



(10) **DE 10 2012 201 003 B4** 2024.07.25

(12)

## Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2012 201 003.3**  
(22) Anmeldetag: **24.01.2012**  
(43) Offenlegungstag: **25.07.2013**  
(45) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: **25.07.2024**

(51) Int Cl.: **G01N 21/64** (2006.01)  
**G02B 21/24** (2006.01)

Innerhalb von neun Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:  
**Carl Zeiss Microscopy GmbH, 07745 Jena, DE**

(74) Vertreter:  
**Patentanwälte GEYER, FEHNERS & PARTNER  
mbB, 80687 München, DE**

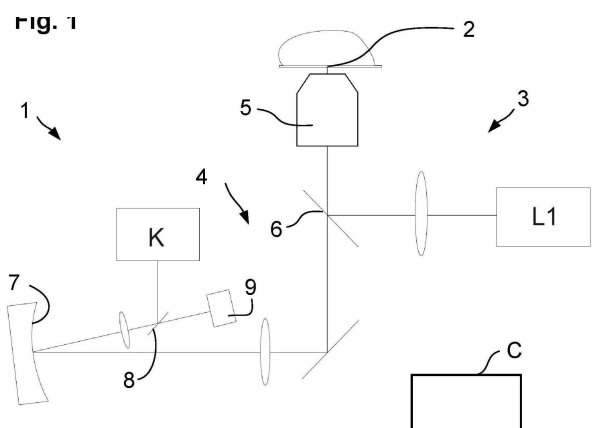
(72) Erfinder:  
**Kalkbrenner, Thomas, Dr., 07745 Jena, DE;  
Wolleschensky, Ralf, 07743 Jena, DE**

(56) Ermittelter Stand der Technik:  
**siehe Folgeseiten**

(54) Bezeichnung: **Mikroskop und Verfahren für die hochauflösende 3-D Fluoreszenzmikroskopie**

(57) Hauptanspruch: Verfahren zur hochauflösenden 3D-Fluoreszenzmikroskopie, wobei

- in einer Probe (2) wiederholt Fluoreszenzmitter zur Abgabe von Fluoreszenzstrahlung angeregt und von der Probe (2) mit einem Mikroskop (1), das einen Abbildungsstrahlengang (4) mit einer optischen Auflösung und eine Fokalebene aufweist, Einzelbilder (10) erzeugt werden, wobei die Fluoreszenzmitter derart zur Abgabe von Fluoreszenzstrahlung angeregt werden, dass zumindest eine Teilmenge der Fluoreszenzmitter in jedem Einzelbild (10) derart isoliert ist, so dass die Bilder (11) dieser Fluoreszenzmitter im Rahmen der optischen Auflösung in den Einzelbildern (10) trennbar sind,
- in den erzeugten Einzelbildern (10) aus den Bildern der isolierten Fluoreszenzmitter die Lagen dieser Fluoreszenzmitter mit einer über eine optische Auflösung hinaus gehenden Ortsgenauigkeit lokalisiert werden und daraus ein hochaufgelöstes Gesamtbild erzeugt wird,
- jedes Einzelbild mittels eines Teilerlements (7) in ein erstes und ein zweites Teilbild (12, 13) aufgeteilt wird, wobei das erste Teilbild (12) eine erste Fokalebene in der Probe (2) und das zweite Teilbild (13) eine zweite Fokalebene in der Probe (2) abbildet,
- beide Teilbilder (12, 13) getrennt abgebildet werden, dadurch gekennzeichnet, dass
- als Teilerlement ein adaptiver Spiegel (7) verwendet und im Wesentlichen in einer Pupille des Abbildungsstrahlengangs (4) angeordnet wird,
- der adaptive Spiegel (7) so eingestellt wird, dass er die zwei Teilbilder (12, 13) zeitlich oder örtlich getrennt abbildet, und
- der adaptive Spiegel (7) so eingestellt wird, dass er zwei unterschiedliche Fokuslängen für die beiden Teilbilder (12, 13) realisiert.



(56) Ermittelter Stand der Technik:

DE	10 2006 021 317	B3
DE	10 2008 009 216	A1
DE	10 2008 024 568	A1
DE	10 2008 049 886	A1
DE	10 2008 059 328	A1
DE	10 2009 043 744	A1
DE	10 2009 060 490	A1
DE	10 2010 044 013	A1
US	7 675 045	B1
US	2009 / 0 059 360	A1
US	2009 / 0 134 342	A1
US	2009 / 0 237 501	A1
US	2009 / 0 242 798	A1
US	2009 / 0 242 801	A1
US	2009 / 0 263 002	A1
US	2010 / 0 160 613	A1
US	2010 / 0 207 037	A1
US	2010 / 0 283 835	A1
EP	2 437 097	A2
WO	2006/ 127 692	A3
WO	2012/ 039 636	A2

Huang, B. [u.a.], In: Science, Vol. 319, 2008, Seite 810

Juette, [u.a.]; In: Nature Methods, Vol. 5, 2008, Seite 527

Pavani, [u.a.], In: PNAS, Vol. 106, 2009, Seite 2995

Shtengel, [u.a.]; In: PNAS, Vol. 106, 2009, Seite 3125

Toprak, [u.a.], In: Nanolet., Vol. 7, 2007, Seiten 3285 - 3290

## Beschreibung

**[0001]** Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur hochauflösenden 3D-Fluoreszenzmikroskopie, wobei in einer Probe wiederholt Fluoreszenzemitter zur Abgabe von Fluoreszenzstrahlung angeregt und von der Probe mit einem Mikroskop, das einen Abbildungsstrahlengang mit einer optischen Auflösung und eine Fokalebene aufweist, Einzelbilder erzeugt werden, wobei die Fluoreszenzemitter derart zur Abgabe von Fluoreszenzstrahlung angeregt werden, dass zumindest eine Teilmenge der Fluoreszenzemitter in jedem Einzelbild derart isoliert ist, so dass die Bilder dieser Fluoreszenzemitter im Rahmen der optischen Auflösung in den Einzelbildern trennbar sind, in den erzeugten Einzelbildern aus den Bildern der isolierten Fluoreszenzemitter die Lagen dieser Fluoreszenzemitter mit einer über eine optische Auflösung hinaus gehenden Ortsgenauigkeit lokalisiert werden und daraus ein hochaufgelöstes Gesamtbild erzeugt wird, jedes Einzelbild mittels eines Teilerlements in ein erstes und ein zweites Teilbild aufgeteilt wird, wobei das erste Teilbild eine erste Fokalebene in der Probe und das zweite Teilbild eine zweite Fokalebene in der Probe abbildet, beide Teilbilder nebeneinander auf eine Kamera abgebildet werden.

**[0002]** Die Erfindung bezieht sich weiter auf ein Fluoreszenzmikroskop zum dreidimensionalen Abbilden einer Probe mit einer über eine optische Auflösung gesteigerten Ortsauflösung, das aufweist: eine Beleuchtungseinrichtung, die dazu ausgebildet ist, in der Probe wiederholt Fluoreszenzemitter zur Abgabe von Fluoreszenzstrahlung anzuregen eine Abbildungsstrahlengang mit der optischen Auflösung umfassende Abbildungseinrichtung, die dazu ausgebildet ist, von der Probe mit der optischen Auflösung Einzelbilder zu erzeugen, eine Steuereinrichtung, die dazu ausgebildet ist, die Beleuchtungseinrichtung und die Abbildungseinrichtung so anzusteuern, dass von der Probe mehrere Einzelbilder erzeugt werden, wobei die Fluoreszenzemitter derart zur Abgabe von Fluoreszenzstrahlung angeregt sind, dass zumindest eine Teilmenge der Fluoreszenzemitter in jedem Einzelbild derart isoliert ist, dass die Bilder dieser Fluoreszenzemitter im Rahmen der optischen Auflösung in den Einzelbildern trennbar sind, wobei die Steuereinrichtung dazu ausgebildet ist, in den erzeugten Einzelbildern die Lagen der isoliert fluoreszierenden Fluoreszenzemitter mit einer über eine optische Auflösung hinaus gehenden Ortsgenauigkeit zu lokalisieren und daraus ein hochaufgelöstes Gesamtbild zu erzeugen, der Abbildungsstrahlengang ein Teilerlement aufweist, das jedes Einzelbild in ein erstes und ein zweites Teilbild aufteilt, wobei das erste Teilbild eine erste Fokalebene in der Probe und das zweite Teilbild eine zweite Fokalebene in der Probe abbildet, die Abbildungseinrichtung eine Kamera umfasst, auf die beide Teilbilder nebeneinander abgebildet sind.

**[0003]** Im Stand der Technik sind verschiedene Verfahren zur Überwindung der Beugungsgrenze in der Mikroskopie entwickelt worden. Aus der WO 2006 / 127 692 A2 oder der DE 10 2006 021 317 A1 ist ein mit PALM abgekürztes Verfahren (photo activated light microscopy) bekannt, das eine Markierungssubstanz zur Abbildung einer Probe verwendet, welche z.B. mittels optischer Strahlung aktiviert werden kann. Nur im aktivierten Zustand kann die Markierungssubstanz bestimmte Fluoreszenzstrahlung abgeben. Nicht aktivierte Moleküle der Markierungssubstanz senden auch nach Einstrahlung von Anregungsstrahlung keine oder zumindest keine merkliche Fluoreszenzstrahlung ab. Man bezeichnet deshalb die Aktivierungsstrahlung allgemein als Umschaltsignal. Im PALM-Verfahren wird nun das Umschaltsignal so aufgebracht, dass zumindest ein gewisser Anteil der aktivierten Markierungsmoleküle von benachbarten aktivierten Molekülen so beabstandet ist, dass diese Markierungsmoleküle gemessen an der optischen Auflösung der Mikroskopie getrennt oder nachträglich durch Bildverarbeitungsverfahren trennbar sind. Man spricht davon, dass eine Teilmenge der Fluoreszenzemitter isoliert wird. Nach Aufnahme der Fluoreszenzstrahlung wird für diese isolierten Emittenten dann das Zentrum deren auflösungsbegrenzt bedingter Strahlungsverteilung ermittelt. Daraus kann man rechnerisch die Lage der Moleküle mit höherer Genauigkeit bestimmen, als es die optische Auflösung eigentlich zulässt. Dieser Vorgang wird als Lokalisierung bezeichnet. Die gesteigerte Auflösung durch rechnerische Schwerpunktbestimmung der Beugungsverteilung wird in der englischen Fachliteratur auch als „super resolution“ bezeichnet. Sie erfordert, dass in der Probe zumindest eine Teilmenge der aktivierten Markierungsmoleküle mit der optischen Auflösung unterscheidbar, also isoliert sind. Dann kann ihre Ortslage mit höherer Genauigkeit bestimmt werden, sie können lokalisiert werden.

**[0004]** Zum Isolieren einzelner Markierungsmoleküle nutzt das PALM-Prinzip statistische Effekte aus. Bei einem Markierungsmolekül, das nach Empfang des Umschaltsignals gegebener Intensität zur Fluoreszenzstrahlung anregbar ist, kann durch Einstellen der Intensität des Umschaltsignals dafür gesorgt werden, dass die Wahrscheinlichkeit in einem gegebenen Flächenbereich der Probe vorhandene Markierungsmoleküle zu aktivieren, so gering ist, dass es ausreichend Teilbereiche gibt, in denen innerhalb der optischen Auflösung nur unterscheidbare Markierungsmoleküle Fluoreszenzstrahlung emittieren.

**[0005]** Das PALM-Prinzip wurde hinsichtlich der Aktivierung der zu erfassenden Moleküle weitergebildet. So ist beispielsweise bei Molekülen, die einen langlebigen nicht fluoreszierenden und einen kurzlebigen fluoreszierenden Zustand aufweisen, ein sepa-

rates Aktivieren mit spektral von der Anregungsstrahlung sich unterscheidender Aktivierungsstrahlung gar nicht erforderlich. Vielmehr wird die Probe zuerst mit Beleuchtungsstrahlung hoher Intensität so aktiviert, dass der weit überwiegende Anteil der Moleküle in den nicht fluoreszenzfähigen langlebigen Zustand (z.B. einen Triplet-Zustand) gebracht werden. Die verbleibenden, dann noch fluoreszierenden Moleküle sind dadurch hinsichtlich der optischen Auflösung isoliert.

**[0006]** Es sei auch noch angemerkt, dass das PALM-Prinzip in der Fachliteratur mittlerweile auch andere Abkürzungen erhalten hat, wie beispielsweise STORM etc. In dieser Beschreibung wird die Abkürzung PALM für alle Mikroskopieaufnahmen verwendet, die eine Ortsauflösung über die optische Auflösung der verwendeten Apparatur hinaus erreichen, indem Fluoreszenzmoleküle zuerst isoliert und dann lokalisiert werden. Das PALM-Verfahren hat den Vorteil, dass für die Beleuchtung keine hohe Ortsauflösung benötigt wird. Eine einfache Weitfeldbeleuchtung ist möglich.

**[0007]** Das PALM-Prinzip erfordert es, dass viele Einzelbilder der Probe aufgenommen werden, die jeweils Teilmengen aus isolierten Molekülen enthalten. Um die Probe zur Gänze abzubilden, muss die Menge aller Einzelbilder sicherstellen, dass möglichst alle Moleküle mindestens einmal in einer Teilmenge enthalten waren. Das PALM-Verfahren benötigt deshalb regelmäßig eine Vielzahl von Einzelbildern, was eine gewisse Dauer für die Aufnahme eines Gesamtbildes bedingt. Damit ist ein erheblicher Rechenaufwand verbunden, da in jedem Einzelbild rechnerisch eine Vielzahl von Molekülen lokalisiert werden muss. Es fallen große Datenmengen an.

**[0008]** Diese Lokalisierungsgenauigkeit wird durch die Lokalisierung in Einzelbildern lediglich lateral erreicht, also in einer Ebene, die der Bildebene der Kamera zugeordnet ist. Die Verfahren sind also in dieser Hinsicht auf eine zweidimensionale Probenanalyse beschränkt. Man kombiniert das PALM-Prinzip deshalb mit einer TIRF-Anregung, welche sicherstellt, dass nur Fluorophore aus einer dünnen Schicht der Probe emittieren.

**[0009]** Zur Lokalisierung lumineszierender Markierungsmoleküle in der dritten Raumrichtung, welche bezogen auf die Abbildung der Probe die Tiefenrichtung ist, sind aus dem Stand der Technik ebenfalls Ansätze bekannt. Unter „Tiefenrichtung“ wird dabei die Richtung längs des Lichteinfalls, also längs der optischen Achse verstanden.

**[0010]** Die Publikation B. Huang et al., Science 319, Seite 810, 2008, beschreibt für das PALM-Prinzip einen Abbildungsstrahlengang, in dem eine schwa-

che Zylinderlinse liegt, die zu einer gezielten astigmatischen Verzeichnung führt. Dadurch wird das Bild des Moleküls auf der Kamera elliptisch verzerrt, sobald sich das Molekül ober- oder unterhalb der Fokalebene, also des Symmetriepunktes der Punktbildverwaschungsfunktion befindet. Aus der Orientierung und der Stärke der Verzerrung lässt sich die Information über die Tiefenlage des lumineszierenden Markierungsmoleküls gewinnen. Ein Nachteil dieses Verfahrens liegt darin, dass auch die lokale Umgebung und die Orientierung eines molekularen Dipols zu einer Verzerrung des Bildes des lumineszierenden Markierungsmoleküls führen können, die mit der Tiefenlage nichts zu tun hat. Solchen lumineszierenden Markierungsmolekülen wird dann, je nach ihrer Orientierung, ein falscher Tiefenwert zugeordnet.

**[0011]** Die Veröffentlichung Pavani et al., PNAS 106, Seite 2995, 2009, schlägt vor, die Punktbildverwaschungsfunktion durch einen räumlichen Phasenmodulator in der Abbildung zu einer Doppelhelixstruktur zu modifizieren. Die Punktbilder einzelner, lumineszierender Markierungsmoleküle werden dann zu Doppelspots, ihre Tiefenlage ist in der Winkellorientierung der gemeinsamen Achse der Doppelspots kodiert.

**[0012]** Gemäß der Veröffentlichung von Shtengel et al., PNAS 106, Seite 3125, 2009, werden von den lumineszierenden Markierungsmolekülen emittierten Photonen mit sich selbst zur Interferenz gebracht. Dazu werden zwei in  $4\pi$ -Konfiguration montierte Objektive verwendet, welche die lumineszierenden Markierungsmoleküle gleichzeitig beobachten. Die derart gewonnenen Teilstrahlengänge werden mittels eines speziellen Drei-Wege-Strahlteilers zur Interferenz gebracht. Jedes der damit erhaltenen Dreipunktbilder wird mit einer Kamera detektiert. Die Intensitätsverhältnisse der Dreipunktbilder geben Aufschluss über die Tiefenlage.

**[0013]** Die Publikationen Toprak et al., Nanolet. 7, Seiten 3285-3290, 2007 sowie Juette et al., Nature Methods 5, Seite 527, 2008, beschreiben einen Ansatz, bei dem ein 50/50-Strahlteiler in den Abbildungsstrahlengang eingebaut wird, der das Abbild der Probe in zwei Teilbilder aufspaltet. Diese zwei Bilder werden eigenständig detektiert. Zusätzlich wird in einem der damit erhaltenen Teilstrahlengänge eine optische Weglängendifferenz dergestalt eingeführt, dass sich aus den beiden Teilstrahlengängen zwei Objektebenen ergeben, die etwa um die halbe oder ganze optische Mindestauf Auflösung (beispielsweise 700 nm) in z-Richtung, also Tiefenrichtung, auseinanderliegen. Die Tiefenposition von Markierungsmolekülen, die zwischen diesen beiden Ebenen liegen, ergibt sich nun durch Analyse der zwei Teilbilder desselben Markierungsmoleküls (z. B. hinsichtlich der Breite des Punktbildverwaschungsbildes,

was durch eine Art Subtraktion erfolgen kann) oder durch entsprechendes Fitten einer dreidimensionalen Punktbildverwaschungsfunktion. Das Verfahren erfordert zwei hochaufgelöste Teilbilder und eine präzise Justage der Strahlengänge und Kalibriermessungen, um eine sub-pixelgenaue Überlagerung der beiden Teilbilder zu erreichen. Weiter sind die beiden Teilbilder eines Markierungsmoleküls in der Regel von unterschiedlicher Form, da sich die laterale Ausdehnung der Punktbildverwaschungsfunktion eines abbildenden Systems in Abhängigkeit von der Lage der betrachteten Objektebene ändert.

**[0014]** Die DE 10 2009 060 490 A1, welche im Übrigen weitere Literaturnachweise zur 3D-Hochauflösung aufführt, verfolgt ebenfalls den gattungsgemäßen Ansatz gemäß Toprak et al., das Abbild der Probe in zwei Teilbilder aufzuspalten. Weitere Aspekte zur Hochauflösung in der Mikroskopie sind den US 2009 / 0 242 801 A1, US 2009 / 0 059 360 A1, EP 2 437 097 A2, US 2009 / 0 237 501 A1, US 2009 / 0 242 798 A1, DE 10 2010 044 013 A1, US 7 675 045 B1 US 2009/0 134 342 A1, DE 10 2008 009 216 A1, DE 10 2008 024 568 A1, US 2010/0 160 613 A1, US 2010 / 0 283 835 A1, US 2010 / 0 207 037 A1, DE 10 2008 059 328 A1, DE 10 2008 049 886 A1 und US 2009 / 0 263 002 A1 zu entnehmen.

**[0015]** Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein solches Verfahren dahingehend zu verbessern, dass der Aufbau vereinfacht und Justieranforderungen einfach zu erfüllen sind.

**[0016]** Die Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur hochauflösenden 3D-Fluoreszenzmikroskopie, wobei in einer Probe wiederholt Fluoreszenzemitter zur Abgabe von Fluoreszenzstrahlung angeregt und von der Probe mit einem Mikroskop, das einen Abbildungsstrahlengang mit einer optischen Auflösung und eine Fokalebene aufweist, Einzelbilder erzeugt werden, wobei die Fluoreszenzemitter derart zur Abgabe von Fluoreszenzstrahlung angeregt werden, dass zumindest eine Teilmenge der Fluoreszenzemitter in jedem Einzelbild derart isoliert ist, so dass die Bilder dieser Fluoreszenzemitter im Rahmen der optischen Auflösung in den Einzelbildern trennbar sind, in den erzeugten Einzelbildern aus den Bildern der isolierten Fluoreszenzemitter die Lagen dieser Fluoreszenzemitter mit einer über eine optische Auflösung hinaus gehenden Ortsgenauigkeit lokalisiert werden und daraus ein hochaufgelöstes Gesamtbild erzeugt wird, jedes Einzelbild mittels eines Teilerlements in ein erstes und ein zweites Teilbild aufgeteilt wird, wobei das erste Teilbild eine erste Fokalebene in der Probe und das zweite Teilbild eine zweite Fokalebene in der Probe abbildet, beide Teilbilder auf mindestens eine Kamera abgebildet werden, bei dem als Teilerlement ein adaptiver Spiegel verwendet und im Wesentlichen in einer Pupille des Abbil-

dungsstrahlengangs angeordnet wird, der adaptive Spiegel so eingestellt wird, dass er die zwei Teilbilder zeitlich oder örtlich getrennt abbildet, und der adaptive Spiegel so eingestellt wird, dass er zwei unterschiedliche Fokuslängen für die beiden Teilbilder realisiert.

**[0017]** Die Aufgabe wird ebenfalls gelöst durch ein Fluoreszenzmikroskop zum dreidimensionalen Abbilden einer Probe mit einer über eine optische Auflösung gesteigerten Ortsauflösung, das aufweist: eine Beleuchtungseinrichtung, die dazu ausgebildet ist, in der Probe wiederholt Fluoreszenzemitter zur Abgabe von Fluoreszenzstrahlung anzuregen eine einen Abbildungsstrahlengang mit der optischen Auflösung umfassende Abbildungseinrichtung, die dazu ausgebildet ist, von der Probe mit der optischen Auflösung Einzelbilder zu erzeugen, eine Steuereinrichtung, die dazu ausgebildet ist, die Beleuchtungseinrichtung und die Abbildungseinrichtung so anzusteuern, dass von der Probe mehrere Einzelbilder erzeugt werden, wobei die Fluoreszenzemitter derart zur Abgabe von Fluoreszenzstrahlung angeregt sind, dass zumindest eine Teilmenge der Fluoreszenzemitter in jedem Einzelbild derart isoliert ist, dass die Bilder dieser Fluoreszenzemitter im Rahmen der optischen Auflösung in den Einzelbildern trennbar sind, wobei die Steuereinrichtung dazu ausgebildet ist, in den erzeugten Einzelbildern die Lagen der isoliert fluoreszierenden Fluoreszenzemitter mit einer über eine optische Auflösung hinaus gehenden Ortsgenauigkeit zu lokalisieren und daraus ein hochaufgelöstes Gesamtbild zu erzeugen, der Abbildungsstrahlengang ein Teilerlement aufweist, das jedes Einzelbild in ein erstes und ein zweites Teilbild aufteilt, wobei das erste Teilbild eine erste Fokalebene in der Probe und das zweite Teilbild eine zweite Fokalebene in der Probe abbildet, die Abbildungseinrichtung mindestens eine Kamera umfasst, auf die beide Teilbilder abgebildet sind, bei dem das Teilerlement als adaptiver Spiegel ausgebildet ist, der im Wesentlichen in einer Pupille des Abbildungsstrahlengangs angeordnet ist, die Steuereinrichtung dazu ausgebildet ist, den adaptiven Spiegel so einzustellen, dass er die zwei Teilbilder zeitlich oder örtlich getrennt abbildet, und die Steuereinrichtung dazu ausgebildet ist, den adaptiven Spiegel so einzustellen, dass er zwei unterschiedliche Fokuslängen für die beiden Teilbilder realisiert.

**[0018]** Erfindungsgemäß wird als strahlteilendes Element ein adaptiver Spiegel verwendet. Er hat eine Doppelfunktion, da er sowohl die Teilbilder räumlich trennt, als sie auch unterschiedlichen Fokalebenen zuordnet. Dies reduziert den Justieraufwand, der im Stand der Technik kennzeichnend für das von der Erfindung verwendete Prinzip war.

**[0019]** Dieses liegt darin, für jedes Einzelbild mindestens zwei Teilbilder zu erzeugen, welche unter-

schiedlichen Fokusebenen in der Probe zugeordnet sind. In den Teilbildern erscheinen dann die Punktbilder der isolierten Fluorophore mit einer Größe, welche von der Tiefenlage des Fluorophors abhängt. Befindet sich das Fluorophor beispielsweise in der Fokusebene eines Teilbildes, ist das Punkt-Bild des Fluoreszenzemitters so klein, wie es die Beugungsbegrenzung zulässt. Mit zunehmendem Abstand zur Fokusebene wächst das Punkt-Bild bei ansonsten gleicher Geometrie. Die Größe des Punkt-Bildes eines Fluoreszenzemitters kodiert den Abstand zur Fokusebene. Unbekannt ist es jedoch, ob der Fluoreszenzemitter sich über oder unter der Fokusebene befindet. Deshalb werden in dem von der Erfindung verfolgten Prinzip mindestens zwei Teilbilder für zwei unterschiedliche Fokusebenen in der Probe erzeugt, um nicht nur den Abstand von der Fokusebene, sondern auch die absolute Lage zur Fokusebene bestimmen zu können. Die zwei Teilbilder können gleichzeitig auf zwei Bildaufnahmebereiche oder nacheinander auf eine Kamera abgebildet werden.

**[0020]** Der adaptive Spiegel hat gegenüber den im Stand der Technik verwendeten Konzepten weiter den Vorteil einer hohen Lichteffizienz. Verluste, wie sie an Strahlteilern etc. im Stand der Technik auftreten, kennt die erfindungsgemäße Lösung nicht. Darüber hinaus kann der Abstand der Fokusebenen der beiden Teilbilder über einen weiten Bereich verstellt werden, ohne dass eine aufwendige mechanische Betätigung von strahlwegumlenkenden Elementen etc. von Nöten wäre. Auch erlaubt es der Spiegel, die Teilbilder in rascher Folge auf eine Kamera abzubilden, da ein schneller Brennweitenwechsel realisiert werden kann.

**[0021]** Zur gleichzeitigen Erzeugung der beiden Teilbilder werden beispielsweise Teile der Spiegelfläche des adaptiven Spiegels mit einer leicht anderen Brennweite und einem gegenüber den restlichen Elementen verkippten Winkel eingestellt. Letzteres führt zur gewünschten lateralen Versetzung und der nebeneinanderliegenden Abbildung der beiden Teilbilder auf der Kamera.

**[0022]** Zusätzlich lässt sich durch Auswahl der Spiegelflächenanteile einstellen, mit welchem Intensitätsverhältnis die beiden Teilbilder erzeugt werden.

**[0023]** Da die räumliche Separation der beiden (gleichzeitig erzeugten) Teilbilder, d. h. die Divergenz ihrer optischen Achsen, wie auch die unterschiedlichen Fokuslängen lediglich durch geeignete Ansteuerung des adaptiven Spiegels bewirkt wird, ist es einfach, die gegenseitige Justierlage der beiden Teilbilder festzustellen bzw. vorzugeben. Wie bereits erwähnt, müssen die beiden Teilbilder subpixelgenau zueinander justiert sein, damit die gewünschte Hochauflösung mit Tiefenangabe erreicht werden kann.

**[0024]** Ein besonders einfaches Vorgehen zur Justierung der Teilbilder liegt darin, diese zuerst mit gleicher Fokuslänge zu erzeugen. Es liegen dann auf der Kamera nebeneinander zwei identische Teilbilder, d. h. das Einzelbild wird zweimal nebeneinander auf die Kamera abgebildet. In diesem Zustand ist es einfach möglich, die Referenzkoordinaten für die beiden Teilbilder zu gewinnen. Dazu muss lediglich eine Struktur in der Probe mit der erforderlichen Hochauflösung in beiden Teilbildern erfasst werden. Die Koordinaten des damit hochaufgelöst ermittelten Fluoreszenzemitters liefern einfach die Relativlagen der beiden Teilbilder auf der Kamera. Nachdem die Justierung derart durchgeführt wurde, wird der Spiegel so angesteuert, dass die unterschiedlichen Fokallängen realisiert werden. Die Justierlage der Teilbilder ändert sich dabei nicht, so dass die zuvor ermittelte Relativangabe der Koordinaten in den beiden Teilbildern weiterhin Gültigkeit hat.

**[0025]** Alternativ oder zusätzlich ist es zur Justierung auch möglich, die beiden Teilbilder zuerst superpositioniert auf die Kamera abzubilden und in diesem Zustand lagezujustieren. Dann wird der Spiegel so verstellt, dass die beiden Teilbilder nebeneinander zu liegen kommen. Ggf. können dabei wiederum Strukturelemente ausgewertet werden.

**[0026]** Unter „Lagejustierung“ wird hier verstanden, dass eine Koordinatenangabe ermittelt wird, die es erlaubt, einen Punkt im ersten Teilbild auch im zweiten Teilbild aufzufinden. Im einfachsten Fall kann es sich um eine Relativkoordinate handeln.

**[0027]** Die Verwendung des adaptiven Spiegels erlaubt es einfach, die Differenz der Fokuslängen zu verändern, wodurch die Tiefenauflösung bzw. der erfasste Tiefenbereich einfach einstellbar ist.

**[0028]** Um die Intensitätsverhältnisse der Teilbilder einzustellen, werden einfach die Spiegelflächenanteile des adaptiven Spiegels, die die Abbildung des ersten Teilbildes bewirken, verkleinert und um dieses Maß die Spiegelflächenanteile, welche die Abbildung des zweiten Teilbildes bewirken, vergrößert.

**[0029]** Der adaptive Spiegel erlaubt es besonders einfach, Abbildungsfehler des Abbildungsstrahlenganges zu korrigieren. Dazu ist es zweckmäßig, am Spiegel reflektierte Strahlung (auch) mit einem Wellenfrontsensor zu erfassen.

**[0030]** Als adaptiver Spiegel kommen insbesondere Spiegel mit segmentierter Oberfläche oder kontinuierliche, sogenannte Membranspiegel in Frage, wie sie dem Fachmann bekannt sind, beispielsweise aus der Veröffentlichung [www.bostonmicromachines.com/light-modulator.htm](http://www.bostonmicromachines.com/light-modulator.htm) oder [www.imagine-optic.com](http://www.imagine-optic.com). Ein Überblick über adaptive Spiegel findet

sich weiter in  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Deformable\\_mirror](http://en.wikipedia.org/wiki/Deformable_mirror).

**[0031]** Bevorzugt wird der adaptive Spiegel mit einem Wellenfrontsensor kombiniert, der die Wellenfront der Strahlung, welche am Spiegel reflektiert wurde, erfasst. Damit werden optional Abbildungsfehler des Mikroskopes oder Abbildungsfehler, die durch die Probe bewirkt werden korrigiert. Darüber hinaus ist eine Verschiebung der Fokusebene innerhalb gewisser Grenzen unproblematisch möglich, ohne dass das Mikroskopobjektiv verstellt werden müsste. Mechanische Störungen der Probe durch Bewegungen des Mikroskopobjektives können dadurch vermieden werden.

**[0032]** Unter dem Bild eines Fluoreszenzemitters ist dessen in der Regel beugungsbegrenztes Punkt-Bild gemeint.

**[0033]** Es versteht sich, dass die vorstehend genannten und die nachstehend noch zu erläuternden Merkmale nicht nur in den angegebenen Kombinationen, sondern auch in anderen Kombinationen oder in Alleinstellung einsetzbar sind, ohne den Rahmen der vorliegenden Erfindung zu verlassen. Soweit in dieser Beschreibung Verfahrensmerkmale erwähnt sind, werden sie im Betrieb des Mikroskops durch ein entsprechend ausgebildetes Steuergerät realisiert. Analog gilt eine Offenbarung von funktionellen Merkmalen des Steuergerätes auch als Beschreibung entsprechender Verfahrensmerkmale, z.B. Schritte.

**[0034]** Nachfolgend wird die Erfindung beispielsweise anhand der beigefügten Zeichnungen, die auch erfindungswesentliche Merkmale offenbaren, noch näher erläutert. Es zeigen:

**Fig. 1** eine Schemadarstellung eines Mikroskops zur tiefenaufgelösten und hochaufgelösten Fluoreszenzmikroskopie,

**Fig. 2 und 3** Teilbilder, die beim Betrieb des Mikroskops 1 zur Tiefenauflösung erzeugt werden, und

**Fig. 4** eine Schemadarstellung der Wirkungsweise eines adaptiven Spiegels im Abbildungsstrahlengang des Mikroskops der **Fig. 1**.

**[0035]** Die **Fig. 1** zeigt schematisch ein Fluoreszenzmikroskop 1, dessen Betrieb von einem Steuergerät C gesteuert wird. Es ist über nicht gezeigte Verbindungen mit den Elementen bzw. Bauteilen des Mikroskops 1 verbunden. Das Mikroskop 1 ist dazu eingerichtet, Fluoreszenzmikroskopie nach dem PALM-Prinzip etc. auszuführen. Es umfasst einen Beleuchtungsstrahlengang 3, sowie einen Abbildungsstrahlengang 4, die über ein gemeinsames Objektiv 5 eine Probe 2 beleuchten und die fluoreszierende Probe abbilden. Der Beleuchtungsstrahlen-

gang 3 ist mit dem Abbildungsstrahlengang 4 über einen in der Regel dichroitisch ausgestalteten Strahlteiler 6 zusammengefasst, so dass sowohl der Beleuchtungsstrahlung aus dem Beleuchtungsstrahlengang 3 durch das Objektiv 5 zur Probe fällt, als auch die Abbildung der Probe durch das Objektiv 5 erfolgt. Der Beleuchtungsstrahlengang 3 kann mehrere Spektralkanäle aufweisen, in der Darstellung der **Fig. 1** ist exemplarisch nur eine Laserquelle L1 dargestellt. Der Beleuchtungsstrahlengang beleuchtet die Probe so, dass Fluoreszenzstrahlung in der Probe 2 angeregt wird. Je nach Ausgestaltung des PALM-Prinzipes kann zusätzlich noch eine Anregungsstrahlenquelle in den Beleuchtungsstrahlengang 3 eingekoppelt werden.

**[0036]** Die Probe 2 gibt Fluoreszenzstrahlung ab, und im Abbildungsstrahlengang 4 wird das Bild der fluoreszierenden Probe 2 auf eine hochauflösende Kamera K geleitet. Die Auflösung von Objektiv 5, Abbildungsstrahlengang 4 und Kamera K ist so gewählt, dass ein beugungsbegrenztes Punkt-Bild eines einzelnen Fluoreszenzemitters auf mehrere Pixel fällt. Dies ermöglicht das für das eingangs geschilderte PALM-Prinzip erforderliche Lokalisieren eines Fluoreszenzemitters mit einer lateralen Ortsgenauigkeit, welche über die optische Auflösung von Mikroskop 5 und Abbildungsstrahlengang 4 hinausgeht.

**[0037]** Natürlich kann das Mikroskop 1 auch mit mehreren Farbkanälen ausgestaltet werden. Dann sind im Abbildungsstrahlengang 4 mehrere Kameras vorgesehen, die über geeignete Strahlteiler in den Strahlengang gekoppelt sind.

**[0038]** Der Abbildungsstrahlengang 4 umfasst neben nicht näher bezeichneten optischen Elementen, die für das Mikroskop 1 nicht weiter charakteristisch und im übrigen fachüblich sind, einen adaptiven Spiegel 7, dessen Spiegelfläche gekrümmt ist, und der Teil des Abbildungsstrahlenganges 4 ist. Er bündelt die Strahlung von der fluoreszierenden Probe 2 in Richtung auf die Kamera K. Seine Funktion wird noch erläutert werden.

**[0039]** Der adaptive Spiegel wird durch das Steuergerät C angesteuert, das die Geometrie der Spiegelfläche einstellt. Ein über einen Strahlteiler in den Abbildungsstrahlengang 4 geschalteter Wellenfrontsensor 9 dient dem Steuergerät C dabei dazu, die aktuelle Spiegelwirkung möglichst genau erfassen zu können. Er steigert damit die Genauigkeit, ist aber nicht zwingend erforderlich.

**[0040]** Das Steuergerät C steuert das Mikroskop 1 so an, dass das PALM-Prinzip ausgeführt wird. Die Probe 2 wird also vom Beleuchtungsstrahlengang 2 so beleuchtet, dass Fluoreszenzemitter in der Probe 2 isoliert sind, d. h. innerhalb der optischen Auflö-

sung getrennt werden können. Es wird eine Vielzahl an Einzelbildern aufgenommen, die jeweils unterschiedliche Teilmengen der Fluoreszenzmitter in der Probe 2 isoliert beinhalten. In den Einzelbildern wird dann mittels bekannter mathematischer Algorithmen vom Steuergerät C für jeden isolierten Fluoreszenzmitter dessen Lage hochgenau bestimmt, so dass eine über die optische Auflösung der Abbildung hinausgehende Ortsgenauigkeit erreicht wird. Dies wird in der Literatur als sogenannte Hochauflösung oder super resolution bezeichnet.

**[0041]** Das PALM-Prinzip erlaubt eine hochgenaue laterale Lokalisierung von Fluoreszenzmittern, d. h. die Erfassung der Lage senkrecht zur optischen Achse. Inwieweit ein Fluoreszenzmitter sich in einer Fokalebene, vor oder hinter einer Fokalebene befindet, also die Tiefenlage des Fluoreszenzmitters, wird durch das PALM-Prinzip nicht mit höherer Genauigkeit angegeben, als bei anderen Weitfeldmikroskopen auch.

**[0042]** Um in dieser Hinsicht eine bessere Auflösung zu erreichen, also eine Tiefenangabe für die lateral lokalisierten Fluoreszenzmitter zu schaffen, wird das Mikroskop 1 unter Steuerung durch das Steuergerät C so betrieben, dass jedes Einzelbild, in dem die laterale Lokalisierung erfolgt, in zwei Teilbilder aufgeteilt wird, die unterschiedlichen Fokusebenen in der Probe 2 zugeordnet sind. Die **Fig. 2** und **3** zeigen diese Teilbilder 12 und 13. Dabei ist das Teilbild 12 ein Einzelbild, das eine Fokusebene abbildet, die bezogen auf die Lichteinfallrichtung, d. h. die optische Achse, höher liegt, als das Teilbild 13.

**[0043]** Die **Fig. 2** und **3** zeigen verschiedene Zustände a, b, c für die Teilbilder 12 und 13, und enthalten exemplarisch lediglich einen einzigen Fluoreszenzmitter. Die Teilbilder 12a und 13a zeigen dabei einen Zustand, in dem ein Fluoreszenzmitter so liegt, dass er in der Fokusebene ist, die dem Teilbild 13 zugeordnet ist. Folglich ist das Bild 11a des Fluoreszenzmitters im Teilbild 13a ein beugungsbegrenzter Spot, dessen Größe durch die Beugungsgrenze vorgegeben ist. Denselben Spot findet man auch in Teilbild 12a, jedoch ist das Bild 11a hier größer ausgedehnt, da der abgebildete Fluoreszenzmitter sich nicht in der Fokusebene des Teilbildes 12 befindet. Dies führt zu einer Defokussierung, die das Bild 11a vergrößert. Der Vergleich der Bilder 11a im Teilbild 12a und 13a zeigt deutlich die Tiefenlage des Fluoreszenzmitters, nämlich in der Fokusebene des Teilbildes 13.

**[0044]** Das Steuergerät C kann deshalb aus der Größe der Punkt-Bilder der Fluoreszenzmitter und dem Vergleich der Teilbilder eine entsprechende Tiefenangabe für die Fluoreszenzmitter ableiten. Die laterale Lokalisierung wird wie bekannt aus dem Punkt-Bild 11a gewonnen.

**[0045]** Die Teilbilder 12b und 13b zeigen einen Zustand, in dem sich ein Fluoreszenzmitter zwischen den Fokusebenen der Teilbilder befindet. Dies ist daran zu erkennen, dass das Punkt-Bild 11b dieses Fluoreszenzmitters eine Größe aufweist, die über dem beugungsbegrenzten Mindestmaß liegt, jedoch auch unter dem Maß, das sich ergäbe, wenn der Fluoreszenzmitter in der Fokusebene des Teilbildes 13 angeordnet wäre.

**[0046]** Die Teilbilder 12c und 13c zeigen schließlich einen Zustand, der zu dem Zustand a invertiert ist.

**[0047]** Das Konzept, durch Teilbilder aus unterschiedlichen Fokusebenen nicht nur eine Relativlage der Fluoreszenzmitter zur Fokusebene eines Bildes zu gewinnen, sondern auch die Richtung der Verschiebung gegenüber der Fokusebene, ist im Stand der Technik, wie eingangs geschildert wurde, bekannt.

**[0048]** Das Fluoreszenzmikroskop 1 erreicht die Teilbilder 12 und 13 durch Einsatz des adaptiven Spiegels 7. Dieser bewirkt sowohl die Aufteilung der Abbildung der Probe 2 in die zwei Teilbilder 12, 13, als auch die Zuordnung zu unterschiedlichen Fokusebenen durch unterschiedliche Brennweiten für die Teilbilder 12, 13. Dies ist schematisch in **Fig. 4** dargestellt. Sie zeigt den adaptiven Spiegel 7, auf den die Strahlung von der Probe 2 längs einer optischen Achse OA einfällt. Die reflektierende Fläche des Spiegels 7 ist in Segmente 15 und 16 aufgeteilt bzw. wird durch die Ansteuerung durch das Steuergerät 10 in solche Segmente unterteilt. Der adaptive Spiegel wirkt als Strahlteiler, der das beugungsbegrenzte Einzelbild der Probe 2 im Abbildungsstrahlengang 4 in die zwei Teilbilder 12 und 13 aufteilt. Weitere abbildende Elemente wie Linsen etc. können dabei verwendet werden, sind in der Darstellung der **Fig. 4** der besseren Übersichtlichkeit halber jedoch nicht eingetragen.

**[0049]** Der adaptive Spiegel 7 wird so eingestellt, dass er Spiegelflächensegmente 15 aufweist, welche die optische Achse OA in eine erste Richtung ablenken. Dazu verschachtelt liegende Spiegelflächensegmente 16 lenken die optische Achse OA in eine zweite Richtung. Dabei ist die erste Richtung eine optische Achse OA1, die dem Kamerabildbereich Ka zugeordnet ist, und die zweite Richtung entspricht einer optischen Achse OA2, welche dem Kamerabildbereich Kb zugeordnet ist. Die entsprechenden Randstrahlen für die Abbildung durch die ersten Spiegelflächensegmente 15 ist dabei wie die optische Achse OA1 gepunktet in **Fig. 4** eingetragen, die Randstrahlen und die optische Achse OA2, welche durch die Spiegelflächensegmente 16 auf den Kamerabildbereich Kb geleitet werden, sind strichpunktiert gezeichnet.



**[0050]** Weiter bewirken die Spiegelflächensegmente 15 einen Brennweitenunterschied im erzeugten Teilbild 12. Der adaptive Spiegel 7 ist somit so eingestellt, dass er nicht nur eine Bildteilung erzeugt, sondern auch beide Teilbilder 12 und 13 unterschiedlichen Fokusebenen in der Probe 2 zuordnet. Dies ist dadurch zu erkennen, dass die Randstrahlen für das Teilbild 12 sich auf der optischen Achse OA im Kamerabildbereich Ka treffen, wohingegen die strichpunktierten Randstrahlen für das Teilbild 13 am Kamerabildbereich Kb noch aufgeweitet sind.

**[0051]** Die Kamerabildbereiche Ka und Kb sind bevorzugt aber nicht zwingend Bildbereiche ein und derselben Kamera K. Dies hat den Vorteil, dass eine sub-pixelgenaue Justierung der Teilbilder 12 und 13 einfach möglich ist. Hierzu bieten sich u. a. folgende Optionen:

1. In einem dem eigentlichen Messverfahren vorgelagerten Justierschritt wird der adaptive Spiegel 7 so eingestellt, dass die Teilbilder 12 und 13 entlang divergierender optischer Achsen OA1 und OA2 erzeugt werden, jedoch mit derselben Brennweite des Spiegels 7. Die Teilbilder 12 und 13 entstammen dann während des Justierschrittes derselben Fokusebene. Die hochauflösende laterale Lokalisierung einer oder mehrerer Strukturen in den Teilbildern 12 und 13 erlaubt es dann einfach, eine Referenzangabe zu gewinnen, mit der im späteren Messbetrieb Strukturen im Teilbild 12 auf das Koordinatensystem des Teilbildes 13 umgerechnet werden und umgekehrt.

2. Sind die Kamerabildbereiche Ka und Kb Bildbereiche ein und derselben Kamera, können die Teilbilder 12 und 13 zuerst superpositioniert, d. h. in Überlagerung dargestellt werden. Der Spiegel 7 wird dazu so eingestellt, dass die optischen Achsen OA1 und OA2 zusammenfallen, der Winkelunterschied zwischen den Spiegelsegmenten 15 und 16 also nicht mehr gegeben ist. In dieser Überlagerung kann einfach sichergestellt werden, dass trotz unterschiedlicher Brennweiten der Segmente 15 und 16 die Bilder übereinander liegen. Auch kann eine Referenzierung der Bilder zueinander einfach durchgeführt werden. Dann wird im Justierschritt der Spiegel so umgestellt, dass die Winkelunterschiede zwischen den Spiegelsegmenten 15 und den Spiegelsegmenten 16 vorliegen. Mit anderen Worten, die Winkeldivergenz zwischen den optischen Achsen OA1 und OA2 tritt auf, und die Teilbilder 12 und 13 liegen nebeneinander. Der dadurch bewirkte Unterschied in den Koordinaten zwischen den Teilbildern 12 und 13 ist aus den Spiegelparametern einfach abzuleiten, so dass durch die vorher erreichte Justierung im superpositionierten Zustand eine hoch-

präzise Relativreferenzierung zwischen den Teilbildern 12 und 13 gewährleistet ist.

**[0052]** Natürlich können die oben erwähnten Verfahrensschritte 1 und 2, die vor dem eigentlichen Messprinzip zur Justierung ausgeführt werden, auch in beliebiger Reihenfolge bzw. kombiniert angewendet werden.

## Patentansprüche

1. Verfahren zur hochauflösenden 3D-Fluoreszenzmikroskopie, wobei

- in einer Probe (2) wiederholt Fluoreszenzmitter zur Abgabe von Fluoreszenzstrahlung angeregt und von der Probe (2) mit einem Mikroskop (1), das einen Abbildungsstrahlengang (4) mit einer optischen Auflösung und eine Fokalebene aufweist, Einzelbilder (10) erzeugt werden, wobei die Fluoreszenzmitter derart zur Abgabe von Fluoreszenzstrahlung angeregt werden, dass zumindest eine Teilmenge der Fluoreszenzmitter in jedem Einzelbild (10) derart isoliert ist, so dass die Bilder (11) dieser Fluoreszenzmitter im Rahmen der optischen Auflösung in den Einzelbildern (10) trennbar sind,
- in den erzeugten Einzelbildern (10) aus den Bildern der isolierten Fluoreszenzmitter die Lagen dieser Fluoreszenzmitter mit einer über eine optische Auflösung hinaus gehenden Ortsgenauigkeit lokalisiert werden und daraus ein hochaufgelöstes Gesamtbild erzeugt wird,
- jedes Einzelbild mittels eines Teilerlements (7) in ein erstes und ein zweites Teilbild (12, 13) aufgeteilt wird, wobei das erste Teilbild (12) eine erste Fokalebene in der Probe (2) und das zweite Teilbild (13) eine zweite Fokalebene in der Probe (2) abbildet,
- beide Teilbilder (12, 13) getrennt abgebildet werden, **dadurch gekennzeichnet**, dass
- als Teilerlement ein adaptiver Spiegel (7) verwendet und im Wesentlichen in einer Pupille des Abbildungsstrahlengangs (4) angeordnet wird,
- der adaptive Spiegel (7) so eingestellt wird, dass er die zwei Teilbilder (12, 13) zeitlich oder örtlich getrennt abbildet, und
- der adaptive Spiegel (7) so eingestellt wird, dass er zwei unterschiedliche Fokuslängen für die beiden Teilbilder (12, 13) realisiert.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass der adaptive Spiegel (7) die zwei Teilbilder (12, 13) entlang divergierender optischer Achsen (OA1, OA2) auf nebeneinanderliegende Bildaufnahmebereiche (Ka, Kb) abbildet.

3. Verfahren nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein Intensitätsverhältnis der Teilbilder (12, 13) verstellt wird, indem Spiegelflächenanteile (15) des adaptiven Spiegels (7), die die Abbildung des ersten Teilbildes (12) bewirken, verkleinert und um dieses Maß Spiegelflächenan-

teile (16) des adaptiven Spiegels (7), die die Abbildung des zweiten Teilbildes (13) bewirken, vergrößert werden.

4. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass zum Einstellen einer Tiefenauflösung oder eines erfassten Tiefenbereiches durch Verstellung des adaptiven Spiegels (7) eine Differenz der Fokuslängen verändert wird.

5. Verfahren nach einem der obigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass am Spiegel (7) reflektierte Strahlung mit einem Wellenfrontsensor (9) erfasst wird und der Spiegel (7) zur Korrektur von Abbildungsfehlern des Abbildungsstrahlenganges (4) verstellt wird.

6. Verfahren nach einem der obigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass für eine Tiefenlagenverstellung die beiden Fokuslängen synchron verstellt werden.

7. Verfahren nach einem der obigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass vor der tiefenauflösenden Mikroskopie in einem Justierschritt der Teilbilder (12, 13) diese zuerst mit gleicher Fokuslänge erzeugt und in diesem Zustand lagejustiert werden.

8. Verfahren nach einem der obigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die beiden Bildaufnahmebereiche (Ka, Kb) auf einer Kamera (K) liegen und vor der tiefenauflösenden Mikroskopie in einem Justierschritt die beiden Teilbilder (12, 13) zuerst superpositioniert auf die Kamera (K) abgebildet und in diesem Zustand lagejustiert werden und dann der Spiegel (7) so verstellt wird, dass die Teilbilder (12, 13) nebeneinander auf den Bildaufnahmebereichen (Ka, Kb) zu liegen kommen.

9. Fluoreszenzmikroskop zum dreidimensionalen Abbilden einer Probe (2) mit einer über eine optische Auflösung gesteigerten Ortsauflösung, das aufweist:

- eine Beleuchtungseinrichtung (L1, 3, 5), die dazu ausgebildet ist, in der Probe (2) wiederholt Fluoreszenzemitter zur Abgabe von Fluoreszenzstrahlung anzuregen
- einen Abbildungsstrahlengang (4) mit der optischen Auflösung umfassende Abbildungseinrichtung (5, 4, K), die dazu ausgebildet ist, von der Probe (2) mit der optischen Auflösung Einzelbilder zu erzeugen,
- eine Steuereinrichtung (C), die dazu ausgebildet ist, die Beleuchtungseinrichtung (L1, 3, 5) und die Abbildungseinrichtung (5, 4, K) so anzusteuern, dass von der Probe (2) mehrere Einzelbilder erzeugt werden, wobei die Fluoreszenzemitter derart zur Abgabe von Fluoreszenzstrahlung angeregt sind, dass zumindest eine Teilmenge der Fluoreszenzemitter in jedem Einzelbild derart isoliert ist, dass

die Bilder dieser Fluoreszenzemitter im Rahmen der optischen Auflösung in den Einzelbildern trennbar sind, wobei

- die Steuereinrichtung (C) dazu ausgebildet ist, in den erzeugten Einzelbildern die Lagen der isoliert fluoreszierenden Fluoreszenzemitter mit einer über eine optische Auflösung hinaus gehenden Ortsgenauigkeit zu lokalisieren und daraus ein hochaufgelöstes Gesamtbild zu erzeugen,
- der Abbildungsstrahlengang (4) ein Teilereslement (7) aufweist, das jedes Einzelbild in ein erstes und ein zweites Teilbild (12, 13) aufteilt, wobei das erste Teilbild (12) eine erste Fokalebene in der Probe (2) und das zweite Teilbild (13) eine zweite Fokalebene in der Probe (2) abbildet,
- die Abbildungseinrichtung (5, 4, K) mindestens eine Kamera (K) umfasst, auf die beide Teilbilder (12, 13) nebeneinander abgebildet sind, **dadurch gekennzeichnet**, dass
- das Teilereslement als adaptiver Spiegel (7) ausgebildet ist, der im Wesentlichen in einer Pupille des Abbildungsstrahlenganges (4) angeordnet ist,
- die Steuereinrichtung (C) dazu ausgebildet ist, den adaptiven Spiegel (7) so einzustellen, dass er die zwei Teilbilder (12, 13) zeitlich oder örtlich getrennt abbildet, und
- die Steuereinrichtung (C) dazu ausgebildet ist, den adaptiven Spiegel (7) so einzustellen, dass er zwei unterschiedliche Fokuslängen für die beiden Teilbilder (12, 13) realisiert.

10. Fluoreszenzmikroskop nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Steuereinrichtung (C) dazu ausgebildet ist, den adaptiven Spiegel (7) so anzusteuern, dass er die zwei Teilbilder (12, 13) entlang divergierender optischer Achsen (OA1, OA2) auf nebeneinanderliegende Bildaufnahmebereiche (Ka, Kb) auf der Kamera (K) abbildet.

11. Fluoreszenzmikroskop nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass zur Verstellung eines Intensitätsverhältnisses der Teilbilder (12, 13) die Steuereinrichtung (C) dazu ausgebildet ist, den adaptiven Spiegel (7) so einzustellen, dass Spiegelflächenanteile (15) des adaptiven Spiegels (7), die die Abbildung des ersten Teilbildes (12) bewirken, abnehmen und um dieses Maß Spiegelflächenanteile (16) des adaptiven Spiegels (7), die die Abbildung des zweiten Teilbildes (13) bewirken, zunehmen.

12. Fluoreszenzmikroskop nach Anspruch 9, 10 oder 11, **dadurch gekennzeichnet**, dass zum Einstellen einer Tiefenauflösung oder eines erfassten Tiefenbereiches die Steuereinrichtung (C) dazu ausgebildet ist, den adaptiven Spiegel (7) so einzustellen, dass eine Differenz der Fokuslängen verändert wird.

13. Fluoreszenzmikroskop nach einem der Ansprüche 9 bis 11, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein Wellenfrontsensor (9) vorgesehen ist, der am Spiegel (7) reflektierte Strahlung erfasst, um den Spiegel (7) zur Korrektur von Abbildungsfehlern des Abbildungsstrahlenganges (4) zu verstellen.

14. Fluoreszenzmikroskop nach einem der Ansprüche 9 bis 13, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Steuereinrichtung (C) dazu ausgebildet ist, für eine Tiefenlagenverstellung die beiden Fokusslängen synchron zu verstellen.

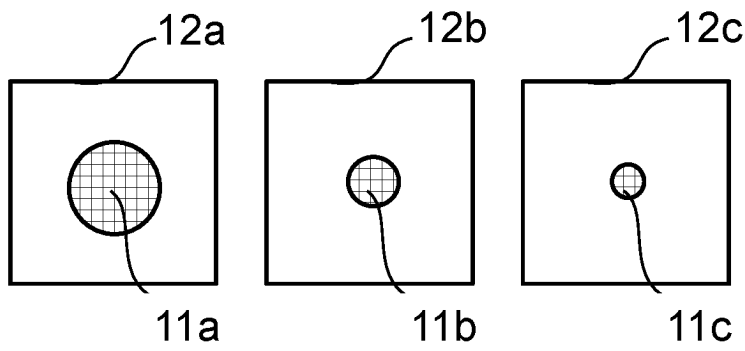
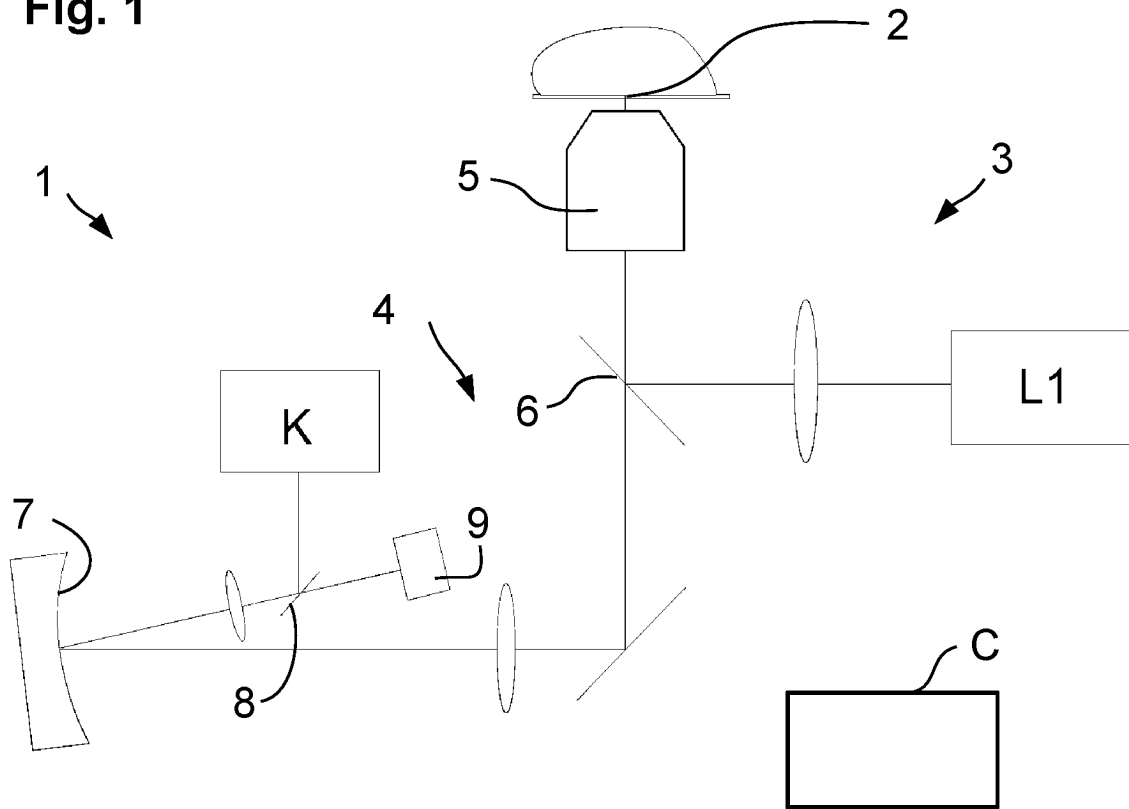
15. Fluoreszenzmikroskop nach einem der Ansprüche 9 bis 14, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Steuereinrichtung (C) dazu ausgebildet ist, zur Justierung vor der tiefenauflösenden Abbildung den Spiegel (7) so anzusteuern, dass die Teilbilder (12, 13) zuerst mit gleicher Fokusslänge erzeugt sind, und in diesem Zustand ein Lagejustiersignal erzeugt.

16. Fluoreszenzmikroskop nach einem der Ansprüche 9 bis 15, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Bildaufnahmebereiche (Ka, Kb) von einer Kamera (K) bereitgestellt sind und die Steuereinrichtung (C) dazu ausgebildet ist, zur Justierung vor der tiefenauflösenden Abmessung den Spiegel (7) so anzusteuern, dass die Teilbilder (12, 13) superpositioniert auf die Kamera (K) abgebildet sind, in diesem Zustand ein Lagejustiersignal zu erzeugen und dann den Spiegel so zu verstellen, dass die Teilbilder (12, 13) nebeneinander auf die Bildaufnahmebereiche (Ka, Kb) abgebildet sind.

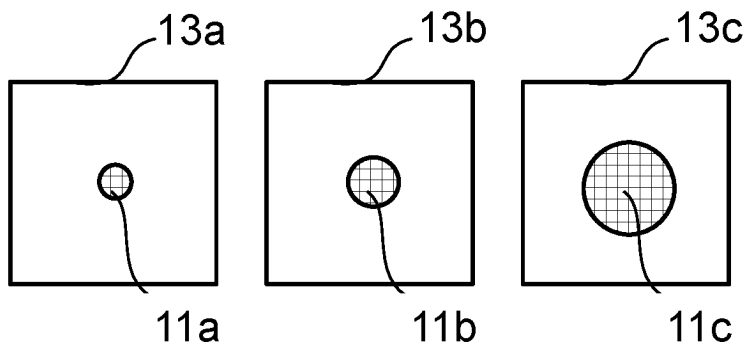
Es folgen 2 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

**Fig. 1**



**Fig. 2**



**Fig. 3**

Fig. 4

