



(10) **DE 10 2014 118 025 B4 2024.03.28**

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2014 118 025.9**

(22) Anmeldetag: **05.12.2014**

(43) Offenlegungstag: **09.06.2016**

(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: **28.03.2024**

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

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

(73) Patentinhaber:

Carl Zeiss Microscopy GmbH, 07745 Jena, DE

(74) Vertreter:

Schiffer, Axel, Dipl.-Phys.Univ. Dr.rer.nat., 80335 München, DE

(72) Erfinder:

Ritter, Jörg, Dr., 07749 Jena, DE

(56) Ermittelter Stand der Technik:

DE 10 2011 051 042 A1

DE 10 2012 218 920 A1

US 2011 / 0 115 895 A1

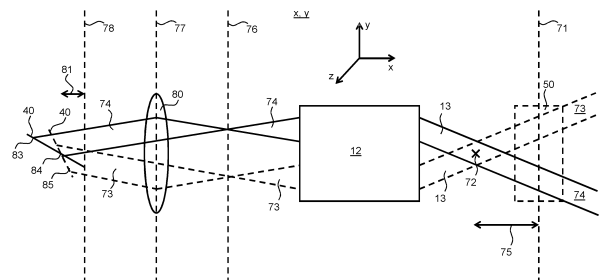
HUISKEN, J. ; STAINIER, Y. R.: Even fluorescence excitation by multidirectional selective plane illumination microscopy (mSPIM). In: Opt. Lett., Vol. 32, 2007, Nr. 17, S. 2608-2610. - ISSN 0146-9592

(54) Bezeichnung: **Vorrichtung zur Lichtblattmikroskopie**

(57) Hauptanspruch: Vorrichtung zur Lichtblattmikroskopie mit einem Beleuchtungsstrahlengang (10) mit optischen Mitteln (12) zum Leiten eines Anregungslichtbündels (13) in einer Strahlrichtung (16) in einen flächigen Bereich (18) in einer Probenebene (19) einer zu untersuchenden Probe (20),

mit einem Detektionsstrahlengang (30) mit optischen Mitteln (32) zum Aufnehmen von Detektionslicht (38), welches in einer Detektionsrichtung (39) von der Probe (20), insbesondere aus dem flächigen Bereich (18), abgestrahlt wird, wobei die Detektionsrichtung (39) quer zu der Probenebene (19) ausgerichtet ist,

dadurch gekennzeichnet, dass in dem Beleuchtungsstrahlengang (10) ein schwenkbarer Spiegel (40) vorhanden ist, dergestalt, dass durch ein Betätigen dieses schwenkbaren Spiegels (40) gleichzeitig sowohl eine Verkipfung des Anregungslichtbündels (13) in der Probenebene (19) als auch eine Verschiebung des Anregungslichtbündels (13) in der Probenebene (19) in einer Richtung (y) quer, insbesondere senkrecht, zur Strahlrichtung (16) bewirkbar ist.



Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Lichtblattmikroskopie nach dem Oberbegriff des Anspruchs 1.

[0002] Eine gattungsgemäße Vorrichtung weist einen Beleuchtungsstrahlengang mit optischen Mitteln zum Leiten eines Anregungslichtbündels in einer Strahlrichtung in einem flächigen Bereich in einer Probenebene einer zu untersuchenden Probe auf. Außerdem ist ein Detektionsstrahlengang vorhanden mit optischen Mitteln zum Aufnehmen von Detektionslicht, welches in einer Detektionsrichtung von der Probe, insbesondere aus dem flächigen Bereich, abgestrahlt wird. Die Detektionsrichtung ist dabei quer, insbesondere senkrecht zur Probenebene ausgerichtet.

[0003] Die Lichtblattmikroskopie (light sheet microscopy) kombiniert optische Schnitte mit einer Weitfeld-detektion, indem eine, insbesondere komplette, laterale Brennebene, beispielsweise die x-y-Ebene, eines Detektionsobjektivs mit einem dünnen Lichtblatt beleuchtet wird. Bei dem dünnen Lichtblatt handelt es sich um einen flachen oder flächigen mit Anregungslicht beleuchteten Bereich in einer Probenebene einer zu untersuchenden Probe. Die Lichtblattbeleuchtung erfolgt besonders bevorzugt rechtwinklig zur Detektionsachse oder Detektionsrichtung, beispielsweise der z-Achse. Die Probe wird in einem überlappenden Bereich von Beleuchtung und Detektion platziert. Fluoreszenzsignale können über das gesamte Gesichtsfeld des Detektionsobjektivs auf eine Kamera abgebildet werden.

[0004] Die grundlegende Situation wird mit Bezug auf **Fig. 1** im Einzelnen erläutert. Dargestellt ist dort in schematischer Form eine Vorrichtung zur Lichtblattmikroskopie 100 nach dem Stand der Technik. Als wesentliche Komponenten weist diese Vorrichtung 100 einen Beleuchtungsstrahlengang 10 und einen Detektionsstrahlengang 30 auf. Der Beleuchtungsstrahlengang dient zum Leiten eines Anregungslichtbündels 13 in einer Strahlrichtung 16 in einen flächigen Bereich 18, der auch als Lichtblatt oder dünnes Lichtblatt bezeichnet werden kann, in einer Probenebene 19 einer zu untersuchenden Probe 20. Das Anregungslicht des Anregungslichtbündels 13 wird von einer Lichtquelle 14 geliefert und in einem ersten Teil des Strahlengangs 15 über nicht im Einzelnen gezeigte optische Mittel bis zu einem Beleuchtungsobjektiv 12 geleitet, bei dem es sich um ein grundsätzlich bekanntes Mikroskopobjektiv handeln kann. Das Anregungslichtbündel weist in z-Richtung eine vergleichsweise geringe, insbesondere beugungsbegrenzte, Dicke auf, die in **Fig. 1** durch die Pfeile 21 schematisch dargestellt ist. Vergleichsweise viel größer ist die Ausdehnung des

Lichtbündels 13 in y-Richtung, wie dies in **Fig. 2** schematisch dargestellt ist.

[0005] **Fig. 2** zeigt eine Draufsicht auf das Anregungslichtbündel entlang der in **Fig. 1** eingetragenen Richtung A-A. Die Ausdehnung des Anregungslichtbündels 13 in y-Richtung ist in **Fig. 2** mit dem Pfeil 55 gekennzeichnet. Diese Ausdehnung ist viel größer als die Dicke des Anregungslichtbündels in z-Richtung (Pfeile 21 in **Fig. 1**), weshalb, in diesem Sinn, das Anregungslichtbündel 13 auch als, insbesondere dünnes, Lichtblatt bezeichnet wird. Durch die Strecken 51, 52, 53, 54 ist in dem in **Fig. 2** schematisch dargestellten Beispiel ein Gesichtsfeld 50 des Detektionsstrahlengangs 30 begrenzt. Dieses Gesichtsfeld (Field of View) kann auch in y-Richtung eine größere Ausdehnung aufweisen, wir kommen hierauf später noch zurück.

[0006] Von der Probe 20 in eine Richtung 39 ausgesandtes Detektionslicht 38 kann bei der in **Fig. 1** schematisch dargestellten Vorrichtung 100 mit Hilfe eines Detektionsstrahlengangs 30 aufgenommen und schließlich einer Auswertung zugeführt werden. Hierzu weist der Detektionsstrahlengang 30 ein Detektionsobjektiv 32 grundsätzlich bekannter Art auf, mit welchem das Detektionslicht 38 aufgenommen wird. Das Detektionslicht kann sodann über weitere optische Komponenten, die nicht im Einzelnen dargestellt sind und durch die Pfeile 33 repräsentiert werden, im gezeigten Beispiel einer Kamera 34 zugeführt werden. Diese Kamera 34 kann mit einer Steuer- und Auswerteeinrichtung 36, bei der es sich beispielsweise um eine Recheneinrichtung handeln kann, verbunden sein (angedeutet durch den Pfeil 35). Mit Hilfe dieses Rechners wird die Vorrichtung 100 angesteuert und die von der Kamera 34 gelieferten Daten über das nachgewiesene Detektionslicht 38 werden dort ausgewertet.

[0007] Wir gehen nun auf zwei spezifische Probleme der Lichtblattmikroskopie ein. Lichtmikroskope leiden grundsätzlich unter Bildartefakten, die durch die Wechselwirkung von Licht mit dem Proben-gewebe verursacht werden (bei biologischen Proben). Durch die seitliche Beleuchtung der Probe ist dieses Problem bei der Lichtblattmikroskopie besonders ausgeprägt. Das Anregungslicht des Anregungslichtbündels 13 wird bei seiner Ausbreitung durch die Probe 20 von optisch dichteren Gewebestellen teilweise absorbiert oder gestreut. Es kommt dadurch zu einer Abschwächung des Anregungslichts 13, was zu einem Verlust von Fluoreszenzsignal tiefer im Probeninneren der Probe 20 führt. Im Ergebnis führt dies zu Streifen und Schatten im Bild und letzten Endes zu einem Verlust an Bildqualität.

[0008] Schematisch ist das in **Fig. 2** gezeigt. Wegen des in **Fig. 2** von links in der Strahlrichtung 16 kommenden Anregungslichts 13 kann es dazu kommen,

dass Probenbereiche, die hinter einer optisch dichteren Gewebestelle liegen, nicht mehr oder viel weniger mit Anregungslicht beaufschlagt werden. Schematisch ist das in **Fig. 2** durch die Probenstrukturen 25 dargestellt, die jeweils optisch dichte Bereiche der biologischen Probe 20 repräsentieren. Rechts von diesen Strukturen findet sich ein Schattenwurf, der daraus resultiert, dass das von links in der Strahlrichtung 16 einkommende Anregungslicht 13 durch die optisch dichteren Bereiche oder Probenstrukturen 25 abgeschattet wird.

[0009] Ganz allgemein führt die Bestrahlung von links in der Strahlrichtung 16 dazu, dass beispielsweise ein Bereich 22 in der Probe 20 im Bild heller erscheint als ein Bereich 23. Mit anderen Worten: Das Bild der Probe 20 wird von links nach rechts zunehmend dunkler, weil das Anregungslicht nach und nach absorbiert oder gestreut wird.

[0010] Diesem Problem kann dadurch begegnet werden, dass man das Lichtblatt in der Probenebene schnell hin- und her verschwenkt oder verkippt. Dadurch wird eine gleichmäßigere Beleuchtung erreicht. Durch dieses rasche Kippen, welches auch als Winkelscan bezeichnet werden kann, können Streuzentren umgangen werden und es wird im zeitlichen Mittel eine gleichmäßigere Beleuchtung erzielt. Dies ist beispielsweise beschrieben in *Optics Letters*, Vol. 32, No. 17, Seiten 2608 bis 2610. Ein solcher Winkelscan kann beispielsweise durch einen Spiegel erfolgen, der in einer zur Probenebene optisch konjugierten Ebene positioniert ist.

[0011] Eine weitere Aufgabenstellung im Bereich der Lichtblattmikroskopie hat damit zu tun, dass auch vergleichsweise große biologische Proben mit einem Durchmesser von beispielsweise bis zu 3 mm untersucht werden sollen. Solche breiten Lichtblätter können mit den üblicherweise verwendeten optischen Komponenten nicht bereitgestellt werden. Deshalb wird, um solch große Gesichtsfelder homogen zu beleuchten, das Lichtblatt in der Regel rasch in der betreffenden Ortskoordinate, beispielsweise der y-Achse, die dann auch als Höhe bezeichnet wird, parallel verschoben. Ein solcher Höhenscan erfüllt somit zwei Funktionen: Einerseits wird das nutzbare Gesichtsfeld (Field of View) entlang der Verschiebungs- oder Scanachse vergrößert. Andererseits wird das Beleuchtungsstrahlprofil verschmiert, was zu einer homogenen Beleuchtung führt und ebenfalls vorteilhaft ist. Solch ein Ortsscan oder Höhenscan kann durch einen beweglichen Spiegel verwirklicht werden, der dazu in einer zur hinteren Objektivbrennebene optisch konjugierten Ebene stehen muss.

[0012] **Fig. 3** zeigt eine Schnittansicht der Ansicht aus **Fig. 2** entlang der Linie B-B. Insbesondere ist dort zu erkennen, dass das Lichtblatt in einem flächigen

Bereich 18 in einer Probenebene 19 der Probe 20 fokussiert ist. Eine minimale Ausdehnung in z-Richtung, bei der es sich insbesondere um eine beugungsbegrenzte Strahltaile handeln kann, ist dabei durch die Pfeile 21 veranschaulicht.

[0013] **Fig. 4** zeigt schematisch das Verkippen des Anregungslichtbündels 13, welches auch als Lichtblatt bezeichnet werden kann, um einen Drehpunkt 17, welcher bei den aus dem Stand der Technik bekannten Vorrichtungen auf einer Achse einer Detektionsrichtung 39 des Detektionsstrahlengangs 30 liegt. Dargestellt ist in **Fig. 4** ein Anregungslichtbündel 13, welches aus dem Beleuchtungsobjektiv 12 im Wesentlichen parallel zu dessen optischer Achse und zur x-Richtung austritt und deshalb senkrecht zur y-Richtung und zur z-Richtung orientiert ist und außerdem ein verkipptes Anregungslichtbündel 24, dessen Mittenachse eine Mittenachse des Anregungslichtbündels 13 in dem Drehpunkt 17 auf der Achse der Detektionsrichtung 39 des Detektionsstrahlengangs 30 schneidet.

[0014] In **Fig. 5** ist schematisch das Verschieben eines Anregungslichtbündels 13 in Richtung der y-Achse gezeigt, was auch als Höhenscan bezeichnet wird. Ein maximaler Hub zwischen einem Anregungslichtbündel 61 und einem Anregungslichtbündel 62, welches in einer Richtung 71 in Richtung der y-Richtung verschoben ist, ist in **Fig. 5** durch den Pfeil 63 angedeutet. Die Anregungslichtbündel 61, 62 liegen dabei in der x-y-Ebene, das heißt, dass das Anregungslichtbündel 13 innerhalb einer Probenebene 19 verschoben wird und deshalb auch vergleichsweise große biologische Proben mit einem Durchmesser von bis zu beispielsweise 3 mm betrachtet werden können. Für den Fall, dass solch ein Höhenscan des Anregungslichtbündels 13 durchgeführt wird, stimmt die Ausdehnung des Gesichtsfeldes 50 in y-Richtung nicht mehr, wie in **Fig. 2**, mit der Ausdehnung des Anregungslichtbündels 13 in y-Richtung überein, sondern ist dem maximalen Hub entsprechend größer.

[0015] Im Stand der Technik werden demgemäß für die beiden Funktionen „Verkippen des Lichtblatts in der Probenebene“ und „Verschieben des Lichtblatts in der Probenebene“ zwei separate Einrichtungen verwendet, um beiden Funktionen unabhängig voneinander zu kontrollieren. In beiden Fällen handelt es sich um eine Scanbewegung, einmal um einen Winkelscan und einmal um einen linearen Scan, Ortsscan oder Höhenscan. Die verwendeten Scaneinrichtungen müssen hierzu in jeweils unterschiedlichen konjugierten Ebenen positioniert werden. Weil zwei Scanner verwendet werden müssen, sind diese Aufbauten vergleichsweise teuer.

[0016] DE102011051042A1 offenbart ein Lichtblattmikroskop, bei dem das Lichtblatt in der Proben-

ebene mithilfe eines Scanners verschoben und durch Verschieben eines Mikroskopobjektivs außerdem verkippt werden kann.

[0017] DE102012218920A1 beschreibt eine Vorrichtung zur Beleuchtung einer Probe mit einem Lichtblatt, welches mithilfe eines schwenkbaren Spiegels verkippt wird.

[0018] US2011/0115895A1 offenbart eine weitere Vorrichtung zur Lichtblattmikroskopie, bei der das Lichtblatt in rascher Abfolge aus unterschiedlichen Richtungen auf die Probe eingestrahlt wird. Außerdem wird das Lichtblatt nacheinander aus gegenüberliegenden Richtungen auf die Probe eingestrahlt (US2011/0115895A1, **Fig.** 9A, 9B; 10A bis 10C). Das Lichtblatt wird dabei um seinen Fokus verschwenkt (D3, **Fig.** 12, rechter Strahlengang, Verschwenkung des Lichtplatz bei FP).

[0019] Als eine Aufgabe der Erfindung kann angesehen werden, eine Vorrichtung zur Lichtblattmikroskopie anzugeben, bei der eine möglichst gute Ausleuchtung des Lichtblatts mit kostengünstigen Mitteln erreicht werden kann.

[0020] Diese Aufgabe wird durch die Vorrichtung mit den Merkmalen des Anspruchs 1 gelöst.

[0021] Die Vorrichtung der oben angegebenen Art ist erfindungsgemäß dadurch weitergebildet, dass in dem Beleuchtungsstrahlengang eine Strahlmanipulationseinrichtung vorhanden ist, dergestalt, dass durch ein Betätigen dieser Strahlmanipulationseinrichtung gleichzeitig sowohl eine Verkipfung des Anregungslichtbündels in der Probenebene als auch eine Verschiebung des Anregungslichtbündels in der Probenebene in einer Richtung quer, insbesondere senkrecht zur Strahlrichtung bewirkbar ist. Die Strahlmanipulationseinrichtung ist erfindungsgemäß durch einen schwenkbaren Spiegel verwirklicht.

[0022] Als ein Kerngedanke der Erfindung kann angesehen werden, die Funktionen eines Orts- und eines Winkelscans mit ein und derselben Strahlmanipulationseinrichtung zu verwirklichen. Dadurch können in erheblichem Umfang Kosten eingespart werden.

[0023] Die Verkipfung des Anregungslichtbündels und die Verschiebung des Anregungslichtbündels können starr aneinander gekoppelt sein. D. h., dass beim Betätigen der Strahlmanipulationseinrichtung das Anregungslichtbündel verkippt und automatisch auch verschoben wird: Das eine geht nicht ohne das andere.

[0024] Für diese Beschreibung wird davon ausgegangen, dass eine optische Ebene zu sich selbst optisch konjugiert ist.

[0025] Die im Beleuchtungsstrahlengang vorhandenen optischen Mittel dienen im Grundsatz dazu, das Anregungslicht, insbesondere in Form eines Lichtblatts, in einen flächigen Bereich einer zu untersuchenden Probe einzuleiten. Zweckmäßig ist hierzu mindestens ein Beleuchtungsobjektiv vorhanden. Hierbei kann es sich um Mikroskopobjektive grundsätzlich bekannter Art handeln. Gegebenenfalls können auch mehrere Beleuchtungsobjektive, beispielsweise einschwenkbar, oder wechselbare Beleuchtungsobjektive vorhanden sein.

[0026] Die wesentliche Funktion der Erfindung ist, mit ein- und derselben Strahlmanipulationseinrichtung sowohl ein Verschwenken als auch ein Verschieben eines Anregungslichtbündels in einer Probenebene einer zu untersuchenden Probe zu erreichen. Dies kann besonders bevorzugt dadurch erreicht werden, dass die Strahlmanipulationseinrichtung, insbesondere ein Scanspiegel, weder in einer zur Probenebene oder Brennebene des Beleuchtungsobjektivs optisch konjugierten Ebene noch in einer zur hinteren Brennebene des Beleuchtungsobjektivs optisch konjugierten Ebene angeordnet wird. Wieweit entfernt die Strahlmanipulationseinrichtung von diesen optisch konjugierten Ebenen positioniert wird, hängt von den Erfordernissen des Einzelfalls ab.

[0027] Erfindungsgemäß können sowohl das Vergrößern eines zu nutzenden Gesichtsfelds (Field of View) durch Aufziehen eines Lichtblatts in der Höhe als auch eine Schattenunterdrückung durch schnelles Verkippen oder Verschwenken des Lichtblatts in der Probenebene durch ein- und denselben Scanner oder dieselbe Strahlmanipulationseinrichtung erreicht werden. Dies wird zum Beispiel ermöglicht, indem die Strahlmanipulationseinrichtung weder in einer zur Probenebene oder Brennebene des Beleuchtungsobjektivs konjugierten Ebene noch in einer zur hinteren Brennebene des Beleuchtungsobjektivs konjugierten Ebene angeordnet wird, sondern vielmehr axial entlang der optischen Achse verschoben wird.

[0028] Die Probenebene kann auch als Brennebene des Beleuchtungsobjektivs bezeichnet und angesehen werden.

[0029] Bei einer solchen Anordnung der Strahlmanipulationseinrichtung führt ein Betätigen der Strahlmanipulationseinrichtung vorteilhafterweise immer sowohl zu einer Verschiebung als auch, insbesondere gleichzeitig oder starr gekoppelt, insbesondere zu einer Verkipfung des Anregungslichtbündels in der Probenebene.

[0030] Eine weitere vorteilhafte Variante der erfindungsgemäße Vorrichtung ist dadurch gekennzeichnet, dass der Beleuchtungsstrahlengang mindestens

einen Bereich aufweist, in welchem das Anregungslichtbündel kollimiert ist und dass in diesem Bereich eine Zylinderlinse zum Fokussieren des Anregungslichtbündels in Richtung der Detektionsrichtung in der Probenebene angeordnet ist.

[0031] Durch Fokussierung des Anregungslichtbündels mit einer Zylinderlinse in der Probenebene erhält man im Bereich der Probe ein besonders dünnes Lichtblatt.

[0032] Wenn die Bewegung des Anregungslichtbündels innerhalb der Probenebene stärker den Charakter eines Verschwenkens als den Charakter einer Verschiebung aufweisen soll oder, mit anderen Worten, eine Vergrößerung des Lichtblatts in der Höhe eine eher untergeordnete Rolle im Vergleich zur Reduzierung von Schattenwurf spielt, ist eine Ausführungsvariante der erfindungsgemäßen Vorrichtung bevorzugt, bei der die Strahlmanipulationseinrichtung näher an einer zur Probenebene konjugierten Ebene als an einer zu einer hinteren Brennebene des Beleuchtungsobjektivs oder eine dazu konjugierten Ebene positioniert ist.

[0033] Wenn aber andererseits die Unterdrückung von Schattenwurf weniger wichtig im Vergleich zur Vergrößerung des zu beobachtenden Bereichs in Richtung quer zur Beleuchtungsrichtung und quer zur Beobachtungsrichtung ist, wenn also ausge dehnte Proben untersucht werden sollen, ist es zweckmäßig, wenn die Strahlmanipulationseinrichtung im Beleuchtungsstrahlengang näher an einer hinteren Brennebene des Beleuchtungsobjektivs oder einer dazu konjugierten Ebene angeordnet ist als an einer zur Probenebene optisch konjugierten Ebene.

[0034] Um in diesem Zusammenhang dem Verwenden des Mikroskops größtmögliche Freiheit zu geben, sind Varianten der erfindungsgemäßen Vorrichtung besonders bevorzugt, bei welchen die Strahlmanipulationseinrichtung in einer Richtung der optischen Achse des Beleuchtungsstrahlengangs variabel positionierbar, insbesondere verschiebbar angeordnet ist. Zusätzlich zu einer Verschiebbarkeit der Strahlmanipulationseinrichtung kann außerdem vorgesehen sein, dass die Strahlmanipulationseinrichtung entfernbar ist und an anderer Stelle des Beleuchtungsstrahlengangs wieder eingesetzt werden kann.

[0035] Bei der Strahlmanipulationseinrichtung, also dem schwenkbarer Spiegel, kommt es im Grundsatz nur darauf an, dass die Strahlrichtung eines Anregungslichtbündels mit Hilfe der Strahlmanipulationseinrichtung definiert geändert werden kann. Besonders bevorzugt werden galvanometrische oder mikromechanische Spiegel verwendet.

[0036] Grundsätzlich kann der Grundgedanke der Erfindung, dass nämlich ein Anregungslichtbündel in der Probenebene sowohl verschwenkt als auch verschoben wird, ausgehend von einer Vorrichtung des Stands der Technik mit einem Winkel-scanner auch dadurch erreicht werden, dass nicht ein Scanspiegel, sondern das Beleuchtungsobjektiv entlang einer optischen Achse verschoben wird. Dadurch wird natürlich auch die Brennebene des Beleuchtungsobjektivs verschoben und der notwendige Verschiebeweg ist wegen der vergleichsweise hohen Tiefenschärfe in der hinteren Objektivbrennebene in der Regel viel größer im Vergleich zu der Situation, bei der ein Scanspiegel aus einer optischen konjugierten Ebene verschoben wird.

[0037] Weiterhin wird der Grundgedanke der Erfindung, also das gleichzeitige Verschwenken und Verschieben eines Anregungslichtbündels in einer Probenebene mit Hilfe von ein- und derselben Strahlmanipulationseinrichtung auch dadurch erreicht, dass anstelle einer Strahlmanipulationseinrichtung, beispielsweise eines Scanspiegels, die Tubuslinse verschoben wird. Auch hier ist die Wirkung im Prinzip die gleiche, denn der oder die Scanner (wenn sowohl ein Winkelscanner als auch ein Höhenscanner verwendet werden) stehen nicht mehr in einer optisch konjugierten Ebene. Eine Verschiebung der Brennebene der Tubuslinse auf einer dem Scanner abgewandten Seite kann im Prinzip durch eine geeignet hohe Tiefenschärfe auf dieser Seite ausgeglichen werden.

[0038] Weil bei der Lichtblattmikroskopie eine Zylindersymmetrie des Anregungslichtbündels ohnehin nicht erforderlich ist, muss die Tubuslinse nicht notwendig eine sphärische Rundoptik sein. Bei vorteilhaften Varianten der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist demgemäß in dem Beleuchtungsstrahlengang eine Tubuslinse vorhanden, die einen Astigmatismus aufweist. Hierbei kann es sich insbesondere um eine Zylinderlinse, eine asphärische Linse oder ein adaptives optisches Element handeln.

[0039] Eine weitere vorteilhafte Variante der erfindungsgemäße Vorrichtung besteht darin, dass eine Brennweite der Tubuslinse verändert wird, beispielsweise durch eine adaptive Linse, dass also im Beleuchtungsstrahlengang, insbesondere unmittelbar, benachbart zur Tubuslinse mindestens eine zusätzliche lichtbrechende Komponente, insbesondere eine Linse oder ein adaptives Element, vorhanden ist. Diese mindestens eine zusätzliche lichtbrechende Komponente wird zweckmäßig so dimensioniert und positioniert, dass die Strahlmanipulationseinrichtung weder in einer zur Probenebene oder Brennebene des Beleuchtungsobjektivs optisch konjugierten Ebene oder in einer zur hinteren Brenn-

ebene des Beleuchtungsobjektivs optisch konjugierten Ebene positioniert ist.

[0040] Für den Detektionsstrahlengang kommt es im Prinzip darauf an, dass das von der zu untersuchenden Probe abgestrahlte Detektionslicht möglichst vollständig in der Detektionsrichtung aufgenommen und der weiteren Verarbeitung zugeführt wird. Zweckmäßig ist hierzu im Detektionsstrahlengang als optisches Mittel mindestens ein Detektionsobjektiv vorhanden. Im Wesentlichen kann es sich beim Detektionsstrahlengang um den Strahlengang eines Weitfeldlichtmikroskops, insbesondere zur Fluoreszenzmikroskopie, handeln. Bei solchen Mikroskopen sind Objektivrevolver mit mehreren Detektionsobjektiven gängig.

[0041] Besonders zweckmäßig können bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung detektionsseitig Detektionsmittel zum Nachweisen des Detektionslichts und eine Steuer- und Verarbeitungseinrichtung, vorzugsweise eine Rechneinrichtung, zum Steuern der Vorrichtung und zum Auswerten der aufgenommenen Messdaten vorhanden sein. Auch Okulare zum Betrachten des mikroskopischen Bilds können vorhanden sein.

[0042] Weitere Vorteile und Merkmale der vorliegenden Erfindung werden im Folgenden unter Bezugnahme auf die beigefügten schematischen Figuren erläutert. Hierin zeigen:

Fig. 1: eine schematische Darstellung einer Vorrichtung zur Lichtblattmikroskopie nach dem Stand der Technik;

Fig. 2: eine Teilschnittansicht entlang der Linien A-A aus **Fig. 1**;

Fig. 3: eine Teilschnittansicht entlang der Linie B-B in **Fig. 2**;

Fig. 4: eine schematische Darstellung des Verkippens eines Lichtblatts um einen Drehpunkt in einer Brennebene eines Beleuchtungsobjektivs;

Fig. 5: eine schematische Darstellung der Verschiebung eines Lichtblatts in einer Richtung parallel zu einer Brennebene eines Beleuchtungsobjektivs; und

Fig. 6: eine schematische Darstellung der optischen Komponenten und der gleichzeitigen Verkipfung und Verschiebung eines Lichtblatts in einer Variante der erfindungsgemäßen Vorrichtung.

[0043] In allen Figuren sind äquivalente oder gleich wirkende Komponenten und Bestandteile in der Regel mit denselben Bezugszeichen gekennzeichnet.

[0044] Weiterhin sind in sämtlichen Figuren Koordinatensysteme angegeben, um die räumliche Lage der in den einzelnen Figuren dargestellten Bestandteile zu verdeutlichen.

[0045] **Fig. 6** zeigt die Anordnung der wesentlichen Komponenten bei einer Ausführungsvariante der Erfindung, die im Übrigen wie das in **Fig. 1** dargestellte Beispiel aufgebaut ist. Unterschiede im Vergleich zum Stand der Technik ergeben sich im Vergleich zu den **Fig. 2, 4** und **5**. Dies wird im Einzelnen beschrieben.

[0046] Als wesentliche Komponenten der Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Vorrichtung sind in **Fig. 6** ein Beleuchtungsobjektiv 12, eine Tubuslinse 80 und die erfindungsgemäß vorhandene Strahlmanipulationseinrichtung 40 gezeigt. Die Strahlmanipulationseinrichtung 40 ist im gezeigten Beispiel ein, beispielsweise galvanometrisch betriebener, Scanspiegel.

[0047] Außerdem ist in **Fig. 6** ein Gesichtsfeld 50 eines Detektionsstrahlengangs dargestellt, der in **Fig. 6** zwar nicht gezeigt ist, im Prinzip aber so aussieht, wie in **Fig. 1** dargestellt. Die Ansicht der **Fig. 6** liegt in der x-y-Ebene, das heißt der Detektionsstrahlengang sieht von oben, im Wesentlichen senkrecht auf das Gesichtsfeld 50. In dem Gesichtsfeld 50 kann sich eine, in **Fig. 6** nicht dargestellte, zu untersuchende Probe befinden. Gezeigt sind in **Fig. 6** zwei Strahlenbündel, die in unterschiedlichen Winkeln durch die optischen Komponenten hindurchtreten und mit den Bezugszeichen 73, 74 gekennzeichnet sind. Eine Brennebene des Objektivs 12 trägt das Bezugszeichen 71 (parallel zur y-Richtung). Mit dem Bezugszeichen 76 ist eine hintere Brennebene des Beleuchtungsobjektivs 12 gekennzeichnet. Die Tubuslinse 80 liegt in einer Ebene 77 zwischen der hinteren Brennebene 76 des Beleuchtungsobjektivs 12 und einer zur Brennebene 71 des Beleuchtungsobjektivs 12 optisch konjugierten Ebene 78. Die Strahlmanipulationseinrichtung 40, im gezeigten Beispiel ein Scanspiegel, ist in **Fig. 6** in ihrer Schwenkposition für beide gezeigten Strahlverläufe 73, 74 dargestellt. Für das Anregungslichtbündel 74 steht die Manipulationseinrichtung 40 in der mit Bezugszeichen 83 versehenen Position. Für das Anregungslichtbündel 73, andererseits steht der Scanspiegel 40 in der mit dem Bezugszeichen 85 versehenen Position.

[0048] Besonders wichtig für die Erfindung ist, dass ein Drehpunkt 84 des Scanspiegels 40 nicht in der zur Brennebene 71 des Beleuchtungsobjektivs 12 optisch konjugierten Ebene 78 liegt, sondern geringfügig davor, nämlich um einen Abstand 81 versetzt. Das führt dazu, dass eine Verschwenkung des Scanspiegels 40 nicht bedeutet, dass das Anregungslichtbündel 13 um eine in der Brennebene 71 liegende

Achse verschwenkt oder verkippt wird, sondern dass diese Drehachse vielmehr, der Verschiebung 81 des Scanspiegels 40 aus der zur Brennebene 71 optisch konjugierten Ebene 78 entsprechend, verschoben ist.

[0049] Ein Drehpunkt der Anregungslichtbündel 13, der in **Fig. 6** schematisch durch den Schnittpunkt der Mittenachsen der beiden Lichtbündel 73 und 74 mit unterschiedlicher Winkellage dargestellt ist, trägt das Bezugszeichen 72. Dieser Drehpunkt 72 ist gegenüber der Brennebene 71 um eine Strecke 75 verschoben und kann, wie aus **Fig. 6** ersichtlich, außerhalb des Gesichtsfelds 50 eines Detektionsstrahlengangs liegen. Der Umstand, dass die Drehung oder Verkipfung der Anregungslichtbündel 13 nun nicht mehr um eine in der Brennebene 71 liegende Achse, sondern vielmehr um eine außerhalb davon liegende Achse erfolgt, führt dazu, dass die Anregungslichtbündel 13, wie dies in **Fig. 6** für die Lichtbündel 73 und 74 angedeutet ist, im Bereich des Gesichtsfelds 50 des Detektionsstrahlengangs und insbesondere im Bereich der Brennebene 71 des Beleuchtungsobjektivs 12 auch in der y-Koordinate verschoben werden.

[0050] Insgesamt führt dies zu dem besonders wichtigen und wesentlichen Vorteil der vorliegenden Erfindung, dass durch alleiniges Betätigen einer einzigen Strahlmanipulationseinrichtung, nämlich im gezeigten Beispiel des Scanspiegels 40, das Anregungslichtbündel 13 im Gesichtsfeld 50 des Detektionsstrahlengangs sowohl seine Richtung ändert, nämlich verkippt oder verschwenkt wird, als auch gleichzeitig verschoben wird, was eine weitgehende Abdeckung des Gesichtsfelds 50 ermöglicht.

[0051] Mit Hilfe der vorliegenden Erfindung wird also eine Vorrichtung zur Lichtblattmikroskopie bereitgestellt, bei der sowohl die Schwierigkeit des Schattenswurfs überwunden als auch besonders große Proben untersucht werden können. Dies wird mit kostengünstigen Mitteln ermöglicht.

Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Lichtblattmikroskopie mit einem Beleuchtungsstrahlengang (10) mit optischen Mitteln (12) zum Leiten eines Anregungslichtbündels (13) in einer Strahlrichtung (16) in einen flächigen Bereich (18) in einer Probenebene (19) einer zu untersuchenden Probe (20), mit einem Detektionsstrahlengang (30) mit optischen Mitteln (32) zum Aufnehmen von Detektionslicht (38), welches in einer Detektionsrichtung (39) von der Probe (20), insbesondere aus dem flächigen Bereich (18), abgestrahlt wird, wobei die Detektionsrichtung (39) quer zu der Probenebene (19) ausgerichtet ist, **dadurch gekennzeichnet**,

dass in dem Beleuchtungsstrahlengang (10) ein schwenkbarer Spiegel (40) vorhanden ist, dergestalt, dass durch ein Betätigen dieses schwenkbaren Spiegels (40) gleichzeitig sowohl eine Verkipfung des Anregungslichtbündels (13) in der Probenebene (19) als auch eine Verschiebung des Anregungslichtbündels (13) in der Probenebene (19) in einer Richtung (y) quer, insbesondere senkrecht, zur Strahlrichtung (16) bewirkbar ist.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die optischen Mittel in dem Beleuchtungsstrahlengang (10) mindestens ein Beleuchtungsobjektiv (12) umfassen.

3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass der schwenkbare Spiegel (40) sowohl außerhalb einer zur Probenebene (71, 19) konjugierten Ebene (78) als auch außerhalb einer hinteren Brennebene (76) des Beleuchtungsobjektivs (12) oder einer dazu konjugierten Ebene angeordnet ist.

4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Beleuchtungsstrahlengang (10) mindestens einen Bereich aufweist, in welchem das Anregungslichtbündel (13) kollimiert ist, und dass in diesem Bereich eine Zylinderlinse zum Fokussieren des Anregungslichtbündels (13) in Richtung der Detektionsrichtung (39) in der Probenebene (19) angeordnet ist.

5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass der schwenkbare Spiegel (40) im Beleuchtungsstrahlengang (10) in Richtung einer optischen Achse verschiebbar ist und/oder herausnehmbar und wiedereinfügar ist.

6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass der schwenkbare Spiegel (40) im Beleuchtungsstrahlengang (10) näher an einer zur Probenebene (71, 19) konjugierten Ebene (78) liegt als an einer hinteren Brennebene (76) des Beleuchtungsobjektivs (12) oder einer dazu konjugierten Ebene.

7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass der schwenkbare Spiegel (40) im Beleuchtungsstrahlengang (10) näher an einer hinteren Brennebene (76) des Beleuchtungsobjektivs (12) oder einer dazu konjugierten Ebene angeordnet ist als an einer zur Probenebene (71, 19) konjugierten Ebene (78).

8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass der schwenkbare Spiegel (40) ein galvanometrischer Spiegel oder ein mikromechanischer Spiegel ist.

9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass in dem Beleuchtungsstrahlengang (10) eine Tubuslinse, die einen Astigmatismus aufweist, eine Zylinderlinse, eine asphärische Linse oder ein adaptives optisches Element vorhanden ist.

10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass eine Brennweite der Tubuslinse dergestalt angepasst ist, dass der schwenkbare Spiegel (40) weder in einer zur Probenebene (71, 19) konjugierten Ebene (78) noch in einer zur hinteren Brennebene (76) des Beleuchtungsobjektivs (12) konjugierten Ebene angeordnet ist.

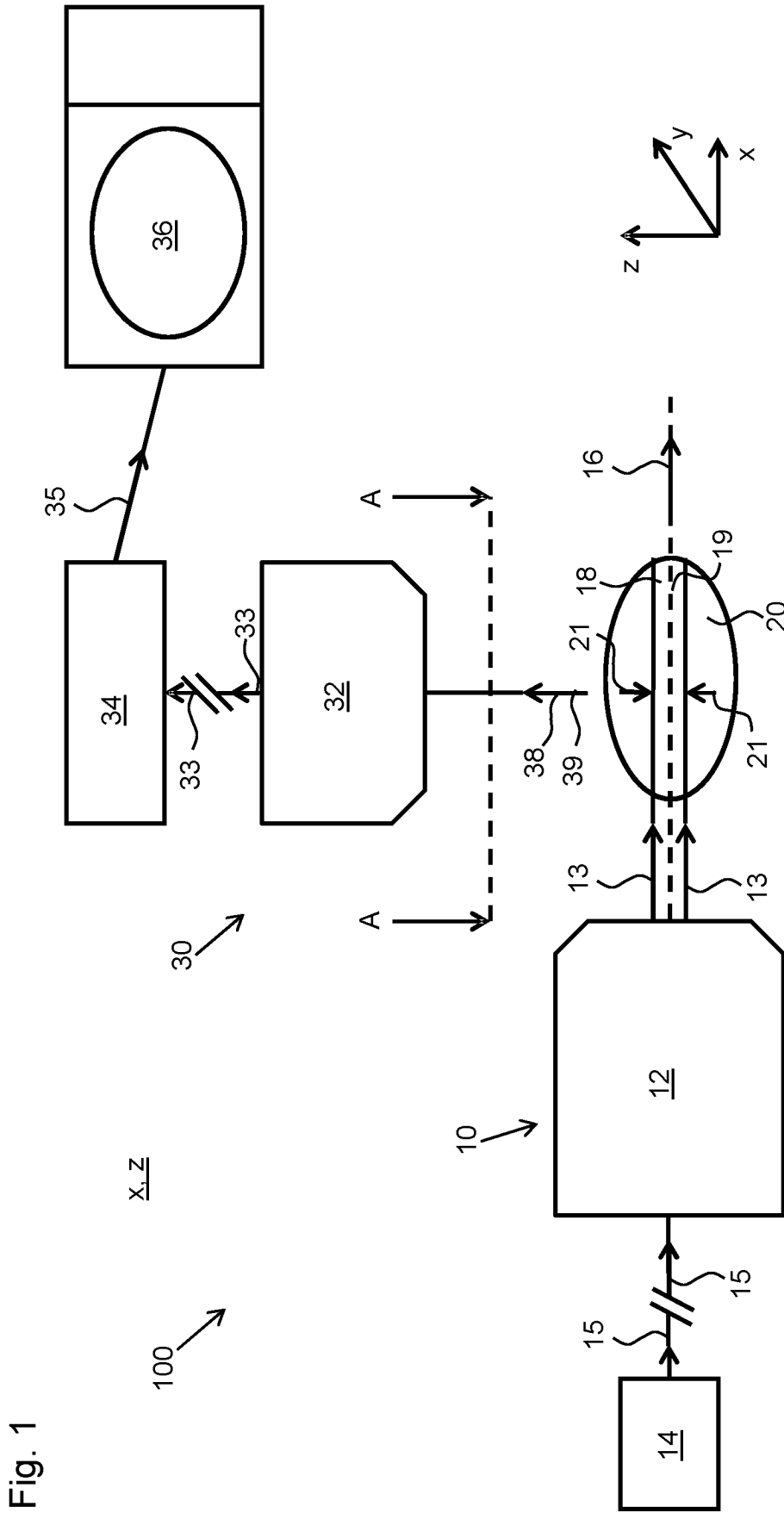
11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass im Beleuchtungsstrahlengang (10) benachbart zur Tubuslinse eine zusätzliche lichtbrechende Komponente, eine Linse oder ein adaptives Element, vorhanden ist.

12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, **dadurch gekennzeichnet**, dass die optischen Mittel des Detektionsstrahlengangs (30) mindestens ein Detektivobjektiv (32) umfassen.

13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass detektionsseitig Detektivmittel (34) zum Nachweisen des Detektivlichts (38) und/oder eine Steuer- und Verarbeitungseinrichtung, vorzugsweise eine Rechneinrichtung (36), zum Steuern der Vorrichtung und zum Auswerten von aufgenommenen Messdaten vorhanden ist.

Es folgen 6 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



STAND DER TECHNIK

Fig. 2 Stand der Technik

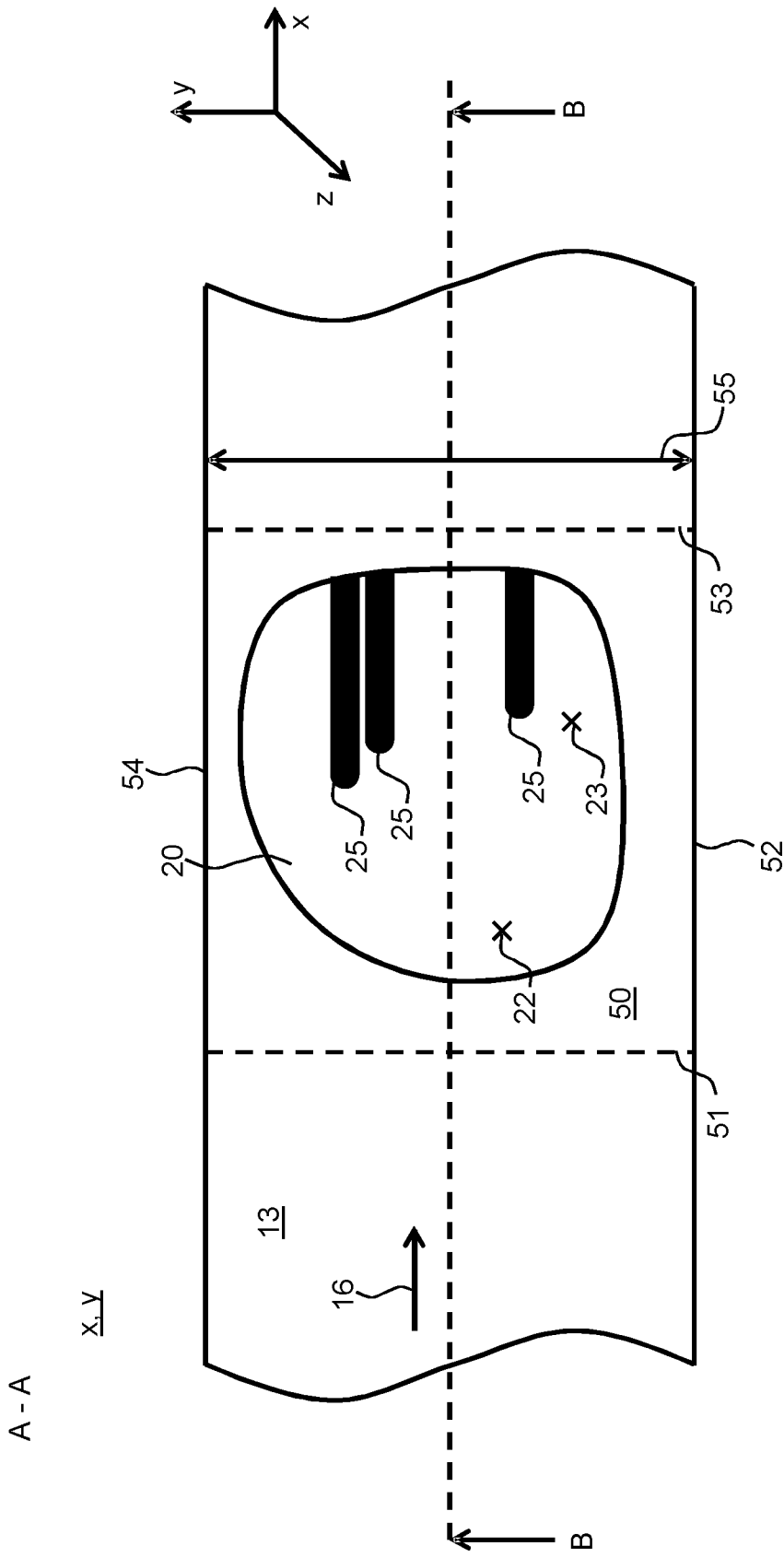


Fig. 3 Stand der Technik

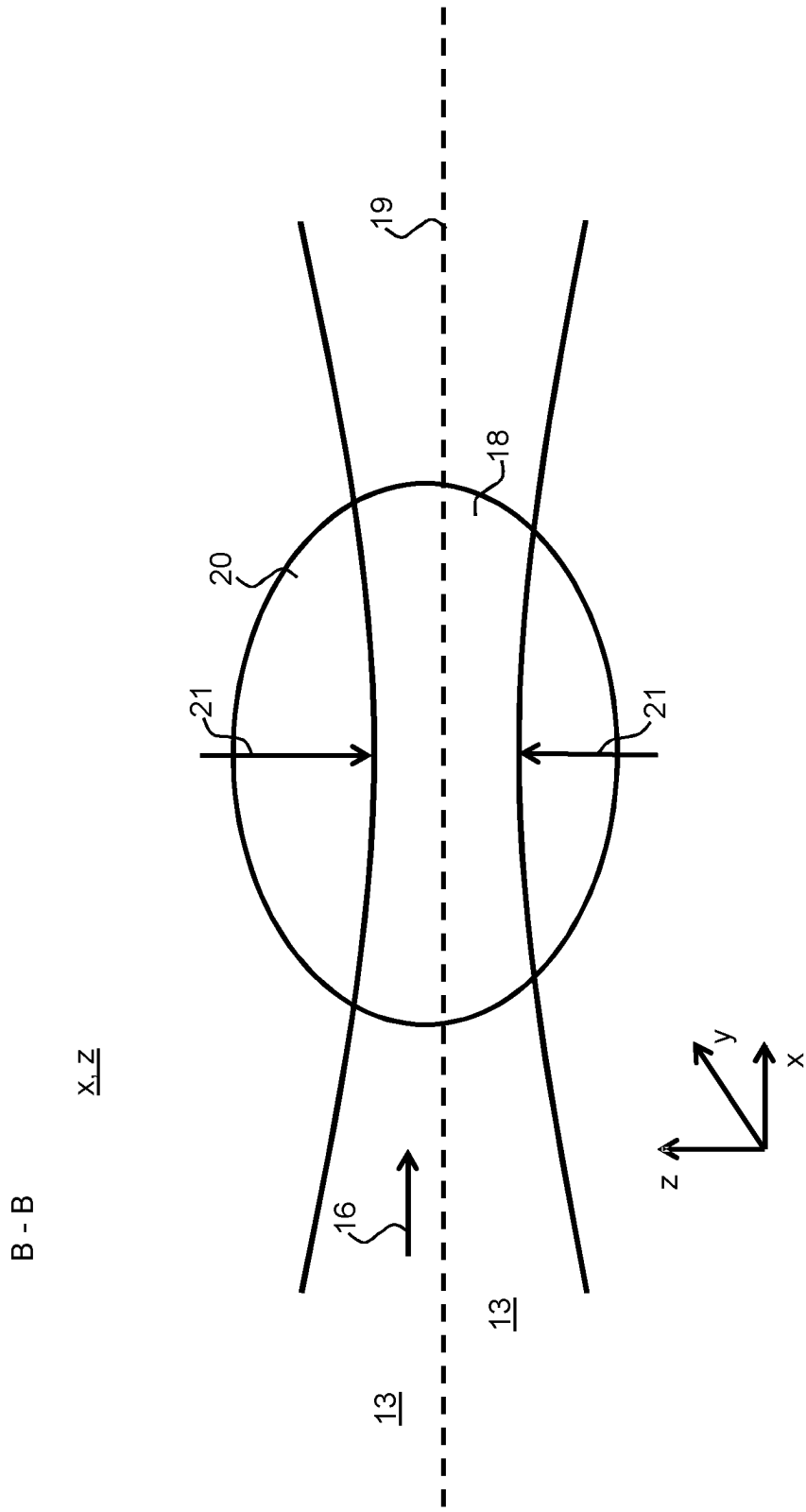


Fig. 4 Stand der Technik

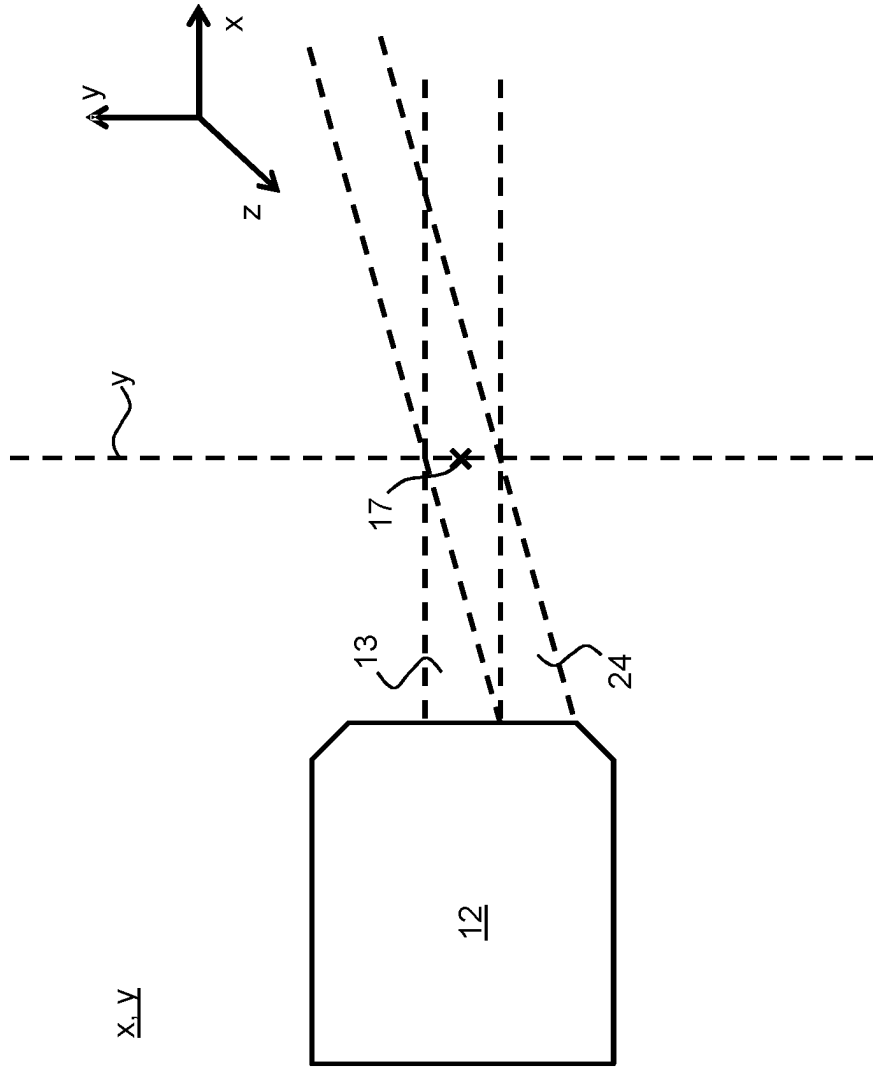
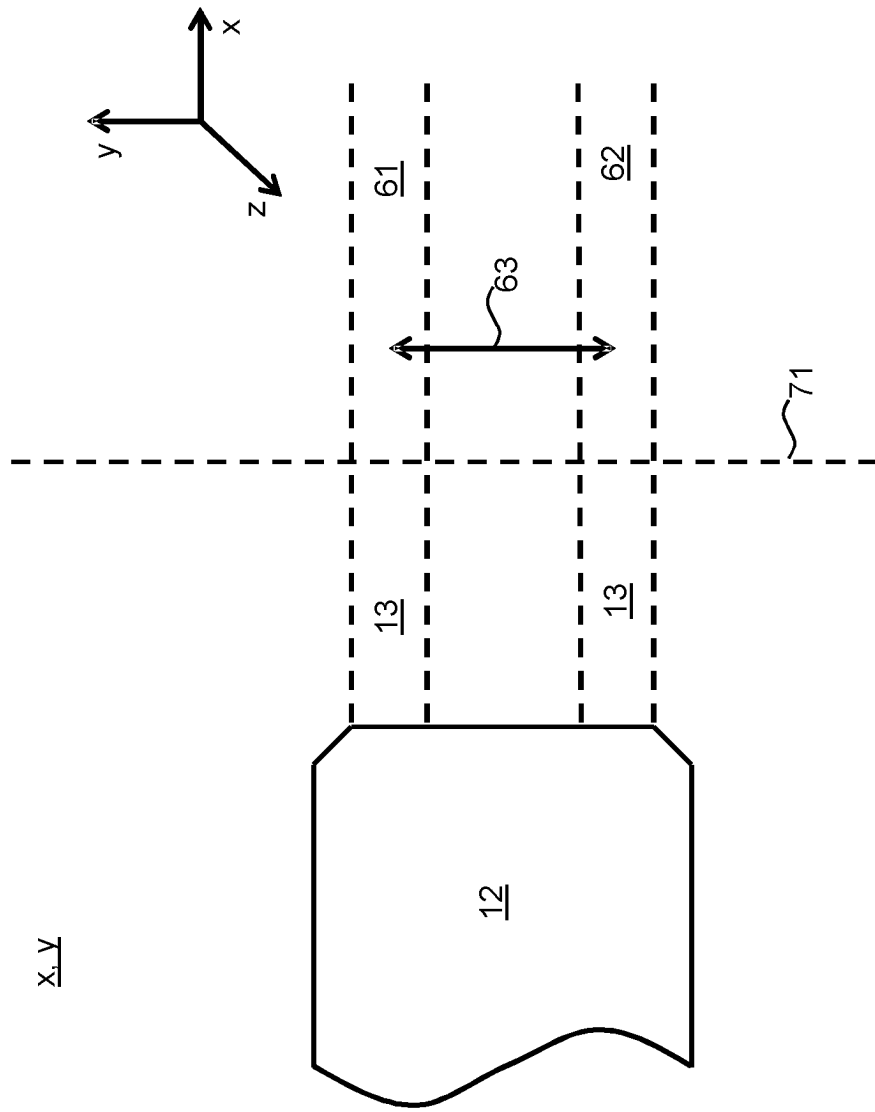


Fig. 5 Stand der Technik



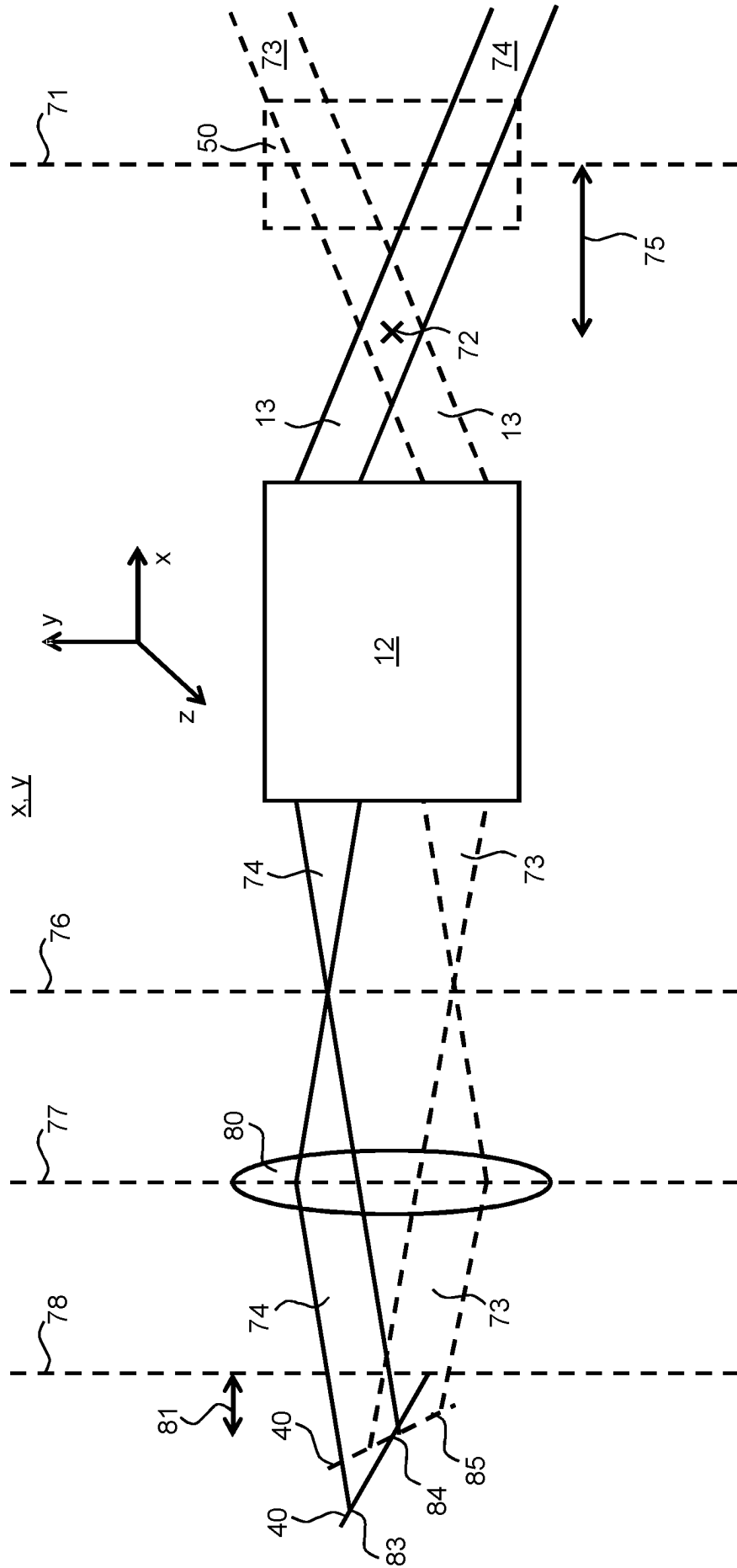


Fig. 6