



(19)
 Bundesrepublik Deutschland
 Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2007 017 598 A1** 2008.10.16

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2007 017 598.3**

(22) Anmeldetag: **13.04.2007**

(43) Offenlegungstag: **16.10.2008**

(51) Int Cl.⁸: **G02B 21/06** (2006.01)

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

(72) Erfinder:
**Westphal, Peter, Dr., 07743 Jena, DE; Lippert,
 Helmut, Dr., 07743 Jena, DE; Radt, Benno, Dr.,
 07743 Jena, DE**

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht zu
 ziehende Druckschriften:

DE 103 19 182 A1

DE 101 53 113 A1

DE 101 27 284 A1

DE 37 28 257 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

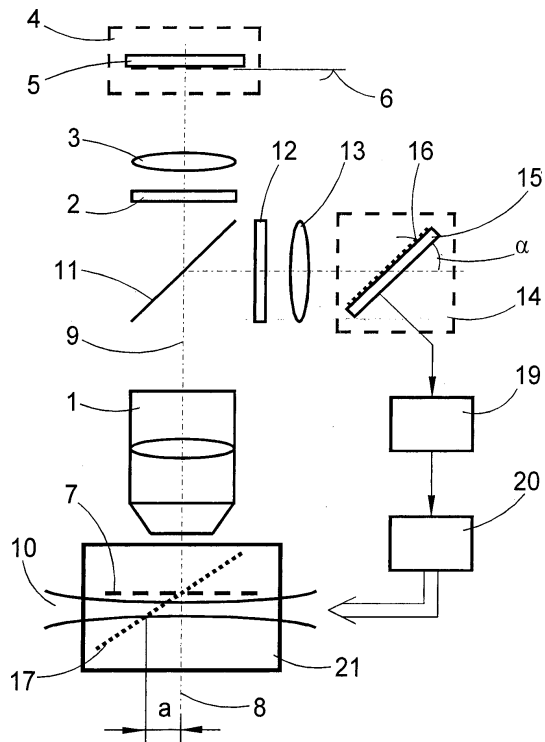
Rechercheantrag gemäß § 43 Abs. 1 Satz 1 PatG ist gestellt.

(54) Bezeichnung: **Verfahren und Anordnung zum Positionieren eines Lichtblattes in der Fokusebene einer Detektionsoptik**

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren und eine Anordnung zum Positionieren eines Lichtblattes (10) in der Fokusebene (7) bei der Untersuchung einer Probe nach der Methode der Selective-Plane-Illumination-Microscopy (SPIM).

Erfindungsgemäß sind folgende Verfahrensschritte vorgesehen:

- Abbilden einer mit dem Lichtblatt (10) einen Winkel $0^\circ < \alpha < 90^\circ$ einschließenden zweiten Fokusebene (17) auf einen ortsauflösenden Detektor (15),
- Ermitteln der Ist-Position des maximalen Kontrastes oder der maximalen Intensität in der Abbildung der zweiten Fokusebene (17), wobei die Ist-Position dem Schnittpunkt des Lichtblattes (10) mit der zweiten Fokusebene (17) entspricht,
- Bestimmen des Abstandes a' zwischen der Ist-Position und der Soll-Position des maximalen Kontrastes oder der maximalen Intensität in dieser Abbildung, wobei die Soll-Position dem Schnittpunkt der beiden Fokusebenen (7, 17) entspricht, und
- Verschieben des Lichtblattes (10) oder der Detektionsoptik (1), bis der Abstand a' zwischen der Ist-Position und der Soll-Position gleich Null ist.



Beschreibung

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zum Positionieren des zu einem Lichtblatt geformten Beleuchtungsstrahles bei der Untersuchung einer Probe nach der Methode der Selective-Plane-Illumination-Microscopy (SPIM). Die Erfindung bezieht sich weiterhin auf eine Anordnung zum Ausüben dieses Verfahrens.

[0002] Im Unterschied zur konfokalen Laser-Scanning-Microscopy (LSM), bei der eine dreidimensionale Probe in einzelnen, unterschiedlich tiefen Ebenen Punkt für Punkt abgetastet wird und die dabei gewonnenen Bildinformationen nachfolgend zu einer dreidimensionalen Abbildung der Probe zusammengesetzt werden, beruht die SPIM-Technologie auf der Weitfeld-Mikroskopie und ermöglicht die bildliche Darstellung der Probe auf der Grundlage von optischen Schnitten durch einzelne Ebenen der Probe.

[0003] Die Vorteile der SPIM-Technologie bestehen unter anderem in der größeren Geschwindigkeit, mit der die Erfassung der Bildinformationen erfolgt, der geringeren Gefahr des Ausbleichens von biologischen Proben sowie in der Möglichkeit, die laterale Auflösung der Abbildung unabhängig von der Tiefenauflösung einstellen zu können.

[0004] Prinzipiell werden bei der SPIM-Technologie Fluorophore, die an sich in der Probe enthalten sind oder zur Kontrastierung in die Probe eingebracht wurden, mit Laserlicht angeregt, wobei die Laserstrahlung zu einem so genannten „Lichtblatt“ geformt ist. Mit dem Lichtblatt wird jeweils eine ausgewählte Ebene in der Tiefe der Probe beleuchtet und mit einer Abbildungsoptik ein Bild dieser Probenebene in Form eines optischen Schnittes gewonnen. Das Lichtblatt kann auch durch schnelles Hin- und Herbewegen eines dünnen, rotationssymmetrischen Laserstrahls in der Fokusebene der Abbildungsoptik nachgebildet werden, was im Wesentlichen zur Anregung mit einem statischen Lichtblatt äquivalent ist.

[0005] Ein Beispiel für die SPIM-Methode ist aus WO 2004/053558 A1 bekannt. Hierbei wird die zu untersuchende Probe, beispielsweise ein Medaka-Embryo, in ein wässriges Gel eingebettet, in dem sie eine gewisse Zeit weiterlebt, aber dabei nahezu bewegungsunfähig ist.

[0006] Um die Geometrie des Lichtblattes zu verdeutlichen sei im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung angenommen, dass das Lichtblatt eine senkrecht zur optischen Achse der Detektionsoptik in den Koordinaten X und Y ausgedehnte, an das Objektfeld angepasste Länge und Breite und eine in der Richtung der optischen Achse der Detektionsoptik bzw. in der Koordinatenrichtung Z sich erstreckende Dicke hat, die im Bereich von 0,5 μm bis 20 μm liegt.

Dabei ist in der Regel die Dicke nicht über die gesamte Länge konstant, sondern weist eine mittige, als Strahltaille bezeichnete Einschnürung auf.

[0007] Ein immer wiederkehrendes praktisches Problem bei der Untersuchung von Proben nach der SPIM-Methode besteht darin, dass das Lichtblatt möglichst exakt in die Fokusebene der Detektionsoptik gebracht werden muss, um optimale Ergebnisse bei der Abbildung der beleuchteten Probenebene und der nachfolgenden Auswertung dieser Probenebene erzielen zu können. Ein wesentlicher Grund für die sich dabei ergebenden Schwierigkeiten besteht darin, dass die Proben typischerweise von einem Gel umschlossen und gemeinsam mit diesem Gel von einem wässrigen Medium umgeben sind.

[0008] Dabei kann der Raum zwischen der Detektionsoptik und der Probe vollständig mit einem wässrigen Medium und/oder mit Gel gefüllt sein, oder es verbleibt ein luftgefüllter Teilraum zwischen der Detektionsoptik und der sich innerhalb einer Probenkammer befindenden Probe. Je nach Verwendung derselben Detektionsoptik ergeben sich aufgrund der unterschiedlichen Brechungsindizes von Gel, wässrigem Medium und Luft Lageabweichungen für die Fokusebene.

[0009] Im Stand der Technik erfolgt die Positionierung des Lichtblattes in der Fokusebene der Detektionsoptik bisher durch visuelle, subjektive Beurteilung anhand des Kontrastes in der Probenabbildung. Ob dabei die optimale Einstellung erreicht wird, hängt weitestgehend vom Empfinden des Beobachters ab. Außerdem ist die Handhabung dabei zeitraubend und der Vorgang kaum reproduzierbar.

[0010] Von diesem Stand der Technik ausgehend liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren und eine Anordnung anzugeben, mit denen das Lichtblatt in unkomplizierter und zeitsparender Weise reproduzierbar und weitestgehend frei von subjektiven Einflüssen in die Fokusebene der Detektionsoptik gebracht werden kann.

[0011] Bei einem Verfahren zum Positionieren des Lichtblattes in der Fokusebene der Detektionsoptik der eingangs beschriebenen Art ist erfindungsgemäß vorgesehen, dass:

- eine objektseitige, mit der optischen Achse und dem Lichtblatt jeweils einen Winkel α im Bereich $0^\circ < \alpha < 90^\circ$ einschließende zweite Fokusebene auf einen ortsauflösenden Detektor mit einer zur zweiten Fokusebene konjugierten Empfangsebene abgebildet wird,
- der Kontrast oder die Intensität in dieser Abbildung bewertet wird, und
- das Lichtblatt oder die Detektionsoptik in der Richtung der optischen Achse verschoben wird, bis die Bewertung ergibt, dass das Lichtblatt die

erste Fokusebene überdeckt.

[0012] In einer ersten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens sind bezüglich der Bewertung des Kontrastes folgende Verfahrensschritte vorgesehen:

- a) Ermitteln der Ist-Position des maximalen Kontrastes oder der maximalen Intensität in der Abbildung der zweiten Fokusebene, wobei die Ist-Position dem Schnittpunkt des Lichtblattes mit der zweiten Fokusebene entspricht,
- b) Bestimmen des Abstandes zwischen der Ist-Position und der Soll-Position des maximalen Kontrastes oder der maximalen Intensität in dieser Abbildung, wobei die Soll-Position dem Schnittpunkt der beiden Fokusebenen mit der optischen Achse entspricht, und
- c) Verschieben des Lichtblattes oder der Detektionsoptik in der Richtung der optischen Achse, bis der Abstand zwischen der Ist-Position und der Soll-Position gleich Null ist.

[0013] In einer zweiten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist vorgesehen, dem Lichtblatt eine Struktur aus einem senkrecht zu seiner Ausbreitungsrichtung periodischen Intensitätsprofil aufzuprägen, und das so strukturierte Lichtblatt in der Richtung der optischen Achse zu verschieben, bis der Kontrast in der Abbildung der zweiten Fokusebene sein Maximum erreicht hat. Die Strukturierung des Lichtblattes wird anschließend wieder aufgehoben, um mit einer unstrukturierten Beleuchtung Aufnahmen von der Probe zu erhalten.

[0014] Bei beiden vorgenannten Ausgestaltungen kann vorgesehen sein, dass zunächst mithilfe eines ersten ortsauflösenden Detektors, dessen Empfangsebene zur zweiten Fokusebene konjugiert ist, das Lichtblatt in der ersten Fokusebene positioniert wird. Befindet sich dann das Lichtblatt in der ersten Fokusebene, kann die dort beleuchtete Ebene der Probe zum Zweck der Beobachtung und Auswertung auf einen anderen ortsauflösenden Detektor abgebildet werden, der eine mit einer zur ersten Fokusebene konjugierte Empfangsebene besitzt.

[0015] Da der erste Detektor ausschließlich der Positionierung bzw. der Ausrichtung des Lichtblattes in der ersten Fokusebene dient, muss dieser kein hochqualitatives Bild aufnehmen. Es genügt, hierzu eine kostengünstige CMOS-Kamera mit verhältnismäßig geringer Empfindlichkeit bzw. hohem Rauschfaktor zu verwenden. Gegebenenfalls kann die Intensität der Fluoreszenzstrahlung angehoben werden, um Nachteile auszugleichen, die sich aus der geringen Empfindlichkeit ergeben können.

[0016] Als zweiter Detektor, der zur Abbildung der beleuchteten Probenebene zum Zweck der Beobachtung und Auswertung dient, sollte dagegen eine

hoch lichtempfindliche CCD- oder EMCC-Kamera verwendet werden.

[0017] Im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens liegt es, zum Positionieren des Lichtblattes eine von der Probe ausgehende Fluoreszenzstrahlung einer ersten Wellenlänge/eines ersten Wellenlängenbereichs zu nutzen, und zur Auswertung der mit dem Lichtblatt beleuchteten Ebene der Probe eine von der Probe ausgehende Fluoreszenzstrahlung einer zweiten Wellenlänge/eines zweiten Wellenlängenbereichs zu nutzen.

[0018] Das wird beispielsweise erreicht, indem die Probe mit einer Menge Fluoreszenzbeads versetzt wird, von der bei Anregung mit dem Lichtblatt eine erste Teilmenge die Fluoreszenzstrahlung der ersten Wellenlänge/des ersten Wellenlängenbereichs und eine zweite Teilmenge die Fluoreszenzstrahlung der zweiten Wellenlänge/des zweiten Wellenlängenbereichs abstrahlt.

[0019] Damit ist es möglich, die Verfahrensschritte zur Positionierung des Lichtblattes in der ersten Fokusebene mithilfe des ersten Detektors und die Beobachtung der mit dem Lichtblatt beleuchteten Probenebene mit dem zweiten Detektor simultan vorzunehmen. Es ist lediglich dafür zu sorgen, dass der erste Detektor für die Fluoreszenzstrahlung der einen Wellenlänge/des einen Wellenlängenbereichs sensibel ist und der zweite Detektor für die Fluoreszenzstrahlung der anderen Wellenlänge/des ersten Wellenlängenbereichs.

[0020] Bei einer besonders vorteilhaften Ausgestaltungsvariante des erfindungsgemäßen Verfahrens ist nur ein Detektor vorgesehen, der sowohl zur Positionierung des Lichtblattes in der ersten Fokusebene als auch zum Abbilden der mit dem Lichtblatt beleuchteten Ebene der Probe verwendet wird.

[0021] Dabei wird die Empfangsebene dieses einen Detektors zunächst zum Positionieren des Lichtblattes so ausgerichtet, dass sie zur zweiten Fokusebene konjugiert ist. Im Anschluss an den Positionierungsvorgang wird die Empfangsebene des Detektors so ausgerichtet, dass sie nun zur ersten Fokusebene konjugiert ist. Die Ausrichtung der Empfangsebene kann in vorteilhafter Weise geändert werden, indem diese um ihren Schnittpunkt mit der optischen Achse geschwenkt und so deren Neigung gegenüber der optischen Achse verändert wird. Alternativ kann auch das Lichtblatt anstatt der Empfangsebene des Detektors für den Fokussierungsvorgang geneigt werden.

[0022] Das erfindungsgemäße Verfahren umfasst weiterhin eine Ausgestaltung, bei der zum Positionieren des Lichtblattes alternativ Fluoreszenzlicht genutzt wird, das von der zu untersuchenden Probe ausgeht, oder Fluoreszenzlicht genutzt wird, das von

einer Referenzprobe ausgeht, wobei nach dem Positionieren des Lichtblattes in der ersten Fokusebene die zu untersuchende Probe an die Stelle der Referenzprobe gestellt wird. Als Referenzprobe kann dabei eine homogen fluoreszierende wässrige Lösung, ein mit fluoreszierenden Substanzen durchsetztes Gel oder ein mit fluoreszierenden Substanzen durchsetzter Kunststoff verwendet werden.

[0023] Gegenstand der Erfindung ist weiterhin eine Anordnung zum Positionieren des zu einem Lichtblatt geformten Beleuchtungsstrahles in einer objektseitigen, die optische Achse einer Detektionsoptik schneidenden ersten Fokusebene bei der Untersuchung einer Probe nach der Methode der Selective-Plane-Illumination-Microscopy (SPIM), umfassend:

- eine optische Einrichtung zum Abbilden einer objektseitigen, mit der optischen Achse und dem Lichtblatt jeweils einen Winkel α im Bereich $0^\circ < \alpha < 90^\circ$ einschließenden zweiten Fokusebene auf die Empfangsebene eines ortsauflösenden Detektors,
- eine Auswerteinrichtung zur Bewertung des Kontrastes oder der Intensität in dieser Abbildung, und
- eine Einrichtung zur Positionsänderung des Lichtblattes relativ zur ersten Fokusebene in Abhängigkeit von dieser Bewertung.

[0024] In einer ersten Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Anordnung ist die Auswerteinrichtung ausgebildet

- zum Ermitteln der Ist-Position des maximalen Kontrastes oder der maximalen Intensität in dieser Abbildung, wobei die Ist-Position dem Schnittpunkt des Lichtblattes mit der zweiten Fokusebene entspricht, und
- zum Bestimmen des Abstandes zwischen der Ist-Position und der Soll-Position des maximalen Kontrastes oder der maximalen Intensität in dieser Abbildung, wobei die Soll-Position dem Schnittpunkt der beiden Fokusebenen mit der optischen Achse entspricht, und
- zum Generieren von Stellbefehlen zum Verschieben des Lichtblattes in Abhängigkeit von diesem Abstand.

[0025] Diese erste Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Anordnung ist insbesondere zur Ausführung der weiter oben beschriebenen ersten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeignet.

[0026] Die Einrichtung zur Positionsänderung des Lichtblattes ist zu dessen Verschiebung in der Richtung der optischen Achse der Detektionsoptik, d. h. in Richtung der Koordinate Z, vorgesehen, wobei davon ausgegangen wird, dass das Lichtblatt parallel zur ersten Fokusebene und damit senkrecht zur optischen Achse der Detektionsoptik ausgerichtet ist, je-

doch die erste Fokusebene noch nicht überdeckt, so dass die sich in der ersten Fokusebene befindende Probenebene nicht oder hinsichtlich einer optimalen Beobachtung nur ungenügend beleuchtet wird.

[0027] Insofern wird mit der Verschiebung des Lichtblattes in der Richtung der optischen Achse, die eine Parallelverschiebung des Lichtblattes ist, die Position des Lichtblattes kontinuierlich verändert, bis das Lichtblatt die erste Fokusebene überlagert.

[0028] Optional kann die Einrichtung zur Positionsänderung des Lichtblattes auch zu dessen Verschiebung senkrecht zur optischen Achse der Detektionsoptik, d. h. in Richtung der Koordinate X und/oder der Koordinate Y, ausgelegt sein. Mit dieser Option ergibt sich die Möglichkeit, beispielsweise im Anschluss an die Positionierung in der ersten Fokusebene das Lichtblatt so zu verschieben, dass seine Strahltaile in der Bildfeldmitte liegt. Damit lässt sich die Ausleuchtung der sich in der ersten Fokusebene befindenden Probenebene insofern weiter optimieren, als sich das Kontrast- oder das Intensitätsmaximum nun auch in der Bildfeldmitte befindet.

[0029] Die erfindungsgemäße Anordnung kann über zwei Detektoren verfügen. Einer der Detektoren hat dabei eine zur ersten Fokusebene konjugierte Empfangsebene und ist zum Abbilden der vom Lichtblatt beleuchteten Probenebene vorgesehen. Der andere Detektor besitzt eine zur zweiten Fokusebene konjugierte Empfangsebene und dient als Hilfsmittel zur Positionierung des Lichtblattes in der ersten Fokusebene. Der Detektionsstrahlengang ist in diesem Fall so verzweigt, dass einer der Zweige auf die Empfangsebene des einen Detektors und der zweite Zweig auf die Empfangsebene des anderen Detektors gerichtet sind.

[0030] Die Verfahrensschritte zur Positionierung des Lichtblattes in der ersten Fokusebene einerseits und die Abbildung der sich in der ersten Fokusebene befindenden Probenebene zum Zweck der Beobachtung und Auswertung andererseits werden mit dieser Ausgestaltungsvariante der erfindungsgemäßen Anordnung mit voneinander unabhängigen Detektoren vorgenommen.

[0031] In diesem Zusammenhang kann vorgesehen sein, dass die Probe bei Anregung mit dem Lichtblatt Fluoreszenzlicht mit Wellenlängen/Wellenlängenbereichen abstrahlt, für die der erste Detektor sensibel ist, und zugleich Fluoreszenzlicht mit Wellenlängen/Wellenlängenbereichen abstrahlt, für die der zweite Detektor sensibel ist, wodurch es möglich ist, die Verfahrensschritte zur Positionierung des Lichtblattes und die Beobachtung der mit dem Lichtblatt beleuchteten Probenebene simultan vorzunehmen.

[0032] Alternativ dazu wird aber auch eine Ausge-

staltungsvariante der erfindungsgemäßen Anordnung vorgeschlagen, bei der nur ein Detektor vorhanden und dieser mit einer Vorrichtung zum Verkippen seiner Empfangsebene um deren Schnittpunkt mit der optischen Achse des Abbildungsstrahlengangs gekoppelt ist. Damit wird erreicht, dass in einer Endlage der Verkipfung die Empfangsebene zur zweiten Fokusebene konjugiert ist und der Detektor so als Hilfsmittel zur Positionierung des Lichtblattes zur zweiten Fokusebene zur Verfügung steht, und in einer anderen Endlage der Verkipfung die Empfangsebene zur ersten Fokusebene konjugiert und der Detektor zur Abbildung und Auswertung der mit dem Lichtblatt beleuchteten Probenebene nutzbar ist.

[0033] Hier ist zwar nur ein Detektor erforderlich, jedoch ist die Verwendung dieses Detektors zur Positionierung des Lichtblattes einerseits und zur Probenbeobachtung andererseits nur zeitlich aufeinander folgend möglich.

[0034] Bestandteil der erfindungsgemäßen Anordnung kann auch eine Referenzprobe sein, die als Hilfsmittel zum Positionieren des Lichtblattes in der ersten Fokusebene dient. Dabei sollte bei Anregung mit dem Lichtblatt von der Referenzprobe eine Fluoreszenzstrahlung derselben Wellenlänge/desselben Wellenlängenbereichs ausgehen, wie bei Anregung der zu untersuchenden Probe mit dem Lichtblatt. Eine Ausnahme davon ist selbstverständlich für die Ausgestaltungsvariante denkbar, bei der zwei auf unterschiedliche Fluoreszenzstrahlung geeichte Detektoren genutzt werden, wie weiter oben beschrieben.

[0035] Als Referenzprobe kann eine homogen fluoreszierende wässrige Lösung, ein mit fluoreszierenden Substanzen durchsetztes Gel oder ein mit fluoreszierenden Substanzen durchsetzter Kunststoff vorgesehen sein.

[0036] Bei der Variante mit Kunststoff steht zum Positionieren des Lichtblattes und damit zum Kalibrieren der erfindungsgemäßen Anordnung eine stets wieder verwendbare Referenzprobe mit großer Haltbarkeitsdauer zur Verfügung.

[0037] Zum Zweck der spektralen Unterdrückung von gestreutem Anregungslicht und damit zur Erhöhung der Genauigkeit bei der Bewertung des Kontrastes bzw. der Intensität bei der Positionierung und auch zur Erhöhung der Abbildungsqualität der beleuchteten Probenebene können im Detektionsstrahlengang vor den Empfangsebenen Fluoreszenzfilter angeordnet sein, die nur das für den jeweiligen Detektor bestimmte Fluoreszenzlicht passieren lassen.

[0038] Die ortsauflösenden Detektoren bestehen vorteilhaft aus einzelnen, in der Empfangsebene liegenden und in einem Array aus Zeilen und Spalten angeordneten optoelektronischen Sensoren, deren

Signalausgänge mit der Auswerteeinrichtung in Verbindung stehen. Diesbezüglich kommen zum Positionieren des Lichtblattes Detektoren in Betracht, die mit einer Anzahl von 2 bis 2000 Sensorzeilen, bevorzugt mit einer Anzahl von 20 bis 200 Sensorzeilen, zweidimensionale Bilder aufnehmen können.

[0039] Der Winkel α , den die bildseitige Fokusebene mit der optischen Achse der Detektionsoptik einschließt, sollte im Bereich zwischen 20° und 70° , vorzugsweise bei 40° liegen.

[0040] Der Aufbau einer zweiten Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Anordnung, die insbesondere zur Ausführung der weiter oben beschriebenen zweiten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeignet ist, entspricht teilweise dem Aufbau der ersten Ausgestaltung der Anordnung. Allerdings ist hierbei die Verwendung einer Referenzprobe in Form einer Kalibrierkammer vorgesehen, die mit einer homogen fluoreszierenden wässrigen Lösung gefüllt ist, und in den Beleuchtungsstrahlengang sind optische Mittel gestellt, mit denen dem Lichtblatt eine Struktur aus einem periodischen Intensitätsprofil aufgeprägt wird. Das periodische Intensitätsprofil kann durch Einbringen eines Amplituden- oder Phasengitters in den Beleuchtungsstrahlengang erreicht werden.

[0041] In diesem Fall ist die Auswerteeinheit zur Bewertung des Gitterkontrastes in der Abbildung der zweiten Fokusebene ausgebildet, und in Abhängigkeit vom Ergebnis dieser Bewertung wird das Lichtblatt soweit in Koordinatenrichtung Z verschoben, bis der Gitterkontrast sein Maximum erreicht hat. Der maximale Gitterkontrast entsteht genau dann, wenn sich das strukturierte Lichtblatt in der Fokusebene befindet. Das strukturierte Lichtblatt kann auch dadurch nachgebildet werden, dass ein dünner, rotationssymmetrischer Laserstrahl hin- und herbewegt und dabei mit noch höherer Frequenz periodisch ein- und ausgeschaltet wird.

[0042] Nach der Positionierung wird an die Stelle die Kalibrierkammer die zu beobachtende Probe gestellt. Zugleich werden die optischen Mittel aus dem Beleuchtungsstrahlengang entfernt, mit denen dem Lichtblatt das periodische Intensitätsprofil aufgeprägt wurde, sodass diese Struktur aufgehoben ist und das Lichtblatt nun eine homogene Intensitätsverteilung aufweist. Jetzt kann die Ebene der Probe aufgenommen werden, die sich in der ersten Fokusebene befindet.

[0043] Die Erfindung soll nachfolgend anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert werden. In den zugehörigen Zeichnungen zeigen

[0044] [Fig. 1](#) das Prinzip der erfindungsgemäßen Anordnung in einer Ausgestaltung mit zwei Detektoren,

[0045] [Fig. 2](#) eine Darstellung der mit einem der Detektoren aufgenommenen Intensitätsverteilung in der Abbildung der zweiten Fokusebene,

[0046] [Fig. 3](#) das Prinzip der erfindungsgemäßen Anordnung in einer Ausgestaltung mit einem Detektor,

[0047] [Fig. 4](#) das Prinzip der erfindungsgemäßen Anordnung in einer Ausgestaltung mit einem strukturierten Lichtblatt,

[0048] [Fig. 5](#) eine Darstellung der mit einem der Detektoren aufgenommenen Intensität bei Verwendung der Ausgestaltung nach [Fig. 4](#).

[0049] Aus [Fig. 1](#) ist zunächst der prinzipielle Aufbau einer mikroskopischen Einrichtung zur Beobachtung einer Probe nach der Methode der Selective-Plane-Illumination-Microscopy (SPIM) ersichtlich. Hierzu gehören als wesentliche Baugruppen ein Detektionsobjektiv **1**, ein Fluoreszenzfilter **2**, eine Tubusoptik **3** und eine Kamera **4**, beispielsweise eine CCD-Kamera. Die Kamera **4** weist einen Detektor **5** auf, der aus einzelnen, in einem Array aus Zeilen und Spalten angeordneten und eine Empfangsebene **6** bildenden optoelektronischen Sensoren besteht, sodass die Kamera **4** zur Aufnahme von zweidimensionalen Bildern geeignet ist. Das Array weist beispielhaft 1000 bis 5000 Zeilen und ebenso viele Spalten auf, wobei für den Positioniervorgang vorteilhaft nur ein Teil der Zeilen oder Spalten verwendet wird, um den Vorgang zu beschleunigen.

[0050] Die Fokusebene **7** schneidet die optische Achse **8** des Detektionsobjektivs **1** im rechten Winkel. Die Empfangsebene **6** befindet sich in einer zur Fokusebene **7** des Detektionsobjektivs **1** optisch konjugierten Position.

[0051] Befindet sich eine fluoreszierende Substanz in der Fokusebene **7** und wird diese mit einer Anregungsstrahlung, beispielsweise der Wellenlänge 488 nm, zum Fluoreszieren angeregt, wird von der Fokusebene **7** ausgehende Fluoreszenzstrahlung vom Detektionsobjektiv **1** aufgesammelt und im Abbildungsstrahlengang durch das Fluoreszenzfilter **2** und die Tubusoptik **3** hindurch auf die Empfangsebene **6** des Detektors **5** gerichtet.

[0052] Die Signalausgänge der optoelektronischen Sensoren des Detektors **5** sind mit einer elektronischen Bildverarbeitungs- und -auswerteeinrichtung verbunden (zeichnerisch nicht dargestellt).

[0053] Mit dieser Anordnung wird ein zweidimensionales Abbild der sich in der Fokusebene **7** befindenden fluoreszierenden Substanz generiert und somit die Beobachtung einer in der Fokusebene **7** liegenden Ebene einer insbesondere biologischen Probe

ermöglicht.

[0054] Voraussetzung dafür ist allerdings, dass genau die in der Fokusebene **7** liegende und abzubildende Ebene der Probe mit der Anregungsstrahlung beleuchtet wird. Typischerweise erfolgt diese Anregung bei der SPIM-Technologie mit einem zu einem Lichtblatt **10** geformten Beleuchtungsstrahlengang.

[0055] Das in [Fig. 1](#) angedeutete Lichtblatt **10** weist eine in der Richtung der optischen Achse **8** bzw. der Koordinate Z gemessene Dicke im Bereich zwischen 0,5 μm bis 20 μm auf. Seine Ausdehnung in der Koordinate X, die in der Zeichenebene liegt, und in der Koordinate Y, die sich senkrecht zur Zeichenebene erstreckt, entspricht der Ausdehnung des mikroskopisch zu beobachtenden Feldes in der Fokusebene **7**.

[0056] Das bisher im Stand der Technik unzureichend gelöste Problem besteht darin, das Lichtblatt **10** möglichst exakt in eine Position zu bringen, in der die Fokusebene **7** vom Lichtblatt **10** vollständig überdeckt wird.

[0057] Wie in [Fig. 1](#) dargestellt, ist das Lichtblatt **10** zwar parallel zur Fokusebene **7** ausgerichtet, überdeckt diese jedoch nicht.

[0058] Diesbezüglich ist erfindungsgemäß vorgesehen, im Abbildungsstrahlengang zwischen dem Detektionsobjektiv **1** und dem Fluoreszenzfilter **2** einen Strahlteiler **11**, beispielsweise ein Dichroit, anzuordnen, der einen Teil des dem Abbildungsstrahlengangs bildenden Fluoreszenzlichtes auskoppelt und durch einen zweiten Fluoreszenzfilter **12** und eine zweite Tubusoptik **13** hindurch auf eine zweite Kamera **14**, hier beispielsweise eine CMOS-Kamera, richtet, die einen Detektor **15** aufweist, der wiederum aus in Zeilen und Spalten angeordneten einzelnen optoelektronischen Sensoren besteht, die gemeinsam eine Empfangsebene **16** bilden. Die Empfangsebene **16** schließt mit der optischen Achse **8** der Detektionsoptik **1** einen Winkel α ein, der beispielsweise zwischen 20° und 70° liegt und im beschriebenen Ausführungsbeispiel 40° betragen soll.

[0059] Die Empfangsebene **16** befindet sich in einer zu einer Fokusebene **17** optisch konjugierten Position.

[0060] Wie aus [Fig. 1](#) ersichtlich, schneidet bei dieser Konstellation die Fokusebene **17** auch das Lichtblatt **10**, wobei dieser Schnittpunkt um einen Betrag a von der optischen Achse **8** der Detektionsoptik **1** entfernt ist.

[0061] Wird nun die Fokusebene **17** auf die Empfangsebene **16** des Detektors **15** der Kamera **14** abgebildet, so ergibt sich die in [Fig. 2a](#) dargestellte In-

tensitätsverteilung auf einer exemplarisch herausgenommenen Sensorzeile der Empfangsebene **16**. Die in **Fig. 2a** zu erkennende Ist-Position des Intensitätsmaximums **18** entspricht der Position des Schnittpunktes des Lichtblattes **10** mit der Fokusebene **17**.

[0062] In **Fig. 2a** ist weiterhin der Schnittpunkt der beiden Fokusebene **7** und **17** miteinander und mit der optischen Achse **8** insofern definiert, als diese Position bestimmten optoelektronischen Sensoren auf dieser Sensorzeile zugeordnet ist. Diese Position ist die Soll-Position des Intensitätsmaximums. Insofern ist der Abstand a' in **Fig. 2a** proportional zum Abstand a in **Fig. 1** und damit ein Maß für die Ablage des Lichtblattes **10** von der Fokusebene **7**.

[0063] Die Signalausgänge der optoelektronischen Sensoren des Detektors **15** liegen an einer Auswerteeinheit **19** an, in der die Ist-Position des Intensitätsmaximums mit dessen Sollposition verglichen wird. Der Ausgang der Auswerteeinheit **19** ist mit einer Stelleinrichtung **20** gekoppelt, die über Stellelemente verfügt, die zur Verschiebung des Lichtblattes **10** in der Richtung der optischen Achse **8** bzw. in der Koordinatenrichtung Z ausgebildet sind (zeichnerisch nicht dargestellt).

[0064] Ergibt die Auswertung der Intensitätsverteilung in **Fig. 2a** beispielsweise die in **Fig. 1** gezeichnete Ablage des Lichtblattes **10** zur Fokusebene **7**, werden in der Auswerteeinheit **19** Stellbefehle generiert und an die Stelleinrichtung **18** weitergeleitet, die eine Parallelverschiebung des Lichtblattes **10** zur Fokusebene **7** hin bewirken. Alternativ kann auch die Detektionsoptik **1** in Richtung seiner optischen Achse verschoben werden.

[0065] Die kontinuierliche Auswertung dieser Intensitätsverteilung während dieser Verschiebung ermöglicht es, die Verringerung des Abstandes a' zu verfolgen, bis sich schließlich das Intensitätsmaximum **18** an seiner Sollposition befindet, wie in **Fig. 2b** gezeigt. Dies ist dann der Fall, wenn das Lichtblatt **10** die Fokusebene **7** überdeckt.

[0066] Damit ist die Aufgabe der Erfindung gelöst, nämlich das Lichtblatt **10** unabhängig von subjektiven Einflüssen eines Beobachters zur Deckung mit der Fokusebene **7** zu bringen.

[0067] In der Anordnung nach **Fig. 1** kann zur Abbildung der Fokusebene **17** auf die Empfangsebene **16** der Kamera **15** die Fluoreszenzstrahlung genutzt werden, die von der zu untersuchenden Probe ausgeht.

[0068] Dabei kann vorgesehen sein, dass die Probe bei Anregung mit dem Lichtblatt **10** Fluoreszenzlicht mit Wellenlängen oder Wellenlängenbereichen abstrahlt, für die der erste Detektor sensibel ist, und zu-

gleich Fluoreszenzlicht mit Wellenlängen oder Wellenlängenbereichen abstrahlt, für die der zweite Detektor sensibel ist. So ist es möglich, beide Kameras **5**, **15** simultan zu nutzen und die Verfahrensschritte zur Positionierung des Lichtblattes **10** und die Beobachtung der mit dem Lichtblatt **10** beleuchteten Probenebene simultan vorzunehmen.

[0069] In einer alternativen Variante der Erfindung kann dazu auch eine Fluoreszenzstrahlung dienen, die von einer Referenzprobe ausgeht. In der Darstellung nach **Fig. 1** jedoch ist die Verwendung einer Referenzprobe vorgesehen, die sich in einer Kalibrierkammer **21** befindet. Zu diesem Zweck ist die Kalibrierkammer **21** mit einer fluoreszierenden Substanz gefüllt, beispielsweise mit einem mit Fluoreszenzbeads durchsetzten Gel oder mit einem mit Fluoreszenzbeads durchsetzten Kunststoff.

[0070] Eine solche Referenzprobe ist vorteilhaft wieder verwendbar, hat dabei eine hohe Lebensdauer, und die Verfahrensschritte bei der Positionierung des Lichtblattes **10** in der Fokusebene **7** sind mit einer solchen Referenzprobe in höchstem Grade reproduzierbar.

[0071] Nach der Positionierung des Lichtblattes **10** mit Hilfe der Kalibrierkammer **21** wird an deren Stelle die zu untersuchende Probe gestellt, und es kann mit der Untersuchung der Probenebene begonnen werden, die sich in der Fokusebene **7** befindet.

[0072] **Fig. 3** zeigt ein Ausführungsbeispiel der erfindungsgemäßen Anordnung, bei der im Gegensatz zu der Anordnung nach **Fig. 1** lediglich die Kamera **4** vorhanden und diese sowohl zur Positionierung des Lichtblattes **10** in der Fokusebene **7** als auch zur Abbildung und Auswertung der jeweils in die Fokusebene **7** gestellten Probenebene vorgesehen ist.

[0073] Der Übersichtlichkeit halber werden in **Fig. 3** für Baugruppen, die bereits in **Fig. 1** dargestellt sind, auch dieselben Bezugszeichen wie in **Fig. 1** verwendet.

[0074] Im Unterschied zu der Anordnung nach **Fig. 1** ist bei der Anordnung nach **Fig. 3** die Kamera **4**, beispielsweise wiederum die CCD-Kamera, schwenkbar angeordnet, und zwar so, dass der Winkel, den die Empfangsebene **6** der Kamera **4** mit der optischen Achse **9** des Abbildungsstrahlengangs einschließt, in zwei Endlagen veränderbar ist.

[0075] In einer ersten Endlage ist die Empfangsebene **6** so geneigt, dass sie mit optischen Achse **9** den Winkel α einschließt, sodass sie zur Fokusebene **17** optisch konjugiert ist.

[0076] In dieser Konstellation dient die Kamera **4** zur Positionierung des Lichtblattes **10** in der Fokuse-

bene 7, wie anhand [Fig. 1](#) beschrieben. Zu diesem Zweck ist sie zumindest während des Ablaufs der Verfahrensschritte zur Positionierung des Lichtblattes 10 mit der Auswerteeinrichtung 19 verbunden. Die dabei mittels der Kamera 4 entstehende Abbildung ergibt wieder die Intensitätsverteilung in der Fokusebene 17 wie in [Fig. 2a](#) dargestellt. Diese Intensitätsverteilung wird in der Auswerteeinheit 19 ausgewertet, und es werden Stellbefehle generiert und an die Stelleinrichtung 20 übermittelt, die mittels (zeichnerisch nicht dargestellter) Stellelemente die Verschiebung des Lichtblattes 10 in Richtung der optischen Achse 8 bewirken.

[0077] In einer alternativen konstruktiven Ausführung der erfindungsgemäßen Anordnung können die Stellbefehle dazu genutzt werden, an Stelle der Verschiebung des Lichtblattes 10 eine Verschiebung der Detektionsoptik 1 in der Richtung der optischen Achse 8 zu veranlassen, bis der Abstand $a' = 0$ ist und sich Lichtblatt 10 und Fokusebene 7 überdecken.

[0078] Nachdem die Positionierung des Lichtblattes 10 abgeschlossen ist, wird entweder manuell, vorzugsweise jedoch durch ebenfalls in der Auswerteeinheit 19 generierte Stellbefehle veranlasst, die Kamera 4 so verkippt, dass deren Empfangsebene 6 die optische Achse 9 des Abbildungsstrahlengangs im rechten Winkel schneidet, sodass diese nun zur Fokusebene 7 optisch konjugiert ist.

[0079] In dieser Ausrichtung dient die Kamera 4 zur Abbildung der sich jeweils in der Fokusebene 7 befindenden Ebene einer zu untersuchenden Probe. Wie bereits weiter oben beschrieben, ist auch hier die Positionierung des Lichtblattes 10 in der Fokusebene 7 alternativ anhand der Nutzung der von einer Referenzprobe in der Kalibrierkammer 21 ausgehenden Fluoreszenzstrahlung oder anhand der Nutzung der von der zu untersuchenden Probe ausgehenden Fluoreszenzstrahlung möglich.

[0080] In [Fig. 4](#) ist das Prinzip eines Ausführungsbeispiels der erfindungsgemäßen Anordnung dargestellt, deren Aufbau im Wesentlichen dem Aufbau nach [Fig. 1](#) entspricht. Allerdings wird hier eine Kalibrierkammer 21 verwendet, die mit einer homogen fluoreszierenden wässrigen Lösung als Referenzprobe gefüllt ist. Außerdem sind in den Beleuchtungsstrahlengang optische Mittel gestellt, mit denen dem Lichtblatt 10 eine Struktur aus einem senkrecht zu seiner Ausbreitungsrichtung, die der Koordinatenrichtung Y entspricht, ein periodisches Intensitätsprofil aufgeprägt wird.

[0081] Die Mittel zur Erzeugung einer solchen Struktur sind aus dem Stand der Technik hinreichend bekannt. So kann zum Beispiel mit einem Phasengitter oder einem Amplitudengitter erreicht werden, dass das Lichtblatt 10 senkrecht zu seiner Ausbrei-

tungsrichtung abwechselnd helle und dunkle Bereiche aufweist. Das Gitter kann elektronisch steuerbar ausgeführt (z. B. LCD, DMD) oder mechanisch ein- und ausschwenkbar angeordnet sein.

[0082] Aufgrund der Neigung der Fokusebene 17 wird das strukturierte Lichtblatt 10 mit Hilfe der Kamera 15 partiell wiedergegeben, wie beispielhaft in [Fig. 5a](#) gezeigt. Mittels der Auswerteeinheit 19 wird der Gitterkontrast ausgewertet, und in Abhängigkeit vom Ergebnis dieser Auswertung wird das Lichtblatt 10 soweit in Koordinatenrichtung Z verschoben, bis der Gitterkontrast sein Maximum erreicht hat. Der maximale Gitterkontrast entsteht genau dann, wenn sich das strukturierte Lichtblatt 10 in der Fokusebene 7 befindet, womit die Positionierung des Lichtblattes 10 abgeschlossen ist.

[0083] Nun wird die Kalibrierkammer 21 entfernt und an deren Stelle die zu beobachtende Probe gestellt. Mit der Entfernung der Kalibrierkammer 21 wird zugleich das Phasen- oder Amplitudengitter aus dem Beleuchtungsstrahlengang herausgeschwenkt, sodass die Struktur im Lichtblatt 10 aufgehoben ist und das Lichtblatt 10 eine homogene Intensitätsverteilung aufweist. Mit der Kamera 4 kann jetzt die Ebene der Probe aufgenommen werden kann, die sich in der Fokusebene 7 befindet.

[0084] Bei dieser Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Anordnung ist von Vorteil, dass die in die Kalibrierkammer 21 einzufüllende homogen fluoreszierende wässrige Lösung unkompliziert herzustellen ist. Insbesondere kann die Kalibrierkammer 21 mit einem Zu- und Abfluss für die wässrige Lösung ausgestattet sein, wodurch es möglich ist, die Kalibrierkammer 21 zu entleeren und dann mit der zu untersuchenden Probe zu bestücken.

[0085] Damit ist die Kalibrierkammer 21 zugleich als Aufnahmekammer für Proben verwendbar, so dass sich eine separate Probenkammer erübrigt. Optische Fehler, die sich aufgrund eines Kammerwechsels einstellen könnten, werden so vermieden.

[0086] Alle Varianten des erfindungsgemäßen Verfahrens können in äquivalenter Weise durchgeführt werden, wenn für den Positioniervorgang zusätzlich oder anstatt des jeweiligen Detektors bzw. der Empfangsebene das Lichtblatt um einen Winkel ungleich 90° gegenüber der optischen Achse der Abbildungs-optik geneigt wird.

Bezugszeichenliste

1	Detektionsobjektiv
2	Fluoreszenzfilter
3	Tubusoptik
4	Kamera
5	Detektor

6	Empfangsebene
7	Fokusebene
8	optische Achse
9	Abbildungsstrahlengang
10	Lichtblatt
11	Strahlteiler
12	Fluoreszenzfilter
13	Tubusoptik
14	Kamera
15	Detektor
16	Empfangsebene
17	Fokusebene
18	Intensitätsmaximum
19	Auswerteeinheit
20	Stelleinrichtung
21	Kalibrierkammer
a, a'	Abstand

ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

Zitierte Patentliteratur

- WO 2004/053558 A1 [\[0005\]](#)

Patentansprüche

1. Verfahren zum Positionieren des zu einem Lichtblatt (10) geformten Beleuchtungsstrahles in einer objektseitigen, die optische Achse (8) einer Detektionsoptik (1) schneidenden ersten Fokusebene (7) bei der Untersuchung einer Probe nach der Methode der Selective-Plane-Illumination-Microscopy (SPIM), bei dem

- eine objektseitige, mit der optischen Achse (8) und dem Lichtblatt (10) einen Winkel α im Bereich $0^\circ < \alpha < 90^\circ$ einschließende zweite Fokusebene (17) auf eine zur zweiten Fokusebene (17) konjugierte Empfangsebene (16) eines ortsauflösenden Detektors (15) abgebildet wird,
- der Kontrast oder die Intensität in dieser Abbildung bewertet wird, und
- das Lichtblatt (10) oder die Detektionsoptik (1) in der Richtung der optischen Achse (8) bewegt wird, bis die Bewertung ergibt, dass das Lichtblatt (10) die erste Fokusebene (7) überdeckt.

2. Verfahren nach Anspruch 1,

gekennzeichnet durch folgende Verfahrensschritte:

- d) Ermitteln der Ist-Position des maximalen Kontrastes oder der maximalen Intensität in der Abbildung der zweiten Fokusebene (17), wobei die Ist-Position dem Schnittpunkt des Lichtblattes (10) mit der zweiten Fokusebene (17) entspricht,
- e) Bestimmen des Abstandes zwischen der Ist-Position und der Soll-Position des maximalen Kontrastes oder der maximalen Intensität in dieser Abbildung, wobei die Soll-Position dem Schnittpunkt der beiden Fokusebenen (7, 17) mit der optischen Achse (8) der Detektionsoptik (1) entspricht, und
- f) Verschieben des Lichtblattes (10) oder der Detektionsoptik (1) in Richtung der optischen Achse (8), bis der Abstand zwischen der Ist-Position und der Soll-Position gleich Null und damit das Lichtblatt (10) in der ersten Fokusebene (7) positioniert ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, dass:

- dem Lichtblatt (10) eine Struktur aus einem senkrecht zur Ausbreitungsrichtung periodischen Intensitätsprofil aufgeprägt wird, und
- das so strukturierte Lichtblatt (10) in Richtung der optischen Achse (8) verschoben wird, bis der Kontrast in der Abbildung der zweiten Fokusebene (17) sein Maximum erreicht hat, womit das Lichtblatt (10) in der ersten Fokusebene (7) positioniert ist.

4. Verfahren nach einem der vorgenannten Ansprüche, bei dem zunächst

- das Lichtblatt (10) mit Hilfe des ortsauflösenden Detektors (15) mit einer zur zweiten Fokusebene (17) konjugierten Empfangsebene (16) positioniert wird, und danach
- die mit dem Lichtblatt (10) beleuchtete Ebene der Probe auf einen zweiten ortsauflösenden Detektor

(5) mit einer zur ersten Fokusebene (7) konjugierten Empfangsebene (6) abgebildet wird.

5. Verfahren nach Anspruch 4, bei dem

- zum Positionieren des Lichtblattes (10) eine von der Probe ausgehende Fluoreszenzstrahlung einer ersten Wellenlänge/eines ersten Wellenlängenbereichs genutzt wird, und
- zur Auswertung der mit dem Lichtblatt (10) beleuchteten Ebene der Probe eine von der Probe ausgehende Fluoreszenzstrahlung einer zweiten Wellenlänge/eines zweiten Wellenlängenbereichs genutzt wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, bei dem

- ein ortsauflösender Detektor (5) zunächst zum Positionieren des Lichtblattes (10) in der ersten Fokusebene (7) und danach zum Abbilden der mit dem Lichtblatt (10) beleuchteten Ebene der Probe verwendet wird, wobei
- zum Positionieren des Lichtblattes (10) die Empfangsebene (6) des Detektors (5) so ausgerichtet wird, dass sie zur zweiten Fokusebene (17) konjugiert ist, und nach dem Positionieren die Empfangsebene (6) des Detektors (5) so ausgerichtet wird, dass sie zur ersten Fokusebene (7) konjugiert ist.

7. Verfahren nach Anspruch 6, bei dem die Ausrichtung der Empfangsebene (6) geändert wird, indem sie um ihren Schnittpunkt mit der optischen Achse (9) des Abbildungsstrahlengangs geschwenkt wird.

8. Verfahren nach einem der vorgenannten Ansprüche, bei dem zum Positionieren des Lichtblattes (10)

- Fluoreszenzlicht genutzt wird, das von der zu untersuchenden Probe ausgeht, oder
- Fluoreszenzlicht genutzt wird, das von einer Referenzprobe ausgeht, wobei nach dem Positionieren des Lichtblattes (10) in der ersten Fokusebene (7) die zu untersuchende Probe an die Stelle der Referenzprobe gestellt wird.

9. Verfahren nach Anspruch 8, bei dem als Referenzprobe eine homogen fluoreszierende wässrige Lösung, ein mit fluoreszierenden Substanzen durchsetztes Gel oder ein mit fluoreszierenden Substanzen durchsetzter Kunststoff genutzt wird.

10. Anordnung zum Positionieren des zu einem Lichtblatt (10) geformten Beleuchtungsstrahles in einer objektseitigen, die optische Achse (8) einer Detektionsoptik (1) schneidenden ersten Fokusebene (7) bei der Untersuchung einer Probe nach der Methode der Selective-Plane-Illumination-Microscopy (SPIM), umfassend:

- eine optische Einrichtung zum Abbilden einer objektseitigen, mit der optischen Achse (8) und dem Lichtblatt (10) jeweils einen Winkel α im Bereich $0^\circ <$

$\alpha < 90^\circ$ einschließenden zweiten Fokusebene (17) auf die Empfangsebene (16) eines ortsauflösenden Detektors (15),

- eine Auswerteeinrichtung (19)
- zum Ermitteln der Ist-Position des maximalen Kontrastes oder der maximalen Intensität in dieser Abbildung, wobei die Ist-Position dem Schnittpunkt des Lichtblattes (10) mit der zweiten Fokusebene (17) entspricht, und
- zum Bestimmen des Abstandes zwischen der Ist-Position und der Soll-Position des maximalen Kontrastes oder der maximalen Intensität in dieser Abbildung, wobei die Soll-Position dem Schnittpunkt der beiden Fokusebenen (7, 17) mit der optischen Achse (8) entspricht, und
- eine Einrichtung zur Positionsänderung des Lichtblattes (10) in Relation zur ersten Fokusebene (7).

11. Anordnung nach Anspruch 10, bei der die Einrichtung zur Positionsänderung des Lichtblattes (10) ausgebildet ist

- zur Verschiebung des Lichtblattes (10) in Richtung der optischen Achse (8) der Detektionsoptik (1), und optional
- zur Verschiebung des Lichtblattes (10) senkrecht zur optischen Achse (8) der Detektionsoptik (1).

12. Anordnung nach einem der Ansprüche 10 oder 11, bei der

- zwei ortsauflösende Detektoren (5, 15) vorhanden sind, von denen
- ein erster Detektor (5) eine zur ersten Fokusebene (7) konjugierte Empfangsebene (6) besitzt und zum Abbilden der vom Lichtblatt (10) beleuchteten Probenebene vorgesehen ist, und
- der zweite Detektor (15) eine zur zweiten Fokusebene (17) konjugierte Empfangsebene (16) besitzt und als Hilfsmittel zur Positionierung des Lichtblattes (10) in der ersten Fokusebene (7) vorgesehen ist, und
- der Detektionsstrahlengang so verzweigt ist, dass einer der Zweige auf die Empfangsebene (6) des ersten Detektors (5) und der zweite Zweig auf die Empfangsebene (16) des zweiten Detektors (15) gerichtet sind.

13. Anordnung nach Anspruch 12, bei welcher die Probe bei Anregung mit dem Lichtblatt (10)

- Fluoreszenzlicht mit Wellenlängen abstrahlt, für die der erste Detektor (5) in Zusammenarbeit mit einem Fluoreszenzfilter (2) sensibel ist, und zugleich
- Fluoreszenzlicht mit Wellenlängen abstrahlt, für die der zweite Detektor (15) in Zusammenarbeit mit einem Fluoreszenzfilter (12) sensibel ist.

14. Anordnung nach Anspruch 10 oder 11, bei der ein Detektor (5) vorhanden und dieser mit einer Vorrichtung zum Verkippen seiner Empfangsebene (6) um deren Schnittpunkt mit der optischen Achse (9) des Abbildungsstrahlengangs gekoppelt ist, wo-

bei

- in einer ersten Endlage der Verkippung die Empfangsebene (6) zur ersten Fokusebene (7) konjugiert und der Detektor (5) zur Abbildung und Auswertung der mit dem Lichtblatt (10) beleuchteten Probenebene vorgesehen ist, und
- in einer zweiten Endlage der Verkippung die Empfangsebene (6) zur zweiten Fokusebene (17) konjugiert und der Detektor (5) als Hilfsmittel zur Positionierung des Lichtblattes (10) zur zweiten Fokusebene (17) vorgesehen ist.

15. Anordnung nach einem der Ansprüche 10 bis 14, bei der als Hilfsmittel zum Positionieren des Lichtblattes (10) in der ersten Fokusebene (7) eine Referenzprobe vorgesehen ist, von der bei Anregung mit dem Lichtblatt (10) Fluoreszenzstrahlung derselben Wellenlänge/desselben Wellenlängenbereichs ausgeht wie von der zur untersuchenden Probe bei deren Anregung mit dem Lichtblatt (10)

16. Anordnung nach Anspruch 15, wobei

- die Referenzprobe ein mit fluoreszierenden Substanzen durchsetztes Gel oder ein mit fluoreszierenden Substanzen durchsetzter Kunststoff ist, und
- die Referenzprobe sich in einer Kalibrierkammer (21) befindet.

17. Anordnung nach einem der Ansprüche 10 bis 15, bei der im Beleuchtungsstrahlengang optische Mittel vorhanden sind, mit denen dem Lichtblatt (10) eine Struktur aus einem senkrecht zu seiner Ausbreitungsrichtung periodischen Intensitätsprofil aufgeprägt wird und bei der als Referenzprobe eine homogene fluoreszierende wässrige Lösung vorgesehen ist.

18. Anordnung nach einem der Ansprüche 10 bis 17, mit ortsauflösenden Detektoren (5, 15), die aus einzelnen, in der jeweiligen Empfangsebene (6, 16) liegenden optoelektronischen Sensoren gebildet sind, deren Signalausgänge mit der Auswerteeinrichtung (19) in Verbindung stehen.

19. Anordnung nach einem der Ansprüche 10 bis 18, mit einem Winkel α im Bereich $20^\circ < \alpha < 70^\circ$.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

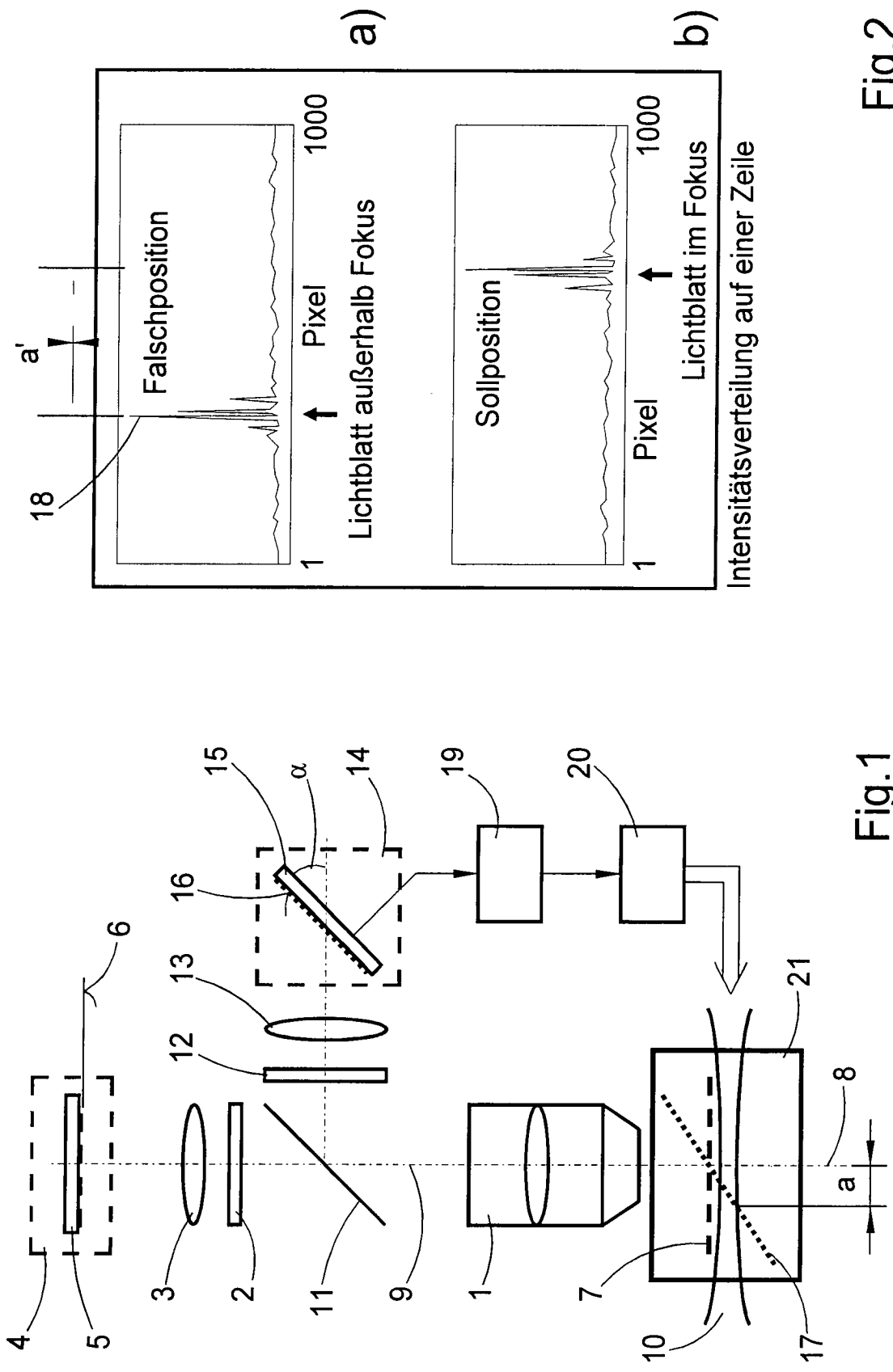


Fig.1

Fig.2

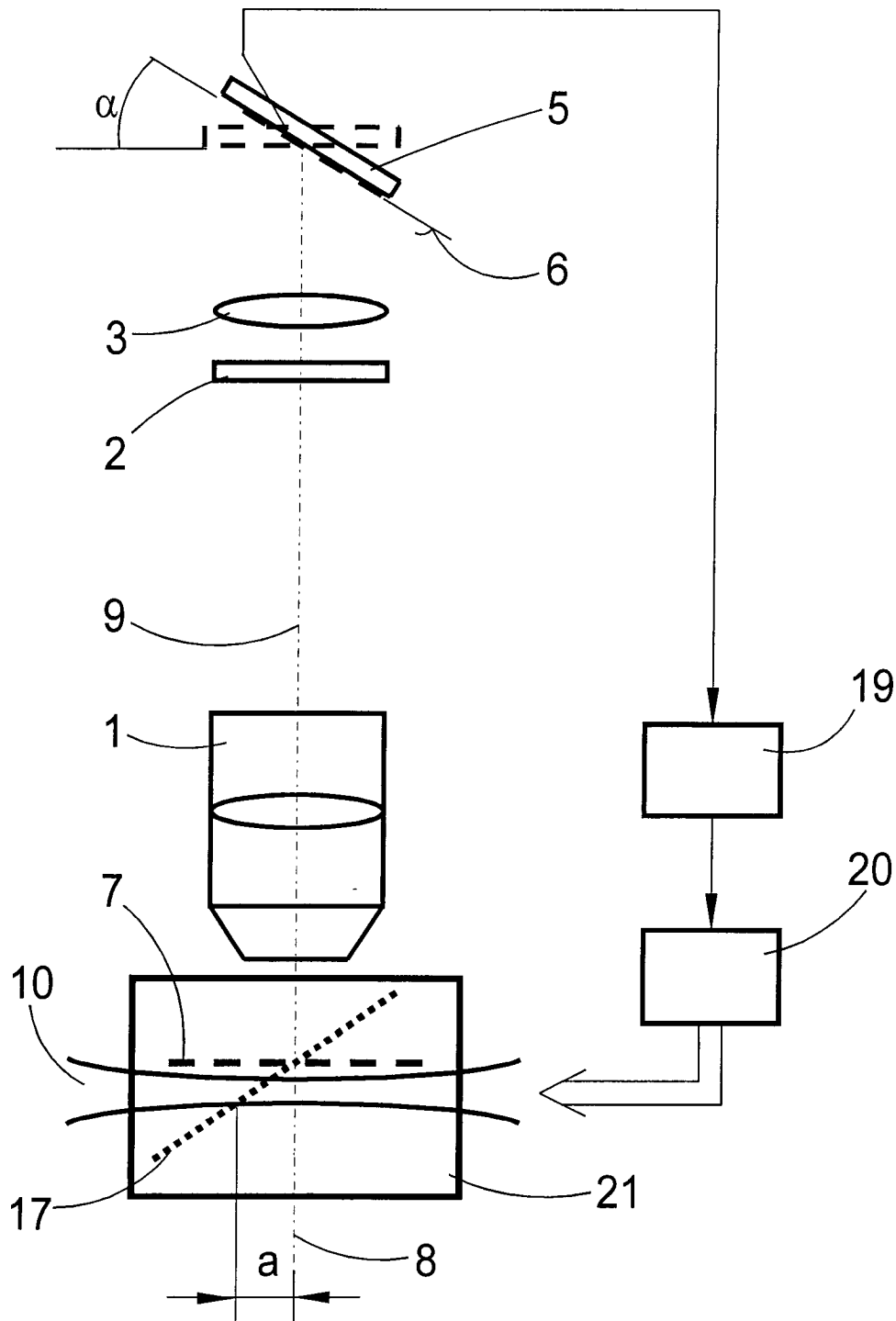


Fig.3

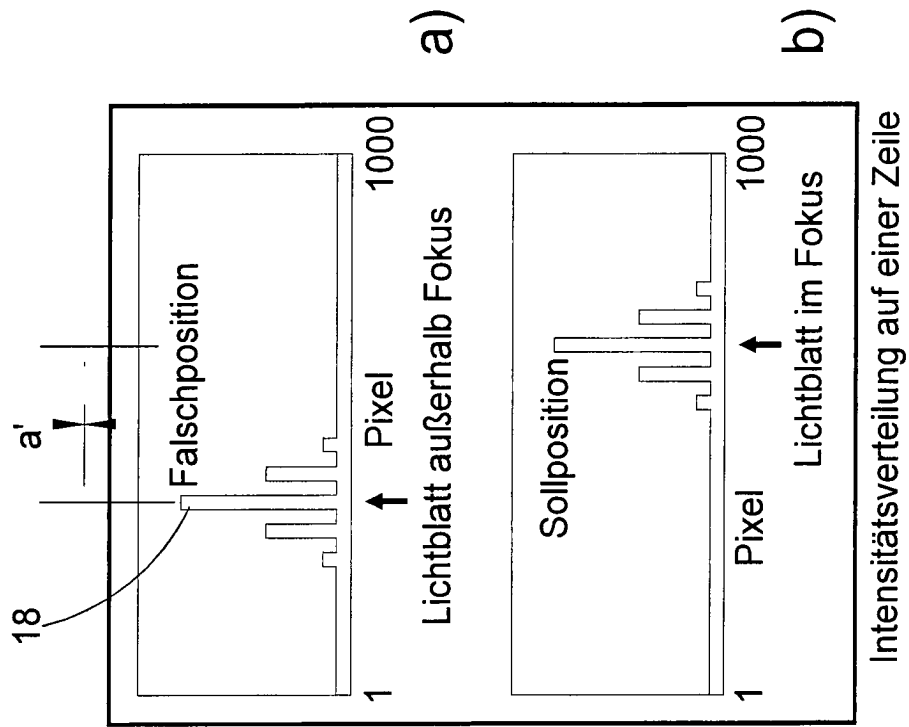


Fig.5

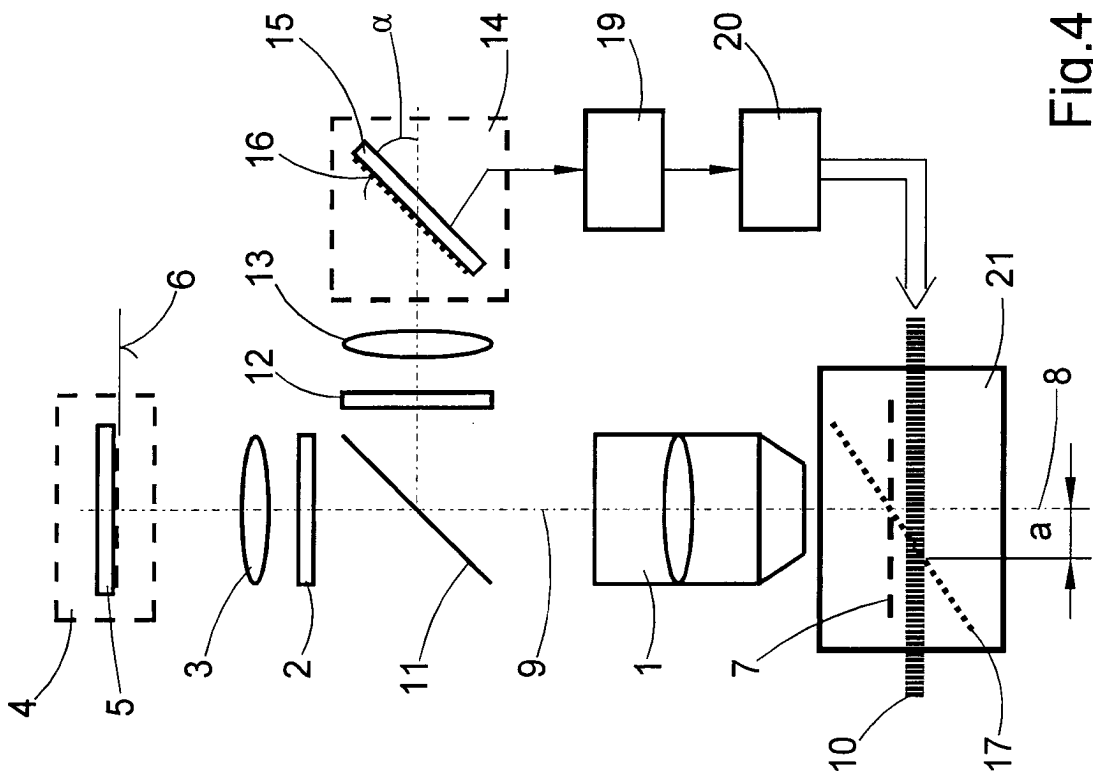


Fig.4