

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 912 386**

51 Int. Cl.:

G02B 21/36 (2006.01)

G02B 21/06 (2006.01)

G02B 21/24 (2006.01)

G02B 21/00 (2006.01)

G06T 7/00 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.10.2013 PCT/EP2013/071077**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.04.2014 WO14056992**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2013 E 13779171 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.02.2022 EP 2906984**

54 Título: **Microscopio y procedimiento para la microscopía SPIM**

30 Prioridad:

12.10.2012 DE 102012020240

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:

25.05.2022

73 Titular/es:

CARL ZEISS MICROSCOPY GMBH (100.0%)

Carl-Zeiss-Promenade 10

07745 Jena, DE

72 Inventor/es:

HILBERT, WIEBKE y

LIPPERT, HELMUT

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 912 386 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Microscopio y procedimiento para la microscopía SPIM

5 La invención se refiere a un microscopio que comprende un objetivo de reproducción para la reproducción de imágenes de una muestra en un detector, así como elementos para la iluminación de la muestra con una hoja de luz en el plano focal del objetivo de reproducción o en un plano definido en las proximidades de este plano focal. Los elementos para la iluminación comprenden una fuente de iluminación que emite preferiblemente una luz coherente.

10 Un microscopio en el que la trayectoria del haz de iluminación y la trayectoria del haz de detección están dispuestos fundamentalmente perpendiculares entre sí y en el que la muestra se ilumina con una hoja de luz en el plano focal del objetivo de reproducción, es decir, perpendicularmente a su eje óptico, está configurado para el examen de muestras según el procedimiento de microscopía de iluminación plana selectiva (SPIM). A diferencia de la microscopía confocal de barrido láser (LSM), en la que una muestra tridimensional se escanea punto por punto en planos individuales de profundidad variable y en la que la información de la imagen obtenida se monta posteriormente formando una imagen tridimensional de la muestra, la tecnología SPIM se basa en la microscopía de campo amplio y permite la

15 representación gráfica de la muestra a partir de secciones ópticas a través de los distintos planos de la muestra. Las ventajas de la tecnología SPIM incluyen, entre otros, una mayor velocidad de adquisición de la información de imagen, un menor riesgo de blanqueo de las muestras biológicas, así como una mayor profundidad de penetración del foco en la muestra.

20 En principio, en la tecnología SPIM, los fluoróforos contenidos en la muestra o introducidos en la misma se excitan con la luz láser que se forma en una así llamada hoja de luz. Con la hoja de luz se ilumina un plano seleccionado en la profundidad de la muestra y con la óptica de reproducción se obtiene una imagen de este plano de muestra en forma de una sección óptica. Fundamentalmente, el equivalente a una excitación como ésta con una hoja de luz estática es el movimiento rápido de un lado a otro de un fino rayo láser rotacionalmente simétrico en el plano focal del objetivo de reproducción. Efectivamente, es decir, como media temporal a lo largo del período de observación, también

25 resulta la forma de una hoja de luz SPIM. La tecnología SPIM se describe, por ejemplo, en Stelzer et al, Optics Letters 31, 1477 (2006), en Stelzer et al, Science 305, 1007 (2004), en el documento DE 102 57 423 A1 y en el documento WO2004/0530558 A1.

30 En la figura 1 se representa en primer lugar la estructura básica de un microscopio SPIM. La luz procedente de una fuente de iluminación 1 se convierte en una hoja de luz a través de una óptica de iluminación 2 y se dirige a una muestra 3. La muestra y la hoja de luz se encuentran en el plano focal de un objetivo de reproducción 4. El eje óptico del objetivo de reproducción 4 es perpendicular a la dirección desde la que se ilumina la muestra 3. La óptica de iluminación 2 comprende por regla general varios elementos ópticos que coliman la luz coherente de la fuente de iluminación 1, formando a partir de la misma una hoja de luz. En el estado de la técnica, la óptica de iluminación 2 también suele presentar una lente cilíndrica, cuyo lado plano está orientado hacia la muestra y cuyo lado abombado

35 está orientado en la dirección de la fuente de iluminación. Se representa esquemáticamente un portamuestras PH mediante el cual la muestra se mueve por motor en la dirección del eje óptico del objetivo 4, por ejemplo, se controla por medio de una unidad de control A.

40 La "microscopía de fluorescencia de lámina de luz" descrita (Light sheet microscopy) combina secciones ópticas con una detección de campo amplio a través de una cámara de resolución espacial (cámara CCD), iluminándose con una hoja de luz fina (figura 1) todo el plano focal lateral (plano xy) del objetivo de detección. La iluminación de hoja de luz se realiza perpendicularmente al eje de detección (eje z).

45 La muestra se coloca en la zona de superposición de la iluminación y la detección. Las señales de fluorescencia excitadas por la hoja de luz de iluminación se reproducen en la cámara por todo el campo de visión del objetivo de detección. Mediante la iluminación en ángulo recto con una hoja de luz fina, sólo se ilumina una pequeña parte de la extensión axial de la óptica de detección, generándose así una sección óptica. Para observar otra zona de la muestra, la muestra se mueve a través de la hoja de luz con una unidad de posicionamiento de muestra independientemente de la óptica. Gracias a la captura de secciones ópticas en diferentes posiciones de muestra a lo largo del eje de detección, es posible una toma de pilas de imágenes tridimensionales. Estas pilas de imágenes pueden reconstruirse a continuación en una imagen 3D.

50 Con esta finalidad es necesaria la captura de varias pilas de imágenes tridimensionales desde distintos ángulos. Una pila de imágenes comprende, por ejemplo, 200 imágenes. Se requieren al menos cuatro ángulos de irradiación diferentes para obtener una imagen tridimensional.

55 Para conseguir una buena calidad de imagen y un "seccionamiento" limpio, la superposición perfecta del plano de iluminación con el plano de detección es especialmente crítica. Debido a los cambios en las muestras y en los índices de refracción, ésta es siempre una tarea recurrente en el trabajo diario.

El movimiento relativo conocido de la hoja de luz hacia la muestra y el objetivo da lugar a que el plano z iluminado dentro de la muestra y, por consiguiente, el plano de muestra utilizado para la evaluación, varíe durante el ajuste. Si se aplica un procedimiento de ajuste de este tipo a una muestra real, el movimiento z da lugar a que la información en

las distintas imágenes de ajuste varíe de forma considerable, por lo que ya no es posible una evaluación de la imagen de ajuste. En menor medida, este problema también afecta a los procedimientos de ajuste con una muestra de referencia. Sin embargo, estas muestras son más homogéneas, por lo que rara vez llaman la atención. Un ajuste manual controlado por el usuario requiere mucho tiempo y mucha experiencia. Aquí, para facilitar la evaluación, el usuario suele concentrarse en zonas de imagen fuertemente estructuradas, cuyo contenido informativo, sin embargo, depende significativamente del plano z de la muestra. Si este plano z varía durante el proceso de ajuste, este cambio da lugar con frecuencia a una evaluación errónea.

El estado de la técnica se ilustra además en las solicitudes de patente DE 102007017598 A1 y DE 102007045897 A1. Los procedimientos de ajuste conocidos requieren, por una parte, que un objeto de referencia fluorescente (por ejemplo, perlas/fiduciales o un objeto fluorescente homogéneo) se posicione en lugar de la muestra o en la muestra. Estos objetos de referencia se iluminan con la hoja de luz plana y se busca el punto de ajuste óptimo por medio del contraste o de la PSF (por ejemplo, en el caso de las perlas). Por otra parte, en algunos procedimientos se prevé solicitar el objeto de referencia fluorescente mediante la luz de iluminación con una estructura de referencia. Esto se lleva a cabo, por ejemplo, mediante una rejilla en un plano conjugado con el plano del objeto o mediante una modulación de la hoja de luz escaneada.

Los procedimientos de ajuste por medio de una muestra de referencia requieren que la muestra de referencia sea completamente idéntica a la muestra real del usuario en todas las propiedades ópticas (índice de refracción, curvatura de la superficie, profundidad de penetración,...). Esto no es factible para el espectro existente de muestras predestinadas. En este sentido, estos procedimientos de ajuste aceptan desviaciones del ajuste óptimo. Los efectos ópticos debidos a las estructuras de muestras no homogéneas como, por ejemplo, las diferentes estructuras celulares, no pueden tenerse en cuenta en absoluto. Se producen efectos similares si, por ejemplo, la profundidad de penetración en el medio de muestra cambia significativamente durante la toma de una pila de imágenes.

El ajuste general de la hoja de luz según el estado de la técnica se describe, por ejemplo, en Greger et al. (Greger et al., Rev. Sci. Instr. 78, 023705, 2007) (sección II B.). En este caso se utiliza una montura cardán y un telescopio, a fin de mover exclusivamente la hoja de luz a lo largo de la dirección z de la óptica de detección con la ayuda de un movimiento angular. Esta orientación de la óptica de iluminación relativamente con respecto a la óptica de detección también corresponde al estado de la técnica más antiguo según Voie et al. (Journal of Microscopy 170, 229, 1992; sección "sistema de iluminación") o Santi et al. (BioTechniques 46, 287, 2009, Suppl. Mat.). En Krzic et al. (Nat Methods 9, 730, 2012, Suppl.) se describe el ajuste tridimensional de la hoja de luz para una hoja de luz de barrido con la ayuda de un rayo láser "aparcado" que ilumina una solución fluorescente. En este caso se aprovecha, entre otros, la cintura del rayo láser. También se describe el uso de la luz difusa. Aquí también se describe cómo se realiza el ajuste de la hoja de luz mediante el movimiento de la óptica de detección relativamente con respecto a la hoja de luz en una solución fluorescente o una muestra de referencia. En Keller et al. (Science 322, 1065, 2008, Supp) se describe un diseño con una óptica de detección móvil que, sin embargo, no se describe aquí en el sentido de un ajuste de la hoja de luz.

En el documento US 2011/0304723 A1 se describe un microscopio de hoja de luz con haces de Bessel.

En el documento WO 2008/125204 A1 se describe un procedimiento para el posicionamiento de la hoja de luz en relación con el plano focal en un microscopio.

Representación de la solución inventiva, así como ejemplos de realización

La invención se caracteriza por las características de las reivindicaciones independientes.

Un requisito previo ventajoso para un buen ajuste automatizado es la elección del criterio de evaluación correcto y la aplicabilidad a la muestra real en lugar de una estructura de referencia.

Por el estado de la técnica no se conoce ningún procedimiento en el que la muestra a examinar se utilice directamente en el ajuste de la hoja de luz, moviéndose la misma junto con la hoja de luz relativamente con respecto al objetivo o al plano de detección.

La invención se refiere especialmente a un movimiento, preferiblemente acoplado a través de una unidad de control, de la hoja de luz y de la muestra relativamente con respecto al plano focal predeterminado de la unidad de detección.

A la inversa, el objetivo de detección también puede naturalmente moverse solo o todos los elementos pueden moverse de forma coordinada entre sí por medio de una unidad de control común, a fin de lograr el efecto inventivo. Si la muestra se mueve después o simultáneamente a un ajuste de la hoja de luz, el plano de muestra observado y, por lo tanto, el contenido básico de la imagen sigue siendo idénticos. Las diferencias en la imagen sólo se deben a la posición de ajuste. Para poder realizar un movimiento correctamente acoplado, resulta ventajoso ajustar con anterioridad los dos movimientos individuales entre sí con suficiente precisión mediante una calibración.

Además, en relación con los procedimientos descritos a continuación es posible y resulta ventajoso determinar de antemano las estructuras de la muestra a utilizar para el ajuste con la ayuda de otro procedimiento de contraste y, a continuación, alinear la muestra relativamente con respecto a la detección.

En la figura 2 se representa la estructura básica de un microscopio SPIM para la realización del procedimiento inventivo.

Una muestra P, que puede encontrarse en una cámara de muestras PK, disponiéndose la muestra o la cámara de muestras de forma ajustable en la dirección de un eje Z y también de forma giratoria alrededor del eje óptico del objetivo de detección, es detectada por una trayectoria del haz de detección que se compone de un objetivo de detección O verticalmente ajustable, cuyo eje de detección o eje óptico se desarrolla en la dirección Z, al que se conectan en la dirección de detección un filtro de luz F preferiblemente intercambiable, una lente tubular TL y un receptor de superficie CCD.

Fundamentalmente perpendicular al eje de detección Z, aquí en la dirección X, se encuentra una trayectoria del haz de iluminación, compuesta en este caso por dos láseres L1, L2 acoplados a través de divisores de haz BS que a través de un AOTF para la selección de la longitud de onda y el ajuste de la intensidad, de un espejo de desviación S y de un expansor de haz BE, así como de una óptica anamórfica, como en este caso una lente cilíndrica ZL para la conformación del haz, generan la distribución de luz plana que atraviesa la muestra.

Se representa esquemáticamente una unidad de ajuste BLjust que puede, por ejemplo, ajustar o inclinar los elementos S, BE y ZL en varias direcciones. Preferiblemente tiene lugar un ajuste Z de la iluminación, representado por la flecha vertical, y un giro de la unidad de iluminación alrededor del eje Z, así como una inclinación, aquí por ejemplo alrededor del eje Y, pudiendo encontrarse el punto de giro de la inclinación también en la muestra, por ejemplo, en el eje óptico OA del objetivo de detección, como consecuencia de un ajuste Z acoplado y de un giro alrededor del eje de espejo.

Una unidad de control y de mando común CU, formada generalmente por un ordenador y una unidad de visualización ("display"), está conectada a todos los dispositivos de ajuste como el AOTF, el ajuste de la cámara de muestras PK y el ajuste de la iluminación BLJust para poder llevar a cabo el procedimiento según la invención.

En la figura 3-6 se representa a modo de sección de la figura 2:

O: Objetivo de detección

P: Como muestra, un tejido con núcleos celulares marcados para los planos de muestra a modo de ejemplo

K: Imagen de cámara de la muestra con núcleos celulares

LB: Rango de iluminación de la hoja de luz (por ejemplo, haz gaussiano)

OA: Eje óptico de la iluminación (punteado)

FE: Plano focal de la óptica de detección

La figura 3a, b muestra en 3a) el estado inicial de una hoja de luz desenfocada y en 3b) el estado ajustado mediante el desplazamiento de la hoja de luz. Se puede ver claramente que en 3a y 3b, el objetivo O reproduce diferentes zonas de muestra P1, P2.

Gracias a la invención se garantiza que el estado en 3b se asegura del mismo modo para cada plano de muestra atravesado, a fin de realizar una sección de muestra perfecta.

Independientemente de la invención, se proponen los siguientes procedimientos a modo de ejemplo:

Procedimiento 1:

Cuando el usuario enfoca nítidamente la muestra mediante el movimiento de la muestra o del portamuestras en la dirección del eje de detección del objetivo (eje Z), las diferencias realmente existentes en el índice de refracción de la muestra o los saltos del índice de refracción pueden provocar que la hoja de luz ya no se sitúe exactamente en el plano focal del objetivo de detección.

Por este motivo, en un paso de calibración antes de la medición real de la muestra, se registra una tabla de calibración que realiza un ajuste Z para la muestra realmente utilizada, en la que se registra la posición real de la hoja de luz en dependencia de la posición vertical de la muestra (y, por lo tanto, en dependencia del índice de refracción de la muestra).

A estos efectos se detecta y almacena la posición de altura respectiva de la hoja de luz junto con su posición en sus elementos de ajuste para diferentes zonas de muestra observadas nítidamente, es decir, enfocadas, de una muestra real.

El registro de la posición de la hoja de luz tiene lugar, por ejemplo, como sigue:

Se produce un ajuste Z de la muestra y las respectivas posiciones Z forman un valor de memoria con $Z_1 - Z_i$ ($i=1-n$).

Para cada Z_1-Z_i , la hoja de luz se ajusta respectivamente al menos de forma vertical, con preferencia también se inclina antes o después (mediante la unidad de control Cu en la figura 2, por ejemplo).

El ajuste y/o la inclinación se llevan a cabo preferiblemente en torno al respectivo valor Z_i .

Por medio de la determinación de la nitidez o del análisis del contraste por parte del CCD en la figura 2 (también concebible visualmente por el observador) y de la unidad de evaluación CU, el valor de la nitidez más alta/de un contraste óptimo con los valores correspondientes de la unidad de ajuste BLJust en la figura 2 a través de Cu,

asignados al valor respectivo Z_i , se almacena (en la tabla de calibración) o la posición de la hoja de luz ajustada también se utiliza directamente para una medición.

A continuación, si el usuario observa un plano Z determinado en la muestra o si éste se detecta, esta determinación de la posición de la hoja de luz en relación con los valores Z_i se utiliza para realizar una corrección correspondiente, es decir, para ajustar la posición real de la hoja de luz exactamente para este plano de muestra enfocado, de manera que la hoja de luz real se encuentre siempre en el plano focal realmente observado o detectado, a pesar de las fluctuaciones mencionadas del índice de refracción.

Procedimiento 2:

Durante el ajuste de la muestra en un nuevo plano Z, simultáneamente o inmediatamente a continuación, la hoja de luz se mueve en relación con la muestra (por ejemplo, bajo la determinación del contraste óptimo), al menos en la dirección Z, preferiblemente también inclinada alrededor de un eje de giro, por ejemplo, en el centro del plano focal del objetivo de detección.

Por ejemplo, una superficie o superficie límite curvada en la muestra puede dar lugar, como consecuencia de su desarrollo de índice de refracción, a que la hoja de luz se "doble" desde una posición horizontal a una posición inclinada.

Este doblado se compensa ventajosamente mediante el procedimiento.

Dicha operación puede llevarse a cabo visual o automáticamente (de forma análoga a los procedimientos de autoenfoco que funcionan con un ajuste de contraste).

La combinación de los movimientos de la muestra en la dirección Z y el ajuste de la hoja de luz, así como la evaluación del contraste de muestra, se realizan preferiblemente en la unidad de control y cálculo XX.

Ventajosamente, los procedimientos 1 y 2 también pueden aplicarse de forma enlazada.

En la figura 4-6 se representa qué efectos causados por las propiedades ópticas de la muestra pueden ocurrir, por ejemplo, durante la mencionada toma de una pila de imágenes. Con esta finalidad se representan tres posiciones de la muestra P relativamente con respecto al objetivo de detección O. En la representación se ha omitido cualquier equipo adicional, como una cámara de muestras con medio de inmersión. En el caso de la muestra puede tratarse, por ejemplo, de una sección de tejido celular en la que los núcleos celulares se hacen visibles mediante un marcador fluorescente.

En la posición según 4a) y b), la zona de la iluminación de la hoja de luz se solapa completamente con el plano focal del objetivo de detección, de manera que los núcleos celulares ZK situados en el plano focal de la óptica de detección O se registren en la imagen de cámara K con aproximadamente el mismo contraste.

En la posición según 5a) y b) se producen ahora dos efectos como consecuencia de la modificación de la longitud de trayectoria óptica provocada por la diferente posición de muestra: por una parte, el plano focal FE de la detección se desplaza en la dirección z con respecto al eje óptico nominal de la iluminación LB. Los núcleos celulares que se encuentran en el plano focal ya no pueden representarse con todo el contraste debido a la reducción del solapamiento con la iluminación de la hoja de luz. Además, en la iluminación también puede producirse un desplazamiento del foco a lo largo de la dirección x, por lo que también existe una inhomogeneidad correspondiente de la imagen debido a la distribución no homogénea de la intensidad en el haz de iluminación.

En la posición según la figura 6a) y b), además de un desplazamiento de enfoque ampliado en la detección, también se produce una inclinación de la hoja de luz, dado que el haz de iluminación en la superficie de muestra se desvía de forma correspondiente como consecuencia de un salto del índice de refracción.

Los efectos descritos se representan a modo de ejemplo. Naturalmente la situación en un caso normal es aún más compleja, ya que, en ocasiones, la muestra se caracteriza por una permitividad complicada y no homogénea, lo que también puede manifestarse, por ejemplo, en la aparición de varias superficies límite ópticas dentro del volumen de la muestra.

Por el estado de la técnica no se conocen procedimientos que compensen directamente los artefactos de este tipo como los procedimientos antes descritos.

Otras configuraciones

[A]

El movimiento acoplado de la hoja de luz y la muestra relativamente entre sí simplifica en gran medida el procedimiento de ajuste manual. Por regla general, en este procedimiento el usuario evalúa visualmente la calidad de la imagen. Dado que ahora puede concentrarse en la información de imagen en un plano de muestra que se mantiene estacionario, el procedimiento de ajuste se vuelve más intuitivo y orientado al objetivo. Los problemas antes descritos ya no se producen.

[B]

Un segundo aspecto parcial consiste en que con la ayuda del movimiento acoplado es posible un ajuste automático de la hoja de luz en muestras reales. Ya no es necesaria la ayuda de una muestra de referencia, ya sea en forma de una muestra homogéneamente fluorescente o de objetos de referencia determinados como, por ejemplo, las perlas.

- 5 Dado que el movimiento de ajuste acoplado utiliza siempre el mismo plano de muestra para la evaluación, la información de imagen generalmente disponible es irrelevante. En la evaluación del contraste, de la profundidad de modulación o de la PSF, el movimiento acoplado resulta ventajoso para todos los procedimientos de ajuste automáticos, ya sea usando una hoja de luz plana o estructurada.

[C]

- 10 Los métodos de microscopía de hoja de luz se basan en el hecho de que mediante un movimiento relativo de la muestra y del plano focal de la detección se toma una pila de imágenes (pila z). Debido a las inhomogeneidades de la muestra o también a la profundidad de penetración en el medio de muestra, la posición de ajuste óptima de la hoja de luz depende del plano z. La ventaja de la invención consiste en que las inhomogeneidades específicas del objeto de los diferentes planos de muestra, que requieren otra posición de ajuste óptima en función del plano, pueden calibrarse gracias al movimiento acoplado y, por consiguiente, gracias a la aplicabilidad de los procedimientos de ajuste a todas las muestras (especialmente a las muestras reales). Un procedimiento según la invención se desarrolla, por ejemplo, de la siguiente manera:

1. Para un subconjunto de planos z (= planos de muestra) se determina la posición de ajuste óptima por medio del algoritmo de evaluación preferible dentro de la muestra real.
- 20 2. La posición de ajuste óptima para los planos z entre estos planos de apoyo se interpola mediante una función adecuada (polinómica, spline, ...).
3. Mientras se toma la pila z, se establece la posición de ajuste óptima específica de la hoja de luz para cada plano z. Esto también corresponde a un movimiento acoplado, por ejemplo, de la muestra y de la hoja de luz. Esta operación también puede incluir especialmente un ajuste angular (véase > Figura 6).
- 25 4. Gracias a la posición de ajuste óptima para cada plano de imagen se obtiene una pila z con una calidad de imagen óptima.
5. Las posibles distorsiones en la imagen global en 3D de la muestra provocadas por el seguimiento de la hoja de luz pueden corregirse adicionalmente mediante cálculo.

[D]

- 30 Los métodos de la microscopía de hoja de luz se basan además en el hecho de que mediante un giro relativo de la muestra con respecto a la dirección de detección y de iluminación y mediante la posterior toma de varias pilas z desde diferentes ángulos (=vistas) es posible la reconstrucción de una imagen 3D. Para conseguir un resultado de imagen óptimo, también es importante aquí establecer para cada dirección de iluminación la posición de ajuste óptima de la hoja de luz, dado que la profundidad de penetración y las propiedades ópticas de la muestra son diferentes en cada dirección de iluminación. Esto sólo es posible mediante un movimiento simultáneo o sucesivo de la muestra y de la hoja de luz.

[E]

Se obtiene un resultado de imagen aún mejor si se combinan el aspecto parcial [B], el aspecto parcial [C] y el aspecto parcial [D].

- 40 [F]

En caso de una pila z y/o de una imagen multivisión, el movimiento de la muestra también puede dar lugar a un cambio en la desviación del enfoque en la dirección de iluminación relativamente con respecto al campo de la imagen. Por consiguiente, puede resultar ventajoso un seguimiento correspondiente de la posición de la hoja de luz en la dirección x. Naturalmente, éste puede acoplarse al movimiento descrito en la dirección z.

45

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la microscopía SPIM con un microscopio con

- 5 - un dispositivo de iluminación que comprende una fuente de luz de iluminación (L1, L2) y una trayectoria del haz de iluminación para la iluminación de una muestra (P) con una hoja de luz (LB),
- un dispositivo de detección para la detección de la luz emitida por la muestra con un objetivo (O),
10 - siendo la hoja de luz (LB) en el foco (FE) del objetivo (O) o en un plano definido en las proximidades del foco (FE) del objetivo de reproducción (O) fundamentalmente plana y presentando el objetivo (O) un eje óptico que corta el plano de la hoja de luz (LB) en un ángulo distinto de cero, preferiblemente de forma perpendicular, y previéndose elementos de ajuste para el ajuste de la trayectoria del haz de iluminación al menos a lo largo del eje óptico del objetivo de detección (O),
15 realizándose un movimiento relativo de la muestra (P) y del plano focal (FE) de la detección en la dirección del eje óptico del objetivo (O) para el registro de diferentes planos de muestra a través de la hoja de luz (LB) y tomándose una pila de imágenes, caracterizado por que
20 - en un primer paso se lleva a cabo una calibración por medio de la muestra (P), detectándose como planos de apoyo en los distintos planos de muestra la posición real de la hoja de luz (LB) en dependencia de la posición de la muestra (P) y determinándose una posición de ajuste respectiva de la hoja de luz, y
25 - en un segundo paso, durante el ajuste relativo de la muestra en un nuevo plano Z, se lleva a cabo simultánea o posteriormente un ajuste de la posición de la hoja de luz (LB) con respecto al plano focal (FE) del objetivo de detección (O) mediante el movimiento de la hoja de luz (LB) con respecto a la muestra (P) al menos en la dirección Z, interpolándose la posición de ajuste específica por medio de una función para los planos de muestra entre los planos de apoyo.
30 2. Procedimiento según la reivindicación 1, realizándose durante el movimiento relativo de la hoja de luz (LB) con respecto a la muestra (P) una detección y una evaluación del contraste de la muestra.
35 3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 2, realizándose el movimiento relativo de la hoja de luz (LB) con respecto a la muestra (P) hasta alcanzar un contraste de imagen máximo o un contraste de imagen optimizado sobre la base de criterios.
40 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, llevándose a cabo un movimiento relativo de la hoja de luz (LB) alrededor de una posición de enfoque vertical ajustada (FE) del objetivo de detección (O), a fin de ajustar el contraste máximo u óptimo.
5. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones anteriores, realizándose el acoplamiento del movimiento de la hoja de luz (LB) relativamente con respecto a la muestra (P) a través de una unidad de control (CU) conectada a los elementos de ajuste para la iluminación.
45 6. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones anteriores, llevándose a cabo una inclinación de la trayectoria del haz de iluminación alrededor de al menos un eje, preferiblemente alrededor de un eje de inclinación situado en el eje óptico del objetivo (O).
50 7. Microscopio diseñado para la realización del procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores.
8. Microscopio según la reivindicación 7, siendo posible ajustar el objetivo en la dirección de su eje óptico.
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, siendo posible ajustar el objetivo (O) en la dirección de su eje óptico.
55

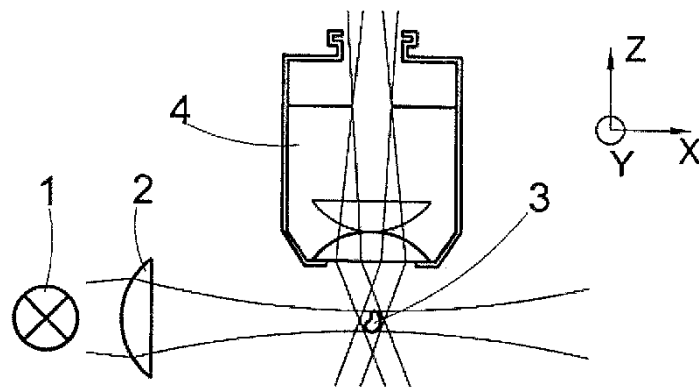


Fig.1

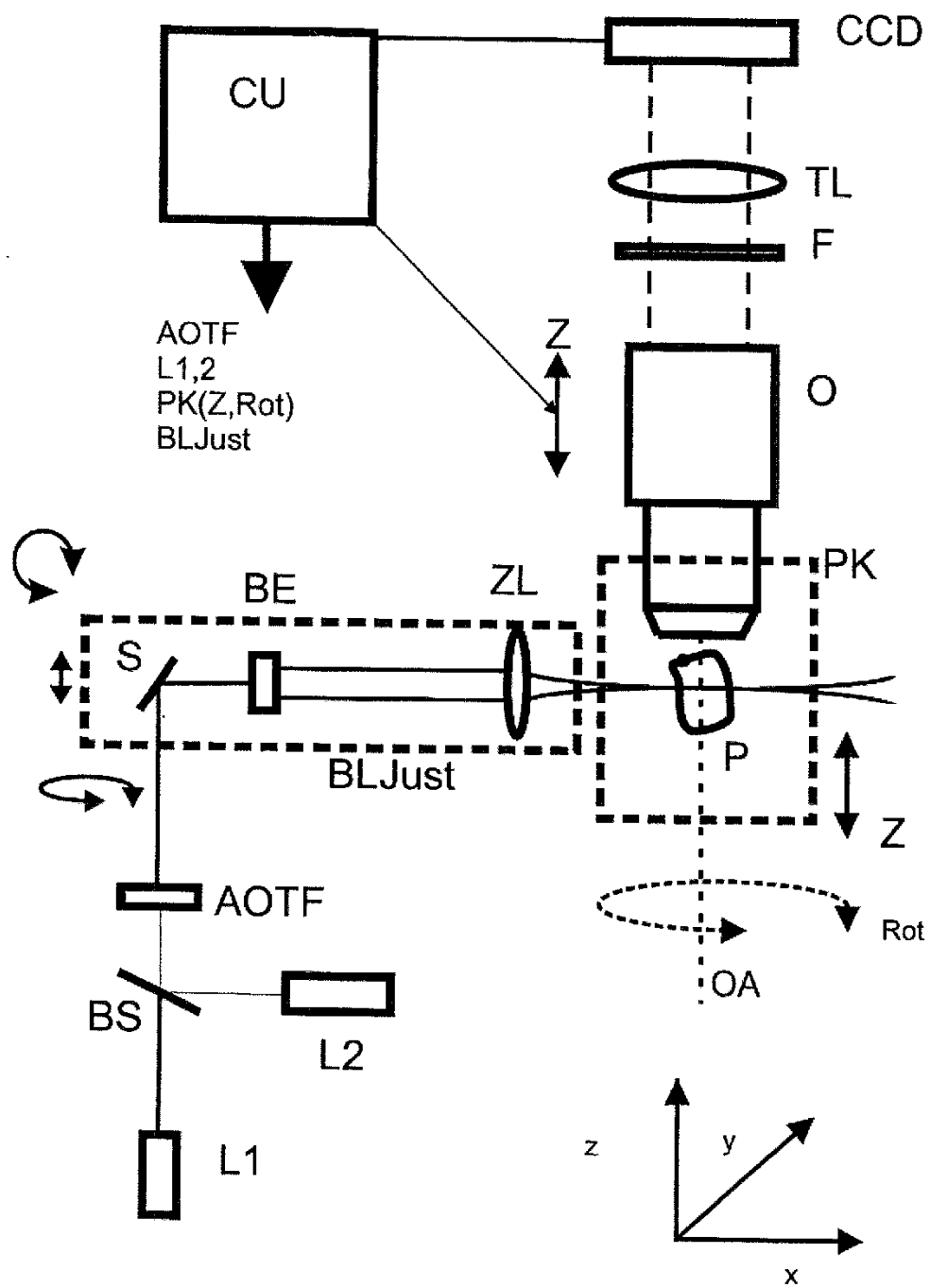


Fig.2

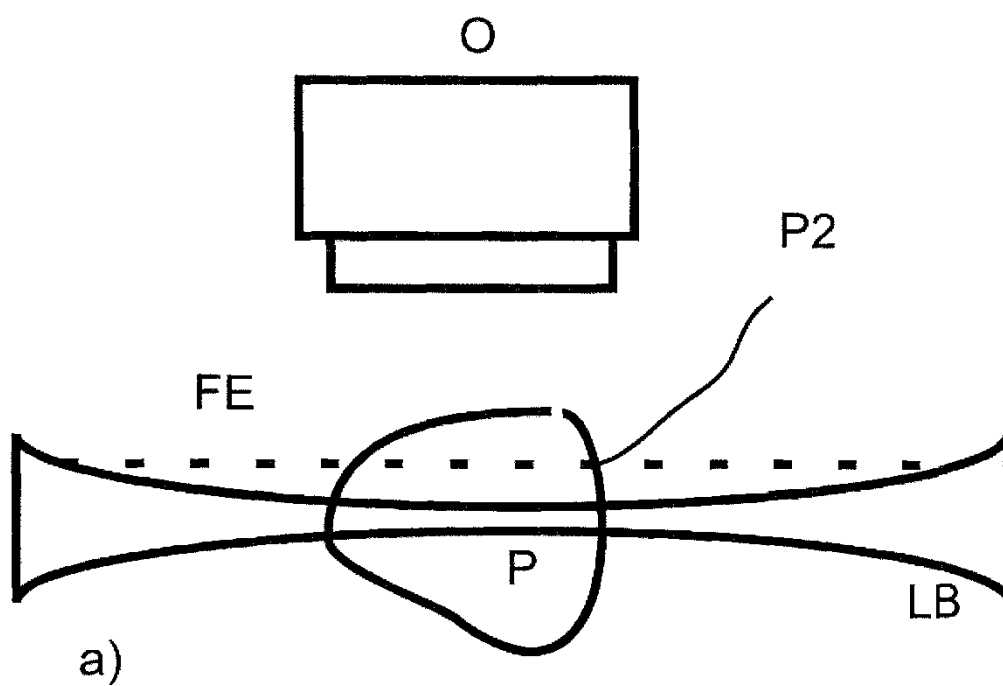


Fig.3

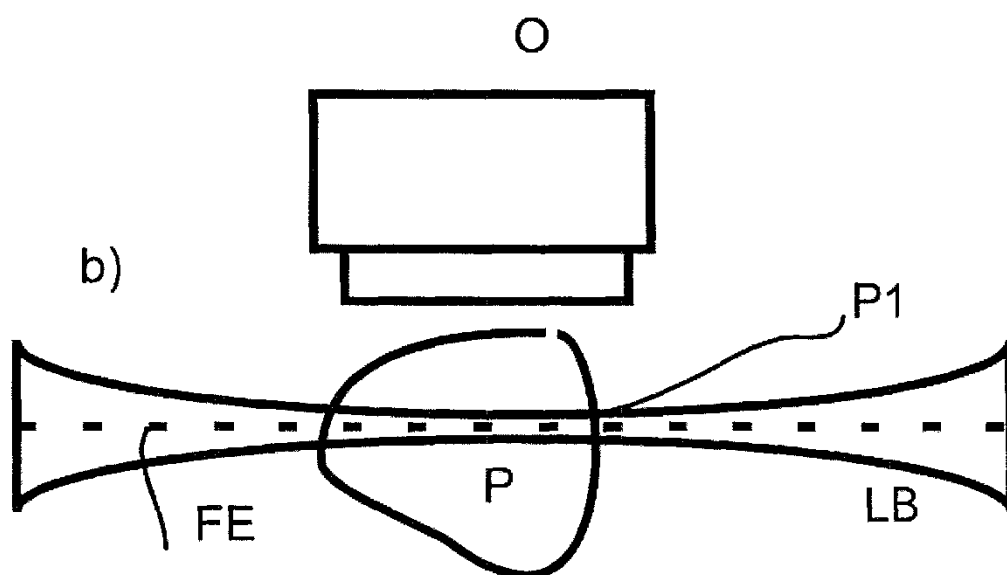


Fig.4

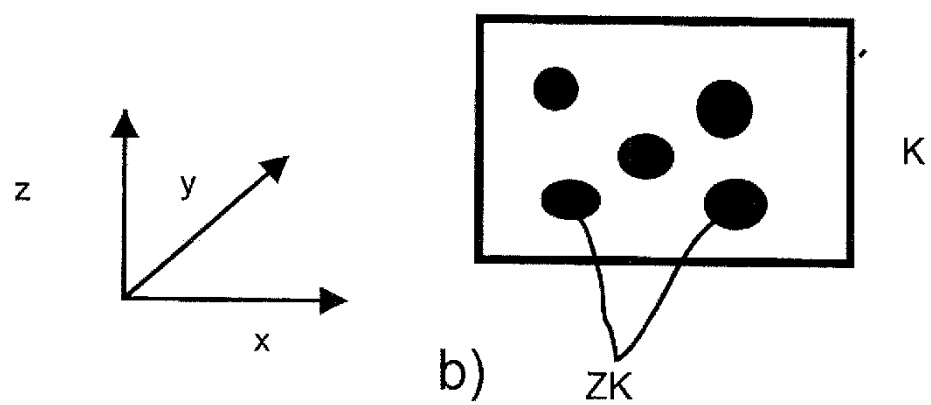
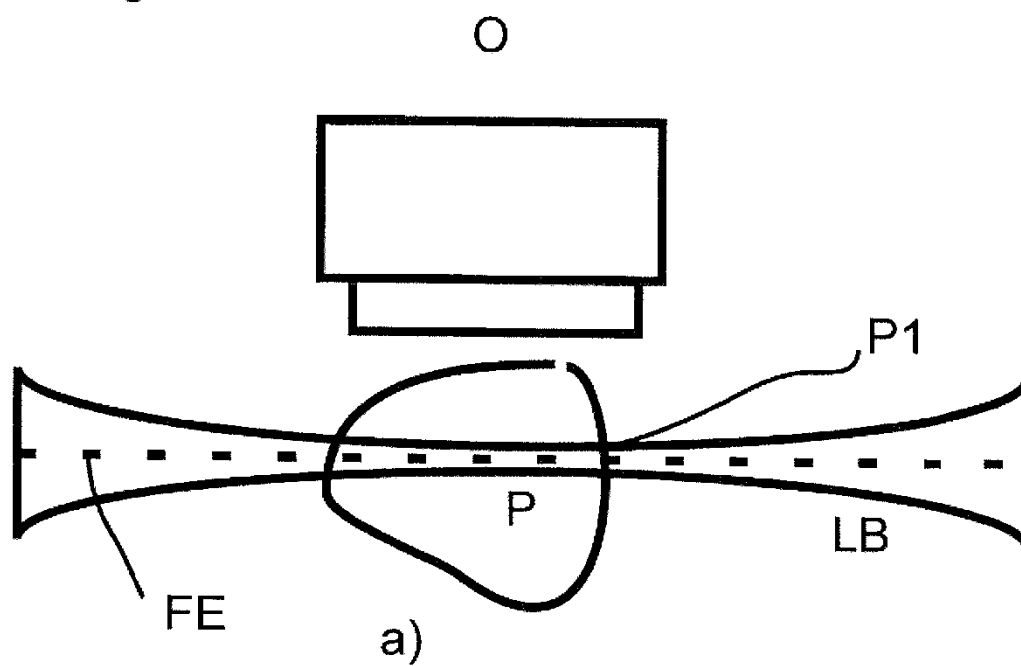


Fig.5

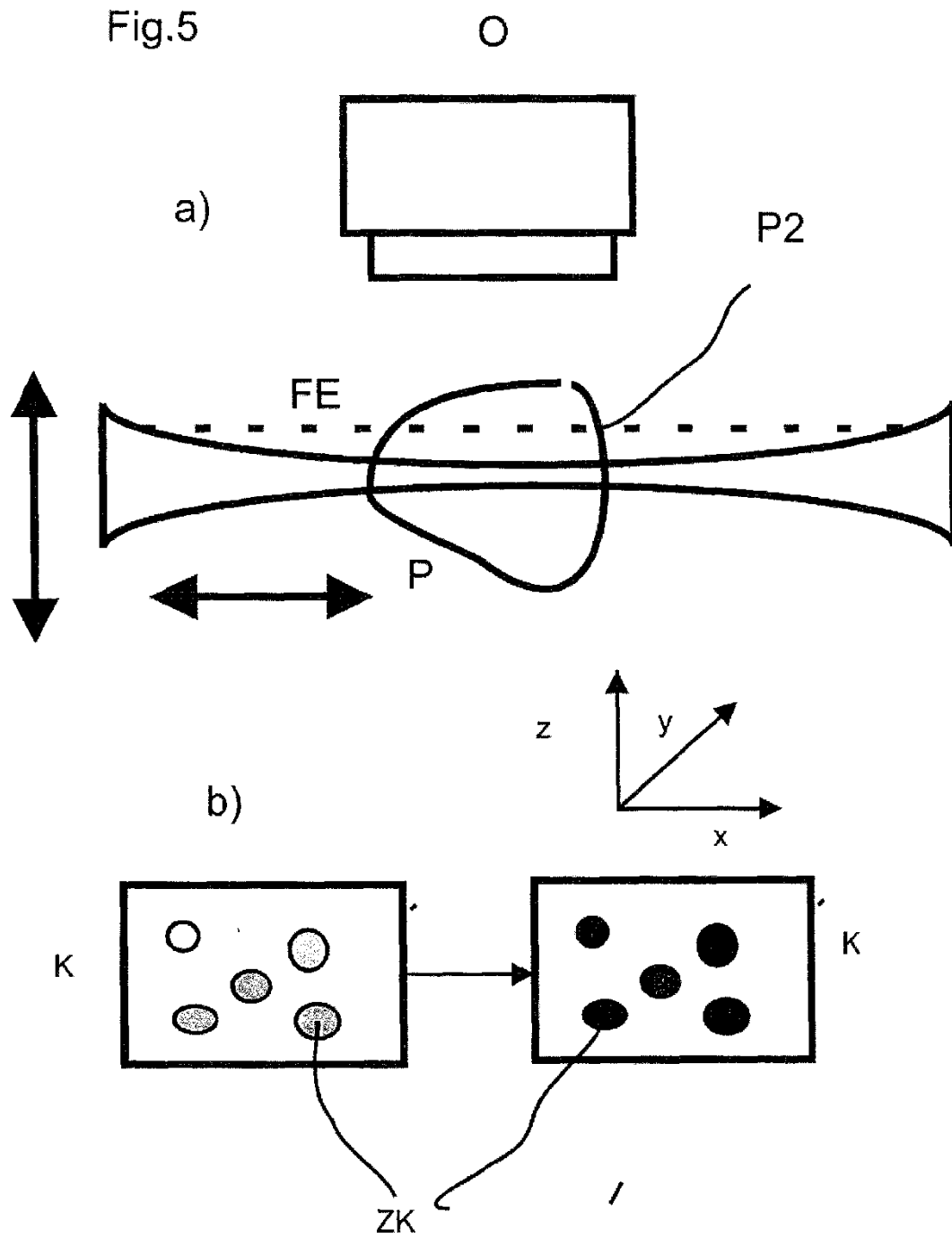
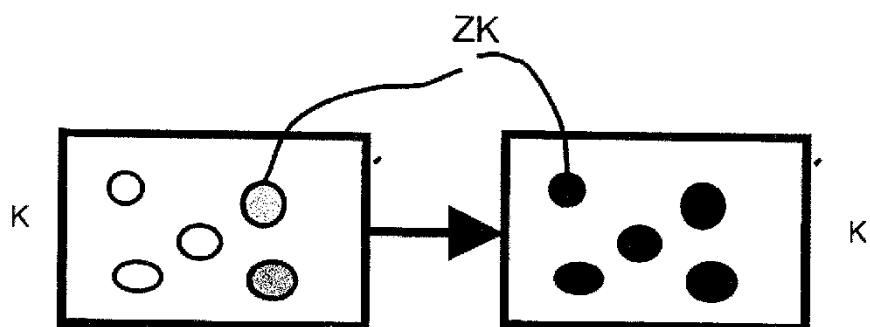
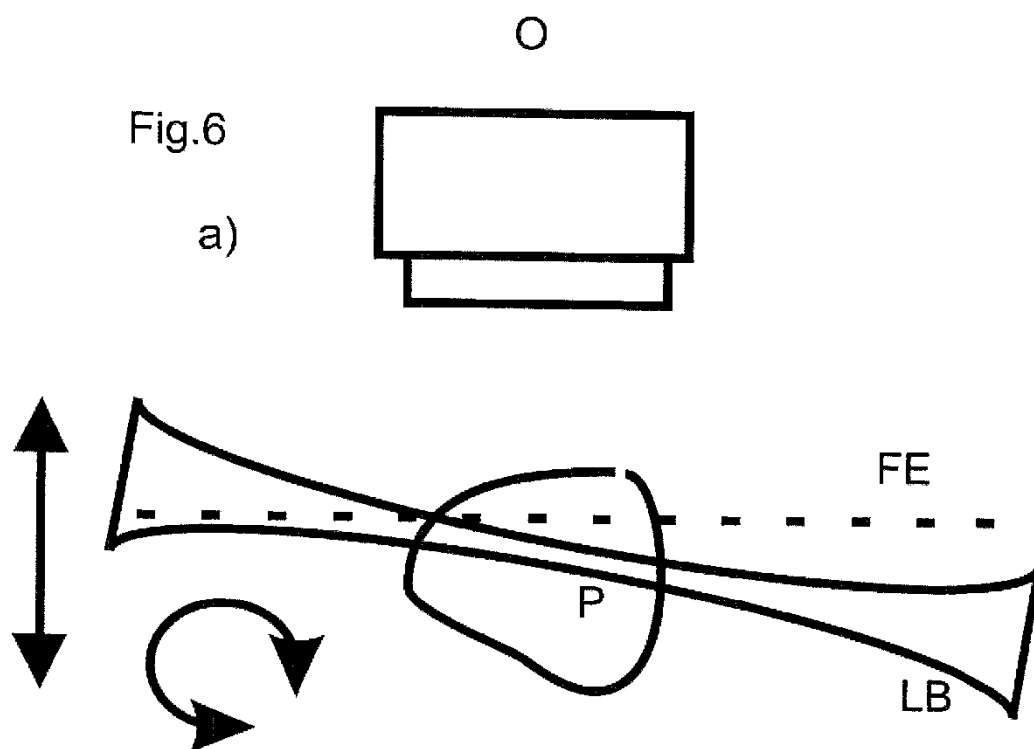


Fig.6

a)



b)

