

(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  
23. Oktober 2008 (23.10.2008)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2008/125605 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:

G01B 11/24 (2006.01) G06T 7/00 (2006.01)  
G02B 21/00 (2006.01) G01N 21/64 (2006.01)  
G02B 21/16 (2006.01)

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für

jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, KM, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2008/054390

(22) Internationales Anmeldedatum:  
11. April 2008 (11.04.2008)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
10 2007 018 048.0 13. April 2007 (13.04.2007) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: SCHWERTNER, Michael [DE/DE];  
Ernst-Abbe-Platz 5, App. 808, 07743 Jena (DE).

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für

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

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(74) Anwälte: KRUSPIG, Volkmar usw.; Meissner, Bolte & Partner, Postfach 86 06 24, 81633 München (DE).

(54) Title: METHOD AND ASSEMBLY FOR OPTICAL REPRODUCTION WITH DEPTH DISCRIMINATION

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND ANORDNUNG ZUR OPTISCHEN ABBILDUNG MIT TIEFENDISKRIMINIERUNG

(57) Abstract: The invention relates to a method and an assembly for generating optical split images. The invention permits the three-dimensional, layered optical scanning of spatially extended objects and is used in microscopy, but is not limited to this field. In said method, periodically distributed exposures are projected in one spatial direction into a plane and fluorescent and/or luminescent light that is reflected and/or scattered and/or emitted by the sample is reproduced on a local-resolution detector. According to the invention, a calibration step is first carried out, in which step the local phase and/or the local period of the distributed exposures are determined for each location on the detector. In the sample detection mode, two distributed exposures are projected into or onto the sample to calculate each split image and the resultant intensity distributions are reproduced on the detector. The method steps for projecting and detecting two exposure light distributions are repeated as often as desired, in particular for different focal positions of the sample and/or different exposure wavelengths and the intensity distributions are used to calculate at least one optical split image from the captured intensity distributions with the aid of the local phase and/or local period.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Anordnung zur Erzeugung optischer Schnittbilder. Die Erfindung dient der dreidimensionalen, schichtweisen optischen Abtastung räumlich ausgedehnter Objekte und findet Anwendungen in der Mikroskopie, ohne jedoch auf diesen Bereich beschränkt zu sein. Bei dem Verfahren werden mindestens in einer Raumrichtung periodische Beleuchtungsverteilungen in eine Projektionsebene projiziert und in der Probe reflektiertes und/oder gestreutes und/oder emittiertes Fluoreszenzlicht und/oder Lumineszenzlicht auf einem ortsauflösenden Detektor zur Abbildung gebracht. Erfindungsgemäß erfolgt zunächst ein Kalibrierschritt, in welchem die lokale Phase und/oder die lokale Periode der Beleuchtungsverteilungen für jeden Ort auf dem Detektor bestimmt werden. Im Probenerfassungsmodus werden für die Berechnung jeweils eines Schnittbildes jeweils zwei Beleuchtungsverteilungen in oder auf die Probe projiziert und die resultierenden Intensitätsverteilungen auf dem Detektor zur Abbildung gebracht. Die Verfahrensschritte der Projektion und Detektion von zwei Beleuchtungslichtverteilungen werden beliebig oft wiederholt, insbesondere bei verschiedenen Fokuspositionen der Probe und/oder verschiedenen Beleuchtungswellenlängen, wobei aus den Intensitätsverteilungen mit Hilfe der lokalen Phase und/oder lokalen Periode mindestens ein optisches Schnittbild aus den aufgenommenen Intensitätsverteilungen berechnet wird.

WO 2008/125605 A2

## Verfahren und Anordnung zur optischen Abbildung mit Tiefendiskriminierung

### Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Anordnung zur Erzeugung optischer Schnittbilder.

Die vorliegende Erfindung dient der dreidimensionalen, schichtweisen optischen Abtastung räumlich ausgedehnter Objekte und hat hauptsächlich Anwendungen in der Mikroskopie, ist jedoch nicht auf diesen Bereich beschränkt.

Um dreidimensionale Abbildungen von Objekten zu erhalten, bedient man sich oft der Technik des optischen Schneidens. Ein sogenannter optischer Schnitt ist eine Abbildung, welche nur Informationen aus einem bestimmten Tiefenbereich enthält. Ein optisches System zur Erstellung optischer Schnitte bildet deshalb selektiv Objektdetails ab, welche sich in der Fokusebene befinden, wobei Objektdetails, welche sich nicht in dieser Ebene befinden, im Schnittbild unterdrückt werden.

Durch die Aufnahme einer Serie von optischen Schnitten an unterschiedlichen Fokuspositionen kann ein 3D Objekt schrittweise abgetastet werden. Somit kann eine dreidimensionale Abbildung des Objektes erstellt oder seine Topologie analysiert werden. Die Begriffe Objekt und Probe werden im Folgenden gleichberechtigt verwendet. Insbesondere in der Mikroskopie wird das untersuchte Objekt oft als Probe bezeichnet.

Die vorliegende Erfindung ermöglicht die Erstellung von optischen Schnitten auf besonders einfache Weise und kann zum Beispiel in der Biologie, Medizin oder den Materialwissenschaften zur Analyse von Objekten verwendet werden.

Eines der ersten Verfahren zur Erzeugung von optischen Schnitten war das konfokale Mikroskop von Minsky [1]. Hier wird die Abbildung von Bilddetails außerhalb der Fokusebene durch eine Anordnung von konfokalen Blenden unterdrückt.

Ein anderer Ansatz zur Erzeugung von optischen Schnitten ist die strukturierte Beleuchtung, wie sie zum Beispiel von Wilson et al. in [2] beschrieben ist. Hier wird eine Struktur, zum Beispiel ein Gitter, in die abzubildende Probe projiziert. Dies erzeugt eine Modulation der Lichtverteilung in der Probe. Wie zum Beispiel in [2] gezeigt wurde, ist die Modulationstiefe in der Fokusebene am stärksten und kennzeichnet in diesem Sinne die Fokusebene. Bei der strukturierten Beleuchtung wird zuerst eine Modulation dem Beleuchtungslicht aufgeprägt, danach eine Serie von Abbildungen für verschiedene Positionen (Phasenschritte) der projizierten Struktur aufgenommen und im letzten Schritt das optische Schnittbild aus den aufgenommenen Daten berechnet.

Hierzu wurden verschiedene Anordnungen vorgeschlagen. Im Patent von Wilson et al., [3] wird ein Gitter in einer der Probe konjugierten Ebene angeordnet und lateral zur optischen Achse verschoben. Bei Gerstner et al. [4][5] wird dagegen eine in den Strahlengang eingebrachte planparallele Platte gekippt, welche die in bzw. auf die Probe projizierte Beleuchtungsstruktur lateral verschiebt. Bei transparenten oder teiltransparenten Proben findet eine Projektion in die Probe statt, bei intransparenten Oberflächenstrukturen wird von einer Projektion auf die Probe gesprochen.

Eine andere Lösung wurde von Neil et al. [6] vorgeschlagen. Hier entsteht die Beleuchtungsstruktur in der Probe direkt durch Interferenz.

Alle Verfahren [2-6] haben die Eigenschaft, dass sie die Aufnahme von mindestens 3 Einzelbildern erfordern. All diese Verfahren und Anordnungen haben gemeinsam, dass Artefakte durch Ungenauigkeiten bei der Positionierung der projizierten Struktur entstehen können, da sie die exakte und gleichzeitig schnelle Einstellung eines mechanischen Elementes erfordert. Details zu Artefakten und deren Kompensation kann man zum Beispiel in [7] finden. Die einzelnen Vorschläge zur Realisierung des Verfahrens unterscheiden sich vor allem hinsichtlich der Anordnung, mit der die Positionsänderung (Phasenlage) der Beleuchtungsstruktur erreicht wird. Insbesondere werden auch Anordnungen vorgeschlagen, welche durch Verzicht auf bewegliche Elemente eine

festen Justierung und somit sehr gute Reproduzierbarkeit der Phasenschritte ermöglichen.

Das US-Patent 5381236 [11] beschreibt einen optischen Sensor zur Abstandsbestimmung von dreidimensionalen Objekten ("range finding"). Hier wird eine periodische Struktur in das Objekt projiziert, wobei die Beleuchtungsstruktur umgekehrt werden kann, was einer Phasenverschiebung um 180 Grad entspricht. Das hier vorgeschlagene Verfahren basiert ebenfalls auf der Änderung der projizierten Struktur in zwei Schritten, weist jedoch gegenüber [11] folgende Unterschiede auf:

Die einzelnen Elemente der projizierten Beleuchtungsstruktur müssen in [11] exakt auf die Einzelelemente des Detektors (CCD Pixel) ausgerichtet werden. Dies ist eine starke Einschränkung aus mehreren Gründen: Die optische Anordnung müsste sehr genau den Abbildungsmaßstab einhalten, um eine Übereinstimmung des Beleuchtungsmusters mit dem Detektor zu erzielen. Weiterhin müsste die relative Justierung der beiden Strukturen sehr exakt realisiert und sub-pixelgenau sein. Die vermutlich wichtigste Einschränkung besteht darin, dass eine auch nur minimale Verzerrung der optischen Abbildung (zum Beispiel Kissen- oder Tonnenverzerrung) eine sub-pixelgenaue Übereinstimmung der Elemente von Beleuchtungsstruktur und Detektor für das gesamte Gesichtsfeld unmöglich macht. Die Anordnung würde aufwendig korrigierte und justierte Optiken erfordern, welche einer breiten und robusten Anwendung des Verfahrens entgegenstehen. Beim vorgeschlagenen Verfahren kann die Beleuchtungsstruktur im Gegensatz zu [11] hinsichtlich ihrer Art und Feinheit frei gewählt werden, da sie keine exakte Ausrichtung der Beleuchtungsstruktur in Bezug auf den Detektor erfordert. Dies ermöglicht eine Anpassung der Tiefendiskriminierung des optischen Systems, bzw. der Dicke des erzeugten optischen Schnittes (in einem konfokalen Mikroskop würde dies der Einstellung des Durchmessers der konfokalen Blendenöffnung entsprechen). Dies kann mit der vorliegenden Erfindung einfach realisiert werden, wäre in [11] entsprechend dem Stand der Technik jedoch nicht möglich. Somit können wesentliche Nachteile von [11] vermieden werden. Eine Anordnung zur Realisierung ohne bewegte Elemente ist ebenfalls nicht in [11] offenbart und kann Nachteile durch Positionierungsungenauigkeiten vermeiden.

An dieser Stelle soll zur genauen Definition und Abgrenzung auch auf andere in der Literatur beschriebene Methoden zur Vermessung von Oberflächen mittels strukturierter Beleuchtung hingewiesen werden, welche sich von der vorgeschlagenen Methode durch ihr Prinzip unterscheiden. Es gibt Oberflächenmessverfahren, welche auf Triangulation in Kombination mit strukturierter Beleuchtung basieren. Stellvertretend sei hier auf die Literaturstelle [12] und weitere darin enthaltene Referenzen verwiesen. Bei der Triangulation wird die Deformation einer Beleuchtungsstruktur (z.B. Streifenmuster) bei Projektion auf die Probe ausgewertet, wobei das Objektprofil aus der lokalen Phase der projizierten Struktur ermittelt wird. Primäre Messgröße ist also die lokale Phase. Charakteristisch ist auch, dass die Projektion der Struktur und Detektion durch verschiedene, nicht koaxiale Optiken erfolgen oder das Objekt in Bezug auf die optische Achse gekippt wird. Bei der vorliegenden Methode zur Abbildung mit Tiefendiskriminierung geht es um eine Trennung (Diskriminierung) von Bildsignalen, welche aus der Fokusebene stammen, von solchen Signalen, welche dem Hintergrund zuzuordnen sind. Ein Tiefenprofil der Probe kann durch eine axiale Abtastung der Probe mittels einer Fokussiereinrichtung erfolgen, wobei jedes der Teilbilder dieser axialen Abtastung einen optischen Schnitt darstellt. Ein optischer Schnitt, welcher auch pseudo-konfokale Abbildung genannt werden kann, enthält nur die Bildsignale aus der Fokusebene, wobei Hintergrundsignale durch geeignete Methoden unterdrückt bzw. herausgefiltert wurden. Ein Konfokalmikroskop [1] produziert ebenfalls optische Schnitte, löst diese Aufgabe jedoch durch eine andere optische Anordnung. Die Tiefendiskriminierung in einem Verfahren der strukturierten Beleuchtung basiert auf der Detektion der lokalen Modulationstiefe der in bzw. auf die Probe projizierten Struktur. Im Gegensatz zu Triangulationsverfahren ist die lokale Modulation primäre Messgröße. Weiterhin erfolgt in der vorliegenden Erfindung die Projektion der Beleuchtungsstruktur sowie die Detektion des Lichtes von der Probe vorzugsweise in durch ein und dieselbe, der Probe zugewandte Optik (Objektiv). Triangulation hingegen arbeitet mit der Projektion auf bzw. Detektion vom Objekt aus unterschiedlichen Richtungen.

Ein weitere wesentlicher Aspekt von Implementierungen des Verfahrens der Strukturierten Beleuchtung mit Tiefendiskriminierung ist die Abbildung einer Probe unter Nutzung verschiedener Wellenlängen. Zur Zeit bekannte Implementierungen haben hier Probleme beim Wechsel der Wellenlänge: durch verbleibende axiale chromatische Aberration, welche vom verwendeten Objektiv und der Zwischenoptik abhängig sein kann, muss die projizierte Struktur (in der Regel eine Maske) axial neu positioniert werden. Dies erfordert in bekannten Mikroskopanordnungen relativ große Stellwege und somit viel Zeit für die Bewegung von mechanischen Elementen (siehe z.B. [4]).

Die vorliegende Erfindung schlägt neuartige Anordnungen vor, welche bei einem Wechsel der Abbildungswellenlänge keine mechanische axiale Bewegung der projizierten Maskenstruktur mehr erfordern und somit Geschwindigkeitsvorteile durch schnelle zeitsequentielle oder sogar zeitsimultane Abbildung mit verschiedenen Wellenlängen haben. Weiterhin werden neue Anordnungen zur Lösung des Problems der chromatischen Korrektur vorgeschlagen, welche zwar bewegliche Elemente nutzen, jedoch eine geringere Komplexität im Vergleich zum Stand der Technik haben.

Eine andere Ausgestaltung des Prinzips der strukturierten Beleuchtung entsprechend dem Stand der Technik arbeitet mit kontinuierlich bewegten Beleuchtungsmasken, welche in bzw. auf die Probe projiziert werden [8,9]. Hier wird eine bewegliche Maske sowohl zur Kodierung der Beleuchtungsstruktur und anschließender Projektion auf die Probe als auch zur Dekodierung genutzt. Hierbei ist charakteristisch, dass das von der Probe ausgehende Licht die Maske durchläuft. In [8] wurde eine Anordnung beschrieben, welche für die Implementierung in einem Weitfeld-Mikroskop geeignet ist. Die Anordnung in [9] ist vorrangig für die Verwendung in Kombination mit einem Linienscanner geeignet. Beide Verfahren in [8] und [9] haben gemeinsam, dass zwei verschiedene Signale auf einem ortsauflösenden Detektor integriert werden, wobei sich das gewünschte optische Schnittbild durch einfache Subtraktion der beiden Bilddatensätze ergibt. Gemeinsamer Nachteil der Anordnungen in [8] und [9] ist, dass das von der Probe ausgehende und zu detektierende Licht vor der Registrierung am Detektor beim Durchgang durch die

Maske geschwächt wird. Dies ist vor allem bei der Beobachtung schwacher Lichtsignale von Bedeutung, wie sie insbesondere in der Fluoreszenzmikroskopie auftreten.

In der Veröffentlichung [13] wurde gezeigt, wie sich die Methode der strukturierten Beleuchtung mit der Methode der Fluoreszenzlebensdauer kombinieren lässt. Hier wird die dem Stand der Technik entsprechende Methode aus [2,3] verwendet, welche die Aufnahme einer Sequenz aus drei Beleuchtungsschritten erfordert. Die Messung der Fluoreszenzlebensdauer wird durch Kombination mit einem Detektor sehr hoher Zeitauflösung (gated optical intensifier) und gepulster Laseranregung ermöglicht. Eine andere Variante zur Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer ist das "frequenz domain FLIM" wobei das Anregungslicht periodisch moduliert und die Lebensdauer aus der Phasenverschiebung des Detektionssignals in Bezug auf das Anregungssignal bestimmt wird. Die vorliegende Erfindung ermöglicht ebenfalls die Messung der Fluoreszenzlebensdauer in optischen Schnittbildern mit der Aufnahme von nur zwei Einzelbildern pro berechnetem Schnittbild, wenn entsprechende Detektoren und Lichtquellen genutzt werden.

Die Veröffentlichung [14] behandelt eine Methode zur Erzeugung von optischen Schnittbildern mit nur einer Bildaufnahme. Hier wird die in [2,3] vorgestellte Methode mit drei Beleuchtungsmustern implementiert. Dabei sind die drei in bzw. auf die Probe projizierten und von der Probe detektierten Phasenschritte durch Licht unterschiedlicher Wellenlänge kodiert, was eine zeit-simultane Projektion bzw. Aufnahme ermöglicht. Diese Technik bietet zwar Geschwindigkeitsvorteile, führt jedoch zu anderen Problemen. Eine Verwendung in der Fluoreszenzmikroskopie ist hier nicht möglich, da die Farbstoffe vorgegebene spektrale Eigenschaften (Anregungswellenlänge und Emissionswellenlänge) haben. Weiterhin ist es problematisch, wenn die Probe im Reflexionsbetrieb inhomogene spektrale Eigenschaften hat. Die Veröffentlichung [14] ist deshalb als Spezialfall der Methode [2,3] zu sehen, wobei Einschränkungen aufgrund der Wellenlängenkodierung der Beleuchtungsschritte auftreten. Bei dem vorgeschlagenen erfindungsgemäßen Verfahren sind diese Einschränkungen nicht erforderlich, da man nicht auf eine spektrale Kodierung der Beleuchtungsschritte angewiesen ist.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren und eine Anordnung zur Erzeugung von optischen Schnittbildern mittels strukturierter Beleuchtung und dient der schichtweisen optischen Abtastung ausgedehnter Objekte. Im Vergleich zum Stand der Technik soll es möglich sein, optische Schnittbilder durch Projektion und Aufnahme von nur je zwei Beleuchtungsmustern auf die Probe zu erhalten. Weiterhin soll auf die bisher notwendige, jedoch sehr schwer zu realisierende, pixelgenaue Ausrichtung der beleuchteten Struktur auf den Detektor verzichtet werden.

Mit der zu schaffenden Anordnung soll eine schnellere Probenabtastung, robustere Konstruktion sowie verbessertes Signal-Rauschverhältnis der erzeugten optischen Schnitte bei gleicher Anzahl der detektierten Photonen möglich werden.

Weiterhin ist eine Anordnung vorzuschlagen, mit der das erfindungsgemäße Verfahren ohne bewegliche mechanische Komponenten implementiert werden kann. Dies reduziert den Justieraufwand, Kosten für mechanische Aktuatoren sowie Bildartefakte aufgrund von Positionierfehlern, deutlich.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft die Erzeugung von optischen Schnittbildern, wobei die Probe mit verschiedenen Wellenlängen abgetastet wird. Dies kann zum Problem mit den axialen chromatischen Eigenschaften der Optik führen, was bisher z.B. durch eine mechanische Nachführung von optischen Elementen gelöst wurde. Es werden weiterhin Anordnungen offenbart, welche das Problem der axialen chromatischen Korrektur bei der strukturierten Beleuchtung, insbesondere bei Integration in übliche Mikroskopsysteme, ohne bewegte mechanische Elemente lösen und weitere Geschwindigkeitsvorteile gegenüber dem Stand der Technik bieten.

Zusätzlich ist eine neuartige Anordnung zur Implementierung eines Verfahrens zur strukturierten Beleuchtung angegeben, welche für die zwei Aufgaben der Phasenverschiebung der Beleuchtungsstruktur sowie die Nachführung der chromatischen axialen Korrektur mit nur einem Aktuator auskommt.



Die Lösung der genannten Aufgaben erfolgt durch die Lehre der unabhängigen Ansprüche.

Das Verfahren zur Generierung optischer Schnittbilder durch Projektion von zwei Lichtverteilungen stellt sich wie folgt dar:

Für die strukturierte Beleuchtung muss das auf das Objekt projizierte Beleuchtungslicht eine Modulation in mindestens einer Raumrichtung aufweisen. Verfahren zur Strukturierten Beleuchtung entsprechend dem Stand der Technik benötigen die Projektion von mindestens drei Strukturen bzw. die Projektion von mindestens drei Phasenlagen einer Struktur.

Erfindungsgemäß werden genau zwei Strukturen projiziert, wobei es vorteilhaft ist, wenn die Intensitätsverteilung der zweiten Struktur komplementär zur ersten ist und die gemittelten Intensitäten beider Beleuchtungsverteilungen nicht stark voneinander abweichen.

Obwohl auch die Nutzung zweidimensionaler Beleuchtungsstrukturen denkbar ist, soll das Prinzip im Folgenden wegen der einfacheren Darstellung an einer Gitterstruktur erklärt werden. Ohne Einschränkung der Allgemeinheit wird die Projektion einer sinusförmigen Gitterstruktur in die zu untersuchende Probe angenommen.

Die erste Struktur, welche in bzw. auf die Probe abgebildet wird, hat die Form:

$$G_1(a,b) = 1 + A \cos(\omega a + \delta). \quad < 1 >$$

Die zweite, zur ersten Struktur komplementäre Struktur ist dann:

$$G_2(a,b) = 1 - A \cos(\omega a + \delta) = 1 + A \cos(\omega a + \pi + \delta). \quad < 2 >$$

Hier sind a und b die lateralen lokalen Koordinaten im System der projizierten Struktur,  $\omega$  ist Gitterfrequenz und die  $\delta$  die Phasenlage des Gitters. Wie aus Gleichung <2> ersichtlich, entspricht die komplementäre Beleuchtungs-

struktur einer Verschiebung der periodischen Struktur um den Phasenwinkel  $\pi$ . Es ist anzumerken, dass die Projektion einer Struktur und ihrer komplementären Struktur erfindungsgemäß ohne bewegliche mechanische Komponenten implementiert werden kann. Dies eliminiert mögliche Phasenfehler durch Positionier-Ungenauigkeiten und wird später erläutert. Weiterhin ist es vorteilhaft, wenn an der Probe die über das Gesichtsfeld gemittelten Intensitäten beider Projektionen nicht zu stark voneinander abweichen.

Die in bzw. auf die Probe projizierten Lichtverteilungen  $G_1(a,b)$  und  $G_2(a,b)$  werden in der Probe gestreut, reflektiert, von ihr transmittiert, absorbiert oder regen Fluoreszenz oder Lumineszenz an. Beliebige Kombinationen dieser genannten Wechselwirkungen sind ebenfalls denkbar, auch bei verschiedenen Wellenlängen. Durch entsprechende Konfiguration der Detektoren kann zusätzlich die Fluoreszenzlebensdauer bestimmt werden, wobei neben der hohen Zeitauflösung des Detektors eine gepulste Anregung bzw. zeitliche Modulation des Anregungslichtes erforderlich ist.

Die in der Probe erzeugte Projektion der Intensitätsverteilung  $G_1(a,b)$  wird vom Ort der Probe auf einen ortsauflösenden Detektor abgebildet. Die Intensitätsverteilungen  $G_1(a,b)$  und  $G_2(a,b)$  sowie die Objektebene (Probe) und der Detektor befinden sich in zueinander konjugierten Bildebenen. Bei der Implementierung in einem Mikroskop ist es vorteilhaft, wenn sich die projizierte Beleuchtungsstruktur in einer zur Feldblende konjugierten Ebene befindet.

Bei Projektion von  $G_1(a,b)$  wird am Detektor die Intensitätsverteilung

$$I_1(x, y) = K(x, y) + S(x, y) * \cos[x * g(x, y) + \alpha(x, y)] \quad < 3 >$$

gemessen. Bei der Projektion der zweiten dazu komplementären Struktur  $G_2(a,b)$  ergibt sich die komplementäre Intensitätsverteilung

$$I_2(x, y) = K(x, y) - S(x, y) * \cos[x * g(x, y) + \alpha(x, y)] \quad < 4 >$$

am Detektor. Hierbei sind  $(x,y)$  die Koordinaten in der Detektorebene,  $g(x,y)$  ist die Modulationsfrequenz (Gitterfrequenz) in Richtung der x-Koordinate, wobei  $g = 2\pi/T$  gilt und  $T$  die Periodizität in x-Richtung ist. Übliche ortsauflösende Detektoren wie CCD's oder CMOS Sensoren sind Pixel-basiert, weshalb die Koordinaten  $(x,y)$  auch in diskreten Pixelkoordinaten angegeben werden können.

Der Parameter  $\alpha(x,y)$  ist die Phase der periodischen Struktur. Die Größe  $K(x,y)$  ist die konventionelle Abbildung, welche auch Bildinformationen von Ebenen außerhalb der Fokusebene enthält. In der Mikroskopie entspricht  $K(x,y)$  der Weitfeld-Abbildung der Probe.

Mit Hilfe der Gleichungen <3> und <4> kann die konventionelle Abbildung einfach berechnet werden:

$$K(x,y) = \frac{I_1(x,y) + I_2(x,y)}{2} \quad . \quad < 5 >$$

Die Größe  $S(x,y)$  ist das gesuchte optische Schnittbild, welches auch der Modulationstiefe durch die strukturierte Beleuchtung entspricht). Das Gleichungssystem, bestehend aus <3> und <4>, enthält insgesamt 4 unbekannte Größen für jeden Ort des Detektors mit den Koordinaten  $(x,y)$ : das konventionelle Schnittbild  $K(x,y)$ , das gesuchte Schnittbild  $S(x,y)$ , die Gitterfrequenz  $g(x,y)$ , sowie die lokale Phase  $\alpha(x,y)$ .

Bei perfekter Geometrie der in bzw. auf die Probe projizierten Beleuchtungsverteilung und perfekter optischer Abbildung wären die Gitterfrequenz und die Phase nicht von den Koordinaten  $(x,y)$  abhängig. Unter praktischen Bedingungen und bei leichten Abbildungsfehlern der Optik ist diese Annahme jedoch nur eine Näherung. Deshalb ist die Bestimmung dieser lokalen Parameter vorteilhaft oder notwendig.

Die Verfahren gemäß dem Stand der Technik [2-7] nehmen eine lokal konstante Gitterfrequenz  $g$  an. Deshalb verbleiben 3 unbekannte Größen und die bisherigen Verfahren [2-7] benötigen mindestens die Messung von 3 Phasenschritten  $\alpha$  der projizierten Struktur, um ein Schnittbild zu berechnen.

Im erfindungsgemäßen Verfahren wird eine Kalibrierschritt durchgeführt, in welchem die lokale Phase  $\alpha(x,y)$  und optional die lokale Gitterfrequenz  $g(x,y)$  für jeden Ort im Detektorkoordinatensystem  $(x,y)$  aus den gemessenen Kalibrierdaten oder den für die Schnittbildberechnung aufgenommenen Bilddaten  $I_1(x,y)$  bzw.  $I_2(x,z)$  bestimmt werden. In beiden Fällen können die gleichen noch zu erläuternden Methoden (z.B. Fouriertransformation oder Waveletverfahren) zur gebietsweisen Bestimmung der lokalen Phase und der lokalen Gitterfrequenz eingesetzt werden.

Durch den Kalibrierschritt bzw. die Kenntnis der lokalen Phase  $\alpha(x,y)$  und der lokalen Gitterfrequenz  $g(x,y)$  und die weiter unten beschriebenen Algorithmen kann erfindungsgemäß die Anzahl der erforderlichen Projektionsschritte zur Erzeugung eines optischen Schnittbildes auf nur zwei reduziert werden. Der bei anderen Verfahren nach dem Stand der Technik übliche dritte oder weitere Schritte entfallen damit im Probenerfassungsmodus. Dies führt auch insbesondere bei der Fluoreszenzmikroskopie zu geringeren Probenbelastungen und geringerem Photo-bleaching. Eine Kalibriermessung verwendet vorzugsweise ein ebenes und homogenes Kalibrierobjekt, welches reflektiert und / oder streut und / oder fluoreszierende Eigenschaften und / oder Lumineszenz aufweist. Das Einschwenken des Kalibrierobjektes und die Kalibriermessung können automatisiert sein. Das Kalibrierobjekt kann dabei an Stelle der zu untersuchenden Probe oder in einer dazu konjugierten Bildebene lokalisiert sein. Für die Kalibriermessung werden mit Hilfe des Kalibrierobjektes ein Kalibrierdatensatz, bestehend aus  $C_1(x,y)$  und optional  $C_2(x,y)$  bei der Projektion der Strukturen  $G_1(a,b)$  bzw.  $G_2(a,b)$  aufgenommen. Bei annähernd homogenen Eigenschaften des Kalibrierobjektes repräsentieren  $C_1(x,y)$  bzw.  $C_2(x,y)$  somit die Beleuchtungsstruktur und ihre Lage im Detektorkoordinatensystem.

Werden die Bilddatensätze  $I_1(x,y)$  bzw.  $I_2(x,z)$  zur Bestimmung der lokalen Phasen verwendet, so enthalten diese Datensätze Probeninformationen, denen die Beleuchtungsstruktur aufgeprägt (aufmoduliert) wurde. Da die Probeneigenschaften im Allgemeinen über das Gesichtsfeld und auch zwischen den einzelnen untersuchten Fokusebenen variieren können, variiert die Qualität der Bestimmbarkeit der lokalen Phasen bzw. Gitterfrequenz ebenfalls

und kann in Abhängigkeit von der Probe eventuell nur gebietsweise möglich sein. Wird wie meist üblich eine Serie von verschiedenen Fokusebenen abgetastet, so können die Informationen aus mehreren Ebenen für den Kalibrierschritt genutzt werden. So kann zum Beispiel für jedes Detektorgebiet diejenige Fokusebene ausgewählt werden, welche die Bestimmung der lokalen Phasen bzw. Gitterfrequenzen mit der besten Qualität ermöglicht. Ein Beispielkriterium für die Qualität der Bestimmung der lokalen Parameter wird weiter unten angegeben (siehe Metrik in <5c>). Die Kenntnis der lokalen Parameter kann bei Schwierigkeiten bei der Bestimmung in einigen Gebieten durch Interpolation (lateral und / oder axial) bzw. durch periodische Fortsetzung auf das gesamte Detektorkoordinatensystem ausgedehnt werden. Bei diesem Prozess sollten Daten aus Gebieten mit hoher Qualität der Bestimmung der lokalen Parameter entsprechend bevorzugt verwendet werden.

Die gebietsweise Bestimmung der lokalen Phase  $\alpha(x,y)$  und der lokale Gitterfrequenz  $g(x,y)$  soll nun am Beispiel einer Fouriermethode illustriert werden. Die Nutzung von Wavelet-Techniken oder iterative Verfahren sind ebenfalls denkbar.

Die lokale Gitterfrequenz  $g(x,y)$  ist in üblichen Anordnungen eine stetige Funktion mit nur allmählichen Änderungen innerhalb des Gesichtsfeldes. Näherungsweise kann sie ebenfalls durch die Entfernung  $E$  in der Abbildung bestimmt werden, welche von einer bekannten Anzahl an Perioden  $n$  überdeckt wird, es gilt  $g = n2\pi/E$ . Zur genaueren Bestimmung definieren wir die Größen

$$FT_C(g, x, y) = \iint_F L(x, y) \cos(g * x) dx dy \quad \text{und} \quad < 5b >$$

$$FT_S(g, x, y) = \iint_F L(x, y) \sin(g * x) dx dy.$$

Hier steht  $L(x,y)$  für den zu untersuchende Datensatz, welcher ein Datensatz aus der Kalibrierung ( $C_1(x,y)$  bzw.  $C_2(x,y)$ ) oder ein Bilddatensatz ( $I_1(x,y)$  bzw.  $I_2(x,z)$ ) sein kann. Das Integrationsgebiet  $F$  hat dabei die Koordinaten  $(x,y)$  als Mittelpunkt überdeckt in guter Näherung eine ganzzahlige Anzahl von Perioden der Struktur. Die Integration kann im Fall von diskreten

Koordinaten  $(x,y)$  durch eine entsprechende Summation ersetzt werden. Nun definieren wir die Metrik

$$M(g,x,y) = \sqrt{FT_C^2(g,x,y) + FT_S^2(g,x,y)} \quad < 5c >$$

Der Wert von  $g(x,y)$  ist nun genau der positive Wert, welcher die Metrik  $M(g,x,y)$  maximiert. Die Größe des Wertes  $M(g,x,y)$  entspricht für den Fall das  $g$  die Gitterfrequenz ist, der lokalen Modulationstiefe durch das Gitter. Deshalb ist  $M(g,x,y)$  zusätzlich ein nützliches Kriterium für die Qualität bzw. Genauigkeit der Bestimmung der lokalen Parameter. Die lokale Phase  $\alpha(x,y)$  kann nun ebenfalls berechnet werden, denn es gilt:

$$\tan[\alpha(x,y)] = \frac{FT_S[g(x,y),x,y]}{FT_C[g(x,y),x,y]} \quad < 5d >$$

Der Wert von  $\alpha(x,y)$  kann nun durch Invertierung der Tangensfunktion unter Berücksichtigung der Vorzeichen von  $FT_S$  bzw.  $FT_C$  für die Quadrantenzuordnung erhalten werden. Die Funktion `atan2( . , . )` der Programmiersprache C tut dies automatisch.

Die Bestimmung der lokalen Phasen aus den Bilddaten  $I_1(x,y)$  bzw.  $I_2(x,z)$  kann zwar zu einer etwas geringeren Genauigkeit der lokalen Phasen im Vergleich zu einer Kalibrierung führen, ermöglicht jedoch den Wegfall der Kalibrierung und des dazugehörigen apparativen Aufwandes. Die Balance zwischen Genauigkeit und Ortsauflösung der lokalen Parameter kann durch Wahl der Größe des Gebietes  $F$  an die jeweiligen Gegebenheiten des Objektes angepasst werden.

Im Folgenden wird angenommen, dass die lokale Phase  $\alpha(x,y)$  und die lokale Gitterfrequenz  $g(x,y)$  wie beschrieben aus dem Kalibrierschritt ermittelt wurden oder durch a-priori Wissen bekannt sind.

Für die Berechnung des Schnittbildes werden unter Verwendung von <3> und <4> nun folgende Größen eingeführt:

$$D_1(x, y) = \frac{\partial I_1(x, y)}{\partial x} = -g(x, y) * S(x, y) * \sin[x * g(x, y) + \alpha(x, y)] \quad < 6 >$$

$$D_2(x, y) = \frac{\partial I_2(x, y)}{\partial x} = +g(x, y) * S(x, y) * \sin[x * g(x, y) + \alpha(x, y)]. \quad < 7 >$$

Nun lässt sich das gesuchte Schnittbild mit Hilfe der Gleichungen <3>, <4>, <6> und <7> einfach berechnen:

$$S(x, y) = S(x, y) \sqrt{\cos^2[x * g(x, y) + \alpha(x, y)] + \sin^2[x * g(x, y) + \alpha(x, y)]}$$

$$S(x, y) = \sqrt{\left[ \frac{I_1(x, y) - I_2(x, y)}{2} \right]^2 + \left[ \frac{D_1(x, y) - D_2(x, y)}{2 * g(x, y)} \right]^2}. \quad < 8 >$$

Weiterhin kann es Inhomogenitäten in der Beleuchtungsverteilung der beiden Strukturen am Detektor geben. Diese können sowohl durch die Imperfektionen der projizierten Struktur selbst, Inhomogenitäten bei der Projektion in bzw. auf die Probe oder der anschließenden Abbildung auf den Detektor entstehen. Erfindungsgemäß können deshalb die Daten  $I_1(x, y)$  und  $I_2(x, y)$  zur Kompensation von Inhomogenitäten normiert werden:

$$N_1(x, y) = \frac{I_1(x, y)}{C_1(x, y)} ; \quad N_2(x, y) = \frac{I_2(x, y)}{C_2(x, y)}. \quad < 9 >$$

Dabei sind

$$\overline{C}_1(x, y) = \frac{\iint_F I_1(x, y) dx dy}{F} ; \quad \overline{C}_2(x, y) = \frac{\iint_F I_2(x, y) dx dy}{F} \quad < 10 >$$

die Mittelwerte von  $C_1(x, y)$  bzw.  $C_2(x, y)$  über ein Gebiet  $F$ , welches die Koordinaten  $(x, y)$  beinhaltet und eine ganzzahlige Anzahl von Perioden der Struktur überdeckt.

Die Kompensation von nachteiligen Effekten durch die Inhomogenität der Intensitäten der abgebildeten Beleuchtungsstrukturen (Ausleuchtungsprobleme oder Maskenimperfektion) oder auch Inhomogenitäten des Detektors

können durch die Verwendung der normierten Größen  $N_1(x,y)$  und  $N_2(x,y)$  anstelle der aufgenommenen Größen  $I_1(x,y)$  und  $I_2(x,y)$  in den Gleichungen <5, 6, 7, 8 > erfolgen.

Die Berechnung von Schnittbildern durch Projektion und Detektion von zwei Beleuchtungsverteilungen je Schnittbild im Probenerfassungsmodus wurde hier am vereinfachten Beispiel der Projektion einer kontinuierlich variierenden, sinusförmigen Beleuchtungsstrukturierung demonstriert. Oft werden jedoch auch binäre Verteilungen genutzt, da derartige Masken einfacher und kostengünstiger herzustellen sind. Zur Reduktion von Bildartefakten im Zusammenhang mit binären oder anderen Masken ist die Kenntnis der lokalen Phasen der Beleuchtungsstruktur ebenfalls wichtig und kann durch den Kalibrierschritt erreicht werden.

Das beschriebene Verfahren kann in einer Vielzahl von Anordnungen verwirklicht werden, insbesondere in weitfeld-Fluoreszenz Mikroskopen und in Weitfeld-Mikroskopen zur Untersuchung und Tiefenerfassung von Oberflächen im Auflichtbetrieb.

Im folgenden sollen anhand von Zeichnungen erfindungsgemäße Anordnungen zur Implementierung des o. g. Verfahrens erläutert werden.

Figur 1 zeigt eine vereinfachte Anordnung zur Implementierung des Verfahrens. Zur vereinfachten Darstellung wurden optional vorhandene Zwischenbilder und relay-Optiken nicht gezeichnet. Die Beleuchtungseinheit (1) generiert erfindungsgemäß zwei verschiedene Lichtverteilungen. Dabei befindet sich in Ebene (3) eine beleuchtete Maskenstruktur, ein beleuchteter DMD chip (digital mirror device, auch als DLP Technik von Texas Instruments bekannt) oder aber eine Zwischenabbildung einer Lichtverteilung, welche eine Modulation in mindestens einer Raumrichtung aufweist.

Da der Begriff Maske bzw. Maskenstruktur vielfach in diesem Dokument verwendet wird, soll er genauer definiert werden: eine Maske ist ein optisches Element, dessen physikalische Eigenschaften, insbesondere Transmission und / oder Reflexion und / oder Absorption und / oder optische Weglänge über die Fläche des Elementes strukturiert wurden. Wenn die optische Weglänge



strukturiert wurde, spricht man von einer Phasenmaske, die zum Beispiel durch das Ätzen von Strukturen in einem Glassubstrat hergestellt werden kann. Eine Phasenmaske kann bei Beleuchtung durch Diffraktion eine bestimmte Beleuchtungsverteilung erzeugen und kann eine hohe optische Effizienz erreichen. Alle hier genannten Maskentypen werden im Folgenden unter dem Begriff Maske zusammengefasst.

Die in der Ebene (3) vorhandene Lichtverteilung wird über den Strahlteiler (7) und das Objektiv (5) auf oder in das zu untersuchende Objekt (10) projiziert. Dabei sind die Ebene (3) und die nominale Objektebene (9) zueinander konjugiert. Der Strahlteiler (7) kann ein halbdurchlässiger Spiegel oder auch ein dichroitischer Strahlteiler sein. Multi-Band Strahlteiler können ebenfalls eingesetzt werden. Die auf bzw. in die Probe projizierte Lichtverteilung wird nun über ein Objektiv und weitere Zwischenoptiken auf die Detektionseinheit (11) abgebildet. Die Ebene (13) ist dabei eine Bildebene oder Zwischenbildebene, welche konjugiert zu den Ebenen (9) und (3) ist. Die Lage der Fokusebene innerhalb des Objektes kann mittels einer Fokussiereinrichtung eingestellt werden, wobei dies gewöhnlich durch eine axiale Bewegung des Objektivs (5) oder der Probe realisiert wird. In einem Mikroskopsystem ist es vorteilhaft, wenn die Ebene (3) mit der zu projizierenden Lichtverteilung konjugiert zur Ebene der Leuchtfeldblende ist. Innerhalb der Detektionseinheit (11) kann sich dabei ein Ortsaufgelöster Detektor, wie zum Beispiel ein CCD oder ein CMOS-Sensor befinden. Alternativ dazu kann die Einheit (11) auch das sich in Ebene (13) befindliche Bild weiter auf einen oder mehrere Detektoren abbilden.

Figur 2 zeigt eine erfindungsgemäße Anordnung zur Realisierung der Beleuchtungseinheit (1). Die beiden Lichtquellen (19) und (23) sind dabei derart angeordnet, dass sie eine Maskenstruktur in Ebene (3) unter Nutzung eines Strahlteilers (21) von verschiedenen Seiten beleuchten. Die Lichtquellen (19) und (23) können dabei in ihrer Intensität und optional auch in der spektralen Zusammensetzung des emittierten Lichtes gesteuert werden. Falls die zeitgleiche Beleuchtung der Maskenstruktur in Ebene (3) von beiden Seiten erfolgt, können die beiden Lichtquellen (19) und (23) auch durch eine

einzigste Lichtquelle ersetzt werden, welche durch Nutzung eines Strahlteilers und geeignete Strahlführung die Maske von beiden Seiten beleuchtet.

Die Maske in Ebene (3) hat Bereiche, welche besonders stark reflektieren und dazu komplementäre Bereiche mit besonders hoher Transmission. Eine solche Maske kann nicht nur binäre Strukturen sondern auch kontinuierliche Verteilungen enthalten. In Ebene (3) kann sich eine strukturierte Spiegelfläche befinden. Dabei werden von beiden Lichtquellen zueinander komplementäre Lichtverteilungen durch Transmission (Lichtquelle (19)) und durch Reflexion (Lichtquelle (23)) an der Maskenstruktur in Ebene (3) erzeugt.

Es ist hervorzuheben, dass eine solche Anordnung zwei verschiedene Beleuchtungsverteilungen zur Verfügung stellt, welche die simultane oder zeitsequentielle Projektion von zwei Strukturen bzw. zwei verschiedenen Phasenlagen derselben Struktur ohne jegliche beweglichen mechanische Elemente ermöglicht. Dies führt zu Geschwindigkeitsvorteilen und auch zu reduziertem Justieraufwand bei der Implementierung des erfindungsgemäßen Verfahrens und ist ein wesentlicher Vorteil gegenüber dem Stand der Technik.

Bei zeitsequentiellen Betrieb emittiert entweder die Lichtquelle (19) oder die Quelle (23) Licht, wobei die Aufnahmen der Abbildung der Probe mittels der Detektionseinheit (11) dazu synchronisiert sind.

In einer weiteren Ausgestaltung der Erfindung werden beide Lichtverteilungen bzw. Beleuchtungsstrukturen zeitgleich abgestrahlt. Zu einer Kodierung der beiden Verteilungen kann dazu die Polarisierung des abgestrahlten Lichtes oder seine spektrale Charakteristik genutzt werden. Hierzu werden die beiden optionalen Polarisationsfilter bzw. Spektralfilter (20) und (24) in Figur 2 genutzt. Im Falle von Polarisationsfiltern sind diese gekreuzt zueinander angeordnet, sodass das in Richtung (22) abgestrahlte Licht, welches die Filter (20) bzw. (24) durchlaufen hat, zwei zueinander orthogonale Polarisationsrichtungen aufweist. Alternativ zu linear polarisiertem Licht kann eine Kennzeichnung bzw. Trennung der Projektionskanäle durch links- oder rechtszirkular polarisiertes Licht erfolgen.

Die erfindungsgemäße Anordnung zur zeitsimultanen und durch Polarisierung oder spektrale Charakteristik kodierten Abstrahlung von zwei komplementären Beleuchtungsstrukturen hat zusätzliche Geschwindigkeitsvorteile und ermöglicht die Erzeugung von Schnittbildern in Echtzeit, wie es insbesondere bei der Materialmikroskopie im Auflichtbetrieb und zur Konstruktion von Oberflächenvermessungssystemen für mikroskopische und makroskopische Objekte wünschenswert ist.

Eine weitere Möglichkeit zur erfindungsgemäßen Implementierung einer Beleuchtungseinheit (1) ist in Figur 2b dargestellt, wobei die Bezeichnungen von Figur 2 übernommen sind. Hier sind zwei Masken angeordnet, welche beide in zueinander konjugierten Ebenen (3) liegen. Beide Masken werden im Durchlicht betrieben. Die hier dargestellte Anordnung hat eine etwas höhere optische Effizienz im Vergleich zu Figur 2, erfordert jedoch auch die Justierung der beiden Masken aufeinander, sodass in Richtung (22) je nach Wahl der Lichtquelle zwei Beleuchtungsverteilungen abgegeben werden, welche zueinander um 180 Grad Phasenverschoben sind. Diese Justierung muss nur einmal vorgenommen werden und ist unproblematisch, da nur die Justierung der planen Fläche des Strahlteilers (21) notwendig ist, welcher vernachlässigbare Verzerrungen in der Abbildung verursacht.

Figur 3 zeigt eine erfindungsgemäße und vorteilhafte Anordnung zur Implementierung der Lichtquellen (19) und (23). Hier sind die Lichtquellen (19) und (23), welche Teil der Beleuchtungseinheit (1) sind, durch den Ausgang von zwei Lichtleitern (37) und (39) ersetzt. Der Aufbau enthält weiterhin eine Anzahl von  $n$  Lichtquellen, wovon in Figur 3 nur die Lichtquelle 1 (25) und die Lichtquelle  $n$  (27) dargestellt sind. Diese Lichtquellen können auch verschiedene spektrale Anteile des von einer einzigen Quelle erzeugten und räumlich spektral aufgespalteten Lichtes darstellen. Die verschiedenen Lichtquellen können unterschiedliche spektrale Eigenschaften haben. Ein Lichtwellenleiter (31) ist mit den Aktuatoren (33) und (35) verbunden und nutzt die Kopplungsoptiken (29). Die gesamte Anordnung arbeitet als erfindungsgemäß als schaltbare Weiche, welche es ermöglicht, eine beliebige Licht-

quelle mit einem der beiden Lichtleiterausgänge (19) oder (23) zu verbinden. Dies hat zwei Hauptvorteile: erstens wird nur ein Exemplar einer Lichtquelle benötigt, was die Kosten senkt und die gleiche spektrale Verteilung in beiden Projektionsschritten sicher stellt. Zweitens können die Ausgänge (19) und (23) als fest justierte Punktlichtquellen fungieren, auf welche die restliche Optik der Projektionseinheit justiert ist und bleibt. Dies reduziert den Justieraufwand.

In Figur 4 ist eine mögliche Ausgestaltung der Maske dargestellt, welche Teil der in Figur 2 gezeigten Projektionseinheit sein kann und dort in Ebene (3) angeordnet ist. Im einfachsten Fall befinden sich auf einem transparenten Substrat (41) alternierend angeordnete homogene Gebiete (47) mit hoher Reflektivität (49) und geringer Transparenz sowie homogene Gebiete (45) mit hoher Transparenz (43). Hierbei ist die Gesamtfläche jeweils der transparenten und der intransparenten Flächen gleich groß. Obwohl in diesem Beispiel eine binäre Struktur gewählt wurde, sind auch Maskendesigns mit mehreren Stufen für Transmission und Reflexion oder kontinuierliche Verteilungen denkbar.

In Figur 5 ist eine Anordnung für eine Beleuchtungseinheit (1) entsprechend dem Stand der Technik [2] dargestellt, wobei eine Maske (52) im Durchlicht betrieben und von einem Aktuator (51) senkrecht zur optischen Achse bewegt wird. Eine solche Vorrichtung kann auch für die Implementierung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Schnittbildgenerierung aus zwei Projektionsschritten verwendet werden. Gegenüber dem Stand der Technik mit drei Projektionsschritten ermöglicht dies eine höhere Probenabtastgeschwindigkeit und geringeres Photo-bleaching. Im Vergleich zur erfindungsgemäßen Implementierung mit feststehender Maske in Figur 2 erfordert dies jedoch den Aktuator (51), welcher eine sehr hohe Reproduzierbarkeit bei der Einstellung der beiden projizierten Lichtverteilungen liefern muss.

In Figur 6 werden Aspekte zur Kalibriermessung und zur chromatischen Korrektur erläutert. Hier wurde die diagrammatische Darstellung von Figur 1 durch eine zusätzlich dargestellte Zwischenoptik (55) ergänzt. Zur Kalibrier-

messung kann je nach Erfordernissen ein fluoreszierendes und / oder reflektierendes und /oder streuendes Element (53) in den Strahlengang geschwenkt werden. Die Ebene des Elementes (53) entspricht einer Zwischenbildebene und ist zu (3),(9) und (13) konjugiert. Die Lage und Gestalt des Zwischenbildes und das im Fall einer ebenen Probe von der Probe zurück in die Ebene des Elementes (53) abgebildete Zwischenbild können deckungsgleich sein. Aus diesem Grund kann das Einschwenken von Element (53) äquivalent zur Montage eines Kalibrierobjektes vor dem Objektiv (5) sein. Das Einschwenken des Elementes (53) kann dabei vollautomatisch und im Inneren der optischen Anordnung geschehen. Dies vereinfacht die Benutzung und ermöglicht eine vollautomatische Kalibriermessung, d.h. die Aufnahme von Daten zur späteren Bestimmung der lokalen Phase  $\alpha(x,y)$  und optional der lokale Gitterfrequenz  $g(x,y)$  für jeden Ort im Detektorkoordinatensystem  $(x,y)$  unter Nutzung eines bekannten Kalibrierobjektes. Zusätzlich kann dieses Objekt nicht verschmutzen oder verloren gehen, da es Teil der optischen Anordnung ist. Das Element (53) kann eine diffus reflektierende, fluoreszierende oder eine nur bei einer bestimmten Wellenlänge reflektierende Oberfläche haben. Eine Kalibriermessung kann, unabhängig von Element (53), jederzeit auch durch ein Kalibrierobjekt erfolgen, welches manuell vor dem Objektiv (5) im Probenraum positioniert wird.

Ein weiteres Problem von Anordnungen entsprechend dem Stand der Technik ist eine Schwankung der Beleuchtungsintensität während der Projektion. Insbesondere Quecksilber-Hochdrucklampen können bauartbedingte Schwankungen der Beleuchtungsintensität aufweisen, welche zu Artefakten beim Verfahren der strukturierten Beleuchtung führen können. Dies kann durch eine gleichzeitig mit der Bildaufnahme erfolgende Messung der relativen Beleuchtungsdosis der verschiedenen Projektionsschritte auf dem Detektor (11) gemessen werden. Diese Information über die relativen Beleuchtungsintensitäten kann dann in der Berechnung des Schnittbildes genutzt werden und somit zur Reduzierung von Artefakten beitragen. Zur Messung der relativen Beleuchtungsdosis kann die Beleuchtungsstruktur, welche sich am Ort (3) befindet oder dorthin abgebildet wird, Testgebiete am Rand einer jeden projizierten Struktur haben. Ein Element, welches auch das Kalibrationselement

(53) sein kann, wird nun erfindungsgemäß nur Teilweise in den Strahlengang am Ort eines Zwischenbildes der projizierten Struktur, z.B. Ort von (53), eingeschwenkt, sodass es auf dem Detektor (11) nur am Rand des Gesichtsfeldes abgebildet ist. Dieses Element verbleibt während der gesamten Projektionsprozedur zur Schnittbildgenerierung im Strahlengang. Dies erlaubt die Protokollierung der relativen Intensitäten der Projektionsschritte auf dem Detektor (11) unabhängig von der betrachteten Probe und deren Eigenschaften.

Ein zusätzliches Problem bei Anordnungen entsprechend dem Stand der Technik und Hindernis beim Erreichen hoher System-Geschwindigkeiten tritt bei der Abbildung mit mehreren Wellenlängen auf, insbesondere in der Fluoreszenzmikroskopie. Durch chromatische Aberrationen, insbesondere axiale chromatische Aberrationen, sind die Ebenen (3) und (13) in Figur 6 nicht mehr exakt zueinander konjugiert. Dies wird bei Anordnungen entsprechend dem Stand der Technik gelöst durch eine Refokussierung der abgebildeten Maske, entsprechend einer axialen Verschiebung von Ebene (3) in Figur 6. Hierbei sind oft große Verstellwege erforderlich, was zu langen Positionierungszeiten der und damit insgesamt zu langen Prozesszeiten bei der optischen Abtastung mit mehreren Wellenlängen führt. Insbesondere in der Fluoreszenzmikroskopie ist jedoch die simultane oder zumindest zeitnahe Aufnahme mittels verschiedener Wellenlängen oft erforderlich.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch spektrale Korrekturmaßnahmen, ohne die Bewegung der projizierten Struktur oder Maske gelöst. Hierzu werden optional in den Ebenen (15) und / oder (17) und optional auch in der Detektionseinheit (11) (siehe Figur 6) Korrektur Elemente eingesetzt. Diese Korrektur Elemente können zum Beispiel Linsen mit bekannten Dispersionseigenschaften, diffraktive optische Elemente oder Hologramme sein, welche die spektralen Eigenschaften der Optik beeinflussen. Diffraktive optisches Korrektur Elemente können spezifisch für die Korrektur einer bestimmten optischen Konfiguration gefertigt werden. Bei einem Wechsel des Objektivs der Anordnung kann ein Wechsel der Korrektur Elemente ebenfalls erforderlich sein.

Eventuell zusätzlich vorhandene Korrekturmaßnahmen innerhalb der Detektionseinheit (11) werden weiter unten mit Hilfe von Figur 10 erläutert. Es ist vorteilhaft, wenn die Korrektur Elemente (15) und (17) in einem im Wesentlichen kollimierten Teil des Strahlengangs lokalisiert sind. Die Korrektur der axialen chromatischen Aberration kann hierbei auf zwei Wegen erfolgen, wobei beide Ausführungen auf die axiale Bewegung der projizierten Struktur verzichten können.

In der ersten Variante, der chromatischen Teilkorrektur, wird durch den Einsatz der Korrektur Elemente sicher gestellt, dass die Ebenen (3) und (13) bei allen verwendeten Abbildungswellenlängen zueinander konjugiert sind. Durch eine derartige Korrektur kann es, obwohl die Ebenen (3) und (13) zueinander konjugiert bleiben, zu einer verbleibenden Wellenlängen-Abhängigkeit der axialen Position des Projektionsortes der Beleuchtungsstruktur in bzw. auf der Probe (10) kommen. Dies kann einfach per Software kompensiert werden, indem bei einer Abtastung einer physikalischen axialen Position der Probe die axial leicht verschobenen Abbildungsorte beim schichtweisen Aufbau des 3D Datensatzes der Probe berücksichtigt und zugewiesen werden. Alternativ dazu kann die Probe selbst axial um den Betrag des axialen Versatzes beim Wechsel der Wellenlänge verschoben werden. Dies kann in den meisten Mikroskop-Anordnungen Probenseitig schneller erfolgen als die axiale Bewegung der Beleuchtungsseitigen Struktur (Maske oder DMD). In der zweiten Variante wird durch vollständige axiale chromatische Korrektur sicher gestellt, dass die Ebenen (3) der projizierten Struktur, (9) in bzw. auf der Probe und (13) auf dem Detektor konjugiert zueinander sind für alle genutzten Wellenlängen.

Figur 7 zeigt eine weitere erfindungsgemäße Ausführung der Beleuchtungseinheit (1). Hier ist in Ebene (3) ein DMD chip (digital mirror device, auch als DLP Technik von Texas Instruments bekannt) angeordnet. Die Lichtquelle (23) beleuchtet mittels des Strahlteilers (21) den DMD Chip. Die zu projizierende, auf dem Chip dargestellte Beleuchtungsverteilung wird nun durch (21) hindurch abgestrahlt. Anstelle des DMD Chips sind auch LCD-Module denkbar,

welche in Ebene (3) angebracht sind und im Durchlicht und mittels der in Figur 2 dargestellten Lichtquelle (19) betrieben werden. Eine solche Anordnung hat den Vorteil, dass die zu projizierende Struktur per Software und sehr schnell geändert werden kann. Eine Anpassung der projizierten Struktur an eine andere Optik, wie sie zum Beispiel bei einem Wechsel des Objektivs notwendig sein kann, ist somit einfach und schnell möglich.

Figur 8 zeigt ein erfindungsgemäßes Implementierungsbeispiel für die Detektionseinheit (11). Hier wird das einfallende Licht mittels eines Strahlteilers (57) auf zwei ortsauflösenden Detektoren (z.B. CCD's) verteilt, welche sich in den beiden konjugierten Ebenen (13) befinden. Der Strahlteiler (57) kann zum Beispiel ein dichroitischer Spiegel oder ein Polarisationsstrahlteiler sein. Somit können, je nach verwendetem Strahlteiler, zwei Spektrale Bereiche oder zwei Polarisationszustände der Abbildung zeitgleich und getrennt beobachtet werden.

Wenn die beiden projizierten Lichtverteilungen durch Polarisation oder spektral entsprechend Figur 2 kodiert sind, kann Projektion und Aufnahme der beiden Beleuchtungsstrukturen zeitgleich und in Echtzeit erfolgen. Dies ermöglicht die Konstruktion von schnellen Aufbauten zur Oberflächenvermessung nach dem erfindungsgemäßen Verfahren, welche prinzipbedingt deutlich schneller als bisherige Verfahren sind.

Figur 9 zeigt eine weitere Möglichkeit zur Implementierung der Detektionseinrichtung (11), welche einen Strahlteiler (59) und einen Vollspiegel (61) verwendet. Der Strahlteiler (59) kann ein dichroitischer Spiegel oder ein Polarisationsstrahlteiler sein. Die parallele Detektion ist ähnlich zu der in Figur 8 dargestellten Implementierung. Es kann jedoch parallele Beobachtung mit nur einem einzigen in der Ebene (13) positionierten Detektor erfolgen, wodurch bei reduzierter Auflösung Kosten gespart werden können.

Figur 10 erläutert erfindungsgemäße Modifikationen bestehender Optikanordnungen, welche die zeitgleiche Erstellung von Schnittbildern in verschiedenen spektralen Kanälen ermöglicht, ohne die projizierte Lichtverteilung (z.B. Maske) axial zu bewegen. Diese Maßnahme kann in Kombination mit oder un-



abhängig von der anhand von Figur 6 erläuterten spektralen Korrekturalelemente (15) und (17) erfolgen. Entsprechend dem Stand der Technik gibt es Anordnungen, welche die Abbildung eines Objektes in verschiedene Kanäle (z.B. spektral oder Polarisation) zerlegen und diese Kanäle zeitgleich nebeneinander auf einem ortsauflösenden Detektor, wie z.B. ein CCD Chip, abbilden [10]. Bei axialer chromatischer Aberration, kann die axiale Position des eingangsseitigen Zwischenbildes (13) von der Wellenlänge abhängen. Die optische Einheit (63) spaltet dabei die Abbildung anhand ihrer spektralen Charakteristik in mehrere Kanäle, wobei hier vier dargestellt sind. Danach können in den Einzelkanälen entsprechend dem Stand der Technik spektrale Filter (65) in einem im Wesentlichen kollimierten Bereich des Strahlengangs angeordnet sein. Die optische Einheit (69) fokussiert die parallelen Kanäle derart, dass sie nebeneinander auf einem ortsauflösenden Detektor (71) abgebildet werden. In Figur 10 sind 4 Kanäle linear nebeneinander angeordnet, die Projektion in 4 verschiedene Quadranten des Detektors ist ebenfalls üblich. Erfindungsgemäß wird diese Anordnung durch ein oder mehrere Korrekturalelemente (67) modifiziert, welche vorzugsweise im kollimierten Teil des parallelen Strahlengangs und vorzugsweise nach den spektralen Filtern (65) angeordnet sind. Die Korrekturalelemente (67) können jeweils mit den Filtern (65) eine Einheit bilden. Die Korrekturalelemente sind vorzugsweise diffraktive optische Elemente. Diese Korrektur stellt sicher, dass trotz der in Abhängigkeit von der Wellenlänge leicht verschiedenen axialen Eingangsposition des Zwischenbildes (13), alle spektralen Kanäle parallel und zeitgleich auf den Detektor (71) fokussiert werden. Die diffraktiven optischen Elemente oder Hologramme (67) können für verschiedene Kanäle auch nebeneinander auf dem gleichen Substrat untergebracht sein.

Durch die Kombination der erfindungsgemäßen zeitgleichen Detektion verschiedener spektraler Kanäle ohne die Bewegung mechanischer Elemente und die erfindungsgemäße Implementierung von Verfahren und Anordnung zur Schnittbildgenerierung aus zwei Beleuchtungsschritten ohne bewegliche mechanische Elemente können optische Systeme mit Tiefendiskriminierung und hoher optischer Effizienz konstruiert werden, welche deutlich schneller und

dabei trotzdem einfacher und preiswerter zu konstruieren sind als bisher mit dem Stand der Technik möglich.

Da der spektralen Korrektur der verschiedenen spektralen Abbildungskanäle eine wichtige Rolle zukommt und sie bei den Systemen der strukturierten Beleuchtung entsprechend dem Stand der Technik als wesentliches Hindernis für eine weitere Geschwindigkeitssteigerung bei der Abtastung mit mehreren Wellenlängen angesehen werden kann, sollen im Folgenden weitere erfindungsgemäße Lösungen zur spektralen Korrektur in einem System zur strukturierten Beleuchtung angegeben werden. Ziel einer spektralen Korrekturvorrichtung ist es, die Fokusebene der in der Probe erzeugten Beleuchtungsstruktur mit der zum Detektor (z.B. CCD Kamera) konjugierten Fokusebene für verschiedene Wellenlängen in Übereinstimmung zu bringen.

Durch die spektralen Eigenschaften der Optik, d.h. Unterschiede der spektralen Eigenschaften der Optikpfade für Beleuchtung und Detektion, kann sich die axiale Position der in die Probe projizierten Beleuchtungsstruktur je nach Wellenlänge von der auf den Detektor abgebildeten Ebene unterscheiden. Somit wären die Ebenen (3) und (13) (siehe Figur 1) nicht mehr wie gefordert konjugiert zueinander. Die Aufgabe der spektralen Korrektur besteht darin, die Konjugation der Ebenen (3) und (13) zu gewährleisten. Dies kann zum Beispiel durch eine axiale Positionierung der Beleuchtungsstruktur oder einer entsprechenden Verschiebung der Tubuslinse gelöst werden. Alternativ dazu können die spektralen Eigenschaften der Optik wie im vorangehenden Ausführungsbeispiel derart korrigiert werden, dass die Ebene (3) aus Figur 1 unabhängig von der Wellenlänge konjugiert zur Ebene (13) ist. Entsprechend dem Stand der Technik wird die chromatische Korrektur durch die axiale Bewegung der projizierten Struktur (Gitter) mit Hilfe eines Schrittmotors gelöst, was relativ zeitraubend ist. Des Weiteren muss bekanntermaßen das Gitter zur Anpassung an verschiedene Abbildungsbedingungen zur Einstellung bzw. Auswahl der Gitterperiode manuell gewechselt werden.

Im Folgenden wird nun ein erfindungsgemäße Anordnung offenbart, welche sowohl das Problem der chromatischen Korrektur mit erhöhter Geschwindigkeit als auch den Wechsel einer Beleuchtungsstruktur (z.B. Gitter) ermöglicht. Eine erfindungsgemäße Ausführung ist in Figur 11 abgebildet.

Die in bzw. auf die Probe projizierte periodische Beleuchtungsstruktur ist vorzugsweise in Form einer Maske ausgeführt und wird mit Hilfe eines Komponentenwechslers in den Strahlengang eingeschwenkt. Die Maske befindet sich dabei in einer zu Ebene (3) konjugierten axialen Position (siehe Figur 1). Der Komponentenwechsler ist hier als Komponentenrad (73) ausgeführt, lineare Anordnungen mit linearen Wechselmechanismen sind ebenfalls denkbar. Figur 11a zeigt eine Ebene senkrecht zur optischen Achse, Figur 11b eine Schnittdarstellung durch die Rotationsachse (81) des Komponentenrades (73) in einer Ebene (79) parallel zur optischen Achse. Das Komponentenrad (73) hat mehrere Komponentenaufnahmen (75) für optische Komponenten, welche durch Drehung (77) des Rades in den Strahlengang eingebracht bzw. gewechselt werden können. Es ist vorteilhaft, wenn die Einzelpositionen des Komponentenrades zusätzlich durch entsprechende Rastungen definiert sind. In Figur 11 ist ein Beispiel mit 6 Komponentenaufnahmen (75) skizziert, die Anzahl der Komponentenaufnahmen (75) kann jedoch den Erfordernissen angepasst werden. Erfindungsgemäß ist das Komponentenrad (73) derart konstruiert, dass axiale Position der sich darin befindlichen optischen Komponenten (87) durch eine Justierung in axialer Richtung (85) voreingestellt werden kann.

Im Schnittbild Figur 11b sind zwei optische Komponenten (87) eingezeichnet, welche sich an unterschiedlichen axialen Positionen befinden. Die Verstellung der optischen Komponenten (87) in axialer Richtung (85) kann dabei manuell oder auch durch elektrische Aktuatoren erfolgen. In Figur 11 ist ein Ausführungsbeispiel mit manuellen Justierknöpfen (83) für die Justierung in axialer Richtung (85) dargestellt. Wichtig ist hier, dass der Wechsel zwischen zwei Komponenten des Komponentenrades (73) schnell erfolgen kann. Wechselzeiten um die 50 ms sind hier erreichbar. Eine direkte axiale Positionierung der projizierten Struktur mittels Schrittmotor entsprechend dem Stand der

Technik [4] könnte dies nur mit sehr hohem Aufwand erreichen. Ein Geschwindigkeitsvorteil ergibt sich mit der offenbarten Anordnung, da man schnell zwischen vorjustierten axialen Positionen der verschiedenen optischen Komponenten (87) wechselt, während die eigentliche axiale Justierung manuell oder mit langsamen und preiswerten Aktuatoren vorgenommen werden kann. Das Komponentenrad (73) kann erfindungsgemäß strukturierte Masken mit unterschiedlichen Strukturgrößen aufnehmen. Wenn eine Komponentenaufnahme (75) nicht bestückt wird, ermöglicht dies zusätzlich die Umschaltung des Abbildungssystems vom Modus der Strukturierten Beleuchtung in den Konventionellen Modus. Die optischen Komponenten (87), welche in den Komponentenaufnahmen (75) gehalten sind, können eine vormontierte Einheit, bestehend aus einem Spektralfilter (91) und einer zu projizierenden Struktur (89) sein (siehe vergrößerte Darstellung in Figur 11c). Dabei kann das Element (89), welches zur Erzeugung einer Beleuchtungsverteilung am Ort der Probe genutzt wird eine Maske sein, welche in Transmission und / oder Reflexion und / oder ihren Phaseneigenschaften strukturiert wurde, wobei es eine Periodizität der Strukturierung in mindestens einer Richtung gibt. Eine oder mehrere Leuchtfeldblenden (Iris oder feste Durchmesser) können ebenfalls in den Komponentenaufnahmen (75) bzw. der Einzelkomponente (79) montiert werden.

Die beschriebene und in Figur 11 dargestellte Anordnung kann somit gleichzeitig mehrere Aufgaben erfüllen:

Durch einen Wechsel der Position des Komponentenrades (73) kann somit je nach Bestückung zwischen verschiedenen axialen Justierungen der optischen Komponenten (87) gewechselt werden, was der chromatischen Korrektur der Anordnung entspricht; Es kann zwischen verschiedenen Strukturgrößen der Masken gewechselt werden; Es können entsprechende spektrale Filter in den Strahlengang geschwenkt werden, welche auf die jeweilige chromatische Korrektur (axiale Position) abgestimmt sind und die Anordnung kann durch Auswahl einer leeren Position im Komponentenrad vom Modus der strukturierten Beleuchtung in den konventionellen Beleuchtungsmodus wechseln.

Ein weiteres Beleuchtungsmodul (1) zur Implementierung der strukturierten Beleuchtung ist in Figur 12 dargestellt. Aufgabe des schon beschriebenen Beleuchtungsmoduls (1) ist es, Beleuchtungsverteilungen mit verschiedenen Phaseneinstellungen für die Projektion in bzw. auf der Probe bereit zu stellen. Eine Besonderheit des hier in Figur 12 gezeigten Ausführungsbeispiels ist es, dass sowohl die Aufgabe der Phasenverschiebung der in der Probe erzeugten Beleuchtungsstruktur als auch die spektrale Korrektur der Anordnung mit einem einzigen Aktuator gelöst ist. Das Element zur Erzeugung einer Beleuchtungsverteilung in der Probe befindet sich in der zuvor beschriebenen Ebene (3), die eine zur Objektebene (9) und zur Zwischenbildebene bzw. Detektorebene (13) konjugierte Ebene ist. Die exakte Konfiguration des optischen Systems, bei welcher die Ebenen (3), (9) und (13) zueinander konjugiert sind, kann von der verwendeten Wellenlänge abhängen. Die Herstellung dieser Bedingung (Ebenenkonjugation) für verschiedene Wellenlängen ist die Aufgabe der spektralen Korrektur. Die Anordnung arbeitet mit einer Lichtquelle (19), welche spektral schaltbar sein kann. Die Phasenverschiebung der in bzw. auf die Probe abgebildeten Beleuchtungsstruktur wird durch einen Spiegel (93) realisiert. In Figur 12 hat die optische Achse (99) einen Winkel von 45 Grad in Bezug auf den Spiegel (93), andere Orientierungswinkel sind jedoch ebenfalls möglich. Der Spiegel (93) wird durch einen Aktuator (95) bewegt, welcher auf einer Piezotechnologie basieren kann. Der Spiegel (93) wird geradlinig bewegt (97) oder gekippt (101).

Die Kippung (101) ermöglicht eine Steuerung der Phase der projizierten Struktur, die geradlinige Bewegung (97) dagegen erlaubt sowohl die Steuerung der Phase als auch die Einstellung der chromatischen Korrektur, wie im Folgenden erläutert wird.

Die geradlinige Bewegung des Spiegels (93) verursacht eine Bewegung (98) des Bildes (4) der feststehenden Struktur in Ebene (3), welches in bzw. auf die Probe projiziert wird.

Die Bewegung (98) des Bildes (4) hat zwei Komponenten: eine axiale und eine laterale (senkrecht zur optischen Achse (99)). Die laterale Bewegungskomponente beeinflusst die Phasenlage der Beleuchtungsstruktur in bzw. auf der Probe, die axiale Bewegungskomponente beeinflusst die spektrale Kor-

rektur. Die Optik zur weiteren Abbildung der Beleuchtungsstruktur, welche die Gestalt einer Tubuslinse haben kann, hat üblicherweise eine relativ kleine numerische Apertur und somit eine entsprechend große Schärfentiefe. Deshalb kann die Anordnung derart konfiguriert werden, dass die Phasenlage der Beleuchtungsstruktur wesentlich empfindlicher auf eine Bewegung (98) reagiert als die chromatische Korrektoreinstellung (axiale Position von (4)).

Bei einer Bewegung von (97) um einen kleinen Betrag in der Größenordnung der Periodizität der abgebildeten Struktur in Ebene (3) wird somit vorrangig die Phase der in bzw. auf die Probe projizierten Lichtverteilung verändert, wobei die Auswirkung der axialen Bewegungskomponente von (98) vernachlässigt werden kann. Wird der Aktuator (95) jedoch um einen größeren Betrag bewegt, so wird neben der Phasenänderung der projizierten Struktur um mehrere Perioden auch die axiale Position des Bildes dieser Struktur verändert, was zur spektralen Korrektur der Anordnung genutzt werden kann. Ein einziger Aktuator (95) kann somit durch geeignete Positionierung des Spiegels (93) sowohl die Phase der projizierten Struktur als auch die axiale Position der Beleuchtungsstruktur in der Probe kontrollieren. Dies ist letztlich durch die unterschiedlichen Empfindlichkeiten der beiden, durch nur einen Aktuator beeinflussten Parameter möglich. Diese erfindungsgemäße Anordnung kann dabei sowohl mit dem erfindungsgemäßen Verfahren zur strukturierten Beleuchtung mit nur 2 Projektionsschritten als auch den Verfahren zur strukturierten Beleuchtung mit 3 oder mehr Schritten entsprechend dem Stand der Technik genutzt werden.

Die ebenfalls in Figur 12 dargestellte Beleuchtungseinheit (2) ist eine Unter-einheit von Beleuchtungseinheit (1). Sie nutzt die erwähnte Maske in Ebene (3) zur Erzeugung einer Beleuchtungsverteilung. Im Unterschied zur in verschiedenen Ausführungen beschriebenen Beleuchtungseinheit (1) erzeugt die Einheit (2) nur eine einzige, statische Beleuchtungsverteilung und hat nicht wie Anordnung (1) die Möglichkeit der Manipulation der Phase der Beleuchtungsverteilung.

Im Folgenden sollen weitere Ausführungsbeispiele für eine Realisierung der vorliegenden Erfindung oder einer anderen Methode der strukturierten Be-

leuchtung entsprechend dem Stand der Technik gegeben werden, wobei hier insbesondere die einfache Nachrüstbarkeit in bestehenden Mikroskopsystemen sowie die Lösung des Problems der axialen chromatischen Korrektur der Anordnung im Vordergrund steht.

Vorerst wird noch einmal Figur 1 betrachtet. Die Ursache des Auseinanderdriftens der von der Detektionseinheit (11) abgebildeten und der zur Ebene (3) konjugierten Ebene in der Probe (10) bei einem Wechsel der Wellenlänge kann in den verschiedenen wellenlängenabhängigen Eigenschaften von Beleuchtungsoptik (103) und Abbildungsoptik (104) liegen. Dieses Problem kann durch eine axiale mechanische Nachführung der zur Erzeugung der Beleuchtungsverteilung genutzten Maske gelöst werden.

Die erforderlichen Aufwendungen für die spektrale Korrektur können erfindungsgemäß reduziert oder vollständig vermieden werden, indem die Optik (103) für die Abbildung der Beleuchtungsstruktur in die Probe (Beleuchtungstubusoptik) sowie die Optik (104) zur Abbildung der Beleuchtungsverteilung auf von der Probe auf die Detektionseinheit (Detektor-Tubusoptik) identische Eigenschaften haben, i.e. identisch konstruiert sind. In einem Standard-Mikroskop, welches nicht für die strukturierte Beleuchtung entworfen wurde, haben Beleuchtungstubusoptik und Detektor-Tubusoptik jedoch meist verschiedene Eigenschaften und Abmessungen, da sie für verschiedene Anforderungen konstruiert wurden.

In Figur 13 ist eine Einheit zur Nachrüstung eines Mikroskops zur Implementierung der strukturierten Beleuchtung dargestellt, wobei das Nachrüstmodul (109) an einem Kameraport (111) des ursprünglichen Mikroskops (110) angebracht wird. Ein solcher Kameraport ist ein standardisiertes mechanisches Interface zur Montage von ortsauflösenden Detektoren, wie z.B. CCD Kameras. Ein üblicher Standard ist hier "C-mount". Die Zwischenbildebene (113) entspricht dabei der Ebene, in welcher die ursprüngliche Mikroskopanordnung (110) die Lage des Bildsensors (z.B. CCD) vorgesehen hatte. In Figur 1 entspricht die dargestellte Detektorebene (13) der Zwischenbildebene (113) aus Figur 13.

Die in Figur 1 dargestellte Mikroskopanordnung könnte umgerüstet werden, indem die Detektionseinheit (11), der dichrotische Spiegel (7) sowie optional andere Beleuchtungseinrichtungen entfernt und das Nachrüstmodul (109) aus Figur 13 derart angebracht wird, dass die Zwischenbildebene (113) in Position der ehemaligen Detektorebene (13) in Figur 1 angeordnet ist. Für die Bewegung der Phase der in bzw. auf die Probe projizierten Beleuchtungsstruktur gibt es zwei Möglichkeiten bzw. Konfigurationen, welche beide in Figur 13 enthalten sind.

Die erste Konfiguration nutzt die beschriebene Beleuchtungseinheit (1) mit darin enthaltenen Vorrichtungen zur Veränderung der Phasenlage in Kombination mit einem feststehenden dichroitischen oder halbdurchlässigen Spiegel (115). Die zweite Konfiguration nutzt die weniger komplexe Beleuchtungseinheit (2), welche eine statische Beleuchtungsverteilung abgibt, und manipuliert die in bzw. auf die Probe projizierte Beleuchtungsverteilung mit Hilfe des Aktuators (95), welcher den dichroitischen oder halbdurchlässigen Spiegel (115) bewegt, um die Phase der in bzw. auf der Probe erzeugten Beleuchtungsverteilung zu verändern.

In Figur 13 wird das Bild der Beleuchtungseinheit (2) durch eine Bewegung des dichroitischen oder halbdurchlässigen Spiegels (115) in linearer Form (97) und / oder durch Kippung (101) bewegt, was einer Phasenverschiebung der in bzw. auf die Probe projizierten Beleuchtungsstruktur entspricht. Die Tubuslinse (105) bildet das Zwischenbild (113) ab, wobei der dichroitische oder halbdurchlässige Spiegel an einer Position im Strahlengang angebracht ist, in welcher das Licht im Wesentlichen kollimiert ist. Die Optiken (103) und (104) (Tubusoptiken) haben vorzugsweise vergleichbare spektrale Eigenschaften und sind vorzugsweise identisch konstruiert. Diese Symmetrie führt dazu, dass die Ebenen (3) und (13) unabhängig von der verwendeten Wellenlänge durch die jeweiligen Optiken (103) bzw. (104) in Ebenen in der Probe abgebildet werden, welche genügend dicht beieinander liegen und in guter Näherung als konjugiert bezeichnet werden können. Bei einem Wechsel der Wellenlänge kann somit auf eine aktive spektrale Korrektur mit bewegten



Elementen verzichtet werden, was die Anordnung schneller und weniger komplex macht. Somit ist hier eine Anordnung zur strukturierten Beleuchtung offenbart, welche trotz der Nutzung verschiedener Wellenlängen ohne bewegliche Elemente auskommt. Der in Figur 13 ebenfalls abgebildete Ausschnitt der mit der strukturierten Beleuchtung nachgerüsteten Mikroskopanordnung (110) zeigt ebenfalls die dem Kameraport (111) zugeordnete Tubuslinse (117), welche ursprünglich dafür vorgesehen war, ein reales Bild der Probe in Ebene (113) zu erzeugen, wobei (119) ein Teil des Unendlichstrahlengangs des Mikroskops ist.

Da das Zwischenbild in Ebene (113) für die vorgeschlagene Anordnung nicht dringend nötig ist, lässt sich die optische Effizienz der Anordnung in Figur 13 durch eine weitere, in Figur 14 dargestellte Modifikation verbessern. Hier wurden die Tubusoptiken (117) des Mikroskops und (105) des Nachrüstmoduls (109) entfernt, wodurch der Unendlichstrahlengang (119) des Mikroskops bis zum dichroitischen oder halbdurchlässigen Spiegel (115) und darüber hinaus erweitert wird. In einer vorteilhaften Implementierung haben die Tubusoptiken (104) und (103) die gleichen optischen Eigenschaften wie die ursprünglich verwendete Tubusoptik (117) des Mikroskopes.

In einem weiteren Ausführungsbeispiel soll, unter Beibehaltung der Bezeichnungen aus Figur 14, die Integration einer Anordnung zur strukturierten Beleuchtung in ein Mikroskopsystem illustriert werden, welches über mindestens zwei der Kameraports (111) verfügt.

Figur 15 zeigt einen Ausschnitt des Mikroskopsystems (110), wobei (119) ein Teil der Unendlichstrahlengangs ist, welcher mit dem Objektiv (5) der Mikroskopanordnung verbunden ist. Die Strahlengänge können in einer praktischen Anordnung zusätzlich ein- oder mehrfach durch Spiegel oder Strahlteiler gefaltet sein, was hier zur vereinfachten Darstellung des Prinzips nicht eingezeichnet ist. An einem der Kameraports (111) ist eine Detektionseinheit (11) montiert, wobei das durch die Tubusoptik (104) erzeugte reale Bild auf die Detektionsebene (13) abgebildet wird, welche ihrerseits konjugiert zur Ebene (9) innerhalb der Probe (10) ist (nicht gezeichnet), in welche die Beleuchtungseinheit (1) bzw. (2) die periodische Beleuchtungsverteilung projiziert.

ziert. Die Detektionseinheit (11) kann dabei über verschiedene spektrale Kanäle verfügen und ihrerseits mehrere ortsauflösende Detektoren enthalten. Im einfachsten Fall ist (11) eine Kamera, welche wie gewöhnlich am Kameraport (111) montiert wird. Die Beleuchtungseinheit (1) bzw. (2) wird ebenfalls an einem Kameraport (111) montiert. Hierbei wird die Ebene (3), welche konjugiert zu den Ebenen (9) in bzw. auf der Probe und (13) auf der Detektionseinheit ist, an genau dem Ort justiert, an welchem normalerweise ein standardisierter ortsauflösender Detektor montiert wird. Die Tubusoptik (103), welche normalerweise zur Erzeugung eines realen Bildes auf einem ortsauflösenden Detektor vorgesehen ist, wird nun zur Abbildung der Beleuchtungseinheit und der sich in Ebene (3) befindlichen Maske bzw. deren Bildes in die Probe genutzt. Ursprünglich war in der Mikroskopanordnung (110) an der Stelle des dichroitischen Strahlteilers oder halbdurchlässigen Spiegels (115) ein Element vorgesehen, welches die Verteilung des Detektionslichtes auf die beiden Kameraports (111) vornehmen sollte. Die Aufgabe des installierten Elementes (115) ist die Teilung des Beleuchtungslichtes von der Beleuchtungseinheit (1) bzw. (2) von dem von der Probe stammenden Detektionslicht. Falls die bereits erläuterte Beleuchtungseinheit (1) eingesetzt wird, welche über eine Möglichkeit der Manipulation der Phase der auf bzw. in die Probe projizierten Beleuchtungsstruktur verfügt, so wird vorzugsweise ein starrer, nicht beweglicher dichroitischer Filter bzw. halbdurchlässiger Spiegel (115) genutzt, wobei der Aktuator (95) entfällt. Wird die einfachere Beleuchtungseinheit (2) ohne die Möglichkeit zur Phasensteuerung genutzt, kann das Element (115) mit einem Aktuator (95) bewegt werden, welcher durch laterale Bewegung (97) und / oder Verkippung die Manipulation der Phase der in bzw. auf die Probe projizierten Beleuchtungsstruktur erlaubt. Das Element (115) kann zum Beispiel für Fluoreszenzanordnungen in Form eines dichroitischen Multiband-Spiegels ausgeführt sein. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass die Nutzung der Anordnung wie in Figur 15 die Entfernung oder den Austausch des ursprünglichen Strahlteilers der Mikroskopanordnung (110) gegen einen Spiegel erfordert (nicht eingezeichnet). Die Nutzung der beiden Kameraports (111) hat den Vorteil, dass die beiden Tubusoptiken (103) bzw. (104) identische spektrale Eigenschaften haben (können) und somit aufgrund der Symmetrie eine mechanische und

langsame chromatische Korrektur entsprechend dem Stand der Technik entfallen kann. Sollte die Mikroskopanordnung über mehr als zwei Kameraports (111) verfügen, kann der Detektionsstrahlengang (121) nach Passieren des Elementes (115) auf zwei oder mehr Teile aufgespalten und den an den entsprechenden Kameraports montierten Detektionseinheiten (11) zugeführt werden.

In den Figuren 14 und 15 kann die Tubusoptik (104) durch die in Figur 9 dargestellte Einheit zur gleichzeitigen Detektion verschiedener (z.B.) spektraler Kanäle auf einem einzigen Detektor ersetzt werden. Hier ist die Aufspaltung in zwei Kanäle dargestellt. Die Position dieser in Figur 9 dargestellten Detektionseinheit ist im Unendlichstrahlengang direkt hinter dem Strahlteiler, welcher Beleuchtungslicht vom Detektionslicht trennt. Diese Anordnung noch vor einem Zwischenbild, hat im Gegensatz zu einer oft üblichen Anordnung hinter dem reellen Zwischenbild, zum Beispiel innerhalb der Einheit (11) den Vorteil einer weiter erhöhten optischen Effizienz.

Der Verfahrensablauf gemäß der Erfindung kann wie folgt zusammengefasst werden:

In einem ersten Schritt können eine oder mehrere der später auch zur Schnittbildgenerierung verwendeten Beleuchtungsstrukturen auf ein bekanntes Kalibrierobjekt projiziert werden. Aus diesen Daten oder den Bilddaten zur Schnittbildberechnung selbst werden die lokale Phase der projizierten Struktur und optional die lokale Strukturperiode und / oder die Intensitätsverteilung der Projektionsschritte für jeden Ort auf Detektor bestimmt. Die Kalibriermessung kann eingespart werden, wenn die lokale Phase und Gitterfrequenz der projizierten Beleuchtungsstruktur aus den im späteren Prozessverlauf aufgenommenen Bilddaten bestimmt werden kann.

In weiteren Prozessschritten, welche beliebig oft und für verschiedene Wellenlängen und verschiedene axiale Positionen der Probe wiederholt werden können, werden jeweils zwei Projektionsstrukturen auf die Probe projiziert und mit Hilfe der lokalen Phasen und Gitterfrequenz der Beleuchtungsvertei-

lung auf dem Detektor ein optisches Schnittbild berechnet. Die Implementierungen zur strukturierten Beleuchtung entsprechend dem Stand der Technik benötigen mindestens drei Projektionsschritte zur Erzeugung eines Schnittbildes und sind dadurch weniger effizient. Zusätzlich wurden erfindungsgemäße Anordnungen vorgeschlagen, welche die Projektion der beiden Beleuchtungsstrukturen ohne bewegliche mechanische Elemente und in einer Ausführung sogar zeitgleich ermöglichen. Die Selektion der projizierten Lichtverteilung kann durch elektronische Steuerung von Lichtquellen und / oder optischen Schaltern erfolgen. Weitere erfindungsgemäße Anordnungen ermöglichen den Wechsel der Abbildungswellenlänge ohne Bewegung von mechanischen Elementen.

Eine Kalibriermessung zur Bestimmung der lokalen Phasen und Gitterfrequenzen muss nur bei einer Änderung am optischen System, wie zum Beispiel einem Objektivwechsel und eventuell der erstmaligen Nutzung einer neuen Wellenlänge vorgenommen werden oder kann entfallen, wenn die Bestimmung aus den aufgenommenen Bilddaten in ausreichender Qualität möglich ist und die hierzu erforderliche Rechenzeit toleriert werden kann.

#### Literaturverweise

- [1] Marvin Minsky, "Microscopy Apparatus", US patent 3013467, 1961
- [2] M. A. A. Neil, R. Juskaitis, and T. Wilson: "Method of Obtaining Optical Sectioning by using Structured Light in a conventional microscope", Optics Letters, Vol. 22, No. 24, p. 1905, 1997
- [3] Wilson et al., "Microscopy Imaging Apparatus and Method", US patent 6376818, 2002
- [4] Gerstner et al., "Assembly for Increasing the Depth Discrimination of an Optical Imaging System", US patent 681945 B2, 2004
- [5] Gerstner et al., "Assembly for Increasing the Depth Discrimination of an Optical Imaging System", Internationales Patent WO02/12945, 2002
- [6] M.A.A. Neil et al., "Real Time 3D Fluorescence Microscopy by Two-Beam Interference Illumination", Optics Communications, 153, 1998

- [7] Schaefer, " Structured illumination microscopy: artefact analysis and reduction utilizing a parameter optimization approach", *Journal of Microscopy* 216 (2), 165–174, 2004
- [8] Wilson et al., "Confocal Microscopy Apparatus and Method", US patent 6687052, 2004
- [9] Ralf Wolleschensky, "Verfahren und Anordnung zur Tiefenaufgelösten optischen Erfassung einer Probe", Europäisches Patent EP 1420281, 2004
- [10] Mark Hopkins, "Multi-Spectral Two-Dimensional Imaging Spectrometer", US patent US5926283
- [11] Colin G. Morgan, "Optical Sensor for imaging an object", United States Patent US5381236
- [12] Chenggen Quan et al., "Shape measurement by use of liquid-crystal display fringe projection with two-step phase shifting", *Applied Optics*, Vol, 42, No. 13, 2003, 2329-2335
- [13] S.E.D. Webb et al, "A wide field time-domain fluorescence lifetime imaging microscope with optical sectioning", *Review of Scientific Instruments*, Vol. 73, No. 4, 2002, 1898-1907
- [14] L.G. Kryewina and M.K. Kim, "Single-exposure optical sectioning by color structured illumination microscopy", *Optics Letters*, Vol. 31, No. 4, 2006, 477-479

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Erzeugung optischer Schnittbilder durch strukturierte Beleuchtung der Probe, wobei mindestens in einer Raumrichtung periodische Beleuchtungsverteilungen in eine Probenebene projiziert und in der Probe reflektiertes und/oder gestreutes und/oder emittiertes Fluoreszenzlicht und/oder Lumineszenzlicht auf einem ortsauflösenden Detektor zur Abbildung gebracht werden,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass

ein Kalibrierschritt erfolgt, in welchem die lokale Phase und/oder die lokale Periode der Beleuchtungsverteilungen für jeden Ort auf dem Detektor bestimmt werden, und dass im Probenerfassungsmodus

für die Berechnung jeweils eines Schnittbildes jeweils zwei Beleuchtungsverteilungen in oder auf die Probe projiziert und die resultierenden Intensitätsverteilungen auf dem Detektor zur Abbildung gebracht werden sowie die Verfahrensschritte der Projektion und Detektion von zwei Beleuchtungslichtverteilungen beliebig oft wiederholt werden, insbesondere bei verschiedenen Fokuspositionen der Probe und/oder verschiedenen Beleuchtungswellenlängen, wobei aus den Intensitätsverteilungen mit Hilfe der lokalen Phase und/oder lokalen Periode mindestens ein optisches Schnittbild aus den aufgenommenen Intensitätsverteilungen berechnet wird.

2. Verfahren zur Erzeugung optischer Schnittbilder durch strukturierte Beleuchtung der Probe nach Anspruch 1,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass

die lokale Phase und/oder lokale Periode der Beleuchtungsverteilung für jeden Detektorort aus Intensitätsverteilungen bestimmt werden, welche durch Projektion und Detektion mindestens einer auch später im Probenerfassungsmodus verwendeten Beleuchtungslichtverteilung auf ein bekanntes Kalibrierobjekt mit vorzugsweise homogenen Eigenschaften entstanden ist oder die lokale Phase und/oder lokale Periode der Beleuchtungsverteilung für jeden Detektorort aus Intensitätsdaten bestimmt werden, welche im Probenerfassungsmodus aufgenommen wurden.

3. Verfahren zur Erzeugung optischer Schnittbilder durch strukturierte Beleuchtung der Probe nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
sich die beiden in oder auf die Probe projizierten Beleuchtungsverteilungen in ihrer Phase um 180 Grad unterscheiden.
4. Verfahren zur Erzeugung optischer Schnittbilder durch strukturierte Beleuchtung der Probe nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
zur Berechnung eines Schnittbildes aus den jeweils zwei aufgenommenen Beleuchtungsverteilungen Differenzen zwischen den Beleuchtungsverteilungen und/oder Differenzen zwischen räumlichen Eigenschaften innerhalb der beiden Beleuchtungsverteilungen genutzt werden, wobei die räumlichen Eigenschaften partielle Ableitungen oder Gradienten innerhalb der Beleuchtungsverteilungen sein können.
5. Verfahren nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
die Generierung der Schnittbilder für verschiedene Ebenen der Probe durchgeführt und die Probe somit schichtweise abgetastet wird, wobei zur Fokussierung der Probe die Probe selbst und/oder Teile der optischen Anordnung bewegt werden und aus der Serie der Schnittbilder ein Datensatz erstellt wird, welcher die dreidimensionale Gestalt der Probe repräsentiert.
6. Verfahren nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
neben der Intensität der Beleuchtungsverteilung auch ihr zeitlicher Verlauf moduliert wird und zeitliche Parameter des Emissionsvorganges vom Detektor registriert werden und die Fluoreszenzlebensdauer und/oder die Lumineszenzlebensdauer bestimmt wird.
7. Anordnung zur Erzeugung von optischen Schnittbildern, bestehend aus einer Beleuchtungseinheit, einer optischen Vorrichtung zur Abbildung der Probe auf mindestens einen ortsauflösenden Detektor, einer Fokussiereinrichtung sowie einer Signalverarbeitungseinheit, insbesondere zur Durchfüh-

nung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 6, da durch gekennzeichnet, dass die Beleuchtungseinheit zwei verschiedene Beleuchtungsverteilungen in oder auf der Probe erzeugt, die Beleuchtungsverteilungen eine Periodizität in mindestens einer Raumrichtung besitzen, die Probenebene, in welcher die Beleuchtungsverteilung erzeugt wird, zur Ebene des jeweiligen ortsauflösenden Detektors konjugiert ist und die durch das Beleuchtungslicht in bzw. auf der Probe durch Wechselwirkung mit dem Beleuchtungslicht entstehenden Lichtverteilungen zeitsequentiell oder zeitparallel von dem einen oder mehreren ortsauflösenden Detektoren registriert und der Signalverarbeitungseinheit zur Berechnung eines optischen Schnittbildes zugeführt werden.

8. Anordnung zur Erzeugung von optischen Schnittbildern nach Anspruch 7, da durch gekennzeichnet, dass zur Kalibrierung der an einem oder mehreren Detektoren registrierten Lichtverteilung, insbesondere der Phasenlage und/oder lokalen Periode der Beleuchtungsstruktur und/oder der Uniformität ein Kalibrierobjekt vorhanden ist, welches anstelle der Probe eingefügt wird oder in das optische System in einer zur Probe konjugierten Bildebene montiert ist oder in Position gebracht werden kann, wobei das Kalibrierobjekt vorzugsweise homogene und/oder bekannte Probeneigenschaften hat und vorzugsweise eben ist.

9. Anordnung zur Erzeugung von optischen Schnittbildern nach Anspruch 7, da durch gekennzeichnet, dass der oder die ortsauflösenden Detektoren von der Probe emittiertes Fluoreszenzlicht und/oder in der Probe erzeugtes Lumineszenzlicht detektieren, wobei eine zeitlich modulierte Anregung durch die Beleuchtungseinheit in Kombination mit synchroner oder zeitaufgelöster Detektion erfolgt und die Fluoreszenzlebensdauer und/oder Lumineszenzlebensdauer bestimmt wird.

10. Anordnung zur Erzeugung von optischen Schnittbildern nach Anspruch 7, da durch gekennzeichnet, dass die Beleuchtungseinheit zur Erzeugung der Beleuchtungsverteilungen in bzw. auf der Probe eine Maske in Transmission und/oder Reflexion oder eine Phasenmaske oder ein pixeliertes Element wie zum Beispiel eine LCD Matrix oder



ein schaltbares Spiegelarray (DLP) nutzt oder die Beleuchtungsstruktur durch Interferenz ebener Wellen erzeugt wird.

11. Anordnung zur Erzeugung von optischen Schnittbildern nach Anspruch 7, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass die Beleuchtungseinheit zwei Beleuchtungsverteilungen erzeugt, wobei sich die beiden periodischen Lichtverteilungen in ihrer Phasenlage um 180 Grad unterscheiden.

12. Anordnung zur Erzeugung von optischen Schnittbildern nach Anspruch 7, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass die beiden Beleuchtungsverteilungen in der Beleuchtungseinheit durch vorderseitige bzw. rückseitige Beleuchtung einer Maskenstruktur erzeugt werden.

13. Anordnung zur Erzeugung von optischen Schnittbildern nach Anspruch 7, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass die beiden Beleuchtungsverteilungen in der Beleuchtungseinheit durch elektronisches Schalten von Lichtquellen und/oder das Schalten von Lichtfaserschaltern konfiguriert werden.

14. Anordnung zur Erzeugung von optischen Schnittbildern nach Anspruch 7, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass die Anordnung eine Konfiguration und/oder Umschaltung der spektralen Zusammensetzung des von der Beleuchtungseinheit emittierten und/oder des von dem mindestens einen ortsauflösenden Detektor registrierten Lichtes ermöglicht.

15. Anordnung zur Erzeugung von optischen Schnittbildern nach Anspruch 7, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass innerhalb der Beleuchtungseinheit zur Erzeugung der Beleuchtungslichtverteilungen genutzte Masken in einem Komponentenwechsler vormontiert sind, wobei sich die Masken innerhalb der Einzelaufnahmen des Komponentenwechslers in ihren Strukturgrößen bzw. der Periodizität unterscheiden können, sich die axialen Positionen der Masken entlang der optischen Achse im optischen System zwischen den einzelnen Komponentenaufnahmen unter-

scheiden können und vorjustiert werden können, wobei die Maskenelemente mit spektralen Filterelementen zu einer Einheit kombiniert werden können.

16. Anordnung zur Erzeugung von optischen Schnittbildern nach Anspruch 7, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass zwei Beleuchtungsverteilungen zeitgleich in bzw. auf die Probe projiziert und detektiert werden, wobei sich das für beide Projektionen verwendete Licht in seiner Polarisation und/oder spektralen Zusammensetzung unterscheidet, wobei diese unterschiedlichen Eigenschaften des Beleuchtungslichtes, zu verschiedenen Eigenschaften der zeitgleich von der Probe abgegebenen Lichtverteilungen führen und diese Eigenschaften des von der Probe abgegebenen Lichtes zur detektionsseitigen Trennung der beiden Beleuchtungsverteilungen genutzt werden, wobei die beiden Beleuchtungsverteilungen zeitgleich auf einen oder mehrere ortsauflösende Detektoren abgebildet werden können.

17. Anordnung zur Erzeugung von optischen Schnittbildern, bestehend aus einer Beleuchtungseinheit zur Erzeugung von Beleuchtungsverteilungen in oder auf der Probe, mindestens einem ortsauflösenden Detektor zur Registrierung von Signalen von der Probe, einer Fokussiereinrichtung, sowie einer Signalverarbeitungseinheit, insbesondere zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 6

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass eine Phasenverschiebung der durch die Beleuchtungseinheit projizierten Struktur und optional die chromatische Korrektur, das heißt die Übereinstimmung der Probenebene, in welcher die Beleuchtungsstruktur erzeugt wird, mit der auf einen oder mehrere Detektorebenen abgebildeten Ebenen, durch die lineare Bewegung oder Kippung eines Spiegels oder dichroitischen Spiegels erfolgt, welcher an der Abbildung der Beleuchtungseinheit in die Probe beteiligt ist.

18. Anordnung zur Erzeugung von optischen Schnittbildern, bestehend aus einer Beleuchtungseinheit zur schrittweisen Erzeugung von mehreren Lichtverteilungen in oder auf der Probe, mindestens einem ortsauflösenden Detektor zur Registrierung von Lichtverteilungen in oder auf der Probe, einer Fokussiereinrichtung zur Selektion der Probenebene, sowie einer Signalverar-

beitungseinheit, insbesondere zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 6

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass

die axiale chromatische Aberration durch das Einfügen von einem oder mehreren Korrektur-elementen, vorzugsweise in einem Bereich mit kollimierter Strahlführung nach dem Ausgang der Beleuchtungseinheit und/oder in der Pupillenebene des Objektivs oder einer zu ihr konjugierten Ebene und/oder in einem oder mehreren Spektralkanälen des Ortsauflösenden Detektions-systems implementiert ist, wobei die Korrektur-elemente vorzugsweise diffraktive optische Elemente oder Hologramme enthalten und ein Wechsel der Abtastwellenlänge keine mechanische Bewegung der an der Projektion der Beleuchtungsstruktur beteiligten Elemente erfordert und eine eventuell verbleibende spektral bedingte axiale Abweichung am Ort der Probe softwareseitig bei der Datenaufnahme oder durch eine axiale Bewegung der Probe kompensiert wird.

19. Anordnung zur Erzeugung von optischen Schnittbildern, bestehend aus einer Beleuchtungseinheit zur Erzeugung von Lichtverteilungen in oder auf der Probe, mindestens einem ortsauflösendem Detektor zur Registrierung von Lichtverteilungen in oder auf der Probe, einer Fokussiereinrichtung zur Selektion der Probenebene, sowie einer Signalverarbeitungseinheit, insbesondere zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 6

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass

die Strahlengänge für Beleuchtung und Detektion in Bezug auf ihre axiale chromatische Korrektur optisch gleichwertig sind und insbesondere identisch konstruiert sein können, wodurch eine mechanische Nachführung von optischen Elementen zur Justierung der axialen chromatischen Korrektur bei einem Wellenlängenwechsel überflüssig wird.

20. Anordnung zur Erzeugung von optischen Schnittbildern, bestehend aus einer Beleuchtungseinheit zur Erzeugung von Lichtverteilungen in oder auf der Probe, mindestens einem ortsauflösendem Detektor zur Registrierung von Lichtverteilungen in bzw. auf der Probe, einer Mikroskopeinrichtung, einer Fokussiereinrichtung zur Selektion der Probenebene, sowie einer Signalverarbeitungseinheit, insbesondere zur Durchführung des Verfahrens nach einem

der Ansprüche 1 bis 6

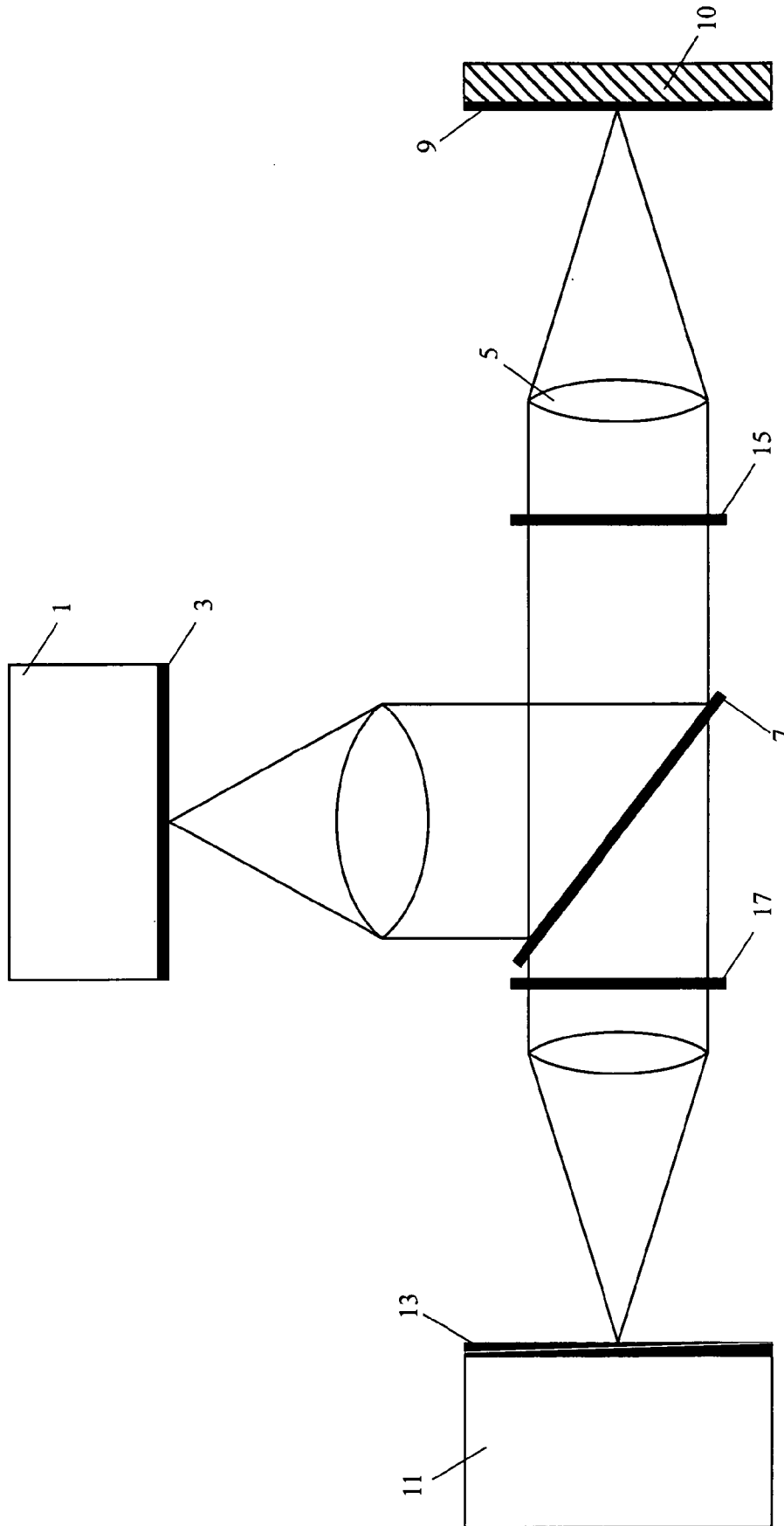
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass ein Modul, welches die Beleuchtungseinheit sowie die Detektionseinheit umfasst, an einem Kameraport der Mikroskopeinrichtung angebracht wird, wobei das Modul einen Strahlteiler zur Trennung von Beleuchtungslicht und Detektionslicht enthält und der ursprüngliche Strahlteiler des Mikroskops entfernt bzw. durch einen Spiegel ersetzt wird.

21. Anordnung zur Erzeugung von optischen Schnittbildern unter Nutzung einer Beleuchtungseinheit zur Erzeugung von Lichtverteilungen in oder auf der Probe, mindestens einem ortsauflösendem Detektor zur Registrierung von Lichtverteilungen in bzw. auf der Probe, einer Mikroskopeinrichtung, einer Fokussiereinrichtung zur Selektion der Probenebene, sowie einer Signalverarbeitungseinheit, insbesondere zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 6

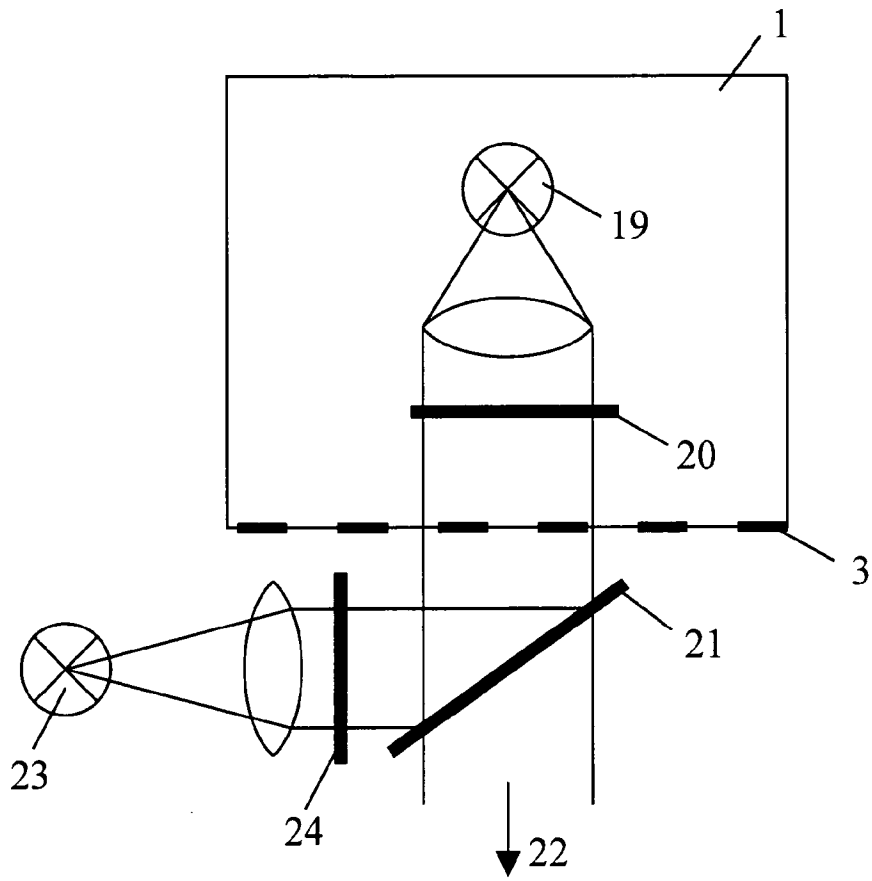
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass das Beleuchtungsmodul an einem ersten Kameraport der Mikroskopeinrichtung montiert ist, und mindestens eine Detektionseinheit an mindestens einem weiteren Kameraport der Mikroskopeinrichtung angebracht ist.

22. Anordnung zur Erzeugung von optischen Schnittbildern in einem Mikroskop nach einem oder mehreren der Ansprüche 19 bis 21

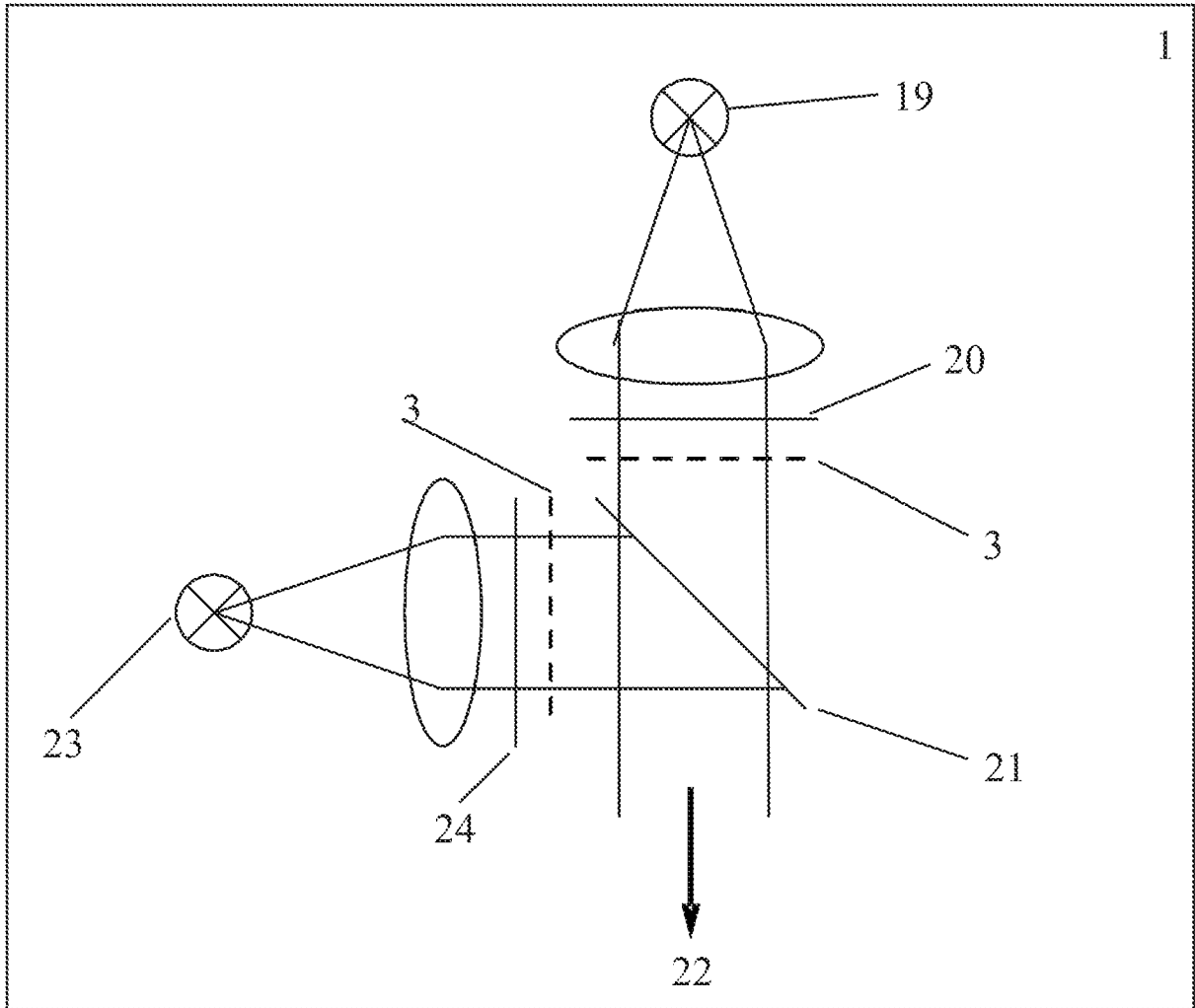
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass eine spektrale Aufspaltung in zwei oder mehr spektrale Kanäle zur zeitgleichen Projektion auf nur einen ortsauflösenden Detektor direkt nach einem dichroitischen Strahlteiler im Unendlichstrahlengang erfolgt, wobei besagter Strahlteiler die Trennung von Beleuchtungslicht und Detektionslicht vornimmt und die genannte Aufspaltung in spektrale Kanäle noch vor der Entstehung eines Zwischenbildes erfolgt.



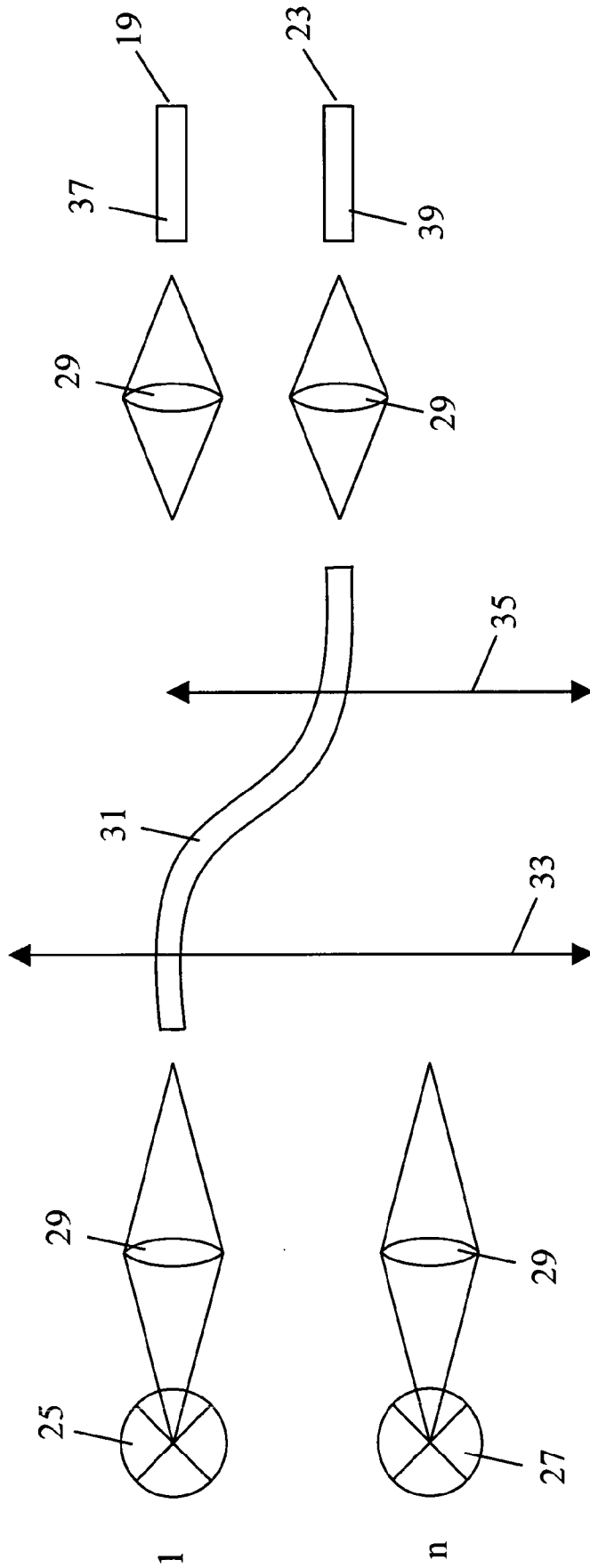
Figur 1



Figur 2

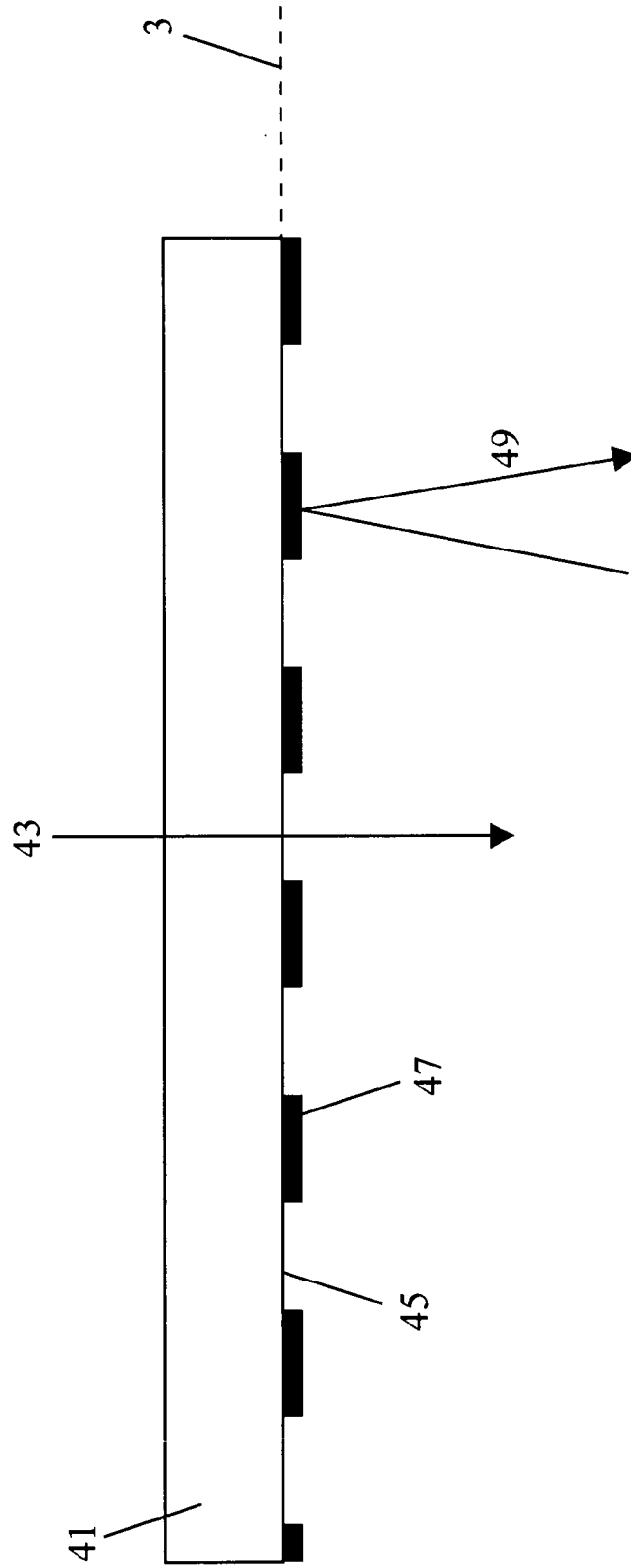


Figur 2b

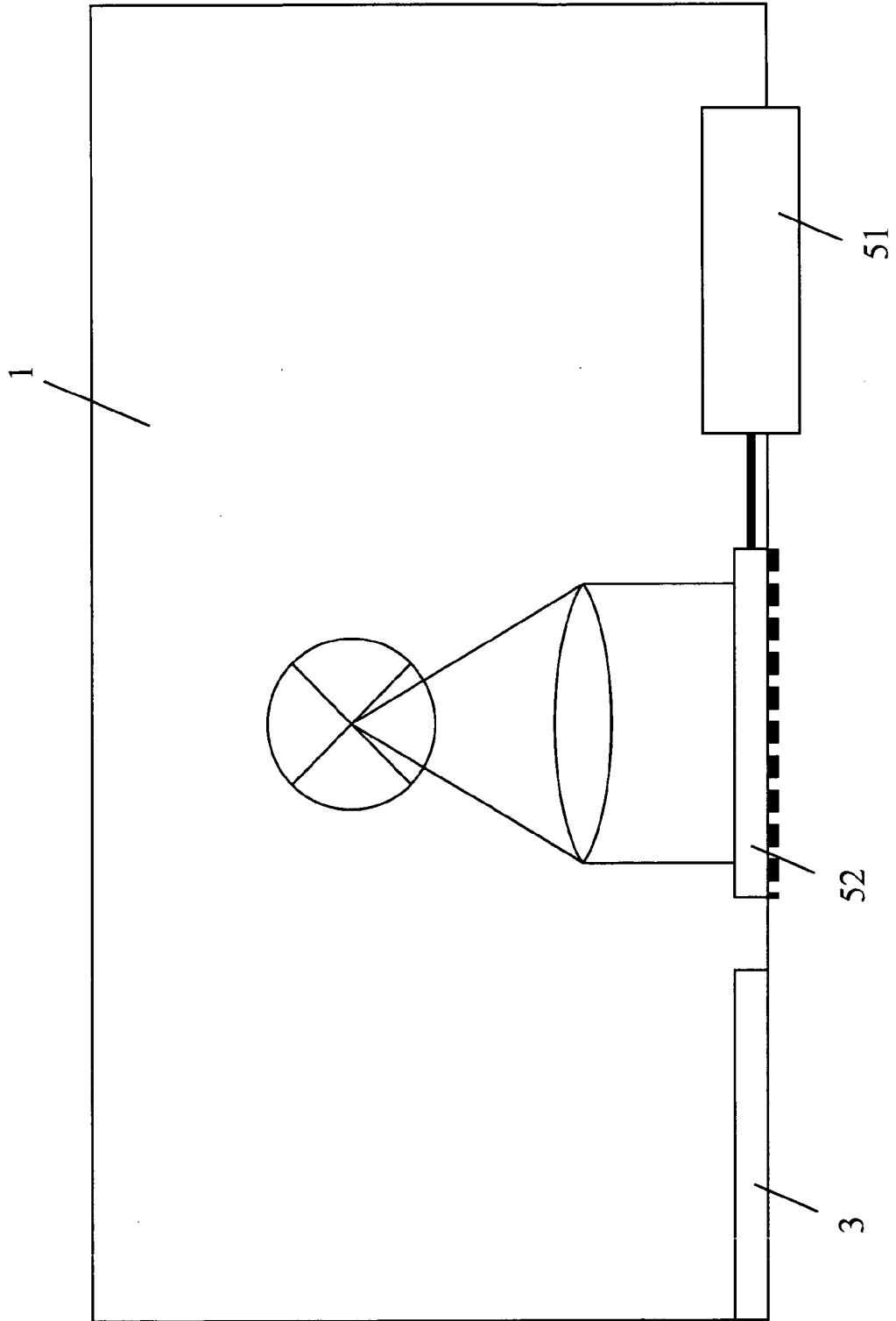


Figur 3

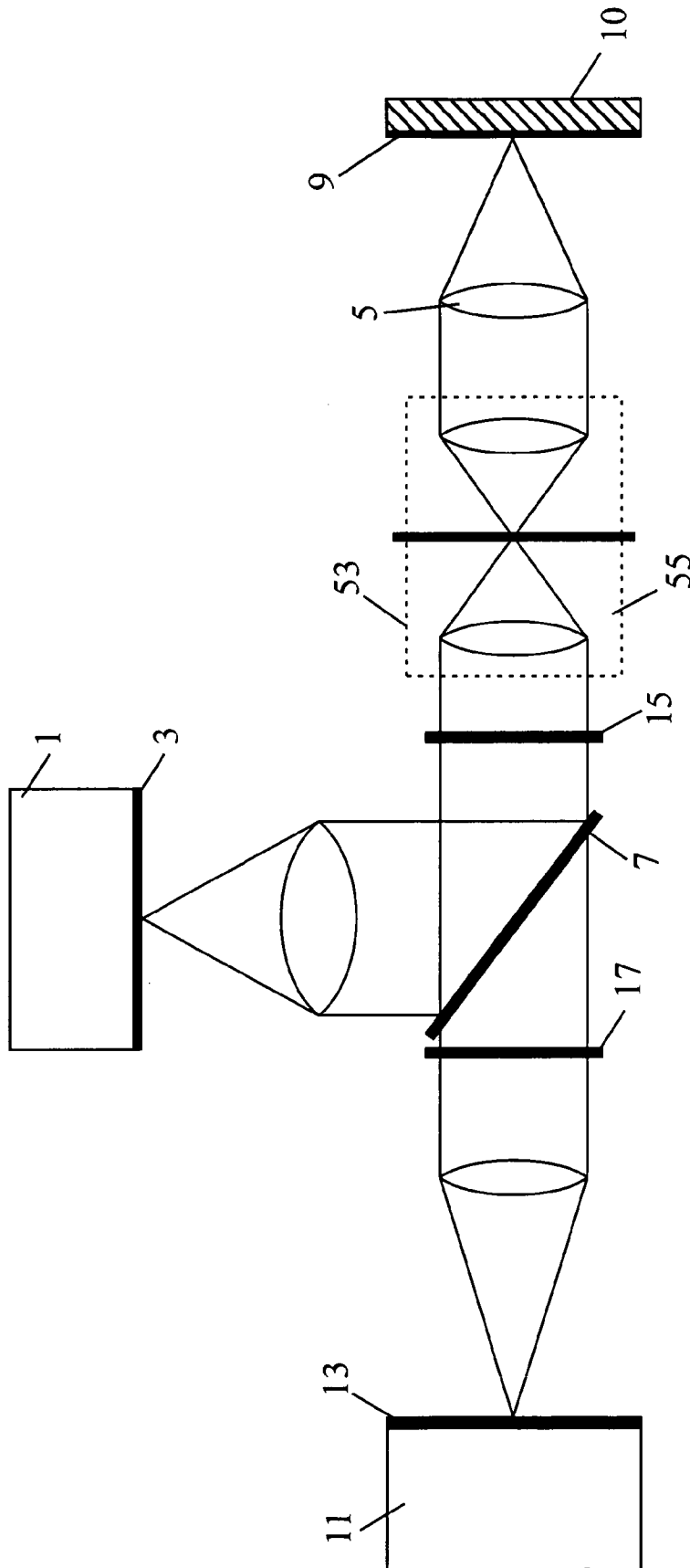




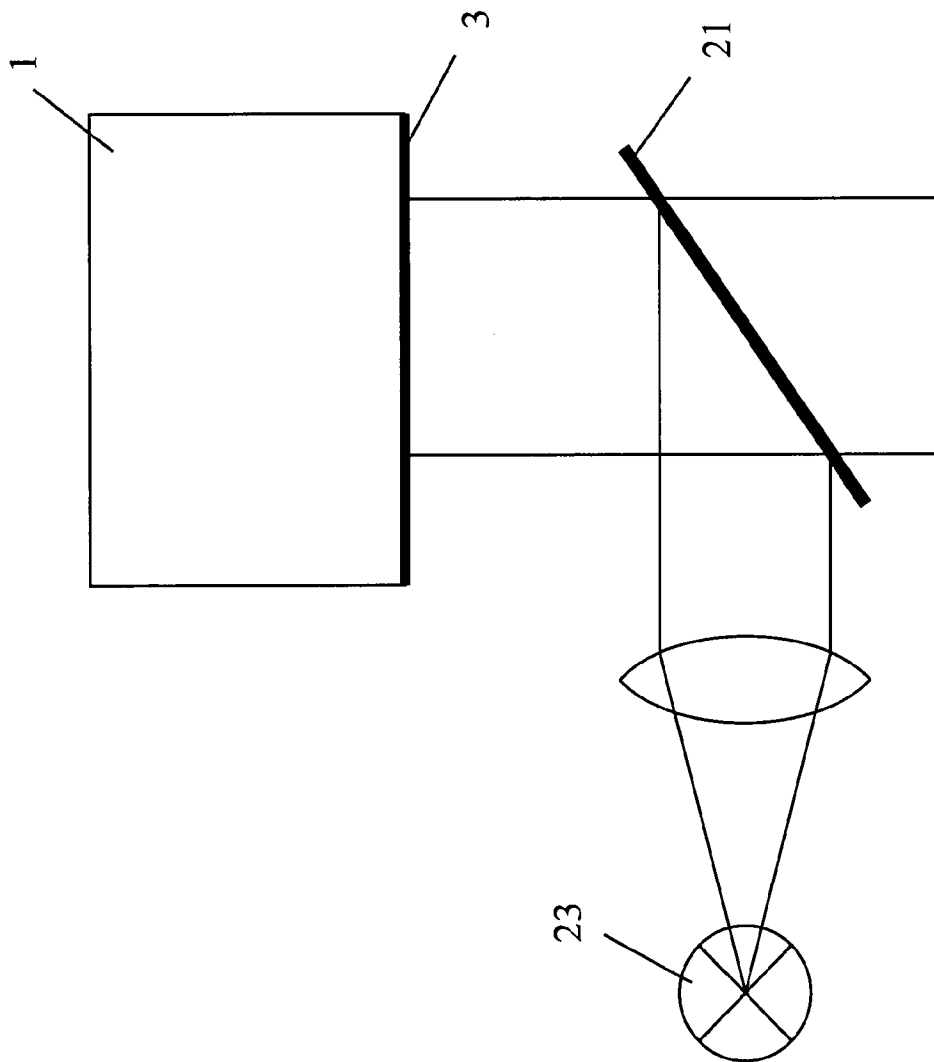
Figur 4



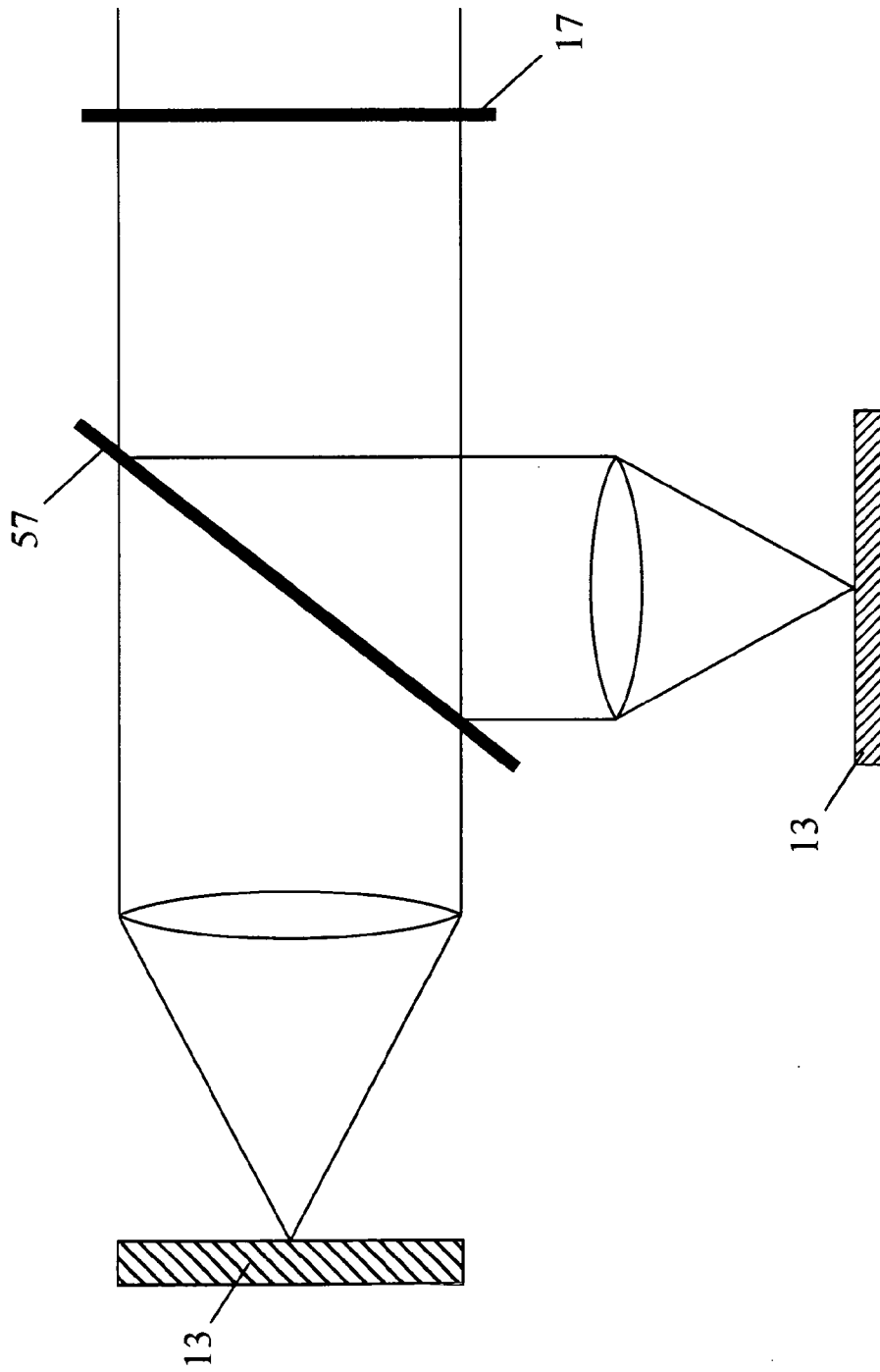
Figur 5



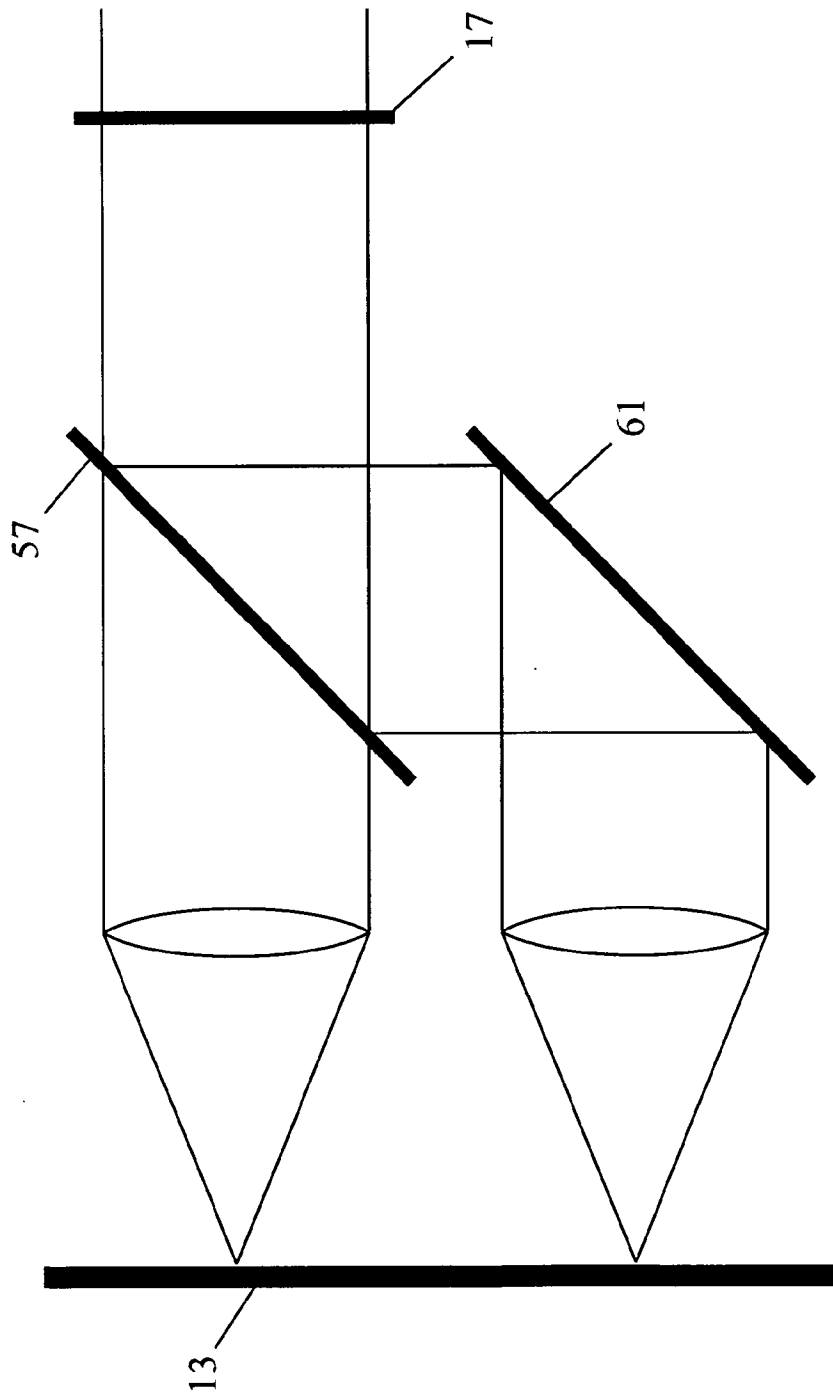
Figur 6



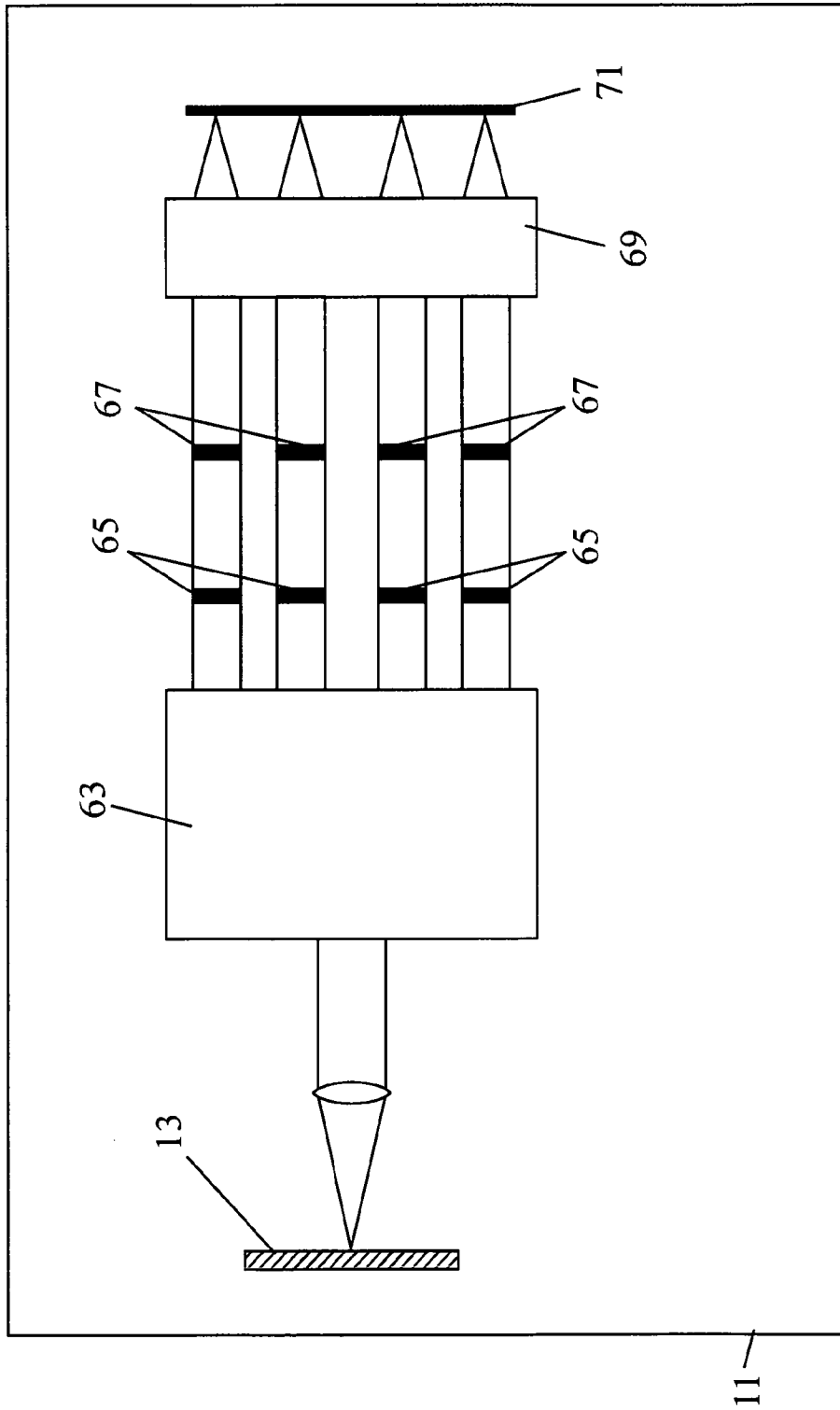
Figur 7



Figur 8



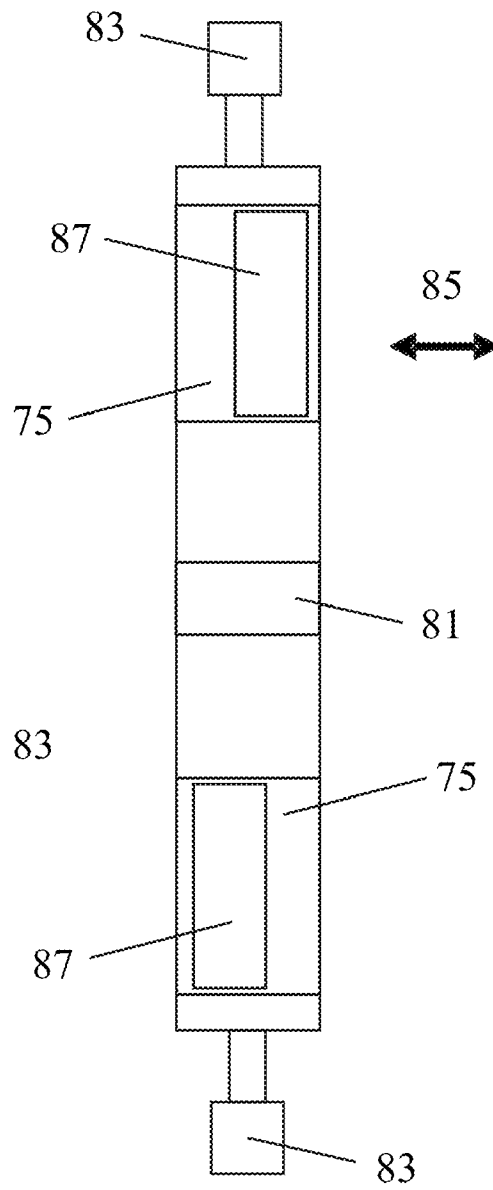
Figur 9



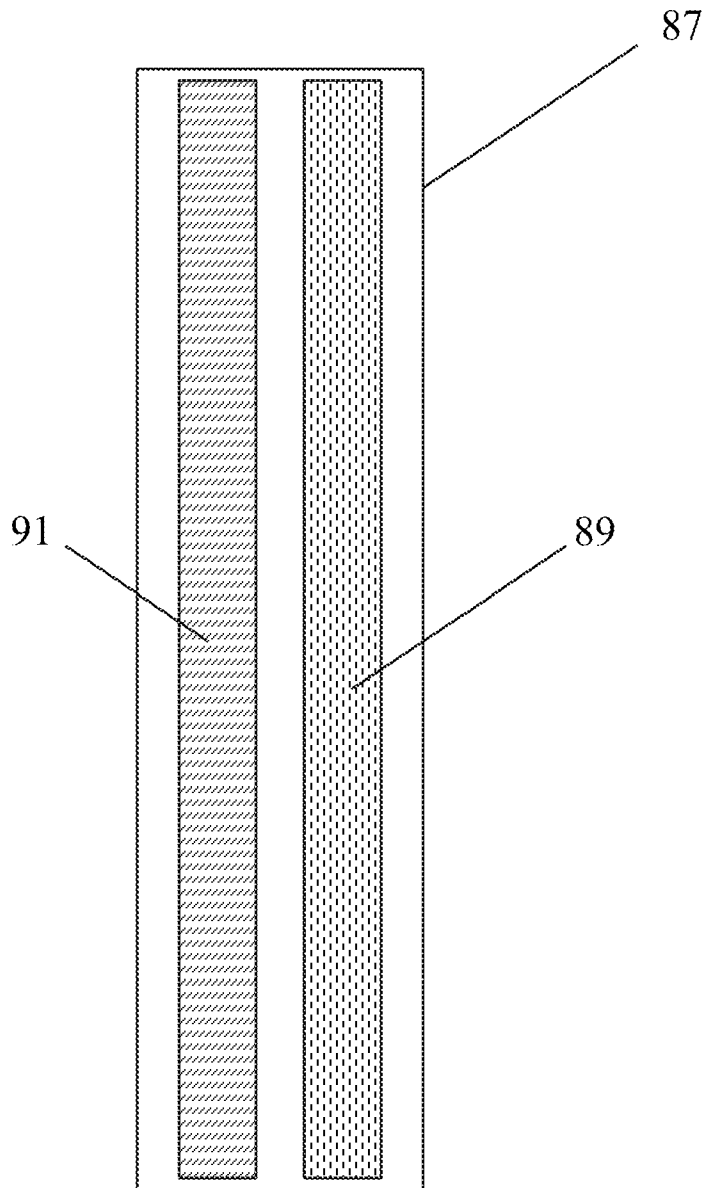
Figur 10





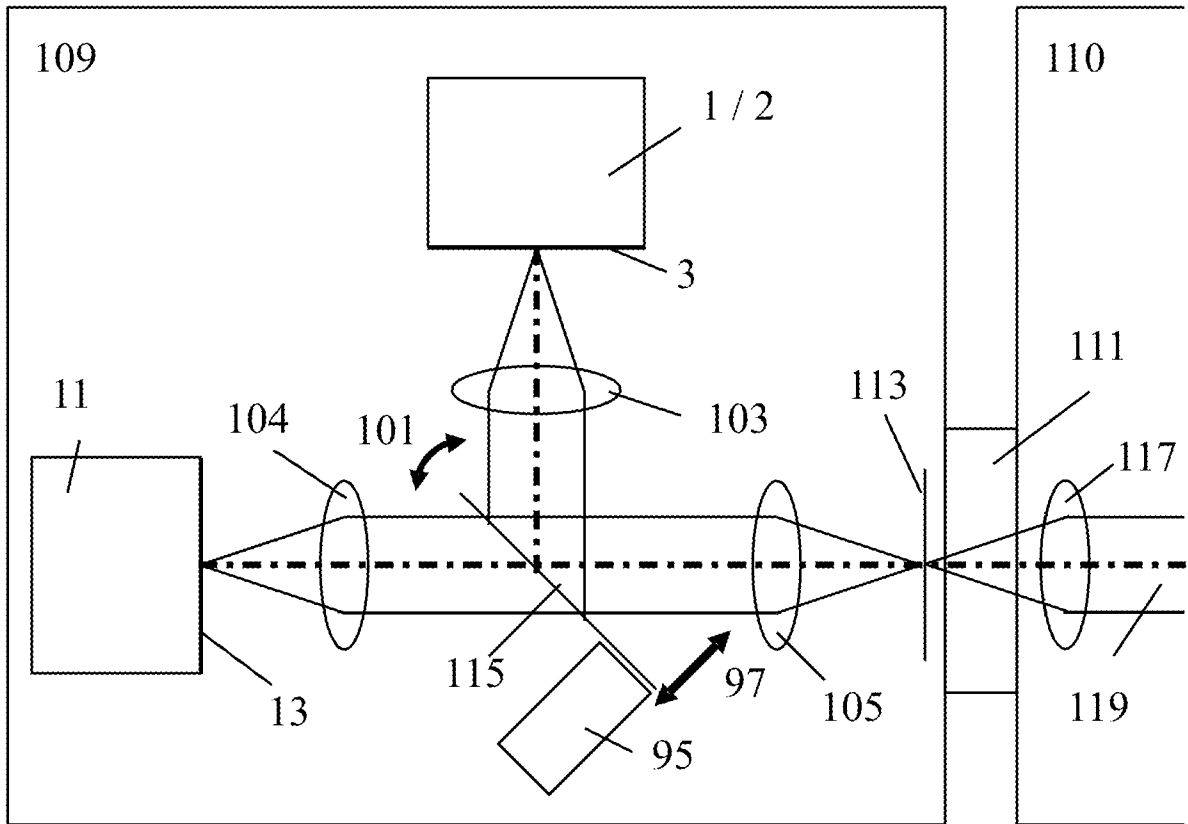


Figur 11b

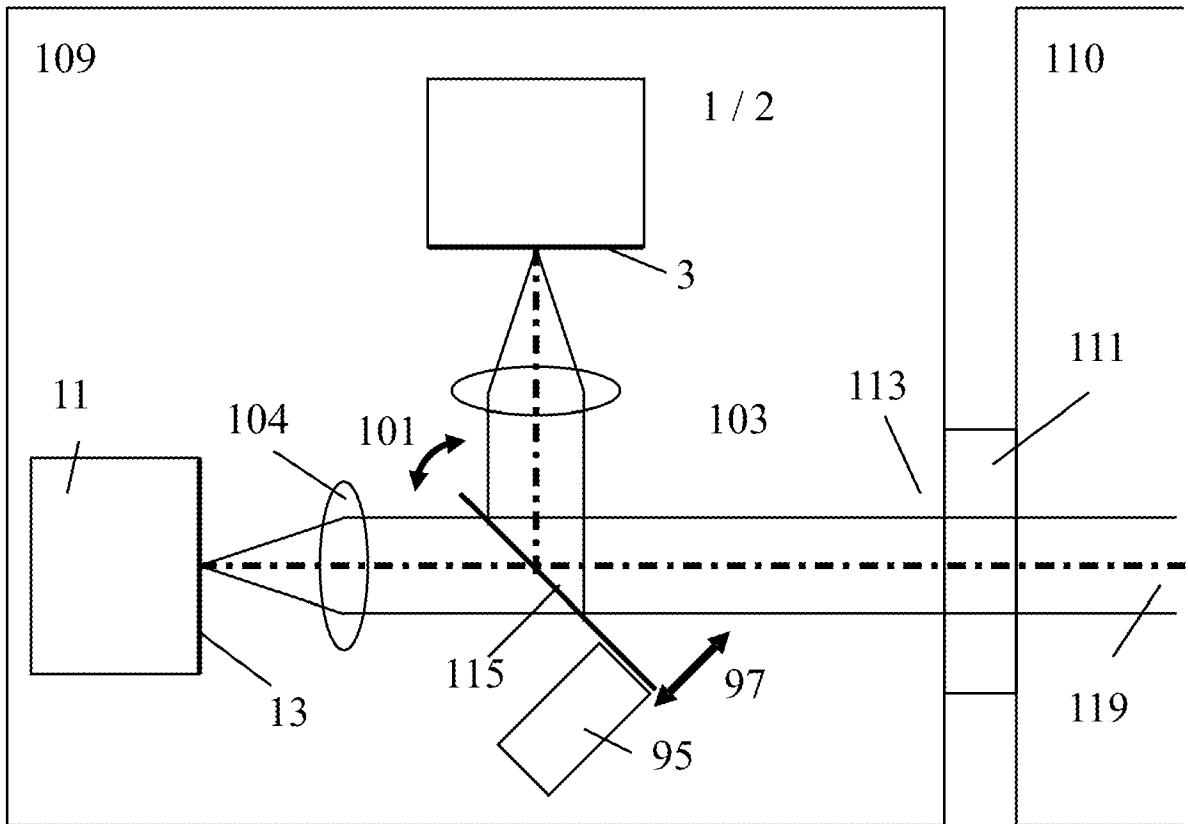


Figur 11c

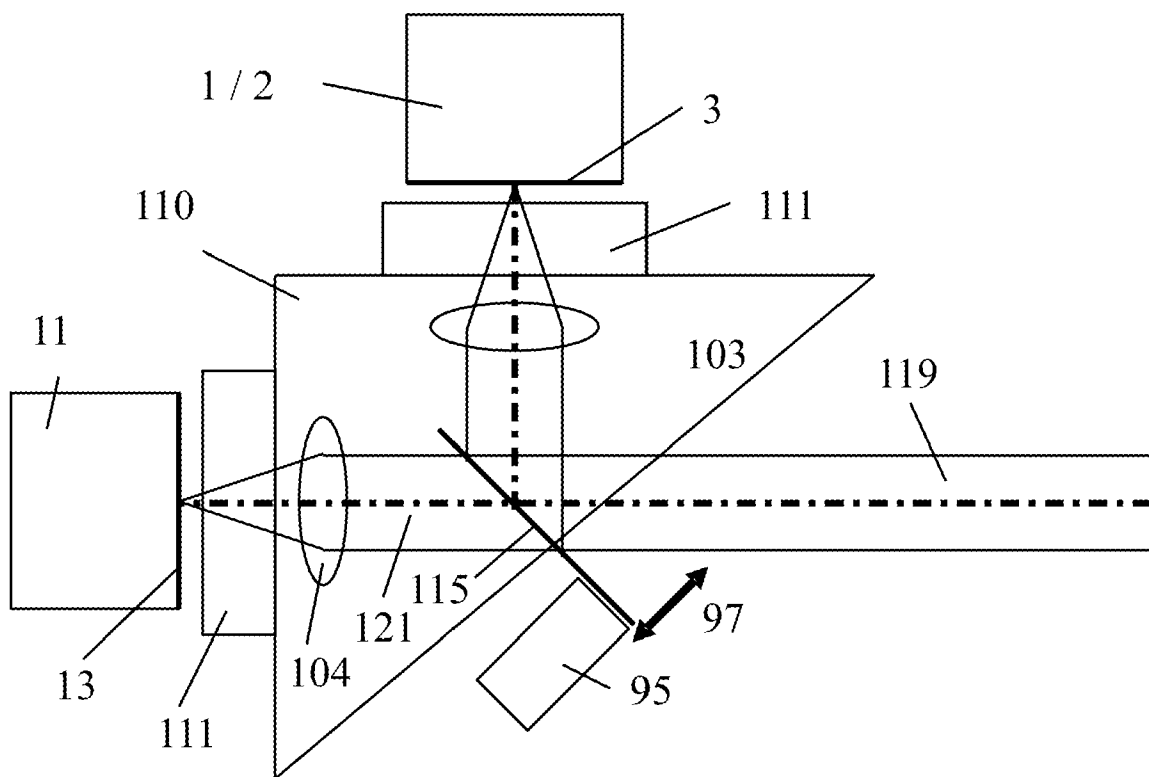




Figur 13



Figur 14



Figur 15