



(12) **Patentschrift**

(21) Aktenzeichen: **10 2023 101 782.9**
(22) Anmeldetag: **25.01.2023**
(43) Offenlegungstag: –
(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: **13.06.2024**

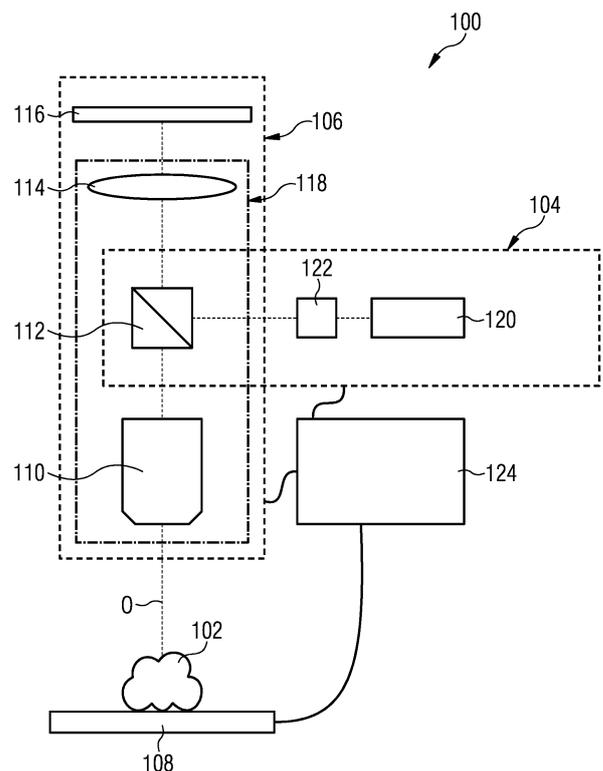
(51) Int Cl.: **G02B 21/00** (2006.01)
G02B 21/06 (2006.01)
G02B 21/36 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)
G02F 1/01 (2006.01)
G02B 26/10 (2006.01)
G05D 25/02 (2006.01)
G02B 6/06 (2006.01)

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: Leica Microsystems CMS GmbH, 35578 Wetzlar, DE	(72) Erfinder: Tille, Sebastian, 35578 Wetzlar, DE
(74) Vertreter: Schaumburg und Partner Patentanwälte mbB, 81679 München, DE	(56) Ermittelter Stand der Technik: siehe Folgeseiten

(54) Bezeichnung: **Vorrichtung und Verfahren zum Erzeugen eines zusammengesetzten Bildes einer Probe**

(57) Zusammenfassung: Eine Vorrichtung (100) zum Erzeugen eines zusammengesetzten Bildes einer Probe (102) umfasst eine Beleuchtungseinheit (104), die dazu ausgebildet ist, Beleuchtungslicht zum Beleuchten der Probe (102) zu erzeugen, und eine Bildaufnahmeeinheit (106), die dazu ausgebildet ist, ein erstes Einzelbild der Probe (102) und zumindest ein zweites Einzelbild der Probe (102) zu erzeugen. Das erste Einzelbild entspricht einem ersten Probenbereich und das zweite Einzelbild entspricht einem zweiten Probenbereich, der von dem ersten Probenbereich verschieden ist und der mit dem ersten Probenbereich in einem Überlappungsbereich (402, 604) überlappt. Die Vorrichtung (100) umfasst ferner eine Steuereinheit (124), die dazu ausgebildet ist, die Beleuchtungseinheit (104) derart zu steuern, dass zumindest der Überlappungsbereich (402, 604) beim Erzeugen des ersten Einzelbildes und des zweiten Einzelbildes jeweils mit Beleuchtungslicht einer geringeren Intensität beleuchtet wird, als der übrige erste Probenbereich und der übrige zweite Probenbereich.



(56) Ermittelter Stand der Technik:

DE	100 43 992	A1
DE	101 45 221	A1
DE	10 2005 024 066	A1
DE	10 2013 016 367	A1
DE	10 2013 021 482	A1
DE	10 2020 209 889	A1
DE	699 28 232	T2
US	2006 / 0 023 217	A1
US	2010 / 0 150 472	A1
CN	1 13 689 332	A

Beschreibung

Technisches Gebiet

[0001] Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zum Erzeugen eines zusammengesetzten Bildes einer Probe. Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zum Erzeugen eines zusammengesetzten Bildes einer Probe.

Hintergrund

[0002] Stitching ist ein Verfahren zum Erstellen von Bildern, die größer sind als ein einzelnes Sichtfeld einer Bilderzeugungsvorrichtung, beispielsweise eines Mikroskops. Bei dem Verfahren wird eine Probe zum Erzeugen mehrerer in Teilbereichen überlappender Einzelbilder relativ zu einer Optik der Bilderzeugungsvorrichtung bewegt. Diese Teilbereiche werden nachfolgend als Überlappungsbereiche bezeichnet. Alternativ kann auch die Optik der Bilderzeugungsvorrichtung relativ zu der Probe bewegt werden. Es wird algorithmisch die beste Überlagerung der Überlappungsbereiche der Einzelbilder ermittelt, um ein einziges größeres zusammengesetztes Bild, auch Mosaikbild, für die anschließende Verarbeitung, Betrachtung und/oder Analyse zu erstellen. Dabei werden die Überlappungsbereiche von benachbarten Einzelbildern verglichen und identische Strukturen in betrachteten Überlappungsbereichen von benachbarten Einzelbildern identifiziert. Anschließend werden die benachbarten Einzelbilder zusammengesetzt und die zugehörigen Überlappungsbereiche überlagert, indem anhand der identifizierten Strukturen die sich überschneidenden Pixel aus jedem der Überlappungsbereiche mit Hilfe einer mathematischen Formel kombiniert werden.

[0003] Typische Probleme beim Stitching sind sogenannte Stitching-Artefakte. Bei solchen Artefakten kann es sich beispielsweise um Geister- oder Doppelbilder von Merkmalen in den Überlappungsbereichen handeln, beispielsweise aufgrund von optischen oder mechanischen Toleranzen, oder Nichtlinearitäten. Selbst wenn das Stitching präzise ist und sich die einander entsprechenden Pixel der Einzelbilder perfekt überlappen, können immer noch Artefakte nach der Kombination der Pixel der Teilbilder in den Überlappungsbereichen entstehen, wenn die Pixel-Intensitäten in den Überlappungsbereichen von der Pixel-Intensitäten in den nicht überlappenden Bereichen abweichen. In zusammengesetzten Bildern sind die Überlappungsbereiche häufig aufgrund der unterschiedlichen Intensitäten deutlich zu erkennen.

[0004] Die Artefakte, die beim Stitching entstehen, werden typischerweise in der Nachbearbeitung entfernt, beispielsweise unter Verwendung des in Peng et al. A BaSiC tool for background and shading cor-

rection of optical microscopy images. Nat Commun 8, 14836 (2017) - <https://doi.org/10.1038/ncomms14836> beschriebenen Algorithmus. Das Problem derartiger Algorithmen ist jedoch, dass sie Intensität der Pixel der Nahstellen in dem zusammengesetzten Bild verändern, was nachträglich keine quantitativen Aussagen mehr über diese Pixel erlaubt.

[0005] Außerdem bewirkt die Mehrfachbelichtung der überlappenden Bereiche, dass hier die Probe stärker gebleicht und quasi ein Gittermuster in die Probe gestanzt wird, was dann bei Wiederholung einer Aufnahme zu zusätzlichen Artefakten führt, wenn die Einzelbilder nicht präzise an identischen Stellen aufgenommen werden. Solche Artefakte sind dann nur noch sehr schwer mit Nachbearbeitung zu korrigieren.

[0006] Aufgabe der der vorliegenden Erfindung ist es daher, eine Vorrichtung und ein Verfahren zum Erzeugen eines zusammengesetzten Bildes einer Probe anzugeben, die es erlauben, mehrere überlappende Einzelbilder der Probe zu einem Bild zusammenzusetzen und welche die vorgenannten Probleme des Standes der Technik überwinden.

[0007] Die DE 101 45 221 A1 offenbart ein Verfahren zur Anregung und Detektion von Fluoreszenzen von Mikroarrays. Bei dem Verfahren werden nebeneinander angeordnete Flächen des Mikroarrays zeitlich nacheinander durch Lichtstrahlung ausgeleuchtet. Diese ausgeleuchteten Flächen überlappen einander in vorbestimmten Bereichen. Die Beleuchtungsintensität der Lichtstrahlung in den Überlappungsbereichen ist schwächer als im Kernbereich.

[0008] Aus der DE 10 2013 021 482 A1 ist ein Scanning-Mikroskop bekannt, das dazu ausgebildet ist, gleichzeitig mehrere Beleuchtungsspots zu erzeugen. Diese Beleuchtungsspots können jeweils eine unterschiedliche Intensität aufweisen und liegen jeweils in einer Scanzeile.

[0009] Zum Stand der Technik wird zudem auf die Dokumente US 2010 / 0 150 472 A1, CN 1 13 689 332 A und US 2006 / 0 023 217 A1 verwiesen, die jeweils das Zusammensetzen von Teilbildern und die Korrektur der Intensitäten in den Überlappungsbereichen offenbaren. Es wird ferner auf die Dokumente DE 699 28 232 T2, DE 10 2013 016 367 A1 und die DE 100 43 992 A1 verwiesen.

Übersicht

[0010] Die vorgeschlagene Vorrichtung zum Erzeugen eines zusammengesetzten Bildes einer Probe umfasst eine Beleuchtungseinheit, die dazu ausgebildet ist, Beleuchtungslicht zum Beleuchten der

Probe zu erzeugen, und eine Bildaufnahmeeinheit, die dazu ausgebildet ist, ein erstes Einzelbild der Probe und zumindest ein zweites Einzelbild der Probe zu erzeugen. Das erste Einzelbild entspricht einem ersten Probenbereich und das zweite Einzelbild entspricht einem zweiten Probenbereich, der von dem ersten Probenbereich verschieden ist und der mit dem ersten Probenbereich in einem Überlappungsbereich überlappt. Die Vorrichtung umfasst ferner eine Steuereinheit, die dazu ausgebildet ist, die Beleuchtungseinheit derart zu steuern, dass zumindest der Überlappungsbereich beim Erzeugen des ersten Einzelbildes und des zweiten Einzelbildes jeweils mit Beleuchtungslicht einer geringeren Intensität beleuchtet wird, als der übrige erste Probenbereich und der übrige zweite Probenbereich.

[0011] Das erste Einzelbild und das zweite Einzelbild können zu einem zusammengesetzten Bild der Probe zusammengesetzt werden. Dieses zusammengesetzte Bild umfasst den ersten Probenbereich und den zweiten Probenbereich. Hierdurch können insbesondere Bilder erzeugt werden, die einen Bereich der Probe zeigen, der größer ist als das Sichtfeld der Bildaufnahmeeinheit. Durch die Beleuchtung des Überlappungsbereiches mit der geringeren Intensität werden hierbei in dem zusammengesetzten Bild Stitching-Artefakte vermieden oder deren Effekt zumindest stark reduziert. Da der Überlappungsbereich jeweils mit der geringeren Intensität beleuchtet wird, kann die kumulierte Intensität, mit welcher der Überlappungsbereich im Verlauf der Erzeugung der beiden Einzelbilder beleuchtet wird, so gewählt werden, dass die kumulierte Intensität der Intensität entspricht, mit der jeweils der übrige erste Probenbereich und der übrige zweite Probenbereich, d.h. die sich nicht überlappenden Probenbereiche, beleuchtet werden. Im Verlauf der Erzeugung der beiden Einzelbilder werden somit alle Bereiche der Probe mit der gleichen Intensität beleuchtet und es entstehen keine auffälligen Stitching-Artefakte, beispielsweise durch Ausbleichen der Probe, insbesondere bei fluoreszenzmarkierten Proben. Somit vermeidet die vorgeschlagene Vorrichtung Stitching-Artefakte in Echtzeit und entfernt diese nicht erst in der Nachbearbeitung. Dies erlaubt insbesondere die Durchführung von Bildgebungsexperimenten, bei denen mehrere Einzelbilder entweder zur Dokumentation oder Quantifizierung zusammengefügt werden müssen. Darüber hinaus erlaubt es auch wiederholte Aufnahmen von zusammengesetzten Bildern von bereits aufgenommenen Probenstellen, beispielsweise nach Optimierung von Bildaufnahme-Parametern oder dem Bildausschnitt oder bei Aufnahme von Zeitserien. Da keine Nachbearbeitung erfolgt bei der die Intensität einzelner Pixel der beiden Einzelbilder verändert wird, erlaubt die vorgeschlagene Vorrichtung insbesondere auch quantitative Auswertungen von Bildbereichen des zusammengesetzten Bildes.

[0012] Bei einer Ausführungsform ist die Beleuchtungseinheit dazu ausgebildet, eine strukturierte Beleuchtung mit einem räumlich modulierten Intensitätsmuster zu erzeugen. Die strukturierte Beleuchtung ist räumlich derart moduliert, dass zumindest der Überlappungsbereich mit Beleuchtungslicht der geringeren Intensität beleuchtet wird. In dieser Ausführungsform ist die Beleuchtungseinheit dazu ausgebildet, eine flächige Beleuchtung in Form des räumlich modulierten Intensitätsmusters zu erzeugen. Eine solche flächige Beleuchtung erlaubt insbesondere eine Weitfeldbilderzeugung, bei der entweder das gesamte Sichtfeld oder zumindest ein großer Teil des Sichtfeldes der Bildaufnahmeeinheit auf einmal beleuchtet und abgebildet werden.

[0013] Bei einer weiteren Ausführungsform umfasst die Beleuchtungseinheit eine Lichtquelle zum Erzeugen des Beleuchtungslichtes und eine der Lichtquelle nachfolgend angeordnete Lichtmodulationseinheit, die dazu ausgebildet ist, aus dem Beleuchtungslicht die strukturierte Beleuchtung mit dem räumlich modulierten Intensitätsmuster zu erzeugen. Mit Hilfe der Lichtmodulationseinheit kann die strukturierte Beleuchtung besonders einfach erzeugt werden. Insbesondere kann die Lichtmodulationseinheit auch derart ausgebildet sein, dass die Lichtmodulationseinheit aus einem Beleuchtungsstrahlengang der Beleuchtungseinheit entfernt werden kann, um eine homogene Beleuchtung zu erzeugen. Dies macht die Vorrichtung noch flexibler.

[0014] Bei einer alternativen Ausführungsform umfasst die Beleuchtungseinheit eine Lichtquelle, die dazu ausgebildet ist, die strukturierte Beleuchtung mit dem räumlich modulierten Intensitätsmuster zu erzeugen. Beispielsweise kann die Lichtquelle selbst mehrere auf einem Gitter angeordneten Punktlichtquellen umfassen, beispielsweise ein LED-Array oder Laserdioden-Array. Bei dieser Ausführungsform kann die strukturierte Beleuchtung besonders flexibel erzeugt werden.

[0015] Bei einer weiteren Ausführungsform umfasst die Lichtmodulationseinheit einen steuerbaren Flächenlichtmodulator. Die Steuereinheit kann dazu ausgebildet sein, die Lichtmodulationseinheit zum Erzeugen der strukturierten Beleuchtung derart zu steuern, dass zumindest der Überlappungsbereich mit Beleuchtungslicht der geringeren Intensität beleuchtet wird. Steuerbare Flächenlichtmodulatoren werden auch als Spatial Light Modulators oder kurz SLM bezeichnet. Mit Hilfe des steuerbaren Flächenlichtmodulators kann die flächige Beleuchtung der Probe flexibel erzeugt und somit besonders einfach an die Geometrie des Überlappungsbereiches angepasst werden. Dies macht die Vorrichtung besonders vielseitig einsetzbar.

[0016] Bei einer weiteren Ausführungsform umfasst der steuerbare Flächenlichtmodulator ein Mikrospiegelarray und/oder ein Flüssigkristallelement. Mikrospiegelarrays werden auch als Mikrospiegelaktoren, Digital Micromirror Device oder kurz DMD bezeichnet. Bei dem Flüssigkristallelement kann es sich insbesondere um eine ansteuerbare Blende handeln, die durch einen Flüssigkristall gebildet ist. Das Mikrospiegelarray und das Flüssigkristallelement sind jeweils verbreitete optische Elemente, die das räumlich modulierten Intensitätsmuster durch Reflektion bzw. durch Transmission des Beleuchtungslichtes erzeugen. Durch die Verwendung verbreiteter optischer Bauelemente kann der Herstellungsaufwand für die Vorrichtung reduziert werden.

[0017] Bei einer weiteren Ausführungsform umfasst die Lichtmodulationseinheit ein strukturiertes optisches Filter mit zumindest einem halbtransparenten Bereich. Der halbtransparente Bereich kann derart angeordnet sein, dass zumindest der Überlappungsbereich mit Beleuchtungslicht der geringeren Intensität beleuchtet wird. In dieser Ausführungsform wird die strukturierte Beleuchtung mit Hilfe des optischen Filters erzeugt. Das strukturierte optische Filter ist ein passives optisches Element, d.h. es wird nicht angesteuert. Hierdurch wird die Komplexität der Vorrichtung reduziert. Ferner sind passive optische Elemente kostengünstiger als deren aktive Gegenstücke. Dies reduziert zusätzlich die Herstellungskosten der Vorrichtung.

[0018] Alternativ zu dem strukturierten optischen Filter kann die Lichtmodulationseinheit auch einen Spiegel umfassen, der eine strukturierte Beschichtung aufweist. Die strukturierte Beschichtung verändert die Reflektivität des Spiegels in bestimmten Bereichen, wodurch beim Bescheinen des Spiegels mit dem Beleuchtungslicht das räumlich modulierten Intensitätsmuster erzeugt wird. In anderen Worten: Während das strukturierte optische Filter das räumlich modulierten Intensitätsmuster durch Transmission aus dem Beleuchtungslicht erzeugt, erzeugt der Spiegel das räumlich modulierten Intensitätsmuster durch Reflektion aus dem Beleuchtungslicht. Auch der Spiegel ist ein passives optisches Element mit den obengenannten Vorteilen.

[0019] Bei einer weiteren Ausführungsform umfasst die Beleuchtungseinheit eine erste Lichtquelle zum Erzeugen des Beleuchtungslichtes, mindestens eine zweite Lichtquelle zum Erzeugen des Beleuchtungslichtes mit der geringen Intensität und ein Faserbündel. Das Faserbündel ist dazu ausgebildet, das Beleuchtungslicht und das Beleuchtungslicht mit der geringen Intensität zu empfangen und derart auf die Probe zu lenken, dass zumindest der Überlappungsbereich mit Beleuchtungslicht der geringeren Intensität beleuchtet wird. Bei dieser Ausführungsform wird das erzeugte Beleuchtungslicht nahezu

vollständig zum Beleuchten der Probe verwendet, d.h. es wird kein Beleuchtungslicht herausgefiltert oder in eine Strahlfalle abgelenkt, um das Beleuchtungslichtes mit der geringen Intensität zu erzeugen. Dies ist besonders effizient.

[0020] Bei einer weiteren Ausführungsform umfasst die Beleuchtungseinheit eine Lichtquelle zum Erzeugen des Beleuchtungslichtes und eine der Lichtquelle nachfolgend angeordnete Dämpfungseinheit, die dazu ausgebildet ist, die Intensität des Beleuchtungslichtes zu verringern. Insbesondere bei einer abtastenden Beleuchtung muss die Intensität des Beleuchtungslichtes immer dann auf die geringere Intensität reduziert werden, wenn die Beleuchtung den Überlappungsbereich abtastet. Dies kann vorteilhafterweise mit der Dämpfungseinheit erfolgen, die der Lichtquelle nachfolgend angeordnet ist. Bei Verwendung der Dämpfungseinheit kann die Lichtquelle während der gesamten Beleuchtung mit der gleichen Intensität betrieben werden, was bei bestimmten Lichtquellen effizienter ist, als die Intensität der Lichtquelle selbst zu steuern. Insbesondere kann es je nach Lichtquelle schneller sein, die Dämpfungseinheit zum Reduzieren der Intensität zu verwenden, als die Lichtquelle selbst zu steuern.

[0021] Bei einer weiteren Ausführungsform umfasst die Dämpfungseinheit eines der folgenden optischen Elemente, einen akustisch-optischen abstimmbaren Filter, einen akustisch-optischen Modulator, einen elektrisch-optischen Modulator oder eine Pockels-Zelle. Akustisch-optische abstimmbare Filter werden auch als Acousto-Optic Tunable Filter oder kurz AOTF bezeichnet. Akustisch-optische Modulatoren werden auch kurz als AOM bezeichnet. Elektrisch-optischen Modulatoren werden auch kurz als EOM bezeichnet. Mit Hilfe der genannten optischen Elemente kann die Intensität des Beleuchtungslichtes besonders schnell gesteuert, d.h. insbesondere reduziert werden. Beispielsweise können Pockels-Zellen im Nanosekundenbereich geschaltet werden. Folglich kann die Geschwindigkeit der abtastenden Beleuchtung maßgeblich erhöht werden, wenn eines dieser optischen Elemente zu Reduzierung der Intensität des Beleuchtungslichtes verwendet wird.

[0022] Bei einer weiteren Ausführungsform umfasst die Beleuchtungseinheit eine Lichtquelle zum Erzeugen des Beleuchtungslichtes, die zum Steuern der Intensität des Beleuchtungslichtes ansteuerbar ist. Bei der ansteuerbaren Lichtquelle handelt es sich beispielsweise um eine Laserdiode oder eine LED. Alternativ oder zusätzlich zum Reduzieren der Intensität des Beleuchtungslichtes mit der Dämpfungseinheit, kann auch die Lichtquelle selbst angesteuert werden, um die Intensität beim Beleuchten des Überlappungsbereiches auf die geringere Intensität zu dämpfen. Insbesondere bei auf Dioden basierenden

Lichtquellen kann die Intensität sehr schnell reduziert werden. Durch den Verzicht auf die Dämpfungseinheit wird die Komplexität der Vorrichtung reduziert, wodurch die Vorrichtung einfacher herzustellen und handzuhaben ist.

[0023] Bei einer weiteren Ausführungsform umfasst die Vorrichtung eine der Beleuchtungseinheit nachfolgend angeordneten Abtasteinheit, die dazu ausgebildet ist, das Beleuchtungslicht zum Erzeugen einer abtastenden Beleuchtung abzulenken. Die Steuereinheit kann dazu ausgebildet sein, die Abtasteinheit derart zu steuern, dass zum Erzeugen des ersten Einzelbildes der erste Probenbereich punktweise oder zeilenweise mit dem Beleuchtungslicht abgetastet wird und zum Erzeugen des zweiten Einzelbildes der zweite Probenbereich punktweise bzw. zeilenweise mit dem Beleuchtungslicht abgetastet wird, und die Beleuchtungseinheit derart zu steuern, dass zumindest zum Beleuchten des Überlappungsbereiches die Intensität des Beleuchtungslichtes auf die geringere Intensität verringert wird. In dieser Ausführungsform ist die Beleuchtungseinheit dazu ausgebildet, die abtastende Beleuchtung zu realisieren, bei der die Probe mit dem Beleuchtungslicht punktweise oder zeilenweise abgetastet wird. Wann immer die abtastende Beleuchtung einen Punkt oder eine Zeile des Überlappungsbereiches abtastet, steuert die Steuereinheit die Beleuchtungseinheit derart an, dass diese die Intensität des Beleuchtungslichtes auf die geringere Intensität verringert. Hierzu kann beispielsweise die Dämpfungseinheit verwendet werden und/oder die Beleuchtungseinheit reduziert die Intensität der Lichtquelle. Die abtastende Beleuchtung erlaubt es beispielsweise, die Vorrichtung für Konfokalmikroskopie oder Multi-Photonen-Mikroskopie zu verwenden.

[0024] Bei einer weiteren Ausführungsform ist die Beleuchtungseinheit dazu ausgebildet, eine lichtblattartige Beleuchtungslichtverteilung des Beleuchtungslicht in der Probe zu erzeugen. Bei der Lichtblattmikroskopie wird die Probe mit der lichtblattartigen Beleuchtungslichtverteilung beleuchtet. Mit dieser Beleuchtungslichtverteilung kann eine sehr dünne Schicht, typischerweise einige Mikrometer dünn, der Probe beleuchtet werden. Hierdurch kann eine hohe Auflösung entlang der optischen Achse erzielt werden. Es ist ferner möglich, mehrere übereinander liegende Schichten der Probe zu beleuchten und zu einem Volumenbild der Probe zusammensetzen.

[0025] Bei einer weiteren Ausführungsform umfasst die Vorrichtung einen motorisierten Mikroskoptisch, der dazu ausgebildet ist, die Probe aufzunehmen. Die Steuereinheit kann dazu ausgebildet sein, den Mikroskoptisch zum Erzeugen des ersten Einzelbildes derart zu verfahren, dass der erste Probenbereich in einem Sichtfeld der Bildaufnahmeeinheit

liegt, und zum Erzeugen des zweiten Einzelbildes derart zu verfahren, dass der zweite Probenbereich in dem Sichtfeld der Bildaufnahmeeinheit liegt. Mithilfe des motorisierten Mikroskoptisches kann die Probe sehr präzise in dem Sichtfeld der Bildaufnahmeeinheit positioniert werden. Dies erleichtert es später, die beiden Einzelbilder zu dem zusammengesetzten Bild der Probe zusammensetzen. Der motorisierte Mikroskoptisch erlaubt es ferner, die Erzeugung der beiden Einzelbilder weitestgehend zu automatisieren.

[0026] Bei einer weiteren Ausführungsform ist die Beleuchtungseinheit dazu ausgebildet, Beleuchtungslicht zum Anregen von in der Probe angeordneten Fluorophoren zu erzeugen. Insbesondere kann die Beleuchtungseinheit dazu ausgebildet sein, Laserlicht als das Beleuchtungslicht zu erzeugen. In dieser Ausführungsform kann die Vorrichtung insbesondere als ein Fluoreszenzmikroskop ausgebildet sein. Die Fluoreszenzmikroskopie erlaubt eine präzise Auflösung von mit den Fluorophoren eingefärbten Strukturen der Probe.

[0027] Bei einer weiteren Ausführungsform umfasst die Bildaufnahmeeinheit ein Sensorelement und ein optisches System, das dazu ausgebildet ist, das Beleuchtungslicht auf die Probe zu lenken und von der Probe ausgehendes Detektionslicht auf das Sensorelement zu lenken. Das Sensorelement kann insbesondere ein Flächensensor sein, der dazu ausgebildet ist, aus dem Detektionslicht ein zweidimensionales Bild der Probe zu erzeugen, beispielsweise eine CCD-Kamera, eine CMOS-Kamera oder sCMOS Kamera, oder ein Punktdetektor-Array (PMT- oder SPAD-Array). Alternativ kann das Sensorelement auch ein Punktdetektor oder Zeilendetektor sein, die dazu ausgebildet sind, aus dem Detektionslicht einen einzelnen Bildpunkt bzw. eine einzelne Bildzeile eines zweidimensionalen Bildes der Probe zu erzeugen. Derartige Punktdetektoren und Zeilendetektoren kommen insbesondere bei der Konfokalmikroskopie zum Einsatz.

[0028] Bei einer weiteren Ausführungsform umfasst die Bildaufnahmeeinheit ein optisches System. Das optische System umfasst zumindest ein auf die Probe gerichtetes Mikroskopobjektiv und bildet ein Mikroskop. Insbesondere umfasst das optische System nur ein einziges auf die Probe gerichtetes Mikroskopobjektiv. In dieser Ausführungsform ist die Vorrichtung insbesondere als ein Lichtblattmikroskop ausgebildet, wobei die Beleuchtungseinheit dazu ausgebildet, eine lichtblattartige Beleuchtungslichtverteilung des Beleuchtungslicht in der Probe zu erzeugen. Das einzige Mikroskopobjektiv dient dabei dazu, dass Beleuchtungslicht bzw. das aus dem Beleuchtungslicht geformte Lichtblatt, auf die Probe zu lenken, und dazu, dass von der Probe aus-

gehende Detektionslicht zu empfangen und auf das Sensorelement zu lenken.

[0029] Bei einer weiteren Ausführungsform ist die Bildaufnahmeeinheit dazu ausgebildet, mindestens ein drittes Einzelbild der Probe zu erzeugen. Das dritte Einzelbild entspricht einem dritten Probenbereich, der von dem ersten Probenbereich und dem zweiten Probenbereich verschieden ist und der mit dem ersten Probenbereich und dem zweiten Probenbereich in einem weiteren Überlappungsbereich überlappt. Die Steuereinheit kann dazu ausgebildet sein, die Beleuchtungseinheit derart zu steuern, dass zumindest der weitere Überlappungsbereich beim Erzeugen des ersten Einzelbildes, des zweiten Einzelbildes und des dritten Einzelbildes jeweils mit Beleuchtungslicht einer noch geringeren Intensität beleuchtet wird, als der Überlappungsbereich. Bei dieser Ausführungsform überlappen sich alle drei Einzelbilder in dem weiteren Überlappungsbereich. Damit es durch die dreimalige Beleuchtung des weiteren Überlappungsbereiches nicht zu einem Ausbleichen der Probe kommt, wird der weitere Überlappungsbereich jeweils mit der noch geringeren Intensität beleuchtet. Dabei ist die noch geringere Intensität vorzugsweise derart gewählt, dass die kumulierte Intensität, mit welcher der weitere Überlappungsbereich im Verlauf der Erzeugung der drei Einzelbilder beleuchtet wird, der Intensität entspricht, mit der jeweils der übrige erste Probenbereich, der übrige zweite Probenbereich und der übrige dritte Probenbereich beleuchtet werden. Hierdurch kann aus den drei Einzelbildern das zusammengesetzte Bild der Probe erzeugt werden, die einen Bereich der Probe zeigen, der größer ist als das Sichtfeld der Bildaufnahmeeinheit, und bei dem Stitching-Artefakte vermieden werden oder deren Effekt zumindest stark reduziert ist.

[0030] Bei einer weiteren Ausführungsform ist die Steuereinheit dazu ausgebildet, dem ersten Einzelbild entsprechende erste Bilddaten und dem zweiten Einzelbild entsprechende zweite Bilddaten zum Erzeugen des zusammengesetzten Bildes der Probe zu verarbeiten, das eine Abbildung des ersten Probenbereich und des zweiten Probenbereiches umfasst. Die Bilddaten werden beispielsweise von der Bildaufnahmeeinheit erzeugt. In dieser Ausführungsform ist die Steuereinheit dazu ausgebildet, ein zusammengesetztes Bild der Probe zu erzeugen. Hierzu ist die Steuereinheit insbesondere dazu ausgebildet, auf Grundlage der ersten Bilddaten und der zweiten Bilddaten identische Elemente in den beiden Einzelbildern zu identifizieren. Anhand der identischen Elemente in den beiden Einzelbildern kann die Steuereinheit dann eine Bildregistrierung der beiden Einzelbilder vornehmen. Dies kann insbesondere mit Hilfe bekannter Verfahren erfolgen. In dieser Ausführungsform kann die Erzeugung des zusam-

mengesetzten Bildes der Probe weitestgehend automatisiert werden.

[0031] Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zum Erzeugen eines zusammengesetzten Bildes einer Probe. Bei dem Verfahren wird ein erstes Einzelbild der Probe erzeugt, das einem ersten Probenbereich entspricht. Es wird zumindest ein zweites Einzelbild der Probe erzeugt, das einem zweiten Probenbereich entspricht, der von dem ersten Probenbereich verschieden ist und der mit dem ersten Probenbereich in einem Überlappungsbereich überlappt. Es wird ferner zumindest der Überlappungsbereich beim Erzeugen des ersten Einzelbildes und des zweiten Einzelbildes jeweils mit Beleuchtungslicht einer geringeren Intensität beleuchtet, als der übrige erste Probenbereich und der übrige zweite Probenbereich. Das vorgeschlagene Verfahren hat dieselben Vorteile wie die oben beschriebene Vorrichtung und kann insbesondere mit den Merkmalen der auf die Vorrichtung gerichteten abhängigen Ansprüche weitergebildet werden. Umgekehrt kann auch die Vorrichtung mit den Merkmalen des auf das Verfahren gerichteten abhängigen Anspruchs weitergebildet werden.

[0032] Das Verfahren umfasst einen Kalibrierungsschritt zum Bestimmen der geringeren Intensität. Der Wert der geringeren Intensität kann derart bestimmt werden, dass die Intensität von Detektionslicht, das beim Beleuchten von der Probe ausgeht, beim Beleuchten mit Beleuchtungslicht der geringeren Intensität halb so groß ist wie beim Beleuchten mit Beleuchtungslicht einer normalen Intensität, mit der der übrige erste Probenbereich und der übrige zweite Probenbereich beleuchtet werden. In dem Kalibrierungsschritt kann, gleichsam zur geringeren

[0033] Intensität, auch die noch geringere Intensität bestimmt werden. Mit dem von der Probe ausgehenden Detektionslicht ist insbesondere von der Probe ausgehendes Fluoreszenzlicht gemeint. Die Steuereinheit der oben beschriebenen Vorrichtung kann dazu ausgebildet sein, den Kalibrierungsschritt durchzuführen, in dem die Steuereinheit die Beleuchtungseinheit und die Bildaufnahmeeinheit steuert. In einem Regime, in dem sich die die Intensität des Detektionslichtes linear zu der Intensität des Beleuchtungslichtes verhält, kann die geringe Intensität als die Hälfte der normalen Intensität gewählt werden. Beim Einsatz in der Fluoreszenzmikroskopie wird sich das Detektionslicht, also die Fluoreszenzantwort, meist nicht-linear verhalten. Daher ist der Kalibrierungsschritt erforderlich. Durch den Kalibrierungsschritt wird sichergestellt, dass die kumulierte Intensität des von dem Überlappungsbereich ausgehenden Detektionslichtes, d.h. die über die Aufnahme der beiden Einzelbilder summierte Intensität des Detektionslichtes, mit der Intensität des von den übrigen Probenbereichen ausgehenden

Detektionslichtes vergleichbar ist. Insbesondere kann der Kalibrierungsschritt durchgeführt werden, in dem ein Bereich der Probe mit Beleuchtungslicht unterschiedlicher Intensität beleuchtet wird und jeweils die Intensität des Detektionslichtes als Kalibrierungsdaten gespeichert wird. Aus den Kalibrierungsdaten kann dann ein Zusammenhang zwischen der Intensität des Beleuchtungslichtes und der Intensität des Detektionslichtes ermittelt werden, beispielsweise durch einen Fit der Kalibrierungsdaten an einen funktionalen Zusammenhang oder durch Interpolation der Kalibrierungsdaten.

[0034] Weitere Merkmale und Vorteile ergeben sich aus der folgenden Beschreibung, welche in Verbindung mit den beigefügten Figuren Ausführungsbeispiele näher erläutert.

Kurzbeschreibung der Figuren

[0035] Es zeigen:

Fig. 1 eine Vorrichtung zum Erzeugen eines zusammengesetzten Bildes einer Probe nach einem Ausführungsbeispiel;

Fig. 2 eine Vorrichtung zum Erzeugen eines zusammengesetzten Bildes der Probe nach einem weiteren Ausführungsbeispiel;

Fig. 3 eine Vorrichtung zum Erzeugen eines zusammengesetzten Bildes der Probe nach einem weiteren Ausführungsbeispiel;

Fig. 4a eine beispielhafte strukturierte Beleuchtung für die Aufnahme von zwei Einzelbildern mit einer der Vorrichtungen nach **Fig. 1, 2** oder **3**;

Fig. 4b eine beispielhafte strukturierte Beleuchtung für die Aufnahme von mehr als zwei Einzelbildern mit einer der Vorrichtungen nach **Fig. 1, 2** oder **3**;

Fig. 5 eine Vorrichtung zum Erzeugen eines zusammengesetzten Bildes der Probe nach einem weiteren Ausführungsbeispiel;

Fig. 6 eine abtastende Beleuchtung der Vorrichtung nach **Fig. 5**; und

Fig. 7 einen Ablaufplan eines Verfahrens zum Erzeugen eines zusammengesetzten Bildes einer Probe.

Beschreibung

[0036] **Fig. 1** zeigt in schematischer Darstellung eine Vorrichtung 100 zum Erzeugen eines zusammengesetzten Bildes einer Probe 102 nach einem Ausführungsbeispiel.

[0037] Die in **Fig. 1** gezeigte Vorrichtung 100 ist rein beispielhaft als ein Weitfeldmikroskop mit einer Auf-

lichtbeleuchtung ausgebildet und umfasst eine Beleuchtungseinheit 104, eine Bildaufnahmeeinheit 106 und einen Mikroskoptisch 108. Die Bildaufnahmeeinheit 106 umfasst ein einziges auf die Probe 102 gerichtetes Mikroskopobjektiv 110, das dazu ausgebildet ist, von der Probe 102 ausgehendes Detektionslicht zu empfangen und auf einen Strahlteiler 112 der Vorrichtung 100 zu lenken. Das von dem Mikroskopobjektiv 110 empfangene Detektionslicht wird von dem Strahlteiler 112 auf eine Tubuslinse 114 gelenkt, die das Detektionslicht auf ein Sensorelement 116 fokussiert. Das Mikroskopobjektiv 110, der Strahlteiler 112 und die Tubuslinse 114 sind Teil eines optischen Systems 118 der Vorrichtung 100, welches das Detektionslicht zum Erzeugen von Bildern der Probe 102 auf das Sensorelement 116 lenkt.

[0038] Der Mikroskoptisch 108 ist zumindest in einer Ebene senkrecht zu der optischen Achse O des Mikroskopobjektives 110 motorisch bewegbar. Durch die Bewegung der Probe 102 relativ zu dem Mikroskopobjektiv 110 können verschiedene Probenbereiche 600, 602 (vgl. **Fig. 6**) in das Sichtfeld der Bildaufnahmeeinheit 106 gebracht werden. Insbesondere können durch Bewegen der Probe 102 relativ zu dem Mikroskopobjektiv 110 ein erstes Einzelbild der Probe 102 erzeugt werden, das einem ersten Probenbereich 600 entspricht, und zumindest ein zweites Einzelbild der Probe 102 erzeugt werden, das einem zweiten Probenbereich 602 entspricht, der von dem ersten Probenbereich 600 verschieden ist und der mit dem ersten Probenbereich 600 in einem Überlappungsbereich 402, 604 (vgl. **Fig. 4a** und **6**) überlappt. Es können ferner weitere Einzelbilder erzeugt werden, beispielsweise ein drittes Einzelbild, das einem dritten Probenbereich entspricht, der von dem ersten Probenbereich 600 und dem zweiten Probenbereich 602 verschieden ist und der mit dem ersten Probenbereich 600 und dem zweiten Probenbereich 602 in einem weiteren Überlappungsbereich 404 (vgl. **Fig. 4b**) überlappt. Die Einzelbilder können dann zu einem Bild der Probe 102 zusammengesetzt werden, das einen Bereich der Probe 102 abbildet, der größer als das Sichtfeld der Bildaufnahmeeinheit 106 ist.

[0039] Die Beleuchtungseinheit 104 umfasst eine Lichtquelle 120, die dazu ausgebildet ist, Beleuchtungslicht zum Beleuchten der Probe 102 zu erzeugen. Die Beleuchtungseinheit 104 umfasst ferner eine der Lichtquelle 120 nachfolgend angeordnete Lichtmodulationseinheit 122. Die Lichtmodulationseinheit 122 ist dazu ausgebildet, aus dem Beleuchtungslicht eine strukturierte Beleuchtung 400, 406 (vgl. **Fig. 4a** und **4b**) mit einem räumlich modulierten Intensitätsmuster zu erzeugen. Die strukturierte Beleuchtung 400, 406 wird von dem Strahlteiler 112 in Richtung der Mikroskopobjektives 110 abgelenkt

und durch das Mikroskopobjektiv 110 auf die Probe 102 abgebildet, um die Probe 102 zu beleuchten.

[0040] Die strukturierte Beleuchtung 400, 406 ist räumlich derart moduliert, dass zumindest der Überlappungsbereich 402, 604 mit Beleuchtungslicht einer geringeren Intensität beleuchtet wird, als der übrige erste Probenbereich und der übrige zweite Probenbereich. Eine beispielhafte strukturierte Beleuchtung 400 der Probe 102 bei der Aufnahme der beiden Einzelbilder ist im Folgenden anhand der **Fig. 4a** noch näher beschrieben. Werden mehr als zwei Einzelbilder erzeugt, ist die strukturierte Beleuchtung 406 derart moduliert, dass zusätzlich zumindest der weitere Überlappungsbereich 404 beim Erzeugen des ersten Einzelbildes, des zweiten Einzelbildes und des dritten Einzelbildes jeweils mit Beleuchtungslicht einer noch geringeren Intensität beleuchtet wird, als der Überlappungsbereich 402, 604. Eine beispielhafte strukturierte Beleuchtung 406 der Probe 102 bei der Aufnahme der mehr als zwei Einzelbilder ist im Folgenden anhand der **Fig. 4b** noch näher beschrieben.

[0041] Beim Erzeugen der Einzelbilder werden die Überlappungsbereiche 402, 404, 604 mehrmals beleuchtet. Hierdurch kann es zu einer Ausbleichung der Probe 102 in den Überlappungsbereichen 402, 404, 604 kommen. Dadurch, dass die Überlappungsbereiche 402, 404, 604 mit der geringeren bzw. noch geringeren Intensität beleuchtet werden, wird das Ausbleichen verhindert. Hierdurch werden Artefakte, die durch das Ausbleichen entstehen, in dem zusammengesetzten Bild vermieden.

[0042] Die Lichtmodulationseinheit 122 kann verschiedene passive oder aktive optische Elemente aufweisen, die entweder durch Transmission oder durch Reflektion aus dem Beleuchtungslicht die strukturierte Beleuchtung erzeugen. Beispielsweise kann die Lichtmodulationseinheit 122 ein strukturiertes optisches Filter oder einen in Transmission arbeitenden steuerbaren Flächenlichtmodulator aufweisen, beispielsweise ein Flüssigkristallelement. Beispiele für mit Reflektion arbeitende optische Elemente, die ein Teil der Lichtmodulationseinheit 122 sein können, sind ein Spiegel mit einer strukturierten Beschichtung oder ein ansteuerbares Mikrospiegelarray.

[0043] Die Vorrichtung 100 umfasst ferner eine Steuereinheit 124, die dazu ausgebildet ist, die Beleuchtungseinheit 104, die Bildaufnahmeeinheit 106 und den Mikroskoptisch 108 zu steuern. Die Steuereinheit 124 ist ferner dazu ausgebildet, ein Verfahren zum Erzeugen des zusammengesetzten Bildes der Probe 102 auszuführen. Bei dem Verfahren steuert die Steuereinheit 124 die Bildaufnahmeeinheit 106 und den Mikroskoptisch 108 derart, dass das erste Einzelbild der Probe 102 und zumindest

das zweite Einzelbild der Probe 102 erzeugt werden. Die Steuereinheit 124 steuert ferner die Beleuchtungseinheit 104 derart, dass zumindest der Überlappungsbereich 402, 604 beim Erzeugen des ersten Einzelbildes und des zweiten Einzelbildes jeweils mit Beleuchtungslicht der geringeren Intensität beleuchtet wird. Das Verfahren ist im Folgenden anhand der **Fig. 7** noch näher beschrieben.

[0044] **Fig. 2** zeigt in schematischer Darstellung eine Vorrichtung 200 zum Erzeugen eines zusammengesetzten Bildes der Probe 102 nach einem weiteren Ausführungsbeispiel.

[0045] Die Vorrichtung 200 nach **Fig. 2** unterscheidet sich von der Vorrichtung 100 nach **Fig. 1** darin, dass die Vorrichtung 200 nach **Fig. 2** als ein Durchlichtmikroskop ausgebildet ist. In diesem Ausführungsbeispiel ist die Beleuchtungseinheit 104 unterhalb des Mikroskoptisches 108 angeordnet, so dass die Probe 102 von unten mit der strukturierten Beleuchtung 400, 406 beleuchtet wird. Die Bildaufnahmeeinheit 202 ist oberhalb des Mikroskoptisches 108 angeordnet. Die Anordnung der Beleuchtungseinheit 104 und der Bildaufnahmeeinheit 106 macht die Vorrichtung 200 nach **Fig. 2** zu einem aufrechten Mikroskop. Die Anordnung der Beleuchtungseinheit 104 und der Bildaufnahmeeinheit 106 kann auch vertauscht werden, so dass ein inverses Mikroskop gebildet ist. Das optische System 204 der Vorrichtung 200 weist den Strahlteiler 112 nicht auf.

[0046] **Fig. 3** zeigt in schematischer Darstellung eine Vorrichtung 300 zum Erzeugen eines zusammengesetzten Bildes der Probe 102 nach einem weiteren Ausführungsbeispiel.

[0047] Die Vorrichtung 300 nach **Fig. 3** unterscheidet sich von der Vorrichtung 100 nach **Fig. 1** darin, dass die Beleuchtungseinheit 302 eine zweite Lichtquelle 304 umfasst, die dazu ausgebildet ist, das Beleuchtungslicht mit der geringeren Intensität zu erzeugen. Die Beleuchtungseinheit 302 umfasst ferner ein den Lichtquellen 120, 302 nachfolgend angeordnetes Faserbündel 304, das dazu ausgebildet ist, das Beleuchtungslicht mit einer normalen, d.h. nicht reduzierten, Intensität von der ersten Lichtquelle 120 und das Beleuchtungslicht mit der geringen Intensität von der zweiten Lichtquelle 304 zu empfangen und zu der strukturieren Beleuchtung 400 zu formen. Das Faserbündel 306 lenkt die strukturierte Beleuchtung 400 dann auf den Strahlteiler 112.

[0048] Die **Fig. 4a** und **4b** zeigen jeweils in schematischer Darstellung beispielhafte strukturierte Beleuchtung 400, 406 der Probe 102 bei der Aufnahme der Einzelbilder mit einer der Vorrichtungen 100, 200, 400 nach den **Fig. 1, 2** und **3**.

[0049] Die Vorrichtungen 100, 200, 400 nach den **Fig. 1, 2 und 3** sind jeweils Weitfeldmikroskope, d.h. bei der Bilderzeugung wird jeweils das gesamte Sichtfeld oder zumindest ein großer Teil des Sichtfeldes auf einmal beleuchtet und abgebildet. Der Überlappungsbereich 402 bzw. die Überlappungsbereiche 402, 404 befinden sich jeweils am Rande des Sichtfeldes. Daher weisen die in den **Fig. 4a und 4b** gezeigten strukturierte Beleuchtung 400, 406 jeweils eine Vignettierung auf. Dies bedeutet, dass die Intensität am Rande des Sichtfeldes geringer ist als die Intensität im Zentrum des Sichtfeldes. Die verschiedenen Intensitäten sind in den **Fig. 4a und 4b** dabei jeweils durch unterschiedliche Schraffur dargestellt.

[0050] Die in **Fig. 4a** gezeigte strukturierte Beleuchtung 400 kommt insbesondere bei der Aufnahme von zwei überlappenden Einzelbildern zur Verwendung. Die strukturierte Beleuchtung 400 weist eine Vignettierung auf, bei welcher der Rand des Sichtfeldes, der dem Überlappungsbereich 402 entspricht, mit Beleuchtungslicht der geringeren Intensität beleuchtet wird. Das Zentrum des Sichtfeldes, das dem übrigen ersten Probenbereich bzw. dem übrigen zweiten Probenbereich entspricht, wird dabei mit Beleuchtungslicht der normalen Intensität beleuchtet. Beispielsweise beträgt die geringere Intensität am Rand des Sichtfeldes 50% der normalen Intensität im Zentrum des Sichtfeldes. Die kumulierte Intensität, mit welcher der Überlappungsbereich 402 in Verlauf der Aufnahme der beiden Einzelbilder beleuchtet wird, beträgt daher 100%.

[0051] Die in **Fig. 4b** gezeigte strukturierte Beleuchtung 406 kommt insbesondere bei der Aufnahme von mehr als zwei Einzelbildern zur Verwendung. Die strukturierte Beleuchtung 406 nach **Fig. 4b** unterscheidet sich von der strukturierten Beleuchtung 400 nach **Fig. 4a** darin, dass diese eine Vignettierung aufweist, bei welcher die Kanten des Sichtfeldes, die dem weiteren Überlappungsbereich 404 entsprechen, mit der noch geringeren Intensität beleuchtet werden. Beispielsweise beträgt die noch geringere Intensität am Rand des Sichtfeldes 33% oder 25% der normalen Intensität im Zentrum des Sichtfeldes. Die kumulierte Intensität, mit welcher der weitere Überlappungsbereich in Verlauf der Aufnahme von drei bzw. vier Einzelbildern beleuchtet wird, beträgt daher jeweils 100%.

[0052] **Fig. 5** zeigt in schematischer Darstellung eine Vorrichtung 500 zum Erzeugen eines zusammengesetzten Bildes der Probe 102 nach einem weiteren Ausführungsbeispiel.

[0053] Die Vorrichtung 500 nach **Fig. 5** unterscheidet sich von der Vorrichtung 100 nach der **Fig. 1** darin, dass die Vorrichtung 500 nach **Fig. 5** als ein Mikroskop mit einer abtastenden Beleuchtung ausgebildet ist. Die abtastende Beleuchtung wird durch

eine Abtasteinheit 502 der Beleuchtungseinheit 504 realisiert, die rein beispielhaft zwischen dem Strahlteiler 112 und dem Mikroskopobjektiv 110 angeordnet ist. Die Anordnung der Abtasteinheit 502 in **Fig. 5** realisiert eine sogenannte descanned Anordnung, bei der das von der Probe 102 ausgehende Detektionslicht immer auf den selben Punkt des Sensorelementes 116 fällt. Durch eine Anordnung der Abtasteinheit 502 zwischen dem Strahlteiler 112 und der Lichtquelle 120 kann eine non-descanned Anordnung realisiert werden, bei der das von der Probe 102 ausgehende Detektionslicht bei Abtasten der Probe 102 mit dem Beleuchtungslicht auf verschiedene Punkte des Sensorelementes 116 fällt. Die Steuereinheit 506 der Vorrichtung 500 ist zusätzlich dazu ausgebildet, die Beleuchtungseinheit 504 zum Realisieren der abtastenden Beleuchtung zu steuern.

[0054] Bei der abtastenden Beleuchtung wird die Probe 102 entweder punktweise oder zeilenweise mit dem Beleuchtungslicht abgetastet. Um dabei den Überlappungsbereich 604 (vgl. **Fig. 6**) mit der geringeren Intensität bzw. den weiteren Überlappungsbereich 404 mit der noch geringeren Intensität zu beleuchten, muss das Beleuchtungslicht immer dann gedämpft werden, wenn die Beleuchtung gerade die Überlappungsbereiche 604, 404 abtastet. Hierzu weist die Vorrichtung 500 nach **Fig. 5** eine Dämpfungseinheit 506 auf, die der Lichtquelle 120 nachfolgend angeordnet ist. Die Dämpfungseinheit 506 ist ansteuerbar und dazu ausgebildet, die Intensität des Beleuchtungslichtes zu reduzieren, wenn die Dämpfungseinheit 506 entsprechend angesteuert wird. Beispiele für optische Elemente, die ein Teil der Dämpfungseinheit 506 sein können, sind akustisch-optisch abstimmbare Filter, akustisch-optische Modulatoren, elektrisch-optische Modulatoren und Pockels-Zellen. Alternativ zu der Dämpfung des Beleuchtungslichtes mit der Dämpfungseinheit 506, kann auch die Lichtquelle 120 derart ausgebildet sein, dass die Intensität des von der Lichtquelle 120 erzeugten Beleuchtungslichtes steuerbar ist. Die Beleuchtung der Probe 102 mit der abtastenden Beleuchtung beim Erzeugen der Einzelbilder ist im Folgenden anhand der **Fig. 6** noch näher beschrieben.

[0055] Die Beleuchtungseinheit 504 der Vorrichtung 500 nach **Fig. 5** kann insbesondere dazu ausgebildet sein, eine lichtblattartige Beleuchtungslichtverteilung zu erzeugen. Die lichtblattartige Beleuchtungslichtverteilung kann dabei entweder statisch, d.h. durch eine der Lichtquelle 120 nachfolgend angeordnete Optik, beispielsweise eine Zylinderlinse, oder dynamisch, d.h. durch eine schnelle lineare Bewegung eines Beleuchtungslichtstrahls, erzeugt werden. Das optische System 508 der Vorrichtung 500 umfasst das Mikroskopobjektiv 112, die Abtasteinheit 502, den Strahlteiler 112 und die Tubuslinse 114. Die

Bildaufnahmeeinheit 510 der Vorrichtung 500 umfasst das optische System 508 und das Sensorelement 116.

[0056] Fig. 6 zeigt in schematischer Darstellung die abtastende Beleuchtung der Probe 102 bei der Aufnahme der Einzelbilder mit der Vorrichtung 500 nach Fig. 5.

[0057] Die beiden Probenbereiche 600, 602 sind in Fig. 6 beispielhaft als zwei horizontal zueinander versetzte Rechtecke dargestellt. Der erste Probenbereich 600 ist in Fig. 6 links dargestellt und der zweite Probenbereich 602 ist in Fig. 6 rechts dargestellt. Der Überlappungsbereich 604 befindet sich dort, wo sie der erste Probenbereich 600 und der zweite Probenbereich 602 überschneiden, d.h. am rechten Rand des ersten Probenbereiches 600 und am linken Rand des zweiten Probenbereiches 602.

[0058] Beim Erzeugen des ersten Einzelbildes wird der erste Probenbereich 600 mit der abtastenden Beleuchtung abgetastet. Dies erfolgt zum Beispiel punktweise, d.h. aus dem Beleuchtungslicht wird mindestens ein Beleuchtungspunkt erzeugt, mit dem der erste Probenbereich 600 abgerastert wird. Die abtastende Beleuchtung kann auch zeilenweise erfolgen, d.h. aus dem Beleuchtungslicht wird eine Beleuchtungslinie geformt, beispielsweise durch eine schnelle lineare Bewegung eines Beleuchtungslichtstrahls, mit dem der erste Probenbereich 600 entlang einer Richtung abgetastet wird, beispielsweise von links nach rechts in Fig. 6. Die abtastende Beleuchtung kann ferner durch die lichtblattartige Beleuchtungslichtverteilung realisiert werden, insbesondere durch ein dynamisch erzeugtes Lichtblatt. Bei der Beleuchtung mit dem dynamisch erzeugten Lichtblatt ist die Lichtausbreitungsrichtung des Lichtblattes in Fig. 6 vertikal, d.h. von unten nach oben oder von oben nach unten. Beim Erzeugen des zweiten Einzelbildes wird der zweite Probenbereich 602 mit der abtastenden Beleuchtung gleichsam dem ersten Probenbereich 600 abgetastet.

[0059] Damit der Überlappungsbereich 604 jeweils mit der geringen Intensität beleuchtet wird, wird die Intensität des Beleuchtungslichtes immer dann auf die geringe Intensität reduziert, wenn die abtastende Beleuchtung gerade den Überlappungsbereich 604 abtastet. Bei der punktwisen Beleuchtung wird die Intensität dann auf die geringe Intensität reduziert, wenn sich der Beleuchtungspunkt gerade in dem Überlappungsbereich 604 befindet. Bei der zeilenweisen Beleuchtung wird die Intensität dann auf die geringe Intensität reduziert, wenn die Beleuchtungslinie den Überlappungsbereich 604 überfährt. Bei der Beleuchtung mit dem dynamisch erzeugten Lichtblatt wird die Intensität immer dann auf die geringe Intensität reduziert, wenn der Lichtstrahl, der für die Erzeugung des Lichtblattes linear bewegt wird, den

Überlappungsbereich 604 überfährt. Die verschiedenen Intensitäten sind in der Fig. 6 dabei jeweils durch unterschiedliche Schraffur dargestellt.

[0060] Fig. 7 zeigt einen Ablaufplan eines Verfahrens zum Erzeugen eines zusammengesetzten Bildes einer Probe 102.

[0061] Das Verfahren kann insbesondere mit einer der oben beschriebenen Vorrichtungen 100, 200, 300, 500 durchgeführt werden. In Schritt S700 wird das Verfahren gestartet. In dem optionalen Schritt S702 wird eine Kalibrierung durchgeführt, um den Wert der geringen Intensität und gegebenenfalls den Wert der noch geringeren Intensität zu bestimmen. Der Wert der geringeren Intensität wird derart bestimmt, dass die Intensität des von der Probe 102 ausgehenden Detektionslichtes beim Beleuchten mit der geringeren Intensität halb so groß ist wie beim Beleuchten mit Beleuchtungslicht der normalen Intensität. Der Wert der noch geringeren Intensität wird derart bestimmt, dass die Intensität des von der Probe 102 ausgehenden Detektionslichtes beim Beleuchten mit der noch geringeren Intensität ein Drittel der Intensität beim Beleuchten mit Beleuchtungslicht der normalen Intensität beträgt, wenn sich in dem weiteren Überlappungsbereich 404 drei Probenbereiche überlappen. Entsprechend wird der Wert der noch geringeren Intensität derart bestimmt, dass die Intensität des von der Probe 102 ausgehenden Detektionslichtes beim Beleuchten mit der noch geringeren Intensität ein Viertel der Intensität beim Beleuchten mit Beleuchtungslicht der normalen Intensität beträgt, wenn sich in dem weiteren Überlappungsbereich 404 vier Probenbereiche überlappen.

[0062] In einem Regime, in dem sich die Fluoreszenzantwort der Probe 102 linear verhält, kann die geringere Intensität als die Hälfte der normalen Intensität bestimmt werden bzw. kann die noch geringere Intensität als ein Drittel oder ein Viertel der normalen Intensität bestimmt werden. Außerhalb des linearen Regimes muss in Schritt S702 eine Kalibrierungsmessung durchgeführt werden, anhand derer die Fluoreszenzantwort der Probe 102 qualitativ bestimmt werden kann, beispielsweise in Form einer Tabelle, einer Interpolation oder eines gefitteten funktionalen Zusammenhangs. Diese Kalibrierungsmessung kann beispielsweise in einem Probenbereich erfolgen, der für die eigentliche Bilderzeugung uninteressant ist. Alternativ oder zusätzlich kann die Kalibrierungsmessung auch an Fluorophoren außerhalb der Probe 102, d.h. unter Verwendung eines Testobjektes, erfolgen.

[0063] In Schritt S704 steuert die Steuereinheit 124 den Mikroskopisch 108 derart, dass der erste Probenbereich 600 in dem Sichtfeld der Bildaufnahmeeinheit 106 liegt. In Schritt S706 wird dann das erste

Einzelbild erzeugt, das dem ersten Probenbereich 600 entspricht. Dabei wird der Überlappungsbereich 402, 604 mit dem Beleuchtungslicht der geringeren Intensität beleuchtet und der übrige erste Probenbereich wird mit dem Beleuchtungslicht der normalen Intensität beleuchtet. In Schritt S708 steuert die Steuereinheit 124 den Mikroskoptisch 108 derart, dass der zweite Probenbereich 602 in dem Sichtfeld der Bildaufnahmeeinheit 106 liegt. In Schritt S710 wird dann das zweite Einzelbild erzeugt, das dem zweiten Probenbereich 602 entspricht. Dabei wird der Überlappungsbereich 402, 604 mit dem Beleuchtungslicht der geringeren Intensität beleuchtet und der übrige zweite Probenbereich wird mit dem Beleuchtungslicht der normalen Intensität beleuchtet.

[0064] Die Schritte S708 und S710 können optional für weitere Probenbereiche durchgeführt werden. Werden weitere Probenbereiche abgebildet steuert die Steuereinheit 124 die Beleuchtungseinheit 104, 504 in den Schritten S706 und S710 jeweils derart, dass die weiteren Überlappungsbereiche, d.h. Bereiche der Probe, an denen sich jeweils drei oder mehr Probenbereiche 600, 602 überlappen, mit der noch geringeren Intensität beleuchtet werden. In dem optionalen Schritt S712 erzeugt die Steuereinheit 124 den Einzelbildern entsprechende Bilddaten. Die die Steuereinheit 124 verarbeitet die Bilddaten dann zu dem zusammengesetzten Bild der Probe, das alle aufgenommenen Probenbereiche 600, 602 umfasst. Das Verfahren wird dann in Schritt S714 beendet.

[0065] Der Begriff „und/oder“ umfasst alle Kombinationen von einem oder mehreren der zugehörigen aufgeführten Elemente und kann mit „/“ abgekürzt werden.

[0066] Obwohl einige Aspekte im Rahmen einer Vorrichtung beschrieben wurden, ist es klar, dass diese Aspekte auch eine Beschreibung des entsprechenden Verfahrens darstellen, wobei ein Block oder eine Vorrichtung einem Verfahrensschritt oder einer Funktion eines Verfahrensschritts entspricht. Analog dazu stellen Aspekte, die im Rahmen eines Verfahrensschritts beschrieben werden, auch eine Beschreibung eines entsprechenden Blocks oder Elements oder einer Eigenschaft einer entsprechenden Vorrichtung dar.

Bezugszeichenliste

100	Vorrichtung
102	Probe
104	Beleuchtungseinheit
106	Bildaufnahmeeinheit
108	Mikroskoptisch
110	Mikroskopobjektiv

112	Strahlteiler
114	Tubuslinse
116	Sensorelement
118	optisches System
120	Lichtquelle
122	Lichtmodulationseinheit
124	Steuereinheit
200	Vorrichtung
202	Bildaufnahmeeinheit
204	optisches System
300	Vorrichtung
302	Beleuchtungseinheit
304	Lichtquelle
306	Faserbündel
400	strukturierte Beleuchtung
402, 404	Überlappungsbereich
406	strukturierte Beleuchtung
500	Vorrichtung
502	Abtasteinheit
504	Beleuchtungseinheit
506	Dämpfungseinheit
508	optisches System
510	Bildaufnahmeeinheit
600, 602	Probenbereich
604	Überlappungsbereich
O	optische Achse

Patentansprüche

1. Vorrichtung (500) zum Erzeugen eines zusammengesetzten Bildes einer Probe (102), umfassend
 eine Beleuchtungseinheit (504), die dazu ausgebildet ist, Beleuchtungslicht zum Beleuchten der Probe (102) zu erzeugen,
 eine Bildaufnahmeeinheit (510), die dazu ausgebildet ist, ein erstes Einzelbild der Probe (102) und zumindest ein zweites Einzelbild der Probe (102) zu erzeugen, wobei das erste Einzelbild einem ersten Probenbereich (600) entspricht und das zweite Einzelbild einem zweiten Probenbereich (602) entspricht, der von dem ersten Probenbereich (600) verschieden ist und der mit dem ersten Probenbereich in einem Überlappungsbereich (402, 604) überlappt,
 eine Steuereinheit (124), die dazu ausgebildet ist, die Beleuchtungseinheit (504) derart zu steuern, dass zumindest der Überlappungsbereich (402,

604) beim Erzeugen des ersten Einzelbildes und des zweiten Einzelbildes jeweils mit Beleuchtungslicht einer geringeren Intensität beleuchtet wird, als der übrige erste Probenbereich und der übrige zweite Probenbereich, und eine der Beleuchtungseinheit (504) nachfolgend angeordnete Abtasteinheit (502), die dazu ausgebildet ist, das Beleuchtungslicht zum Erzeugen einer abtastenden Beleuchtung abzulenken; wobei die Steuereinheit (124) dazu ausgebildet ist, die Abtasteinheit (502) derart zu steuern, dass zum Erzeugen des ersten Einzelbildes der erste Probenbereich (600) punktwise oder zeilenweise mit dem Beleuchtungslicht abgetastet wird und zum Erzeugen des zweiten Einzelbildes der zweite Probenbereich (602) punktwise bzw. zeilenweise mit dem Beleuchtungslicht abgetastet wird, und die Beleuchtungseinheit (504) derart zu steuern, dass zumindest zum Beleuchten des Überlappungsbereiches (402, 604) die Intensität des Beleuchtungslichtes auf die geringere Intensität verringert wird, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Steuereinheit (124) ferner dazu ausgebildet ist, die Vorrichtung (500) zum Durchführen eines Kalibrierungsschrittes zum Bestimmen der geringeren Intensität zu steuern, wobei der Wert der geringeren Intensität derart bestimmt wird, dass die Intensität von Detektionslicht, das beim Beleuchten von der Probe (102) ausgeht, beim Beleuchten mit Beleuchtungslicht der geringeren Intensität halb so groß ist wie beim Beleuchten mit Beleuchtungslicht einer normalen Intensität, mit der der übrige erste Probenbereich und der übrige zweite Probenbereich beleuchtet werden.

2. Vorrichtung (500) nach Anspruch 1, wobei die Beleuchtungseinheit (504) eine Lichtquelle (120) zum Erzeugen des Beleuchtungslichtes und eine der Lichtquelle (120) nachfolgend angeordnete Dämpfungseinheit (506) umfasst, die dazu ausgebildet ist, die Intensität des Beleuchtungslichtes zu verringern.

3. Vorrichtung (500) nach Anspruch 2, wobei die Dämpfungseinheit (506) eines der folgenden optischen Elemente umfasst, einen akustisch-optischen abstimmbaren Filter, einen akustisch-optischen Modulator, einen elektrisch-optischen Modulator und eine Pockels-Zelle.

4. Vorrichtung (500) nach Anspruch 1, wobei die Beleuchtungseinheit (504) eine Lichtquelle (120) zum Erzeugen des Beleuchtungslichtes umfasst, die zum Steuern der Intensität des Beleuchtungslichtes ansteuerbar ist.

5. Vorrichtung (500) nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Beleuchtungseinheit (504) dazu ausgebildet ist, eine lichtblattartige

Beleuchtungslichtverteilung des Beleuchtungslicht in der Probe (102) zu erzeugen.

6. Vorrichtung (500) nach einem der vorhergehenden Ansprüche, umfassend einen motorisierten Mikroskoptisch (108), der dazu ausgebildet ist, die Probe (102) aufzunehmen, wobei die Steuereinheit (124) dazu ausgebildet ist, den Mikroskoptisch (108) zum Erzeugen des ersten Einzelbildes derart zu verfahren, dass der erste Probenbereich (600) in einem Sichtfeld der Bildaufnahmeeinheit (510) liegt, und zum Erzeugen des zweiten Einzelbildes derart zu verfahren, dass der zweite Probenbereich (602) in dem Sichtfeld der Bildaufnahmeeinheit (510) liegt.

7. Vorrichtung (500) nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Beleuchtungseinheit (504) dazu ausgebildet ist, Beleuchtungslicht zum Anregen von in der Probe (102) angeordneten Fluorophoren zu erzeugen.

8. Vorrichtung (500) nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Bildaufnahmeeinheit (510) ein Sensorelement (116) und ein optisches System (508) umfasst, das dazu ausgebildet ist, das Beleuchtungslicht auf die Probe (102) zu lenken und von der Probe (102) ausgehendes Detektionslicht auf das Sensorelement (116) zu lenken.

9. Vorrichtung (500) nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Bildaufnahmeeinheit (510) ein optisches System (508) umfasst; und wobei das optische System (508) zumindest ein auf die Probe (102) gerichtetes Mikroskopobjektiv (110) umfasst und das optische System (508) ein Mikroskop bildet.

10. Vorrichtung (500) nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Bildaufnahmeeinheit (510) dazu ausgebildet ist, mindestens ein drittes Einzelbild der Probe (102) zu erzeugen, wobei das dritte Einzelbild einem dritten Probenbereich entspricht, der von dem ersten Probenbereich und dem zweiten Probenbereich verschieden ist und der mit dem ersten Probenbereich und dem zweiten Probenbereich in einem weiteren Überlappungsbereich (404) überlappt; und wobei die Steuereinheit (124) dazu ausgebildet ist, die Beleuchtungseinheit (504) derart zu steuern, dass zumindest der weitere Überlappungsbereich (404) beim Erzeugen des ersten Einzelbildes, des zweiten Einzelbildes und des dritten Einzelbildes jeweils mit Beleuchtungslicht einer noch geringeren Intensität beleuchtet wird, als der Überlappungsbereich (402, 604).

11. Vorrichtung (500) nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Steuereinheit (124) dazu ausgebildet ist, dem ersten Einzelbild entsprechende erste Bilddaten und dem zweiten Einzelbild entsprechende zweite Bilddaten zum Erzeugen des

zusammengesetzten Bildes der Probe (102) zu verarbeiten, das eine Abbildung des ersten Probenbereiches (600) und des zweiten Probenbereiches (602) umfasst.

12. Verfahren zum Erzeugen eines zusammengesetzten Bildes einer Probe (102),
bei dem ein erstes Einzelbild der Probe (102) erzeugt wird, das einem ersten Probenbereich (600) entspricht, in dem der erste Probenbereich (600) punktweise oder zeilenweise mit Beleuchtungslicht abgetastet wird; und
bei dem zumindest ein zweites Einzelbild der Probe (102) erzeugt wird, das einem zweiten Probenbereich (602) entspricht, der von dem ersten Probenbereich (600) verschieden ist und der mit dem ersten Probenbereich (602) in einem Überlappungsbereich (402, 604) überlappt, in dem der zweite Probenbereich (602) punktweise oder zeilenweise mit dem Beleuchtungslicht abgetastet wird;
wobei zumindest der Überlappungsbereich (402, 604) beim Erzeugen des ersten Einzelbildes und des zweiten Einzelbildes jeweils mit Beleuchtungslicht einer geringeren Intensität beleuchtet wird, als der übrige erste Probenbereich und der übrige zweite Probenbereich,
dadurch gekennzeichnet, dass
das Verfahren einen Kalibrierungsschritt zum Bestimmen der geringeren Intensität umfasst, wobei der Wert der geringeren Intensität derart bestimmt wird, dass die Intensität von Detektionslicht, das beim Beleuchten von der Probe (102) ausgeht, beim Beleuchten mit Beleuchtungslicht der geringeren Intensität halb so groß ist wie beim Beleuchten mit Beleuchtungslicht einer normalen Intensität, mit der der übrige erste Probenbereich und der übrige zweite Probenbereich beleuchtet werden.

Es folgen 7 Seiten Zeichnungen

FIG. 1

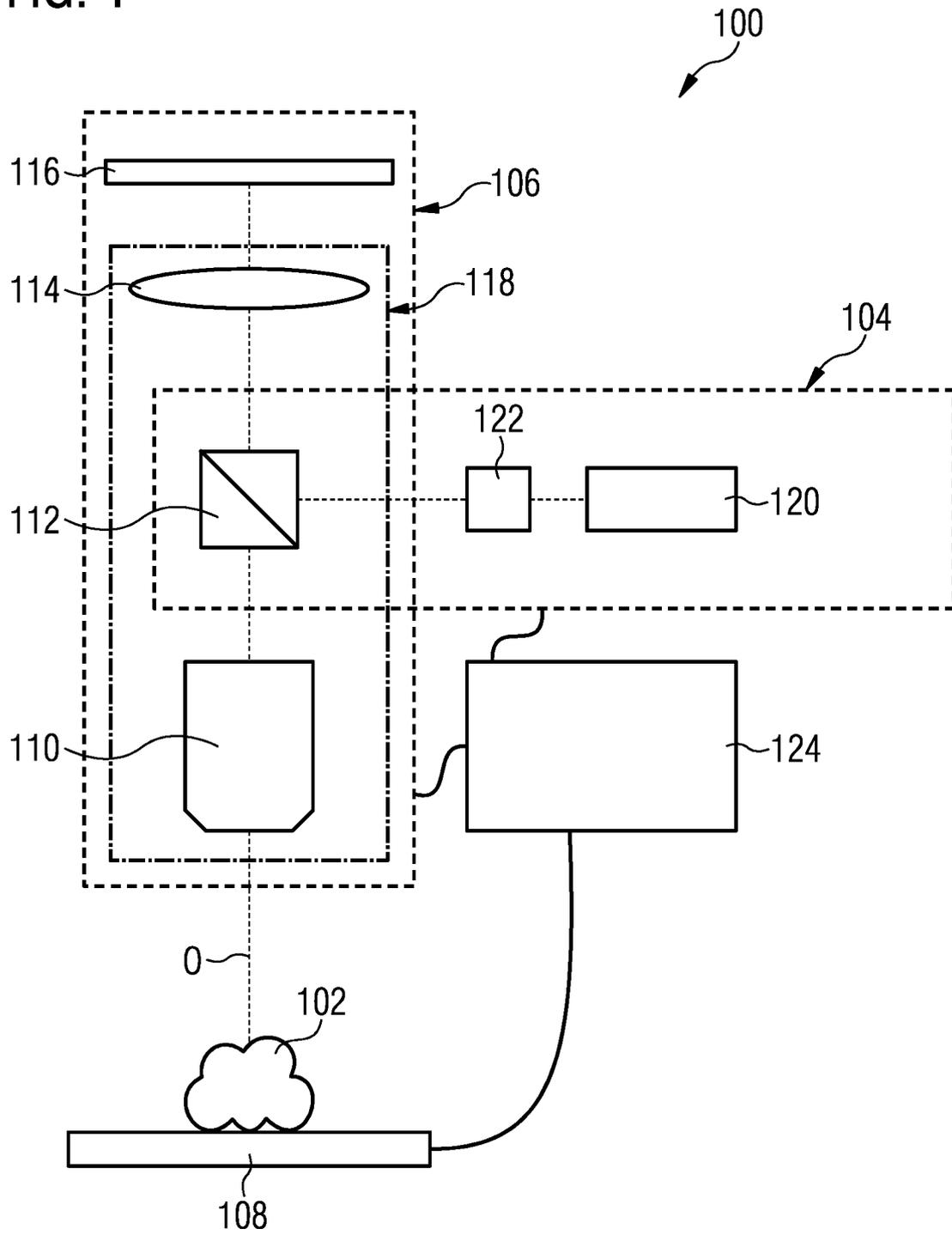


FIG. 2

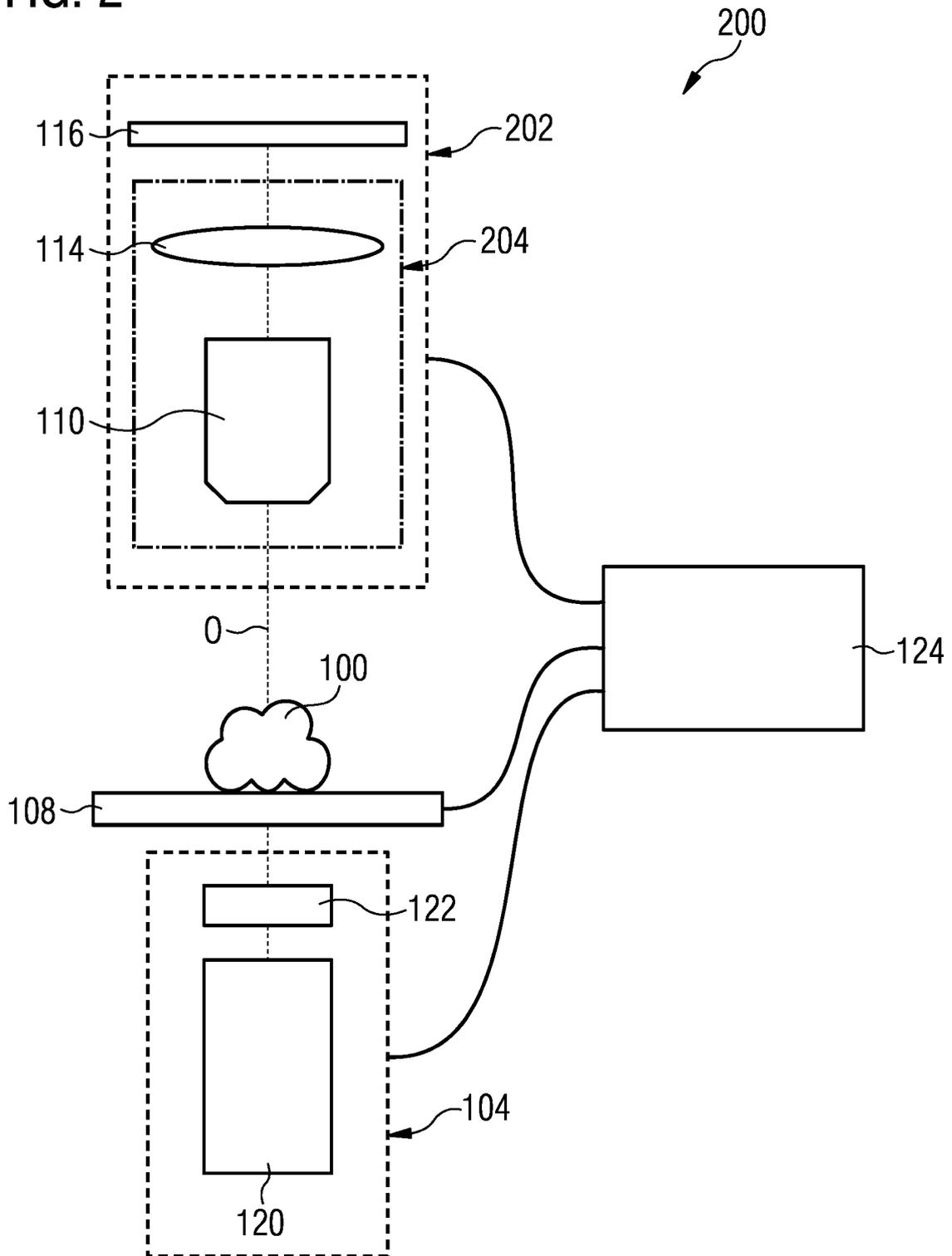
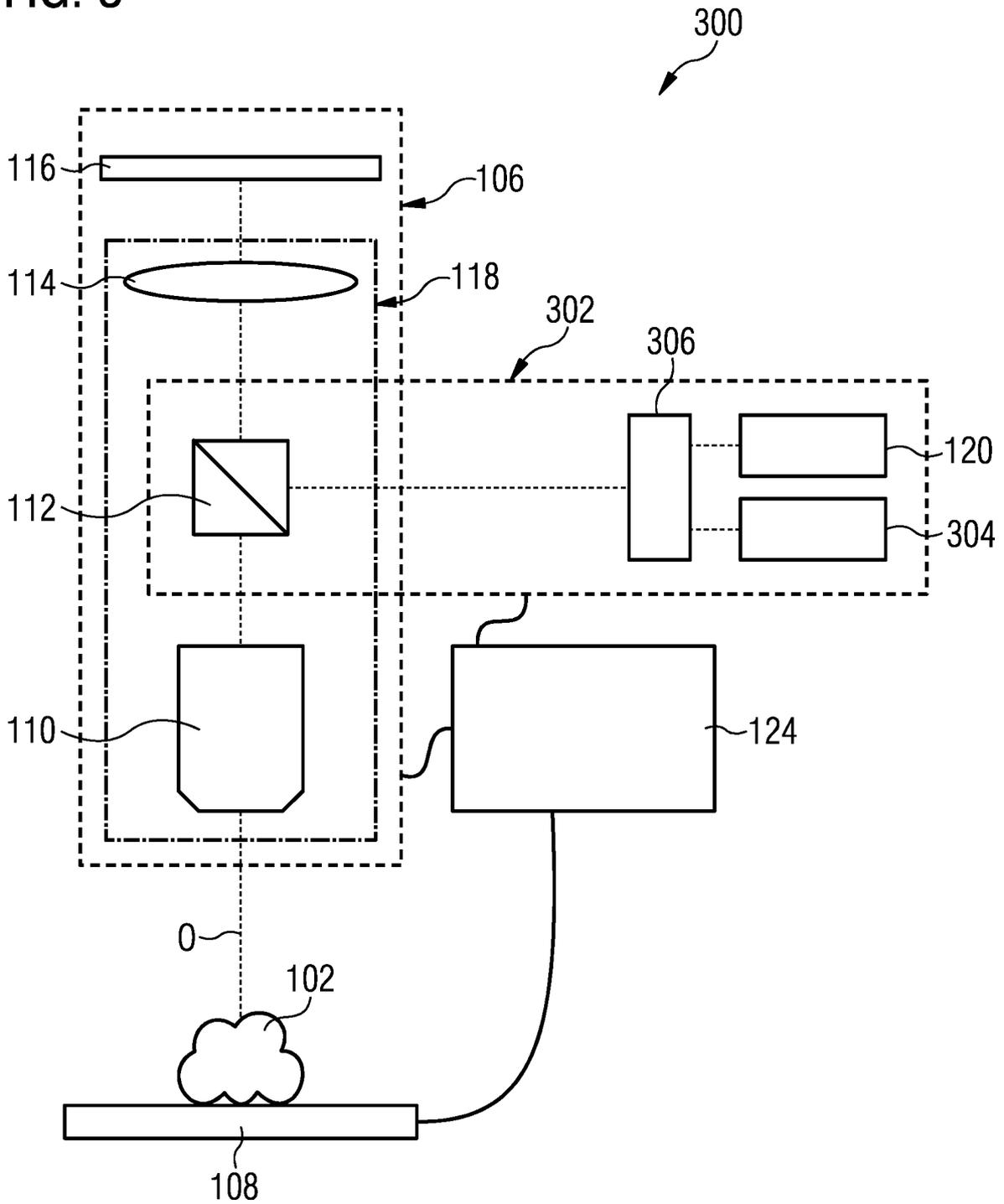


FIG. 3



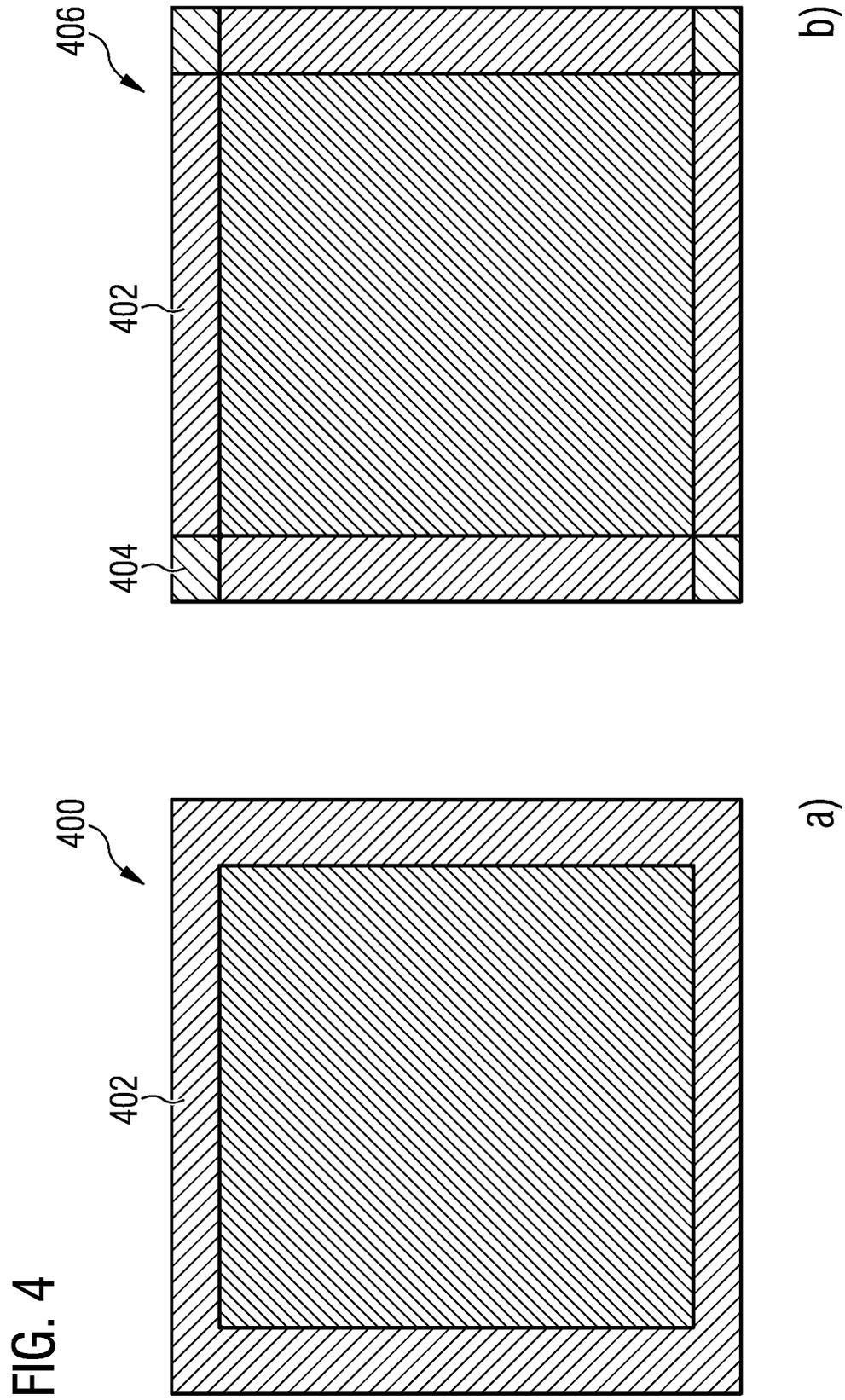


FIG. 5

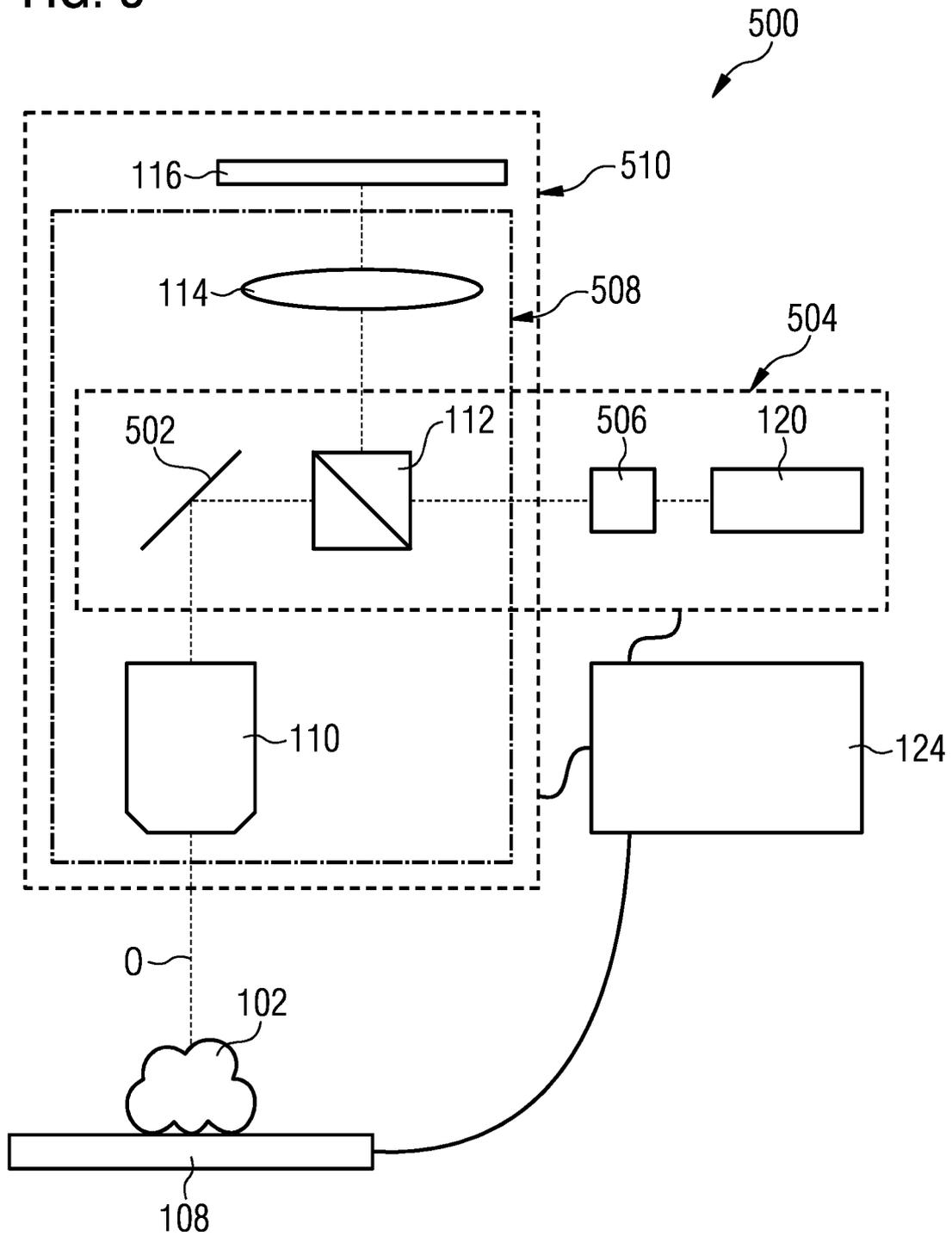


FIG. 6

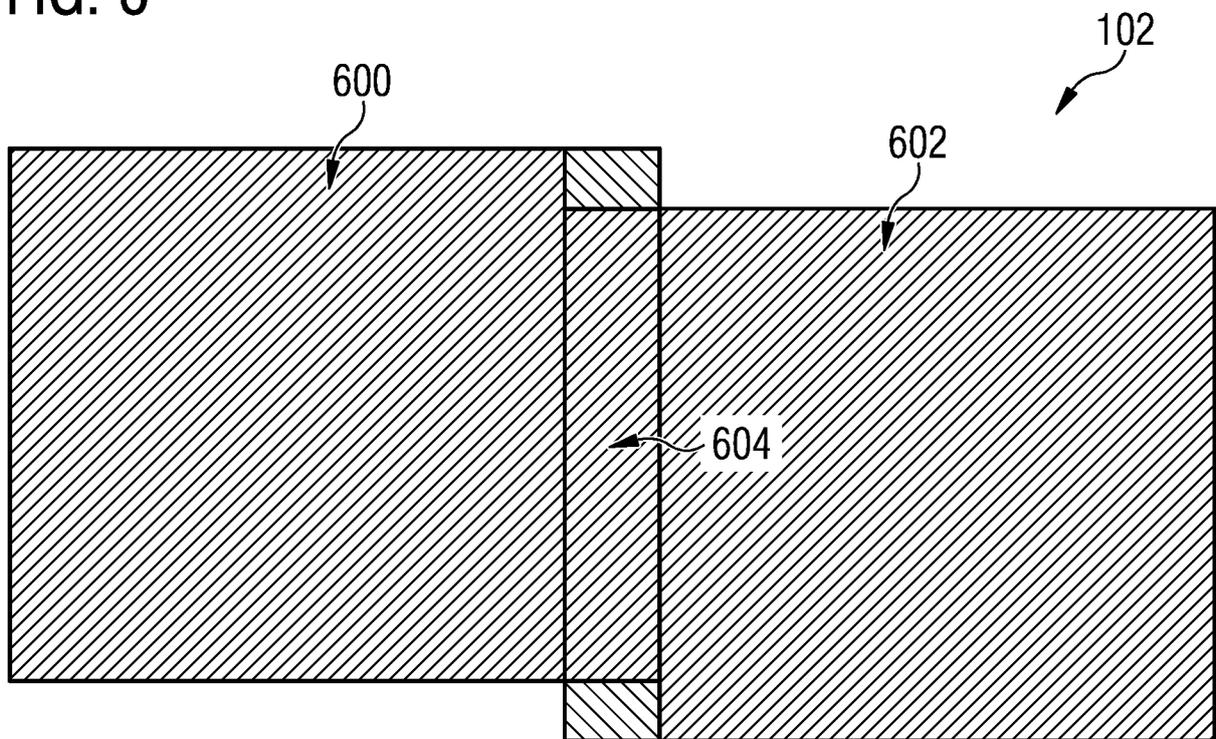


FIG. 7

