer Probe mit Anregungslicht, einen Detektionsstrahlengang  
10 mindestens mit einem Mikroskopobjektiv zum Leiten von von der Probe abgestrahltem  
Emissionslicht in Richtung einer Kamera, die Kamera zum Aufnehmen von Bildern der  
Probe und eine Steuereinheit zum Ansteuern mindestens der Beleuchtungssteue-  
rungseinrichtung und der Kamera. Die Steuereinheit ist dazu eingerichtet, jeweils aus-  
zulesende Bereiche einer Sensorfläche der Kamera mit einer durch die Beleuchtungs-  
15 steuerungseinrichtung definierten Position des Anregungslichts zu synchronisieren.

In der biomedizinischen Forschung werden zunehmend Prozesse in Zellverbänden, Organen oder ganzen Tieren studiert. Die Untersuchungsobjekte sind somit in der Re-  
gel nicht mehr flache zweidimensionale Objekte auf Glaträgern, sondern dreidimen-  
sionale Objekte, die hochsensitiv mit großer Geschwindigkeit als ganzes Volumen  
20 beobachtet werden sollen. Zur dreidimensionalen mikroskopischen Bildgebung hat  
sich das Laserscanmikroskop (LSM) etabliert, das jedoch die Forderung nach hohen  
Volumenraten nicht erfüllen kann.

Höhere Bildraten lassen sich durch Parallelisierung erreichen. Lösungen hierzu wur-  
den beispielsweise in US7335898 vorgestellt. Darin wird die Probe mit einer linienfö-  
25 rmligen Lichtverteilung abgetastet, die mit dem Rolling Shutter einer CMOS-Kamera  
synchronisiert ist. Der Rolling Shutter wirkt dabei wie eine bewegliche elektronische  
Konfokalblende und ermöglicht damit das vom LSM bekannte optische Schneiden (op-  
tical sectioning) mit entsprechend kontrastreicher Bildgebung. Mit dieser Technologie

- sind zwar schon höhere Bildraten möglich, die Volumenraten bleiben aber auf wenige Volumen pro Sekunde begrenzt. Außerdem bewirkt eine Linienbeleuchtung in einem größeren axialen Probenbereich eine erhöhte Probenbelastung, da die Lichtintensität nur linear mit dem Abstand zur Fokusebene abfällt und nicht quadratisch wie bei der Punktbeleuchtung. Somit bleibt die Strahlungsintensität über einen ausgedehnten axialen Bereich hoch, ohne dass eine Information über die Probe erfasst wird. Dieser bei einer Linienbeleuchtung unvermeidbare Effekt ist insbesondere in Hinsicht auf nichtlineares Bleichen, wie es gerade relevante fluoreszente Proteine zeigen, nachteilig (Sci. Rep. 2015 Oct 20;5:15348. doi: 10.1038/srep15348).
- Um die Probenbelastung zu reduzieren und die Volumenrate gleichzeitig zu vergrößern, wurden zusätzlich in axialer Richtung parallelisierte Mikroskopsysteme vorgeschlagen (Jean-Marc Tsang et al., Biomed. Opt. Expr. 12, 1339 (2021)). Dabei wird in drei verschiedenen axialen Ebenen ein verspiegelter Spalt angeordnet, um die Emission aus der dazu konjugierten Ebene in Richtung einer Kamera zu reflektieren. Die vorgeschlagene Anordnung ist dahingehend aufwendig, dass die Emission auf die Kamera rescannt werden muss. Es sind somit viele aufeinanderfolgende Abbildungsstufen notwendig, die zu Verlusten und Abbildungsfehlern führen. Außerdem ist diese Anordnung wenig flexibel, da die reflektierenden Elemente, die die Funktion der konfokalen Linienblende übernehmen, ortsfest und unveränderlich in den Strahlengang integriert wurden. Diese Blende muss aber, wie im punktscannenden System auch, an das Objektiv anpassbar sein.
- In der Regel werden Größen von z.B. einer Airyeinheit (AU – Airy unit) als Blendengrößen genutzt. Hierbei ist eine Airyeinheit dadurch definiert, dass man die Punktbildverwaschungsfunktion in der Probe, welche durch die numerische Apertur (NA) des Objektivs bestimmt ist, mit dem entsprechenden Vergrößerungsfaktor, wie er durch das Objektiv und die Tubuslinse gegeben ist, in die Ebene der Blende abbildet. Eine Anpassung wird notwendig, wenn man verschiedene Auflösungsstufen und Bildfeldgrößen einstellen möchte. Bei der von Tsang et al. vorgeschlagenen Lösung werden die Blenden auf die Kamera abgebildet. Bei Oberflächendefekten können so störende Streifen im Bild auftreten.

Sodann sind aus der Weitfeldmikroskopie Ansätze zur sogenannten Bildteilung (Image Splitting) bekannt, die es ermöglichen, mehrere Objektebenen nebeneinander auf einem Kamerasensor anzuordnen (GB2442576B oder Sheng Xiao et al., Optica 7, 1477 (2020)). Insbesondere die Anordnung von Sheng Xiao et al. kann zu Bildartefakten  
5 neigen, da optische Grenzflächen in der Nähe der Bildebenen angeordnet sind. Andere Anordnungen, etwa der in WO13106731A1 beschriebene Aufbau, sind vergleichsweise komplex und erscheinen nicht tauglich für eine Serienproduktion.

Als eine Aufgabe der Erfindung kann angesehen werden, ein Mikroskop und ein Verfahren zur Mikroskopie anzugeben, bei denen bei akzeptabler Lichtbelastung der Proben und akzeptablem apparativem Aufwand hohe Bild- und Volumenraten erreicht werden.  
10

Diese Aufgabe wird durch das Mikroskop mit den Merkmalen des Anspruchs 1 und durch das Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 24 gelöst.

Das Mikroskop der oben angegebenen Art ist erfindungsgemäß dadurch weitergebildet, dass im Detektionsstrahlengang eine Bildteilereinheit vorhanden ist zum Aufteilen  
15 des Emissionslichts in mehrere Teilstrahlengänge, die jeweils ein Teilbild der Probe auf der Sensorfläche der Kamera erzeugen, wobei die Teilbilder auf der Sensorfläche dergestalt nebeneinander liegen, dass linienförmige Bereiche in den Teilbildern, die einer durch die Beleuchtungssteuerungseinrichtung definierten Position des Anregungslichts auf oder in der Probe entsprechen, auf derselben Zeile oder denselben Zeilen  
20 der Sensorfläche liegen.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Mikroskopie werden folgende Schritte durchgeführt: eine Probe wird durch ein Beleuchtungsobjektiv mit Anregungslicht, insbesondere linienförmig, beleuchtet und abgetastet, von der Probe abgestrahltes Emissionslicht wird über ein Mikroskopobjektiv in Richtung einer Kamera geleitet, strahlabwärts von dem Mikroskopobjektiv wird das Emissionslicht in mehrere Teilstrahlengänge aufgeteilt, wobei jeder der Teilstrahlengänge ein Teilbild der Probe auf einer  
25 Sensorfläche der Kamera erzeugt und wobei die Teilbilder der Probe auf der Sensorfläche dergestalt nebeneinander liegen, dass linienförmige Bereiche in den Teilbildern, die einer Position des Anregungslichts auf oder in der Probe entsprechen, auf derselben Zeile oder denselben Zeilen der Sensorfläche liegen, und schließlich werden  
30

auszulesende Bereiche der Sensorfläche der Kamera mit der Position des Anregungslichts auf der Probe synchronisiert.

Das erfindungsgemäße Mikroskop ist zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeignet. Das erfindungsgemäße Verfahren kann insbesondere mit dem erfindungsgemäßen Mikroskop durchgeführt werden.

Bevorzugte Ausgestaltungen des erfindungsgemäßen Mikroskops und vorteilhafte Varianten des erfindungsgemäßen Verfahrens werden im Folgenden, insbesondere im Zusammenhang mit den abhängigen Ansprüchen und den Figuren erläutert.

Das Anregungslicht ist elektromagnetische Strahlung, insbesondere im sichtbaren Spektralbereich und angrenzenden Bereichen. An das kontrastgebende Prinzip ist für die vorliegende Erfindung nur insoweit eine Anforderung gestellt, als die Probe infolge der Bestrahlung mit dem Anregungslicht Emissionslicht abstrahlt. Typischerweise ist das Emissionslicht Fluoreszenzlicht, welches die Probe, insbesondere dort vorhandene Farbstoffmoleküle, infolge der Bestrahlung mit dem Anregungslicht abstrahlt oder abstrahlen.

Mit dem Begriff des Beleuchtungsstrahlengangs werden alle optischen strahlführenden und strahlverändernden Komponenten bezeichnet, beispielsweise Linsen, Spiegel, Prismen, Gitter, Filter, Blenden, Strahlteiler, mit denen und über welche das Anregungslicht von einer Lichtquelle, beispielsweise einem Laser, bis auf die zu untersuchende Probe geleitet wird. Der Beleuchtungsstrahlengang beinhaltet mindestens die Beleuchtungssteuerungseinrichtung, beispielsweise einen Scanner mit mindestens einem galvanometrischen Spiegel, und ein Beleuchtungsobjektiv. Das Beleuchtungsobjektiv kann ein Mikroskopobjektiv grundsätzlich bekannter Natur sein. Der Beleuchtungsstrahlengang kann durch den Beleuchtungsstrahlengang eines Laserscanmikroskops verwirklicht sein.

Von der zu untersuchenden Probe infolge der Bestrahlung mit dem Anregungslicht ausgesandtes Licht wird als Emissionslicht bezeichnet und gelangt über den Detektionsstrahlengang auf die Kamera. Mit dem Begriff des Detektionsstrahlengangs werden alle strahlführenden und strahlverändernden optischen Komponenten, beispielsweise Linsen, Spiegel, Prismen, Gitter, Filter, Blenden, Strahlteiler, bezeichnet, mit

denen und über welche das Emissionslicht von der zu untersuchenden Probe bis auf die Kamera geleitet wird. Die Kamera ist ein hinreichend schneller optischer Detektor mit einer zweidimensional ortsauflösenden Sensorfläche, deren Pixel mindestens zeilenweise, insbesondere zeilenweise, schnell ausgelesen werden können.

5 Mit dem Begriff der Steuereinheit werden alle Hardware- und Softwarekomponenten bezeichnet, die mit den Komponenten des erfindungsgemäßen Mikroskops zu dessen bestimmungsgemäßer Funktion zusammenwirken. Insbesondere kann die Steuereinheit eine Recheneinrichtung, beispielsweise einen PC, und eine Kamerasteuerung aufweisen, die zum schnellen Auslesen von Messsignalen, insbesondere von Zeilen der  
10 Sensorfläche, in der Lage ist. Erfindungsgemäß ist die Steuereinheit dazu eingerichtet, jeweils auszulesende Bereiche einer Sensorfläche der Kamera, insbesondere Zeilen der Sensorfläche, mit einer durch die Beleuchtungssteuerungseinrichtung, beispielsweise den Scanner, genauer gesagt durch die Stellung des Scanners, definierten Position des Anregungslichts auf oder in der Probe zu synchronisieren. Die Steuereinheit  
15 kann auch eingerichtet sein zum Auswerten der von der Kamera gelieferten Bilddaten,

Mit dem Begriff der Bildteilereinheit werden alle strahlführenden und strahlverändernden optischen Komponenten bezeichnet, beispielsweise Linsen, Spiegel, Prismen, Gitter, Filter, Blenden, Strahlteiler, mit denen und über welche das Emissionslicht in die mindestens zwei Teilbilder auf die Sensorfläche der Kamera geleitet wird.

20 Die Kamera kann beispielsweise eine CMOS- oder sCMOS-Kamera mit Rolling-Shutter-Elektronik sein. Der Rolling Shutter ist zweckmäßig mit der Scangeschwindigkeit der Linienbeleuchtung synchronisiert. Die ausgelesenen Kamerapixel sind also zu einer Momentanposition des Linienfokus auf der Probe optisch konjugiert. Ebenso kann eine SPAD-Kamera eingesetzt werden, deren Auslesematrix dynamisch einstellbar ist,  
25 so dass eine Synchronisierung mit dem Vorschub des Linienfokus möglich wird. Beispielsweise kann eine Kamera vom Typ "pco.edge 10 bi CLHS" der Firma Excelitas PCO GmbH, 93309 Kelheim, Deutschland verwendet werden.

Für Fluoreszenz-Mikroskopie mit mehreren Farbstoffen kann auch bevorzugt sein, wenn die Kamera eine farbauflösende Kamera ist. Beispielsweise kann die Kamera  
30 einen Bayerfilter aufweisen.

Höhere Grade der Parallelisierung der Bildaufnahme und damit höhere Bild- und Volumenraten sind möglich, wenn die Kamera zum schnellen zusammenhängenden Auslesen von mehr als einem Bereich, insbesondere mehr als einer Zeile, eingerichtet ist. Beispielsweise kann die Kamera mehrere Rolling-Shutter-Blenden aufweisen. Im Sinn  
5 der Erfindung kann auch eine solche Kamera zum Einsatz kommen, indem man erfindungsgemäße Verfahren auf die dann vorliegende Situation sowohl in der Beleuchtung als auch in der Detektion anpasst. Konkret wird dann für jeden zur Verfügung stehenden auszulesenden Bereich eine entsprechende Beleuchtung der Probe bereitgestellt. Beispielsweise kann die Probe bei Verwendung einer Kamera mit mehreren Rolling-  
10 Shutter-Blenden gleichzeitig mit mehreren Beleuchtungslinien beleuchtet werden, die mit der Beleuchtungssteuerungseinrichtung, insbesondere einem Scanner, über die Probe geführt werden.

Zum Aufnehmen oder Halten der Probe kann das Mikroskop eine Probenhalterung grundsätzlich bekannter Art aufweisen.

15 Das Beleuchtungsobjektiv und das Mikroskopobjektiv können separate Objektive sein, etwa bei einer Durchlichtbeleuchtung. Es ist aber auch möglich, dass das Beleuchtungsobjektiv und das Mikroskopobjektiv ein und dasselbe Objektiv ist. Zum Trennen des Emissionslichts von Anteilen des Anregungslichts in dem von der Probe insgesamt zurückgestrahlten Licht kann dann zweckmäßig ein Hauptfarbteiler vorhanden sein.  
20 Gegebenenfalls können mehrere, insbesondere manuell oder durch die Steuerung austauschbare, Mikroskopobjektive, angeordnet beispielsweise auf einem Revolver oder einem Linearschieber, vorhanden sein.

Zum Bereitstellen des Anregungslichts kann mindestens eine Lichtquelle, insbesondere ein Laser, vorhanden sein. Die spektrale Zusammensetzung des Anregungslichts  
25 kann, insbesondere zwischen zwei oder mehr Farben, einstellbar sein. Das Anregungslicht kann auch simultan polychromatisch sein, beispielsweise wenn gleichzeitig unterschiedliche Farbstoffe nachgewiesen werden sollen. Der Hauptfarbteiler kann für diese oder andere Anwendungen ein Doppelbandpass-Filter oder Mehrfachbandpass-Filter sein.

In grundsätzlich bekannter Weise kann im Beleuchtungsstrahlengang ein Linsensystem zum Abbilden des Scanners oder der Scanner in eine hintere Brennebene des Beleuchtungsobjektivs vorhanden sein.

5 Als eine wesentliche Idee der vorliegenden Erfindung kann zunächst angesehen werden, das von der Probe abgestrahlte und die zu extrahierende mikroskopische Information enthaltende Emissionslicht, in mehrere Teilstrahlenbündel aufzuteilen, die so-  
dann jeweils Teilbilder der Probe in der Ebene der Sensorfläche generieren. Eine wei-  
tere wesentliche Idee der vorliegenden Erfindung ist, die Teilbilder so auf der Sensor-  
fläche der Kamera zu positionieren, dass das schnelle Auslesen, insbesondere der  
10 Pixel einer Zeile, für alle Teilbilder gleichzeitig genutzt werden kann.

Beispielsweise kann die Bildteilereinheit auf die Sensorfläche einer Kamera drei Teil-  
bilder der Probe aus unterschiedlichen Tiefen nebeneinander so ablegen, dass für alle  
Teilbilder die Position des Linienfokus auf dieselben Sensorzeilen fällt. In dem Fall,  
dass die Ausbreitungsrichtung der Linie parallel zur optischen Achse des Mikroskopob-  
15 jektivs ist oder mit dieser zusammenfällt, werden auf der Kamera Bilder abgelegt, die  
z.B. drei Ebenen der Probe entsprechen, die lateral den gleichen Bereich überdecken.  
Bei einer Inklination der Propagationsrichtung der Linienbeleuchtung wären die Bilder  
lateral gegeneinander versetzt. Entscheidend ist, dass die einstellbare elektronische  
Detektionsblende der Kamera mit dem durch die Linie in der jeweiligen Ebene beleuch-  
20 teten Bereich im Wesentlichen zusammenfällt.

Mit der vorliegenden Erfindung werden ein Mikroskop und ein Verfahren zur Mikrosko-  
pie bereitgestellt, bei denen die in die Probe eingetragene Energie, insbesondere auf-  
grund axialer Mehrfachabtastung, effektiver zur Bildgebung genutzt wird. Die effektive  
Bestrahlungsdauer der Probe wird dadurch verkürzt und bei gleicher Gesamtstrah-  
25 lungslast können höhere Bild- und Volumenraten erreicht werden. Der gerätetechni-  
sche Aufwand bleibt dabei im Rahmen. Insbesondere können vorhandene Mikroskope  
mit den zur Verwirklichung der Erfindung notwendigen Komponenten nachgerüstet  
werden. Gegebenenfalls kann die Detektionsoptik an eine konkrete zu untersuchende  
Probe und an eine konkrete Messaufgabe angepasst werden.

30 Bei dem erfindungsgemäßen Mikroskop und dem erfindungsgemäßen Verfahren kön-  
nen die linienförmigen Bereiche in den Teilbildern, die auf der Sensorfläche

nebeneinander liegen, insbesondere optisch konjugiert sein zu den linienförmig beleuchteten Bereichen auf oder in der Probe.

Mit optisch konjugiert ist in diesem Zusammenhang insbesondere gemeint, dass zwischen den optisch konjugierten Flächen oder Flächenbereichen eine durch die Optik  
5 vermittelte Punkt-zu-Punkt-Beziehung besteht. Im konkreten Beispiel besteht also zwischen den Punkten auf oder in den linienförmig beleuchteten Bereichen auf oder in der Probe eine Punkt-zu-Punkt-Beziehung zu Punkten in den linienförmigen Bereichen der Teilbilder. Mit dem Begriff einer durch die Optik vermittelten Punkt-zu-Punkt-Beziehung zwischen einem Punkt im Objektraum (der Probe) und einem Punkt auf der Sensorfläche der Kamera ist gemeint, dass ein von dem Punkt im Objektraum ausgehen-  
10 des Strahlenbündel von der Optik in den Punkt auf der Sensorfläche der Kamera abgebildet wird.

Grundsätzlich wird die Erfindung verwirklicht bei Anordnungen, bei denen ein Abstand zwischen dem Beleuchtungsobjektiv und der Probe manuell verändert und eingestellt  
15 wird. Bei einer vorteilhaften Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Mikroskops ist eine steuerbare Verschiebeeinrichtung zum Ändern eines Abstands zwischen dem Beleuchtungsobjektiv und der Probe vorhanden und die Steuereinheit ist eingerichtet zum Steuern der Verschiebeeinrichtung, insbesondere abgestimmt auf die Ansteuerung der Beleuchtungssteuerungseinrichtung. Mit dieser apparativen Ergänzung können auto-  
20 matisiert Volumenscans durchgeführt werden.

Bevorzugt wird die Probe mit einer linienförmigen Verteilung des Anregungslichts beleuchtet und abgetastet. Vorteilhaft ist dazu im Beleuchtungsstrahlengang zum Erzeugen der linienförmigen Verteilung des Anregungslichts in einer Probenebene eine, insbesondere in den Beleuchtungsstrahlengang einschwenkbare, Zylinderoptik, anamorphotische Optik oder anamorphe Optik, beispielsweise eine Zylinderlinse, vorhanden.  
25 Alternativ oder ergänzend kann im Beleuchtungsstrahlengang zum Erzeugen der linienförmigen Verteilung des Anregungslichts in einer Probenebene eine, insbesondere in den Beleuchtungsstrahlengang einschwenkbare, Powell-Linse vorhanden sein.

Grundsätzlich kann es für viele Anwendungen ausreichend sein, wenn die linienförmige Verteilung des Anregungslichts eine unveränderliche Breite aufweist. Bei einer vorteilhaften Weiterentwicklung des erfindungsgemäßen Mikroskops ist im  
30

Beleuchtungsstrahlengang zum Variieren einer Breite eines Linienfokus in der Probenebene eine, insbesondere in den Beleuchtungsstrahlengang einschwenkbare, zweite Zylinderoptik, beispielsweise eine astigmatische Linse, vorhanden.

5 Grundsätzlich kann es für viele Anwendungen ausreichend sein, wenn die axiale Verteilung des Anregungslichts, also die Intensitätsverteilung des Anregungslichts in der Richtung der optischen Achse eine unveränderliche Breite aufweist. Insbesondere im Hinblick auf Volumenscans kann es aber vorteilhaft sein, wenn im Beleuchtungsstrahlengang optische Mittel, insbesondere Linsen und/oder Blenden, zum Einstellen einer numerischen Apertur und damit einer Fokustiefe oder Schärfentiefe der linienförmigen  
10 Beleuchtung vorhanden sind. Beispielsweise kann zum Einstellen der Fokustiefe der linienförmigen Beleuchtung im Beleuchtungsstrahlengang eine Zoomoptik vorhanden sein. Alternativ oder ergänzend kann zum Einstellen der Fokustiefe der linienförmigen Beleuchtung im Beleuchtungsstrahlengang eine Ablendeinrichtung vorhanden ist.

15 Die Beleuchtungssteuerungseinrichtung dient zum räumlichen Manipulieren oder Positionieren des Anregungslichts auf oder in der Probe. Die Beleuchtungssteuerungseinrichtung kann beispielsweise einen, insbesondere galvanometrischen, Scanner grundsätzlich bekannter Natur aufweisen. Alternativ oder ergänzend kann die Beleuchtungssteuerungseinrichtung ein, insbesondere ansteuerbares und/oder programmierbares, Mikrospiegelarray, DMD, aufweisen.

20 Wenn die Ausdehnung der linienförmigen Verteilung des Anregungslichts in Richtung der Linie größer ist als die Ausdehnung des beobachteten Bildfelds der Teilbilder reicht ein Scanner aus, der die linienförmige Verteilung des Anregungslichts in einer Richtung quer zur Richtung der Linie über oder durch die Probe bewegt. Bei einer weiteren vorteilhaften Ergänzung des erfindungsgemäßen Mikroskops weist die die Beleuchtungssteuerungseinrichtung zum Scannen in einer Richtung parallel zur Linienbeleuchtung  
25 einen zweiten Scanner auf. Dieser Scanner kann insbesondere dazu dienen, die Probe in der Erstreckungsrichtung der Beleuchtungslinie zu scannen und/oder eine Länge der Beleuchtungslinie in der Probe auf einen gewünschten Wert anzupassen.

30 Alternativ oder ergänzend kann in diesem Zusammenhang auch im Beleuchtungsstrahlengang ein Anregungsfilter, beispielsweise in einem Filterwürfel, durch eine

Zylinderlinse ersetzt werden, die dann durchscannt wird. Diese technische Lösung kann ohne Weiteres an jedem Laser-Scanning-Mikroskops nachgerüstet werden.

Die Erfindung wird grundsätzlich verwirklicht, wenn die Bildteilereinheit irgendwo zwischen der Probe und der Kamera angeordnet ist.

- 5 Die Bildteilereinheit kann zum Aufteilen des Emissionslichts grundsätzlich bekannte Komponenten aufweisen. Bei einer Ausgestaltung weist die Bildteilereinheit mindestens eine diffraktive Einrichtung, insbesondere ein Gitter und/oder einen Spatial Light Modulator, zum Aufteilen des Emissionslichts auf. Die diffraktive Einrichtung ist bevorzugt in einer Pupille oder in der Nähe einer Pupille des Detektionsstrahlengangs angeordnet.
- 10

Mit einer Pupillenebene ist die hintere Brennebene des Mikroskopobjektivs, d.h. die auf der anderen Seite als die Probe liegende Brennebene, oder eine zur hinteren Brennebene des Mikroskopobjektivs optisch konjugierte Ebenen gemeint.

- Bei anderen Varianten des erfindungsgemäßen Mikroskops weist die Bildteilereinheit zum Aufteilen des Emissionslichts alternativ oder ergänzend mindestens eine monolithische Komponente auf, bestehend beispielsweise aus geklebten und/oder beschichteten Prismen oder Platten. Solche Komponenten können insbesondere nicht einstellbar sein.
- 15

- Bei vorteilhaften Varianten des erfindungsgemäßen Mikroskops, die insbesondere eine relativ unaufwändige Nachrüstbarkeit an bestehende Mikroskopsysteme erlauben, ist die Bildteilereinheit im Detektionsstrahlengang zwischen einem Zwischenbild strahl-  
abwärts von einer Tubuslinse und der Kamera angeordnet.
- 20

- Die Bildteilereinheit kann beispielsweise so verwirklicht sein, dass das Emissionslicht durch Strahlteiler aufgeteilt wird und sodann mit jeweils separaten optischen Mitteln in beugungsbegrenzte Teilbilder auf die Kamera geleitet wird. Bei einer vorteilhaften Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Mikroskops, weist die Bildteilereinheit ein Relay-Linsensystem mit einer Eintrittslinse und einer Austrittslinse auf, zwischen denen mindestens ein Strahlteiler angeordnet ist. Bei dieser Variante kann mindestens die
- 25

Austrittslinse des Relay-Linsensystems gleichzeitig von mindestens zwei Teilstrahlengängen genutzt werden.

Um Punktverwaschungsfunktionen lateral ausmessen zu können, beispielsweise wenn einzelne Farbstoffmoleküle lokalisiert werden sollen, kann eine Vergrößerung des Relay-Linsensystems der Bildteilereinheit vorteilhaft so gewählt sein, dass der Durchmesser eines Airy-Scheibchens auf der Sensorfläche der Kamera mindestens viermal so groß ist wie ein Abstand von benachbarten Pixeln der Kamera. Dabei wird unter dem Durchmesser des Airy-Scheibchens der Durchmesser des ersten Beugungsminimums, also des ersten dunklen Rings, verstanden.

Äquivalent dazu ist die Forderung, dass die Vergrößerung des Relay-Linsensystems der Bildteilereinheit so gewählt wird, dass die Halbwertsbreite der zu dem Airy-Scheibchen gehörenden Punktbildfunktion auf der Sensorfläche der Kamera mindestens doppelt so groß ist wie ein Abstand von benachbarten Pixeln der Kamera. Unter der Halbwertsbreite der Punktbildfunktion wird dabei der Durchmesser des Bereichs verstanden, an dessen Umrandung die Intensität der Punktbildfunktion auf die Hälfte des Maximums abgefallen ist.

Ein besonderer Vorteil der Erfindung ist, dass Gestaltungsfreiheit besteht betreffend den oder die Parameter, in dem oder in denen sich die Teilbilder unterscheiden. Beispielsweise können die Teilbilder zu axial voneinander beabstandeten Ebenen in der Probe gehören. Für diesen Zweck kann mindestens einer der Strahlteiler, insbesondere mehr als einer oder jeder der Strahlteiler, ein Neutralteiler sein, d.h. die Teilstrahlengänge können in spektraler Hinsicht identisch sein. Bei einer anderen Variante unterscheiden sich die Teilbilder in spektraler Hinsicht. Beispielsweise kann in einem ersten Teilbild im Wesentlichen ein erster und in einem zweiten Teilbild im Wesentlichen ein zweiter Farbstoff sichtbar sein.

Für diesen Zweck kann mindestens einer der Strahlteiler, insbesondere mehr als einer oder jeder der Strahlteiler, ein dichroitischer Strahlteiler sein, d.h. die Teilstrahlengänge können in spektraler Hinsicht unterschiedlich sein. Die Verwendung von zwei- oder mehrfarbigem Anregungslicht kann in diesem Fall sinnvoll sein.

Mischformen dieser Varianten sind grundsätzlich möglich, das heißt, die Teilbilder können sowohl zu axial beabstandeten Probenebenen gehören als auch spektral unterschiedlich sein. In Spezialsituationen kann das von Vorteil sein.

5 In grundsätzlich bekannter Weise kann mindestens einer der Strahlteiler und insbesondere mehr als einer oder jeder der Strahlteiler austauschbar und/oder umschaltbar angeordnet sein, beispielsweise auf einem Linearschieber oder einem Revolver.

Bevorzugt sind die Teilstrahlengänge der Austrittslinse des Relay-Linsensystems so zugeführt, dass die zugehörigen mindestens zwei Teilbilder nebeneinander auf der Sensorfläche der Kamera dergestalt angeordnet sind, dass linienförmige Bereiche in  
10 den Teilbildern, die insbesondere optisch konjugiert sind zu linienförmig beleuchteten Bereichen auf oder in der Probe, auf derselben Zeile oder denselben Zeilen der Sensorfläche liegen.

Eine weitere vorteilhafte Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Mikroskops zeichnet sich dadurch aus, dass in mindestens einem der Teilstrahlengänge der Bildteilereinheit,  
15 bevorzugt in mehreren oder allen Teilstrahlengängen der Bildteilereinheit, insbesondere ansteuerbare, Umlenkelemente, insbesondere Umlenkspiegel, vorhanden sind. Bevorzugt kann dann außerdem die Steuereinheit dazu eingerichtet sein, die ansteuerbaren Umlenkelemente unter Verwendung eines Steuersignals für die Kamera anzusteuern dergestalt, dass eine konfokale Bedingung für alle Bilder der jeweiligen Ebenen durch den konfokalen Auslesebereich erfüllt ist.  
20

Im Zusammenhang mit den einzusetzenden Strahlteilern wurde schon erläutert, dass bei einer Variante der Erfindung die mindestens zwei Teilbilder zu axial versetzten Bereichen der Probe gehören können. Beispielsweise kann bei einer weiteren Variante des erfindungsgemäßen Mikroskops in mindestens einem der Teilstrahlengänge der  
25 Bildteilereinheit bevorzugt in mehreren oder allen Teilstrahlengängen der Bildteilereinheit, eine zusätzliche Linse angeordnet sein. Durch diese Linse oder Linsen können unterschiedliche axiale Lagen der zu den Teilbildern gehörenden Probenebenen erreicht werden.

Besonders vorteilhaft ist außerdem eine Weiterbildung des erfindungsgemäßen Mikroskops, wo ein axialer Abstand der Probenebenen, zu denen die Teilbilder gehören und  
30

die zur Ebene der Sensorfläche optisch konjugiert sind, einstellbar ist. Beispielsweise kann eine Brennweite der mindestens einen zusätzlichen Linse veränderlich und insbesondere auf unendlich einstellbar sein. Die mindestens eine zusätzliche Linse kann eine elektrisch einstellbare Linse (ETL) sein. Die Steuereinheit kann dazu eingerichtet sein, die Brennweite der mindestens einen zusätzlichen Linse zu steuern.

Alternativ können auch in einem Bereich zwischen der Ausgangslinse und der Sensorfläche der Kamera in einer Ebene, in der die Teilbilder nicht mehr überlappen, unterschiedlich dicke Glasblöcke eingebracht werden, um den jeweils gewünschten axialen Versatz der Teilbilder zueinander zu erzeugen.

Bei einer vorteilhaften Ergänzung können bei dem erfindungsgemäßen Mikroskop zum Abgleich von axialen Lage der Pupillen für die Teilstrahlengänge in der Bildteilereinheit Umlenkelemente und/oder Glasblöcke vorhanden sein.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Mikroskops ist zum Anpassen einer Größe der Teilbilder in einer Zwischenbildebene im Detektionsstrahlengang eine Feldblende vorhanden. Durch geeignetes Einstellen dieser Feldblende kann vermieden werden, dass sich die Teilbilder auf der Sensorfläche der Kamera überlappen,

Bei einer wichtigen Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens werden Bilder von ausgedehnten Volumenbereichen aufgenommen, d.h. es werden Volumenscans durchgeführt. Im Vergleich zum Stand der Technik ist das mit der vorliegenden Erfindung schneller und mit geringerer Lichtbelastung der Probe, also vergleichsweise probenschonend, möglich.

In grundsätzlich bekannter Weise können aus den Bildern eines ausgedehnten Volumenbereichs, insbesondere automatisiert, interessierende Bereiche ausgewählt werden, die dann mit einem Laser-Scanning-Mikroskop näher untersucht werden.

Weiterhin kann in grundsätzlich bekannter Weise auf Grundlage von Messdaten eines Laser-Scanning-Mikroskops einer Probe, insbesondere automatisiert, entschieden werden, von welchen Volumenbereichen der betreffenden Probe Bilder aufgenommen werden.

Bei den Volumenscans sind die zu den Teilbildern gehörenden Probenebenen axial gegeneinander versetzt und der Abstand zwischen dem Mikroskopobjektiv und der Probe wird über einen bestimmten Scanhub in einer festzulegenden Schrittweite, verändert und für jeden Abstand der Probe von dem Mikroskopobjektiv wird eine der Anzahl der Teilbilder entsprechende Zahl von Bildern aufgenommen. Die einzelnen Bilder können dann von der Steuereinheit zu einem 3D-Bild des beobachteten Volumens zusammengesetzt werden.

Grundsätzlich kann eine Fokustiefe oder Schärfentiefe der linienförmigen Beleuchtung unveränderlich sein. Bevorzugt wird die Fokustiefe der linienförmigen Beleuchtung auf einen Wert eingestellt, der einem axialen Abstand von zwei Probenebenen, insbesondere, wenn mehr als zwei Probenebenen gleichzeitig abgebildet werden, dem Abstand der beiden axial außen liegenden Probenebenen, entspricht, die zu der Ebene der Sensorfläche der Kamera optisch konjugiert sind. Dieses ist insbesondere für Volumenscans zweckmäßig wo ein optimales Verhältnis zwischen Bildqualität und Lichtbelastung der Probe erwünscht ist.

Neben einfachen gaußartigen Beleuchtungsprofilen können auch komplexere Strahlformungen verwendet werden. Zum Beispiel können mit diffraktiven optischen Elementen mehrere Foki erzeugt werden.

Um eine Punktverwaschungsfunktion axial abzutasten, sollte der axiale Abstand der beobachteten Probenebenen nicht größer sein als die halbe axiale Schärfentiefe der Abbildung des Mikroskopobjektivs im Detektionsstrahlengang. Das wird auch als axiales Nyquist-Sampling bezeichnet. Wenn man davon ausgeht, dass bei Volumenscans der axiale Abstand der Probenebenen größer ist als die axiale Schrittweite, ergibt sich daraus die Anforderung, dass die axiale Schrittweite, insbesondere der Einstellung des Abstands zwischen der Probe und dem Mikroskop, kleiner gewählt wird als die halbe axiale Schärfentiefe der Abbildung des Mikroskopobjektivs im Detektionsstrahlengang. Grundsätzlich ist aber auch möglich, dass der axiale Abstand der zu den Teilbildern gehörenden Probenebenen kleiner ist als oder gleich groß ist wie die Schärfentiefe der Abbildung des Mikroskopobjektivs im Detektionsstrahlengang. Die axiale Schrittweite kann dann entsprechend größer sein. Eine die axiale Nyquist-Bedingung nicht erfüllende Anwendung der Erfindung, also ein Untersampling, ist überdies natürlich auch

möglich. Dieses kann beispielsweise erwünscht sein, wenn schnelle Volumenscans durchgeführt werden sollen.

Bei einer bevorzugten Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens ist bei Volumenscans ein axialer Abstand der zu den Teilbildern gehörenden Probenebenen ein ganzzahliges Vielfaches der axialen Schrittweite. Bis auf die Ebenen an den axialen Grenzen des abgetasteten Volumens werden von den Probenebenen dann jeweils mehrere Bilder aufgenommen, und zwar entsprechend der durch die Bildteilereinheit definierten Anzahl der Teilbilder. Diese Wahl der Schrittweite erlaubt auch jeweils ein Überprüfen des korrekten Anschlusses des jeweils folgenden Bildstapels.

Bei einer anderen Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens ist bei Volumenscans eine axiale Schrittweite ein ganzzahliges Vielfaches des axialen Abstands der zu den Teilbildern gehörenden Probenebenen. Beispielsweise kann die axiale Schrittweite ein  $n$ -faches des axialen Abstands der zu den Teilbildern gehörenden Probenebenen sein, wobei  $n$  die Anzahl der Probenebenen und der Teilbilder ist. Mit dieser Wahl der axialen Schrittweite sind rasche Volumenscans möglich.

Mischformen dieser Varianten sind möglich. Vorteilhaft ist, dass die axialen Abstände der Probenebenen und die axiale Schrittweite bei Volumenscans über weite Bereiche frei gewählt werden können.

Weitere Steigerungen der Bild- und Volumenraten sind möglich, wenn die Probe mit mehreren linienförmigen Beleuchtungsbereichen abgetastet wird und die den linienförmigen Beleuchtungsbereichen entsprechenden Bereiche der Sensorfläche der Kamera jeweils synchronisiert ausgelesen werden.

In der Regel wird das Anregungslicht parallel zur optischen Achse des Beleuchtungsobjektivs auf die Probe eingestrahlt. Bei bestimmten Proben kann aber auch bevorzugt sein, dass eine linienförmige Laserbeleuchtung unter einem Winkel zur optischen Achse des Beleuchtungsobjektivs in die Probe eingestrahlt wird. Die den Teilbildern entsprechenden Probenbereiche sind dann lateral gegeneinander verschoben. Die abgetasteten Volumina können dann im Wesentlichen einem Parallelepipid entsprechen.

Weitere Vorteile und Eigenschaften der vorliegenden Erfindung werden im Zusammenhang mit den beigefügten Figuren erläutert. Darin zeigt:

- Figur 1: eine schematische Darstellung eines Ausführungsbeispiels eines erfindungsgemäßen Mikroskops;
- 5 Figur 2: in schematischer Darstellung eine Skizze der Beleuchtungssituation in einer Probe; und
- Figur 3: eine schematische Darstellung der Sensorfläche der Kamera mit zwei Teilbildern, korrespondierend zu einer je verschiedenen z-Tiefe innerhalb der Probe.
- 10 Gleiche und gleichwirkende Komponenten sind in den Figuren in der Regel mit denselben Bezugszeichen gekennzeichnet. Ein Ausführungsbeispiel eines erfindungsgemäßen Mikroskops 200 wird mit Bezug auf die Figuren 1 bis 3 erläutert.

Das in Figur 1 schematisch dargestellte erfindungsgemäße Mikroskops 200 weist als wesentliche Komponenten einen Beleuchtungsstrahlengang, einen Detektionsstrahlengang und eine Steuereinheit 100, beispielsweise einen PC, auf.

Der Beleuchtungsstrahlengang dient zum Beleuchten und Abtasten einer Probe S mit Anregungslicht 12 und beinhaltet im gezeigten Beispiel neben anderen Komponenten einen Scanner 20 als Beleuchtungssteuerungseinrichtung und ein Beleuchtungsobjektiv 40. Infolge der Bestrahlung mit dem Anregungslicht 12 sendet die Probe S Emissionslicht 14 aus, welches über den Detektionsstrahlengang auf eine Sensorfläche 98 einer Kamera 90 abgebildet wird. Der Detektionsstrahlengang beinhaltet neben anderen Komponenten das Mikroskopobjektiv 40, dass im gezeigten Beispiel identisch ist mit dem Beleuchtungsobjektiv 40, und, als wesentlichen Bestandteil des erfindungsgemäßen Mikroskops, die Bildteilereinheit 60. Die Bildteilereinheit 60 dient dazu, das von der Probe S kommende Emissionslicht 14 aufzuteilen und in qualifizierter Weise auf eine Sensorfläche 98 der Kamera abzubilden. Die Kamera 90 dient zum Aufnehmen von Bildern der Probe S. Die Steuereinheit 100 dient zum Ansteuern mindestens des Scanners 20 und der Kamera 90.

Der Beleuchtungsstrahlengang kann durch den Beleuchtungsstrahlengang eines Laser-Scanning-Mikroskops verwirklicht sein.

Das Anregungslicht 12 wird durch einen Laser 10 in den Beleuchtungsstrahlengang eingespeist und mit dem Scanner 20 durch das Mikroskopobjektiv 40 über die Probe S gescannt. Die Abbildung des Scanners 20, beispielsweise des Scanspiegels oder der Scanspiegel, in eine rückseitige Brennebene des Beleuchtungsobjektivs 40 (Pupillenebene) erfolgt über ein Linsensystem aus Scanoptik 22 und Tubuslinse 24. Mit einer Zylinderoptik, insbesondere einer Zylinderlinse 18, wird bevorzugt eine linienförmige Verteilung des Anregungslichts 12 in der Pupillen- und einer Probenebene erzeugt. Wegen der Fourierrelation zwischen Pupillen- und Bildebene stehen diese senkrecht zueinander.

Ergänzend oder alternativ kann zum Erzeugen einer linienförmigen Verteilung des Anregungslichts 12 eine Zylinderlinse auf der beleuchtungsseitigen Eintrittsseite des Hauptstrahlteilers 30, der unten beschrieben wird, vorhanden sein.

In dem gezeigten Ausführungsbeispiel ist außerdem eine, zuschaltbare oder austauschbare, beispielsweise einschwenkbare, zweite Zylinderoptik, beispielsweise eine Zylinderlinse 16, vorhanden zum Einstellen einer Breite des Linienfokus.

Im gezeigten Ausführungsbeispiel ist im Beleuchtungsstrahlengang außerdem eine Zoomoptik 13 vorhanden, mit welcher eine Fokustiefe oder Schärfentiefe der Linienbeleuchtung in der Probe S eingestellt werden kann. Ergänzend oder alternativ kann im Beleuchtungsstrahlengang zum Einstellen der Fokustiefe der Beleuchtung eine in Figur 1 nicht dargestellte Abblendeinrichtung vorhanden sein.

Der Linienfokus wird durch den Scanner 20 in einer Richtung quer zur Erstreckungsrichtung des Linienfokus in der Probe S bewegt. Gegebenenfalls kann zum Scannen des Anregungslichts 12 in einer Richtung parallel zur Linienbeleuchtung ein zweiter Scanner als Teil der Beleuchtungssteuerungseinrichtung vorhanden sein.

Ein Abstand zwischen dem Mikroskopobjektiv 40 und der Probe S kann im gezeigten Ausführungsbeispiel mit einer Verschiebeeinrichtung 42, beispielsweise einem motorischen z-Trieb, eingestellt werden.

Das in der Probe S aufgrund der Bestrahlung mit dem Anregungslicht 12 erzeugte Emissionslicht 14, insbesondere Fluoreszenzlicht, wird durch das Mikroskopobjektiv 40 kollimiert und mit dem Hauptfarbteiler 30, einem dichroitischen Strahlteiler, in dem Detektionsstrahlengang in Richtung der Kamera 90 abgelenkt. Das Emissionslicht 14, also das Fluoreszenzlicht, läuft mithin nicht über den Scanner 20.

An eine Zwischenbildebene 52 strahlabwärts von einer Tubuslinse 50 schließt sich die Bildteilereinheit 60 an, die im gezeigten Ausführungsbeispiel drei Teilbilder aus unterschiedlichen Tiefenbereichen der Probe S erzeugt und diese nebeneinander auf der Sensorfläche 98 der Kamera 90, beispielsweise einem CMOS-Chip oder einem SPAD-Array, anordnet. Die Kamera 90 kann auch eine farbauflösende Kamera sein.

Über die Steuereinheit 100 sind die Kamera 90, der Scanner 20 und die Verschiebeeinrichtung 42 wirkungsmäßig miteinander verbunden.

Die Steuereinheit 100 ist insbesondere dazu eingerichtet, die durch eine Stellung des Scanners 20 definierte Position der Linienbeleuchtung in der Probe S mit den jeweils auszulesenden Bereichen der Sensorfläche 98 der Kamera 90, etwa in der Art eines Rolling-Shutters, zu synchronisieren. Die Steuereinheit 100 kann auch zum Steuern der Verschiebeeinrichtung 42, insbesondere abgestimmt auf die Ansteuerung des Scanners 20, eingerichtet sein.

In dem in Figur 1 gezeigten Ausführungsbeispiel ist die Bildteilereinheit 60 im Detektionsstrahlengang zwischen einem Zwischenbild 52 strahlabwärts von einer Tubuslinse 50 und der Kamera 90 angeordnet.

Die Bildteilereinheit 60 weist ein optisches Relay-Linsensystem mit einer Eintrittslinse 62 und einer Austrittslinse 64 auf, welches die Zwischenbildebene 52 auf die Sensorfläche 98 der Kamera 90 abbildet. Eine Vergrößerung des Relay-Linsensystems kann dabei so gewählt sein, dass eine gewünschte Anzahl an Teilbildern, im Ausführungsbeispiel der Figur 1 sind das drei Teilbilder, so auf die Sensorfläche 98 abgebildet werden, dass Punktverwaschungsfunktionen lateral abgetastet werden können. Damit ist gemeint, dass die Vergrößerung des Relay-Linsensystems 62, 64 der Bildteilereinheit 60 beispielsweise so gewählt ist, dass der Durchmesser eines Airy-Scheibchens auf der Sensorfläche 98 der Kamera 90 mindestens viermal so groß ist wie ein Abstand

von benachbarten Pixeln der Kamera 90. Gegebenenfalls kann in der Zwischenbild-ebene 52 eine Feldblende vorhanden sein, um ein Überlappen der Teilbilder auf der Sensorfläche der Kamera 98 zu vermeiden.

5 Zwischen der Eintrittslinse 62 und der Austrittslinse 64 des Relay-Linsensystems sind im gezeigten Ausführungsbeispiel Strahlteiler 72, 82 vorhanden, die das Emissionslicht 14 in einen ersten, einen zweiten und einen dritten Teilstrahlengang aufteilen.

Im ersten Teilstrahlengang gelangt das Emissionslicht 14 vom Strahlteiler 72 über einen verstellbaren Spiegel 74 und eine Linse 76 auf die Austrittslinse 64 und wird von dieser in ein erstes Teilbild 91 auf die Sensorfläche 98 der Kamera 90 abgebildet.

10 Im zweiten Teilstrahlengang gelangt das Emissionslicht 14 vom Strahlteiler 82 über einen verstellbaren Spiegel 84 und eine Linse 86 auf die Austrittslinse 64 und wird von dieser in ein zweites Teilbild 92 auf die Sensorfläche 98 der Kamera 90 abgebildet.

15 In dem dritten Teilstrahlengang durchläuft das Emissionslicht 14 beide Strahlteiler 72, 82, gelangt direkt zur Austrittslinse 64 und von dieser auf ein drittes Teilbild auf der Sensorfläche 98 der Kamera 90.

Der Neutralteiler 82 könnte im gezeigten Ausführungsbeispiel auch ein einfacher Spiegel sein. Dann würden der dritte Teilstrahlengang und entsprechend das dritte Teilbild entfallen.

20 Die Steuereinheit 100 kann dazu eingerichtet sein, die verstellbaren Spiegel 74, 84 unter Verwendung eines Steuersignals für die Kamera 90 anzusteuern dergestalt, dass eine konfokale Bedingung für alle Teilbilder der jeweiligen Ebenen durch den konfokalen Auslesebereich erfüllt ist.

25 Der erste Teilstrahlengang und der zweite Teilstrahlengang sind der Austrittslinse 64 des Relay-Linsensystems 62, 64 so zugeführt, dass die zugehörigen mindestens zwei Teilbilder 91, 92 nebeneinander auf der Sensorfläche 98 der Kamera 90 dergestalt angeordnet sind, dass linienförmige Bereiche 93, 94 in den Teilbildern 91, 92, die optisch konjugiert sind zu linienförmig beleuchteten Bereichen auf oder in der Probe S, auf derselben Zeile oder denselben Zeilen 95 der Sensorfläche 98 liegen (Figur 3).

Zusätzlich können in Figur 1 nicht gezeigte Umlenkelemente oder Glasblöcke im ersten und/oder zweiten Teilstrahlengang vorhanden sein, um die Pupillenlagen für die Teilbilder abzugleichen.

5 Durch die Linse 76 im ersten Teilstrahlengang ist die axiale Lage einer Ebene S1 in der Probe S definiert, die zur Ebene der Sensorfläche 98 optisch konjugiert ist. Durch die Linse 86 im zweiten Teilstrahlengang ist die axiale Lage einer Ebene S2 in der Probe S definiert, die zur Ebene der Sensorfläche 98 optisch konjugiert ist. Durch geeignete Wahl der Linsen 76 und 86 können demgemäß die axialen Lagen der Probenebenen S1, und S2, die zur Ebene der Sensorfläche 98 optisch konjugiert sind eingestellt werden. Bevorzugt wird, insbesondere für Volumenscans, ein gewisser axialer Abstand für die Probenebenen S1, und S2 eingestellt. Zweckmäßig kann dann außerdem mit der Zoomoptik 13 eine Fokustiefe der Beleuchtung mit dem Anregungslicht 12 so eingestellt werden, dass die beiden Probenebenen hinreichend, angrenzende Bereiche aber möglichst wenig mit dem Anregungslicht 12 bestrahlt werden. Die Einstellung der Fokustiefe soll bewirken, dass die angrenzenden Bereiche eine geringe Beleuchtungsdichte aufweisen, also eine größere Fläche beleuchtet wird. Dieses würde erreicht, wenn die am weitesten voneinander entfernt liegenden gleichzeitig betrachteten Probenebenen gerade noch innerhalb der Fokustiefe der Beleuchtung liegen, wie im nächsten Absatz beschrieben.

20 Bevorzugt wird die Fokustiefe der linienförmigen Beleuchtung eingestellt auf einen Wert, der einem axialen Abstand von zwei Probenebenen S1, S2 entspricht, die zu der Ebene der Sensorfläche 98 der Kamera 90 optisch konjugiert sind.

Vorteilhafterweise ist die Brennweite der Linsen 76, 86 einstellbar, indem entweder die Linsen austauschbar sind oder beispielsweise als elektrisch einstellbare Linsen (electrically tunable lens, ETL) ausgeführt sind, deren Brennweite dann auch mit der Steuereinheit 100 einstellbar ist. Der Abstand der zur Kamerabildebene konjugierten Probenebenen S1, S2 zu einer Fokusebene des Mikroskopobjektivs 40 kann so eingestellt werden.

30 Die einstellbaren Linsen 76, 86 sind bevorzugt insbesondere auch so einstellbar, dass die Probenebenen S1 und S2 axial nicht beanstandet sind. Beispielsweise kann für beide Linsen 76, 78 die Brennweite auf unendlich gestellt werden. Mit der in Figur 1

gezeigten Anordnung würden dann das erste Teilbild 91 und das zweite Teilbild 92 idealerweise identisch sein.

Zweckmäßig können dann die Strahlteiler 72 und 82 durch unterschiedliche dichroitische Strahlteiler ersetzt werden, die auf die Beobachtung chromatisch unterschiedlicher Farbstoffe abgestimmt sind. Beispielsweise kann im ersten Teilbild 91 schwerpunktmäßig ein erster Farbstoff und im zweiten Teilbild 92 schwerpunktmäßig ein zweiter Farbstoff dargestellt werden. Die Probe S wird also in zwei Farbkanälen simultan beobachtet, wobei nach wie vor die Linienbeleuchtung mit dem Rolling-Shutter der Kamera 90 synchronisiert über die Probe S geführt wird.

Die Probe S kann beispielsweise ein Zellverbund mit einer Dicke von etwa 15  $\mu\text{m}$  sein. Das Mikroskopobjektiv 40 kann beispielsweise ein Objektiv 40x/1.2 sein. Die Schärfentiefe der Abbildung beträgt dann ca. 0,5  $\mu\text{m}$ , so dass axiales Nyquist-Sampling mit einer Schrittweite von 0,25  $\mu\text{m}$  erreicht wird. Anstatt zweier Teilbilder, wie in den Figuren gezeigt, können beispielsweise auch drei Teilbilder gleichzeitig aufgenommen werden. Der axiale Abstand der drei Probenebenen kann beispielsweise auf 2,5  $\mu\text{m}$  eingestellt werden, d.h. dass die äußeren Probenebenen axial 5  $\mu\text{m}$  beabstandet sind. Ein axialer Hub von 5  $\mu\text{m}$  kann dann gleichmäßig durchfahren werden in Schritten von 0,25  $\mu\text{m}$  Schritten, ohne dass unterschiedlich große Sprünge mit eventuell unterschiedlichen Zeitverzögerungen notwendig sind. Die Anzahl der aufzunehmenden Bilder würde um einen Faktor drei auf nur 20 Bilder reduziert werden. Bei einer Bildwiederholrate der Kamera von 120 fps (frames per second = Bilder pro Sekunde) würden demnach sechs Volumen pro Sekunde aufgenommen. Vorteilhaft ist hierbei, dass es eine Überdeckung der je ersten und letzten Ebene in den Bereichen gibt, die im Inneren der Probe liegen (siehe Figur 2). Hierdurch kann ein korrekter Anschluss der Bildaufnahmen sichergestellt werden.

Weiterhin bevorzugt ist eine geregelte Ablage der Teilbilder 91, 92 auf der Kamera 90. Hierbei kann, ausgehend vom Signal auf der Sensorfläche 98 der Kamera 90, in der Steuereinheit 100 nach festgelegten Kriterien eine Ansteuerung der, insbesondere motorisch verstellbaren, Umlenkspiegel 74, 84 realisiert werden, die dafür sorgt, dass die abgelegten Teilbilder 91, 92 sich nicht überschneiden und außerdem so

nebeneinander liegen, dass der Bereich der konfokalen Auslesung mit dem Beleuchtungsbereich optimal überlappt.

Figur 2 zeigt eine schematische Darstellung des Mikroskopobjektivs 40 relativ zur Probe S. Zwischen dem Mikroskopobjektiv 40 und der Probe S befindet sich ein Im-  
5 mersionsmedium zur Anpassung der Brechungsindizes. Dargestellt sind sodann zwei Probenebenen S1 und S2. Die erste Probenebene S1 ist über den ersten Teilstrahlengang, der über die Komponenten 62, 72, 74, 76, 64 verläuft, optisch konjugiert zum ersten Teilbild 91 (Figur 3). Die zweite Probenebene S2 ist über den zweiten Teilstrahlengang, der über die Komponenten 62, 82, 84, 86, 64 verläuft, optisch konjugiert zum  
10 zweiten Teilbild 92 (Figur 1, Figur 3). Eine Ausdehnung der axialen Verteilung des Anregungslichts 12 entspricht etwa dem axialen Abstand der Probenebenen S1 und S2.

Figur 3 zeigt eine schematische Darstellung der Sensorfläche 98 der Kamera 90. Das zum ersten Teilstrahlengang gehörende erste Teilbild, welches ein Bild der Probenebene S1 ist, liegt, wie ersichtlich, neben dem zum zweiten Teilstrahlengang gehörenden zweiten Teilbild 92, welches ein Bild der Probenebene S2 ist. Ein linienförmiger  
15 Bereich 93 im ersten Teilbild 91 entspricht einem Bereich, der optisch konjugiert ist zu der Lage der Linienbeleuchtung in der ersten Probenebene S1. Ein linienförmiger Bereich 94 im zweiten Teilbild 92 entspricht einem Bereich, der optisch konjugiert ist zu der Lage der Linienbeleuchtung in der zweiten Probenebene S2. Wie ersichtlich, liegen  
20 das erste Teilbild 91 und das zweite Teilbild 92 auf der Sensorfläche 98 so nebeneinander, dass die linienförmigen Bereiche 93, 94 in den Teilbildern 91, 92, die optisch konjugiert sind zu linienförmig beleuchteten Bereichen auf oder in der Probe S, auf derselben Zeile oder denselben Zeilen 95 der Sensorfläche 98 liegen. Die Steuereinheit 100 ist dazu eingerichtet, die von den in der Zeile oder den Zeilen 95 liegenden  
25 Pixeln gemessenen Messsignale auszulesen und auszuwerten. Mit der Bewegung des Linienfokus in der Probe S mithilfe des Scanners 20 quer zur Erstreckungsrichtung des Linienfokus wird auch der jeweils auszulesende Bereich der Sensorfläche 98 der Kamera 90 in Richtung des Pfeils 96 mitgeführt.

Bezugszeichenliste

	10	Lichtquelle, insbesondere Laser
	12	Anregungslicht
	13	Zoomoptik zum Einstellen der Fokustiefe der Beleuchtung
5	14	Emissionslicht
	16	Zylinderlinse, insbesondere einschwenkbar
	18	Zylinderlinse, insbesondere einschwenkbar
	20	Beleuchtungssteuerungseinrichtung, z.B. Galvo-Scanner
	22	Scanoptik
10	24	Tubuslinse im Beleuchtungsstrahlengang
	30	Hauptfarbteiler
	40	Beleuchtungsobjektiv, Mikroskopobjektiv
	42	steuerbare Verschiebeeinrichtung
	44	Immersionsflüssigkeit (optional, abhängig vom Objektiv 40)
15	50	Tubuslinse im Detektionsstrahlengang
	52	Zwischenbildebene
	60	Bildteilereinheit
	62	Eintrittslinse
	64	Austrittslinse
20	72	Strahlteiler, insbesondere Neutralteiler
	74	Umlenkeinrichtung, insbesondere Spiegel, insbesondere steuerbar
	76	Linse, insbesondere mit einstellbarer Brennweite
	82	Strahlteiler, insbesondere Neutralteiler
	84	Umlenkeinrichtung, insbesondere Spiegel, insbesondere steuerbar
25	86	Linse, insbesondere mit einstellbarer Brennweite
	90	Kamera
	91	erstes Teilbild
	92	zweites Teilbild
	93	linienförmiger Bereich, korrespondierend mit und optisch konjugiert zu
30		linienförmigem beleuchteten Bereich auf oder in Probe S
	94	linienförmiger Bereich, korrespondierend mit und optisch konjugiert zu
		linienförmigem beleuchteten Bereich auf oder in der Probe S

95	eine oder mehrere auszulesende Zeilen der Sensorfläche 98
96	Bewegungsrichtung der auszulesenden Zeile oder Zeilen
98	Sensorfläche der Kamera 90
100	Steuereinrichtung, insbesondere PC
5 200	erfindungsgemäßes Mikroskop
S	Probe
S1	erste Probenebene
S2	zweite Probenebene

## Patentansprüche

### 1. Mikroskop

mit einem Beleuchtungsstrahlengang mindestens mit einer Beleuchtungs-  
steuerungseinrichtung (20) und einem Beleuchtungsobjektiv (40) zum, insbe-  
sondere linienförmigen, Beleuchten und Abtasten einer Probe (S) mit Anre-  
gungslicht (12),  
mit einem Detektionsstrahlengang mindestens mit einem Mikroskopobjek-  
tiv (40) zum Leiten von von der Probe (S) abgestrahltem Emissionslicht (14) in  
Richtung einer Kamera (90),  
mit der Kamera (90) zum Aufnehmen von Bildern der Probe (S) und  
mit einer Steuereinheit (100) zum Ansteuern mindestens der Beleuchtungs-  
steuerungseinrichtung (20) und der Kamera (90),  
wobei die Steuereinheit (100) dazu eingerichtet ist, jeweils auszulesende Be-  
reiche einer Sensorfläche (98) der Kamera (90) mit einer durch die Beleuch-  
tungssteuerungseinrichtung (20) definierten Position des Anregungslichts (12)  
zu synchronisieren,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass im Detektionsstrahlengang eine Bildteilereinheit (60) vorhanden ist zum  
Aufteilen des Emissionslichts (14) in mehrere Teilstrahlengänge, die jeweils  
ein Teilbild (91, 92) der Probe (S) auf der Sensorfläche (98) der Kamera (90)  
erzeugen, wobei die Teilbilder (91, 92) auf der Sensorfläche (98) dergestalt ne-  
beneinander liegen, dass linienförmige Bereiche (93, 94) in den Teilbildern (91,  
92), die einer durch die Beleuchtungssteuerungseinrichtung (20) definierten  
Position des Anregungslichts (12) auf oder in der Probe (S) entsprechen, auf  
derselben Zeile oder denselben Zeilen (95) der Sensorfläche (98) liegen.

### 2. Mikroskop nach Anspruch 1,

dadurch gekennzeichnet,  
dass die linienförmigen Bereiche (93, 94) in den Teilbildern (91, 92), die auf  
der Sensorfläche (98) nebeneinander liegen, optisch konjugiert sind zu linien-  
förmig beleuchteten Bereichen auf oder in der Probe (S).

3. Mikroskop nach Anspruch 1 oder 2,  
dadurch gekennzeichnet,  
5 dass eine steuerbare Verschiebeeinrichtung (42) zum Ändern eines Abstands  
zwischen dem Beleuchtungsobjektiv (40) und der Probe (S) vorhanden ist und  
dass die Steuereinheit (100) zum Steuern der Verschiebeeinrichtung (42), ins-  
besondere abgestimmt auf die Ansteuerung der Beleuchtungssteuerungsein-  
richtung (20), eingerichtet ist.
- 10 4. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 3,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass im Beleuchtungsstrahlengang zum Erzeugen einer linienförmige Vertei-  
lung des Anregungslichts (12) in einer Probenebene (S1, S2) eine, insbeson-  
dere in den Beleuchtungsstrahlengang einschwenkbare, Zylinderoptik (18)  
15 vorhanden ist.
5. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 4,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass im Beleuchtungsstrahlengang zum Variieren einer Breite eines Linienfo-  
20 kus in der Probenebene (S1, S2) eine, insbesondere in den Beleuchtungs-  
strahlengang einschwenkbare, zweite Zylinderoptik (16) vorhanden ist.
6. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 5,  
dadurch gekennzeichnet,  
25 dass im Beleuchtungsstrahlengang Linsen (13) und/oder Blenden zum Einstel-  
len einer Fokustiefe der linienförmigen Beleuchtung vorhanden sind.
7. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 6,  
dadurch gekennzeichnet,  
30 dass die Beleuchtungssteuerungseinrichtung mindestens einen Scanner (20)  
und/oder mindestens ein Mikrospiegelarray aufweist.

8. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 7,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass die Bildteilereinheit (60) zum Aufteilen des Emissionslichts mindestens  
eine diffraktive Einrichtung, insbesondere ein Gitter und/oder einen Spatial  
Light Modulator, aufweist.
9. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 8,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass die Bildteilereinheit (60) zum Aufteilen des Emissionslichts mindestens  
eine monolithische Komponente aufweist, bestehend beispielsweise aus ge-  
klebten und/oder beschichteten Prismen oder Platten.
10. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 9,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass die Beleuchtungssteuerungseinrichtung zum Scannen des Anregungs-  
lichts in einer Richtung parallel zur Linienbeleuchtung einen zweiten Scanner  
aufweist.
11. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 10,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass die Bildteilereinheit (60) im Detektionsstrahlengang zwischen einem Zwi-  
schenbild (52) strahlabwärts von einer Tubuslinse (50) und der Kamera (90)  
angeordnet ist.
12. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 11,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass die Bildteilereinheit (60) ein Relay-Linsensystem mit einer Eintritts-  
linse (62) und einer Austrittslinse (64) aufweist, zwischen denen mindestens  
ein Strahlteiler (72, 82) angeordnet ist.

13. Mikroskop nach Anspruch 12,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass eine Vergrößerung des Relay-Linsensystems (62, 64) der Bildteilerein-  
heit (60) so gewählt ist, dass der Durchmesser eines Airy-Scheibchens auf der  
5 Sensorfläche (98) der Kamera (90) mindestens viermal so groß ist wie ein Ab-  
stand von benachbarten Pixeln der Kamera (90).
14. Mikroskop nach einem der Ansprüche 12 oder 13,  
dadurch gekennzeichnet,  
10 dass mindestens einer der Strahlteiler (72, 82), insbesondere mehr als einer  
oder jeder der Strahlteiler (72, 82), ein Neutralteiler oder ein dichroitische  
Strahlteiler ist.
15. Mikroskop nach einem der Ansprüche 12 bis 14,  
dadurch gekennzeichnet,  
15 dass die Teilstrahlengänge der Austrittslinse (64) des Relay-Linsensystems so  
zugeführt sind, dass die zugehörigen mindestens zwei Teilbilder (91, 92) ne-  
beneinander auf der Sensorfläche (98) der Kamera (90) dergestalt angeordnet  
sind, dass linienförmige Bereiche (93, 94) in den Teilbildern (93, 94), die insbe-  
20 sondere optisch konjugiert sind zu linienförmig beleuchteten Bereichen auf  
oder in der Probe (S), auf derselben Zeile oder denselben Zeilen (95) der Sen-  
sorfläche (98) liegen.
16. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 15,  
dadurch gekennzeichnet,  
25 dass in mindestens einem der Teilstrahlengänge der Bildteilereinheit (60), be-  
vorzugt in mehreren oder allen Teilstrahlengängen der Bildteilereinheit (60),  
insbesondere ansteuerbare, Umlenkelemente (74, 84), insbesondere Umlenk-  
spiegel, vorhanden sind.

17. Mikroskop nach Anspruch 16,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass die Steuereinheit (100) dazu eingerichtet ist, die ansteuerbaren Um-  
lenkelemente (74, 84) unter Verwendung eines Steuersignals für die Ka-  
5 mera (90) anzusteuern dergestalt, dass eine konfokale Bedingung für alle Bil-  
der der jeweiligen Ebenen durch den konfokalen Auslesebereich erfüllt ist.
18. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 17,  
dadurch gekennzeichnet,  
10 dass die mindestens zwei Teilbilder (91, 92) zu axial versetzten Bereichen der  
Probe (S) gehören.
19. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 18,  
dadurch gekennzeichnet,  
15 dass in mindestens einem der Teilstrahlengänge der Bildteilereinheit (60) be-  
vorzugt in mehreren oder allen Teilstrahlengängen der Bildteilereinheit (60),  
eine zusätzliche Linse (76, 86) angeordnet ist.
20. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 19,  
20 dadurch gekennzeichnet,  
dass ein axialer Abstand der Probenebenen (S1, S2), zu denen die Teilbil-  
der (91, 92) gehören und die zur Ebene der Sensorfläche (92) optisch konju-  
giert sind, einstellbar ist.
- 25 21. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 20,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass eine Brennweite der mindestens einen zusätzlichen Linse (76, 86) verän-  
derlich und insbesondere auf unendlich einstellbar ist.

22. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 21,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass zum Abgleich der axialen Lagen der Pupillen für die Teilstrahlengänge in  
der Bildteilereinheit (60) Umlenkelemente und/oder Glasblöcke vorhanden  
5 sind.
23. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 22,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass die Kamera (90) eine CMOS-Kamera oder sCMOS-Kamera mit Rolling-  
10 Shutter-Elektronik oder eine SPAD-Kamera ist.
24. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 23,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass die Kamera (90) eine farbauflösende Kamera ist.  
15
25. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 24,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass die Kamera (90) zum schnellen zusammenhängenden Auslesen von  
mehr als einem Bereich, insbesondere mehr als einer Zeile, eingerichtet ist.  
20
26. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 25,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass die den Teilbildern (91, 92) entsprechenden Probenbereiche lateral ge-  
25 gegeneinander verschoben sind.
27. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 26,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass zum Anpassen einer Größe der Teilbilder (91, 92) in einer Zwischenbild-  
ebene (52) im Detektionsstrahlengang eine Feldblende vorhanden ist.  
30

28. Verfahren zur Mikroskopie,  
bei dem eine Probe (S) durch ein Beleuchtungsobjektiv (40) mit Anregungslicht (12), insbesondere linienförmig, beleuchtet und abgetastet wird,  
bei dem von der Probe (S) abgestrahltes Emissionslicht (14) über ein Mikroskopobjektiv (40) in Richtung einer Kamera (90) geleitet wird,  
bei dem das Emissionslicht (14) strahlabwärts von dem Mikroskopobjektiv (40) in mehrere Teilstrahlengänge aufgeteilt wird,  
bei dem jeder der Teilstrahlengänge ein Teilbild (91, 92) der Probe (S) auf einer Sensorfläche (98) der Kamera (90) erzeugt,  
wobei die Teilbilder (91, 92) der Probe (S) auf der Sensorfläche (98) dergestalt nebeneinander liegen, dass linienförmige Bereiche (93, 94) in den Teilbildern (91, 92), die einer Position des Anregungslichts (12) auf oder in der Probe (S) entsprechen, auf derselben Zeile oder denselben Zeilen (95) der Sensorfläche (98) liegen und  
bei dem auszulesende Bereiche der Sensorfläche (98) der Kamera (90) synchronisiert werden mit der Position des Anregungslichts (12) auf der Probe.
29. Verfahren nach Anspruch 28,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass eine Fokustiefe der linienförmigen Beleuchtung eingestellt wird auf einen Wert, der einem axialen Abstand von zwei Probenebenen (S1, S2) entspricht, die zu der Ebene der Sensorfläche (98) der Kamera (90) optisch konjugiert sind.
30. Verfahren nach Anspruch 28 oder 29,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass bei Volumenscans eine axiale Schrittweite kleiner ist als oder gleich groß ist wie die halbe axiale Schärfentiefe der Abbildung des Mikroskopobjektivs (40).

31. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 bis 30,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass bei Volumenscans ein axialer Abstand der zu den Teilbildern gehörenden  
Probenebenen (S1, S2) ein ganzzahliges Vielfaches der axialen Schrittweite  
5 ist.
32. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 bis 30,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass bei Volumenscans eine axiale Schrittweite ein ganzzahliges Vielfaches  
10 ist des axialen Abstands der zu den Teilbildern gehörenden Probenebenen.
33. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 bis 32,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass die Probe (S) mit mehreren linienförmigen Beleuchtungsbereichen abge-  
15 tastet wird und  
dass die den linienförmigen Beleuchtungsbereichen entsprechenden Bereiche  
der Sensorfläche (98) der Kamera (90) jeweils synchronisiert ausgelesen wer-  
den.
- 20 34. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 bis 33,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass eine linienförmige Laserbeleuchtung unter einem Winkel zur optischen  
Achse des Beleuchtungsobjektivs (60) in die Probe (S) eingestrahlt wird.

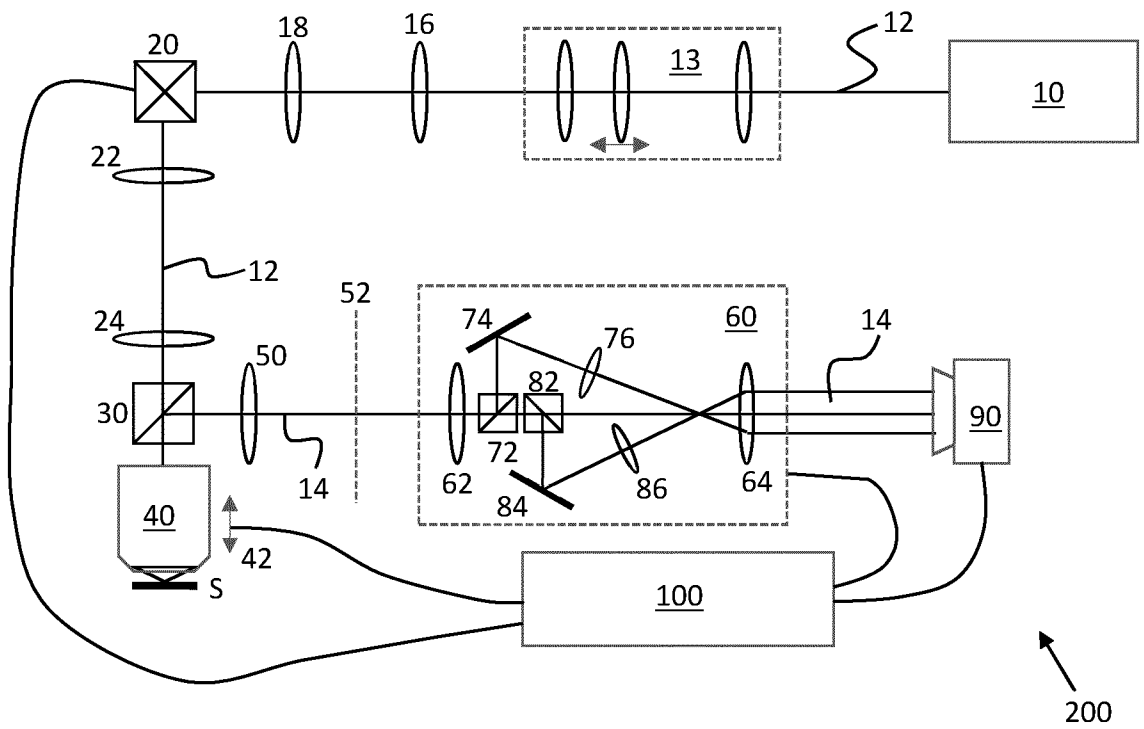
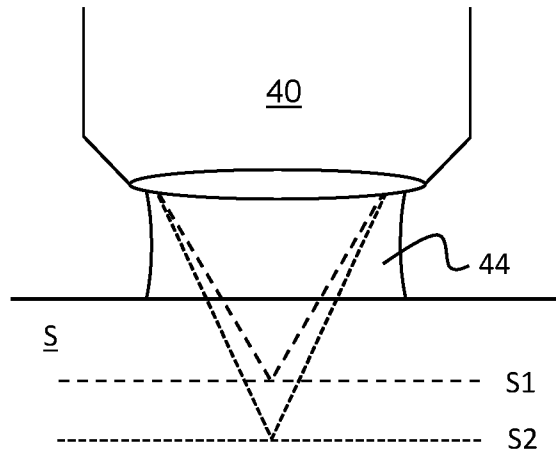
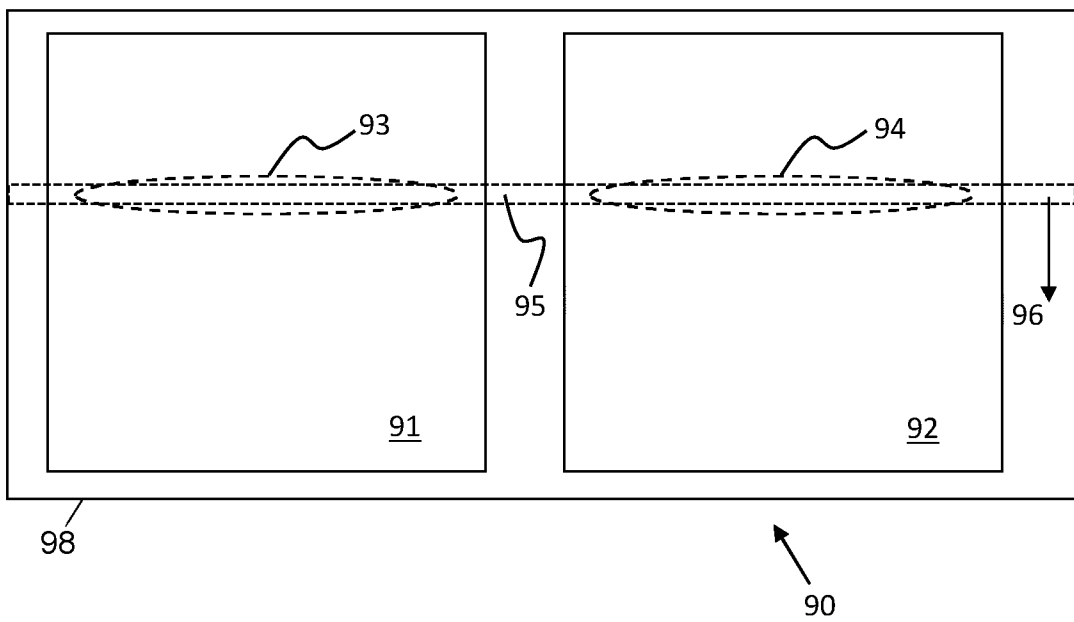


Fig. 1



**Fig. 2**



**Fig. 3**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/EP2022/082544**

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<b>G02B 21/00</b> (2006.01)i; <b>G02B 21/36</b> (2006.01)i; <b>G02B 21/18</b> (2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
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		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TSANG JEAN-MARC ET AL. "Fast, multiplane line-scan confocal microscopy using axially distributed slits" <i>BIOMEDICAL OPTICS EXPRESS</i> , United States, Vol. 12, No. 3, 01 March 2021 (2021-03-01), page 1339 DOI: 10.1364/BOE.417286 ISSN: 2156-7085, XP093028202 cited in the application	1-12,14-16,18-20,22-34
A	page 1339 - page 1341; figures 1(a)-(d)	13,17,21
Y	E. MEI ET AL. "A line scanning confocal fluorescent microscope using a CMOS rolling shutter as an adjustable aperture" <i>JOURNAL OF MICROSCOPY</i> , Vol. 247, No. 3, 20 August 2012 (2012-08-20), pages 269-276 DOI: 10.1111/j.1365-2818.2012.03642.x ISSN: 0022-2720, XP055141531 the whole document	1-12,14-16,18-20,22-34
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search <b>02 March 2023</b>		Date of mailing of the international search report <b>13 March 2023</b>
Name and mailing address of the ISA/EP <b>European Patent Office</b> <b>p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk</b> <b>Netherlands</b> Telephone No. (+31-70)340-2040 Facsimile No. (+31-70)340-3016		Authorized officer <b>Windecker, Robert</b>  Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/EP2022/082544**

<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	XIAO SHENG ET AL. "High-contrast multifocus microscopy with a single camera and z-splitter prism" <i>OPTICA</i> , Vol. 7, No. 11, 22 October 2020 (2020-10-22), page 1477 DOI: 10.1364/OPTICA.404678 XP093028220 cited in the application abstract; drawings	1-34
Y	EP 3614190 A1 (TILL GMBH [DE]) 26 February 2020 (2020-02-26) the whole document	1-12,14-16,18-20,22-34
Y	WO 2012002893 A1 (GE HEALTHCARE BIO SCIENCES [US] ET AL.) 05 January 2012 (2012-01-05) abstract; drawings	1-12,14-16,18-20,22-34
Y	US 2019331904 A1 (HAN KYU YOUNG [US] ET AL) 31 October 2019 (2019-10-31) the whole document	1-12,14-16,18-20,22-34

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/EP2022/082544**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
EP	3614190	A1	26 February 2020	CN	112654911	A	13 April 2021
				EP	3614190	A1	26 February 2020
				EP	3841419	A1	30 June 2021
				JP	2021535428	A	16 December 2021
				US	2021181489	A1	17 June 2021
				WO	2020038754	A1	27 February 2020
WO	2012002893	A1	05 January 2012	EP	2589214	A1	08 May 2013
				JP	5897563	B2	30 March 2016
				JP	2013531819	A	08 August 2013
				US	2013093873	A1	18 April 2013
				WO	2012002893	A1	05 January 2012
US	2019331904	A1	31 October 2019	US	2019331904	A1	31 October 2019
				US	2019346668	A1	14 November 2019

<b>A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b>		
INV. G02B21/00 G02B21/36 G02B21/18		
ADD.		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
<b>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</b>		
Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole ) <b>G02B</b>		
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) <b>EPO-Internal, WPI Data</b>		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
<b>Y</b>	<b>TSANG JEAN-MARC ET AL: "Fast, multiplane line-scan confocal microscopy using axially distributed slits", BIOMEDICAL OPTICS EXPRESS, Bd. 12, Nr. 3, 1. März 2021 (2021-03-01), Seite 1339, XP093028202, United States ISSN: 2156-7085, DOI: 10.1364/BOE.417286 in der Anmeldung erwähnt</b>	<b>1-12, 14-16, 18-20, 22-34</b>
<b>A</b>	<b>Seite 1339 - Seite 1341; Abbildungen 1(a) - (d)</b>	<b>13, 17, 21</b>
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> 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
<b>2. März 2023</b>		<b>13/03/2023</b>
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  <b>Windecker, Robert</b>

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>E. MEI ET AL: "A line scanning confocal fluorescent microscope using a CMOS rolling shutter as an adjustable aperture",            JOURNAL OF MICROSCOPY,            Bd. 247, Nr. 3,            20. August 2012 (2012-08-20), Seiten            269-276, XP055141531,            ISSN: 0022-2720, DOI:            10.1111/j.1365-2818.2012.03642.x            das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	<p>1-12,            14-16,            18-20,            22-34</p>
A	<p>XIAO SHENG ET AL: "High-contrast multifocus microscopy with a single camera and z-splitter prism",            OPTICA,            Bd. 7, Nr. 11,            22. Oktober 2020 (2020-10-22), Seite 1477,            XP093028220,            DOI: 10.1364/OPTICA.404678            in der Anmeldung erwähnt            Zusammenfassung; Abbildungen</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	<p>1-34</p>
Y	<p>EP 3 614 190 A1 (TILL GMBH [DE])            26. Februar 2020 (2020-02-26)</p> <p>das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	<p>1-12,            14-16,            18-20,            22-34</p>
Y	<p>WO 2012/002893 A1 (GE HEALTHCARE BIO SCIENCES [US] ET AL.)            5. Januar 2012 (2012-01-05)</p> <p>Zusammenfassung; Abbildungen</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	<p>1-12,            14-16,            18-20,            22-34</p>
Y	<p>US 2019/331904 A1 (HAN KYU YOUNG [US] ET AL)            31. Oktober 2019 (2019-10-31)</p> <p>das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	<p>1-12,            14-16,            18-20,            22-34</p>

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

**PCT/EP2022/082544**

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung	
<b>EP 3614190</b>	<b>A1</b>	<b>26-02-2020</b>	<b>CN 112654911 A</b>	<b>13-04-2021</b>
			<b>EP 3614190 A1</b>	<b>26-02-2020</b>
			<b>EP 3841419 A1</b>	<b>30-06-2021</b>
			<b>JP 2021535428 A</b>	<b>16-12-2021</b>
			<b>US 2021181489 A1</b>	<b>17-06-2021</b>
			<b>WO 2020038754 A1</b>	<b>27-02-2020</b>
-----				
<b>WO 2012002893</b>	<b>A1</b>	<b>05-01-2012</b>	<b>EP 2589214 A1</b>	<b>08-05-2013</b>
			<b>JP 5897563 B2</b>	<b>30-03-2016</b>
			<b>JP 2013531819 A</b>	<b>08-08-2013</b>
			<b>US 2013093873 A1</b>	<b>18-04-2013</b>
			<b>WO 2012002893 A1</b>	<b>05-01-2012</b>
-----				
<b>US 2019331904</b>	<b>A1</b>	<b>31-10-2019</b>	<b>US 2019331904 A1</b>	<b>31-10-2019</b>
			<b>US 2019346668 A1</b>	<b>14-11-2019</b>
-----				