



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 102 31 543 B3** 2004.02.26

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **102 31 543.4**

(22) Anmeldetag: **11.07.2002**

(43) Offenlegungstag: –

(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: **26.02.2004**

(51) Int Cl.7: **G01N 21/59**

**G01N 21/25, G01N 21/63, G02B 21/00,
H04N 7/18**

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden.

(71) Patentinhaber:
Universität Siegen, 57072 Siegen, DE

(74) Vertreter:
Köllner & Brunotte, 64293 Darmstadt

(72) Erfinder:
**Thiel, Erwin, Dr., 57299 Burbach, DE; Bornemann,
Rainer, Dipl.-Chem., 57076 Siegen, DE; Gregor,
Ingo, 57223 Kreuztal, DE**

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

DE 44 16 558 C2

DE 43 31 570 C2

DE 43 24 681 A1

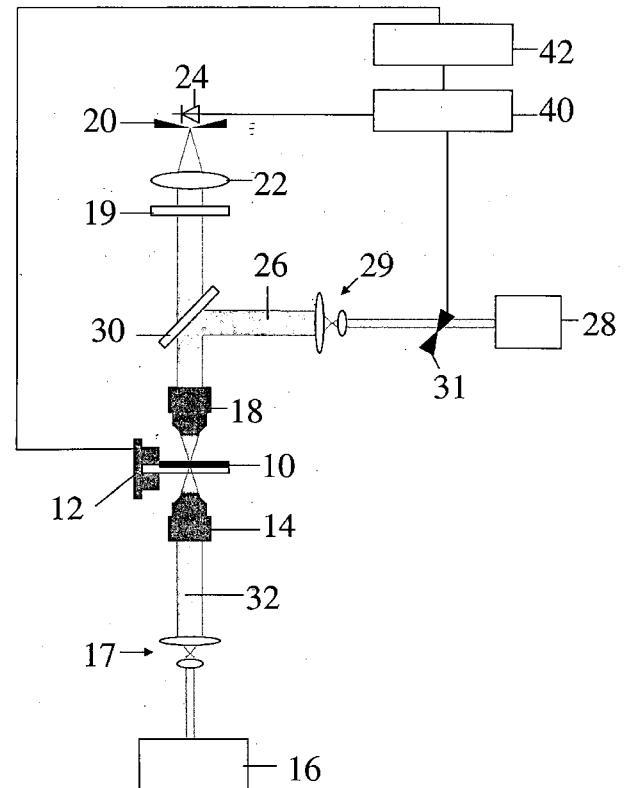
DE 40 40 441 A1

US 46 31 581 A

WO 92/18 850 A1

(54) Bezeichnung: **Konfokale 3D-Scanning Absorption**

(57) Zusammenfassung: Bei der konfokalen dreidimensionalen Scanning-Absorption werden zum Bestimmen der dreidimensionalen Struktur eines Objekts ein Anregungsstrahl (26) und ein Messstrahl (32) in einen im Wesentlichen gemeinsamen Fokus fokussiert. Das Objekt (10) und der Fokus werden zum Abtasten des Objekts durch den Fokus relativ zueinander bewegt. Die Änderung der Transmission des Messstrahls (32) bei dem Durchtritt durch den Fokus wird in Abhängigkeit von der Änderung der Intensität des Anregungsstrahls (26) bestimmt. Durch Bestrahlung der Probe mit Licht in einem wohldefinierten Fokus verändert sich lokal die Transmission der Probe in diesem Fokus. Dies wird mit Hilfe des Messstrahls erfasst. Dadurch können beispielsweise Zellen in ihrer inneren Struktur mittels Absorptionsmessungen dreidimensional erfasst werden, ohne dass sie vorher mit Farbstoffen angefärbt werden müssen.



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft eine Anordnung und ein Verfahren zum Bestimmen der dreidimensionalen Struktur eines Objekts.

Stand der Technik

[0002] Verfahren zum dreidimensionalen optischen Vermessen einer Probe, insbesondere von Zellen, sind beispielsweise aus der US 4,631,581 bekannt. Dazu werden i. d. R. Konfokalmikroskope verwendet, insbesondere konfokale Laser-Scanning-Mikroskope [J. B. Pawley, The Handbook of Biological Confocal Microscopy, Plenum 1990, New York; A. Boyde, Bibliography on confocal microscopy and its applications, Scanning 16 (1994) 33-56; J. W. Lichtmann, Confocal microscopy, Scientific American, 271 (1994) 340-345; J. B. Pawley, The Handbook of Biological Confocal Microscopy, Plenum 1990, New York]. Dabei wird ein Laserstrahl in dem Objekt fokussiert. Ein Teil des Laserlichts wird durch das Objekt absorbiert. Die absorbierte Lichtenergie wird von der Probe teilweise spontan emittiert und nachgewiesen. Auf diese Weise wird systematisch das gesamte Objekt abgetastet. Es werden lumineszierende, insbesondere fluoreszierende oder phosphoreszierende Proben oder mit entsprechenden Farbstoffen markierte Proben vermessen. Bekannt sind auch Verfahren, die die Reflexion von Licht an der Oberfläche eines Objekts zur Aufklärung von dessen Topographie nutzen.

[0003] Bei konfokalen Mikroskopen wird die Ortsauflösung durch eine räumliche Einschränkung des Fokus vor dem Objektiv verbessert.

[0004] Dazu wird das von der Probe emittierte Licht auf eine Lochblende (Pinhole) abgebildet, die in einer zu der Fokalebene des Objektivs im Objekt konjugierten Ebene angeordnet ist. Die verbesserte Auflösung kommt dadurch zustande, dass zwei Punktabbildungsfunktionen die Abbildung in dem konfokalen Mikroskop bestimmen: die Abbildungsfunktion des Fokus des Laserstrahls und die Abbildungsfunktion des Detektors, welche die Abbildung des von der Probe emittierten Lichts in das Pinhole und den dahinter angeordneten Detektor beschreibt. Die Abbildungsfunktion des Detektors beschreibt die Wahrscheinlichkeit, mit der ein im Fokus emittiertes Photon zum Detektor gelangt. Da sowohl die Anregung als auch die Detektion stattfinden müssen, ist die Punktabbildungsfunktion eines konfokalen Mikroskops das Produkt aus den beiden Wahrscheinlichkeitsverteilungen, das heißt das Produkt der Punktabbildungsfunktionen für die Anregung und die Detektion. Dies führt zu einem deutlich schmaleren Hauptmaximum der konfokalen Punktabbildungsfunktion im Vergleich zu einem nicht konfokal angeordneten Mikroskop. Dies entspricht einer höheren Auflösung des konfokalen Mikroskops und bewirkt eine Diskriminierung aller Punkte, die sich nicht in der unmittelbaren Umgebung des Fokus befinden. Letz-

teres ist Voraussetzung für die Erstellung dreidimensionaler Bilder.

[0005] Weiterhin sind konfokale optische Anordnungen mit zwei Strahlen, so genannte doppelt konfokale Mikroskope, bekannt, u. a. aus der DE 40 40 441 A1 oder der WO 92/18850. Diese werden teilweise zur 2-Photonen-Anregung der Probe verwendet (vgl. DE 43 24 681 A1 und DE 43 31 570 C2), oder zum teilweisen stimulierten Emittieren der Probe, um den Bereich der im Fokus befindlichen, angeregten und damit auch emittierenden Moleküle zu verkleinern, wodurch die Ortsauflösung erhöht wird (vgl. DE 44 16 558 C2).

[0006] All diesen Laser-Scanning-Mikroskopen ist gemeinsam, dass sie zur Aufklärung der räumlichen Struktur eines Objekts die spontane Emission von lumineszierenden Molekülen nutzen. Da die zu untersuchende Probe i. d. R. selbst nicht fluoresziert – native Fluoreszenz ist recht selten –, muss die zu untersuchende Probe i. d. R. mit geeigneten Farbstoffmolekülen markiert werden. Diese verändern möglicherweise die Struktur oder gar die Funktion des zu untersuchenden Objekts und damit die Messung. Ferner leiden Farbstoffmoleküle häufig an einer geringen Photostabilität, mit der die Produktion von phototoxischen Substanzen in der Probe, z. B. Singulett-Sauerstoff, verbundenen ist. Auch werden derartige Messungen stets durch Fluoreszenzlicht von Verunreinigungen bzw. frequenzverschobenes Streulicht (so genanntes Raman-Licht) verfälscht, insbesondere bei geringen Farbstoff-Konzentrationen.

Aufgabenstellung

[0007] Aufgabe der Erfindung ist es, das Bestimmen der dreidimensionalen Struktur eines Objekts zu ermöglichen, ohne das Objekt vorher mit Farbstoffmolekülen markieren zu müssen.

[0008] Diese Aufgabe wird durch die Erfindungen mit den Merkmalen der unabhängigen Ansprüche 1 und 4 gelöst. Vorteilhafte Weiterbildungen der Erfindungen sind in den Unteransprüchen gekennzeichnet.

[0009] Erfindungsgemäß wird eine Anordnung zum Bestimmen der dreidimensionalen Struktur eines Objekts angegeben. Als Objekte sind u. a. biologische Objekte von Interesse, etwa Zellen, deren innere und/oder äußere Struktur aufgeklärt werden soll.

[0010] Die Anordnung weist einen Anregungsstrahl und einen Messstrahl mit einem im Wesentlichen gemeinsamen Fokus auf. Die Strahlen sind i. d. R. elektromagnetische Strahlen, insbesondere Lichtstrahlen, die vorzugsweise von einem Laser erzeugt werden. Denkbar sind jedoch auch akustische Strahlen, Neutronenstrahlen oder andere Teilchen-Strahlen. Die Strahlen sollten definiert fokussierbar sein.

[0011] Um die dreidimensionale Struktur des Objekts aufklären zu können, ist der Fokus kleiner als das Objekt. Als Fokus wird das i. d. R. dreidimensionale Ellipsoid maximaler Bestrahlungsintensität be-

zeichnet. Je nach Größe des Objekts kann der Fokus relativ groß gewählt werden. Ist das Objekt klein, etwa eine biologische Zelle, so wird als Strahl i. d. R. ein Laserstrahl verwendet und der Fokus möglichst klein gewählt, insbesondere beugungsbegrenzt.

[0012] Das Objekt kann frei im Raum fixiert sein. Das Objekt kann auch in einem Medium eingebettet sein, das im Wesentlichen transparent sowohl für den Anregungs- als auch für den Messstrahl ist.

[0013] Die Anordnung weist eine Einrichtung zur Relativbewegung von Objekt und Fokus zum Abtasten des Objekts durch den Fokus auf, damit die Struktur des Objekts ermittelt werden kann.

[0014] Es gibt viele Möglichkeiten, die Transmissions-eigenschaften der Probe für den Messstrahl zu verändern. Durch Bestrahlen des im Fokus befindlichen Teils des Objekts mit dem Anregungsstrahl verändert sich lokal die Transmission dieses Teils des Objekts für den Messstrahl, abhängig von der lokalen Beschaffenheit des Objekts. Die Anregung der Probe bzw. einiger selektiv auf den Anregungsstrahl ansprechender Moleküle innerhalb der Probe bewirkt, dass diese Moleküle von einem Grundzustand in einen angeregten Zustand überführt werden. Damit wird einerseits der Grundzustand entleert und andererseits der angeregte Zustand bevölkert. Beides lässt sich nachweisen. Der Anteil der Moleküle, die in einen angeregten Zustand überführt werden müssen, ist sehr gering und liegt typischerweise in der Größenordnung von 0,1% bis 1%.

[0015] Häufig haben die elektronisch angeregten Moleküle einen gegenüber den Molekülen im Grundzustand veränderten Extinktionskoeffizienten bzw. ein verändertes Absorptionsspektrum. Die Veränderung ist i. d. R. für jede Molekülart spezifisch. Zum Nachweis der Bevölkerung des angeregten Zustands wird ein geeigneter Messstrahl gewählt, beispielsweise ein Laserstrahl mit einer Wellenlänge, die eine Absorptionsbande des angeregten Zustands der Moleküle trifft, die jedoch keine Absorptionsbande des Grundzustands trifft.

[0016] Die Bevölkerung des angeregten Zustands lässt sich auch durch stimulierte Emission nachweisen. Dazu wird der Messstrahl auf eine Wellenlänge abgestimmt, die einer Emissionsbande des angeregten Zustands entspricht. Kommt es zur stimulierten Emission, so erhöht sich die Transmission des Messstrahls scheinbar. Ferner erhöht sich bei Verwendung der stimulierten Emission die Photostabilität (die Anzahl der im Mittel möglichen Anregungszyklen) von ggf. eingesetzten Farbstoffen, da diese eine kürzere Zeit in elektronisch angeregten Zuständen verweilen, aus denen heraus sie i. d. R. chemische Reaktionen eingehen können, die ihre Fluoreszenzfähigkeit aufheben.

[0017] Die Entleerung des Grundzustands kann dadurch nachgewiesen werden, dass der Messstrahl beispielsweise die gleiche oder ähnliche Wellenlänge wie der Anregungsstrahl hat und dann auch beide von einem Laser erzeugt werden. Beide mögen auf

eine Absorptionsbande des Grundzustands der Moleküle abgestimmt sein. Wird der Grundzustand teilweise entvölkert bzw. ausgebleicht, so verringert sich die Absorption des Messstrahls abhängig von der Intensität des Anregungsstrahls, d. h. die Transmission erhöht sich. Möglich ist für diesen Fall auch, dass der Messstrahl auf eine andere Absorptionsbande des Grundzustands abgestimmt ist, also eine andere Wellenlänge hat als der Anregungsstrahl.

[0018] Auf diese Weise wird durch den Anregungsstrahl ein Volumen innerhalb des Objekts erzeugt, dass spezifische Eigenschaften hat, die selektiv nachgewiesen werden können. Dieses Volumen ist z. B. bestimmt durch den Bereich der maximalen Konzentration an Molekülen im angeregten Zustand. Dieser Bereich wird durch den Fokus des Anregungsstrahls erzeugt. Ohne diese gezielte Erzeugung eines präparierten Volumens im Objekt könnte eine Absorptionsmessung lediglich Informationen über die Gesamtheit der Moleküle im Strahlengang des Messstrahls liefern.

[0019] Je nach Notwendigkeit haben der Anregungsstrahl und der Messstrahl, sofern es sich um Laserstrahlen handelt, die gleiche Wellenlänge oder unterschiedliche Wellenlängen. Entsprechend werden eine oder mehrere Strahlungsquellen benötigt.

[0020] Es ist nicht nötig, die Probe mit geeigneten Sonden, z. B. Farbstoff-Molekülen, zu markieren. Es genügt, eine Absorptionsbande von Teilen der Probe zu finden und diese durch den Anregungsstrahl reversibel und gezielt auszubleichen. Bei biologischen Proben gibt es oftmals eine Reihe solcher Absorptionsbanden, so beispielsweise bei Cytochromen oder Hämoglobin. Es ist jedoch möglich, durch Markieren des Objekts mit geeigneten Farbstoffen den gewünschten Effekt gezielt herbeizuführen oder zu verstärken. Dazu können auch Farbstoffe eingesetzt werden, die nur schlecht fluoreszieren, etwa klassische Färbemittel, deren Auswirkungen auf Zellen gut erforscht sind.

[0021] Die Anordnung weist schließlich eine Einrichtung auf zum Bestimmen der Änderung der Transmission des Messstrahls bei dem Durchtritt durch den Fokus, abhängig von der Änderung der Intensität des Anregungsstrahls. In der Regel ist die Änderung der Transmission proportional zur Konzentration der Moleküle, die durch den Anregungsstrahl in einen angeregten Zustand überführt wurden. Somit ist die relative Änderung der Transmission i. d. R. proportional zur Intensität des Anregungsstrahls. Typische Werte für die relative Änderung der Transmission des Messstrahls liegen im Bereich von 1% oder weniger. Relative Transmissionsänderungen bis $3 \cdot 10^{-8}$ sind bei geeigneter Ausrüstung noch nachzuweisen. Mit dieser Technik können einzelne Absorbermoleküle nachgewiesen werden.

[0022] Ein großer Vorteil der Erfindung besteht darin, dass auf die Markierung mit Farbstoffen verzichtet werden kann. Dadurch kommt es u. a. zu einer Reduzierung der Produktion phototoxischer Substan-

zen in der Probe, die stark durch fluoreszierende Farbstoffe katalysiert wird.

[0023] Ferner kann das gewünschte Messsignal i. d. R. frei von Untergrund nachgewiesen werden. Wird als Messstrahl ein in der Wellenlänge schmalbandiger Laserstrahl verwendet, so wird auch das gewünschte Signal nur in diesem schmalen Wellenlängen-Bereich nachgewiesen. Dazu kann z. B. vor dem Detektor ein gleichfalls schmalbandiger Farbfilter oder Monochromator eingesetzt werden. Umgebungslicht, Hintergrund-Fluoreszenz oder Raman-Licht wird dadurch ausgeblendet. Wird, wie beim derzeitigen Stand der Technik, Fluoreszenzlicht nachgewiesen, so ist das Emissionslicht über einen wesentlich breiteren Wellenlängenbereich zu sammeln, was zu einem entsprechend erhöhten Untergrund führt. Ferner kann durch das Anregungslicht ein selektiver Zustand präpariert werden, der durch den Messstrahl nachgewiesen wird, ein Zustand, der in der Probe evtl. natürlicherweise nicht vorkommt und daher untergrundfrei ist.

[0024] Die Erfindung kann neben vielen Anwendungen u. a. zur Ultra-Spuren-Analyse in einer Probe eingesetzt werden sowie zur Überprüfung der Homogenität der Färbung von Polymeren bzw. zur Überprüfung der inneren Struktur der Farbstoffverteilung in Proben.

[0025] Vorteilhafterweise wird der durch die Probe transmittierte Messstrahl mit Hilfe eines konfokalen Aufbaus nachgewiesen. Das heißt, dass der Fokus des Messstrahls in der Probe auf ein Pinhole abgebildet wird, hinter dem sich ein Detektor befindet. Dadurch wird die Ortsauflösung erhöht. Gegenüber herkömmlichen Laser-Scanning-Mikroskopen hat dieses konfokale, zweistrahlige Absorptionsmikroskop eine um den Faktor Wurzel 2 verbesserte räumliche Auflösung.

[0026] Um die Ortsauflösung weiter zu erhöhen, wird i. d. R. ein Mikroskop dazu verwendet, den Anregungsstrahl und den Messstrahl in die Probe zu fokussieren. Am besten geeignet zur Durchführung der Erfindung ist ein modifiziertes konfokales Laser-Scanning-Mikroskop.

[0027] Die Erfindung erlaubt es, die spektrale Verteilung der Änderung der Transmission des Messstrahls bei dem Durchtritt durch den Fokus räumlich aufgelöst zu erfassen. Dazu wird zum Erzeugen des Messstrahls eine Lampe eingesetzt, die ein breites, möglichst kontinuierliches Spektrum an Licht aussendet. Alternativ kann auch eine schmalbandige, durchstimmbare Lichtquelle, etwa ein abstimmbarer Laser, eingesetzt werden. Die Transmission des Messstrahls wird dann mit Hilfe eines Spektraldetektors nachgewiesen. Die so ermittelten Transmissions- bzw. Absorptionsspektren können ferner als Funktion der Wellenlänge des Anregungsstrahls ermittelt werden. Damit wird ein neues Feld der mehrdimensionalen Spektroskopie eröffnet, dass enorme Möglichkeiten der differenzierten Darstellung z. B. von Gewebe oder Zellstrukturen schafft.

Ausführungsbeispiel

[0028] Im Folgenden wird die Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert, die in den Figuren schematisch dargestellt sind. Gleiche Bezugsziffern in den einzelnen Figuren bezeichnen dabei gleiche Elemente. Im Einzelnen zeigt:

[0029] **Fig. 1** eine schematische Darstellung des optischen Aufbaus; und .

[0030] **Fig. 2** eine beispielhafte Messung mit konfokaler Absorptionsmikroskopie.

[0031] Wie in **Fig. 1** zu sehen ist, ist eine Probe **10**, z. B. ein Gewebepreparat, auf einem Positioniertisch **12** befestigt. Ein Mikroskopobjektiv **14** fokussiert einen kontinuierlichen Strahl eines Helium-Neon-Lasers **16** in die Probe **10**, nachdem er durch ein Linsenpaar **17** in seinem Durchmesser vergrößert wurde. Der Helium-Neon-Laser hat eine Wellenlänge von 543,5 nm. Das transmittierte Licht wird durch ein zweites Mikroskopobjektiv **18** gesammelt und über einen Spektralfilter **19** auf ein Pinhole **20** mit Hilfe einer Linse **22** fokussiert. Hinter dem Pinhole ist eine Silizium-Photodiode **24** angeordnet, die das durch das Pinhole gelangende Licht detektiert. Es ist nicht nötig, einen besonders empfindlichen bzw. rauscharmen Photodetektor zu verwenden, da nicht einzelne Photonen nachgewiesen werden müssen, sondern lediglich die Änderung der Transmission des Messstrahls. Daher reichen einfache Photo-Dioden, CCDs o. ä. als Detektoren.

[0032] Das zweite Mikroskopobjektiv **18** wird ferner dazu verwendet, den Strahl **26** eines Argon-Ionen-Lasers **28** (mit einer Wellenlänge von 514,5 nm) in die Probe **10** zu fokussieren, nachdem auch dieser durch ein Linsenpaar **29** in seinem Durchmesser vergrößert wurde und durch einen dichroitischen Strahlteiler **30** in das Mikroskopobjektiv **18** eingekoppelt wurde. Die Intensität des Laserstrahls **26** wird mit einer Frequenz von 17 kHz moduliert. Dazu dient beispielsweise ein Chopper oder ein Modulator **31**, beispielsweise ein akustooptischer oder elektro-optischer Modulator, vorzugsweise eine Pockelszelle. Vorzugsweise wird eine Rechteck-Modulation verwendet, d. h. der Anregungsstrahl **26** wird abwechselnd ein- und ausgeschaltet.

[0033] Die Fokusse der beiden Laserstrahlen fallen zusammen, ebenso wie die Abbildung des Pinholes **20** in der Ebene der Probe **10**. Der Strahl **26** des Argon-Ionen-Lasers **28** dient als Anregungsstrahl. Der Strahl des Helium-Neon-Lasers **16** dient als Messstrahl **32**.

[0034] Die Wellenlänge des Anregungsstrahls **26** ist so gewählt, dass sie auf eine Absorptionsbande in der Probe **10** passt. Aufgrund der Absorption des Anregungsstrahls **26** in der Probe **10** kommt es in einem dynamischen Gleichgewicht dazu, dass ein bestimmter Anteil von Molekülen in einen elektronisch angeregten Zustand gebracht wird. Dieser Anteil liegt typischerweise im Bereich von einem Prozent oder mehrere Größenordnungen darunter.

[0035] Häufig haben die elektronisch angeregten Moleküle einen gegenüber den Molekülen im Grundzustand veränderten Extinktionskoeffizienten für die Wellenlänge des Messstrahls **32**. Damit ändert sich die Transmission des Messstrahls **32** durch die Probe **10** in Abhängigkeit von der Modulation des Anregungsstrahls **26**. Diese periodische Änderung der Transmission weist auf die Anwesenheit von Absorbermolekülen in der Probe **10** hin. Durch dreidimensionales Abtasten der Probe **10** mit Hilfe des Positioniertisches **12** lässt sich die räumliche Verteilung der Absorbermoleküle und damit die räumliche Struktur der Probe **10** ermitteln.

[0036] Das Signal der Silizium-Photodiode **24** wird verstärkt und mit Hilfe eines Lock-in-Verstärkers **40** und eines Computers **42** ausgewertet. Der Lock-in-Verstärker **40** erlaubt eine effektive Rauschunterdrückung und damit eine hohe Dynamik der Messsignal-Aufnahme. Der Lock-in-Verstärker **40** wird auf die Frequenz und Phase des Modulators **31** abgestimmt. Der Computer **42** steuert ferner den Positioniertisch **12** und damit die relative räumliche Lage zwischen Probe **10** und Fokus. Auf diese Weise werden Änderungen in der Transmission des Messstrahls **32** durch die Probe **10** als Funktion der räumlichen Positionierung des Fokus in der Probe **10** ermittelt.

[0037] Um die Möglichkeiten dieser konfokalen Absorptionsmikroskopie zu demonstrieren, zeigt **Fig. 2** eine beispielhafte Messung. Als Probe **10** wurde ein Objektträger **34** für die Mikroskopie mit Farbstoffmolekülen beschichtet. Dazu wurde eine 10^{-4} molare Lösung von Rhodamin 6G in Chloroform mit drei Massenprozent Polycarbonat hergestellt. Diese wurde durch Spincoating bei 2000 Umdrehungen pro Minute als Schicht **36** auf den Objektträger aufgebracht. [0038] **Fig. 2** zeigt die Änderung der Transmission $\Delta I/I$ als Funktion der Koordinate z , die den Abstand der Fokalebene **38** des Anregungsstrahls **26** bzw. des Messstrahls **32** zur Ebene der Farbstoff-Schicht **36** angibt. Die räumliche Lokalisierung der Schicht **36** in z -Richtung ist mit dem geschilderten Absorptionsverfahren möglich, wie es in **Fig. 2** deutlich zu sehen ist.

[0039] Die Lage der Fokalebene **38** bezogen auf den Objektträger **34** bzw. die Schicht **36** ist im oberen Teil der **Fig. 2** veranschaulicht. Bedingt durch die Brechung des Lichts des Anregungs- bzw. Messstrahls **26**, **32** am Glas des Objektträgers **34** kommt es teilweise zu einer Verschiebung der Fokalebene, wie es in der Abbildung ganz links im oberen Teil der **Fig. 2** zu sehen ist.

Bezugszeichenliste

10	Probe
12	Positioniertisch
14	Mikroskopobjektiv
16	Helium-Neon-Laser
17	Linsenpaar
18	Mikroskopobjektiv
19	Spektralfilter
20	Pinhole
22	Linse
24	Silizium-Photodiode
26	Anregungsstrahl
28	Argon-Ionen-Laser
29	Linsenpaar
30	dichroitischer Strahlteiler
31	Modulator
32	Messstrahl
34	Objektträger
36	Farbstoff-Schicht
38	Fokalebene
40	Lock-in-Verstärker
42	Computer

Patentansprüche

1. Anordnung zum Bestimmen der dreidimensionalen Struktur eines Objekts
 - a) mit einem Anregungsstrahl (**26**) und einem Messstrahl (**32**) mit einem gemeinsamen Fokus;
 - b) mit einer Einrichtung (**12**) zur Relativbewegung von Objekt (**10**) und Fokus zum Abtasten des Objekts durch den Fokus; und
 - c) mit einer Einrichtung (**24**, **31**, **40**) zum Bestimmen der Änderung der Transmission des Messstrahls (**32**) bei dem Durchtritt durch den Fokus abhängig von der Änderung der Intensität des Anregungsstrahls (**26**).
2. Anordnung nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass die Einrichtung (**24**, **31**, **40**) zum Bestimmen der Änderung der Transmission des Messstrahls (**32**) einen konfokalen Aufbau aufweist.
3. Anordnung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Anregungsstrahl (**26**) und der Messstrahl (**32**) mit Hilfe eines Mikroskopobjektivs (**14**, **18**) in die Probe fokussiert werden.
4. Verfahren zum Bestimmen der dreidimensionalen Struktur eines Objekts mit folgenden Schritten:
 - a) ein Anregungsstrahl (**26**) und ein Messstrahl (**32**) werden in einen gemeinsamen Fokus fokussiert;
 - b) das Objekt (**10**) und der Fokus werden zum Abtasten des Objekts durch den Fokus relativ zueinander bewegt; und
 - c) die Änderung der Transmission des Messstrahls

(32) bei dem Durchtritt durch den Fokus wird in Abhängigkeit von der Änderung der Intensität des Anregungsstrahls (26) bestimmt.

5. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass die spektrale Verteilung der Änderung der Transmission des Messstrahls (32) bei dem Durchtritt durch den Fokus erfasst wird.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

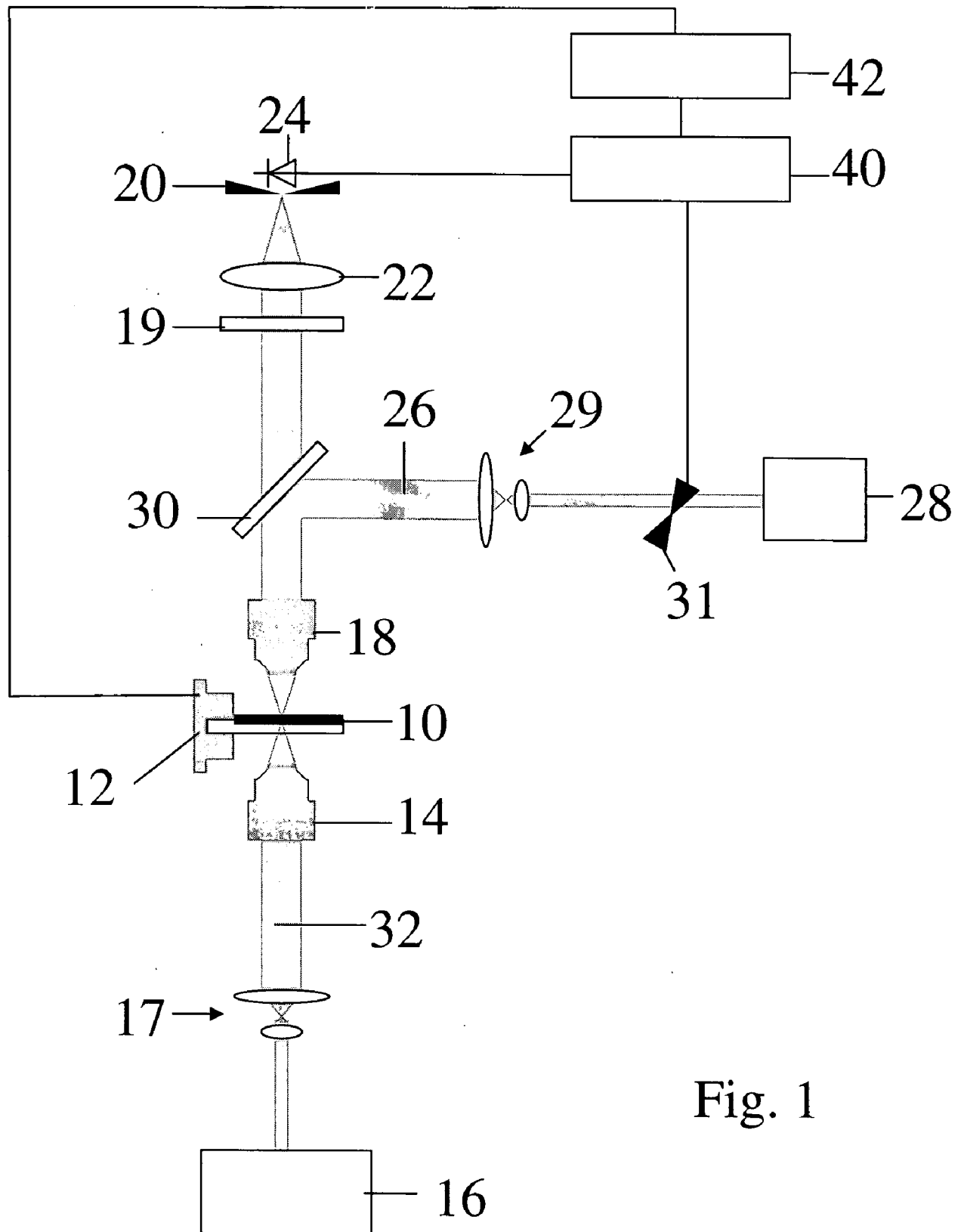


Fig. 1

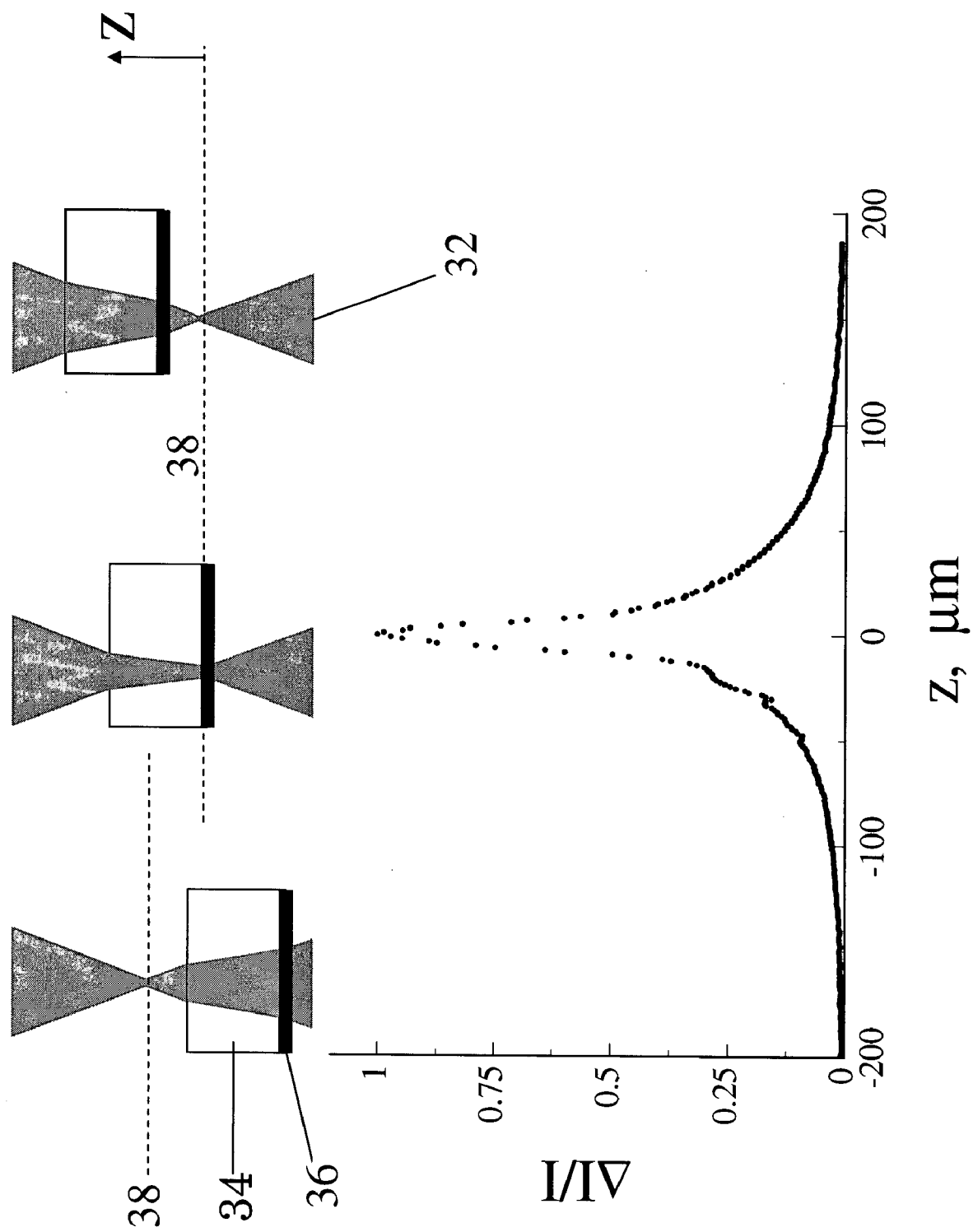


Fig. 2