

(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
8. Januar 2015 (08.01.2015)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2015/000877 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

G02B 27/00 (2006.01) G02B 21/36 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01) G02B 27/58 (2006.01)
G02B 21/16 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2014/063918

(22) Internationales Anmeldedatum:
1. Juli 2014 (01.07.2014)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102013106895.2 1. Juli 2013 (01.07.2013) DE

(71) Anmelder: LEICA MICROSYSTEMS CMS GMBH
[DE/DE]; CPTD, Ernst-Leitz-Strasse 17-37, 35578
Wetzlar (DE).

(72) Erfinder: FÖLLING, Jonas; Alte Eppelheimer Straße 18,
69115 Heidelberg (DE).

(74) Anwalt: BRADL, Joachim; CPTD, Ernst-Leitz-Strasse
17-37, 35578 Wetzlar (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,
RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.

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

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: LIGHT-MICROSCOPIC METHOD OF LOCALIZATION MICROSCOPY FOR LOCALIZING POINT OBJECTS

(54) Bezeichnung : LICHTMIKROSKOPISCHES VERFAHREN DER LOKALISATIONSMIKROSKOPIE ZUR
LOKALISIERUNG VON PUNKTOBJEKTEN

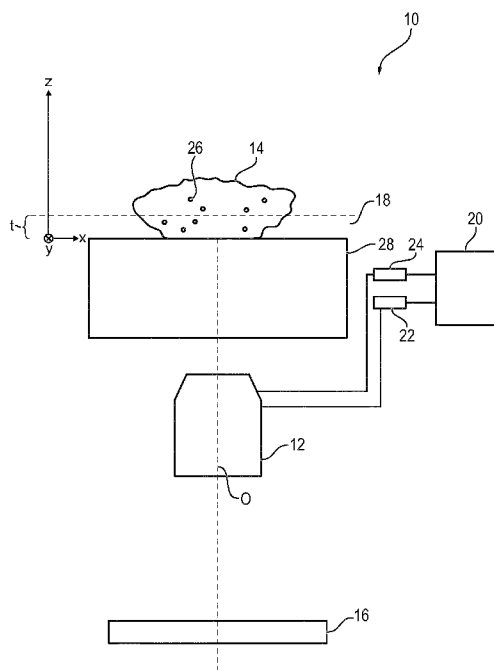


FIG. 1

(57) Abstract: A description is given of a light-microscopic method of
localization microscopy for localizing point objects (26) in a sample (14),
wherein the sample (14) is imaged onto a detector (16) by means of an
imaging optical unit (12); and the point objects (26) contained in the sample
(14) are localized within the depth of field range (18) by virtue of the fact
that a sample image generated by the imaging of the sample (14) on the
detector (16) is taken as a basis for determining lateral x/y positions of the
point objects (26) in a direction perpendicular to the optical axis (O),
wherein the depth of field range (18) is displaced in the object space
relative to the sample (14) along the optical axis (O) at least once by a
predetermined axial z-travel distance (Δz) and, with axially displaced depth of field range
(18), the sample (14) is imaged again onto the detector (16) and a further
sample image is generated; the lateral x/y positions of the point objects (26)
are determined again on the basis of the further sample image; lateral x/y
position deviations between the lateral x/y positions of respectively the same
point objects (26) determined on the basis of the different sample images are
determined; and correction information is generated depending on the lateral
x/y position deviations determined, the lateral x/y positions of the point
objects (26) being corrected with the aid of said correction information.

(57) Zusammenfassung:

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

Beschrieben ist ein lichtmikroskopisches Verfahren der Lokalisationsmikroskopie zur Lokalisierung von Punktoobjekten (26) in einer Probe (14), bei dem die Probe (14) mittels einer Abbildungsoptik (12) auf einen Detektor (16) abgebildet wird; und die in der Probe (14) enthaltenen Punktoobjekte (26) innerhalb des Schärfentiefenbereichs (18) lokalisiert werden, indem auf Grundlage eines Probenbildes, das durch die Abbildung der Probe (14) auf dem Detektor (16) erzeugt wird, laterale x/y-Positionen der Punktoobjekte (26) in Richtung senkrecht zur optischen Achse (O) ermittelt werden, wobei der Schärfentiefenbereich (18) in dem Objektraum relativ zur Probe (14) längs der optischen Achse (O) mindestens einmal um einen vorbestimmten axialen z-Verstellweg (Δz) verschoben und bei axial verschobenem Schärfentiefenbereich (18) die Probe (14) erneut auf den Detektor (16) abgebildet und ein weiteres Probenbild erzeugt wird; auf Grundlage des weiteren Probenbildes erneut die lateralen x/y-Positionen der Punktoobjekte (26) ermittelt werden; laterale x/y- Positionsabweichungen zwischen den auf Grundlage der verschiedenen Probenbilder ermittelten lateralen x/y-Positionen der jeweils selben Punktoobjekte (26) ermittelt werden; und in Abhängigkeit der ermittelten lateralen x/y-Positionsabweichungen eine Korrekturinformation erzeugt wird, an Hand der die lateralen x/y-Positionen der Punktoobjekte (26) korrigiert werden.

Lichtmikroskopisches Verfahren der Lokalisationsmikroskopie zur Lokalisierung von Punktoobjekten

Die Erfindung betrifft ein lichtmikroskopisches Verfahren zur Lokalisierung von Punktoobjekten in einer Probe, bei dem die in einem Objektraum angeordnete Probe mittels einer Abbildungsoptik, die in dem Objektraum einen Schärfentiefenbereich vorbestimmter axialer z-Ausdehnung längs ihrer optischen Achse hat, auf einen Detektor abgebildet wird, und die in der Probe enthaltenen Punktoobjekte innerhalb des Schärfentiefenbereichs lokalisiert werden, indem auf Grundlage eines Probenbildes, das durch die Abbildung der Probe auf dem Detektor erzeugt wird, laterale x/y-Positionen der Punktoobjekte in Richtung senkrecht zur optischen Achse ermittelt werden.

In jüngerer Vergangenheit wurden lichtmikroskopische Abbildungsverfahren entwickelt, mit denen sich basierend auf einer sequentiellen, stochastischen Lokalisierung von einzelnen Markern, insbesondere Fluoreszenzmolekülen, Probenstrukturen darstellen lassen, die kleiner sind als die beugungsbedingte Auflösungsgrenze klassischer Lichtmikroskope. Solche Verfahren sind beispielsweise beschrieben in WO 2006/127692 A2; DE 10 2006 021 317 B3; WO 2007/128434 A1, US 2009/0134342 A1; DE 10 2008 024 568 A1; WO 2008/091296 A2; „Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)“, Nature Methods 3, 793-796 (2006), M. J. Rust, M. Bates, X. Zhuang; „Resolution of $\lambda/10$ in fluorescence microscopy using fast single molecule photo-switching“, Geisler C. et al, Appl. Phys. A, 88, 223-226 (2007). Dieser neue Zweig der Mikroskopie wird auch als Lokalisierungsmikroskopie bezeichnet. Die angewandten Verfahren sind in der Literatur z.B. unter den Bezeichnungen (F)PALM ((Fluorescence) Photoactivation Localization Microscopy), PALMIRA (PALM with Independently Running Acquisition), GSD(IM) (Ground State Depletion Individual Molecule Return) Microscopy) oder (F)STORM ((Fluorescence) Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) bekannt.

Den neuen Verfahren ist gemein, dass die abzubildenden Probenstrukturen mit Punktoobjekten, sogenannten Markern präpariert werden, die über zwei unterscheidbare Zustände verfügen, nämlich einen „hellen“ Zustand und einen „dunklen“ Zustand. Werden beispielsweise Fluoreszenzfarbstoffe als Marker verwendet, so ist der helle Zustand ein fluoreszenzfähiger Zustand und der dunkle Zustand ein nicht fluoreszenzfähiger Zustand.

In bevorzugten Ausführungsformen werden, wie z.B. in der WO 2008/091296 A2 und der WO 2006/127692 A2, photoschaltbare oder photoaktivierbare Fluoreszenzmoleküle verwendet. Alternativ können, wie z.B. in der DE 10 2006 021 317 B3, inhärente Dunkelzustände von Standard-Fluoreszenzmolekülen genutzt werden.

Zur Abbildung von Probenstrukturen mit einer Auflösung, die höher als die klassische Auflösungsgrenze der Abbildungsoptik ist, wird nun wiederholt eine kleine Teilmenge der Marker in den hellen Zustand überführt. Dabei ist im einfachsten Falle die Dichte der diese aktive Teilmenge bildenden Marker so zu wählen, dass der mittlere Abstand benachbarter Marker im hellen und damit lichtmikroskopisch abbildbaren Zustand größer als die Auflösungsgrenze der Abbildungsoptik ist. Die die aktive Teilmenge bildenden Marker werden auf einem räumlich auflösenden Lichtdetektor, z.B. eine CCD-Kamera, abgebildet, so dass von jedem punktförmigen Marker eine Lichtverteilung in Form eines Lichtflecks erfasst wird, dessen Größe durch die Auflösungsgrenze der Optik bestimmt ist.

Auf diese Weise wird eine Vielzahl von Rohdaten-Einzelbildern aufgenommen, in denen jeweils eine andere aktive Teilmenge abgebildet ist. In einem Bildauswerteprozess werden dann in jedem Rohdaten-Einzelbild die Schwerpunktpositionen der Lichtverteilungen bestimmt, die die im hellen Zustand befindlichen, punktförmigen Marker darstellen. Die aus den Rohdaten-Einzelbildern ermittelten Schwerpunktpositionen der Lichtverteilungen werden dann in einer Gesamtdarstellung in Form eines Gesamtbild-Datensatzes zusammengetragen. Das durch diese Gesamtdarstellung entstehende hochaufgelöste Gesamtbild spiegelt die Verteilung der Marker wider.

Für eine repräsentative Wiedergabe der abzubildenden Probenstruktur müssen ausreichend viele Markersignale detektiert werden. Da jedoch die Anzahl an auswertbaren Markern in der jeweils aktiven Teilmenge limitiert ist, müssen sehr viele Rohdaten-Einzelbilder aufgenommen werden, um die Probenstruktur vollständig abzubilden. Typischerweise liegt die Anzahl an Rohdaten-Einzelbildern in einem Bereich von einigen Zehntausend, wobei dieser Bereich stark variiert, da für komplexe Strukturen weit mehr Bilder aufgenommen werden müssen als für einfachere Strukturen, um die Strukturen auflösen zu können.

Neben der vorstehend beschriebenen lateralen Positionsbestimmung der Marker in der Objektebene (im Folgenden auch als x-y-Ebene bezeichnet) kann auch eine Positionsbestimmung in axialer Richtung (im Folgenden auch als z-Richtung bezeichnet) erfolgen. Mit axialer Richtung ist dabei die Richtung längs der optischen Achse der Abbildungsoptik, also die Hauptausbreitungsrichtung des Lichtes gemeint.

Dreidimensionale Lokalisierungen sind aus so genannten „Particle-Tracking“-Experimenten bekannten, wie sie in Kajo et. al., 1994, Biophysical Journal, 67, Holtzer et. al., 2007, Applied Physics Letters, 90 und Toprak et al., 2007, Nano Letters, 7(7) beschrieben sind.

Sie wurden auch schon in bildgebenden Verfahren angewandt, die auf dem oben beschriebenen Schalten und Lokalisieren von Einzelmolekülen basieren. Hierzu wird auf Huang et al, 2008, Science, 319 und Juetten et al., 2008, Nature Methods, verwiesen. Zum Stand der Technik wird ferner auf Pavani et al., 2009, PNAS, 106, verwiesen.

Eine Lokalisierung eines punktförmigen Objektes in z-Richtung kann grundsätzlich dadurch erfolgen, dass man die Veränderung eines auf der Detektionsfläche der Kamera erfassten Lichtflecks auswertet, die sichtbar wird, wenn sich das Punktobjekt aus der zur Detektionsfläche optisch konjugierten Schärfe- oder Fokalebene herausbewegt. Dabei ist im Folgenden unter einem Punktobjekt ein Objekt zu verstehen, dessen Abmessungen kleiner als die beugungsbedingte Auflösungsgrenze der Abbildungsoptik, insbesondere des Detektionsobjektivs sind. In diesem Fall bildet das Detektionsobjektiv ein solches Objekt in Form einer dreidimensionalen Fokuslichtverteilung in den Bildraum ab. Die Fokuslichtverteilung erzeugt auf der Detektionsfläche der Kamera einen Lichtfleck, der durch die sogenannte „Point-Spread-Function“, also Punktabbildungsfunktion oder kurz PSF, charakterisiert ist. Wird nun das Punktobjekt in z-Richtung durch den Fokus, d.h. senkrecht zur Schärfeebene bewegt, so ändern sich Größe und Form der PSF. Analysiert man das dem erfassten Lichtfleck entsprechende Detektionssignal im Hinblick auf Größe und Form der PSF, so kann man dadurch Rückschlüsse auf die tatsächliche z-Position des Objekts erhalten.

Befindet sich das Punktobjekt zu weit von der Schärfeebene entfernt, so ist der auf der Detektionsfläche der Kamera erzeugte Lichtfleck so verschwommen, dass das entsprechende Messsignal innerhalb des üblichen Messrauschens nicht mehr wahrnehmbar ist. Es gibt also in dem Objektraum in z-Richtung einen Bereich um die zentrale Fokal- oder Schärfeebene, innerhalb dessen ein Punktobjekt auf der Detektionsfläche einen Lichtfleck erzeugt, der noch scharf genug ist, um zur Lokalisierung des Punktobjektes in z-Richtung ausgewertet werden zu können. Dieser die Schärfeebene enthaltende Bereich in z-Richtung wird im Folgenden als „Schärfentiefebereich“ bezeichnet.

Bei einer dreidimensionalen Lokalisierung besteht allerdings das grundsätzliche Problem, dass die von einem Punktobjekt herrührende PSF bezüglich der Detektionsfläche symmetrisch ist. Dies bedeutet, dass sich die PSF zwar ändert, wenn das Punktobjekt aus der Schärfeebene heraus bewegt wird, so dass sich der Abstand des Punktobjektes zur Schärfeebene bestimmen lässt. Jedoch ist die Änderung der PSF symmetrisch zu beiden Seiten der Schärfeebene, so dass sich nicht entscheiden lässt, auf welcher Seite der Schärfeebene sich das Punktobjekt innerhalb des Schärfentiefebereichs befindet.

Es sind verschiedene Verfahren bekannt, wie mit dem vorstehend erläuterten Problem umgegangen werden kann. Beispiele sind Verfahren, die in Fachkreisen als

„Astigmatismusverfahren“ (die oben genannten Dokumente Kajo et al., Holtzer et al. und Huang et al.), „Bi-Plane-Verfahren“ (vgl. Toprak et al. und Juetten et al.) und „Doppelhelixverfahren“ (vgl. Pavani et al.) bezeichnet werden. Diesen Verfahren ist gemein, dass zur Lokalisierung des Punktoobjektes in z-Richtung der auf einem Detektor erzeugte Lichtfleck zur Bestimmung einer Kenngröße analysiert wird und dieser Kenngröße eine z-Position des Punktoobjektes zugeordnet wird. Diese Zuordnung erfolgt anhand einer im Vorfeld bestimmten Zuordnungsinformation, welche die Kenngröße mit der z-Position des Punktoobjektes in Beziehung setzt. Als Kenngröße kommt beispielsweise wie in dem Astigmatismusverfahren eine Größe in Betracht, welche die Form des Lichtflecks charakterisiert, oder, wie im Falle des Bi-Plane-Verfahrens eine Größe, welche die Ausdehnungen zweier Lichtflecke miteinander in Beziehung setzt, die von ein- und demselben Lichtfleck herrühren und auf Detektionsflächen erzeugt werden, deren zugeordnete Schärfenebenen im Objektraum in z-Richtung zueinander versetzt sind.

In der Lokalisierungsmikroskopie, bei der Auflösungen von weit unter 100 nm, teilweise sogar bis in den Bereich weniger nm erzielt werden, stellen nun optische Abbildungsfehler, die zwangsläufig in jeder Abbildungsoptik auftreten, ein erhebliches Problem dar. Während in der klassischen, beugungsbegrenzten Mikroskopie, in der im Objektraum gemessene Auflösungen etwa im Bereich von 250 nm erreicht werden, die Abbildungsfehler durch exakte Linsenfertigung oder zusätzliche Korrektorelemente hinreichend minimiert werden können, ist dies bisher in der Lokalisierungsmikroskopie nicht ohne weiteres möglich. Dort ist die Auflösung so hoch, dass die verbleibenden Abbildungsfehler von erheblicher Relevanz sind. Beispiele für solche Abbildungsfehler sind chromatische Aberrationen, sphärische Aberrationen oder laterale Bildfeldverzerrungen, d.h. Abbildungsfehler, die zu einer Verzerrung der PSF in einer Ebene senkrecht zur optischen Achse führen. Ein Beispiel für eine laterale Bildfeldverzerrung ist die Koma.

Aufgabe der Erfindung ist es, ein lichtmikroskopisches Verfahren zur Lokalisierung von Punktoobjekten eingangs genannter Art so weiterzubilden, dass laterale Bildfeldverzerrungen mit möglichst geringem technischen Aufwand zuverlässig korrigiert werden.

Die Erfindung löst diese Aufgabe gemäß Anspruch 1 dadurch, dass der Schärfentiefenbereich, innerhalb dessen die Punktoobjekte lokalisiert werden, in dem Objektraum relativ zur Probe längs der optischen Achse mindestens einmal um einen vorbestimmten axialen z-Verstellweg, der kleiner als die axiale Ausdehnung des Schärfentiefenbereichs ist, verschoben und bei axial verschobenem Schärfentiefenbereich die Probe mittels der Abbildungsoptik erneut auf den Detektor abgebildet und ein weiteres Probenbild erzeugt wird; auf Grundlage dieses weiteren Probenbildes erneut die lateralen x/y-Positionen der Punktoobjekte ermittelt werden; laterale x/y-Positionsabweichungen zwischen den auf Grundlage der verschiedenen Probenbilder ermittelten lateralen x/y-

Positionen der jeweils selben Punktobjekte ermittelt werden; und in Abhängigkeit der ermittelten lateralen x/y-Positionsabweichungen eine Korrekturinformation erzeugt wird, anhand der die lateralen x/y-Positionen der Punktobjekte, die auf Grundlage mindestens eines der verschiedenen Probenbilder ermittelt worden sind, korrigiert werden.

Im Unterschied zu herkömmlichen Lösungen, in denen versucht wird, die Abbildungsfehler allein durch apparative Maßnahmen, insbesondere durch die möglichst fehlerfreie Fertigung der in der Abbildungsoptik verwendeten optischen Elemente, zu korrigieren, wählt die Erfindung einen Weg, bei dem die Korrektur der Abbildungsfehler aus der Analyse der lokalisierten Positionen selbst erfolgt. Auch wird keine zusätzliche Kalibrierung oder eine eigens zur Bestimmung von optischen Fehlern vorgesehene Messung benötigt, wodurch der technische Aufwand erheblich reduziert wird.

Die erfindungsgemäße Lösung sieht eine Verschiebung des Schärfentiefenbereichs längs der optischen Achse der Abbildungsoptik derart vor, dass es zwischen dem ursprünglichen Schärfentiefenbereich und dem verschobenen Schärfentiefenbereich in dem Objektraum eine gewisse Überlappung längs der optischen Achse gibt. Diese Überlappung wird dadurch erreicht, dass der axiale z-Verstellweg, um den der Schärfentiefenbereich längs der optischen Achse bewegt wird, kleiner als die axiale z-Ausdehnung des Schärfentiefenbereichs ist. Dabei liegt der z-Verstellweg beispielsweise im Bereich von 5 bis 90%, 10 bis 80%, 15 bis 70%, 20 bis 60% oder 25 bis 50% der axialen z-Ausdehnung des Schärfentiefenbereichs. Es versteht sich von selbst, dass diese Wertebereiche nur beispielhaft zu verstehen sind.

Die erfindungsgemäße Verschiebung des Schärfentiefenbereichs um den axialen z-Verstellweg, der kleiner ist als die axiale Ausdehnung des Schärfentiefenbereichs, ist demnach so zu verstehen, dass die beiden betrachteten Schärfentiefenbereiche, nämlich der ursprüngliche und der verschobene Schärfentiefenbereich, längs der optischen Achse die vorstehend genannte Überlappung aufweisen. Dies bedeutet, dass die Erfindung auch eine Schrittfolge von Verschiebungen in dem Schärfentiefenbereich abdeckt, bei der in einem einzelnen Schritt der Schärfentiefenbereich um einen Verstellweg verschoben wird, der größer als die Ausdehnung des Schärfentiefenbereichs ist, sofern die Schrittfolge insgesamt dazu führt, dass zwischen den betrachteten Schärfentiefenbereichen die letztlich gewünschte axiale Überlappung realisiert ist.

Die Erfindung sieht vor, von einer gegebenen dreidimensionalen Struktur von Punktobjekten nicht nur ein einziges Probenbild aufzunehmen, sondern mit einem längs der optischen Achse verschobenen Schärfentiefenbereich mindestens ein weiteres Probenbild, so dass ein- und dieselben Punktobjekte in verschiedenen z-Positionen des Schärfentiefenbereichs abgebildet werden.

Durch die erfindungsgemäß zu korrigierende laterale Bildfeldverzerrung weisen die genannten Punktoobjekte in den beiden Probenbildern in Abhängigkeit ihrer jeweiligen z-Position Positionsabweichungen in ihren lateralen x/y-Positionen auf. Aus diesen lateralen x/y-Positionsabweichungen lässt sich nun eine Korrekturinformation erzeugen, die ein Maß für die laterale Bildfeldverzerrung ist. Diese Korrekturinformation kann dann genutzt werden, um die mit dem Abbildungsfehler behafteten lateralen x/y-Positionen der Punktoobjekte zu korrigieren.

Wie schon eingangs erwähnt, ist unter dem erfindungsgemäßen Schärfentiefenbereich in dem Objektraum ein Bereich in z-Richtung um die zentrale Fokal- oder Schärfenebene zu verstehen, innerhalb dessen ein Punktoobjekt auf dem Detektor einen Lichtfleck erzeugt, der noch scharf genug ist, um zur Lokalisierung des Punktoobjektes ausgewertet werden zu können. Dabei ist es nicht erforderlich, diesen maximal möglichen Schärfentiefenbereich voll auszuschöpfen. So kann es sinnvoll sein, in Abhängigkeit der gewünschten Lokalisierungsgenauigkeit den Schärfentiefenbereich bewusst zu verkleinern und somit schon recht verschwommene, aber an sich noch auswertbare Lichtflecken von der Auswertung auszunehmen. Zur Bestimmung der lateralen x/y-Positionen müssen die auf dem Detektor erzeugten Lichtflecken nicht notwendigerweise räumlich strikt voneinander getrennt sein. Über geeignete algorithmische Verfahren, wie sie beispielsweise aus der Literatur als multi-fit-Verfahren oder maximum-likelihood-Verfahren bekannt sind, lassen sich auch überlappende Lichtverteilungen dahingehend analysieren, dass die Positionen der Punktoobjekte bestimmt werden können.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist nicht nur geeignet, diejenigen Abbildungsfehler zu korrigieren, die durch die optischen Elemente der Abbildungsoptik verursacht werden. Vielmehr ermöglicht es die Erfindung auch, optische Störungen zu korrigieren, die durch die Probe selbst verursacht werden. Solche optische Störungen sind häufig vom Ort, an dem sie in der Probe auftreten, oder von der Umgebungstemperatur abhängig. Sie sind somit mit herkömmlichen Verfahren, in denen etwa optische Korrektorelemente mit erheblichem technischen Aufwand geeignet angesteuert werden, nur schwer kontrollierbar. Dies gilt umso mehr als diese herkömmlichen Verfahren in der Regel eine iterative Korrektur der Abbildungsfehler vorsehen, bei der die Probe wiederholt aufgenommen wird und sich deshalb nicht verändern darf. Demgegenüber ändert sich in der Lokalisierungsmikroskopie das von dem Detektor erfasste Signal durch die blinkenden Einzelmoleküle ständig, so dass in der Regel kein Probenbild exakt dem anderen gleicht.

Unter der lateralen x/y-Position eines Punktoobjektes ist im Folgenden eine Position zu verstehen, die etwa unter Bezugnahme auf ein kartesisches Koordinatensystem, bei dem die z-Achse parallel zur optischen Achse der Abbildungsoptik liegt, in Richtung der x-Achse

und/oder in Richtung der y-Achse gemessen wird, wobei die x-Achse und die y-Achse senkrecht zu der y-Achse angeordnet sind.

Vorzugsweise wird innerhalb des Schärfentiefenbereichs mindestens eine senkrecht zur optischen Achse liegende Referenzebene definiert, die bei Verschieben des Schärfentiefenbereichs ortsfest relativ zu dem Schärfentiefenbereich bleibt. Eines der Probenbilder wird dabei als Referenzbild festgelegt, wobei auf Grundlage dieses Referenzbildes eine Vergleichsstruktur definiert wird, die mindestens eines derjenigen Punktoobjekte repräsentiert, die bei Aufnahme des Referenzbildes in der Referenzebene des Schärfentiefenbereichs angeordnet sind. Die Vergleichsstruktur wird dann in dem mindestens einen anderen Probenbild identifiziert. Auf Grundlage der verschiedenen Probenbilder wird jeweils die laterale x/y-Position der Vergleichsstruktur ermittelt. Anschließend wird die laterale x/y-Positionsabweichung zwischen den auf Grundlage der verschiedenen Probenbilder ermittelten lateralen x/y-Positionen der Referenzstruktur bestimmt. Schließlich wird die Korrekturinformation in Abhängigkeit der für die Vergleichsstruktur ermittelten lateralen x/y-Positionsabweichung erzeugt.

Die Referenzebene ist beispielsweise die zentrale Fokal- oder Schärfenebene innerhalb des Schärfentiefenbereichs. Diese wird mit Verschieben des Schärfentiefenbereichs längs der optischen Achse bewegt und tastet so gleichsam den Objektraum ab. Anhand eines der Probenbilder, das als Referenzbild festgelegt wird, wird eine Vergleichsstruktur definiert, die auch in den anderen Probenbildern vorhanden ist, dort jedoch in unterschiedlichen z-Positionen und damit – bedingt durch die laterale Bildfeldverzerrung – auch in anderen x/y-Positionen innerhalb des zugehörigen Schärfentiefenbereichs. Mit Hilfe der Vergleichsstruktur lassen sich so die lateralen x/y-Positionsabweichungen in Abhängigkeit der z-Position zuverlässig ermitteln.

Vorzugsweise wird der Schärfentiefenbereich in mehreren Schritten axial verschoben. In jedem dieser Schritte wird die auf Grundlage des zugehörigen Probenbildes ermittelte laterale x/y-Positionsabweichung der Vergleichsstruktur gegenüber der lateralen x/y-Position der auf Grundlage des Referenzbildes ermittelten Vergleichsstruktur ermittelt. Als Korrekturinformation wird eine Zuordnungsfunktion erzeugt, deren Funktionswerte jeweils die in dem jeweiligen Schritt ermittelte laterale x/y-Positionsabweichung der zugehörigen Vergleichsstruktur abhängig von deren axialer z-Position längs der optischen Achse angeben. Die Zuordnungsfunktion stellt eine Korrekturvorschrift dar, die in Abhängigkeit des Abstandes eines Punktoobjektes von der Referenzebene eine Korrektur der lateralen x/y-Position vorsieht, die genau die durch die laterale Bildfeldverzerrung entstandene Fehllokalisierung dieses Punktoobjektes ausgleicht.

Werte der Zuordnungsfunktion, die zwischen den durch die schrittweise Verschiebung des Schärfentiefenbereichs ermittelten Funktionswerten liegen, können beispielsweise durch Interpolation bestimmt werden. Auf diese Weise kann eine stetige Zuordnungsfunktion ermittelt werden, obgleich durch das schrittweise Verschieben des Schärfentiefenbereichs nur einige diskret ermittelte Funktionswerte vorliegen.

In einer möglichen Ausführungsform werden die lateralen x/y-Positionen der Punktoobjekte durch Bildverarbeitung direkt in dem zugehörigen Probenbild korrigiert. Dies hat den Vorteil, dass dem Benutzer die korrigierten Positionen der Punktoobjekte unmittelbar angezeigt werden, ohne den Umweg über die Korrektur zuvor gespeicherter Positionen und ein auf Grundlage der korrigierten Positionen neu erzeugtes Probenbild gehen zu müssen.

Vorzugsweise wird die Vergleichsstruktur in dem mindestens einen anderen Probenbild in Abhängigkeit der auf dem Detektor erfassten Bildhelligkeit identifiziert, d.h. unter Berücksichtigung der Gesamtzahl der auf dem Detektor erzeugten Lichtflecken, die zu dieser Struktur beitragen. Diese Ausführungsform ist insbesondere dann von Vorteil, wenn die bei verschobenem Schärfentiefenbereich ermittelten x/y-Positionen nicht nur zur Korrektur zuvor mit Abbildungsfehlern behafteter Positionen genutzt werden, sondern zugleich zur Erzeugung eines hochaufgelösten Gesamtlokalisierungsbildes herangezogen werden. Dadurch können störende Helligkeitsunterschiede in dem Gesamtlokalisierungsbild vermieden werden.

Die Summe der einzelnen axialen z-Verstellwege ist im Wesentlichen gleich der axilen z-Ausdehnung des Schärfentiefenbereichs. Es ist jedoch ebenso möglich, den Schärfentiefenbereich in z-Richtung insgesamt um eine Strecke zu verstellen, die größer als die Ausdehnung des Schärfentiefenbereichs ist. Setzt man in diesem Fall die in einzelnen Schritten erzeugten Probenbilder nach der Korrektur der Positionen der Punktoobjekte zu einem Gesamtlokalisierungsbild zusammen, so deckt dieses in z-Richtung einen Bereich ab, der größer als der Schärfentiefenbereich ist. Somit lassen sich insbesondere komplexe dreidimensionale Strukturen hochaufgelöst abbilden.

Vorzugsweise wird der axiale z-Verstellweg mittels eines Sensors erfasst. Dadurch ist sichergestellt, dass der axiale z-Verstellweg, der in die Korrektur der lateralen x/y-Positionen der Punktoobjekte eingeht, stets genau bekannt ist.

Das Verschieben des Schärfentiefenbereichs relativ zur Probe kann dadurch erfolgen, dass entweder die Probe relativ zu der Abbildungsoptik oder aber die Abbildungsoptik relativ zu der Probe längs der optischen Achse bewegt wird. Die Erfindung ist hierauf jedoch nicht beschränkt. So ist es beispielsweise ebenso möglich, eine deformierbare Linse, einen deformierbaren Spiegel, einen räumlichen Lichtmodulator

oder dergleichen zu verwenden, um den Schärfentiefenbereich in dem Objektraum längs der optischen Achse der Abbildungsoptik zu verschieben. Im Prinzip ist es möglich, den Schärfentiefenbereich auf beliebige Art und Weise zu verschieben.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird die z-Position des jeweiligen Punktoresktes längs der optischen Achse ermittelt, indem eine Kenngröße eines des Punktoresktes in dem jeweiligen Probenbild darstellenden Lichtflecks ermittelt und dieser Kenngröße die z-Position anhand einer vorbestimmten Zuordnungsinformation zugeordnet wird. Als Kenngröße kommt beispielsweise eine Größe in Betracht, die wie in dem eingangs genannten Astigmatismus-Verfahren die Form des des Punktoresktes darstellenden Lichtflecks charakterisiert. Alternativ kann auch eine Kenngröße genutzt werden, die, wie im Falle des bekannten Bi-Plane-Verfahrens, die Ausdehnungen zweier Lichtflecke miteinander in Beziehung setzt, die von ein- und demselben Lichtfleck herrühren und auf Detektionsflecken erzeugt werden, deren zugeordnete Schärfenebenen im Objektraum in z-Richtung zueinander versetzt sind.

Vorzugsweise werden die in dem Probenbild ermittelten z-Positionen der Punktoresktes mit den in dem weiteren Probenbild in Abhängigkeit des vorbestimmten axialen z-Verstellwegs ermittelten z-Positionen derselben Punktoresktes verglichen. In Abhängigkeit dieses Vergleichs wird dann eine z-Korrekturinformation erzeugt, anhand der die in Abhängigkeit der Zuordnungsinformation ermittelten z-Positionen der Punktoresktes korrigiert werden. Diese Ausgestaltung umgeht das Problem, dass sich die im Vorfeld der eigentlichen lichtmikroskopischen Messung bestimmte Zuordnungsinformation, die eine Zuordnung zwischen der in der Messung ermittelten Kenngröße und der axialen z-Position des Punktoresktes ermöglicht, häufig so ungenau ist, dass eine präzise Bestimmung der z-Position schwierig ist. Anhand der z-Korrekturinformation kann in diesem Fall die (von vornherein ungenaue) Zuordnungsinformation korrigiert werden.

Nach einem weiteren Aspekt der Erfindung ist eine lichtmikroskopische Einrichtung zur Lokalisierung von Punktoreskten gemäß Anspruch 14 vorgesehen.

Die Erfindung wird im Folgenden anhand der Figuren näher erläutert. Darin zeigen:

Fig. 1 eine schematische Darstellung einer lichtmikroskopischen Einrichtung nach der Erfindung;

Fig. 2 zwei schematische Schnittdarstellungen, von denen eine Darstellung eine verzerrungsfreie PSF und die andere Darstellung eine durch Koma verzerrte PSF im Objektraum zeigt;

- Fig. 3 zwei schematische Darstellungen, die eine dreidimensionale, röhrenartige Struktur ohne Koma zeigen;
- Fig. 4 zwei schematische Darstellungen entsprechend Figur 3, welche die röhrenartigen Struktur mit Koma zeigen;
- Fig. 5 eine schematische Darstellung, die eine X-förmige Struktur zusammen mit einem Schärfentiefenbereich und deren Bild zeigt;
- Fig. 6 eine schematische Darstellung, welche die X-förmige Struktur und deren Bild in einem ersten Schritt eines beispielhaften Verfahrens nach der Erfindung zeigt;
- Fig. 7 eine schematische Darstellung, welche die X-förmige Struktur und deren Bild in einem zweiten Schritt des Verfahrens zeigt;
- Fig. 8 eine schematische Darstellung, welche die X-förmige Struktur und deren Bild in einem dritten Schritt des Verfahrens zeigt;
- Fig. 9 eine schematische Darstellung, welche die X-förmige Struktur und deren Bild in einem vierten Schritt des Verfahrens zeigt;
- Fig. 10 eine schematische Darstellung, welche die X-förmige Struktur und deren Bild in einem fünften Schritt des Verfahrens zeigt;
- Fig. 11 einen Graphen, der laterale x-Positionen einer Vergleichsstruktur in den in den Figuren 6 bis 10 dargestellten Schritten zeigt; und
- Fig. 12 einen Graphen, der eine erfindungsgemäße Zuordnungsfunktion zeigt, deren Funktionswerte laterale x- Positionsabweichungen in Abhängigkeit der z-Position angeben.

Figur 1 zeigt in einer rein schematischen Darstellung eine lichtmikroskopische Einrichtung 10 mit einer Abbildungsoptik 12, die eine Probe 14 auf einen Detektor 16 abbildet. Die Probe 14 ist auf einem Probenträger 28 angeordnet.

Die Abbildungsoptik 12 hat einen Schärfentiefenbereich 18, der längs einer optischen Achse O eine axiale Ausdehnung t aufweist. Im Folgenden soll davon ausgegangen werden, dass die optische Achse O parallel zu einer Achse z eines kartesischen Koordinatensystems liegt, deren weitere Achsen x und y senkrecht zur optischen Achse O angeordnet sind.

Die Einrichtung 10 umfasst ferner eine Steuereinheit 20, die den Gesamtbetrieb der Einrichtung 10 steuert. Insbesondere verfügt die Steuereinheit 20 über Rechenmittel, welche die zur Lokalisierung erforderlichen Berechnungen und Auswertungen vornimmt. Die Steuereinheit 80 steuert ferner einen Piezoaktor 22 an, mit dem sich die Abbildungsoptik 12 längs der optischen Achse O bewegen lässt, um den Schärfentiefenbereich 78 längs der

optischen Achse O, d.h. in z-Richtung zu verschieben. Ein mit der Steuereinheit 20 gekoppelter Sensor 24 erfasst den z-Verstellweg, um den die Abbildungsoptik 12 und damit der Schärfentiefenbereich innerhalb des Objektraums verschoben werden.

Die Probe 14 enthält eine Vielzahl von Punktoobjekten 26, die durch fluoreszierende Marker gebildet sind, die an den abzubildenden Strukturen haften. Während der mikroskopischen Aufnahme werden die Punktoobjekte 26 einzeln als Lichtflecke auf den Detektor 16 abgebildet. Die so erzeugten Lichtflecke werden zur Lokalisierung der Punktoobjekte 26 in der Steuereinheit 20 ausgewertet.

Die Einrichtung 10 nach Figur 1 dient dazu, die in der Probe 14 enthaltenen Punktoobjekte 26 in dem Objektraum 28 zu lokalisieren. Hierzu ermittelt die Steuereinheit 20 der Einrichtung 10 sowohl die z-Position des jeweiligen Punktoobjektes längs der optischen Achse O als auch die laterale x/y-Position in einer senkrecht zur optischen Achse O liegenden Ebene.

Im folgenden wird erläutert, wie eine laterale Bildfeldverzerrung, wie sie beispielsweise durch eine Koma verursacht wird, erfindungsgemäß korrigiert wird.

Dabei soll zunächst unter Bezugnahme auf die Figuren 2 bis 4 veranschaulicht werden, wie sich eine laterale Bildverzerrung auf die Genauigkeit auswirkt, mit der Punktoobjekte 26 in lateraler Richtung lokalisiert werden.

In Figur 2 ist veranschaulicht, wie die Koma zu einer Verzerrung der dem jeweiligen Punktoobjekt zugeordneten PSF im dreidimensionalen Raum führt. Dabei ist in dem linken Teilbild der Figur 2 zunächst der Idealfall einer fehlerfreien PSF 30 dargestellt, die radialsymmetrisch längs ihrer in Figur 2 mit z' bezeichneten Längsachse ist. Die Längsachse z' der PSF 30 soll dabei parallel zur optischen Achse O und damit zur z-Achse des in Figur 2 dargestellten Koordinatensystems liegen.

Die Koma führt nun zu einer Verzerrung der PSF 30, durch welche die Radialsymmetrie der PSF 30 gebrochen wird, wie in dem rechten Teilbild der Figur 2 dargestellt ist. Diese Brechung der Radialsymmetrie führt zu einer lateralen Verschiebung des Schwerpunktes der PSF 30 in der x-y-Ebene. Wie der Figur 2 unmittelbar zu entnehmen ist, ist die laterale Schwerpunktsverschiebung abhängig von der z-Position.

Die Koma führt also dazu, dass die Schwerpunkte der den einzelnen Punktoobjekten zugeordneten PSFs an verschiedenen z-Positionen nicht mehr in der gleichen x/y-Position liegen. Einen entsprechenden Effekt erhält man, wenn man anstelle der Koma eine Verkipfung der PSF im Raum betrachtet.

Liegen nun also Abbildungsfehler vor, die den vorstehend genannten Effekt der Schwerpunktsverschiebung zur Folge haben, so führt dies im hochaufgelösten Probenbild zu Bildfehlern, wie ein Vergleich der Figur 3 und 4 zeigt. Figur 3 zeigt dabei das Bild einer

dreidimensionalen, röhrenartigen Struktur 32, die sich längs der z-Achse erstreckt. Die Struktur 32 soll beispielsweise mit einem geeigneten Farbstoff gefärbt sein, dessen Moleküle in der eingangs erläuterten Weise lokalisiert werden. Aus den ermittelten und gespeicherten Positionsinformationen wird dann ein hochaufgelöstes Bild zusammengesetzt. Dies ist in dem rechten Teilbild nach Figur 3 für eine beispielhafte zwiedimensionale Projektion aller im dreidimensionalen Raum

lokalisierten Punktoobjekte veranschaulicht. In dieser zweidimensionalen Projektion ist die betrachtete Struktur durch einen Kreis dargestellt.

Während Figur 3 den fehlerfreien Fall zeigt, veranschaulicht Figur 4 die Auswirkung einer lateralen Bildfeldverzerrung. Demnach führt die laterale Bildfeldverzerrung dazu, dass Molekülpositionen, die zwar in unterschiedlichen z-Positionen, aber an sich in der gleichen x/y-Position liegen, fälschlicherweise an verschiedene x/y-Positionen gesetzt werden, wie das linke Teilbild der Figur 4 zeigt. Somit ist in der zweidimensionalen Projektion eine Abweichung von der ursprünglichen Kreisform zu sehen, wie das rechte Teilbild der Figur 4 zeigt.

Unter Bezugnahme auf die Figuren 5 bis 12 wird im Folgenden beispielhaft erläutert, wie die vorstehend beschriebene laterale Bildfeldverzerrung erfindungsgemäß korrigiert wird.

Figur 5 zeigt in dem linken Figurenteil eine X-förmige Struktur 32, die sich beispielhaft in der x-z-Ebene erstreckt. Die X-förmige Struktur 32 soll mit einem geeigneten Farbstoff gefärbt sein, welche die zu lokalisierenden Punktoobjekte 26 (vgl. Fig. 1) bilden. Zur Lokalisierung dieser Farbstoffe werden deren Positionen innerhalb des in Figur 5 als rechteckige Fläche dargestellten Schärfentiefenbereichs 18 ermittelt. Das daraus entstehende, hochaufgelöste Bild ist in dem rechten Teil der Figur 5 dargestellt. Somit zeigt der rechte Figurenteil den Bildraum, der zu dem in dem linken Figurenteil dargestellten Objektraum optisch konjugiert ist.

Im Folgenden wird der Einfachheit halber angenommen, dass die Abbildungsoptik 12 eine Bildfeldverzerrung allein in x-Richtung verursacht. Das resultierende, in x-Richtung verzerrte Bild ist mit durchgezogenen Linien dargestellt. Demgegenüber ist das Bild, das bei einer idealen Abbildung ohne Bildfeldverzerrung entstünde, gestrichelt dargestellt.

In Figur 5 ist ferner die zentrale Schärfen- oder Fokalebene des Schärfen-tiefenbereichs 18 mit 34 bezeichnet. Dabei ist darauf hinzuweisen, dass sowohl in dem linken als auch in dem rechten Teil der Figur 5 (und auch in den weiteren Figuren 5 bis 10) die gleichen Bezugszeichen angegeben sind, obgleich der linke Figurenteil den Objektraum und der rechte Figurenteil den hierzu optisch konjugierten Bildraum darstellt.

In den Figuren 6 bis 10 ist gezeigt, wie der Schärfentiefenbereich 18 in mehreren Schritten jeweils um einen z-Verstellweg Δz in dem Objektraum längs der optischen Achse O verschoben wird, um die erfindungsgemäße Korrektur der lateralen x/y-Positionen der Punktoobjekte 26 vorzunehmen.

Das in den Figuren 6 bis 10 dargestellte Verfahren beruht auf folgender Überlegung. In Folge der lateralen Bildfeldverzerrung in x-Richtung werden Punktoobjekte, die innerhalb des Schärfentiefenbereichs 18 zwar in der gleichen x-Position, jedoch in unterschiedlichen z-Positionen liegen, in dem durch die Abbildungsoptik 12 erzeugten Bild in unterschiedlichen x-Positionen dargestellt. Jedoch ist es möglich, eine z-Position innerhalb des Schärfentiefenbereichs 18 zu definieren, bei der die x-Positionszuordnung zwischen Objektraum und Bildraum definitionsgemäß korrekt ist. Diese z-Position innerhalb des Schärfentiefenbereichs 34 bildet somit eine Referenzposition. Die x-y-Ebene, die sich im Objektraum an dieser z-Position befindet, definiert dementsprechend eine Referenzebene. In dem vorliegenden Ausführungsbeispiel wird die zentrale Schärfenebene 34 des Schärfentiefenbereichs 18 als eine solche Referenzebene herangezogen. Die in den Figuren 6 bis 10 gezeigte Schrittfolge hat nun zum Ziel, eine Zuordnungsfunktion als Korrekturinformation zu erzeugen, die in Abhängigkeit des Abstandes eines Punktoobjektes von der Referenzebene 34 eine Korrektur der x-Position vorsieht, die gerade die durch die laterale Bildfeldverzerrung entstandene Fehllokalisierung in x-Richtung ausgleicht.

Die Zuordnungsfunktion wird in dem vorliegenden Ausführungsbeispiel dadurch erzeugt, dass nicht nur ein Bild der X-förmigen Struktur 32, sondern insgesamt fünf Bilder mit jeweils um Δz verschobenem Schärfentiefenbereich 18 erzeugt werden.

Das beispielhafte Korrekturverfahren beginnt in Schritt 1 nach Figur 6, in dem sich die als Referenzebene fungierende Schärfenebene 34 des Schärfentiefenbereichs 18 innerhalb des Objektraums längs der optischen Achse O in der Position z_1 befindet. Der rechte Teil der Figur 6 zeigt das aus dieser Anordnung resultierende hochaufgelöste Bild.

Anschließend wird in Schritt 2 nach Figur 7 die Abbildungsoptik 12 und damit deren Schärfentiefenbereich 18 um den bekannten z-Verstellweg $\Delta z (= z_2 - z_1)$ längs der optischen Achse verschoben, so dass die als Referenzebene dienende Schärfenebene 34 in die Position z_2 gelangt. Wiederum wird in dieser Anordnung ein hochaufgelöstes Bild erzeugt, wobei die in z-Richtung lokalisierten Positionen entsprechend um den Betrag Δz korrigiert werden, um das resultierende Bild im Vergleich zu dem in dem vorhergehenden Schritt 1 erzeugten Bild nicht um Δz zu verschieben. In dem so entstandenen Bild ist die X-förmige Struktur 32 für alle z-Positionen ausser z_2 in z-Richtung verzerrt dargestellt, wie wiederum anhand der gestrichelt dargestellten Idealstruktur zu erkennen ist. Wie der Vergleich der Figuren 6 und 7 zeigt, ändert sich die Verzerrung in dem hochaufgelösten Bild

mit dem Verschieben des Schärfentiefenbereichs 18, da die X-förmige Struktur ihre Lage innerhalb des Schärfentiefenbereichs 34 ändert.

Wie in den Figuren 8 bis 10 gezeigt, wird anschließend in weiteren Schritten 3, 4 und 5 der Schärfentiefenbereich 18 sukzessive jeweils um den vorbestimmten z-Verstellweg Δz längs der optischen Achse O verschoben. Dadurch tastet die Referenzebene 34 gleichsam die X-förmige Struktur 32 in dem Objektraum längs der optischen Achse O ab.

Nach der Erzeugung der fünf hochaufgelösten Bilder wird beispielsweise der Teil der X-förmigen Struktur 32, der sich in Schritt 3 in der Referenzebene 34 befindet, als Vergleichsstruktur gewählt. Diese Vergleichsstruktur wird anschließend auch in den anderen, in den Schritten 1, 2, 4 und 5 erzeugten Bildern identifiziert. Dann wird die laterale x-Position der Vergleichsstruktur auf Grundlage der einzelnen, in den verschiedenen Schritten erzeugten Bilder ermittelt. Da sich die Vergleichsstruktur bei der Aufnahme der einzelnen Bilder relativ zu dem Schärfentiefenbereich 18 in verschiedenen z-Positionen befunden hat, ergeben sich in Folge der Bildfeldverzerrung in x-Richtung von Bild zu Bild unterschiedliche x-Positionen. Diese sind in dem Graphen nach Figur 11 für die einzelnen Schritte 1 bis 5 dargestellt.

Die gewünschte Zuordnungsfunktion erhält man schließlich, indem man die in den Schritten 1, 2, 4 und 5 ermittelten lateralen x-Positionsabweichungen der Vergleichsstruktur gegenüber der in Schritt 3 ermittelten x-Position der Vergleichsstruktur gegen die zugehörigen z-Positionen aufträgt. Dies ist in dem Graphen nach Figur 12 dargestellt. Die den Schritten 1 bis 5 zugeordneten fünf Funktionswerte der Zuordnungsfunktion können dann als Stützstellen genutzt werden, um z.B. im Wege einer Interpolation Zwischenwerte zu erzeugen, um schließlich eine stetige Zuordnungsfunktion zu erhalten. Mit einer solchen Zuordnungsfunktion können die lateralen Positionsabweichungen für alle z-Positionen angegeben werden, um eine verzerrungsfreies, hochaufgelöstes Bild zu erzeugen.

Bezugszeichenliste

10	Lichtmikroskopische Einrichtung
12	Abbildungsoptik
14	Probe
16	Detektor
18	Schärfentiefenbereich
20	Steuereinheit
22	Verstelleinheit
24	Sensor
26	Punktobjekte
28	Probenträger
30	PSF
32	röhrenartige Struktur
32	X-förmige Struktur
34	Referenzebene

Ansprüche

1. Lichtmikroskopisches Verfahren der Lokalisationsmikroskopie zur Lokalisierung von Punktoobjekten (26) in einer Probe (14), bei dem

die in einem Objektraum angeordnete Probe (14) mittels einer Abbildungsoptik (12), die in dem Objektraum einen Schärfentiefenbereich (18) vorbestimmter axialer z-Ausdehnung (t) längs ihrer optischen Achse (O) hat, auf einen Detektor (16) abgebildet wird; und

die in der Probe (14) enthaltenen Punktoobjekte (26) innerhalb des Schärfentiefenbereichs (18) lokalisiert werden, indem auf Grundlage eines Probenbildes, das durch die Abbildung der Probe (14) auf dem Detektor (16) erzeugt wird, laterale x/y-Positionen der Punktoobjekte (26) in Richtung senkrecht zur optischen Achse (O) ermittelt werden;

dadurch gekennzeichnet, dass

der Schärfentiefenbereich (18), innerhalb dessen die Punktoobjekte (26) lokalisiert werden, in dem Objektraum relativ zur Probe (14) längs der optischen Achse (O) mindestens einmal um einen vorbestimmten axialen z-Verstellweg (Δz), der kleiner als die axiale Ausdehnung (t) des Schärfentiefenbereichs (18) ist, verschoben und bei axial verschobenem Schärfentiefenbereich (18) die Probe (14) mittels der Abbildungsoptik (12) erneut auf den Detektor (16) abgebildet und ein weiteres Probenbild erzeugt wird;

auf Grundlage dieses weiteren Probenbildes erneut die lateralen x/y-Positionen der Punktoobjekte (26) ermittelt werden;

laterale x/y-Positionsabweichungen zwischen den auf Grundlage der verschiedenen Probenbilder ermittelten lateralen x/y-Positionen der jeweils selben Punktoobjekte (26) ermittelt werden; und

in Abhängigkeit der ermittelten lateralen x/y-Positionsabweichungen eine Korrekturinformation erzeugt wird, an Hand der die lateralen x/y-Positionen der Punktoobjekte (26), die auf Grundlage mindestens eines der verschiedenen Probenbilder ermittelten worden sind, korrigiert werden.

2. Lichtmikroskopisches Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass innerhalb des Schärfentiefenbereichs (18) mindestens eine senkrecht zur optischen Achse (O) liegende Referenzebene (34) definiert wird, die bei Verschieben des Schärfentiefenbereichs (18) ortsfest relativ zu dem Schärfentiefenbereich (18) bleibt; eines der Probenbilder als Referenzbild festgelegt und auf Grundlage des Referenzbildes eine Vergleichsstruktur definiert wird, die mindestens eines derjenigen Punktobjekte (26) repräsentiert, die bei Aufnahme des Referenzbildes in der Referenzebene (34) des Schärfentiefenbereichs (18) angeordnet sind; die Vergleichsstruktur in dem mindestens einen anderen Probenbild identifiziert wird; auf Grundlage der verschiedenen Probenbilder jeweils die laterale x/y-Position der Vergleichsstruktur ermittelt wird; die laterale x/y-Positionsabweichung zwischen den auf Grundlage der verschiedenen Probenbilder ermittelten lateralen x/y-Positionen der Referenzstruktur bestimmt wird; und die Korrekturinformation in Abhängigkeit der für die Vergleichsstruktur ermittelten lateralen x/y-Positionsabweichung erzeugt wird.
3. Lichtmikroskopisches Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Schärfentiefenbereich (18) in mehreren Schritten axial verschoben wird, in jedem dieser Schritte die auf Grundlage des zugehörigen Probenbildes ermittelte laterale x/y-Positionsabweichung der Vergleichsstruktur gegenüber der lateralen x/y-Position der auf Grundlage des Referenzbildes ermittelten Vergleichsstruktur ermittelt wird, und als Korrekturinformation eine Zuordnungsfunktion erzeugt wird, deren Funktionswerte jeweils die in dem jeweiligen Schritt ermittelte laterale x/y-Positionsabweichung der zugehörigen Vergleichsstruktur abhängig von deren axialer z-Position längs der optischen Achse (O) angeben.
4. Lichtmikroskopisches Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass Werte der Zuordnungsfunktion, die zwischen den durch die schrittweise Verschiebung des Schärfentiefenbereichs (18) ermittelten Funktionswerten liegen, durch Interpolation bestimmt werden.
5. Lichtmikroskopisches Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass die lateralen x/y-Positionen der Punktobjekte (26) durch Bildverarbeitung direkt in dem zugehörigen Probenbild korrigiert werden.

6. Lichtmikroskopisches Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass die lateralen x/y-Positionen der Punktoobjekte (26) in einem aus dem zugehörigen Probenbild gewonnenen Datensatz korrigiert werden und auf Grundlage dieses korrigierten Datensatzes ein korrigiertes Probenbild erzeugt wird.
7. Lichtmikroskopisches Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Vergleichsstruktur in dem mindestens einen anderen Probenbild in Abhängigkeit der auf dem Detektor (16) erfassten Bildhelligkeit identifiziert wird.
8. Lichtmikroskopisches Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die lateralen x/y-Positionsabweichungen nach einem Korrelationsverfahren ermittelt werden.
9. Lichtmikroskopisches Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Summe der einzelnen axialen z-Verstellwege (Δz) im Wesentlichen gleich der axialen z-Ausdehnung (t) des Schärfentiefenbereichs (18) ist.
10. Lichtmikroskopisches Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der axiale z-Verstellweg (Δz) mittels eines Sensors (24) erfasst wird.
11. Lichtmikroskopisches Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Schärfentiefenbereich (18) in dem Objektraum relativ zur Probe (14) längs der optischen Achse (O) um den axialen z-Verstellweg (Δz) verschoben wird, indem die Probe (14) relativ zu der Abbildungsoptik (12) oder die Abbildungsoptik (12) relativ zu der Probe (14) längs der optischen Achse (O) verschoben wird.
12. Lichtmikroskopisches Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die z-Position des jeweiligen Punktoobjektes (26) längs der optischen Achse (O) ermittelt wird, indem eine Kenngröße eines das Punktoobjekt (26) in dem jeweiligen Probenbild darstellenden Lichtflecks ermittelt und dieser Kenngröße die z-Position an Hand einer vorbestimmten Zuordnungsinformation zugeordnet wird.
13. Lichtmikroskopisches Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die in dem Probenbild ermittelten z-Positionen der Punktoobjekte (26) mit den in dem weiteren Probenbild in Abhängigkeit des vorbestimmten axialen z-Verstellwegs (Δz) ermittelten z-Positionen derselben Punktoobjekte (26) verglichen werden; und in Abhängigkeit dieses Vergleichs eine z-Korrekturinformation erzeugt wird, an Hand der die in Abhängigkeit der Zuordnungsinformation ermittelten z-Positionen der Punktoobjekte (26) korrigiert werden.

14. Lichtmikroskopische Einrichtung (10) zur Lokalisierung von Punktoobjekten (26) in einer Probe, mit
- einer Abbildungsoptik (12), die in einem Objektraum einen Schärfentiefenbereich (18) vorbestimmter axialer z-Ausdehnung (t) längs ihrer optischen Achse (O) hat,
- einem Detektor (16), auf den die Abbildungsoptik (12) eine in dem Objektraum angeordnete Probe (14) abbildet; und
- einer Steuereinheit (20), die in der Probe (26) enthaltene Punktoobjekte (26) innerhalb des Schärfentiefenbereichs (18) lokalisiert, indem sie auf Grundlage eines Probenbildes, das die Abbildungsoptik (12) auf dem Detektor (16) erzeugt, laterale x/y-Positionen der Punktoobjekte (26) in Richtung senkrecht zur optischen Achse (O) ermittelt;
- dadurch gekennzeichnet, dass
- eine durch die Steuereinheit (20) angesteuerte Verstelleinheit (22) den Schärfentiefenbereich (18), innerhalb dessen die Punktoobjekte (26) lokalisiert werden, in dem Objektraum relativ zur Probe (14) längs der optischen Achse (O) mindestens einmal um einen vorbestimmten axialen z-Verstellweg (Δz), der kleiner als die axiale Ausdehnung (t) des Schärfentiefenbereichs (18) ist, verschiebt und die Abbildungsoptik (12) bei axial verschobenem Schärfentiefenbereich (18) die Probe (14) erneut auf den Detektor (16) abbildet und ein weiteres Probenbild erzeugt;
- die Steuereinheit (20) auf Grundlage des weiteren Probenbildes erneut die lateralen x/y-Positionen der Punktoobjekte (26) ermittelt;
- die Steuereinheit (20) laterale x/y-Positionsabweichungen zwischen den auf Grundlage der verschiedenen Probenbilder ermittelten lateralen x/y-Positionen der jeweils selben Punktoobjekte (26) ermittelt; und
- die Steuereinheit (20) in Abhängigkeit der ermittelten lateralen x/y-Positionsabweichungen eine Korrekturinformation erzeugt, an Hand der die Steuereinheit (20) die lateralen x/y-Positionen der Punktoobjekte (26), die auf Grundlage mindestens eines der verschiedenen Probenbilder ermittelten worden sind, korrigiert.
15. Lichtmikroskopische Einrichtung (10) nach Anspruch 14, gekennzeichnet durch einen Sensor (24) zum Erfassen des axialen z-Verstellwegs des Schärfentiefenbereichs (18).

1/5

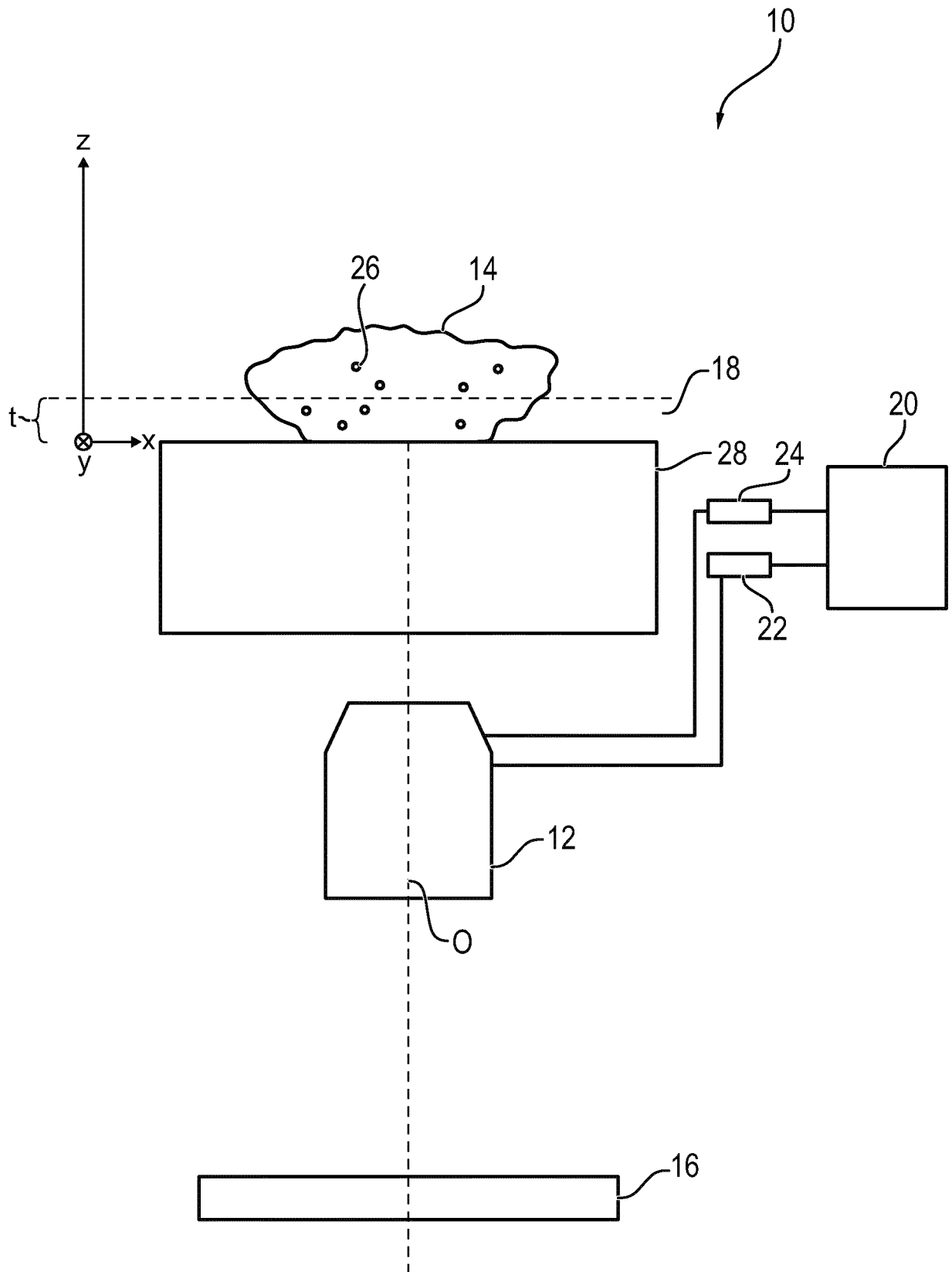
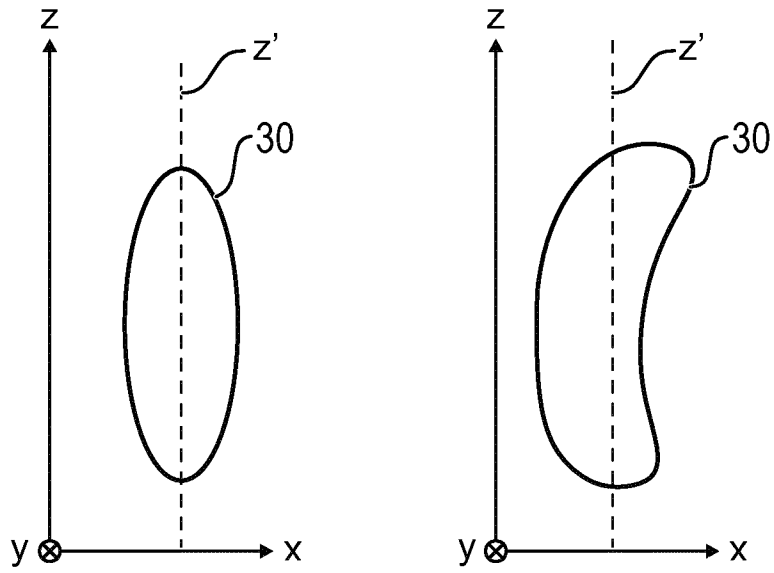
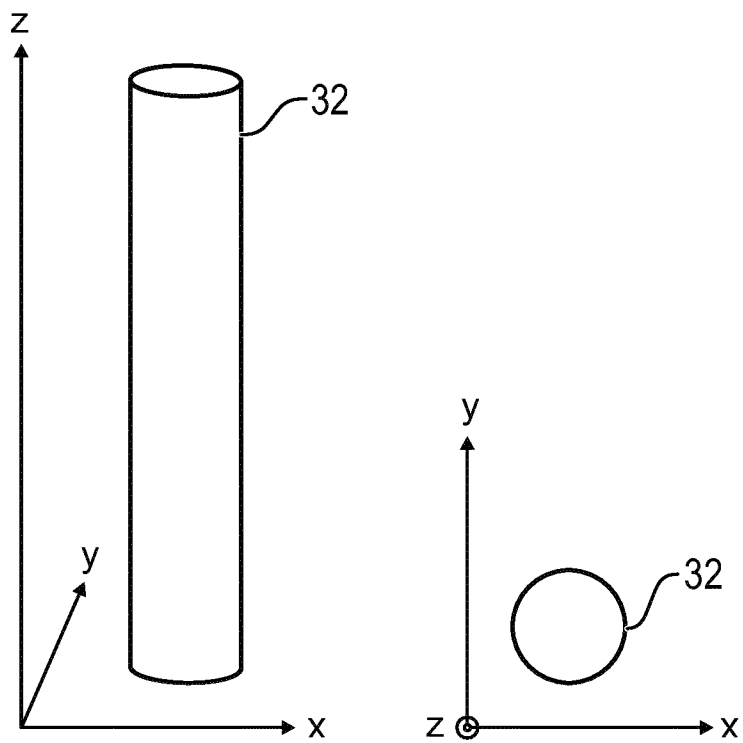


FIG. 1

2/5

**FIG. 2****FIG. 3**

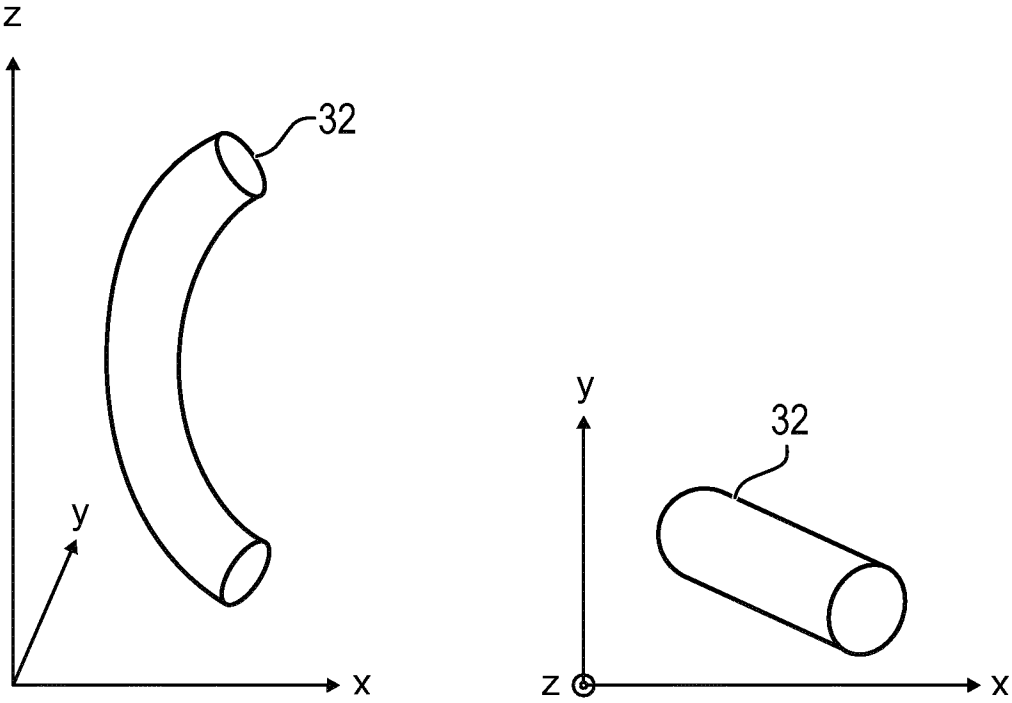


FIG. 4

FIG. 5

4/5

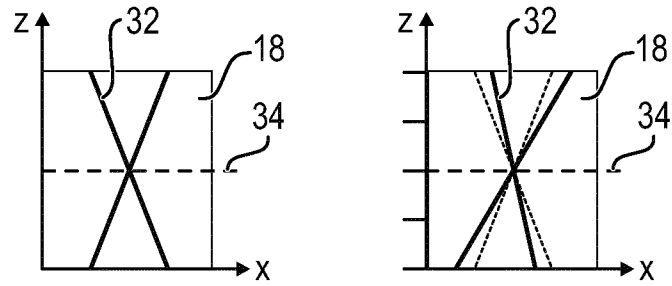


FIG. 6

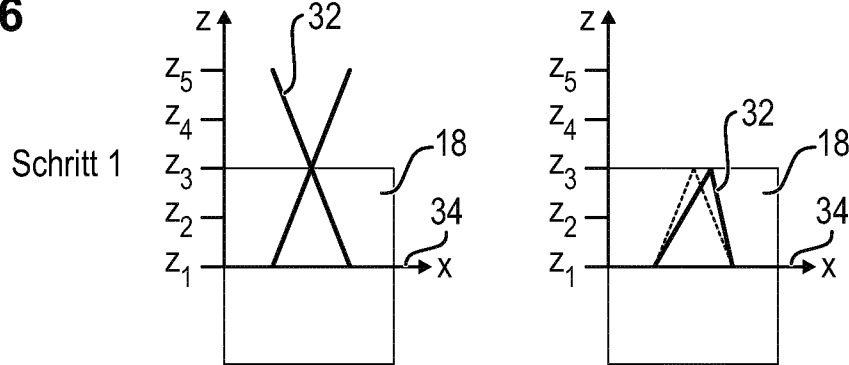


FIG. 7

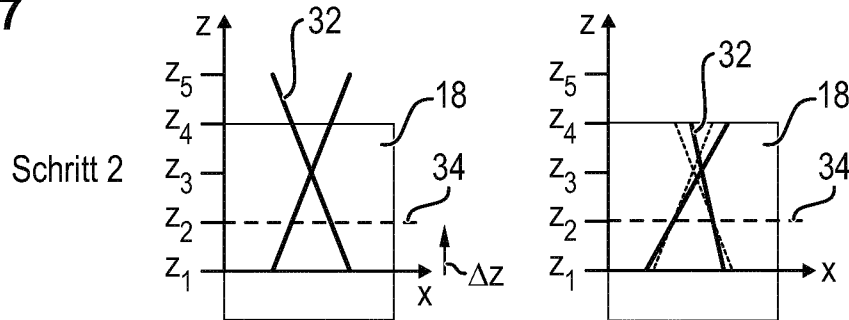


FIG. 8

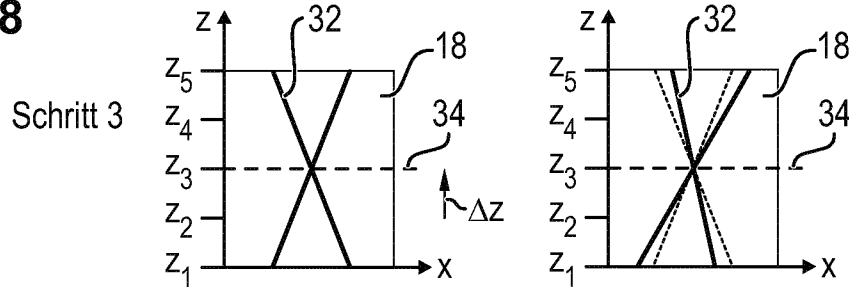


FIG. 9

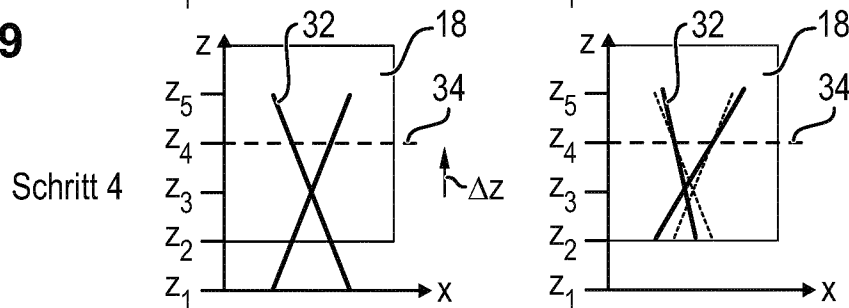


FIG. 10

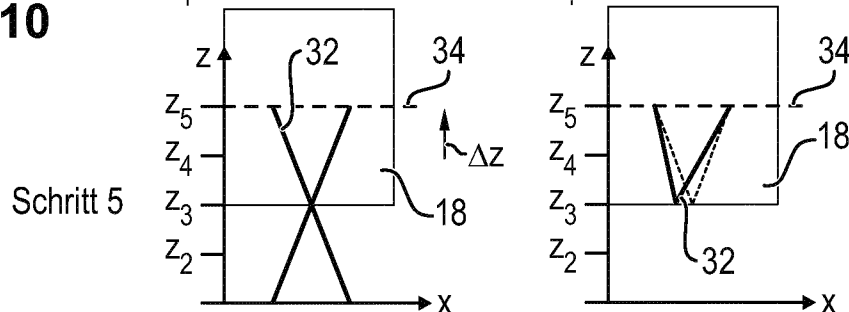


FIG. 11

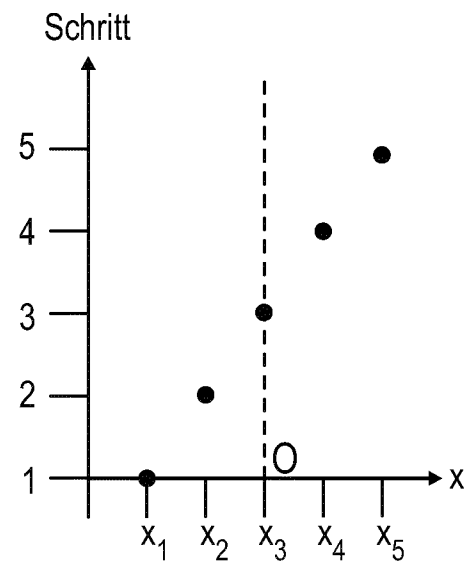
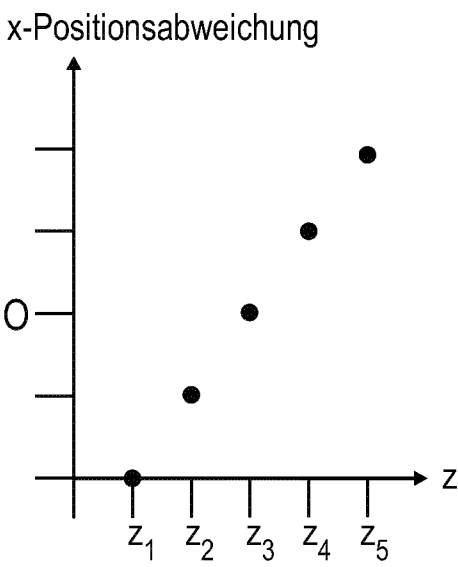


FIG. 12



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2014/063918

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G02B27/00 G01N21/64 G02B21/16 G02B21/36 G02B27/58 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G02B G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 2 592 461 A2 (LEICA MICROSYSTEMS [DE]) 15 May 2013 (2013-05-15) the whole document -----	1-15
X	WO 2009/085218 A1 (HARVARD COLLEGE [US]; ZHUANG XIAOWEI [US]; HUANG BO [US]; BATES WILFRE) 9 July 2009 (2009-07-09) page 30, line 13 - line 32 -----	1,14
A	DE 10 2010 036709 A1 (LEICA MICROSYSTEMS [DE]) 2 February 2012 (2012-02-02) the whole document -----	1-15
A	DE 10 2010 017630 A1 (LEICA MICROSYSTEMS [DE]) 29 December 2011 (2011-12-29) the whole document -----	1-15
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 September 2014		Date of mailing of the international search report 30/09/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Windecker, Robert

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/063918

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 2592461	A2	15-05-2013	CN 103105382 A 15-05-2013
		DE 102011055294 A1 16-05-2013	
		EP 2592461 A2 15-05-2013	
		JP 2013105177 A 30-05-2013	
		US 2013120539 A1 16-05-2013	

WO 2009085218	A1	09-07-2009	CN 101918816 A 15-12-2010
			EP 2232244 A1 29-09-2010
			JP 5526036 B2 18-06-2014
			JP 2011508214 A 10-03-2011
			JP 2014066734 A 17-04-2014
			US 2011002530 A1 06-01-2011
			US 2014038201 A1 06-02-2014
			US 2014063194 A1 06-03-2014
			WO 2009085218 A1 09-07-2009

DE 102010036709	A1	02-02-2012	DE 102010036709 A1 02-02-2012
			JP 2013533513 A 22-08-2013
			US 2013128025 A1 23-05-2013
			WO 2012013586 A1 02-02-2012

DE 102010017630	A1	29-12-2011	DE 102010017630 A1 29-12-2011
			JP 2013533507 A 22-08-2013
			US 2013222568 A1 29-08-2013
			WO 2012000923 A1 05-01-2012

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 INV. G02B27/00 G01N21/64 G02B21/16 G02B21/36 G02B27/58
 ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 G02B G01N

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 2 592 461 A2 (LEICA MICROSYSTEMS [DE]) 15. Mai 2013 (2013-05-15) das ganze Dokument -----	1-15
X	WO 2009/085218 A1 (HARVARD COLLEGE [US]; ZHUANG XIAOWEI [US]; HUANG BO [US]; BATES WILFRE) 9. Juli 2009 (2009-07-09) Seite 30, Zeile 13 - Zeile 32 -----	1,14
A	DE 10 2010 036709 A1 (LEICA MICROSYSTEMS [DE]) 2. Februar 2012 (2012-02-02) das ganze Dokument -----	1-15
A	DE 10 2010 017630 A1 (LEICA MICROSYSTEMS [DE]) 29. Dezember 2011 (2011-12-29) das ganze Dokument -----	1-15



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert,
aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach
dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft er-
scheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer
anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden
soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie
ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung,
eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach
dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum
oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der
Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der
Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden
Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung
kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf
erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung
kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet
werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren
Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und
diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. September 2014

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

30/09/2014

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Windecker, Robert

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2014/063918

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 2592461 A2	15-05-2013	CN 103105382 A	15-05-2013
		DE 102011055294 A1	16-05-2013
		EP 2592461 A2	15-05-2013
		JP 2013105177 A	30-05-2013
		US 2013120539 A1	16-05-2013

WO 2009085218 A1	09-07-2009	CN 101918816 A	15-12-2010
		EP 2232244 A1	29-09-2010
		JP 5526036 B2	18-06-2014
		JP 2011508214 A	10-03-2011
		JP 2014066734 A	17-04-2014
		US 2011002530 A1	06-01-2011
		US 2014038201 A1	06-02-2014
		US 2014063194 A1	06-03-2014
		WO 2009085218 A1	09-07-2009

DE 102010036709 A1	02-02-2012	DE 102010036709 A1	02-02-2012
		JP 2013533513 A	22-08-2013
		US 2013128025 A1	23-05-2013
		WO 2012013586 A1	02-02-2012

DE 102010017630 A1	29-12-2011	DE 102010017630 A1	29-12-2011
		JP 2013533507 A	22-08-2013
		US 2013222568 A1	29-08-2013
		WO 2012000923 A1	05-01-2012
