

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
2. Februar 2012 (02.02.2012)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2012/013586 A1**

- (51) Internationale Patentklassifikation:  
*G02B 21/16* (2006.01) *G01N 21/64* (2006.01)  
*G02B 21/36* (2006.01) *G02B 21/24* (2006.01)
- (74) **Anwalt:** SCHAUMBURG, THOENES, THURN, LANDSKRON, ECKERT; Postfach 86 07 48, 81634 München (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2011/062605
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
22. Juli 2011 (22.07.2011)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:  
10 2010 036 709.5 28. Juli 2010 (28.07.2010) DE
- (71) **Anmelder** (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): LEICA MICROSYSTEMS CMS GMBH [DE/DE]; Ernst-Leitz-Str. 17 - 37, 35578 Wetzlar (DE).
- (72) **Erfinder; und**
- (75) **Erfinder/Anmelder** (nur für US): DYBA, Marcus [DE/DE]; Brechtelstr. 2, 69126 Heidelberg (DE). FÖLLING, Jonas [DE/DE]; Alte Eppelheimer Straße 18, 69115 Heidelberg (DE).
- (81) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) **Title:** DEVICE AND METHOD FOR MICROSCOPIC IMAGE ACQUISITION OF A SAMPLE STRUCTURE

(54) **Bezeichnung :** EINRICHTUNG UND VERFAHREN ZUR MIKROSKOPISCHEN BILDAUFNAHME EINER PROBENSTRUKTUR

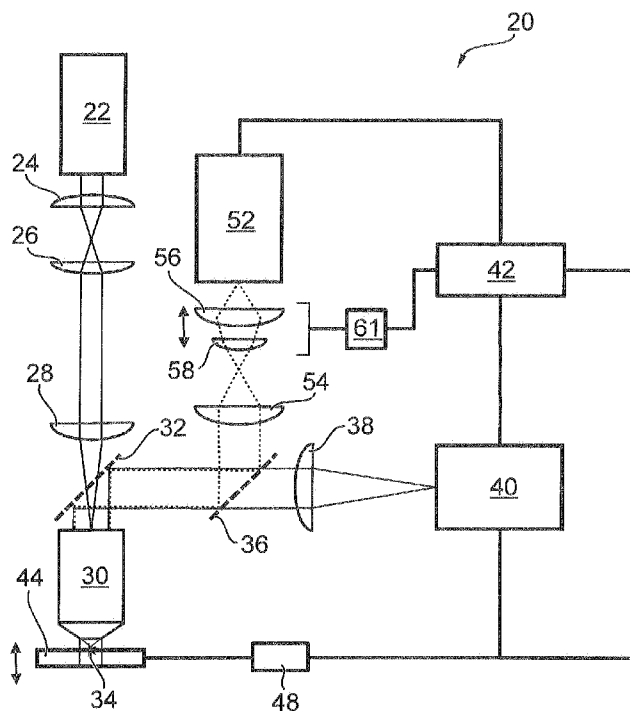


FIG. 4

(57) **Abstract:** The invention relates to a device and method for microscopic image acquisition of a sample structure. A lens (30, 38, 54, 56, 58) for imaging the sample structure (34), a reference structure (50) and a drift capture unit (42, 52) intended to capture a drift of the sample structure (34) relative to the lens (30, 38, 54, 56, 58) using the imaged reference structure are provided. The lens (30, 38, 54, 56, 58) comprises a first focal plane (46) for imaging the sample structure (34) and simultaneously a second focal plane (60) for imaging the reference structure (50), the position thereof being changeable relative to the first focal plane (46).

(57) **Zusammenfassung:** Beschrieben sind eine Einrichtung und ein Verfahren zur mikroskopischen Bildaufnahme einer Probenstruktur. Vorgesehen sind eine Optik (30, 38, 54, 56, 58) zum Abbilden der Probenstruktur (34) und eine Referenzstruktur (50) sowie eine Drifterfassungseinheit (42, 52) zum Erfassen einer Drift der Probenstruktur (34) relativ zur Optik (30, 38, 54, 56, 58) anhand der abgebildeten Referenzstruktur. Die Optik (30, 38, 54, 56, 58) weist eine erste Schärfeebene (46) zum Abbilden der Probenstruktur (34) und zugleich eine relativ zur ersten Schärfeebene (46) lageveränderbare zweite Schärfeebene (60) zum Abbilden der Referenzstruktur (50) auf.

WO 2012/013586 A1

**WO 2012/013586 A1** 

---

RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). **Veröffentlicht:**

— *mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)*

## Einrichtung und Verfahren zur mikroskopischen Bildaufnahme einer Probenstruktur

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Einrichtung zur mikroskopischen Bildaufnahme einer Probenstruktur nach dem Oberbegriff des Anspruchs 1 bzw. 12.

In jüngerer Vergangenheit wurden lichtmikroskopische Abbildungsverfahren entwickelt, mit denen sich basierend auf einer sequentiellen, stochastischen Lokalisierung von einzelnen Markern, insbesondere Fluoreszenzmolekülen, Probenstrukturen darstellen lassen, die kleiner sind als die beugungsbedingte Auflösungsgrenze klassischer Lichtmikroskope. Solche Verfahren sind beispielsweise beschrieben in WO 2006/127692 A2; DE 10 2006 021 317 B3; WO 2007/128434 A1, US 2009/0134342 A1; DE 10 2008 024 568 A1; „Subdiffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)“, Nature Methods 3, 793-796 (2006), M. J. Rust, M. Bates, X. Zhuang; „Resolution of  $\lambda/10$  in fluorescence microscopy using fast single molecule photo-switching“, Geisler C. et al, Appl. Phys. A, 88, 223-226 (2007). Dieser neue Zweig der Mikroskopie wird auch als Lokalisierungsmikroskopie bezeichnet. Die angewandten Verfahren sind in der Literatur z.B. unter den Bezeichnungen PALM, FPALM, (F)STORM, PALMIRA oder GSDIM bekannt.

Den neuen Verfahren ist gemein, dass die abzubildenden Probenstrukturen mit Markern präpariert werden, die über zwei unterscheidbare Zustände verfügen, nämlich einen „hellen“ Zustand und einen „dunklen“ Zustand. Werden beispielsweise Fluoreszenzfarbstoffe als Marker verwendet, so ist der helle Zustand ein fluoreszenzfähiger Zustand und der dunkle Zustand ein nicht fluo-

reszenzfähiger Zustand. Zur Abbildung von Probenstrukturen mit einer Auflösung, die kleiner als die klassische Auflösungsgrenze der bildgebenden Optik ist, wird nun wiederholt eine kleine Teilmenge der Marker in den hellen Zustand präpariert. Diese Teilmenge wird im Folgenden als aktive Teilmenge bezeichnet. Die aktive Teilmenge ist dabei so zu wählen, dass der mittlere Abstand benachbarter Marker im hellen und damit lichtmikroskopisch abbildbaren Zustand größer ist als die Auflösungsgrenze der Optik. Die Luminanzsignale der aktiven Teilmenge werden auf einen räumlich auflösenden Lichtdetektor, z.B. eine CCD-Kamera, abgebildet. Von jedem Marker wird so eine Lichtverteilung in Form eines Lichtflecks erfasst, dessen Größe durch die Auflösungsgrenze der Optik bestimmt ist.

Auf diese Weise wird eine Vielzahl von Rohdaten-Einzelbildern aufgenommen, in denen jeweils eine andere aktive Teilmenge abgebildet ist. In einem Bildanalyse-Prozess werden dann in jedem Rohdaten-Einzelbild die Schwerpunktpositionen der Lichtverteilungen bestimmt, die die im hellen Zustand befindlichen Marker darstellen. Die aus den Rohdaten-Einzelbildern ermittelten Schwerpunktpositionen der Lichtverteilungen werden dann in einer Gesamtdarstellung in Form eines Gesamtbild-Datensatzes zusammengetragen. Das durch diese Gesamtdarstellung entstehende hochaufgelöste Gesamtbild spiegelt die Verteilung der Marker wider. Unter „Rohdaten“ werden im Folgenden also Daten verstanden, die noch nicht dem Bildanalyse-Prozess zur Bestimmung der Schwerpunktpositionen unterzogen worden sind.

Für eine repräsentative Wiedergabe der abzubildenden Probenstruktur müssen ausreichend viele Markersignale detektiert werden. Da jedoch die Anzahl an Markern in der jeweils aktiven Teilmenge durch den minimalen mittleren Abstand, den zwei Marker im hellen Zustand voneinander haben müssen, limitiert ist, müssen sehr viele Rohdaten-Einzelbilder aufgenommen werden, um

die Probenstruktur vollständig abzubilden. Typischerweise liegt die Anzahl an Rohdaten-Einzelbildern in einem Bereich von 10.000 bis 100.000.

Die für die Aufnahme eines Rohdaten-Einzelbildes benötigte Zeit ist nach unten hin durch die maximale Bildaufnahmezeit des Lichtdetektors limitiert. Dies führt zu vergleichsweise langen Gesamtaufnahmezeiten für eine für die Gesamtdarstellung benötigte Sequenz von Rohdaten-Einzelbildern. So kann die Gesamtaufnahmezeit bis zu einigen Stunden betragen.

Über diese lange Gesamtaufnahmezeit kann es nun zu einer Bewegung der abzubildenden Probe relativ zur bildgebenden Optik kommen. Da für die Erstellung eines hochauflösenden Gesamtbildes alle Rohdaten-Einzelbilder nach der Schwerpunktbestimmung zusammengeführt werden, verschlechtert jede Relativbewegung zwischen Probe und Optik, die während der Aufnahme zweier aufeinanderfolgender Rohdaten-Einzelbilder auftritt, die Ortsauflösung des Gesamtbildes. In vielen Fällen rührt diese Relativbewegung von einer systematischen mechanischen Bewegung des Systems her, auch als mechanische Drift bezeichnet, die beispielsweise durch thermische Ausdehnung oder Schrumpfung, durch mechanische Verspannungen oder durch die Veränderung der Konsistenz von Schmiermitteln, die in den mechanischen Komponenten verwendet werden, verursacht wird.

Die vorstehend beschriebene Problematik soll im Folgenden an Hand der Figuren 1 bis 3 veranschaulicht werden.

In Figur 1a ist schematisch eine Probenstruktur 2 dargestellt, die aus drei konzentrischen Kreisringen besteht. Im Folgenden sei angenommen, dass die abzubildenden strukturellen Merkmale dieser Probenstruktur 2, insbesondere die Abstände der konzentrischen Kreisringe voneinander, so klein sind, dass sie

die beugungsbegrenzte Auflösungsgrenze der lichtmikroskopischen Abbildung unterschreiten.

Wird nun die in Figur 1a gezeigte Probenstruktur 2 mit Markern versehen und werden diese Marker in den hellen und damit lichtmikroskopisch abbildbaren Zustand gebracht, so ergibt sich auf Grund des beugungsbegrenzten Auflösungsvermögens der lichtmikroskopischen Abbildung ein Mikroskopbild der in Figur 1b gezeigten Art, in dem die einzelnen mit Markern versehenen Kreisringe der Probenstruktur 2 nicht mehr unterscheidbar sind. In Figur 1b (und auch in den Figuren 2 und 3) ist die in Figur 1a gezeigte Probenstruktur 2 zur Verdeutlichung des Sachverhalts durch gestrichelte Kreislinien angedeutet. Wie in Figur 1b gezeigt, ergibt sich hierbei eine durch die Schraffur angedeutete verwaschene und damit räumlich nicht aufgelöste Lichtverteilung 4.

In Figur 2a ist eine Sequenz von Rohdaten-Einzelbildern gezeigt, in denen jeweils eine aktive Teilmenge an Markern abgebildet ist. Die aktiven Marker erscheinen in den Rohdaten-Einzelbildern als ausgedehnte Lichtflecke 6, deren Größe durch die Auflösungsgrenze der abbildenden Optik bestimmt ist. Wie Figur 2a gezeigt ist, haben die Lichtflecke 6 jeweils einen mittleren Abstand voneinander, der größer als diese die Größe der Lichtflecke 6 bestimmende Auflösungsgrenze ist.

In Figur 2b ist veranschaulicht, wie in dem oben erwähnten Bildanalyse-Prozess aus den Rohdaten-Einzelbildern Schwerpunktpositionen 8 der Lichtflecke 6 ermittelt werden. Die aus den Rohdaten-Einzelbildern bestimmten Schwerpunktpositionen 8 werden dann in einer in Figur 2c gezeigten Gesamtdarstellung zusammengefasst. Die Gesamtdarstellung nach 2c liefert so ein hochaufgelöstes Gesamtbild der in Figur 1a gezeigten Probenstruktur 2.

In den Figuren 3a und 3b ist veranschaulicht, wie es während der Aufnahme zweier aufeinanderfolgender Rohdaten-Einzelbilder in Folge einer Relativbewegung zwischen der abzubildenden Probenstruktur 2 und der abbildenden Optik zu einer Verschlechterung der Ortsauflösung des Gesamtbildes kommen kann. Dabei sollen in diesem lediglich der Veranschaulichung dienenden Beispiel die aus einem ersten Rohdaten-Einzelbild bestimmten Schwerpunktpositionen durch Kreise 10 und die aus einem unmittelbar darauf folgenden zweiten Rohdaten-Einzelbild bestimmten Schwerpunktpositionen mit Quadraten 12 bezeichnet sein.

In Figur 3a ist der Idealzustand ohne mechanische Drift gezeigt. Die aus den beiden Rohdaten-Einzelbildern ermittelten Schwerpunktpositionen 10 und 12 geben die in Figur 1a gezeigte Probenstruktur 2 präzise wieder. In Figur 3b ist der Fall dargestellt, dass die mechanische Drift eine Verschiebung des zweiten Rohdaten-Einzelbildes gegenüber dem ersten Rohdaten-Einzelbild verursacht. Dementsprechend sind die aus dem zweiten Rohdaten-Einzelbild abgeleiteten Schwerpunktpositionen 12 gegenüber den aus dem ersten Rohdaten-Einzelbild abgeleiteten Schwerpunktpositionen 10 versetzt. Dies führt im Ergebnis zu einer Verschlechterung der Ortsauflösung des Gesamtbildes.

Es sind verschiedene Verfahren bekannt, um die Drift der Probenstruktur relativ zur abbildenden Optik zu erfassen und zu kompensieren. Beispielsweise wird vorgeschlagen, die Probenstruktur mit Referenzmarkern, z.B. Goldkügelchen oder fluoreszierende Nanopartikel, zu markieren und deren Position gleichzeitig mit der eigentlichen Bildaufnahme der Probenstruktur optisch zu erfassen. Dabei wird üblicherweise die Probenstruktur in einem ersten Wellenlängenbereich (nämlich im Falle eines Fluoreszenzmikroskops im Wellenlängenbereich des Fluoreszenzlichtes) und die Referenzstruktur in einem davon verschiedenen zweiten Wellenlängenbereich (bei Verwendung von reflektie-

renden Goldkügelchen beispielsweise im Wellenlängenbereich des Beleuchtungslichtes) optisch erfasst. Hierzu können zwei separate Lichtdetektoren oder ein einziger Lichtdetektor, der mit zwei Farbkanälen arbeitet, verwendet werden. Aus den driftbedingten Positionsverschiebungen der aufgenommenen Bilder der Referenzstruktur kann dann die Drift bestimmt werden.

Bei dem vorstehend genannten Verfahren werden die Referenzmarker in vergleichsweise hoher Konzentration in die Probe eingebracht. Nur so ist sichergestellt, dass sich Referenzmarker in ausreichender Menge in der Schärfebene der abbildenden Optik befinden, in die die Probenstruktur gebracht wird, um durch die Optik scharf auf den Lichtdetektor abgebildet zu werden. Insbesondere bei der lichtmikroskopischen Abbildung lebender Zellstrukturen wirken sich die in hoher Konzentration vorhandenen, Fremdkörper bildenden Referenzmarker nachteilig aus. Im Übrigen ist die zur Einbringung der Referenzmarker vorzunehmende Probenpräparation vergleichsweise aufwendig.

Es ist auch möglich, die mechanische Drift durch geeignete Sensoren, z.B. kapazitive Abstandsmesser, zu erfassen. Solche Sensoren werden üblicherweise an den Probenhalter angebracht, an dem die Probe befestigt ist. Nachteilig hieran ist, dass die über den Sensor bestimmte Drift des Probenhalters nicht unbedingt der tatsächlichen Drift der Probenstruktur entspricht, sofern nicht jegliche Relativbewegung zwischen Probenhalter und Probe ausgeschlossen werden kann. Außerdem ist die Verwendung solcher Sensoren technisch vergleichsweise aufwendig.

Aufgabe der Erfindung ist es, eine Einrichtung und ein Verfahren zur mikroskopischen Bildaufnahme einer Probenstruktur anzugeben, die eine zuverlässige und technisch aufwandsarme Erfassung einer Drift der Probenstruktur relativ zur abbildenden Optik ermöglichen.



Die Erfindung löst diese Aufgabe durch den kennzeichnenden Teil des Anspruchs 1 bzw. 12.

Die Erfindung sieht für die abbildende Optik zwei räumlich voneinander getrennte, gegeneinander verstellbare Schärfe- oder Fokalebene vor, von denen die erste zur Abbildung der Probenstruktur und die zweite zur Abbildung der Referenzstruktur dient. Selbstverständlich ist hierbei unter dem Begriff „Ebene“ nicht eine Ebene im streng mathematischen Sinne, d.h. ein streng zweidimensionaler geometrischer Raum zu verstehen, sondern vielmehr derjenige Bereich innerhalb des Objektraums der Optik, innerhalb dessen das Objekt, in diesem Fall die Probenstruktur bzw. die Referenzstruktur, scharf auf die Bildebene abgebildet wird und der üblicherweise durch die Schärfentiefe der Optik charakterisiert ist.

Geht man von einer festen ersten Schärfenebene der Optik aus, in welche die abzubildende Probenstruktur beispielsweise mittels eines an einem Probenhalter angebrachten Fokussierantriebs gebracht wird, so ermöglicht es die erfindungsgemäße Optik, die zweite Schärfenebene nach Belieben auf eine geeignete Referenzstruktur einzustellen. Insbesondere muss sich die Referenzstruktur nicht in unmittelbarer räumlicher Nähe zur ersten Schärfenebene, in der die Probenstruktur angeordnet ist, befinden. Dadurch ist es möglich, jede beliebige Struktur, die eine feste räumliche Beziehung zur abbildenden Probenstruktur aufweist, zur Drifterfassung als Referenzstruktur zu nutzen. In Betracht kommen beispielsweise lichtmikroskopisch abbildbare Strukturen, die schon in der Probe oder auch an dem Probenhalter vorhanden sind. Insbesondere kann die Referenzstruktur an einem Deckglas ausgebildet sein, das üblicherweise verwendet wird, die Probe auf einem Träger des Probenhalters festzu-

setzen. Alternativ kann die Referenzstruktur auf dem Träger selbst ausgebildet, z.B. eingeprägt sein.

Ebenso können autofluoreszierende Strukturen in der Probe zur Drifterfassung genutzt werden. Auch die in der Lokalisierungsmikroskopie verwendeten Marker, die, wie eingangs beschrieben, über einen hellen und einen dunklen Zustand verfügen, können die Referenzstruktur bilden. So ist es beispielsweise möglich, die Referenzstruktur dadurch zu erzeugen, dass sämtliche Marker aus dem dunklen in den hellen Zustand gebracht werden. Anhand der so erzeugten Struktur, die infolge des begrenzten Auflösungsvermögens der Optik zur Abbildung der Probenstruktur nicht geeignet ist, lässt sich dann die Drift bestimmen.

Indem sich bei der erfindungsgemäßen Einrichtung die zweite Schärfenebene der Optik relativ zur ersten Schärfenebene beliebig einstellen lässt, ist es einfach, stets eine geeignete Referenzstruktur aufzufinden und diese zur Erfassung der Drift zu nutzen. Dies ist insbesondere dann von Vorteil, wenn Fremdkörper bildenden Referenzmarker wie z.B. Goldkügelchen in die Probe eingebracht werden. Durch Verschieben der zweiten Schärfenebene der Optik lässt sich leicht ein Probenbereich finden, in dem genügend Referenzmarker vorhanden sind. Dadurch kann die Konzentration an Referenzmarkern, die in die Probe einzubringen sind, verringert werden, was insbesondere bei der Abbildung lebender Zellstrukturen von Vorteil ist. Dies erleichtert zudem die Probenpräparation.

Die erfindungsgemäße optische Erfassung der Drift durch die abbildende Optik selbst ist mit einem geringeren technischen Aufwand verbunden als dies bei der aus dem Stand der Technik bekannten Verwendung von externen Sensoren der Fall ist. Werden in der Probe selbst vorhandene Strukturen als Refe-

renzstrukturen genutzt, so kann die Drift der Probenstruktur zuverlässiger und präziser erfasst werden als dies mit den vorstehend genannten externen Sensoren möglich ist. So ist bei letzteren nicht immer sichergestellt, dass die am Sensor gemessene Drift tatsächlich der Drift der Probenstruktur entspricht. Dies gilt insbesondere dann, wenn an dem Probenhalter, an dem die Sensoren üblicherweise angebracht sind, thermische Ausdehnungen auftreten.

Vorzugsweise weist die Optik ein Objektiv zur Abbildung der Probenstruktur und eine Teiloptik auf, die zur Abbildung der Referenzstruktur mit dem Objektiv zusammenwirkt und zur Lageveränderung der zweiten Schärfenebene einstellbar ist. In dieser Ausgestaltung trägt also das Objektiv sowohl zur Abbildung der Probenstruktur als auch zur Abbildung der Referenzstruktur bei, während die Teiloptik allein zur Abbildung der Referenzstruktur genutzt wird und dazu dient, die zweite Schärfenebene relativ zur ersten Schärfenebene einzustellen.

Die Teiloptik umfasst in einer bevorzugten Weiterbildung mindestens zwei relativ zueinander bewegbare Linsen. Indem diese Linsen gegeneinander verstellt werden, lässt sich die Brennweite des aus der Teiloptik und dem Objektiv gebildeten optischen Systems und damit die zweite Schärfenebene einfach einstellen.

Alternativ ist es auch möglich, die Teiloptik als ortsfeste, d.h. nicht verstellbare Optik vorzusehen und den Lichtdetektor, auf den die Referenzstruktur durch die Teiloptik abgebildet wird, entlang der optischen Achse beweglich auszuführen. In diesem Fall wird durch Verschieben des Lichtdetektors und damit der Abbildungsebene auch der Schärfenbereich der Teiloptik, d.h. die zweite Schärfenebene, verstellt.

Vorzugsweise ist die TeiLOPTIK in einem Nebenstrahlengang angeordnet, der von einem zur Abbildung der Probenstruktur bestimmten Hauptstrahlengang abgezweigt ist. Die Anordnung der TeiLOPTIK in einem Nebenstrahlengang ermöglicht eine einfache und zuverlässige Einstellung der zweiten Schärfenebene, ohne dass hierdurch die Abbildung der Probenstruktur beeinflusst wird.

Eine weitere bevorzugte Ausgestaltung sieht einen in dem Hauptstrahlengang angeordneten ersten Lichtdetektor, auf den die Probenstruktur abbildbar ist, und einen in dem Nebenstrahlengang angeordnetem zweiten Lichtdetektor vor, auf den die Referenzstruktur abbildbar ist. Die beiden Lichtdetektoren können beispielsweise dazu genutzt werden, die Probenstruktur mit Licht in einem ersten Wellenlängenbereich und die Referenzstruktur mit Licht in einem davon verschiedenen zweiten Wellenlängenbereich abzubilden. Wird die erfindungsgemäße Einrichtung in der Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt, so empfängt der erste Lichtdetektor das von der Probenstruktur abgegebene Fluoreszenzlicht, während der zweite Lichtdetektor beispielsweise das an der Referenzstruktur reflektierte Anregungslicht empfängt, durch das die Probenstruktur zur Abgabe des Fluoreszenzlichtes angeregt wird.

Es ist jedoch ebenso möglich, nur einen einzigen Lichtdetektor vorzusehen, der auf die separate Erfassung von Licht in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen ausgelegt ist. Dies hat den Vorteil, dass die Probenstruktur und die Referenzstruktur in ein- und demselben Lichtweg abgebildet werden, wodurch Drifteffekte, die zwischen verschiedenen Lichtwegen auftreten können, vermieden werden.

Sind ein Hauptstrahlengang und ein Nebenstrahlengang vorgesehen, so weist die Einrichtung vorzugsweise ein lichtseparierendes optisches Element auf, durch das der Nebenstrahlengang von dem Hauptstrahlengang abgezweigt und

auf den zweiten Lichtdetektor gerichtet ist. Dieses lichtseparierende optische Element ist beispielsweise ein dichroitischer Spiegel, wenn die Probenstruktur in einem ersten Wellenlängenbereich und die Referenzstruktur in einem davon verschiedenen zweiten Wellenlängenbereich abgebildet wird. Werden die beiden Strukturen in ein und demselben Wellenlängenbereich abgebildet, so ist das lichtseparierende optische Element beispielsweise ein halbdurchlässiger Spiegel.

In einer besonders bevorzugten Ausgestaltung ist eine Autofokusvorrichtung zur Einstellung der zweiten Schärfenebene auf die Referenzstruktur vorgesehen. Durch eine solche Autofokusvorrichtung wird sichergestellt, dass die Optik auf die Referenzstruktur fokussiert bleibt, wenn beispielsweise die Probe mittels eines an dem Probenhalter angreifenden Fokussierantriebs in Richtung der Probentiefe verstellt wird, um eine anvisierte Probenstruktur in die erste Schärfenebene zu bringen. Eine solche Autofokusvorrichtung bewirkt also, dass die zweite Schärfenebene, die beispielsweise auf eine an dem Deckglas des Probenhalters ausgebildete Referenzstruktur eingestellt ist, bei Verschieben der Probe automatisch nachgeführt wird. Als Autofokusvorrichtung kann sowohl eine passive Vorrichtung, die beispielsweise mit dem an der Referenzstruktur reflektierten Beleuchtungslicht arbeitet, als auch eine aktive Vorrichtung zum Einsatz kommen, die eine eigene Lichtquelle zur Beleuchtung der Referenzstruktur aufweist.

Die anhand der Referenzstruktur erfasste Drift der Probenstruktur relativ zur Optik kann dazu genutzt werden, die aufgenommenen Einzelbilder nachträglich anhand der ermittelten Drift zu korrigieren. Es ist jedoch ebenso möglich, die Drift schon während der Abbildung der Probenstruktur zu kompensieren. Hierzu kann beispielsweise ein Stellglied vorgesehen sein, das über ein von der Drifterfassungseinheit erzeugtes Driftsignal ansteuerbar ist, zumindest ei-

nen Teil der Optik und/oder eines Probenhalters zur Driftkompensation zu bewegen. Diese Ausgestaltung kann nach Art eines Regelkreises ausgeführt sein, bei dem ein kontinuierlicher Soll-Ist-Vergleich angestellt und basierend auf diesem Vergleich der genannte Teil der Optik bzw. des Probenhalters anhand des Driftsignals angetrieben wird.

Eine besonders präzise Driftkompensation erhält man, wenn zu jedem Einzelbild der Probenstruktur auch ein Einzelbild der Referenzstruktur aufgenommen und die Drift für jedes Einzelbild erfasst wird. Es ist jedoch auch möglich, nur in längeren, vorbestimmten Zeitabständen ein Bild der Referenzstruktur aufzunehmen und die Drift zu bestimmen. Dies gilt sowohl für den Fall, dass die Bildkompensation nachträglich an den aufgenommenen Einzelbildern vorgenommen wird, als auch für den Fall, dass die Driftkompensation während der Messung, d.h. während der Abbildung der Probenstruktur, über ein Stellglied erfolgt. Werden im erstgenannten Fall die Einzelbilder nachträglich driftkorrigiert und wird die Drift nicht für jedes Einzelbild, sondern jeweils nur für jedes n-te Einzelbild (n natürliche Zahl größer als 1) erfasst, so kann für die dazwischen liegenden Einzelbilder die Drift durch Interpolation bestimmt werden.

Vorzugsweise ist eine Lichtquelle vorgesehen, welche die Probenstruktur und zugleich die Referenzstruktur und durch das Objektiv beleuchtet. In dieser Ausführung werden die Probenstruktur und die Referenzstruktur nach Art der Auflichtmikroskopie beleuchtet. In einer alternativen Ausgestaltung wird nur die Probenstruktur im Auflichtverfahren, die Referenzstruktur jedoch im Durchlichtverfahren beleuchtet. In diesem Fall ist zur Beleuchtung der Referenzstruktur eine eigene Lichtquelle vorgesehen. Die Wellenlänge des von dieser Lichtquelle ausgesendeten Beleuchtungslichts kann in Abhängigkeit der verwendeten Referenzstruktur geeignet gewählt werden.

Die erfindungsgemäße Einrichtung ist bei allen Geräten, die eine vergrößerte Darstellung einer Probenstruktur ermöglichen und bei denen eine Drifterfassung und -kompensation zur Erhöhung der Abbildungsgenauigkeit erwünscht ist, gewinnbringend einsetzbar. Besonders bevorzugt ist die Verwendung als Fluoreszenzmikroskop, das nach einem der eingangs unter der Bezeichnung Lokalisierungsmikroskopie zusammengefassten Verfahren arbeitet.

Die Erfindung wird im Folgenden anhand der Figuren näher erläutert. Darin zeigen:

- Figur 1a eine schematische Darstellung einer beispielhaften Probenstruktur, deren lichtmikroskopisch abzubildenden strukturellen Merkmale kleiner als die Auflösungsgrenze der lichtmikroskopischen Abbildung sind;
- Figur 1b eine schematische Darstellung, die eine auflösungsbegrenzte lichtmikroskopische Abbildung der mit Markern präparierten Probenstruktur nach Fig. 1a zeigt;
- Figur 2a eine Sequenz von Rohdaten-Einzelbildern, in denen jeweils eine aktive Teilmenge an Markern abgebildet ist;
- Figur 2b eine der Bildsequenz nach Fig. 2a entsprechende Sequenz mit den aus den Rohdaten-Einzelbildern ermittelten Schwerpunktpositionen;
- Figur 2c ein hochaufgelöstes Gesamtbild, in dem die in Fig. 2b gezeigten Schwerpunktpositionen zusammengefasst sind;

- Figur 3a ein driftfreies Gesamtbild der Probenstruktur nach Fig. 1a, in dem zur Veranschaulichung Schwerpunktpositionen aus zwei aufeinanderfolgenden Rohdaten-Einzelbildern zusammengefasst sind;
- Figur 3b ein driftbehaftetes Gesamtbild der Probenstruktur nach Fig. 1a, in dem entsprechend Fig. 3a Schwerpunktpositionen zweier aufeinanderfolgender Rohdaten-Einzelbilder zusammengefasst sind;
- Figur 4 den schematischen Aufbau eines erfindungsgemäß ausgebildeten Fluoreszenzmikroskops als erstes Ausführungsbeispiel;
- Figur 5 einen Ausschnitt der Fig. 4, der eine Probenstruktur in einer ersten Schärfenebene und einer Referenzstruktur in einer zweiten Schärfenebene der Optik zeigt;
- Figur 6 den schematischen Aufbau eines erfindungsgemäß ausgebildeten Fluoreszenzmikroskops als zweites Ausführungsbeispiel; und
- Figur 7 einen Ausschnitt der Fig. 6, der die Probenstruktur in der ersten Schärfenebene und die Referenzstruktur in der zweiten Schärfenebene der Optik zeigt.

In Figur 4 ist ein Fluoreszenzmikroskop 20 dargestellt, das ein erstes Ausführungsbeispiel der erfindungsgemäßen Einrichtung bildet. Das Fluoreszenzmikroskop 20 hat eine Lichtquelle 22, die Anregungslicht auf ein aus zwei Linsen 24 und 26 gebildetes Linsensystem aussendet. Dieses Linsensystem dient da-



zu, das von der Lichtquelle 22 ausgesendete Anregungslicht in der gewünschten Weise zu kollimieren. Das kollimierte Anregungslicht fällt dann auf eine Sammellinse 28, die das Anregungslicht in die Apertur eines Objektivs 30 fokussiert. Dabei tritt das Anregungslicht zunächst durch einen ersten dichroitischen Spiegel 32, der für das Anregungslicht durchlässig ist. Indem das von der Lichtquelle 22 ausgesendete Anregungslicht in die Apertur des Objektivs 30 fokussiert wird, tritt es als kollimiertes Strahlenbündel aus dem Objektiv 30 aus und ergibt so eine vergleichsweise großflächige, homogene Beleuchtung einer Probenstruktur, die in Fig. 1 durch das mit 34 bezeichnete Symbol angedeutet ist.

In dem vorliegenden Ausführungsbeispiel wird die Probenstruktur 34, wie eingangs erläutert, mit Markern, z.B. Fluoreszenzmolekülen, präpariert. Dabei können die eingangs genannten Verfahren angewandt werden, um jeweils einen Teil dieser Marker in den hellen Zustand zu überführen und dadurch eine aktive Teilmenge zu erzeugen, die in einem Einzelbild abgebildet wird.

Das von der Probenstruktur 34 ausgesendete Fluoreszenzlicht tritt durch das Objektiv 30 und fällt auf den dichroitischen Spiegel 32. Der dichroitische Spiegel 32 ist so ausgebildet, dass er das von der Probenstruktur 34 ausgesendete Licht reflektiert und so auf einen zweiten dichroitischen Spiegel 36 richtet. Dieser wiederum ist so ausgebildet, dass er das Fluoreszenzlicht durchlässt, sodass das Fluoreszenzlicht auf eine Linse 38 fällt, die das Fluoreszenzlicht auf einen ersten Lichtdetektor 40, z.B. eine CCD-Kamera, bündelt. Auf dem Lichtdetektor 40 wird so ein Einzelbild der Probenstruktur 34 erzeugt. Dabei setzt der erste Lichtdetektor 40 das empfangene Fluoreszenzlicht in elektrische Signale um und gibt diese an eine Rechen-/Steuereinheit 42 aus, in der die Signale weiterverarbeitet werden.

Die Probenstruktur 34 ist Teil einer in den Figuren 4 und 5 nicht näher dargestellten Probe, die auf einem Probenhalter 44 angebracht ist. Wie in Fig. 5 gezeigt, befindet sich die Probenstruktur 34 während der lichtmikroskopischen Abbildung in einer Schärfenebene 46 des Objektivs 30, im Folgenden als erste Schärfenebene bezeichnet. Um die Probenstruktur 34 in die erste Schärfenebene 46 bringen zu können, ist der Probenhalter 44 vertikal verfahrbar, wie in Fig. 4 durch den Doppelpfeil angedeutet ist. Hierzu ist ein mit dem Probenhalter 44 gekoppelter Fokussierantrieb 48 vorgesehen, der durch die Rechen-/Steuereinheit 42 angesteuert wird.

Wie der Fig. 5 zu entnehmen ist, enthält die Probe neben der Probenstruktur 34 Referenzmarker 49, die es ermöglichen, eine Drift zwischen der abbildenden Optik, insbesondere dem Objektiv 30, und der Probenstruktur 34, die während der Aufnahme einer Sequenz von Einzelbildern auftritt, optisch zu erfassen. Ein Teil dieser Referenzmarker 49 wird als Referenzstruktur 50 genutzt. Hierzu weist das Fluoreszenzmikroskop 20 zusätzlich zu den vorstehend genannten optischen Komponenten (insbesondere zusätzlich zu dem Objektiv 30) eine im Folgenden näher beschriebene Teilloptik auf.

Diese Teilloptik befindet sich in einem Nebenstrahlengang, der durch den dichroitischen Spiegel 36 von einem Hauptstrahlengang abgezweigt ist, der durch den von der Probenstruktur 34 zu dem ersten Lichtdetektor 40 führenden Lichtweg des von der Probenstruktur 34 ausgesendeten Fluoreszenzlichtes festgelegt ist. Der Nebenstrahlengang ist auf einen zweiten Lichtdetektor 52, z.B. eine CCD-Kamera, gerichtet. Zwischen dem zweiten dichroitischen Spiegel 36 und dem zweiten Lichtdetektor 52 befindet sich die genannte Teilloptik, die aus einer ortsfesten Linse 54 und zwei relativ zueinander verschiebbaren Linsen 56 und 58 zusammengesetzt ist und für sich ein Linsensystem veränderlicher Brennweite bildet.

In dem vorliegenden Ausführungsbeispiel werden als Referenzmarker 49 autofluoreszente Partikel oder Strukturen verwendet, die in die Probe eingebracht werden oder ohnehin in dieser vorhanden sind. Wesentlich ist, dass sich diese Referenzmarker 49 nicht in der ersten Schärfenebene 46 befinden müssen, in der die Probenstruktur 34 abgebildet wird. Vielmehr ist durch die aus den Linsen 54 bis 58 gebildete Teiloptik im Zusammenwirken mit dem Objektiv 30 eine zweite Schärfenebene 60 gegeben, die sich durch Verstellen der Linsen 56 und 58 beliebig (in Fig. 5 nach oben und unten) verstellen lässt. Dadurch ist es möglich, die zweite Schärfenebene 60 innerhalb der Probe in einen Bereich zu verschieben, in dem genügend Referenzmarker 49 vorhanden sind, die als lichtmikroskopische abbildbare Referenzstruktur 50 genutzt werden können.

Die durch die in der zweiten Schärfenebene 60 angeordneten Referenzmarker 49 gebildete Referenzstruktur 50 wird durch das Objektiv 30 und die Linsen 54 bis 58 auf den zweiten Lichtdetektor 52 abgebildet. Auf dem zweiten Lichtdetektor 52 wird also ein Einzelbild der Referenzstruktur 50 erzeugt und in elektrische Signale umgewandelt. Diese elektrischen Signale werden dann der Rechen-/Steuereinheit 42 zur Auswertung zugeführt. In der Rechen-/Steuereinheit 42 werden Positionsänderungen der Referenzstruktur-Einzelbilder erfasst und daraus Driftkompensationswerte bestimmt, die in dem vorliegenden Ausführungsbeispiel verwendet werden, nach der Messung an der Sequenz der erzeugten Probenstruktur-Einzelbilder eine Driftkompensation vorzunehmen.

Die Linsen 54 und 56 der Teiloptik, die zur Einstellung der zweiten Schärfenebene 60 gegeneinander bewegt werden, sind in diesem Ausführungsbeispiel mit einer Autofokusvorrichtung gekoppelt, welche die zweite Schärfenebene

60 automatisch nachführt, wenn der Probenhalter 44 mittels des Fokussierantriebs 48 bewegt wird. Die Autofokusvorrichtung ist aus der Rechen-/Steuereinheit 42 und einem Antrieb 61 gebildet, der von der Rechen-/Steuereinheit 42 angesteuert wird und die Linsen 54 und 56 zum Nachführen der zweiten Schärfenebene 60 bewegt.

In dem vorstehend beschriebenen Ausführungsbeispiel wird die aus einem Teil der Referenzmarker 49 gebildete Referenzstruktur 50 anhand des Autofluoreszenzlichtes erzeugt, das von der autofluoreszenten Referenzstruktur 50 ausgesendet wird. Demnach ist der erste dichroitische Spiegel 32 so ausgebildet, dass er zum Einen das von der Laserlichtquelle 22 ausgesendete Anregungslicht durchlässt und zum Anderen das von der Probenstruktur 34 ausgesendete Fluoreszenzlicht sowie das von der Referenzstruktur ausgesendete Autofluoreszenzlicht reflektiert. Der zweite dichroitische Spiegel 36 ist so ausgebildet, dass er das von der Probenstruktur 34 ausgesendete Fluoreszenzlicht durchlässt und das von der Referenzstruktur ausgesendete Autofluoreszenzlicht reflektiert.

Diese Ausgestaltung ist jedoch rein beispielhaft zu verstehen. Beispielsweise ist es auch möglich, die Referenzstruktur 50 mit dem Anregungslicht selbst abzubilden. In diesem Fall können als Referenzmarker 50 beispielsweise reflektierende Goldkugeln, die in die Probe eingebracht sind, verwendet werden.

Diese Ausführung macht sich zum Einen den Umstand zu Nutze, dass die Intensität des von der Laserlichtquelle 22 abgegebenen Anregungslichtes in der Regel vergleichsweise hoch ist (jedenfalls im Verhältnis zur Intensität des von der Probenstruktur 34 abgegebenen Fluoreszenzlichtes). Zum Anderen ist es in der Praxis kaum möglich, einen Transmissionsgrad des ersten dichroiti-

schen Spiegels 32 von exakt 100 % zu erzielen. Vielmehr wird stets ein geringer Teil des an der Probe in das Objektiv 30 rückgestreuten Anregungslichts an dem ersten dichroitischen Spiegel 32 reflektiert. Ist nun der zweite dichroitische Spiegel 36 so ausgebildet, dass er das Fluoreszenzlicht durchlässt und das Anregungslicht reflektiert, so kann der von dem ersten dichroitischen Spiegel 32 zwangsläufig reflektierte Teil des Anregungslichts zur Abbildung der Referenzstruktur 50 genutzt werden.

In den Figuren 6 und 7 ist ein zweites Ausführungsbeispiel der erfindungsgemäßen Einrichtung gezeigt.

Während in dem ersten Ausführungsbeispiel die Referenzstruktur 50 im Auflichtverfahren beleuchtet wird, ist in dem zweiten Ausführungsbeispiel nach den Figuren 6 und 7 eine Durchlichtbeleuchtung vorgesehen. Diejenigen Komponenten des zweiten Ausführungsbeispiels, die mit denen des ersten Ausführungsbeispiels identisch sind, sind in den Figuren 6 und 7 mit den in dem ersten Ausführungsbeispiel verwendeten Bezugszeichen versehen. Sie werden im Folgenden nicht nochmals beschrieben.

Das Fluoreszenzmikroskop 20' nach zweitem Ausführungsbeispiel hat gegenüber dem Fluoreszenzmikroskop 20 nach erstem Ausführungsbeispiel zusätzlich eine Lichtquelle 62 sowie ein aus zwei Linsen 64 und 66 gebildetes Linsensystem. Dieses Linsensystem kollimiert das von der Lichtquelle 62 abgegebene Beleuchtungslicht und richtet es von der dem Objektiv 30 abgewandten Seite her auf die Probe. Die (in diesem Beispiel transparente) Probe wird so in Fig. 6 von unten durchleuchtet, sodass die Referenzstruktur 50 nach einem üblichen Durchlichtverfahren, z.B. einem Phasenkontrastverfahren, auf den zweiten Lichtdetektor 52 abgebildet wird.

Die Wellenlänge des von der Lichtquelle 62 ausgesendeten Beleuchtungslichts kann abhängig davon, welche Art von Referenzstruktur 50 abgebildet werden soll, geeignet gewählt werden. Beispielsweise können als Referenzmarker 49 Goldkügelchen verwendet werden, die im Durchlicht auf den zweiten Lichtdetektor 52 abgebildet werden. Die beiden dichroitischen Spiegel 32' und 36' sind entsprechend der gewählten Wellenlänge des von der Lichtquelle 62 ausgesendeten Beleuchtungslichtes modifiziert, nämlich derart, dass sie jeweils das Beleuchtungslicht der Lichtquelle 62 reflektieren.

Die vorstehend beschriebenen Ausführungsbeispiele dienen lediglich der Erläuterung der Erfindung. Letztere ist nicht auf diese Ausführungsbeispiele beschränkt.

So ist es möglich, die abzubildende Referenzstruktur beispielsweise an einem in den Figuren 5 und 7 gezeigten Deckglas 70 auszubilden, das Teil des Probenhalters 44 ist. In diesem Fall wird die zweite Schärfenebene 60 auf das Deckglas 70 ausgerichtet. Auch in diesem Fall kann die Autofokusvorrichtung dafür sorgen, dass die zweite Schärfenebene 60 so nachgeführt wird, dass sie auf dem Deckglas 70 positioniert bleibt.

Die vorstehend beschriebenen Ausführungsbeispiele können auch so abgewandelt werden, dass die Driftkompensation nicht im Nachhinein an den erzeugten Probenstruktur-Einzelbildern vorgenommen wird, sondern während der Messung eine Komponente des Fluoreszenzmikroskops 20 bzw. 20', vorzugsweise deren Probenhalter 44, in Abhängigkeit der erfassten Drift verstellt wird. Dies kann beispielsweise über eine entsprechende Ansteuerung des Fokussierantriebs 48 erfolgen.

## Bezugszeichenliste:

20, 20'	Fluoreszenzmikroskop
22	Laserlichtquelle
24, 26	Linsen
28	Sammellinse
30	Objektiv
32, 32'	erster dichroitischer Spiegel
34	Probenstruktur
36, 36'	zweiter dichroitischer Spiegel
38	Linse
40	erster Lichtdetektor
42	Rechen-/Steuereinheit
44	Probenhalter
46	erste Schärfenebene
48	Stellglied
49	Referenzmarker
50	Referenzstruktur
52	zweiter Lichtdetektor
54, 56, 58	Linsen
60	zweite Schärfenebene
61	Antrieb
62	Lichtquelle
64, 66	Linsen

## Patentansprüche

1. Einrichtung (20, 20') zur mikroskopischen Bildaufnahme einer Probenstruktur (34), mit  
einer Optik (30, 38, 54, 56, 58) zum Abbilden der Probenstruktur (34) und einer Referenzstruktur (50), und  
einer Drifterfassungseinheit (42, 52) zum Erfassen einer Drift der Probenstruktur (34) relativ zur Optik (30, 38, 54, 56, 58) anhand der abgebildeten Referenzstruktur (50),  
dadurch gekennzeichnet, dass die Optik (30, 38, 54, 56, 58) eine erste Schärfenebene (46) zum Abbilden der Probenstruktur (34) und zugleich eine relativ zur ersten Schärfenebene (46) lageveränderbare zweite Schärfenebene (60) zum Abbilden der Referenzstruktur (50) aufweist.
2. Einrichtung (20, 20') nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Optik (30, 38, 54, 56, 58) ein Objektiv (30) zur Abbildung der Probenstruktur (34) und eine Teiloptik (54, 56, 58) aufweist, die zur Abbildung der Referenzstruktur (50) mit dem Objektiv (30) zusammenwirkt und zur Lageveränderung der zweiten Schärfenebene (60) einstellbar ist.
3. Einrichtung (20, 20') nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Teiloptik (54, 56, 58) mindestens zwei relativ zueinander bewegbare Linsen (56, 58) umfasst.
4. Einrichtung (20, 20') nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Teiloptik (54, 56, 58) in einem Nebenstrahlengang angeordnet ist, der von einem zur Abbildung der Probenstruktur (34) bestimmten Hauptstrahlengang abzweigt ist.



5. Einrichtung (20, 20') nach Anspruch 4, gekennzeichnet durch einen in dem Hauptstrahlengang angeordneten ersten Lichtdetektor (40), auf den die Probenstruktur (34) abbildbar ist, und einen in dem Nebenstrahlengang angeordneten zweiten Lichtdetektor (52), auf den die Referenzstruktur (50) abbildbar ist.
6. Einrichtung (20, 20') nach Anspruch 4 oder 5, gekennzeichnet durch ein lichtseparierendes optisches Element (36, 36'), durch das der Nebenstrahlengang von dem Hauptstrahlengang abgezweigt und auf den zweiten Lichtdetektor (52) gerichtet ist.
7. Einrichtung (20, 20') nach einem der vorhergehenden Ansprüche, gekennzeichnet durch eine Autofokusvorrichtung (42, 61) zur Einstellung der zweiten Schärfenebene (60) auf die Referenzstruktur (50).
8. Einrichtung (20, 20') nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Referenzstruktur (50) an einem Deckglas (70) eines Probenhalters (44) ausgebildet ist.
9. Einrichtung (20, 20') nach einem der vorhergehenden Ansprüche, gekennzeichnet durch ein Stellglied (48), das über ein von der Drifterfassungseinheit (42, 52) erzeugtes Driftsignal ansteuerbar ist, zumindest einen Teil der Optik (30, 38, 54, 56, 58) und/oder eines Probenhalters (44) zur Driftkompensation zu bewegen.
10. Einrichtung (20) nach einem der Ansprüche 2 bis 9, gekennzeichnet durch eine Lichtquelle (22), welche die Probenstruktur (34) und zugleich die Referenzstruktur (50) durch das Objektiv (30) beleuchtet.

11. Einrichtung (20, 20') nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Einrichtung (20, 20') ein Fluoreszenzmikroskop ist.
12. Verfahren zur mikroskopischen Bildaufnahme einer Probenstruktur (34), bei dem die Probenstruktur (34) und eine Referenzstruktur (50) durch eine Optik (30, 38, 54, 56, 58) abgebildet werden, und eine Drift der Probenstruktur (34) relativ zur Optik (30, 38, 54, 56, 58) an Hand der abgebildeten Referenzstruktur (50) erfasst wird, dadurch gekennzeichnet, dass die Probenstruktur (34) in einer ersten Schärfenebene (46) der Optik (30, 38, 54, 56, 58) abgebildet wird und zugleich die Referenzstruktur (50) in einer zweiten Schärfenebene (60) der Optik (30, 38, 54, 56, 58) abgebildet wird, wobei die zweite Schärfenebene (60) relativ zur ersten Schärfenebene (46) lageveränderbar ist.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass eine die Probenstruktur (34) enthaltende Probe mit Partikeln (49) präpariert wird, welche die Referenzstruktur (50) bilden.
14. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Referenzstruktur (50) an einem Teil eines Probenhalters (44), insbesondere an einem Deckglas (70) ausgebildet wird.

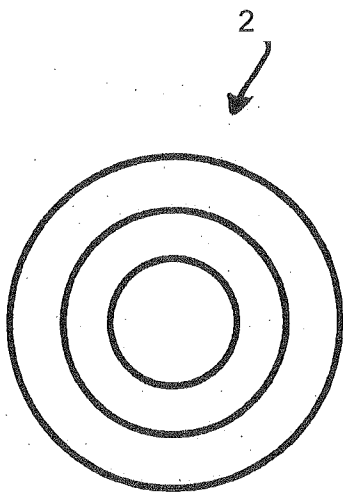


FIG. 1a

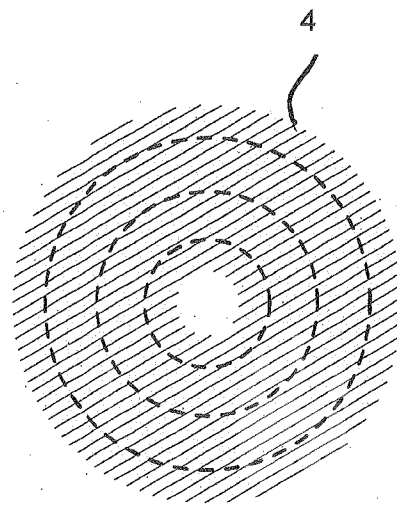


FIG. 1b

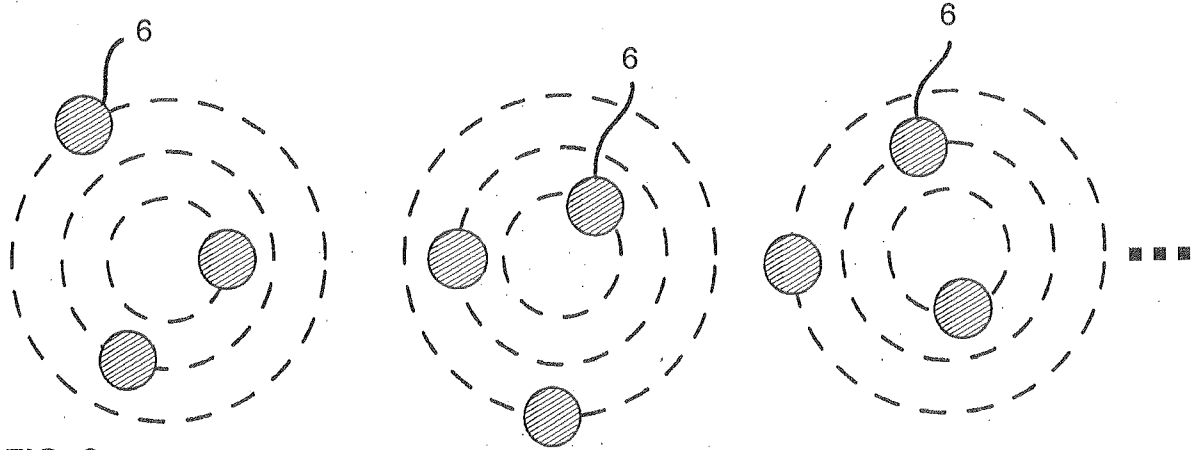


FIG. 2a

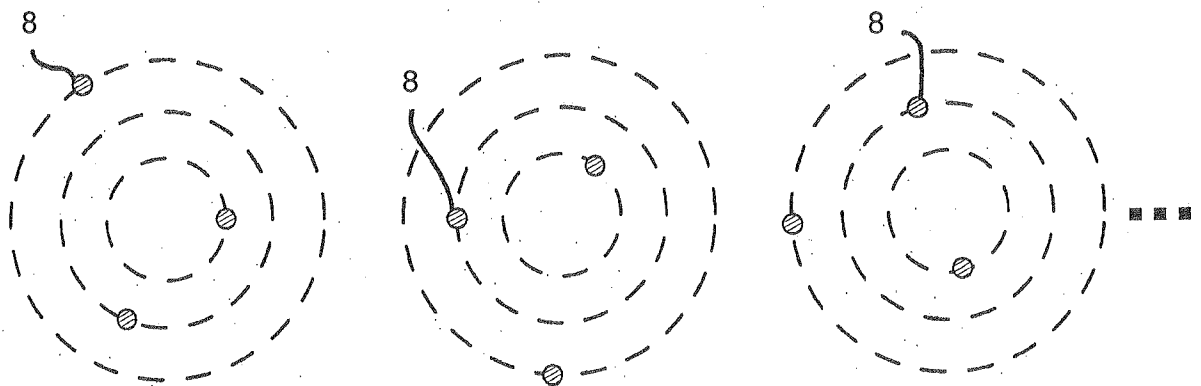


FIG. 2b

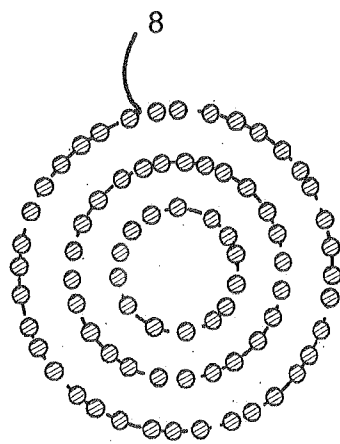


FIG. 2c

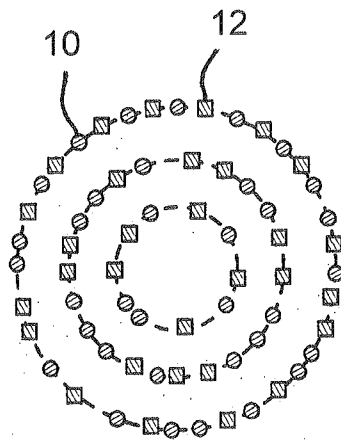


FIG. 3a

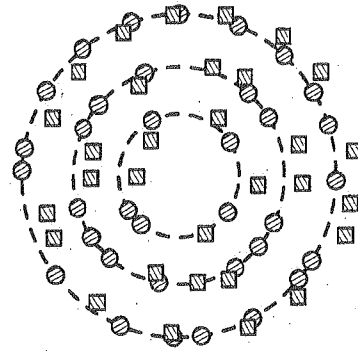


FIG. 3b

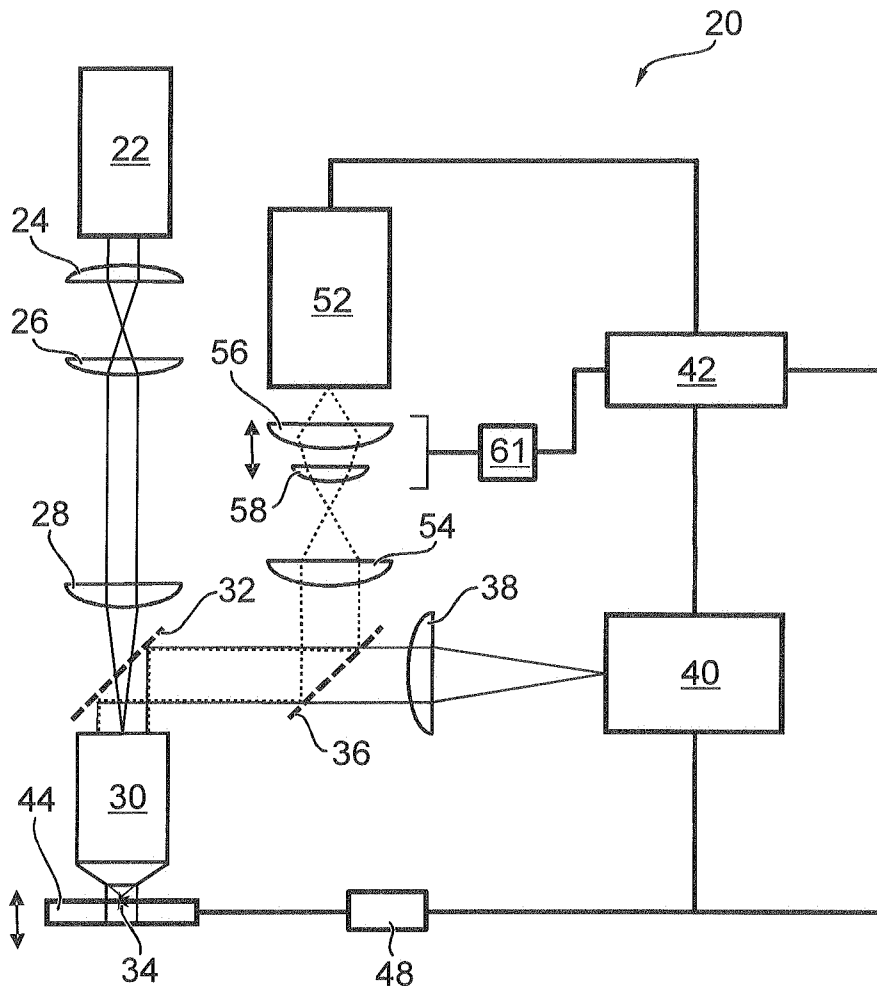


FIG. 4

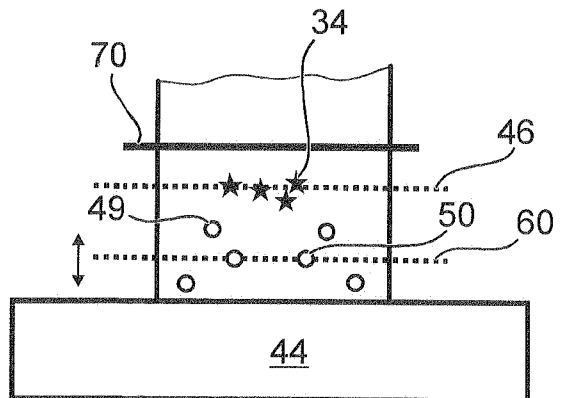


FIG. 5

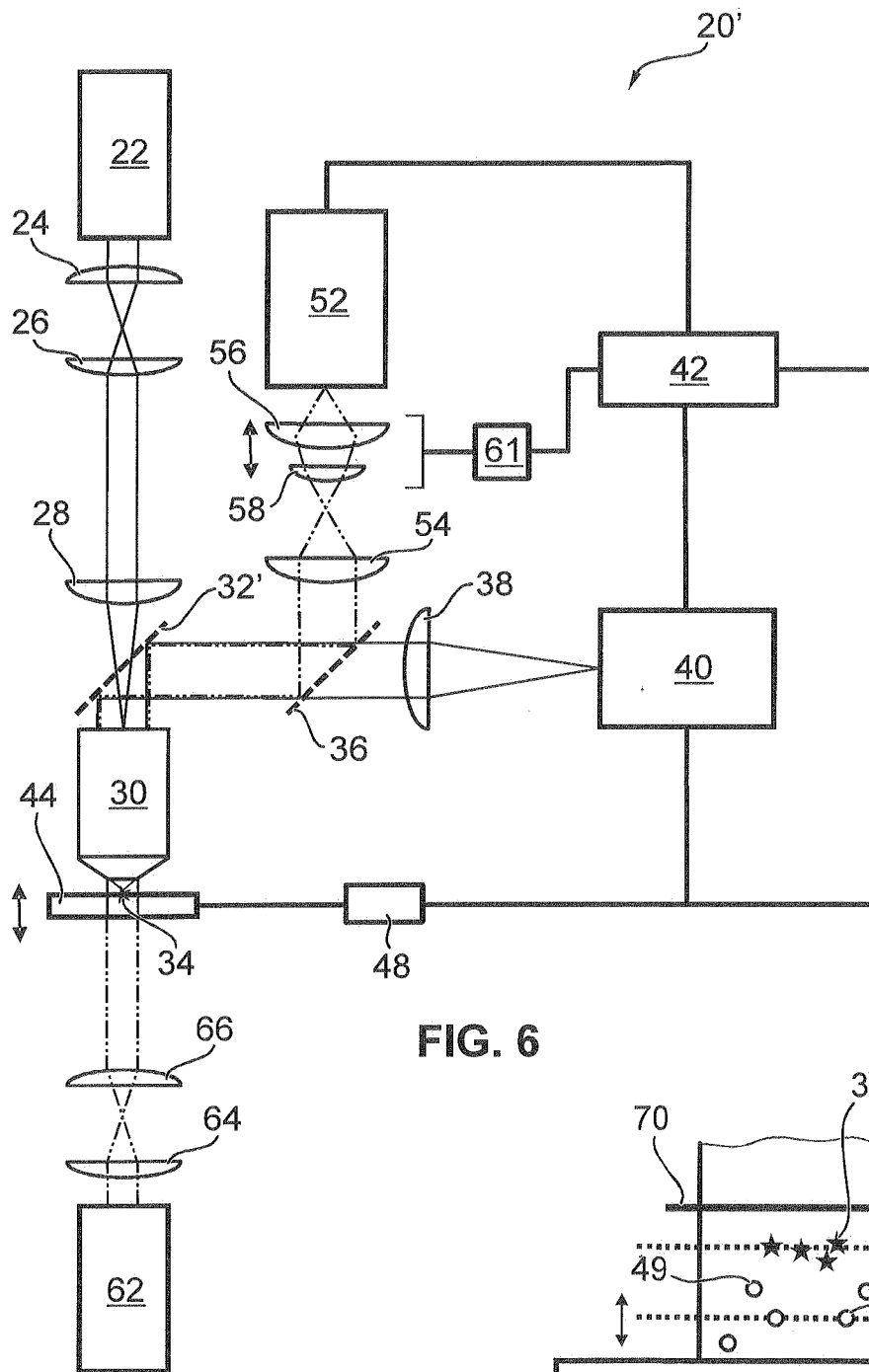


FIG. 6

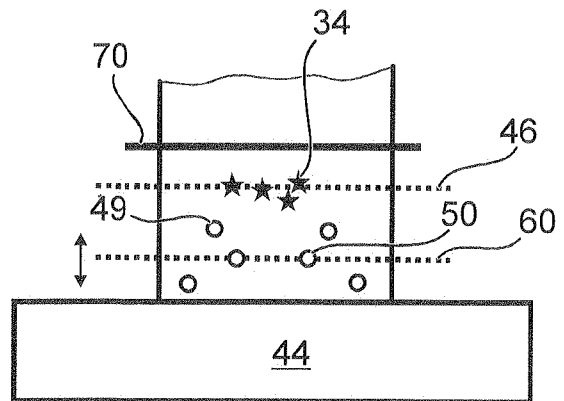


FIG. 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2011/062605

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. G02B21/16 G02B21/36 G01N21/64 G02B21/24  
ADD.  
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED  
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
G02B G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)  
EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2004/113043 A1 (ISHIKAWA AIICHI [JP] ET AL) 17 June 2004 (2004-06-17) figures 1-3 paragraph [0032] - paragraph [0075] -----	1-14
X	US 2007/122143 A1 (OKAMOTO TAKAAKI [JP]) 31 May 2007 (2007-05-31) the whole document -----	1-14
X	EP 2 196 836 A1 (NIPPON KOGAKU KK [JP]) 16 June 2010 (2010-06-16) abstract figures 1-9 paragraph [0014] - paragraph [0100] ----- -/--	1-14

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  14 October 2011	Date of mailing of the international search report  25/10/2011
--	--

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Windecker, Robert
--	---



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2011/062605

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2005/068614 A1 (YONEYAMA TAKASHI [JP] ET AL) 31 March 2005 (2005-03-31) abstract; figures 1-5,10,12 paragraph [0048] - paragraph [0068] paragraph [0114] - paragraph [0150] -----	1-14
A	US 2008/182336 A1 (ZHUANG XIAOWEI [US] ET AL) 31 July 2008 (2008-07-31) cited in the application abstract paragraph [0066] paragraph [0084] - paragraph [0085] -----	1-14

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/EP2011/062605
---

Patent document cited in search report	Publication date	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2004113043	A1	17-06-2004	JP 4370554 B2 JP 2004070276 A	25-11-2009 04-03-2004
US 2007122143	A1	31-05-2007	JP 2007148221 A	14-06-2007
EP 2196836	A1	16-06-2010	WO 2009031477 A1 US 2011127406 A1	12-03-2009 02-06-2011
US 2005068614	A1	31-03-2005	US 2008123185 A1 US 2008204865 A1	29-05-2008 28-08-2008
US 2008182336	A1	31-07-2008	US 2010316269 A1 US 2010297777 A1	16-12-2010 25-11-2010

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. G02B21/16 G02B21/36 G01N21/64 G02B21/24 ADD.		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) G02B G01N		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 2004/113043 A1 (ISHIKAWA AIICHI [JP] ET AL) 17. Juni 2004 (2004-06-17) Abbildungen 1-3 Absatz [0032] - Absatz [0075] -----	1-14
X	US 2007/122143 A1 (OKAMOTO TAKAAKI [JP]) 31. Mai 2007 (2007-05-31) das ganze Dokument -----	1-14
X	EP 2 196 836 A1 (NIPPON KOGAKU KK [JP]) 16. Juni 2010 (2010-06-16) Zusammenfassung Abbildungen 1-9 Absatz [0014] - Absatz [0100] -----	1-14
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
14. Oktober 2011		25/10/2011
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter  Windecker, Robert

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 2005/068614 A1 (YONEYAMA TAKASHI [JP] ET AL) 31. März 2005 (2005-03-31) Zusammenfassung; Abbildungen 1-5,10,12 Absatz [0048] - Absatz [0068] Absatz [0114] - Absatz [0150] -----	1-14
A	US 2008/182336 A1 (ZHUANG XIAOWEI [US] ET AL) 31. Juli 2008 (2008-07-31) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Absatz [0066] Absatz [0084] - Absatz [0085] -----	1-14

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2011/062605

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2004113043 A1	17-06-2004	JP 4370554 B2 JP 2004070276 A	25-11-2009 04-03-2004
US 2007122143 A1	31-05-2007	JP 2007148221 A	14-06-2007
EP 2196836 A1	16-06-2010	WO 2009031477 A1 US 2011127406 A1	12-03-2009 02-06-2011
US 2005068614 A1	31-03-2005	US 2008123185 A1 US 2008204865 A1	29-05-2008 28-08-2008
US 2008182336 A1	31-07-2008	US 2010316269 A1 US 2010297777 A1	16-12-2010 25-11-2010