

(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
09. November 2017 (09.11.2017)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2017/191121 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

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

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2017/060390

(22) Internationales Anmeldedatum:
02. Mai 2017 (02.05.2017)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2016 108 259.7 03. Mai 2016 (03.05.2016) DE
10 2016 123 387.0 02. Dezember 2016 (02.12.2016) DE

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

(72) Erfinder: FAHRBACH, Florian; Cambridgestr. 8, 69115 Heidelberg (DE). SIECKMANN, Frank; Frankenstraße 11, 75031 Eppingen (DE). SCHUMANN, Christian; Am Zollstock 24, 35392 Gießen (DE). SCHLICKER, Oliver; Frankenstraße 79, 35578 Wetzlar (DE).

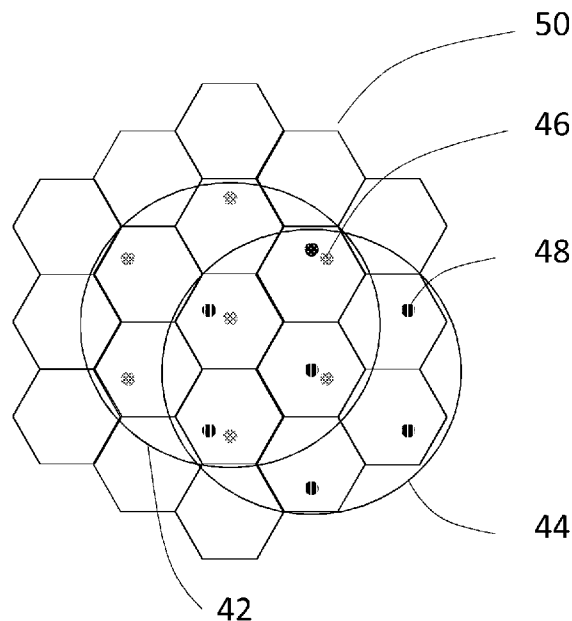
(74) Anwalt: BRADL, Joachim; Leica Microsystems GmbH, Corporate Patents + Trademarks Dept., 35578 Wetzlar (DE).

(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, DJ, 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, KH, KN, KP,

(54) Title: MICROSCOPE AND METHOD FOR LOCALIZING FLUORESCENT MOLECULES IN THREE SPATIAL DIMENSIONS

(54) Bezeichnung: MIKROSKOP UND VERFAHREN ZUM LOKALISIEREN FLUORESZENTER MOLEKÜLE IN DREI RAUMDIMENSIONEN

Fig. 3



(57) Abstract: The invention relates to a microscope which has an optical illuminating system for exciting fluorescence at point light sources of a sample, an optical detection system, and a camera with a sensor. The density of the point light sources is kept low in order to minimize the overlap of point light sources lying one behind the other or in the vicinity of one another in each image captured by the camera, and a means is provided in the beam path of the optical detection system in order to divide the detection aperture into individual sub-apertures such that the images, which have been generated on the camera sensor by the individual sub-apertures, image an object volume from different spatial directions.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Mikroskop, aufweisend eine Beleuchtungsoptik zur Fluoreszenzanregung von Punktlichtquellen einer Probe, eine Detektionsoptik und eine Kamera mit einem Sensor, wobei die Dichte der Punktlichtquellen zur



WO 2017/191121 A1

KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, 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).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

Minimierung der Überdeckung hintereinander oder nahe nebeneinander liegender Punktlichtquellen in jedem von der Kamera aufgenommenen Bild gering gehalten, und wobei im Strahlengang der Detektionsoptik ein Mittel zur Unterteilung der Detektionsapertur in einzelne Teilaperturen vorgesehen ist, so dass die Bilder, die von den einzelnen Teilaperturen auf dem Kamerasensor erzeugt werden, ein Objektvolumen aus unterschiedlichen Raumrichtungen abbilden.

Mikroskop und Verfahren zum Lokalisieren fluoreszenter Moleküle in drei Raumdimensionen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Mikroskop und ein Verfahren zum Lokalisieren fluoreszenter Moleküle in drei Raumdimensionen.

Für Lokalisationstechniken mit Weitfeld / EPI-Fluoreszenzanregung ist eine dünne Probe erforderlich und es können nur die Fluorophore im Bereich einer dünnen Schicht um die Fokusebenen des Detektionsobjektivs lokalisiert werden. Dieser Bereich ist typischerweise sehr schmal, da die Schärfentiefe der zur Lokalisation verwendeten Objektive sehr klein ist.

Um die Fluoreszenz-Anregung auf einen dünnen Bereich zu beschränken, wird auch TIR-Beleuchtung (TIR steht für Total Internal Reflection) genutzt.

Eine Lokalisation mit Lichtblatt-Beleuchtung verbessert das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis und ermöglicht die Lokalisation auch in dicken Proben. Ohne weitere Hilfsmittel kann jedoch innerhalb der beleuchteten Schicht nicht präzise entlang der Detektionsachse (z-Achse) lokalisiert werden.

Die Nutzung von Zylinderlinsen oder anderen optischen Elementen die eine z-Abhängigkeit der Form oder Orientierung der Punktbildfunktion (PSF) im Detektionsstrahlengang bewirken, erlauben es nicht die z-Position gleichzeitig mit hoher Präzision und über einen großen Bereich zu detektieren. Aufgrund der Verwendung solcher, die PSF verformender Elemente kann ferner zusätzlich zur Lokalisation keine aberrationsfreie herkömmliche Abbildung erzeugt werden. Diese kann jedoch wünschenswert sein, um einen Kontext für die Lokalisation in Form einer Abbildung der Umgebung herzustellen.

Die Lichtfeld-Technologie erhöht die Schärfentiefe des Detektionsobjektivs signifikant unter Beibehaltung der Lichteffizienz des optischen Systems (im Gegensatz zu einer Reduktion der numerischen Apertur), weshalb mittels Objektiven mit hoher numerischer Apertur Moleküle aus einem größeren Bereich entlang der optischen Achse detektiert und mit vergleichsweise höherer Präzision lokalisiert werden können.

Die Lichtfeld-Technologie erlaubt außerdem die Lokalisation von entlang der Detektions-Achse (also der z-Achse) direkt hintereinander liegenden Molekülen. Andere Technologien, wie etwa solche unter Verwendung von Zylinderlinsen und ähnlichen optischen Elementen erlauben keine Lokalisation von direkt hintereinander liegenden Molekülen, und wenn sich die Bilder von zwei Molekülen überlagern, können diese häufig nicht präzise und robust lokalisiert werden. Daher ist es unabdingbar, die Anzahl gleichzeitig emittierender Fluoreszenzmoleküle gering zu halten. Dies hat zur Folge, dass in jedem Bild nur wenige Moleküle lokalisiert werden können. Zur hinreichend genauen Bestimmung der Struktur muss jedoch eine ausreichende hohe Anzahl von Molekülen lokalisiert werden. Daher muss eine entsprechend hohe Anzahl von Einzelbildern (mehrere 1000 sind üblich) erfasst werden

und die Aufnahme der Daten, die ein möglichst vollständiges Bild der Struktur ergeben dauert sehr lange. Dieses Problem tritt für dicke, dreidimensionale Proben aufgrund der erhöhten Anzahl potentiell emittierender Moleküle in verstärktem Maße auf, wobei gleichzeitig die Wahrscheinlichkeit zunimmt, dass sich die Bilder von zwei Molekülen überlagern, die deshalb nicht sauber lokalisiert werden können.

Es ist bekannt, dass in der Lokalisationsmikroskopie versucht wird, die Fluorophore auch entlang der Detektionsachse zu lokalisieren indem eine Optik in den Detektionsstrahlengang gebracht wird, deren Ziel es ist die PSF der Abbildung derart zu verändern, dass ein messbares Merkmal entlang der z-Achse variiert. Zum Beispiel kann eine Zylinderlinse eingebracht werden, die zu einer astigmatischen PSF führt, wobei das Verhältnis der Halbachsen der PSF nun Aufschluss über den z-Defokus gibt. Alternativ sind auch spiral- und doppel-spiralförmige PSFs verwendet worden um eine Lokalisation entlang der optischen Achse zu erzielen.

Die Lichtfeld-Technologie wurde in Verbindung mit PIV (Particle Imaging Velocimetry) genutzt um Partikelströme zu lokalisieren. Dabei hat sich die herausragende Eignung der Light-Field Technologie für die Lokalisation von Partikeln gezeigt. Bei PIV werden Partikel in einige Zentimeter großen Probenvolumina abgebildet, deren Größe deutlich über $1\mu\text{m}$ bzw. der Auflösungsgrenze eines Mikroskops liegen. Dabei übertrifft die Präzision der Lokalisation nicht die Beugungsgrenze. Die Lokalisation erfolgt über gestreutes Licht und es wird keine Selektion der Partikel vorgenommen, d.h. es wird von allen Partikeln im beleuchteten Volumen gestreutes Licht detektiert. Da keine einzelnen Moleküle lokalisiert werden kommt die Nutzung von 'Dunkelzuständen (z. B. Triplett-Zustände) oder ähnlichen metastabilen angeregten Zuständen von Fluoreszenzmolekülen nicht in Frage. Wie schon erwähnt werden bei PIV keine einzelnen Moleküle abgebildet, sondern mikroskopische Partikel.

Folgende Druckschriften sind zum vorstehend angeführten Stand der Technik zu nennen:

- EP 2 244 484 A1
- US 725,567 A
- DE 10 2008 009 216 A1
- Cella Zanicchi, F. et al. Live-cell 3D super-resolution imaging in thick biological samples. *Nat. Methods* 8, 1047–1049 (2011).
- Menzel et al 2014, Using a novel light field measurement system to simultaneously measure 3D-3C velocity fields and 3d surface profiles, Fachtagung "Lasermethoden in der Strömungsmesstechnik", 9. – 11. September 2014

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht deshalb darin, ein Mikroskop und ein Verfahren zu schaffen, das die Lokalisation von einzelnen Molekülen oder allgemein Punktlichtquellen in drei Raumdimensionen gewährleistet.

Gelöst wird diese Aufgabe hinsichtlich des Mikroskops durch die Merkmale des Anspruchs 1 und hinsichtlich des Verfahrens durch die Merkmale des Anspruchs 15. Vorteilhaft

Weiterbildungen des Mikroskops und des Verfahrens sind in den jeweiligen Unteransprüchen angegeben.

Demnach schafft die Erfindung ein Mikroskop, aufweisend eine Beleuchtungsoptik zur Fluoreszenzanregung von Punktlichtquellen einer Probe, eine Detektionsoptik und eine Kamera mit einem ortsauflösenden Sensor, wobei die Dichte der emittierenden Punktlichtquellen zur Minimierung der Überdeckung hintereinander oder nahe nebeneinander liegender Punktlichtquellen in jedem von der Kamera aufgenommenen Bild gering gehalten, und wobei im Strahlengang der Detektionsoptik ein Mittel zur Unterteilung der Detektionsapertur in einzelne Teilaperturen vorgesehen ist, so dass die Bilder, die von den einzelnen Teilaperturen auf dem Kamerasensor erzeugt werden, ein Objektvolumen aus unterschiedlichen Raumrichtungen abbilden.

Mit anderen Worten schafft die Erfindung ein Mikroskop zur idealerweise überaufgelösten Lokalisation von einzelnen Molekülen oder allgemein Punktlichtquellen in drei Raumdimensionen.

Gemäß einer besonders vorteilhaften Weiterbildung der Erfindung umfasst die Beleuchtungsoptik mindestens ein Lichtblatt, mit dem die Probe aus mindestens einer Richtung beleuchtet wird und das Mittel zur Unterteilung der Detektionsapertur weist ein Mikrolinsenarray auf. Die dadurch für das erfindungsgemäße Mikroskop bereitgestellte Kombination aus Lichtfeldkamera und Lichtblattbeleuchtung resultiert in einer Lichtfeld-Lokalisationstechnik, die im Folgenden näher erläutert ist.

Um eine Punktlichtquelle in 3D zu lokalisieren sind mindestens zwei Bilder der Punktlichtquelle nötig, die durch verschiedene Mikrolinsen auf den Sensor abgebildet werden. Typischerweise wird jedoch jede Punktlichtquelle durch mehrere Mikrolinsen abgebildet, was eine Überlappung von Bildbereichen verschiedener Punktlichtquellen zur Folge hat. Auf dem Sensor nimmt also jede Punktlichtquelle eine Fläche ein, die dem Vielfachen der Fläche einer auflösungsbegrenzten Abbildung der Punktlichtquelle auf einem Sensor entspricht. Darüber hinaus werden auch noch Punktlichtquellen aus anderen Ebenen senkrecht zur optischen Achse auf eine 2D-Fläche projiziert. Die Bilder einzelner Punktlichtquellen, können sich also überdecken. Ein wesentlicher Aspekt der Erfindung besteht also darin, die Dichte der Punktlichtquellen in jedem einzelnen aufgenommenen Bild einzuschränken. Die Lokalisation von Punktlichtquellen in einem dreidimensionalen Volumen wird demnach dadurch gewährleistet, dass deren Zahl gering gehalten wird, um die Überlappung von Bildbereichen verschiedener Punktlichtquellen minimal zu halten.

Eine möglichst geringe Überlappung von Bildbereichen verschiedener Punktlichtquellen kann durch folgende Maßnahmen erreicht werden:

- durch vereinzelte Markierung, sog. „Sparse Labeling“, demnach die „Dichte“ der Fluorophore in der Probe ist ausreichend gering gehalten wird, etwa bei Ca^{2+} -Bildgebung

einzelner mit gCamp markierter Neuronen mit genetisch codierten Ca^{2+} -Sonden oder bei der Bildgebung des Blutflusses der Einfärbung einer Teilgruppe der Blutzellen.

- durch schaltbare Fluorophore im Falle einer relativ hohen Dichte der Fluorophore in der Probe, wobei für jedes Bild eine ausreichend kleine Untergruppe in einen zur Fluoreszenzmission anregbaren molekularen Zustand gebracht („angeschaltet“) wird, z. B. durch Photoaktivierung, transiente Bindung o. ä., bzw. eine ausreichend große Untergruppe in einen zur Fluoreszenzmission nicht anregbaren Zustand gebracht („ausgeschaltet“) wird;
- durch selektive Beleuchtung: die Dichte der Fluorophore selbst in der Probe ist zwar zu hoch, wobei jedoch für jedes Bild eine ausreichend kleine Untergruppe von Punktlichtquellen zur Fluoreszenzlicht-Abgabe angeregt wird, wie etwa durch eine strukturierte Beleuchtung.

Der im Rahmen der Erfindung aufgestellten Forderung nach einer geringen Dichte der Punktlichtquellen kann in unterschiedlicher Weise entsprochen werden. Zu diesem Zweck kann es beispielsweise vorgesehen sein, dass die Punktlichtquellen schaltbare Fluorophore, wie etwa Farbstoff-Moleküle oder fluoreszente Proteine, oder Quantenpunkte sind können. Die Aktivierung der Fluorophore kann z.B. über das schwache und/oder kurzzeitige Einstrahlen von Licht durch Erzielung eines Konformitätsunterschieds bewirkt werden (PALM, STORM). Die Aktivierung kann z.B. auch durch eine chemische Konformationsänderung bewirkt werden, die dazu führt, dass die Punktlichtquelle in einen bei der vorgesehenen Anregungswellenlänge zur Fluoreszenzmission anregbaren Zustand versetzt wird. Die zur Schaltung verwendete Wellenlänge unterscheidet sich üblicherweise von der zur Anregung der Fluoreszenzmission nutzbaren Wellenlänge. Alternativ können abzubildende Moleküle auch durch eine chemische Bindung in den An-Zustand übergehen (PAINT). Bei GSD-Mikroskopie wird der Grundzustand der Fluoreszenzanregung entvölkert indem die Moleküle in einen metastabilen Dunkel-Zustand überführt werden aus dem heraus sie nicht mehr anregbar sind. Allgemein kann ein Verfahren der RESOLFT-Mikroskopie verwendet werden, bei dem eine lichtinduzierte Schaltung der Punktlichtquellen wird, um Sicherzustellen dass nur eine Teilmenge der im Detektionsvolumen bzw. in der Probe vorhandenen Punktlichtquellen gleichzeitig Fluoreszenz emittieren. Grundsätzlich ist auch eine nichtoptische Maßnahme einsetzbar, nämlich dass man chemisch bei der Färbung der Probe schon auf eine geringe Dichte achtet. Eine Alternative besteht im Einsatz sogenannter „Brainbow“-Organismen, die mit einem besonderen fluoreszenten Protein gefärbt sind, wobei die einzelnen Moleküle in jeweils einem von mehreren Spektralbanden emittieren. Auf diese Weise können mit einem Satz geeigneter spektraler Filter je ein Teil der Moleküle ausgeblendet werden.

Es soll an dieser Stelle zu bemerken, dass das Ziel der 3D-Lokalisation von Punktlichtquellen nicht notwendigerweise mit optischer Überauflösung erreicht werden muss, also nicht unterhalb von ca. $0.6\lambda/\text{NA}$.

Die Beleuchtung, Schaltung in den An-, Aus- oder einen Dunkelzustand, Fluoreszenzanregung der Punktlichtquellen können über das Detektionsobjektiv erfolgen (Epifluoreszenz), über

einen dem Detektionsobjektiv gegenüber gestellten Kondensator oder auch in besonders vorteilhafter Weise von der Seite mit dem Lichtblatt (SPIM). Dabei wird die Dicke des Lichtblatts idealerweise so eingestellt, dass der gesamte Bereich aus dem lokalisiert werden soll, auch für jede Aufnahme eines Kamerabildes beleuchtet wird. Der Bereich aus dem lokalisiert werden soll ist typischerweise der Bereich innerhalb der Schärfentiefe der Detektionsoptik wobei Schärfentiefe im Rahmen dieser Abbildung z.B. den Bereich entlang der optischen Achse bezeichnet innerhalb dessen der Durchmesser des Abbildes einer Punktlichtquelle nicht oberhalb eines vielfachen, z.B. des doppelten, des Durchmessers im Fokus liegt. Gleichzeitig soll die Beleuchtung entlang der optischen Achse der Detektionsoptik so weit wie möglich auf diesen Bereich eingeschränkt werden. Zum Zweck dieser Einschränkung, insbesondere entlang der Detektionsachse, ist die Beleuchtung einer Schicht in der Probe von der Seite (SPIM) besonders vorteilhaft.

Gemäß einer vorteilhaften Weiterbildung der Erfindung ist vorgesehen, die Beleuchtungsoptik zur Aktivierung der Punktlichtquellen eine kohärente oder inkohärente strukturierte Beleuchtung bereitstellt.

Sind die Punktlichtquellen nicht schaltbar, dann kann mit Hilfe der strukturierten Beleuchtung eine Untermenge dazu gebracht werden, Licht abzugeben, das vom Kamerasensor detektiert wird. Durch eine Strukturierung der Beleuchtung soll eine Untergruppe/Teilmenge der sich im Bereich der Tiefenschärfe der Detektionsoptik befindlichen Punktlichtquellen beleuchtet und ggf. angeregt werden. Diese Strukturierung kann durch Interferenz mehrerer von z.B. zwei oder drei Strahlen erreicht werden, die unter einem Winkel zueinander durch das Probenvolumen propagieren. Alternativ kann die Probe auch mit einem fokussierten Strahl abgerastert werden. Die Ausbreitungsrichtung der Strahlen kann vorteilhaft in der Ebene des Lichtblatts liegen, die wiederum mit der Fokusebene der Detektionsoptik übereinstimmt, bzw. innerhalb der Schärfentiefe der Detektionsoptik bzw. innerhalb des Bereichs entlang deren optischer Achse, in dem eine Lokalisation möglich ist, liegt. Liegen die Ausbreitungsrichtungen der Strahlen in einer Ebene, so schließen diese z.B. 180° bei zwei Strahlen und 120° bei drei Strahlen ein. Bevorzugt kann die Phase mindestens eines Teilstrahls so variiert werden, dass sich das Beleuchtungsmuster um einen Bruchteil der Periode verschiebt. Allerdings kann durch die (gegenseitige) Verkipfung einzelner Strahlen gegen die Lichtblattebene auch entlang der Detektionsachse eine Strukturierung der Beleuchtung erreicht werden. Insgesamt ist das Ziel der strukturierten Beleuchtung die Erleichterung der Lokalisation dadurch, dass es zu weniger Überschneidungen und Überdeckungen der Bilder von unterschiedlichen Punktquellen auf dem Sensor kommt. Gleichzeitig soll die Zahl der für ein vollständiges Bild einer Ebene notwendigen Rohbilder minimiert werden, z.B. auf 9.

Handelt es sich bei den Punktlichtquellen um schaltbare, fluoreszente Farbstoffe / Moleküle, kann die Anregung und An- bzw. -Aus-Schaltung dieser Punktlichtquellen mittels PALM, STORM, PAINT, GSD oder ähnliche Methoden erfolgen und diese Methoden können mit der vorstehend erläuterten strukturierten Beleuchtung kombiniert werden.

Vorteilhafterweise sind die Mikrolinsen des Mikrolinsenarrays größer als der Abstand der Pixel auf dem Kamerasensor. Die Größe der Mikrolinsen des Mikrolinsenarrays ist vorteilhafterweise auf die bildseitige Apertur der Detektionsoptik derart abgestimmt, dass die Bilder der Mikrolinsen den Kamerasensor im Wesentlichen vollständig ausleuchten. Die Bilder der Mikrolinsen auf dem Kamerasensor bedecken dabei maximal einen Bereich, der der Größe der Mikrolinse entspricht und es kommt idealerweise zu keinerlei Überschneidungen der einzelnen Bilder der Mikrolinsen untereinander.

Vorteilhafterweise umfasst das Mikrolinsenarray Gruppen von Mikrolinsen gleicher oder unterschiedlicher Brennweiten und die Zentren der Mikrolinsen des Mikrolinsen-Arrays sind vorzugsweise auf einem zweidimensionalen Bravais-Gitter angeordnet. Die Rekonstruktion von Bildern erfolgt dabei über einen iterativen Algorithmus wie beispielsweise in der EP 2 244 484 A1 beschrieben, der es erlaubt, etwa 200 Ebenen innerhalb der Schärfentiefe aufzulösen, wobei jedes der Bilder eine Pixelanzahl aufweist, die etwa die bis zu einem Viertel der Pixelzahl des Kamerasensors entspricht. Das Besondere der erfindungsgemäßen Mikroskopie besteht in der Rekonstruktion, die es vorsieht, zwischen den Bildern der einzelnen Mikrolinsen Übereinstimmungen zu suchen, was besonders gut für isolierte Partikel darstellbar ist.

Das Mikrolinsenarray kann in oder nahe einer zur Probe konjugierten Ebene oder in oder nahe einer zur Pupille konjugierten Ebene angeordnet sein. Es kann zusammen mit dem Kamerasensor als Lichtfeldkamera ausgeführt sein und dann in einem gemeinsamen Gehäuse untergebracht sein. In einer vorteilhaften Anordnung des Mikrolinsenarrays bildet dieses zusammen mit einer vorgeschalteten Linse, bei der es sich bevorzugt um eine Tubuslinse handelt, und deren Apertur für das Mikrolinsenarray ausreicht, ein Teleskop nach Galilei oder Kepler bildet.

Das erfindungsgemäße Mikroskop umfasst eine Post-Processing-Einrichtung zur Rekonstruktion der Lokalisation einzelner Punktlichtquellen bzw. Moleküle einer Probe in drei Raumdimensionen durch einen auf Triangulation basierenden iterativen Algorithmus zur Erzeugung eines 3D-Bilds vorgesehen ist, wobei die Triangulation bevorzugt ein iteratives Maximum-Likelihood-Verfahren umfasst, das beugungsoptische Eigenschaften der Detektionsoptik berücksichtigt. Bei der erfindungsgemäßen Verwendung eines Mikrolinsenarrays als Mittel zur Unterteilung der Detektionsapertur in einzelne Teilaperturen ist der iterative Algorithmus bevorzugt dazu ausgelegt ist, Übereinstimmungen zwischen den Bildern der einzelnen Mikrolinsen zu ermitteln und daraus auf die Position der zu den Bildern gehörigen Punktlichtquelle zu schließen.

Der Algorithmus ist derart gestaltet, dass er analog zur Triangulation mit der Parallaxe arbeitet, die dadurch entsteht, dass verschiedene Mikrolinsen die einzelnen Punktlichtquellen aus leicht unterschiedlichen Richtungen betrachten. Die Position des Bildes einer Punktlichtquelle hinter einer Mikrolinse und der Abstand der Mikrolinse zur optischen Achse geben Auskunft über den Grad der Verkippung der zugehörigen PSF im

Objekt. Jede Mikrolinse bildet Punktlichtquellen, die 'innerhalb eines zur jeweiligen Mikrolinse zugeordneten Subaperturkonus bzw. dessen beugungsbedingten Detektionsvolumens, also eines Bereichs um eine Achse liegen, auf den der Mikrolinse zugehörigen Bereich des Sensors hinter der Mikrolinse ab. Die Position einer Punktlichtquelle lässt sich also als Schnittpunkt der mindestens zwei Achsen ermitteln. Typischerweise werden übereinstimmende Strukturen in den Bildern über verschiedene Mikrolinsen ermittelt. Bei Punktlichtquellen ist eine Unterscheidung kaum möglich und es muss entweder auf die Anordnung von mehreren Punktlichtquellen oder auf a-priori-Information zurückgegriffen werden.

Alternativ ist auch folgender Ansatz möglich: Eine Datenbank enthält die Sensor-Roh-Bilder von jeweils einer Punktlichtquelle pro Bild. Die Rohbilder decken dabei Punktlichtquellen an Positionen ab, die über das gesamte Objektvolumen verteilt sind. Die Rekonstruktion der Position einer Punktlichtquelle findet dann über einen Vergleich des vom Objekt aufgenommen Rohbildes mit einer Überlagerung der Bilder aus der Rohbild-Datenbank (mit variabler „Helligkeit“) statt und es wird diejenige Überlagerung der Rohbilder gesucht, die dem aufgenommenen Bild am besten entspricht.

Das erfindungsgemäße Verfahren zum Lokalisieren von Punktlichtquellen einer Probe in drei Raumdimensionen basiert auf dem erfindungsgemäßen Mikroskop.

Vorteilhafterweise werden bei dem erfindungsgemäßen Verfahren eine vor allem schnelle Aufnahme einer Zeitserie und eine zeitliche und/oder räumliche Korrelation der zu einzelnen Subvolumina gehörigen zeitabhängigen Signals vorgenommen.

Ferner kann ein erfassbares 3D-Lokalisationsvolumen durch Verschiebung der Probe entlang der optischen Achse der Detektionsoptik vergrößert werden. Alternativ oder zusätzlich kann ein erfassbares 3D-Lokalisations-Volumens durch Verschiebung der Probe entlang der optischen Achse der Detektionsoptik erweitert wird.

Gemäß einer vorteilhaften Weiterbildung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird der Korrelations-Algorithmus dazu eingesetzt, berechnete 3D-Lokalisierungspunkte bei dem der Korrelations-Algorithmus dazu eingesetzt wird, berechnete 3D-Lokalisierungspunkte verschiedener Ebenen entlang der optischen Achse der Detektionsoptik derart zu überlagern, dass ein sauber definiertes und/oder in z-Richtung vergrößertes 3D Lokalisations-Volumen entsteht. Alternativ wird der Korrelations-Algorithmus vorteilhafterweise dazu eingesetzt, berechnete 3D-Lokalisierungspunkte verschiedener Ebenen senkrecht zur optischen Achse derart zu überlagern, dass ein senkrecht zur optischen Achse vergrößertes 3D-Lokalisations-Volumen entsteht. Außerdem kann vorteilhafterweise ein erfassbares 3D-Lokalisations-Volumens durch Verschiebung der Probe senkrecht zur optischen Achse der Detektionsoptik vergrößert werden.

Vorteilhafterweise ist ferner eine vor allem schnelle Aufnahme einer Zeitserie und zeitliche und/oder räumliche Korrelation der zu einzelnen Subvolumina gehörigen zeitabhängigen

Signale vorgesehen, wie z.B. bei Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS), Image Correlation Spectroscopy (ICS), oder Spatiotemporal Image Correlation Spectroscopy (STICS). Bei FCS oder ICS bzw. STICS, wird für einen oder mehrere Punkte im Objekt das Fluoreszenzsignal mit hoher zeitlicher Dynamik gemessen. Dieses Signal wird dann mit sich selbst zeitlich korreliert (Autokorreliert) oder mit den Signalen von anderen Objektpunkten (ICS, STICS) oder Fluorophoren (FCCS) zeitlich kreuzkorreliert.

Gemäß einer weiteren vorteilhaften Weiterbildung der Erfindung ist es vorgesehen, die Bilder der einzelnen Teilaperturen durch eine geeignete Methode zur Inversion der Abbildungseigenschaften (sog. Multiview-Deconvolution) miteinander zu verrechnen.

Neben der Möglichkeit der erfindungsgemäß „überauflösenden“ Lokalisations-Mikroskopie bietet sich insbesondere die Verwendung des erfindungsgemäßen Lokalisationsverfahrens für die 3D-Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) und für das Einzelmolekül-Tracking an.

Es gibt nun verschiedene Möglichkeiten, die Lehre der vorliegenden Erfindung in vorteilhafter Weise auszugestalten und weiterzubilden. Dazu ist einerseits auf die dem Patentanspruch 1 nachgeordneten Patentansprüche und andererseits auf die nachfolgende Erläuterung der bevorzugten Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Zeichnung zu verweisen. In Verbindung mit der Erläuterung der bevorzugten Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Zeichnung werden auch im Allgemeinen bevorzugte Ausgestaltungen und Weiterbildungen der Lehre erläutert. In der Zeichnung zeigen

Fig. 1 eine erste Ausführungsform des erfindungsgemäßen Mikroskops zur 3D-Lokalisation mittels EPI-Fluoreszenzanregung,

Fig. 2 eine zweite Ausführungsform des erfindungsgemäßen Lichtfeldmikroskops zur 3D-Lokalisation mittels Lichtblattbeleuchtung, und

Fig. 3 eine Abbildung von Punktlichtquellen durch mehrere Mikrolinsen des Mikrolinsenarrays des Mikroskops von Fig. 1 und 2.

Die in Fig. 1 gezeigte erste Ausführungsform eines Mikroskops weist eine nicht gezeigte Beleuchtungsoptik zur Fluoreszenzanregung von Punktlichtquellen einer Probe. Die Beleuchtungsoptik ist zur EPI-Fluoreszenzanregung ausgelegt.

Ferner umfasst das Mikroskop von Fig. 1 eine Detektionsoptik mit einem Detektionsobjektiv 10. Im Strahlengang folgt auf das Detektionsobjektiv ein dichroitischer Spiegel 11, eine Tubuslinse 12 und eine Kamera, die einen Sensor 13 umfasst. Zwischen der Tubuslinse 12 und dem Kamerasensor 13 ist ein Mittel zur Unterteilung der Detektionsapertur in Gestalt eines Mikrolinsenarrays 14 vorgesehen ist.

Die Mikrolinsen des Mikrolinsenarrays 14 sind größer als der Abstand der Pixel auf dem Kamerasensor 13 und die Größe der Mikrolinsen des Mikrolinsenarrays 14 ist auf die

bildseitige Apertur der Detektionsoptik derart abgestimmt, dass die Bilder der durch die Mikrolinsen abgebildeten Objektivpupille den Kamerasensor 13 im Wesentlichen vollständig ausleuchten.

Das Mikrolinsenarray 14 umfasst Mikrolinsen derselben Brennweite. Alternativ kann ein Mikrolinsenarray 14a zum Einsatz kommen, das Gruppen unterschiedlicher Brennweiten umfasst. Ferner sind die Zentren der Mikrolinsen des Mikrolinsen-Arrays 14, 14a vorzugsweise auf einem zweidimensionalen Bravais-Gitter angeordnet. Außerdem kann bevorzugt vorgesehen sein, das Mikrolinsenarray 14, 14a in oder nahe einer zur Probe konjugierten Ebene oder in oder nahe einer zur Pupille konjugierten Ebene anzuordnen.

Bei dem in Fig. 1 gezeigten Mikroskop sind die Beleuchtungsquelle und/oder ein Fluorophor in der Probe dazu ausgelegt, lediglich eine Teilmenge der Punktlichtquellen zu aktivieren. Mit dem im Strahlengang der Detektionsoptik angeordneten Mittel zur Unterteilung der Detektionsapertur in einzelne Teilaperturen in Gestalt des Mikrolinsenarrays 14, 14a wird erreicht, dass die Bilder, die von den einzelnen Teilaperturen auf dem Kamerasensor 13 räumlich separiert abgebildet werden, ein Objektvolumen aus unterschiedlichen Raumrichtungen abbilden.

Die Beleuchtung erfolgt nach dem Prinzip der Epifluoreszenzanregung. Die Anregungs-, Schalt- und sonstige Strahlen zur Anregung und Beeinflussung der Fluoreszenzemission der Punktlichtquellen (20) wird über einen dichroitischen Spiegel eingekoppelt, der zwischen Objektiv 10 und Tubuslinse 12 angebracht wird. Möglich ist auch eine Durchlichtbeleuchtung durch einen dem Objekt 10 gegenübergestellten Kondensator.

Die in Fig. 2 gezeigte zweite Ausführungsform des Lichtfeldmikroskops unterscheidet sich von der ersten Ausführungsform des in Fig. 1 gezeigten Lichtfeldmikroskops dadurch, dass die 3D-Lokalisation auf Grundlage einer Lichtblattbeleuchtung (30) zur Fluoreszenzanregung von Punktlichtquellen einer Probe erfolgt, und dass das Mikroskop von Fig. 2 nicht den dichroitischen Spiegel 13 des Mikroskops von Fig. 1 benötigt. Sowohl im Mikroskop nach Fig. 1 als auch Fig. 2 werden aber typischerweise Bandpassfilter (nicht dargestellt) verwendet damit nur das Fluoreszenzlicht der zu lokalisierenden Moleküle bis zum Sensor vordringt. Bestandteile des Mikroskops von Fig. 2, die denjenigen des Mikroskops von Fig. 1 entsprechen sind mit denselben Bezugszeichen bezeichnet.

Auch bei dem Mikroskop von Fig. 2 ist die Beleuchtungsquelle und/oder ein Fluorophor in der Probe dazu ausgelegt, lediglich eine Teilmenge der Punktlichtquellen zu aktivieren. Mit dem im Strahlengang der Detektionsoptik angeordneten Mittel zur Unterteilung der Detektionsapertur in einzelne Teilaperturen in Gestalt des Mikrolinsenarrays 14, 14a wird erreicht, dass die Bilder, die von den einzelnen Teilaperturen auf dem Kamerasensor 13 räumlich separiert abgebildet werden, ein (gemeinsames) Objektvolumen aus unterschiedlichen Raumrichtungen abbilden.

In Fig. 3 ist beispielhaft dargestellt, wie jede Punktlichtquelle durch mehrere Mikrolinsen des Mikrolinsenarrays 14, 14a abgebildet wird, was eine Überlappung von Bildbereichen verschiedener Punktlichtquellen 42, 44 zur Folge hat. Auf dem Sensor nimmt also jede Punktlichtquelle eine Fläche ein, die dem Vielfachen der auflösungsbegrenzten Abbildung der Punktlichtquelle entspricht. Darüber hinaus werden auch noch Punktlichtquellen aus anderen Ebenen senkrecht zur optischen Achse der Detektionsoptik auf eine 2D-Fläche projiziert. Die Bilder 46, 48 – vorzugsweise einzelner – verschiedener Punktlichtquellen, können sich also teilweise überdecken. Ein wesentlicher Aspekt der Erfindung besteht nun darin, die Dichte der Punktlichtquellen in jedem einzelnen aufgenommenen Bild einzuschränken. Die Lokalisation von Punktlichtquellen in einem dreidimensionalen Volumen wird demnach dadurch gewährleistet, dass deren Zahl gering gehalten wird, um die Überlappung von Bildbereichen verschiedener Punktlichtquellen minimal zu halten.

Aus Fig. 3 geht hervor, dass zur Minimierung der mindestens von einer Punktlichtquelle zwei eindeutig zuordenbare Bilder benötigt werden, die durch verschiedene Mikrolinsen aufgenommen wurden. Die optimale Dichte lässt sich weiter einschränken. Ist die Dichte der Punktlichtquellen zu hoch, ist eine eindeutige Zuordnung nicht möglich. Ist sie zu gering, wird unter Umständen Information verschenkt bzw. es müssen für das finale Bild mehr Einzelbilder aufgenommen werden. Für jede Position in der Probe gibt es also eine eindeutige Verteilung von Bildern dieser Probe hinter den Mikrolinsen. Eine höhere Zahl als zwei Bilder hilft dabei, die gemessenen Muster auf Plausibilität zu untersuchen. Zum Beispiel wird ein Ring von Linsen Bilder einer Probe erzeugen. In einzelnen Bildern kann es zur Überlagerung mit den Bildern anderer Punktlichtquellen kommen. Kommt es niemals oder nur bei einigen wenigen Bildern zu Überlappungen, dann kann die Zahl der Punktlichtquellen erhöht werden, falls dies erwünscht ist. Mit dem Bezugszeichen 50 sind die Bildfelder der Mikrolinsen auf dem Sensor gekennzeichnet.

Abschließend sei ganz besonders darauf hingewiesen, dass die voranstehend erörterten Ausführungsbeispiele lediglich zur Beschreibung der beanspruchten Lehre dienen, diese jedoch nicht auf die Ausführungsbeispiele einschränken. Insbesondere sind sämtliche, in dieser Beschreibung enthaltenen Merkmale und/oder deren Funktionen, Wirkungen und Eigenschaften für sich gesehen und/oder in Kombination miteinander als hierin offenbart anzusehen, die ein auf dem vorliegenden Gebiet tätiger Fachmann ggf. unter Hinzuziehung seines Fachwissens einzeln oder in Kombination zur Lösung der objektiven Aufgabe oder damit zusammenhängenden Problemstellungen vorsehen würde.

PATENTANSPRÜCHE

1. Mikroskop, aufweisend eine Beleuchtungsoptik zur Fluoreszenzanregung von Punktlichtquellen einer Probe, eine Detektionsoptik und eine Kamera mit einem Sensor,
 - wobei die Dichte der Punktlichtquellen zur Minimierung der Überdeckung hintereinander oder nahe nebeneinander liegender Punktlichtquellen in jedem von der Kamera aufgenommenen Bild gering gehalten, und
 - wobei im Strahlengang der Detektionsoptik ein Mittel zur Unterteilung der Detektionsapertur in einzelne Teilaperturen vorgesehen ist, so dass die Bilder, die von den einzelnen Teilaperturen auf dem Kamerasensor erzeugt werden, ein Objektvolumen aus unterschiedlichen Raumrichtungen abbilden.
2. Mikroskop nach Anspruch 1, wobei die Beleuchtungsoptik mindestens ein Lichtblatt umfasst, mit dem die Probe aus mindestens einer Richtung beleuchtet wird.
3. Mikroskop nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Mittel zur Unterteilung der Detektionsapertur ein Mikrolinsenarray aufweist.
4. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei dann, wenn Punktlichtquellen schaltbare, Fluorophore, wie etwa Farbstoff-Moleküle oder fluoreszente Proteine sind, deren Schaltung auf optischem Wege erfolgt.
5. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Beleuchtungsoptik zur Aktivierung der Punktlichtquellen eine kohärente oder inkohärente strukturierte Beleuchtung bereitstellt.
6. Mikroskop nach Anspruch 5, wobei zur Strukturierung der Beleuchtung eine Interferenz mehrerer, bevorzugt von zwei oder drei Strahlen erfolgt, die sich unter einem Winkel zueinander durch das Probenvolumen ausbreiten.
7. Mikroskop nach Anspruch 3, wobei die Mikrolinsen des Mikrolinsenarrays größer sind als der Abstand der Pixel auf dem Kamerasensor.
8. Mikroskop nach Anspruch 3 oder 7, wobei die Größe der Mikrolinsen des Mikrolinsenarrays auf die bildseitige Apertur der Detektionsoptik derart abgestimmt ist, dass die Bilder der Mikrolinsen den Kamerasensor im Wesentlichen vollständig ausleuchten.
9. Mikroskop nach Anspruch 3, 7 oder 8, wobei das Mikrolinsenarray Gruppen von Mikrolinsen gleicher oder unterschiedlicher Brennweiten umfasst, und wobei die

Zentren der Mikrolinsen des Mikrolinsen-Arrays vorzugsweise auf einem zweidimensionalen Bravais-Gitter angeordnet sind.

10. Mikroskop nach einem der Ansprüche 3 oder 7 bis 9, wobei das Mikrolinsenarray in oder nahe einer zur Probe konjugierten Ebene oder in oder nahe einer zur Pupille konjugierten Ebene angeordnet ist.
11. Mikroskop nach einem der Ansprüche 3 oder 7 bis 9, wobei das Mikrolinsenarray zusammen mit einer vorgeschalteten Linse, bei der es sich bevorzugt um eine Tubuslinse handelt, und deren Apertur für das Mikrolinsenarray ausreicht, ein Teleskop nach Galilei oder Kepler bildet.
12. Mikroskop nach einem der Ansprüche 3 oder 7 bis 11, wobei das Mikrolinsenarray und der Kamerasensor als Lichtfeldkamera ausgeführt und vorzugsweise in einem eigenen Gehäuse untergebracht sind.
13. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei eine Post-Processing-Einrichtung zur Rekonstruktion der Lokalisation einzelner Punktlichtquellen bzw. Moleküle einer Probe in drei Raumdimensionen durch einen auf Triangulation basierenden iterativen Algorithmus zur Erzeugung eines 3D-Bilds vorgesehen ist, wobei die Triangulation bevorzugt ein iteratives Maximum-Likelihood-Verfahren umfasst, das beugungsoptische Eigenschaften der Detektionsoptik berücksichtigt.
14. Mikroskop nach Anspruch 13, wobei der iterative Algorithmus dazu ausgelegt ist, Übereinstimmungen zwischen den Bildern der einzelnen Mikrolinsen zu ermitteln und daraus auf die Position der zu den Bildern gehörigen Punktlichtquelle zu schließen.
15. Verfahren zum Lokalisieren von Punktlichtquellen in einer Probe in drei Raumdimensionen mittels des Mikroskops nach einem der Ansprüche 1 bis 14.
16. Verfahren nach Anspruch 15, bei dem eine vor allem schnelle Aufnahme einer Zeitserie und eine zeitliche und/oder räumliche Korrelation der zu einzelnen Subvolumina gehörigen zeitabhängigen Signale vorgenommen werden.
17. Verfahren nach Anspruch 15 oder 16, bei dem ein erfassbares 3D-Lokalisationsvolumen durch Verschiebung der Probe entlang der optischen Achse der Detektionsoptik erweitert wird.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 17, bei dem der Korrelations-Algorithmus dazu eingesetzt wird, berechnete 3D-Lokalisierungspunkte verschiedener Ebenen entlang der optischen Achse der Detektionsoptik derart zu

überlagern, dass ein sauber definiertes und/oder in z-Richtung vergrößertes 3D Lokalisations-Volumen entsteht.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 18, bei dem der Korrelations-Algorithmus dazu eingesetzt wird, berechnete 3D-Lokalisierungspunkte verschiedener Ebenen senkrecht zur optischen Achse derart zu überlagern, dass ein senkrecht zur optischen Achse vergrößertes 3D-Lokalisations-Volumen entsteht.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 19, bei dem ein erfassbares 3D-Lokalisations-Volumens durch Verschiebung der Probe senkrecht zur optischen Achse der Detektionsoptik vergrößert wird.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 20, bei dem eine vor allem schnelle Aufnahme einer Zeitserie und zeitliche und/oder räumliche Korrelation der zu einzelnen Subvolumina gehörigen zeitabhängigen Signals (z.B. wie bei FCS, ICS, STICS, ...) vorgesehen ist.
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 21, bei dem die Bilder der einzelnen Teilaperturen zur Inversion der Abbildungseigenschaften miteinander verrechnet werden.

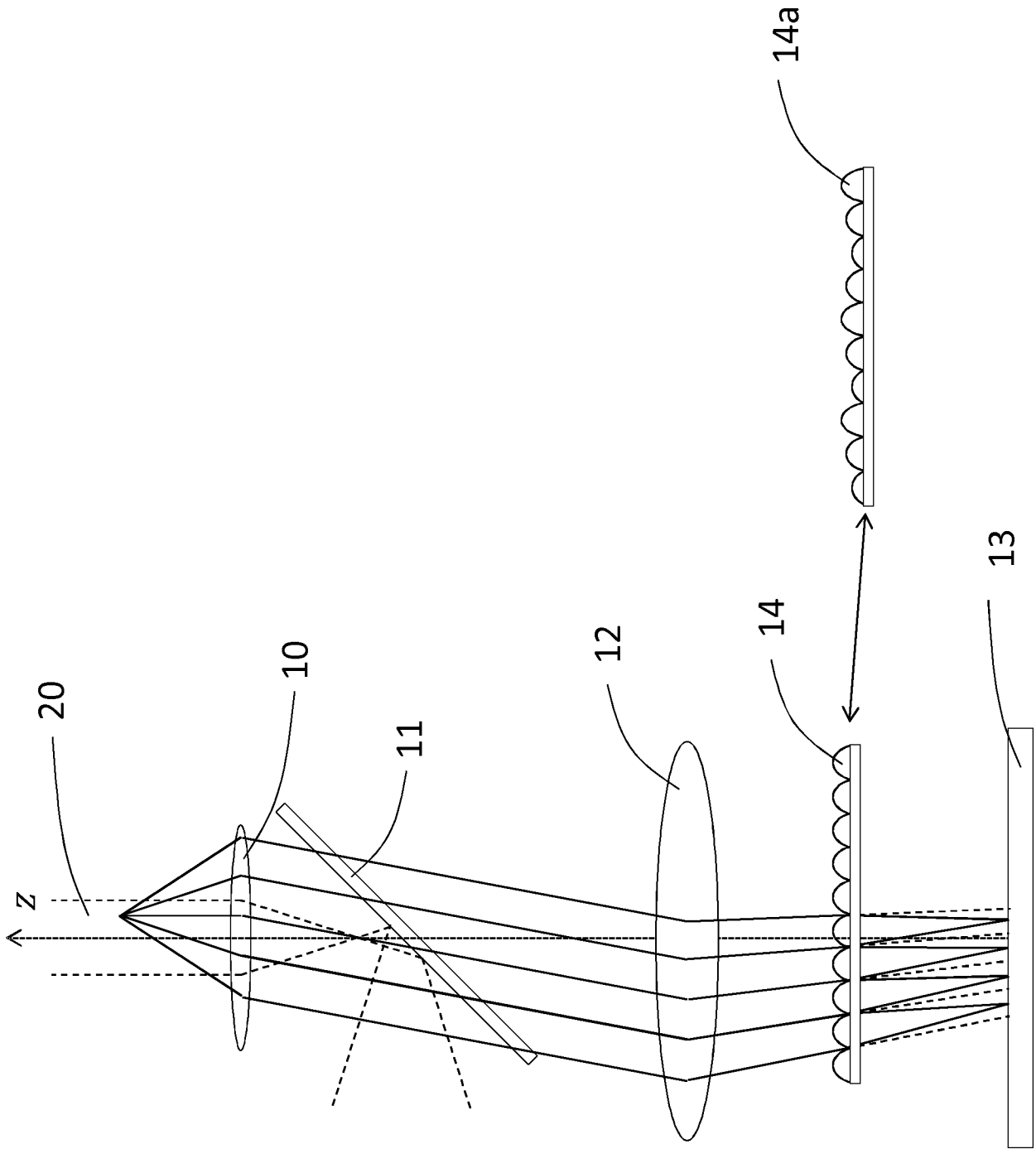


Fig. 1

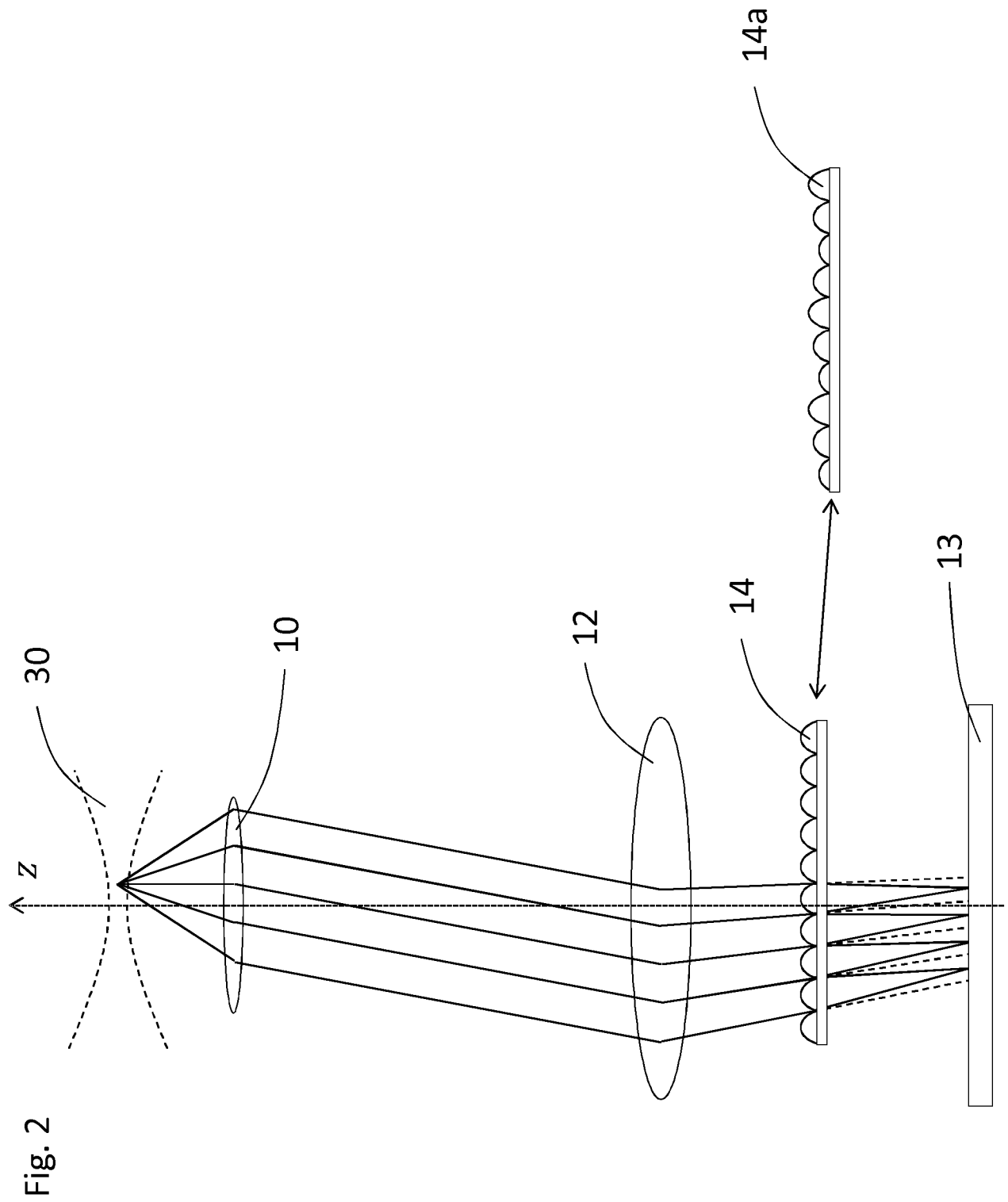
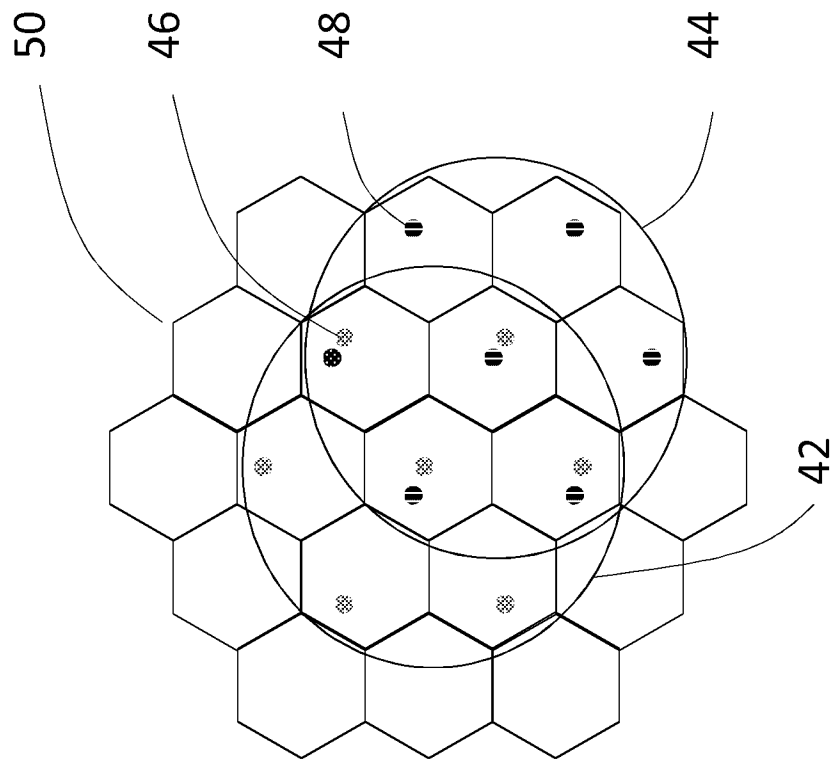


Fig. 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/060390

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. G02B21/00 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
 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	WO 2008/092074 A1 (ADOBE SYSTEMS INC [US]; GEORGIEV TODOR G [US]) 31 July 2008 (2008-07-31)	1,3,4,7,8,10-22
Y	the whole document	2,5,6
X	DE 10 2009 043744 A1 (ZEISS CARL MICROIMAGING GMBH [DE]) 31 March 2011 (2011-03-31) abstract; figures	1,3,4,9,15
X	WO 2016/020684 A1 (IMP INNOVATIONS LTD [GB]) 11 February 2016 (2016-02-11) abstract; figures	1-4,7,8,15
	----- -/--	

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Date of the actual completion of the international search 25 July 2017	Date of mailing of the international search report 02/08/2017
-------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------

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

International application No
PCT/EP2017/060390

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DE 10 2008 009216 A1 (ZEISS CARL MICROIMAGING GMBH [DE]) 20 August 2009 (2009-08-20) cited in the application the whole document	2,5,6
X,P	----- WO 2017/013054 A1 (LEICA MICROSYSTEMS [DE]) 26 January 2017 (2017-01-26) the whole document -----	1-5, 7-12,15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/060390

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008092074 A1	31-07-2008	CN 101646967 A US 2008180792 A1 WO 2008092074 A1	10-02-2010 31-07-2008 31-07-2008

DE 102009043744 A1	31-03-2011	DE 102009043744 A1 US 2012224034 A1 WO 2011038810 A1	31-03-2011 06-09-2012 07-04-2011

WO 2016020684 A1	11-02-2016	NONE	

DE 102008009216 A1	20-08-2009	DE 102008009216 A1 EP 2245494 A1 JP 5826494 B2 JP 6039760 B2 JP 2011511966 A JP 2015215629 A US 2011036996 A1 WO 2009100830 A1	20-08-2009 03-11-2010 02-12-2015 07-12-2016 14-04-2011 03-12-2015 17-02-2011 20-08-2009

WO 2017013054 A1	26-01-2017	NONE	

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. G02B21/00 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		
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	WO 2008/092074 A1 (ADOBE SYSTEMS INC [US]; GEORGIEV TODOR G [US]) 31. Juli 2008 (2008-07-31)	1,3,4,7, 8,10-22
Y	das ganze Dokument	2,5,6
X	DE 10 2009 043744 A1 (ZEISS CARL MICROIMAGING GMBH [DE]) 31. März 2011 (2011-03-31) Zusammenfassung; Abbildungen	1,3,4,9, 15
X	WO 2016/020684 A1 (IMP INNOVATIONS LTD [GB]) 11. Februar 2016 (2016-02-11) Zusammenfassung; Abbildungen	1-4,7,8, 15
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts	
25. Juli 2017	02/08/2017	
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	

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	DE 10 2008 009216 A1 (ZEISS CARL MICROIMAGING GMBH [DE]) 20. August 2009 (2009-08-20) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	2,5,6
X,P	----- WO 2017/013054 A1 (LEICA MICROSYSTEMS [DE]) 26. Januar 2017 (2017-01-26) das ganze Dokument -----	1-5, 7-12,15

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2017/060390

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2008092074 A1	31-07-2008	CN 101646967 A	10-02-2010
		US 2008180792 A1	31-07-2008
		WO 2008092074 A1	31-07-2008

DE 102009043744 A1	31-03-2011	DE 102009043744 A1	31-03-2011
		US 2012224034 A1	06-09-2012
		WO 2011038810 A1	07-04-2011

WO 2016020684 A1	11-02-2016	KEINE	

DE 102008009216 A1	20-08-2009	DE 102008009216 A1	20-08-2009
		EP 2245494 A1	03-11-2010
		JP 5826494 B2	02-12-2015
		JP 6039760 B2	07-12-2016
		JP 2011511966 A	14-04-2011
		JP 2015215629 A	03-12-2015
		US 2011036996 A1	17-02-2011
		WO 2009100830 A1	20-08-2009

WO 2017013054 A1	26-01-2017	KEINE	
