(19) Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2013 021 482 A1** 2015.06.18

(12) # Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2013 021 482.3**
(22) Anmeldetag: **17.12.2013**
(43) Offenlegungstag: **18.06.2015**

(51) Int Cl.: ***G02B 21/00*** (2006.01)
G02B 21/24 (2006.01)
G02B 21/06 (2006.01)

(71) Anmelder:
Carl Zeiss Microscopy GmbH, 07745 Jena, DE

(74) Vertreter:
Weber & Heim Patentanwälte, 81479 München, DE

(72) Erfinder:
Eggert, Helge, Dr., 07743 Jena, DE; Hilbert, Michael, Dr., 07743 Jena, DE

(56) Ermittelter Stand der Technik:

DE	**103 44 060**	**A1**
DE	**10 2008 034 137**	**A1**
DE	**10 2012 019 121**	**A1**

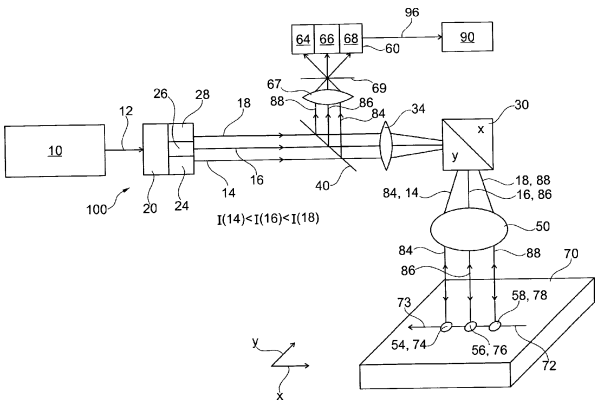
Rechercheantrag gemäß § 43 Abs. 1 Satz 1 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Der Inhalt dieser Schrift weicht von den am Anmeldetag eingereichten Unterlagen ab.

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Scanning-Mikroskopie und Scanning-Mikroskop**

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Scanning-Mikroskopie, bei dem eine Probe gleichzeitig mit mehreren Beleuchtungsspots eines Anregungslichts abgerastert wird, bei dem das von einem Probenort, der mit einem Beleuchtungsspot bestrahlt wird, abgestrahlte Licht unabhängig nachgewiesen wird von dem Licht, welches von einem anderen Probenort, der mit einem anderen Beleuchtungsspot beleuchtet wird, abgestrahlt wird und bei dem aus dem für die verschiedenen Probenorte nachgewiesenen abgestrahlten Licht ein mikroskopisches Bild der Probe zusammensetzbar ist. Das Verfahren ist erfindungsgemäß dadurch gekennzeichnet, dass Intensitäten der verschiedenen Beleuchtungsspots unabhängig voneinander eingestellt werden und dass die Beleuchtungsspots in einer Scanzeile hintereinander über die Probe geführt werden. Die Erfindung bezieht sich außerdem auf ein Scanning-Mikroskop.



Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft in einem ersten Gesichtspunkt ein Verfahren zur Scanning-Mikroskopie nach dem Oberbegriff des Anspruchs 1. Außerdem bezieht sich die Erfindung auf ein Scanning-Mikroskop nach dem Oberbegriff des Anspruchs 9.

[0002] Bei einem gattungsgemäßen Verfahren wird eine Probe gleichzeitig mit mehreren Beleuchtungsspots eines Anregungslichts abgerastert und das von einem Probenort, der mit einem Beleuchtungsspot bestrahlt wird, abgestrahlte Licht wird unabhängig nachgewiesen von dem Licht, welches von einem anderen Probenort, der mit einem anderen Beleuchtungsspot beleuchtet wird, abgestrahlt wird. Aus dem für die verschiedenen Probenorte nachgewiesenen abgestrahlten Licht kann ein mikroskopisches Bild der Probe zusammengesetzt werden.

[0003] Ein gattungsgemäßes Scanning-Mikroskop weist folgende Bestandteile auf: eine Lichtquelle zum Aussenden von Anregungslicht, eine optische Trenneinrichtung zum räumlichen Auftrennen des Anregungslichts in mehrere Beleuchtungsstrahlbündel für eine Mehrzahl von Beleuchtungsspots, Optikmittel zum Leiten des Anregungslichts auf eine Probe und zum Leiten von von der Probe abgestrahltem Licht auf eine Detektoreinheit, eine Scaneinrichtung zum Abrastern der Probe mit der Mehrzahl von Beleuchtungsspots und die Detektoreinheit zum separaten Nachweisen des von den mit den verschiedenen Beleuchtungsspots beleuchteten Probenorten abgestrahlten Lichts.

[0004] Ein solches gattungsgemäßes Verfahren und ein solches gattungsgemäßes Scanning-Mikroskop sind beispielsweise beschrieben in US 6,028,306.

[0005] Üblicherweise werden bei scannenden Mikroskopieverfahren, die mehr als eine Aufnahme benötigen, die Bildaufnahmen zeitlich nacheinander mit demselben Anregungsstrahl ausgeführt. Dabei werden entweder vollständige Bilder oder einzelne Linien nacheinander mit demselben Anregungsfleck oder Anregungsspot aufgenommen. Im Fall der sogenannten HDR-Mikroskopie (engl. High-Dynamic-Range-Mikroscopy) werden beispielsweise drei aufeinanderfolgende Bilder mit drei unterschiedlichen Anregungsintensitäten aufgenommen und anschließend miteinander verrechnet. Wegen der endlichen Aufnahmegeschwindigkeit wird dabei die zeitliche Auflösung im Vergleich zu einem Verfahren, bei dem nur ein Bild aufgenommen wird, verschlechtert oder, mit anderen Worten, die zeitlich auflösbare Probendynamik wird eingeschränkt.

[0006] Der Dynamikbereich heutiger Photodetektoren ist besonders für die Laser-Scanning-Mikroskopie häufig unzureichend, um gleichzeitig einerseits sehr feine und dunkle Strukturen und andererseits sehr helle Bildbereiche gleichermaßen empfindlich aufzulösen. In der Fluoreszenzmikroskopie sind daher Teile des Bilds häufig übersteuert und/oder andere Teile sind nicht mehr vom Hintergrundrauschen zu unterscheiden.

[0007] Weiterhin ist die Photoschädigung von Zellen und Gewebe durch intensive Beleuchtung bis heute einer der Schlüsselfaktoren, der maßgeblich die Anzahl der möglichen Bildaufnahmen von lebenden Zellen und damit die Messzeit limitiert.

[0008] Im Bereich der Laser-Scanning-Mikroskopie steht man somit oft an den Grenzen des Machbaren, wenn es um die Minimierung von Bleicheffekten und Optimierung der Detektoraussteuerung geht. Besonders gut werden diese Probleme zwar beim Prinzip der Photonenzählung adressiert, wobei hierbei die Vorteile eines hohen Signal-Rauschabstands jedoch mit vergleichsweise geringer Dynamik erkauft werden. Ab Zählraten von etwa 10 MHz wird die Zählung nichtlinear und ist ab etwa 30 MHz auch kaum noch zu korrigieren. Ein Benutzer muss deshalb ständig die Beleuchtung der Probe in einem optimalen Bereich halten, nicht zuletzt deshalb, um den unter maximaler Hochspannung betriebenen Photomultiplier vor Zerstörung zu schützen.

[0009] Zur Erweiterung des Dynamikbereichs stehen heute im Wesentlichen drei Techniken zur Verfügung. Zum einen können bessere Detektoren, beispielsweise also Kameras mit einem extrem hohen Dynamikbereich verwendet werden. Allerdings werden für die Mikroskopie heute Dynamiktiefen von 16 Bit bisher kaum erreicht. Die Verwendung hochsensitiver CCD-Kameras mit einem extrem großen Dynamikbereich kommt in der Laser-Scanning-Mikroskopie aufgrund von Streulicht kaum zum Einsatz.

[0010] Das Problem des unzureichenden Dynamikbereichs kann weiterhin in vergleichsweise einfacher Form mit mehreren Bildern umgangen werden, die bei unterschiedlicher Belichtung aufgenommen und anschließend verrechnet werden. Nachteil dieser Methode ist nicht nur die wesentlich größere Probenbelastung, sondern auch die benötigte Aufnahmezeit. Für viele Anwendungen, besonders bei Messungen an lebenden Zellen, ist dies nicht möglich oder jedenfalls nicht optimal.

[0011] Schließlich wurde ein Verfahren mit der Bezeichnung „Controlled Light Exposure Microscopy", auch als CLEM abgekürzt, in WO 2004/102249 A1 vorgeschlagen. Für die Laser-Scanning-Mikroskopie wird dabei während der scannenden Bildaufnahme in einer schnellen rückgekoppelten Regelung pixelgenau die Belichtungszeit geregelt, indem bei Erreichen eines bestimmten Schwellwerts im Detektor die Be-

leuchtung für das jeweilige Pixel ausgeschaltet und die Belichtung somit abgebrochen wird.

[0012] Für die sogenannte DI-Mikroskopie (engl. Dynamic-Illumination-Microscopy), gibt es bisher zwei Ansätze. Bei einer ersten Verfahrensvariante wird ein vollständiges Bild einer Probe oder eines Probenbereichs aufgenommen und auf Grundlage dieses Bilds wird anschließend für jedes einzelne Pixel eine spezifische Anregungsintensität berechnet. Mit dieser berechneten Intensität wird das betreffende Pixel dann in einer zweiten Aufnahme der Probe oder des Probenbereichs beleuchtet. Bei diesem Verfahren sind zwei Aufnahmen notwendig, weshalb auch hier die zeitliche Auflösung verschlechtert wird und dementsprechend die Möglichkeiten, rasch veränderliche Vorgänge in einer lebenden biologischen Probe zu beobachten, beschränkt werden.

[0013] Bei einer zweiten Ausführungsvariante der DI-Mikroskopie wird eine Intensität des von einem Probenort abgestrahlten Lichts direkt als Feedback für eine Regelung der auf eben diesen Probenort eingestrahlten Intensität verwendet. Hierzu ist eine sehr schnelle Regelung notwendig, insbesondere, um eine Sättigung der verwendeten Detektoren zu vermeiden. Dies ist beispielsweise beschrieben in DE 10 2008 034 137 A1.

[0014] Als eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung kann angesehen werden, ein Verfahren zur Scanning-Mikroskopie und ein Scanning-Mikroskop anzugeben, die insbesondere für die HDR- und die DI-Mikroskopie vorteilhaft eingesetzt werden können.

[0015] Diese Aufgabe wird durch das Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 1 und das Scanning-Mikroskop mit den Merkmalen des Anspruchs 9 gelöst.

[0016] Das Verfahren der oben genannten Art ist erfindungsgemäß dadurch weitergebildet, dass die Intensitäten der verschiedenen Beleuchtungsspots unabhängig voneinander eingestellt und die Beleuchtungsspots in einer Scanzeile hintereinander über die Probe geführt werden.

[0017] Das Mikroskop der oben genannten Art ist erfindungsgemäß dadurch weitergebildet, dass Einstellmittel zum unabhängigen Einstellen der Intensitäten der Beleuchtungsstrahlbündel vorhanden sind und die Trenneinrichtung und die Scaneinrichtung zum Abrastern der Probe dergestalt eingerichtet sind, dass die Beleuchtungsspots in einer Scanzeile hintereinander über die Probe geführt werden.

[0018] Als ein erster Grundgedanke der vorliegenden Erfindung kann angesehen werden, die Anregungs- oder Beleuchtungsspots nicht mehr in verschiedenen Zeilen über eine Probe oder einen Probenbereich zu führen, sondern diese in derselben Zeile hintereinander herlaufen zu lassen. Die getrennten Beleuchtungsspots werden dabei bereitgestellt mit Hilfe einer optischen Trenneinrichtung, die das Anregungslicht der Lichtquelle in mehrere Beleuchtungsstrahlbündel auftrennt. Wesentlich für die Erfindung ist außerdem, dass die von nebeneinanderliegenden, nämlich in derselben Scanzeile nebeneinanderliegenden Probenorten abgestrahlte Intensität jeweils unabhängig nachgewiesen wird.

[0019] Anregungslicht im Sinn der hier beschriebenen Erfindung ist elektromagnetische Strahlung, wobei insbesondere die infraroten, sichtbaren und ultravioletten Teile des Spektrums gemeint sind. Als Lichtquellen können prinzipiell alle Quellen verwendet werden, die die gewünschte elektromagnetische Strahlung in hinreichender Intensität bereitstellen. Üblicherweise werden hierzu Laser verwendet. Prinzipiell können aber auch Leuchtdioden oder andere Leuchtmittel eingesetzt werden.

[0020] Als Detektoren können prinzipiell alle Detektoren verwendet werden, die das von der Probe zurückgestrahlte Licht hinreichend effektiv und mit ausreichend gutem Signal- zu Rausch-Verhältnis nachweisen. Grundsätzlich können hierzu auch Halbleiterdetektoren verwendet werden. Weil der Hauptanwendungsfall der vorliegenden Mikroskopietechniken die Fluoreszenz-Mikroskopie ist, wo in der Regel die Zählraten vergleichsweise klein sind, werden üblicherweise Photomultiplier verwendet.

[0021] Vorteilhafte Varianten des erfindungsgemäßen Verfahrens und bevorzugte Ausführungsbeispiele des erfindungsgemäßen Mikroskops werden im Folgenden, insbesondere im Zusammenhang mit den abhängigen Ansprüchen und den Figuren, beschrieben.

[0022] Bei einer ersten besonders bevorzugten Ausführungsvariante des erfindungsgemäßen Verfahrens werden ein vorauslaufender Beleuchtungsspot, der auch als Pilotspot bezeichnet werden kann, und ein nachlaufender Beleuchtungsspot über die Probe geführt und eine für den vorauslaufenden Beleuchtungsspot gemessene Intensität des von einem Probenort zurückgestrahlten oder abgestrahlten Lichts wird verwendet zum Einstellen einer Intensität des nachlaufenden Beleuchtungsspots, wenn der nachlaufende Beleuchtungsspot auf diesen Probenort trifft.

[0023] Es werden demgemäß mindestens zwei Beleuchtungsspots verwendet, die in einem, insbesondere konstanten, Abstand über dieselbe Zeile der Probe gerastert oder gescannt werden. Die Helligkeit des zweiten, also des nachlaufenden Beleuchtungsspots wird dabei entsprechend der Grundidee der Dynamic-Illumination-Mikroskopie auf Grundlage

des von dem ersten Beleuchtungsspot generierten Antwortsignals, also das von dem jeweiligen Probenort zurückgestrahlte Licht, der Probe geregelt. Für das mit dem zweiten Beleuchtungsspot aufgezeichnete Bild können dann alle Vorteile des DIM-Verfahrens erreicht werden. Beispielsweise können die Detektoren gezielt in einem Bereich betrieben werden, wo das Signal zu Rausch-Verhältnis besonders groß ist und außerdem kann ein Ausbleichen der Farbstoffe auf ein Minimum reduziert werden.

[0024] Besonders wichtig für diese Verfahrensvariante ist, dass die Intensität jedes einzelnen Beleuchtungsspots unabhängig eingestellt wird. Erfindungsgemäß sind deshalb Einstellmittel zum separaten Einstellen der Intensitäten der verschiedenen Beleuchtungsspots vorhanden.

[0025] Als Einstellmittel können insbesondere ansteuerbare Komponenten, beispielsweise akustooptische Elemente, wie AOMs, AODs und/oder AOTFs, verwendet werden.

[0026] Bei einer weiteren besonders vorteilhaften Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens werden mehr als zwei, insbesondere drei Beleuchtungsspots über die Probe geführt und die Intensität der Beleuchtungsspots steigt von einem vorauslaufenden oder ersten Beleuchtungsspot bis zu einem letzten Beleuchtungsspot an. Diese Verfahrensvariante ermöglicht die Aufnahme von mikroskopischen Bildern mit besonders hoher Intensitätsdynamik. Diese Technik wird, wie oben erläutert, als HDR-Mikroskopie bezeichnet.

[0027] Wichtig für alle erfindungsgemäßen Varianten ist die Möglichkeit, zwei oder mehrere Anregungsstrahlen zu erzeugen, die sich in einer rückwärtigen Brennebene eines verwendeten Objektivs im Winkel in der schnellen Scanrichtung unterscheiden. Das heißt mit anderen Worten, dass die Beleuchtungsspots in ein und derselben Scanzeile rasch aufeinander folgen. Die Intensitäten dieser Anregungsstrahlen, die auch als Beleuchtungsstrahlbündel bezeichnet werden, können erfindungsgemäß unabhängig voneinander eingestellt werden.

[0028] Die Intensitäten der verschiedenen Beleuchtungsspots können insbesondere für die HDR-Mikroskopie unterschiedlich und insbesondere fest eingestellt werden. Hierzu können als Einstellmittel zum separaten Einstellen der Intensitäten der verschiedenen Beleuchtungsspots Strahlteiler und/oder Strahlabschwächer verwendet werden.

[0029] Prinzipiell können zum Generieren der Mehrzahl von Beleuchtungsspots verschiedene Scaneinrichtungen und verschiedene Optiken verwendet werden. Besonders bevorzugt werden aber zum Leiten der verschiedenen Beleuchtungsspots auf die Probe jeweils dasselbe Mikroskopobjektiv und dieselbe Scaneinrichtung eingesetzt.

[0030] Grundsätzlich kann die Trenneinrichtung zum räumlichen Auftrennen des Anregungslichts in mehrere Beleuchtungsstrahlenbündel an jedem Ort des Anregungsstrahlengangs positioniert werden. Besonders bevorzugt ist die Trenneinrichtung im Strahlengang zwischen der Lichtquelle und der Scaneinrichtung angeordnet.

[0031] Die mit den mehreren Beleuchtungsspots erhaltenen Bilddaten können zweckmäßig zu einem gemeinsamen Bild verrechnet werden.

[0032] Wesentlich für die vorliegende Erfindung ist das Generieren von mehreren in einer Scanzeile nebeneinander liegenden Beleuchtungs- oder Anregungsspots, wobei das von den mit diesen Beleuchtungsspots beleuchteten Probenorten abgestrahlte Licht unabhängig voneinander detektiert werden kann. Insbesondere können erfindungsgemäß außerdem die verschiedenen Beleuchtungsspots in ihrer Intensität voneinander unabhängig eingestellt werden.

[0033] Für das Anwendungsbeispiel der HDR-Mikroskopie durch das Scannen von mehreren aufeinanderfolgenden Beleuchtungsspots in derselben Scanzeile einer Probe kann die Bildaufnahme insgesamt um einen der Anzahl der Beleuchtungsspots entsprechenden Faktor beschleunigt werden. Vorgänge in einer lebenden biologischen Probe können deshalb mit einer entsprechend größeren zeitlichen Dynamik beobachtet werden. Für solche Messungen muss für die Intensitätsverhältnisse der einzelnen Beleuchtungsspots nur gewährleistet sein, dass der vorauslaufende Strahl die geringste Intensität aufweist und die Intensitäten der in der Scanzeile folgenden Beleuchtungsstrahlen von Strahl zu Strahl größer werden. Dies kann beispielsweise durch Strahlteiler und Strahlabschwächer bewerkstelligt werden.

[0034] Für das Anwendungsbeispiel der Dynamic-Illumination-Mikroskopie wird der räumliche und damit auch zeitliche Abstand zwischen dem vorauslaufenden Beleuchtungsspot, der auch als Pilotspot oder Pilotstrahl bezeichnet wird, und dem nachlaufenden Beleuchtungsspot dazu genutzt, die für den zweiten Beleuchtungsspot einzustellende Intensität zu errechnen, wenn der zweite Beleuchtungsspot auf den entsprechenden Probenort trifft. Mit anderen Worten wird also auf Grundlage der Probenantwort eines bestimmten Probenorts nach Bestrahlung mit dem vorauslaufenden Beleuchtungsspot eine Intensität für den zweiten Beleuchtungsspot errechnet, wenn dieser auf den Probenort fällt.

[0035] Die Anforderung an die Schnelligkeit der Regelung kann deshalb mit dem erfindungsgemäßen

Verfahren gesenkt werden und diese Anforderung ist jedenfalls kleiner als für eine Situation, bei der Beleuchtungsintensität noch während einer Verweildauer eines Beleuchtungsspots auf einem Probenort nachgeregelt werden soll.

[0036] Bei einer Geschwindigkeit von x Pixeln/Mikrosekunde und einem Abstand der beiden Anregungsspots in der Scanzeile von y Pixeln wird eine Zeit, die ein Signal zum Durchlaufen der Regelstrecke brauchen darf, etwa y/x sein. Im Vergleich dazu beträgt diese Zeit bei einer direkten Regelung weniger als 1/x und ist demgemäß um einen Faktor y kleiner.

[0037] Das erfindungsgemäße Mikroskop, das insbesondere zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeignet ist, kann ein konfokales Mikroskop sein. Beispielsweise kann die Detektoreinheit konfokale Detektoren aufweisen. Als konfokal wird ein Detektor bezeichnet, wenn er selbst oder eine dem Detektor vorgeschaltete Blende in oder in der Nähe einer konfokalen Ebene positioniert ist. Als konfokale Ebene wird eine zu einer probenseitigen Brennebene des Mikroskopobjektivs optisch konjugierte Ebene des Detektionsstrahlengangs bezeichnet. Eine in einer konfokalen Ebene angeordneten Blende, beispielsweise vor einem Detektor, beschränkt die Lichtaufnahme des Detektors auf ein kleines Zielvolumen am Probenort. Entsprechend wird für eine konfokale Lichtquelle die Beleuchtung der Probe auf ein kleines Zielvolumen auf oder in der Probe beschränkt.

[0038] Weitere Vorteile und Merkmale des erfindungsgemäßen Verfahrens und des erfindungsgemäßen Scanning-Mikroskops werden im Folgenden mit Bezug auf die Figuren erläutert. Es zeigt:

[0039] **Fig.** 1: Ein erstes Ausführungsbeispiel eines erfindungsgemäßen Scanning-Mikroskops und

[0040] **Fig.** 2: Ein zweites Ausführungsbeispiel eines erfindungsgemäßen Scanning-Mikroskops.

[0041] Ein erstes Ausführungsbeispiel eines erfindungsgemäßen Verfahrens und eines erfindungsgemäßen Scanning-Mikroskops **100** wird mit Bezug auf **Fig.** 1 erläutert. Als wesentliche Komponenten sind dort eine Lichtquelle **10**, insbesondere ein Laser, zum Aussenden von Anregungslicht **12**, Optikmittel **20**, **30**, **40**, **50** sowie eine Detektoreinheit **60** gezeigt.

[0042] Als Teil der Optikmittel ist zunächst eine optische Trenneinrichtung **20** vorhanden, mit welcher das Anregungslicht **12** in eine Mehrzahl von Beleuchtungsstrahlbündel **14**, **16**, **18** aufgetrennt wird, wobei diese Beleuchtungsstrahlbündel **14**, **16**, **18** zum Generieren einer Mehrzahl von unterschiedlichen Beleuchtungsspots **54**, **56**, **58** auf einer Probe **70** dienen.

[0043] Weiterer Bestandteil der Optikmittel ist ein Hauptfarbteiler **40**, durch den die Beleuchtungsstrahlbündel **14**, **16**, **18** hindurchtreten. Anschließend gelangen die Beleuchtungsstrahlbündel **14**, **16**, **18** über eine Optik **34** auf eine Scaneinrichtung **30**, mit welcher sie erfindungsgemäß so über die Probe **70** gescannt oder gerastert werden, dass die Beleuchtungsspots **54**, **56**, **58**, wie in **Fig.** 1 schematisch dargestellt, in einer Scanzeile **72** nebeneinander oder, gleichbedeutend, nacheinander über die Probe **70** geführt werden. Die Scanrichtung ist in dem in **Fig.** 1 gezeigten Beispiel die negative x-Richtung, was anhand des schematisch dargestellten Koordinatensystems ersichtlich ist.

[0044] Mit einem Mikroskopobjektiv **50** werden die Beleuchtungsspots **54**, **56**, **58** dann auf oder in die Probe fokussiert und beleuchten dort Probenorte **74**, **76**, **78**, wie in **Fig.** 1 dargestellt. In Reaktion auf das einfallende Anregungslicht wird von diesen Probenorten **74**, **76**, **78** jeweils Licht **84**, **86**, **88** abgestrahlt, das über dasselbe Mikroskopobjektiv **50** zurück auf den Scanner **30** und den Hauptfarbteiler **40** geleitet wird.

[0045] Für den wichtigen Anwendungsfall der Fluoreszenzmikroskopie weist das zurückgestrahlte Fluoreszenzlicht in der Regel größere Wellenlängen als das Anregungslicht auf. Der Hauptfarbteiler **40** ist so beschaffen, dass Licht dieser höheren Wellenlängen reflektiert wird. Das von den Probenorten **74**, **76**, **78** abgestrahlte Licht **84**, **86**, **88** wird demgemäß mit Hilfe der Optik **67** in Richtung einer konfokalen Blende **69** und der Detektoreinheit **60** weitergeleitet.

[0046] In der Detektoreinheit **60** ist für jeden der Beleuchtungsspots **54**, **56**, **58** ein separater Detektor **64**, **66**, **68** vorhanden, so dass das von den Beleuchtungsspots **54**, **56**, **58** generierte abgestrahlte Licht **84**, **86**, **88** der Probe **70** jeweils für jeden beleuchteten Probenort **74**, **76**, **78** separat nachgewiesen werden kann. Vor den Detektoren **64**, **66**, **68** ist im gezeigten Beispiel eine einzige konfokale Blende **69** positioniert, so dass die in **Fig.** 1 dargestellte Anordnung **100** insgesamt zur Durchführung von konfokaler Mikroskopie geeignet ist. Prinzipiell kann auch vor jedem einzelnen Detektor **64**, **66**, **68** eine separate konfokale Blende angeordnet sein.

[0047] Wesentlich für die vorliegende Erfindung ist bei dem Ausführungsbeispiel aus **Fig.** 1, dass die Probe **70** mit einer Mehrzahl von Beleuchtungsspots **54**, **56**, **58** gleichzeitig abgerastert wird, wobei diese Beleuchtungsspots **54**, **56**, **58** in ein und derselben Scanzeile **72** über die Probe geführt werden. Wichtig und wesentlich für die Erfindung ist außerdem, dass die Intensitäten der verschiedenen Beleuchtungsspots unabhängig voneinander eingestellt werden können. Im gezeigten Ausführungsbeispiel ist die Intensität I(**54**) des Beleuchtungsspots **54** klei-

ner ist als die Intensität I(**56**) des Beleuchtungsspots **56**, die wiederum kleiner ist als die Intensität I(**58**) des Beleuchtungsspots **58**.

[0048] Diese Größenrelationen sind in **Fig.** 1 durch die Ungleichung I(**14**) < I(**16**) < I(**18**) wiedergegeben.

[0049] Durch diese Wahl der Intensitäten der einzelnen Beleuchtungsspots **54**, **56**, **58** kann ein Ausbleichen der Farbstoffe in vorteilhafter Weise auf ein Minimum reduziert werden und es können mikroskopische Bilder mit sehr großer Helligkeitsdynamik erreicht werden. Dieses Verfahren wird als HDR-Mikroskopie bezeichnet. Die geeignete Einstellung der Intensitäten erfolgt mit Hilfe von in der **Fig.** 1 schematisch dargestellten Einstellmitteln **24**, **26**, **28**, die der Trenneinrichtung **20** nachgeordnet sind und die Beleuchtungsstrahlbündel **14**, **16**, **18** auf die gewünschte Intensität abschwächen. Dies kann prinzipiell mit Hilfe von Stahlteilern oder Strahlabschwächern geschehen. Um den für die HDR-Mikroskopie gewünschten Vorteil der Reduzierung des Ausbleichens zu erreichen, ist es wichtig, dass der in Scanrichtung erste oder vorlaufende Beleuchtungsspot **54** die niedrigste und der letzte Beleuchtungsspot **58** die höchste Intensität aufweist. In **Fig.** 1 ist die Scanrichtung entlang der Scanzeile **72** durch einen Pfeil **73** dargestellt.

[0050] Die Detektoreinheit **60** ist mit einer Steuer- und Auswerteeinheit **90** verbunden, was in **Fig.** 1 durch einen Pfeil **96** schematisch dargestellt ist. In der Steuer- und Auswerteeinheit **90** können beispielsweise die von den Detektoren **64**, **66**, **68** gelieferten Messdaten zu einem einzigen Bild verrechnet werden. Prinzipiell kann diese Steuer- und Auswerteeinheit **90** wirkungsmäßig mit den Einstellmitteln **24**, **26**, **28**, bei denen es sich insbesondere auch um ansteuerbare Komponenten, beispielsweise akustooptische Komponenten, handeln kann, verbunden sein.

[0051] Ein weiteres Ausführungsbeispiel eines erfindungsgemäßen Scanning-Mikroskops, welches zur Durchführung von DI-Mikroskopie (engl. Dynamic-Illumination-Microscopy) geeignet ist, wird mit Bezug auf **Fig.** 2 erläutert. Die wesentlichen Bestandteile des dort gezeigten Scanning-Mikroskops **100** entsprechen denjenigen des ersten, in **Fig.** 1 gezeigten Beispiels. Generell sind gleiche oder gleich wirkende Bestandteile in den Figuren mit denselben Bezugszeichen gekennzeichnet.

[0052] Abweichend von der in **Fig.** 1 gezeigten Variante eines Scanning-Mikroskops **100** werden bei **Fig.** 2 nur zwei Beleuchtungsspots, nämlich ein vorauslaufender Beleuchtungsspot **54** und ein nachlaufender Beleuchtungsspot **58** in ein und derselben Scanzeile **72** über die Probe **70** geführt. Dementsprechend weist die Detektoreinheit **60** in diesem Beispiel nur zwei Detektoren **64**, **68**, mit einer davor positionierten konfokalen Blende **69** auf. Prinzipiell ist es, wie im Beispiel aus **Fig.** 1, auch hier möglich, dass jeder Detektor eine eigene konfokale Blende und/oder eine eigene Detektoroptik aufweist.

[0053] Die Messinformation der Detektoreinheit **60**, also die Messinformationen der Detektoren **64**, **68** werden einer Steuer- und Auswerteeinheit **90** zugeführt, was in **Fig.** 2 schematisch durch den Pfeil **96** dargestellt ist. Die von dem Detektor **64** gelieferte Messinformation entspricht dem von dem Probenort **74**, der in der in **Fig.** 2 dargestellten Situation von dem vorauslaufenden Beleuchtungsspot **54** beleuchtet wird, als Antwort oder Response auf diesen Beleuchtungsspot **54** ab- oder zurückgestrahlten Licht **84**.

[0054] Die Steuer- und Auswerteeinheit **90** ist zum Liefern von Stellsignalen mit einem Einstellmittel **25** für das Beleuchtungsstrahlbündel **14** sowie einem Einstellmittel **29** für das Beleuchtungsstrahlbündel **18** wirkungsmäßig verbunden, was in **Fig.** 2 durch den Pfeil **92** dargestellt ist. Auf Grundlage der von dem Detektor **64** für den Probenort **74** gelieferten Messinformation errechnet die Steuer- und Auswerteeinheit **90** eine Stellgröße für das Einstellmittel **29**, mit welchem die Intensität des Beleuchtungsstrahlbündels eingestellt wird, wenn dieses Beleuchtungsstrahlbündel **18** als nachlaufender Beleuchtungsfleck auf den Probenort **74** trifft.

[0055] Bei den Einstellmitteln **25**, **29** kann es sich bevorzugt um akustooptische Einstellmittel, wie AOM und AOTF, handeln. Mit Hilfe von AOTFs können prinzipiell auch die Intensitäten von mehreren Farben gezielt und rasch eingestellt werden. Im Vergleich zu bekannten Anordnungen zur DI-Mikroskopie kann mit dem hier beschriebenen Verfahren die Anforderung an die Schnelligkeit der Regelung reduziert werden, weil diese nicht mehr so rasch sein muss, dass die Regelung der Anregungsintensität noch während der Verweildauer des Anregungsspots auf einen bestimmten Probenort erfolgen muss. Andererseits ist die hier vorgeschlagene Lösung deutlich schneller als die Varianten, bei denen zunächst ein ganzes Bild einer Probe aufgenommen wird und anschließend die Probe noch einmal, dann mit den errechneten neuen punktspezifischen Intensitäten beaufschlagt wird.

[0056] Die grundlegende funktionale Abhängigkeit der Intensität I(**18**) des Beleuchtungsstrahlbündels **18** von der für das Licht **84** gemessenen Intensität ist in **Fig.** 2 durch die Gleichung
I(**18**) = f(I(**84**)) wiedergegeben.

[0057] Mit der vorliegenden Erfindung wird ein Scanning-Mikroskop und ein Verfahren zur Scanning-Mikroskopie bereitgestellt, die insbesondere für die HDR-Mikroskopie und die DI-Mikroskopie erhebliche Verbesserungen und Vereinfachungen ermöglicht,

die mit geringem apparativem Aufwand bewerkstelligt werden können.

[0058] Die in den **Fig.** 1 und **Fig.** 2 dargestellten optischen Anordnungen sind beispielhafter Natur. Bei Varianten hierzu könnte beispielsweise die Probe auch in Durchlicht beleuchtet werden. Außerdem kann prinzipiell die relative Anordnung der Probe und des Detektors zum Hauptfarbverteiler **40** so sein, dass die Beleuchtungsstrahlbündel **14**, **16**, **18** vom Hauptfarbteiler **40** reflektiert werden, das Fluoreszenzlicht aber durch den Hauptfarbteiler hindurchtritt.

Bezugszeichenliste

10	Lichtquelle
12	Anregungslicht
14	Beleuchtungsstrahlbündel
16	Beleuchtungsstrahlbündel
18	Beleuchtungsstrahlbündel
20	optische Trenneinrichtung
24, 25, 26, 28, 29	Einstellmittel zum separaten Einstellen der Intensität
30	Scaneinrichtung
34	Optik
40	Hauptfarbteiler
50	Mikroskopobjektiv
54	Beleuchtungsspot
56	Beleuchtungsspot
58	Beleuchtungsspot
60	Detektoreinheit
64	Detektoreinheit
66	Detektoreinheit
67	Optik
68	Detektoreinheit
69	konfokale Blende
70	Probe
72	Scanzeile
73	Scanrichtung
74	Probenort
76	Probenort
78	Probenort
84	von Probenort **74** abgestrahltes Licht
86	von Probenort **76** abgestrahltes Licht
88	von Probenort **78** abgestrahltes Licht
20, 30, 40, 50	Optikmittel
90	Steuer- und Auswerteeinheit
92	Pfeil
96	Pfeil

ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

Zitierte Patentliteratur

- US 6028306 [0004]
- WO 2004/102249 A1 [0011]
- DE 102008034137 A1 [0013]

Patentansprüche

1. Verfahren zur Scanning-Mikroskopie,
bei dem eine Probe (**70**) gleichzeitig mit mehreren Beleuchtungsspots (**54**, **56**, **58**) eines Anregungslichts abgerastert wird,
bei dem das von einem Probenort (**74**), der mit einem Beleuchtungsspot (**54**) bestrahlt wird, abgestrahlte Licht (**84**) unabhängig nachgewiesen wird von dem Licht (**86**), welches von einem anderen Probenort (**76**), der mit einem anderen Beleuchtungsspot (**76**) beleuchtet wird, abgestrahlt wird, und
bei dem für die unterschiedlichen Probenorte nachgewiesenen abgestrahlten Licht ein mikroskopisches Bild der Probe (**70**) zusammensetzbar ist,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Intensitäten der verschiedenen Beleuchtungsspots (**54**, **56**, **58**) unabhängig voneinander eingestellt werden und
dass die Beleuchtungsspots (**54**, **56**, **58**) in einer Scanzeile (**72**) hintereinander über die Probe (**70**) geführt werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet,** dass mehr als zwei, insbesondere drei, Beleuchtungsspots (**54**, **56**, **58**) über die Probe (**70**) geführt werden.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
dass ein vorauslaufender Beleuchtungsspot (**54**) und ein nachlaufender Beleuchtungsspot (**58**) über die Probe (**70**) geführt werden und
dass eine für den vorauslaufenden Beleuchtungsspot (**54**) gemessene Intensität des von einem Probenort (**74**) abgestrahlten Lichts (**84**) verwendet wird zum Einstellen einer Intensität des nachlaufenden Beleuchtungsspots (**58**) wenn der nachlaufende Beleuchtungsspot (**58**) auf diesen Probenort (**74**) trifft.

4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet,** dass die Intensität der Beleuchtungsspots (**54**, **56**, **58**) von einem vorauslaufenden Beleuchtungsspot (**54**) bis zu einem letzten Beleuchtungsspot (**58**) ansteigt.

5. Verfahren nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet,** dass die Intensitäten der verschiedenen Beleuchtungsspots (**54**, **56**, **58**) unterschiedlich eingestellt werden.

6. Verfahren nach Anspruch 2 oder 4, **dadurch gekennzeichnet,** dass die Intensitäten der verschiedenen Beleuchtungsspots (**54**, **56**, **58**) fest eingestellt sind.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet,** dass die für die mehreren Beleuchtungsspots (**54**, **56**, **58**) erhaltenen Messwerte zu einem gemeinsamen Bild verrechnet werden.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet,** dass zum Leiten der verschiedenen Beleuchtungsspots (**54**, **56**, **58**) auf die Probe (**70**) jeweils dasselbe Mikroskopobjektiv (**50**) und dieselbe Scaneinrichtung (**30**) verwendet werden.

9. Scanning-Mikroskop, insbesondere zum Durchführen des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 8,
mit einer Lichtquelle (**10**) zum Aussenden von Anregungslicht (**12**),
mit einer optischen Trenneinrichtung (**20**) zum räumlichen Auftrennen des Anregungslichts (**12**) in mehrere Beleuchtungsstrahlbündel (**14**, **16**, **18**) für eine Mehrzahl von Beleuchtungsspots (**54**, **56**, **58**),
mit Optikmitteln (**20**, **30**, **40**, **50**) zum Leiten des Anregungslichts (**12**) auf eine Probe (**70**) und zum Leiten von von der Probe (**70**) abgestrahltem Licht (**84**, **86**, **88**) auf eine Detektoreinheit (**60**),
mit einer Scaneinrichtung (**30**) zum Abrastern der Probe (**70**) mit der Mehrzahl von Beleuchtungsspots (**54**, **56**, **58**) und
mit der Detektoreinheit (**60**) zum separaten Nachweisen des von den mit den verschiedenen Beleuchtungsspots (**54**, **56**, **58**) beleuchteten Probenorten (**74**, **76**, **78**) abgestrahlten Lichts (**84**, **86**, **88**),
dadurch gekennzeichnet,
dass Einstellmittel (**24**, **26**, **28**; **25**, **29**) zum unabhängigen Einstellen der Intensitäten der Beleuchtungsstrahlbündel (**14**, **16**, **18**) vorhanden sind und
dass die Trenneinrichtung (**20**) und die Scaneinrichtung (**30**) zum Abrastern der Probe (**70**) dergestalt eingerichtet sind, dass die Beleuchtungsspots (**54**, **56**, **58**) in einer Scanzeile (**72**) hintereinander über die Probe (**70**) geführt werden.

10. Scanning-Mikroskop nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet,** dass die Trenneinrichtung (**20**) im Strahlengang zwischen der Lichtquelle (**10**) und der Scaneinrichtung (**30**) angeordnet ist.

11. Scanning-Mikroskop nach Anspruch 9 oder 10, **dadurch gekennzeichnet,** dass als Einstellmittel (**24**, **26**, **28**) Strahlteiler und/oder Strahlabschwächer vorhanden sind.

12. Scanning-Mikroskop nach einem der Ansprüche 9 bis 11, **dadurch gekennzeichnet,** dass als Einstellmittel (**25**, **29**) ansteuerbare Komponenten, insbesondere akustooptische Komponenten wie AOTF, AOM, AOD, vorhanden sind.

13. Scanning-Mikroskop nach einem der Ansprüche 9 bis 12, welches ein konfokales Scanning-Mikroskop ist.

Es folgen 2 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

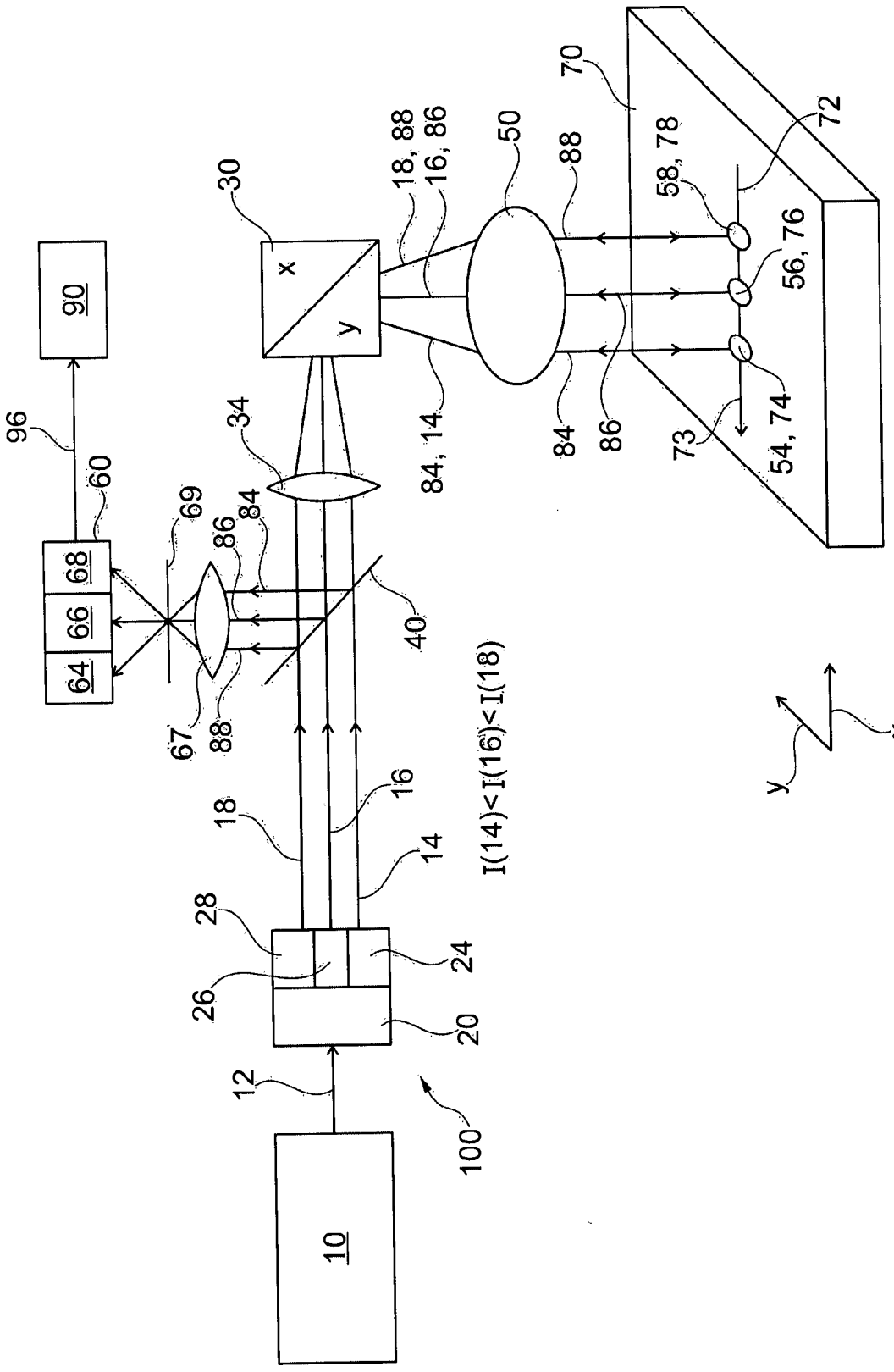


Fig. 1

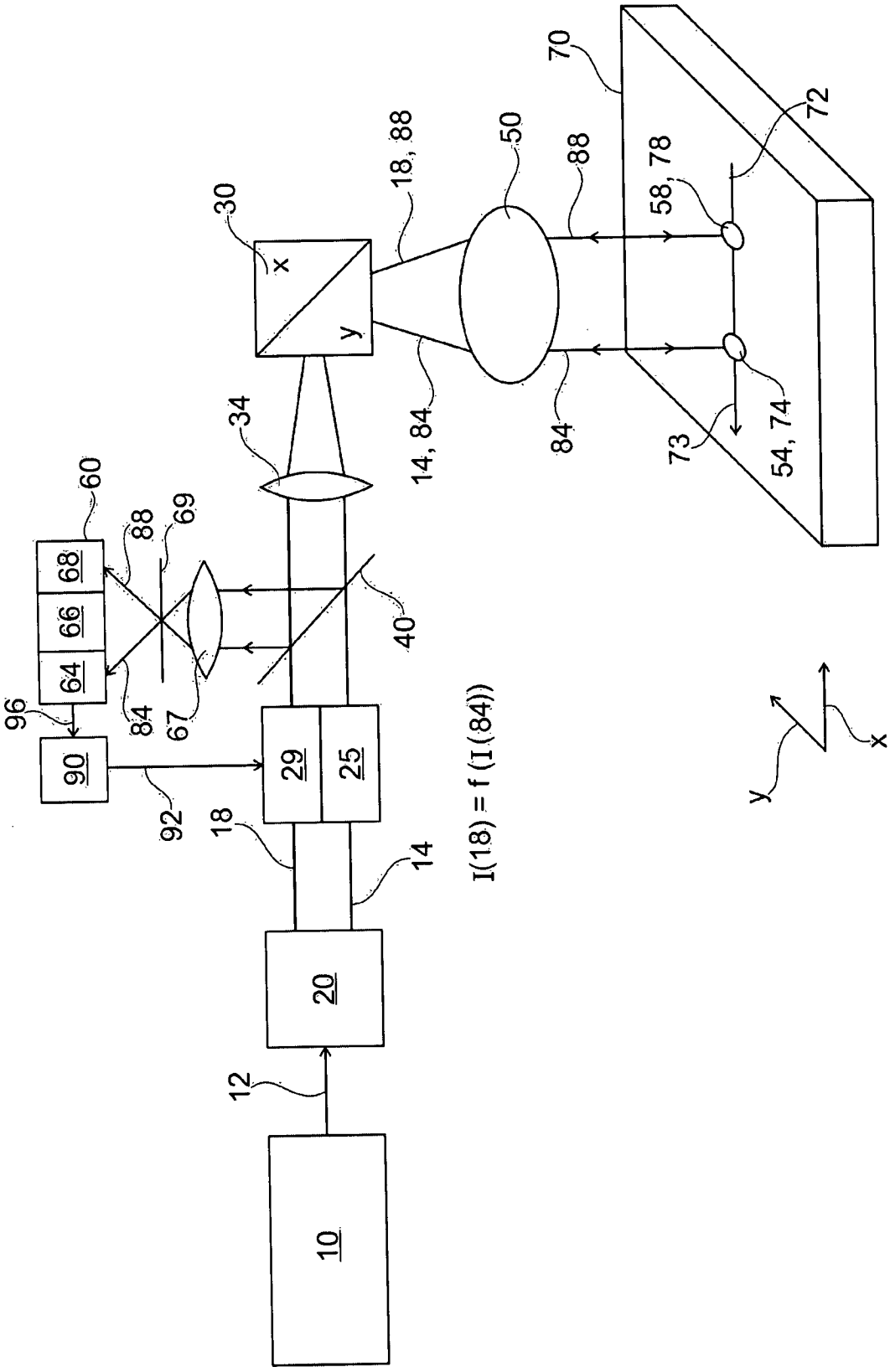

10
12
20
18
14
29
25
92
90
96
64
66
68
60
84
67
88
69
34
30
x
y
18, 88
50
88
70
72
58, 78
14, 84
84
73
54, 74
40
I(18) = f (I(84))
y
x

Fig. 2