



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2005 022 125 A1** 2006.11.16

(12)

## Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2005 022 125.4**

(22) Anmeldetag: **12.05.2005**

(43) Offenlegungstag: **16.11.2006**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **G02B 21/24** (2006.01)  
**G02B 7/28** (2006.01)

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

(74) Vertreter:  
**GEYER, FEHNERS & PARTNER (G.b.R.), 80687 München**

(72) Erfinder:  
**Westphal, Peter, Dr., 07743 Jena, DE; Bublitz, Daniel, Dr., 07743 Jena, DE**

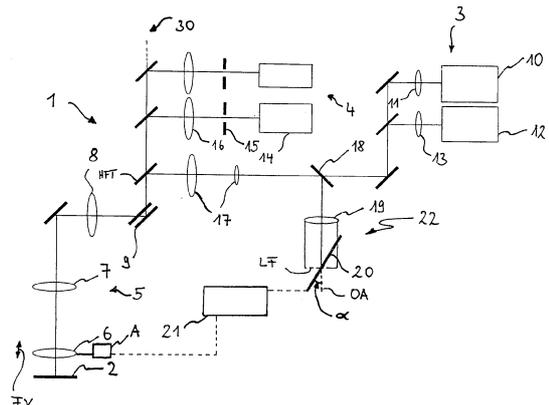
(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht zu ziehende Druckschriften:  
**DE 103 19 182 A1**  
**DE 102 44 618 A1**

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

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

(54) Bezeichnung: **Lichtrastermikroskop mit Autofokusmechanismus**

(57) Zusammenfassung: Es wird beschrieben ein Lichtrastermikroskop mit einem Anregungs- und einem Detektionsstrahlengang, Mittel (9) zur rasternden Abtastung eines Objektes (2) durch Verschieben eines abgebildeten eines Spot-, Linien- oder Multispotbereiches über das Objekt (2) und einem den Spot-, Linien- und Multispotbereich abbildenden Objektiv (6), wobei für das Objektiv (6) ein Fokusverstellmechanismus (A) vorgesehen ist, wobei eine Autofokuseinrichtung (22) zum Erfassen einer Lage der Fokusebene (F) des Objektivs (6) vorgesehen ist, die unterschiedliche Tiefenbereich am abgebildeten Spot-, Linien- oder Multispotbereich auf unterschiedliche Orte eines ortsauflösenden Detektors (20) abbildet.



**Beschreibung**

**[0001]** Die Erfindung bezieht sich auf ein Lichtrastermikroskop mit einem Anregungs- und einem Detektionsstrahlengang, Mitteln zur rasternden Abtastung eines Objektes durch Verschieben eines abgebildeten Spot- oder Multispotbereiches über das Objekt und einem den Spot- oder Multispotbereich abbildenden Objektiv, wobei für das Objektiv ein Fokusverstellmechanismus vorgesehen ist.

**Stand der Technik**

**[0002]** Lichtrastermikroskope sind im Stand der Technik bekannt, hierzu wird beispielsweise auf die DE 197 02 753 A1 oder die DE 102 57 237 A1 verwiesen, die ein als Laserscanningmikroskop ausgebildetes Lichtrastermikroskop beschreibt. In diesem Zusammenhang sei angemerkt, daß hier unter dem Begriff "Licht" der gesamte den optischen Gesetzen gehorchende Bereich der Strahlung verstanden wird.

**[0003]** Lichtrastermikroskope erreichen ein Objektbild üblicherweise durch Abbildung des genannten Spot- oder Multispotbereiches mit einer Detektion, die keine Struktur des Spots oder der Multispots auflöst (z.B. konfokale Detektion). Verschieben des Spot- oder Multispotbereiches über das Objekt liefert das Bild. Am Detektor liegt immer nur Strahlungsinformation zum jeweiligen Spot- bzw. Multispotbereich vor, und ein elektronisches Zusammenfügen dieser Bildinformation unter Berücksichtigung der Verschiebung des Spot- oder Multispotbereiches führt zum gewünschten Bild. Konfokale Detektion ist dabei eine Möglichkeit, eine sehr hohe Tiefenauflösung zu erreichen. Die Signalauswertung ist dann im wesentlichen auf die Fokalebene eingeschränkt, da außerhalb der Fokalebene liegende Bereiche keine wesentliche Signalinformation bei der konfokalen Detektion liefern; sie werden vor oder hinter die Konfokalblende abgebildet.

**[0004]** Die Einstellung der Fokalebenenlage ist damit für ein Lichtrastermikroskop, insbesondere wenn es mit konfokaler Detektion arbeitet, äußerst wichtig. Dies gilt insbesondere, wenn man eine Probe verwendet, die dicker ist als der Schärfentiefebereich des Objektivs. Man muß dann vor der Messung in der Probe diejenige Ebene anfahren, die vermessen werden soll. Zwar sind bei üblichen Lichtrastermikroskopen die Fokusverstellmechanismen hochpräzise, was es erlauben würde, zuerst eine bekannte Referenzfläche anzufahren, und dann die Fokusebene auf den gewünschten Abstand zur Referenzfläche zu stellen, jedoch kann sich der Abstand der aktuellen Fokusebene gegenüber der Referenzfläche aufgrund thermischer Effekte, durch Erschütterungen oder durch andere Störeinflüsse zeitlich verändern. Man müßte dann intermittierend immer wieder den Abstand zur Referenzfläche überprüfen, was sehr auf-

wendig wäre.

**[0005]** Für übliche Mikroskope bekannte Autofokusansätze sind bei Lichtrastermikroskopen oftmals nicht verwendbar. Dies gilt für alle Ansätze, die eine strukturierte Beleuchtung der Probe vornehmen und anhand der Struktur die Fokussierung erreichen. Da bei einem Lichtrastermikroskop zu jedem Zeitpunkt aber nur ein Spot- oder Multispotbereich ohne Auflösung der Struktur des einzelnen Spots abgebildet wird, ist eine strukturierte Beleuchtung nicht möglich, da die Struktur nicht aufgelöst werden könnte. Ansätze wie aus der US 6.545.765 oder US 5.604.344, die für Autofokuszwecke eine strukturierte Probenbeleuchtung bewirken, sind deshalb für Lichtrastermikroskope generell untauglich.

**Aufgabenstellung**

**[0006]** Der Erfindung liegt deshalb die Aufgabe zugrunde, ein Lichtrastermikroskop der genannten Art so auszugestalten, daß eine genaue Bestimmung der Lage der Fokusebene aufwandsgering möglich ist.

**[0007]** Diese Aufgabe wird durch ein Lichtrastermikroskop der eingangs genannten Art gelöst, das eine Autofokuseinrichtung zum Erfassen einer Lage der Fokusebene des Objektivs aufweist, die unterschiedliche Tiefenbereiche am abgebildeten Spot- oder Multispotbereich auf unterschiedliche Orte eines ortsauflösenden Detektors abbildet. Das erfindungsgemäße Lichtrastermikroskop bildet somit an jedem Spot einen Tiefenausschnitt auf den ortsauflösenden Detektor ab, so daß die Lage nicht nur der Fokusebene sondern auch einer Referenzebene, beispielsweise eines Übergangsglas/Probenmaterial ermittelt werden kann. Das Lichtrastermikroskop ermittelt damit die Lage der Fokusebene bezogen zur Referenzebene. Der Fokusverstellmechanismus wird dann so angesteuert, daß der Abstand der Fokusebene, die die Meßebebene darstellt, von der Referenzebene auf ein bestimmtes Maß konstant gehalten wird, bzw. sich anwendungsspezifischen Vorgaben gemäß verändert.

**[0008]** Die Erfindung setzt also erstmals eine tiefenaufgelöste Abbildung des Spot- oder Multispotbereiches zur Autofokussierung ein. Um die Tiefenauflösung wiederzugeben, genügt ein eindimensionales Detektorelement. Die Koordinate des Detektorelementes skaliert die Tiefeninformation. Die Intensität der abgebildeten Strahlung aus dem Spot- oder Multispotbereich hängt von der einen Ortskoordinate des Detektorelementes ab, welche wiederum unter Berücksichtigung der Abbildungsgegebenheiten der Tiefenkoordinate zugeordnet ist.

**[0009]** In der einfachsten Bauweise genügt folglich eine Detektorzeile, auf die die tiefenabhängige Orts-

aufgelöste Abbildung so erfolgt, daß unterschiedliche Tiefenbereiche auf unterschiedliche Bereiche der Detektorzeile zur Abbildung gebracht sind. Die Mitte der Detektorzeile befindet sich in einer zur Fokalebene konjugierten Ebene, anstatt der sonst üblichen konfokalen Blende.

**[0010]** Die tiefenauflösende Abbildung kann mittels einer der Detektorzeile vorgeschalteten anamorphotischen Optik realisiert werden, die auf die Detektorzeile einen Linienfokus bündelt, der mit der Detektorzeile in einer Ebene liegt und die Detektorzeile schneidet. Eine Verkipfung der anamorphotischen Optik oder der Detektorzeile realisiert diese geometrische Anordnung besonders einfach. Die anamorphotische Optik kann beispielsweise als Zylinderlinse, als torische Linse oder als Kombination eines ein-dimensionalen holographischen Diffusors mit einer sphärischen Linse realisiert werden.

**[0011]** Beim Lichtrastermikroskop kommen prinzipiell der Anregungs- oder der Detektionsstrahlengang in Frage, um die Strahlung für die Autofokuseinrichtung auszukoppeln. Vorteilhafterweise erfolgt die Einbindung in den Anregungsstrahlengang. Dann wird Anregungslicht, das aus der Fokusebene des Objektes bzw. von der Referenzebene zurückreflektiert wird, in der Autofokuseinrichtung verwendet. Eine Erhöhung der Strahlungsleistung, mit der Anregungslicht auf das Objekt gerichtet ist, ist nicht nötig, da die Autofokuseinrichtung sich auf die Strahlungsintensität im Detektionsstrahlengang in keiner Weise auswirkt. Aus baulichen Gründen kann es natürlich auch angezeigt sein, die Autofokuseinrichtung in den Detektionsstrahlengang einzubinden. Da das Autofokusverfahren auf reflektiertes Licht von einer Referenzebene angewiesen ist, sollte dafür Sorge getroffen werden, daß der Spektralbereich des Anregungslichtes zur Autofokuseinrichtung im Detektionsstrahlengang gelangen kann. Bei einem Laserscanningmikroskop, dessen Detektoren entsprechende Anregungsfilter vorgeschaltet sind, die Anregungslicht abblocken, ist im Strahlengang bis zu diesen Anregungsfiltern diese Bedingung üblicherweise erfüllt. Durch das konfokale Prinzip wird zurückgestreutes Licht aus anderen als der Probenebene unterdrückt. Durch reflektierende Grenzflächen Glas/Luft, Glas/Wasser oder auch Glas/Probe werden aber Geisterbilder erzeugt, die nicht konfokal unterdrückt werden, wenn sie auf die schräge Zeile abgedrückt werden. Diese dienen nun zur Autofokussierung. Die Referenzebene ist stets eine reflektierende Grenzfläche.

**[0012]** Die Auskopplung der Strahlung für die Autofokuseinrichtung im Strahlengang zwischen Detektormodul bzw. Anregungsmodul und dem Scanner, also bei ruhendem Strahl, bewirkt vorteilhafterweise, daß die Tiefeninformation über die gesamte abgebildete Fläche des Objektes gemittelt wird. Einzelne

Objektbereiche in der Fokusebene, die keine Strahlung rückstreuen, wirken sich dann nicht störend aus.

**[0013]** Die Autofokuseinrichtung erlaubt es dem Lichtrastermikroskop nun, den Fokusverstellmechanismus wunschgemäß anzusteuern. Es ist deshalb eine Weiterbildung bevorzugt, bei der eine Steuereinheit vorgesehen ist, die Signale der Autofokuseinrichtung ausliest und den Fokusverstellmechanismus ansteuert.

**[0014]** Zweckmäßigerweise wird die Steuereinheit aus den Signalen die Lage der Fokusebene im Bezug auf eine Referenzebene ermitteln. Es ist deshalb bevorzugt, daß die Steuereinheit aus den Signalen ein Maß für einen Abstand zwischen der Fokusebene des Objektivs und einer Referenzebene am Objekt feststellt und gegebenenfalls bei der Ansteuerung des Fokusverstellmechanismus berücksichtigt.

**[0015]** Die Signale der Autofokuseinrichtung können in den genannten Ausführungsformen das Signal der Detektorzeile sein. Das Signal wird üblicherweise mindestens zwei Intensitätsmaxima aufweisen: das erste Maximum entspricht der Lage der aktuellen Meßposition, d.h. der Lage der Fokusebene, das zweite Maximum ist der Lage der Referenzebene, beispielsweise einer Glas-/Präparatmaterialgrenzfläche zuzuordnen.

**[0016]** Der Abstand der beiden Maxima liefert den Abstand zwischen Fokusebene und Referenzebene, wobei die Funktion, mit der die Tiefenauflösung auf die Ortsauflösung des Detektors übertragen wird, zu berücksichtigen ist. Je nach Ausführungsform kann hierbei der Winkel zwischen Linienfokus und Längsachse der Detektorzeile, die Schärfentiefe des Objektivs und der Abbildungsmaßstab eingehen, um den Abstand zwischen den Maxima in den Abstand zwischen Fokusebene und Referenzebene umzurechen. Die Breite der Maxima wird dabei in der Regel von der Schärfentiefe des Objektivs bestimmt.

**[0017]** Die anamorphotische Optik erzeugt den erwähnten Linienfokus. Die Intensitätsverteilung längs des Linienfokus ist dabei nur selten konstant, bzw. nur wenn erheblicher Aufwand getrieben wird. Einfacher ist es, bei der Bestimmung der Maxima die Intensitätsverteilung längs des Linienfokuses zu berücksichtigen. Im Falle einer Zylinderoptik entspricht die Intensitätsverteilung längs der Linie dabei der Intensitätsverteilung der Spotbeleuchtung mit Anregungslicht.

#### Ausführungsbeispiel

**[0018]** Die Erfindung wird nachfolgend unter Bezugnahme auf die Zeichnung beispielhalber noch näher erläutert. Es zeigen:

[0019] [Fig. 1](#) eine schematische Darstellung eines Lichtrastermikroskops mit einer Autofokuseinrichtung;

[0020] [Fig. 2a–c](#) unterschiedliche Bauweisen für die Autofokuseinrichtung der [Fig. 1](#),

[0021] [Fig. 3](#) eine vereinfachte Schnittdarstellung eines mit dem Lichtrastermikroskop der [Fig. 1](#) erfaßten Objektes und

[0022] [Fig. 4](#) eine vereinfachte Darstellung eines Signalverlaufes, wie er mit der Autofokuseinrichtung des Lichtrastermikroskops der [Fig. 1](#) anfällt.

[0023] [Fig. 1](#) zeigt schematisch ein als Laserscanningmikroskop **1** ausgebildetes Lichtrastermikroskop. Mit dem Laserscanningmikroskop **1** wird ein Objekt **2** auf noch zu erläuternde Art vermessen. Das Laserscanningmikroskop **1** ist im wesentlichen in ein Anregungsmodul **3**, ein Detektionsmodul **4** sowie ein Mikroskopmodul **5** unterteilbar. Das Anregungsmodul **3** stellt Anregungsstrahlung bereit und speist diese in das Mikroskopmodul **5** ein, so daß sie als spotförmige Beleuchtung auf das Objekt **2** gerichtet wird. Die spotförmige Beleuchtung wird vom Mikroskopmodul **5** rasternd über das Objekt **2** geführt. Der am Objekt **2** dabei mit Anregungsstrahlung aus dem Anregungsmodul **3** beleuchtete Spotbereich wird über das Mikroskopmodul **5** vom Detektionsmodul **4** konfokal detektiert, z.B. in Form einer Fluoreszenzanalyse.

[0024] Das Mikroskopmodul **5** weist ein Objektiv **6** auf, das mittels eines Antriebes A in einer Fokusverstellung FV hinsichtlich der Lage der Fokusebene im Objekt **2** verändert werden kann. Diese Fokusverstellung ist beispielsweise in der DE 197 02 753 A1 näher erläutert.

[0025] Dem Objektiv **6** ist eine Tubuslinse **7** vorgeschaltet. Die vom Anregungsmodul **3** kommende Strahlung wird mittels einer Scanoptik **8** sowie eines Scanners **9** durch die Tubuslinse **7** und das Objektiv **6** als rasternder Spot über das Objektiv **2** geführt. Gleichzeitig bewirkt der Scanner **9** in umgekehrter Strahlrichtung zum Detektionsmodul **4** hin ein sogenanntes de-scannen, so daß nach dem Scanner **9** im Detektionsmodul **4** wieder ein ruhender Strahl vorliegt.

[0026] Der Anregungsstrahlengang des Anregungsmoduls **3** und der Detektionsstrahlengang des Detektionsmoduls **4** sind über einen Hauptfarbteiler HFT vereinigt.

[0027] Die Wirkung des Hauptfarbteilers HFT ist ebenfalls der bereits genannten DE 197 02 753 A1 zu entnehmen. Anstelle eines dichroitischen Hauptfarbteilers kann auch ein farbneutraler Teiler verwendet werden, wie er beispielsweise in der DE 102 57 237

A1 geschildert ist.

[0028] Im Detektionsstrahlengang des Detektionsmoduls **4** wird die Strahlung über weitere, nicht näher bezeichnete Farbteiler in einzelne Detektionskanäle aufgeteilt, die jeweils aus einem Photomultiplier **14** mit vorgeschaltetem Pinhole **15** sowie Pinholeoptik **16** aufgebaut sind. Das Pinhole **15** engt den Detektionsbereich nahezu vollständig auf die theoretische Fokalebene ein; außerhalb dieser Fokalebene erzeugte Strahlung kann das Pinhole **15** nicht passieren.

[0029] Das Anregungsmodul **3** bewirkt eine Beleuchtung des Spots mit Strahlung verschiedener Wellenlängen. Dazu sind verschiedene Beleuchtungskanäle vorgesehen, die im Ausführungsbeispiel jeweils aus einem Laseranschluß **10** bzw. **12** zum Einkoppeln der Strahlung eines Lasers sowie Einkoppeloptik **11** bzw. **13** aufgebaut sind und welche über eine nicht näher bezeichnete Spiegeltreppe vereinigt werden. Zur Einstellung des Spotdurchmessers ist ein Teleskop **17** vorgesehen, das für die Einkopplung entsprechend konditionierter Strahlung am Hauptfarbteiler HFT sorgt.

[0030] Das insoweit dem Stand der Technik entsprechende Laserscanningmikroskop **1** weist nun am Anregungsmodul **3** einen Auskoppler **18** auf, der vom Objekt **2** in den Anregungsstrahlengang des Anregungsmoduls **3** rückgestreute Strahlung auskoppelt und über hier als Anamorphot ausgebildete Optik **19** in einen Linienfokus LF bündelt. Im Falle eines Laserscanningmikroskops **1** mit Punktrasterung handelt es sich bei der Optik **19** um einen Anamorphot. Bei einem linienscannenden Mikroskop kann eine sphärische Optik **19** verwendet werden, da diese dann schon einen Liniefokus liefert. Der Linienfokus LF ist auf eine Detektorzeile **20** gerichtet, die mit der optischen Achse OA einen Winkel  $\alpha$  einschließt und vom Linienfokus LF geschnitten wird. Der Linienfokus LF und die Detektorzeile **20** liegen also in einer Ebene. Der Anamorphot **19** und die Detektorzeile **20** bilden eine Autofokuseinrichtung **22**, deren Funktionsweise anhand der [Fig. 3](#) und [Fig. 4](#) noch erläutert wird.

[0031] Eine mögliche Ausgestaltung für die Optik **19** zeigen die [Fig. 2a–c](#). Zusätzlich ist exemplarisch in [Fig. 2b](#) noch der Linienfokus LF bzw. in [Fig. 2c](#) die Längsachse L der Detektorzeile **20** dargestellt. Die Optik **19** kann als Kombination aus eindimensionalem holographischen Diffusor **26** mit vorgeschalteter sphärischer Optik **25** ([Fig. 2a](#)), als torische Linse **24** ([Fig. 2b](#)) oder als Zylinderlinse **23** ([Fig. 2c](#)) ausgebildet sein, wenn das Laserscanningmikroskop einen Punktspot zum Scannen verwendet.

[0032] Die [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) zeigen durchgängig eine Schrägstellung der Detektorzeile **20**, um zu erreichen, daß der Linienfokus LF schräg zur Längs-

achse L der Detektorzeile **20** liegt. Diese gegenseitige Schräglage kann natürlich auch ohne Verkippung der Detektorzeile **20** gegenüber der optischen Achse OA erreicht werden, beispielsweise durch ein geeignetes holographisches Element oder eine schräg gestellte Zylinderoptik.

**[0033]** Auch kann anstelle der Auskopplung der reflektierten Strahlung aus dem Anregungsstrahlengang des Anregungsmoduls **3** auch eine Auskopplung am Detektionsmodul **4** erfolgen, wenn der Hauptfarbteiler HFT rückgestreute Anregungsstrahlung passieren läßt. Eine mögliche Anbaustelle für die Autofokuseinrichtung **22** ist in [Fig. 1](#) mit **30** bezeichnet und durch eine gestrichelte Linie angedeutet.

**[0034]** [Fig. 3](#) zeigt eine schematische Schnittdarstellung durch das Objekt **2**, das mit dem Laserscanningmikroskop **1** der [Fig. 1](#) erfaßt wird. Das Objekt **2** weist einen Objektträger **27** auf, auf dem abgedeckt durch ein Deckglas **28** eine zu mikroskopierende Zellschicht **29** angeordnet ist. Weiter ist exemplarisch die Lage der Fokusebene F dargestellt, die derjenigen Ebene entspricht, die durch die Konfokalitätsbedingung des Detektionsmoduls **4**, d.h. durch die auswählende Wirkung des Pinholes **15** festgelegt ist. Oberhalb der Zellschicht **29** befindet sich ein Übergang zum Deckglas **28**. Ein solcher Glas/Zellschicht-Übergang weist einen Brechzahlssprung auf. Bekanntermaßen wird an einem Brechzahlssprung Strahlung grundsätzlich reflektiert. Der Brechzahlssprung des Übergangs zwischen Deckglas **28** und Zellschicht **29** kann somit als Referenzebene R verwendet werden.

**[0035]** Die Abbildung des Linienfokuses LF in der Autofokuseinrichtung **22** auf die Detektorzeile **20** bewirkt, daß Strahlung, die aus unterschiedlichen Bereichen entlang der optischen Achse OA, auf der der Spot beleuchtet bzw. abgetastet wird, entlang der Detektorzeile **20** aufgefächert wird. Das Ergebnis dieser Auffächerung im Signal der Detektorzeile **20** zeigt [Fig. 4](#).

**[0036]** Der Reflex am Brechzahlssprung der Referenzebene R führt zu einer gesteigerten Strahlungsintensität an einer bestimmten Stelle der Detektorzeile **20**. Im Signal S der Detektorzeile **20** findet sich ein entsprechender Peak, der in [Fig. 4](#) als referenzebenen Peak PR bezeichnet ist. Die in der Meßebene, d.h. der Fokusebene gemessene Struktur der Zellschicht führt ebenfalls zu einem Reflex, der an anderer Stelle auf der Detektorzeile **20** auftritt, d.h. bei anderer x-Koordinate in [Fig. 4](#) und ebenfalls zu einer Erhöhung der Intensität I führt (in [Fig. 4](#) als Fokusebenenpeak PF bezeichnet).

**[0037]** Entlang der Detektorzeile **20**, deren entsprechende x-Koordinate üblicherweise durch die Pixel-

nummer gegeben ist, finden sich also zwei Peaks, nämlich der Fokusebenenpeak PF und der Referenzebenenpeak PR, die um einen Pixelabstand d beabstandet sind. Der Pixelabstand d kann auf einfache Weise in den Abstand D zwischen der Fokusebene F und der Referenzebene R umgerechnet werden. Dazu ist zum einen der Abbildungsmaßstab der optischen Abbildung zu berücksichtigen. Zum anderen spielt die Schrägstellung der Detektorzeile **20**, d.h. der Winkel  $\alpha$  zwischen Linienfokus LF und Längsebene L der Detektorzeile **20**, eine Rolle.

**[0038]** Die Breite jedes Peak wird durch den Schärfentiefebereich des Objektivs **6** bestimmt. Sie kann bei der Ermittlung des Schwerpunktes des Fokusebenenpeaks PF sowie des Referenzebenenpeaks PR eingehen. Weiter kann bei der Peak- bzw. Schwerpunktsbestimmung ein Grundverlauf des Signals S berücksichtigt werden, der von der Intensitätsverteilung herrührt, die im Linienfokus LF grundsätzlich gegeben ist. Bei einem Gaußförmig beleuchteten Spot wird man z.B. diese Gaußverteilung auch im Linienfokus LF wiederfinden. Analoges gilt natürlich für andere Intensitätsverteilungen im beleuchteten Spot.

**[0039]** Die Ermittlung des Abstandes D wird im Ausführungsbeispiel der [Fig. 1](#) von einem Steuergerät **21** vorgenommen, das sowohl das Signal der Detektorzeile **20** ausliest, als auch den Antrieb A zur Fokuserstellung des Objektivs **6** entsprechend ansteuert. Das Steuergerät ermittelt weiter die Peak-Schwerpunkte, den Peak-Abstand d und steuert die Einstellung des Abstandes D auf ein bestimmtes Maß.

**[0040]** Die dargestellte Bauweise zeigt ein Laserscanningmikroskop **1** mit punktförmiger Rasterung. Das Autofokusverfahren ist jedoch auch bei linienförmiger Rasterung einsetzbar, wobei dann da die Linienform der Strahlung ohne anamorphotische Abbildung bereits gegeben ist.

## Patentansprüche

1. Lichtrastermikroskop mit einem Anregungs- und einem Detektionsstrahlengang, Mitteln (**9**) zur rasternden Abtastung eines Objektes (**2**) durch Verschieben eines abgebildeten Spot-, Linien- oder Multispotbereiches über das Objekt (**2**) und einem den Spot-, Linien- oder Multispotbereich abbildenden Objektiv (**6**), wobei für das Objektiv (**6**) ein Fokusverstellmechanismus (A) vorgesehen ist, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine in den Anregungs- oder Detektionsstrahlengang (**3, 4**) eingekoppelte Autofokuseinrichtung (**22**) zum Erfassen einer Lage der Fokusebene (F) des Objektivs (**6**) vorgesehen ist, die unterschiedliche Tiefenbereiche am abgebildeten Spot-, Linien- oder Multispotbereich auf unterschiedliche Orte eines ortsauflösenden Detektors (**20**) abbildet.

2. Lichtrastermikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Autofokuseinrichtung (22) eine längs einer Längsachse (L) verlaufende Detektorzeile (20) mit vorgeschalteter Optik (19) aufweist, wobei die Detektorzeile (20) mit ihrer Längsachse (L) zur optischen Achse (OA) verkippt ist und die Optik (19) die ausgekoppelte Strahlung zu einem Linienfokus (LF) bündelt, der im wesentlichen in der von der Längsachse (L) und der optischen Achse (OA) aufgespannten Ebene liegt, so daß der Linienfokus (LF) längs der Detektorzeile (20) verläuft.

3. Lichtrastermikroskop nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Lichtrastermikroskop einen Spot abbildet und die Optik (19) eine Zylinderlinse (23), eine torische Linse (24) oder eine Kombination aus einem eindimensionalen holographischen Diffusor (26) mit einer sphärischen Linse (25) aufweist.

4. Lichtrastermikroskop nach einem der obigen Ansprüche, gekennzeichnet durch eine Steuereinheit (21), die Signale (S) der Autofokuseinrichtung (22) ausliest und den Fokusverstellmechanismus (A) ansteuert.

5. Lichtrastermikroskop nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Steuereinheit (21) aus den Signalen (S) ein Maß für einen Abstand (D) zwischen der Fokusebene (F) des Objektivs (6) und einer Referenzebene (R) am Objekt (2) ermittelt.

6. Lichtrastermikroskop nach Anspruch 4 oder 5 jeweils in Kombination mit Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Steuereinheit (21) die von der anamorphotischen Optik (19) bewirkte Intensitätsverteilung längs des Linienfokus (LF) berücksichtigt.

7. Lichtrastermikroskop nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Steuereinheit (21) die Fokusebene (F) in einem konstanten oder gezielt eingestellten Abstand (D) zur Referenzebene (R) hält.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen



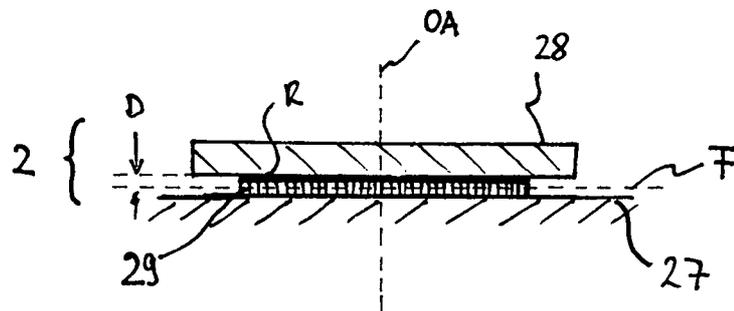


Fig. 3

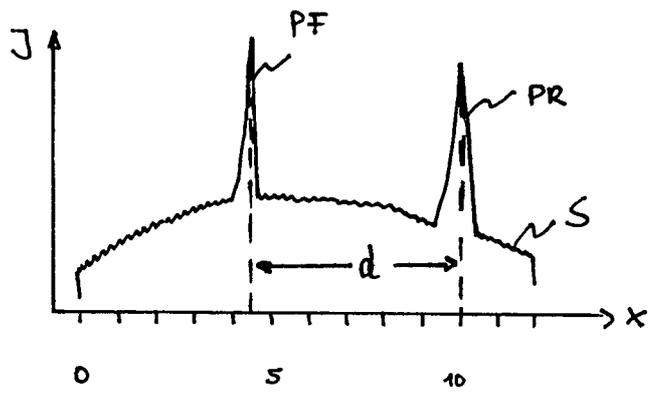


Fig. 4