



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 11 030 T2 2004.07.15**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 097 396 B1**

(51) Int Cl.7: **G02B 21/00**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 11 030.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/CA99/00626**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 928 962.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 00/03283**

(86) PCT-Anmeldetag: **12.07.1999**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **20.01.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **09.05.2001**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **03.09.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **15.07.2004**

(30) Unionspriorität:  
**2243090 10.07.1998 CA**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(73) Patentinhaber:  
**Richardson Technologies Inc., Bolton, Ontario,  
CA**

(72) Erfinder:  
**RICHARDSON, M., Timothy, Bolton, CA**

(74) Vertreter:  
**Glawe, Delfs, Moll, Patentanwälte, 20148 Hamburg**

(54) Bezeichnung: **MIKROSKOP MIT UMGEWANDELTEM DUNKELFELDKONTRAST UND ENTSPRECHENDES VERFAHREN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

## GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Mikroskope und Verfahren zum Erhalten von Bildern mit diesen. Genauer ausgedrückt, betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Erhalten von Bildern mit invertierten Dunkelfeldkontrast- (Inverted Darkfield Contrast, IDC) Mikroskopen und ein neues IDC-Mikroskop.

## HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Viele Jahre lang sind Lichtmikroskope als eine wollentwickelte Technik angesehen worden. Während viele bemerkenswerte Versuche unternommen wurden, die Fähigkeiten des Lichtmikroskops auszuweiten, haben bis jetzt solche Versuche keine wesentlichen Leistungssteigerungen erzielt und sind allgemein zu bedeutend erhöhten Kosten erhalten worden. Schwingungen in Mikroskopen sind als ein Hauptfaktor bekannt gewesen, der zur Grenze der Auflösungsleistung beiträgt. Man hat früher verursacht, Schwingungen im Mikroskoprahmen durch Bauen sehr starrer oder schwerer Rahmen, oder durch Konstruieren horizontaler Mikroskope auf massiven Rahmen im optischen Bankstil zu bewältigen. Andere Versuche zum Verbessern der Schwingungsleistungen haben passive oder aktive Schwingungsdämpfungstische, -Füße oder -Plattformen verwendet.

[0003] Die Erzeugung von Bildkontrast in Mikroskopen ist ein Bereich, wo in der Vergangenheit beträchtliche Arbeit ausgeführt wurde. Versuche, den Kontrast beobachteter biologischer Proben zu vergrößern, haben zu vielen neuen Verfahren wie zum Beispiel Phasenkontrast, Interferenzkontrast, Hoffmann-Modulationskontrast, Differenzinterferenzkontrast, Mikroskopie mit polarisiertem Licht, Dunkelfeldmikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie geführt. Die Herausforderung, Bildkontrast an der äußersten Auflösungsgrenze zu erzeugen, ergab solche Techniken wie Hochleistungs-Immersionsdunkelfeld und ultramikroskopische Beleuchtung. Phasen- und Interferenzkontrasttechniken führten Artefakte ein, von denen einige asymmetrisch waren, die es schwierig machten, die Bilder in bezug zu der echten Struktur der betrachteten Proben zu bringen. Dunkelfeld- und Fluoreszenztechniken stellten Bildausbildung in einer Form dar, die Sehfähigkeiten höchst unvertraut ist, in sehr ähnlicher Weise, wie wir unfähig sind, Informationen aus einem photographischen oder elektronischen "Negativ-" Bild zu extrahieren. Zum Beispiel offenbart US-A-4,896,967 einen Motilitätsscanner zum Charakterisieren lebender Zellen, der ein LED-gestütztes optisches System zum Erfassen eines Hellfeldbilds einschließt, das anschließend elektronisch invertiert wird, um ein Dunkelfeldbild zu erhalten, so dass Zellen als helle Bilder auf einem relativ dunklen

Hintergrund erscheinen können. Systeme dieses Typs vergrößern jedoch weder bedeutend den Bildkontrast, noch ist das resultierende Bild besonders für menschliche Sehfähigkeiten geeignet.

[0004] Versuche, mehr Informationen über Zellen in Echtzeit zu erhalten, haben konfokale Mikroskopie, die Hochleistungs-Laserlichtquellen verwendet, welche den Probenbereich abtasten, um ein Endbild der Probe aufzubauen, und neuere maskierte konfokale Techniken hervorgebracht, die Bilder lebender Proben mit höherer Geschwindigkeit aufbauen können. Allgemein ist die Vollbild/Halbbildrate der konfokalen Systeme zu langsam zum Untersuchen von Bewegung hoher Geschwindigkeit vieler Komponenten in biologischen Systemen, da sie Bewegung hoher Geschwindigkeit aufweisen.

[0005] Versuche, hohe Auflösung zu erzielen, basierten auf der Formel für mikroskopische Auflösung, die zuerst durch Ernst Abbe entwickelt wurde, Auflösungsgrenze = Wellenlänge von Licht / (k × numerische Apertur des Objektivs). Werte für k im Bereich von 1,6 bis 2 sind über 50 Jahre lang akzeptiert worden, aber die neuste Arbeit des Erfinders legt nahe, dass der Wert von k gesenkt werden kann und ausführlicher untersucht werden muss, wenn er auf verbesserte optische Systeme mit neuen Beleuchtungsverfahren und Abbildungsmitteln angewendet wird.

[0006] Da Mikroskopsysteme komplexer geworden sind, haben mehr Glasoberflächen größeren Lichtverlust aufgrund von Übertragungsverlusten in den Glaselementen, Innenreflexion und Streulicht erzeugt. Das Streulicht trug zu schlechtem Kontrast bei, und die Innenreflexionen und Übertragungsverluste zusammen mit dem Streulicht bedeuteten, dass fortschreitend stärkere Lichtquellen zum Erzeugen verwendbarer Bildhelligkeit benötigt wurden. Diese Hochenergiequellen müssen das Licht mit hohen Intensitäten durch den Probenraum weiterleiten, da die meisten der verlustbetroffenen Komponenten sich zwischen der Probe und dem Abbildungsmittel befinden. Moderne binokulare und trinokulare Systeme mit ihren zugehörigen Prismen, Spiegeln und Linsen sind besonders unwirksam und erfordern höhere Lichtpegel.

## ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0007] Es ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein neues IDC-Mikroskop und ein neues Verfahren zum Erhalten von Bildern mit einem IDC gemäß den Ansprüchen 10, 11 und 1 zu schaffen.

[0008] Einem ersten Aspekt der vorliegenden Erfindung zufolge wird ein neues Verfahren zum Erzielen von Kontrast für mikroskopisches Abbilden von Präparationen lebender Zellen und anderer Typen von Objekten zusammen mit Verbesserungen an Mikroskopen beschrieben. Dieses Verfahren kombiniert die traditionelle Dunkelfeldbeleuchtungstechnik mit elektronischer Bildinvertierung (Konvertieren eines positiven zu einem negativen Bild) und anderen Verbesse-

rungen, um den Kontrast und die Auflösung des Endbilds weiter zu verbessern. Das Verfahren wird hier als Invertierter Dunkelfeldkontrast bezeichnet und wird als besonders geeignet zum Betrachten lebender Zellen in Echtzeit ohne Verfärben oder Präparation angesehen.

[0009] Die hier gezeigten Ausführungsformen basieren primär auf einem Videomikroskop, in dem Bildauflösung, Kontrast und optische Effizienz optimiert sind. In Mikroskopen in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung ist gewöhnlich keine störende binokulare oder trinokulare Anordnung oder Okular zwischen dem Objektiv und dem Abbildungssystem vorhanden, welches ein jeglicher Typ von Abbildungsmittel einschließlich Filmkameras, Analog- oder Digitalvideokameras oder Bildverstärker sein kann. Das Mikroskopsystem kann eine vorkonfokussierte und ausgerichtete Lampe und einen Reflektor verwenden, um einen größeren als den üblichen Teil des Lichts von der Lampe in den Beleuchtungsstrahl zu richten. Der Beleuchtungsstrahl wird durch einen Strahlausweiter gerichtet, der den Durchmesser des Beleuchtungsstrahls steuert, während parallele Lichtstrahlen aufrechterhalten werden. Der Beleuchtungsstrahl geht durch Aperturen hindurch, um Streulicht zu steuern.

[0010] Sorgfältige Beachtung wird der Steuerung der Beleuchtungswellenlängen von Licht gewidmet, um die Auflösung des Mikroskops zu verbessern. Insbesondere werden alle nicht sichtbaren Wellenlängen in dem ultravioletten (UV) und infraroten (IR) Teil des Spektrums vorzugsweise zum Verbessern von Bildqualität beseitigt. Die das Objektiv verlassenden Lichtstrahlen werden auch durch Aperturen und eine Ablenkrohre/Ablenkrohren hindurchgeführt, um Streulicht zu reduzieren und Kontrast zu verbessern. Schwingungshemmende Mittel sind auch zum Steuern der Bewegung des Objektivs in bezug zu der betrachteten Probe und der Stellung der Abbildungseinrichtung in bezug zum Objektiv vorgesehen. Steuerung von Streulicht in dem Objektiv und in der Koppelungseinrichtung zwischen dem Objektiv und der Abbildungseinrichtung helfen weiter dabei, Kontrast und Auflösung zu verbessern.

[0011] Das Signal von der Abbildungseinrichtung wird invertiert, um das Negativ des normalen Bilds zu bilden. Auf diese Weise erscheint das traditionelle Dunkelfeldbild als ein Hellfeldbild mit hohem Kontrast auf dem Endmonitor oder der Computeranzeige.

[0012] Die vorliegende Anmeldung weist eine Vielzahl mechanischer und optischer Verbesserungen an einem Mikroskop auf, um Invertierten Dunkelfeldkontrast (IDC) zu erreichen. Genauer ausgedrückt, ist ein Videomikroskop vorgesehen, der Verbesserungen an dem Beleuchtungssystem, dem Kondensator, dem Objektträger, den Objektiven, der Röhre, dem Mikroskopständer und dem Bilderfassungssystem zum Erzeugen eines neuen IDC-Mikroskops einschließen kann.

[0013] Die vorliegende Erfindung schafft ein Verfah-

ren zum Erhalten von Bildern mit hohem Kontrast lebender biologischer Proben, wie zum Beispiel Zellen in Echtzeit, ohne dass Verfärbung oder Fluorchemie benötigt wird. Das Verfahren ist auf die Abbildung einer Vielzahl von Materialien, Substanzen und Strukturen anwendbar, einschließlich Zellen, interner Zellstrukturen, Bakterien, Viren, Pilze und Pflanzenmaterialien. Die vorliegende Erfindung umfasst auch Verbesserungen an Mikroskoptechnik einschließlich Verbesserungen am Ständerdesign, an Beleuchtern, Kondensoren, Objektiven, Abbildungssystemen und an Videoverarbeitung.

[0014] Während das Konzept von Dunkelfeldabbildung nicht neu ist und die Verwendung von Videoinversion von positiv zu negativ im Gebiet von Spezialeffekten bei Fernseh- und Funk bekannt ist, ist die vorliegende Erfindung die erste Anwendung dieser nicht in Verbindung stehenden Techniken zum Erhalten von Bildern mit hohem Kontrast von Proben wie zum Beispiel lebendem biologischem Material. Die vorliegende Erfindung liefert besondere Vorteile, da sie Bilder schaffen kann, die wie verfärbtes biologisches Material aussehen, so dass Biologen einfach die Informationen, die die Bilder darstellen, interpretieren und akzeptieren können, ohne die Verfärbung der abgebildeten Proben zu erfordern. Die vorliegende Erfindung kann den Kontrast, die Auflösung und die Erfassungsgeschwindigkeit des Bilds verbessern, ohne bedeutend die Kosten oder Komplexität des Mikroskops zu erhöhen.

#### KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0015] Vorzugsweise sollen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung nun, nur beispielhaft, unter Bezugnahme auf die beigefügten Figuren beschrieben werden, in denen:

[0016] **Fig. 1** eine Ausführungsform eines IDC-Mikroskops in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung zeigt;

[0017] **Fig. 2** eine Ausführungsform der Anordnung des Videosystems des IDC-Mikroskops zeigt;

[0018] **Fig. 3** eine Ausführungsform einer piezoelektrisch betätigten Abstützung zeigt; und

[0019] **Fig. 4** einen Querschnitt eines typischen Objektivs zeigt, das in einem IDC-Mikroskop in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung verwendet wird; und

[0020] **Fig. 4a** das Detail des bei A in **Fig. 4** identifizierten Bereichs zeigt.

#### AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0021] Die vorliegende Erfindung bildet ein Dunkelfeldbild mit einem optischen System einer hohen numerischen Apertur (NA) und invertiert das digitalisierte Dunkelfeldbild, um ein Negativbild des Dunkelfeldbilds zu erzeugen. Das Negativbild ist ein sichtbares Hellfeldbild mit sehr hohem Kontrast und sehr hoher

Auflösung.

[0022] Während es möglich ist, das Verfahren der vorliegenden Erfindung unter Verwendung von Standardmikroskopbeleuchtern zu realisieren, ist es momentan bevorzugt, dass die mit der vorliegenden Erfindung verwendete Lichtquelle auf der Grundlage eines "Photonenstats" erwogen wird, bei dem der beabsichtige Bestimmung jedes Photons von der Lichtquelle aufgezeichnet und in der Auslegung des IDC-Mikroskops berücksichtigt wird. Um dieses Ziel zu erreichen, wird die Lichtquelle in einer momentan bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wie folgt ausgewählt und aufgebaut.

[0023] In konventionellen Mikroskopen werden Wolfram-, Wolframhalogen-, Quarzhalogen- oder Lichtbogen-Lichtquellen verwendet. Diese Lichtquellen sind nicht gut hinsichtlich der Stellung der lichtemittierenden Oberfläche der Quelle gesteuert, und folglich ist gewöhnlich ein Mittel zum Zentrieren der lichtemittierenden Oberfläche in der X-, Y- und Z-Richtung in Bezug zum Strahlengang des Mikroskops vorhanden.

[0024] Im Gegensatz dazu kann in der derzeit bevorzugten Ausführungsform der Erfindung, die in **Fig. 1** dargestellt ist, das allgemein bei **10** angezeigte Mikroskop eine Lichtquelle **14** verwenden, in der die genaue Position der lichtemittierenden Komponente genau durch den Körper der Lichtquelle **14** und/oder die Fassung gesteuert wird, in der sie angebracht ist. Dies beseitigt die Notwendigkeit eines Zentriermechanismus für die Lichtquelle **14** und stellt sicher, dass im wesentlichen die höchstmögliche Intensität und geometrische Steuerung des Strahls und Wiederholbarkeit erreicht wird. Geeignete Beispiele solcher Lichtquellen sind die Welch Allen-Lampen für medizinische Anwendungen, die ILC-Lichtbogenlampen, die vorfokussierten GE- und Sylvania-Lampen und andere, ähnliche Lichtquellen. Soweit es dem vorliegenden Erfinder bekannt ist, sind diese Lichtquellen bis jetzt nicht mit Lichtmikroskopen verwendet worden.

[0025] In dem Mikroskop **10** wird die Lichtquelle **14**, der die benötigte Energie von einer geeigneten Stromversorgung **16** zugeführt wird, so angebracht, dass so viel Licht wie möglich aus der/den lichtemittierenden Oberfläche oder Oberflächen durch ein geeignetes Beleuchtungsfokussiermittel, wie zum Beispiel einen Spiegel **18** hinter der Lichtquelle **14** und/oder eine Linse **22** vor der Lichtquelle **14**, fokussiert wird. Das Licht von der Rückseite der Lichtquelle **14** wird auf oder angrenzend an die emittierende(n) Oberfläche(n) der Lichtquelle **14** durch den Spiegel **18** zurück fokussiert. Das Licht von der Vorderseite der Lichtquelle **14** und das durch den Spiegel **18** zurückgeführte wird durch die Linse **22** oder einen Satz von Linsen vor der Lichtquelle **22** zu einem gebündelten Strahl fokussiert. Geeignete Aperturen **26**, Ablenkplatten **30** oder Röhrenstrukturen (nicht gezeigt) werden verwendet, um sicherzustellen, dass das Licht von der Linse **22** im wesentlichen vollständig

gebündelt wird. Es ist erwünscht, das Licht von der Linse **22** so zu bündeln, dass wenig oder kein von der Achse abweichendes Licht in das im folgenden beschriebene Kondensorsystem des Mikroskops **10** eintritt. Solches von der Achse abweichendes Licht würde im optischen Abbildungssystem zu "Streulicht" werden und würde den Kontrast des Endbilds verschlechtern.

[0026] Da die meisten Lichtquellen Licht emittieren, das sich außerhalb des Bereichs menschlichen Sehvermögens und dem korrigierten Bereich von Mikroskopoptik befindet, ist ein Filtermittel **34** in dem Weg des Beleuchtungsstrahls vorgesehen, um das Licht zu filtern, damit es so nahe wie möglich dem Bereich von Wellenlängen entspricht, für den die Optik des Mikroskops **10** ausgelegt ist. Das Filtermittel **34** kann irgendwo in dem Beleuchtungsstrahlengang zwischen der Lichtquelle **14** und der Endoptik des Kondensors **38** eingeschlossen sein, und das Filtermittel **34** kann aus einem oder mehreren Wärmefiltern wie zum Beispiel Schott KG1- oder KG5-Glas bestehen, und kann zusätzliche Interferenzfilter zum Dämpfen des roten oder blauen Endes des Lichtspektrums enthalten, und kann den ultravioletten Anteil des Spektrums mit Filtern zum Beispiel der Schott WG- oder GG-Baureihe ausschließen. Durch Beseitigung des Infrarotanteils des Spektrums wird Erhitzung der Probe mit seiner damit verknüpften Auswirkung auf lebende Proben umfassend reduziert. Beseitigung des ultravioletten Lichts hoher Energie aus dem die Probe erreichenden Licht bedeutet, dass die Proben nicht so viel DNA-, Zell- und Entfärbungsbeschädigung ausgesetzt werden. Dies bedeutet, dass Proben während kontinuierlicher Untersuchung für längere Zeitspannen auf dem Mikroskop gehalten werden können. Es bedeutet auch, dass die untersuchten Proben nicht den unnormalen Pegeln von Infrarotlicht und Ultravioletlicht von den gewöhnlichen, in Mikroskopen verwendeten Quellen ausgesetzt werden, die allgemein Glüh-, Metallhalogen- oder Xenon- oder Quecksilberlichtbogenquellen sind, verglichen mit dem Verhältnis von infrarotem zu sichtbarem zu ultraviolettem in dem von der Sonne kommenden Licht. Es ist ein wichtiges Merkmal dieses Mikroskops, dass lebende Proben nur Verhältnissen von infrarotem zu sichtbarem Licht und ultraviolettem zu sichtbarem Licht bei oder weniger als den Verhältnissen ausgesetzt werden, denen die Proben in der Natur ausgesetzt werden würden. Dieses Merkmal bedeutet, dass Proben sich in einer Weise verhalten, die stärker analog zu ihrem Verhalten in ihrer natürlichen Umgebung ist.

[0027] Durch Begrenzen der Wellenlängen von in dem Beleuchtungsstrahl vorhandenem Licht ist es möglich, das Objektiv **40** des Mikroskops **10** mit Licht zu bedienen, das ein Bild höherer Auflösung des Objekts aufgrund der Anpassung des Lichts an die Auslegungsspezifikationen des Objektivs **40** des Mikroskops **10** bildet. Auf diese Weise kann das durch die Proben hindurchgehende Licht darauf begrenzt wer-

den, an die besten sphärischen und chromatischen Aberrationskorrekturpunkte des Objektivs angepasst zu werden. Typischerweise würde das Licht auf zwei Wellenlängenbereiche für ein achromatisches Objektiv oder drei Wellenlängenbereiche für ein apochromatisches Objektiv begrenzt sein. Diese Begrenzung der Wellenlänge des Lichts reduziert weiter Probenheizung und nicht mit Wärme verknüpfte Effekte.

[0028] Es wird erwogen, daß nichtebene Optik die besten Bilder bei Verwendung in dieser Erfindung ergeben wird. Dies liegt darin begründet, dass keine Kompromisse für Feldebenheit vorhanden sind und das IDC-System nur einen kleinen Teil des Innenbereichs des Gesamtbilds verwendet. Dementsprechend ist Feldebenheit nicht so ein großes Problem, wie es in anderen Mikroskopsystemen der Fall wäre, die das vollständige Sichtfeld des Objektivs verwenden.

[0029] Wenn es erwünscht ist, Fluoreszenzvermögen für den Mikroskop **10** einzuschließen, kann eine Stellung in dem Filtermittel **34** für einen Beleuchtungsfilter vorgesehen werden, der die Beleuchtungsstrahl-Wellenlängen nur auf diejenigen Wellenlängen begrenzt, die zum Erregen der mit der Probe verwendeten Fluorophore wichtig sind. In diesem Fall sollte das Substrat dieses Filters so dünn wie möglich gehalten werden, so dass der Strahlengang des Beleuchtungsstrahls so wenig wie möglich unterbrochen wird. Da das Beleuchtungsverfahren in der vorliegenden Erfindung Dunkelfeld ist, kann Fluoreszenzabbildung auf dieses Verfahren mit beinahe der gleichen Ergebnisqualität wie bei reflektierter Lichtmikroskopie angewendet werden, obwohl das Bild von dem IDC-Mikroskop eine durch "Hellfeld" übertragene Lichttechnik zu sein scheint und nominell darstellt. Um den Beleuchtungsstrahl an Charakteristiken des verwendeten Kondensors **38** anzupassen, werden zusätzliche optische Systeme verwendet. Genau ausgedrückt, geht der gebündelte Beleuchtungsstrahl von der Lichtquelle **14** durch einen oder beide der beiden Typen optischer Systeme hindurch. Der erste optische Systemtyp ist bedienbar, um die Beleuchtungsstrahlabmessung abzuwandeln, um zu den optischen Anforderungen des Kondensors **38** zu passen. Dieses System kann ein System aus fixierten Linsen **42** und **46** oder eine Zoomlinseineinrichtung (nicht gezeigt) darstellen, die beide arbeiten, um im wesentlichen die höchstmögliche Lichtmenge von der Beleuchtungsquelle **14** zu dem Kondensor **38** in einer Strahlgeometrie zu liefern, die so gewählt ist, um die Charakteristiken des Kondensors **38** vollständig auszunutzen.

[0030] Wenn ein Dunkelfeldkondensor verwendet wird, kann ein paralleler Lichtstrahl am vorteilhaftesten sein, während in einem konventionellen Hellfeldkondensor ein konvergierender Lichtstrahl erwünscht ist, wobei der konvergierende Strahl das Bild des Glühfadens der Lampe auf der hinteren Brennebene des Kondensors zum Erreichen von Kohler-Beleuchtung präsentiert. Bei Bedarf kann der Beleuchtungs-

strahl durch ein zweites optisches System (nicht gezeigt) hindurchgehen, um den Beleuchtungsstrahl zum Erreichen von Kohler-Beleuchtung umzuformen, wie es im technischen Gebiet gut bekannt ist.

[0031] Der Kondensor **38** kann ein Dunkelfeldkondensor mit hoher numerischer Apertur eines jeglichen Typs sein, wie den Fachleuten in diesem Gebiet bekannt ist. Die Auslegung des Kondensors **38** sollte einen inneren und äußeren Beleuchtungskegel mit einer numerischen Apertur erzeugen, die an die optischen Charakteristiken des verwendeten Objektivs **40** angepasst ist oder diese übersteigt. Die momentan bevorzugten numerischen Aperturen für Kondensoren **38** sind 1,27 für den inneren Kegel und 1,33 für den äußeren Kegel für die meisten biologischen Anwendungen, obwohl für Objektive kleinerer Leistung mit niedrigen numerischen Aperturen ein Dunkelfeldkondensor einer niedrigen NA verwendet werden kann. Dies ist durch Verwendung eines  $\times 63$  Objektivs mit einer NA von 0,7 und einem Kondensor mit einer NA des inneren Kegels von 0,71 und NA des äußeren Kegels von 0,75 dargestellt.

[0032] Wie oben erwähnt ist, ist momentan für viele biologische Anwendungen eine numerische Apertur von 1,27 für den inneren Kegel bevorzugt, so dass Objektive einer numerischen Apertur von 1,25 verwendet werden können, ohne zusätzliche Blenden oder Irisblenden zum Steuern ihrer numerischen Apertur und des Kontrastes des Dunkelfeldeffekts zu benötigen. Eine numerische Apertur von 1,33 ist in ähnlicher Weise für den äußeren Kegel bevorzugt, um zu dem Brechungsindex wässriger Medien zu passen. Wie den Fachleuten in diesem Gebiet klar sein wird, kann es für Medien mit höherem Index und zum Hervorheben von Materialien mit hohem Index, die direkt in Kontakt mit dem Objektträger sind, dann bevorzugt sein, in dem Kondensor **38** eine Apertur von 1,4 oder größer für den äußeren Kegel zu verwenden. Für "extreme" Anwendungen, und wenn die Charakteristiken des die Probe umgebenden Medium und die Probe selbst es zulassen, ist es momentan bevorzugt, einen Kondensor **38** mit einer numerischen Apertur von 1,42 für den inneren Kegel und von 1,47 oder höher für den äußeren Kegel zu verwenden. Dies ermöglicht, dass nur Objekte mit einem Brechungsindex größer als 1,4, die in engem Kontakt mit dem Mikroskopobjektträger sind, gegenüber einem sehr schwarzen Hintergrund hervorgehoben werden, da das einzige Licht, das in die Probe gelangen kann, wenn sie in einem wässrigen Medium angebracht ist, das Licht ist, das in die Probe an dem Bereich von Kontakt mit dem Objektträger fließt. Die Probenobjekte erscheinen daher leuchtend gegenüber einem vollständig dunklen Hintergrund. Diese Betriebsart ermöglicht die Verwendung von Objektiven einer NA von 1,4 für die höchstmögliche Auflösung. Die Nachteile dieses Verfahrens sind, dass jegliche Objekte, die entweder in Fixierungsmedien schwimmen oder nicht optisch mit dem Teil der Probe verbunden werden, die optisch mit dem Objektträger

verbunden ist, verschwinden werden, was ein falsches Bild der vollständigen Umgebung der Probe ergeben wird und möglicherweise einen Teil des Feindetails der Probe selbst verlieren wird; und diese Objekte können scheinbar vollständig spurlos verschwinden, wenn sie plötzlich Kontakt mit dem Objektträger verlieren.

[0033] Einer der Gründe zum Reduzieren der numerischen Apertur des anderen Beleuchtungskegels in wässrigen Anwendungen besteht darin, das Streulicht zu begrenzen, das ansonsten resultieren würde, wenn ein Teil des Beleuchtungskegels von dem Kondensator **38** durch vollständige Innenreflexion an der Berührungsfläche von Wasser und Glas der Probe zurück in den Kondensator **38** reflektiert wird, wo es zu Streulicht wird. Alternativ kann zurückgeführtes Streulicht eingefangen und in Lichtfallen oder Abläsen absorbiert werden, die durch geeignet abgelenkte oder ausgelegte Oberflächengeometrien erzeugt werden.

[0034] Die momentan bevorzugten Konstruktionstypen für Kondensatoren **38** umfassen den Zeiss-Ultradunkelfeldkondensator, den Leitz-Dunkelfeldkondensator älteren Designs für Ölimmersionsverwendung, oder jetzt produzierte LOMO-Dunkelfeldkondensatoren mit hoher numerischer Apertur mit einer inneren NA von wenigstens 1,2.

[0035] Es ist derzeit bevorzugt, dass der Kondensator **38** den Kegeldunkelfeldbeleuchter, oder den koaxialen Dunkelfeld/Hellfeldbeleuchter verwendet, die beide nach der Arbeit von J. E. Barnard etwa 1933 bzw. 1925 entworfen sind und die in verschiedenen Artikeln und Veröffentlichungen beschrieben sind. Genau ausgedrückt, geht bei dem in **Fig. 1** dargestellte Kegeldunkelfeldbeleuchter der Beleuchtungsstrahl durch ein konisches Prisma **50** hindurch, das einen abgewinkelten, aber weiterhin gebündelten Lichtstrahl bildet. Dieser Ring wird von der Oberfläche eines kreisförmigen Spielrings **54** weg reflektiert, welcher das Licht zu einem hohlen Kegel der gewünschten Geometrie fokussiert. Die Elemente des Kondensators **38** sind in einem geeigneten Gehäuse **58** enthalten.

[0036] Der den Kondensator **38** verlassende Beleuchtungsstrahl geht durch eine sphärische Linse **62** in solcher Weise hindurch, dass die Strahlen von der Oberfläche des Spiegelrings **54** durch die Oberfläche der Linse **62** in rechten Winkeln hindurchgehen und nicht abgelenkt werden. Ein Kondensator **38** ist achromatisch, er kann gleichermaßen gut für Abbildungsanwendungen von infrarotem, sichtbarem oder ultraviolettem Licht verwendet werden.

[0037] Der Beleuchtungsstrahl von dem Kondensator **38** geht durch den Objektisch **66** des Mikroskops **10** und den Objektträger **70** hindurch, der die abzubildende Probe/das abzubildende Objekt **74** hält. Unter den meisten Umständen wird die Probe **74** mit einem Deckglas **78** bedeckt sein. Aufgrund der verwendeten hohen numerischen Aperturen wird der Kondensator **38** vorzugsweise mit dem Objektträger **70** durch einen Film aus Immersionsöl verbunden, wie es den

Fachleuten in diesem Gebiet gut bekannt ist.

[0038] Mikroskope sind historisch mit C-förmigen Rahmen mit dem Objektiv und dem Okular an einem oberen Ende des Rahmens und der Lichtquelle und dem Objektisch an dem unteren Ende des Rahmens aufgebaut worden. Der vorliegende Erfinder hat festgestellt, dass während konventionelle C-förmige Rahmen bequem zu verwenden und herzustellen sind, sie unter Nachteilen darin leiden, dass diese Rahmen anfällig für unerwünschte Schwingungen sind und tatsächlich sehr ähnlich wie Stimmgabeln geformt sind und überraschenderweise wie diese wirken. Es ist festgestellt worden, dass äußere Schwingungen von einer jeglichen Quelle und praktisch jeder Frequenz die Neigung haben, die Stimmgabelform des konventionellen C-förmigen Rahmens zu erregen, um bei seiner eigenen Resonanzfrequenz und verknüpften harmonischen Schwingungen zu schwingen, und dies kann das durch den Mikroskop aufgelöste Bild verzerren. Diese Nachteile sind besonders verschlimmert bei der vorliegenden Erfindung, die ansonsten dem Mikroskop **10** erlauben kann, Objekte kleiner als 250 Nanometer oder weniger aufzulösen, und Objekte so klein wie 50 Nanometer zu detektieren. Dementsprechend ist es bevorzugt, Schwingung des Mikroskoprahmens zu dämpfen, so dass unerwünschte Bewegung des Objektischs **40** in bezug zu der abzubildenden Probe **74** gehemmt wird.

[0039] Der vorliegende Erfinder hat zwei Ansätze zum Dämpfen oder Beseitigen dieser unerwünschten Schwingung bestimmt. Der momentan bevorzugte erste Ansatz besteht darin, Abstützungen **78** einzuschließen oder hinzuzufügen, die den Kopf des Mikroskops **82** mit dem Boden **86** des Mikroskops **10** verbinden. Die Abstützungen **78** werden an dem Mikroskop **10** entlang der vertikalen optischen Achse und auf beiden Seiten des Objektischs **66** des Mikroskops **10** befestigt. Die Abstützungen **78** können hergestellt, bearbeitet oder gegossen werden und bestehen vorzugsweise aus einem Material oder Materialien, wie zum Beispiel Flugzeugaluminiumlegierungen oder Stahllegierungen, die eine relativ niedrige Elastizität und Schwingungstendenz aufweisen. In einigen Fällen kann es erwünscht sein, die Abstützungen als Verbundstoff oder Sandwichschichten aus verschiedenen Materialien aufzubauen, um die Abstützung weiter zu versteifen und die Schwingungstendenz zu senken. Vorzugsweise sind die Abstützungen **78** ausgelegt, um so wenig Resonanzschwingung wie möglich aufzuweisen, und von der Schwingung, die nicht beseitigt werden kann, sind die Abstützungen **78** so ausgelegt, dass ihre Resonanzfrequenz keine harmonische Schwingung oder subharmonische Schwingung der Grundfrequenz der Schwingung des C-förmigen Mikroskoprahmens darstellt. Auf diese Weise hat die Schwingung sowohl des Rahmens als auch der Abstützungen **78** die Tendenz, die Schwingungen des anderen zu dämpfen.

[0040] Das Verfahren zum Entwerfen der Abstüt-

zungen besteht darin, zuerst die Schwingungsarten des C-Rahmens so vollständig wie möglich zu charakterisieren, mit dem vollständigen Bereich von Zubehörteilen, die mit in dem Mikroskop verwendet werden können (da die Schwingung mit den verwendeten Zubehörteilen variieren kann). Wenn die Schwingungsarten verstanden wurden, dann werden die Abstützungen zum Reduzieren der Schwingungen entworfen und zum Versuchen, welche Schwingungen auch immer zurückbleiben, zu "Normalmodus" zu machen, so dass alle Komponenten des Mikroskops in Phase schwingen, so dass in typischer Verwendung geringe oder keine "Netto-" Schwingung von dem Punkt des Abbildungsmittels in bezug zu dem Objekt vorliegt.

[0041] Ein anderer Ansatz zum Beseitigen der Schwingung in einem Lichtmikroskop besteht in der Verwendung eines Röhrendesigns für den Rahmen des Mikroskops **10**, wobei die Röhre den Objektisch **6** des Mikroskops **10** in sehr ähnlicher Weise wie das Design von Probenkammern und Säulen konventioneller Raster- und Transmissionselektronenmikroskope umschließt. Ein solches Röhrendesign kann praktisch die Z-Achsen-Schwingungen des Objektivs **40** in bezug zur Probe **74** beseitigen. Während das Röhrendesign Zugang zu dem Probenbereich streng begrenzt, ist der Anstieg in Schwingungsleistung beträchtlich und kann durchaus in Fällen die Unbequemlichkeit wert sein, in denen die bestmögliche Auflösung erwünscht ist.

[0042] Das Objektiv **40** des Mikroskops **10** kann als ein Objektiv feststehender Brennweite ausgelegt werden, um ein vollständig korrigiertes Bild an einer ersten Bildebene des Objektivs **40** zu erzeugen. Außerdem ist das Objektiv **40** vorzugsweise derart ausgelegt, dass jegliches Streulicht von der Probe **74**, das nicht einen scharfen Teil des Endbilds bilden soll, durch Blenden, Irisblenden oder geometrische Lichteinfangmittel gedämpft wird. Wie hier verwendet, sollen die Ausdrücke "geometrisches Lichteinfangen" und "mit geometrischer Oberfläche" eine jegliche Oberfläche mit niedrigem Reflexionsvermögen in den Wellenlängenbereichen von Interesse darstellen und die Oberflächen aufweisen, die geometrisch angeordnet sind, um eine auf sie auftreffende Lichtmenge, wie klein sie auch sein mag, in Richtung auf andere geometrische Lichteinfangflächen oder "sichere" Bereiche zu lenken, wo das Licht nicht den Betrieb oder die Kontrastausbildung des optischen Geräts verschlechtern wird. Daher wird das meiste oder alles des eingefangenen oder gedämpften Lichts während Reflexionen von aufeinanderfolgenden Oberflächen der geometrischen Oberfläche absorbiert. In einigen Fällen sind nur ein oder wenige Sprünge erforderlich, um das Licht ausreichend zu dämpfen, während in anderen Fällen eine große Anzahl von Sprüngen erforderlich ist, um den gewünschten Dämpfungsgrad zu erhalten. Diese geometrischen Oberflächen sind in der Theorie ähnlich den absorbierenden Oberflächen einer akustischen echofreien Kammer oder der

Antiradaroberflächen eines schwer erkennbaren Flugzeugs.

[0043] Die Verwendung einer Apertur **90** oder einer einstellbaren Irisblende (nicht gezeigt) an der gleichen Stelle ist erwünscht, um den Beleuchtungsstrahl genau an die numerische Apertur des Objektivs **40** zur Sicherstellung anzupassen, dass das bestmögliche Dunkelfeldbild erhalten wird.

[0044] Es ist momentan bevorzugt, eine einstellbare anstelle einer feststehenden Irisblende im Mikroskopobjektiv **40** zu verwenden, da die Öffnung einer solchen einstellbaren Irisblende auf ihre vollständige NA in einem Hochleistungsobjektiv mit einem NA größer als 1,25, bei Verwendung mit einem Dunkelfeldkondensator mit einem inneren Kegel einer NA von 1,25, dem Objektiv **40** erlauben soll, bei einer größeren Apertur als dem inneren Beleuchtungskegel des Kondensators **38** zu arbeiten. In diesem Aufbau kann das Mikroskop **10** in einer ungewöhnlichen Hellfeldbetriebsart verwendet werden, die die Oberflächentopographie der Probe **74** hervorhebt, während im wesentlichen ein hoher Kontrast und eine hohe Auflösung des erhaltenen Bilds aufrechterhalten wird. Bei Invertierung scheint dieses Bild einem konventionellen SEM-Bild auf einer Oberfläche zu ähneln. Ferner kann eine geringfügige Verbesserung der Auflösungsstärke des Objektivs **40** aufgrund der Vergrößerung in der numerischen Apertur erhalten werden. Diese Hellfeldbetriebsart kann eine neue Bilderschei-nung liefern, um Bildinformationen zu liefern, die vorhergehend nicht erhältlich waren.

[0045] Wenn das Objektiv **40** ein für unendlich korrigiertes Objektiv ist, dann wird eine geeignete passende Röhrenlinse (nicht gezeigt) verwendet, um das Unendlichlicht zu Licht fester Brennweite zu konvertieren. Es ist vorteilhaft, eine Röhrenlinse mit einer kürzestmöglichen Brennweite zu verwenden, um die Länge einer Kopplungsröhre zwischen der Röhrenlinse und dem Abbildungsmittel auf einem Minimum zu halten. Diese kurze Kopplerlänge hilft bei der Reduzierung von Gewicht und Schwingung des Abbildungsmittels in bezug zu dem Objekt und/oder der Röhrenlinse.

[0046] Normalerweise erzeugt das Objektiv **40** oder die Röhrenlinse in einem für unendlich korrigierten System ein primäres Bild mit einem Kreisdurchmesser von ungefähr 20 bis 25 mm. Da das IDC-Mikroskop ein Abbildungsmittel allgemein in der ersten Bildebene des Objektivs oder der Röhrenlinse aufweist, ist es oft der Fall, dass das Abbildungsmittel eine aktive Fläche von nur 8 bis 12 mm auf einer Seite in einem quadratischen oder rechteckigen Format aufweist. In diesem Fall muss der das Bild tragende Strahlengang mit geometrischen Lichtblendenflächen abgeblendet oder gedämpft werden, um das Licht außerhalb der aktiven Bildfläche zu beseitigen, so dass das außerhalb der aktiven-Bildfläche fallende Bild kein Streulicht in dem System wird.

[0047] Wenn eine Fluoreszenzfähigkeit für das Mikroskop **10** vorgesehen ist und ein für unendlich kor-

rigiertes Objektiv **40** und eine passende Röhrenlinse in dem Mikroskop **10** verwendet werden, können ein Emissionsfilter (nicht gezeigt) oder Filter (wie zum Beispiel ein konventioneller Filterwürfelsatz mit Emissions-, Erregungs- und Strahlteilelementen wie sie gewöhnlich in Reflexionslichtmikroskopen verwendet werden und die hier auch mit einem Standardsystem aus Lichtquelle und Optik für Reflexionsfluoreszenz-Lichtmikroskopie verwendet werden können) zwischen dem Objektiv **40** und der Röhrenlinse in dem Unendlichraum vorgesehen werden. Wenn ein Objektiv **40** mit fester Brennweite verwendet wird, dann kann/können der Emissionsfilter oder die Emissionsfilter für Fluoreszenzmikroskopie im Kopf **82** des Mikroskops **10** eingeschlossen werden.

[0048] Wenn dieser Emissionsfilter (oder die Filter) mit Objektiven fester Brennweite verwendet werden, ist es bevorzugt, den Emissionsfilter auf das dünnmöglichste Filtersubstrat zu schichten, so dass die Abweichungen des Bilds aufgrund des Brechungsindex der Filterbeschichtungen und des Substrats so klein wie möglich sein werden. Der oder die Filter können sich auf einem Objektträger befinden oder können auf einer Revolverkopf- oder Filteranordnung sein, wie den Fachleuten in diesem Gebiet klar sein wird. Wenn diese Filter zum Erzeugen künstlicher Farbe verwendet werden, bei Verwendung einer monochromen Digitalkamera, oder wenn sie für Mehrfluoreszenztechniken verwendet werden oder wenn numerisch verarbeitete computergesteuerte Pseudofarbbildung verwendet wird, dann können der Filterrevolverkopf oder das Rad digital gesteuert und elektrisch angetrieben sein.

[0049] Es kann erwartet werden, dass ein Objektiv fester Brennweite ein helleres (photonwirksameres) und ein stärker korrigiertes Bild in der ersten Bildebene als bei einem auf unendlich korrigierten System aufgrund der kleineren Anzahl von Oberflächen und Komponenten in bezug zu einem auf unendlich fokussierten Objektiv erzeugt. Wenn Objektive mit fester Brennweite verwendet werden, kann es erwünscht sein, die Objektive mit einem viel kürzeren Brennpunkt Abstand von der Linsenrückseite auszuliegen, um die Gesamthöhe des Mikroskops wesentlich zu reduzieren, wie oben für auf unendlich korrigierte Röhrenlinsen zu Abbildungsmittelkopplung beschrieben wurde.

[0050] Das Mikroskop **10** kann ein einzelnes Objektiv **40** einschließen oder kann zwei oder mehr Objektive **40** einschließen, die wie gewünscht zum Gebrauch ausgewählt werden können. In diesem letzteren Fall können die Objektive **40** an einem jeglichen geeigneten Halterungsmittel angebracht sein, wie zum Beispiel dem in vielen Mikroskopdesigns verwendeten konventionellen Objektivwechselrevolver.

[0051] Das das Objektiv **40** verlassende Licht geht durch eine erste Apertur **94** hindurch und dann, wenn es den Kopf **82** des Mikroskops **10** verlässt, durch eine sorgfältig gesteuerte zweite Apertur **96**, die jegliche Lichtstrahlen blockiert, die nicht in dem ge-

wünschten Bildausbildungsstrahl enthalten sind. Die Wände des Kopfs **82** und einer Kopplungseinrichtung **98** haben einen relativ großen Innendurchmesser, um weiter das Streulicht zu reduzieren und Bildkontrast zu verbessern. Die Innenflächen des Kopfes **82** und der Kopplungseinrichtung **98** können auch mit geometrischen Oberflächen hergestellt werden, zum Steuern von und zum wesentlichen Verhindern, dass Lichtreflexionen das Abbildungsmittel erreichen, wie im folgenden erörtert ist.

[0052] Die Innenflächen des Objektivs **40**, des Kopfes **82** und der Kopplungseinrichtung **98** werden vorzugsweise mit einer flachen schwarzen oder anderen geeigneten Beschichtung überzogen, um den niedrigstmöglichen Reflexionsquotienten für Licht der Wellenlängen zu erhalten, die zum Bilden des Endbilds verwendet werden. Allgemein werden dieses flache schwarze oder eloxierte schwarze Überzüge sein.

[0053] Bevor das die Bildinformationen enthaltende Licht das Abbildungsmittel erreicht, geht es durch eine andere Apertur oder Blende **102** hindurch, die geformt ist, um Streulicht weiter zu begrenzen. Diese Apertur kann eine quadratisch oder anders geformte Apertur sein, um zur Geometrie des Abbildungsmittels zu passen.

[0054] Für die vorliegende Erfindung ist es zum Verwenden von Objektiven neuester Herstellung erwünscht, den Objektiven Streulichtsteuermittel hinzuzufügen. Diese Streulichtsteuermittel umfassen Nachbearbeiten der Kanten der Linse zu einer Feinlinienoberfläche (für plankonvexe und doppelkonvexe Linsenelemente), Schwärzen der äußeren Umfangsoberflächen der Linsen und/oder Nachbearbeiten der Umfangsflächen auf geometrische Konfigurationen zum Steuern des Streulichtabpralls, Hinzufügen von Aperturen oder Blenden, Vorsehen von Oberflächen ultraniedriger Reflexion oder geometrisch bearbeiteten Oberflächen auf Innendurchmessern von Linsenhalterungen und Hülsen, und sorgfältiges Steuern der Antireflexionsbeschichtungen zum Verhindern, dass Streulicht in Richtung auf das Abbildungsmittel wandert.

[0055] Objektive zum Gebrauch in IDC-Mikroskopen in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung sollten auch streng geprüft werden, zur Bestimmung, wie dicht sie ihre theoretischen Grenzen für ein Objektiv ihres Designs und für die physikalische Grenze entsprechend der Physik für ein solches Objektivdesign erreichen. Komponenten des Objektivs sollten dann angepasst werden, um die höchstmögliche Übereinstimmung mit theoretischen Leistungsmöglichkeiten zu erreichen. Die Verwendung eines geeigneten Testobjektträgers, wie zum Beispiel dem, der unter dem Namen "Richardson Test Slide" durch Bio-Microtech. Inc., P. O. Box 23, Bolton, Ontario, L7E 5T1 verkauft, und in Richardson T. (1998), Test Slides: Diatoms to Divisions- What are you looking at? [Testobjektträger: Diatome bis Division – Was betrachten Sie?] beschrieben ist, ist sehr nützlich beim



Bestätigen der Leistung jedes Aspekts des IDC-Systems einschließlich der Beleuchtungs-, Objektiv- und Abbildungskomponenten und aller der Verbindungskomponenten in oder angrenzend an den Strahlengang.

[0056] Traditionelle Okulare, egal ob Teil eines monokularen, binokularen oder trinokularen Designs, sind in diesem Design beseitigt worden, um die Photoneffizienz des Systems zu verbessern und die Notwendigkeit zu entfernen, die Optik in dem Okularsystem auf die gleichen hohen Standards wie das übrige optische System zu korrigieren. Entfernung des Okularsystems reduziert weiter die Materialkosten, liefert ein leichteres, kompakteres Design und bietet der Bedienungsperson eine benutzerfreundlichere Schnittstelle mit weniger Ermüdungserscheinungen und praktisch unendlicher ergonomischer Flexibilität, da das Endbild auf einem Video- oder Digitalmonitor betrachtet wird, der praktisch überall positioniert werden kann, um zu der Ergonomie der Situation zu passen.

[0057] In der in **Fig. 1** gezeigten Ausführungsform ist das Abbildungsmittel **106** eine CCD-Kamera mit drei Detektoren wie zum Beispiel ein Model GU-US532, das durch Panasonic hergestellt wird, mit einem internen Prisma **110** und drei ladungsgekoppelten Arraydetektoren **114**, **118** und **122**, das an der primären Bildebene des Objektivs (oder der Objektiv-Röhrenlinsen-Kombination im Fall von für unendlich korrigierten Systemen) vorgesehen wird. Das Vorsehen des Abbildungsmittels **106** in der ersten Fokalebene des Objektivs wird derzeit als vorteilhaft angesehen, da es die Bildhelligkeit verbessert, da ansonsten das Vorliegen jeglicher störender Optik Lichtverluste einführen würde, und da es die höchstmögliche Bildauflösung und den höchstmöglichen Kontrast aufrecht erhält, der ansonsten durch jegliche andere störende Optik verschlechtert werden würde.

[0058] Eine Videokamera mit Fernsehroundfunkqualität mit geringem Licht, wie zum Beispiel ein Modell WV-E590 hergestellt durch Panasonic, kann auch als das Abbildungsmittel verwendet werden. Dieser Kamertyp ist besonders für Arbeit bei geringem Licht geeignet, wo Photonbeschädigung der Probe auf einem Minimum gehalten werden muss. Er ist weiter für Fluoreszenzarbeit geeignet, wo das Bild geringe Lichtstärken aufweist und wo Erregungsenergie auf einem Minimum gehalten werden muss, um Photonbeschädigung und Entfärben der Probe und der Fluorophore zu reduzieren.

[0059] Das durch die Abbildungsmittel **106** erfasste elektronische Bild wird einer Steuereinheit **128** zugeführt, die automatische Verstärkungssteuerungen, Weißabgleichs-, Schwarzabgleichs- und Autoirisblendenfunktionen enthalten kann, die alle durch die Bedienungsperson des Systems für maximale Abbildungssteuerung und Flexibilität gesteuert oder begrenzt werden können.

[0060] Ein besonderer Vorteil dieses Systems ist die

Verwendung einer Videokamera mit der Fähigkeit, Halbbilder von Bildern gegenüber Vollbildern anzuzeigen. Wenn nur die ungeraden oder geraden Halbbilder angezeigt werden und die Verknüpfungsfunktion von den angrenzenden Halbbildern interpoliert wird, dann können wirksame Vollbildgeschwindigkeiten gleich der Halbbildrate erzielt werden. Dies ist wichtig, wenn es erwünscht ist, Bewegung sehr hoher Geschwindigkeit mit einem Minimum von Bewegung während der Bilderfassungszeit zu untersuchen. Es ist weiter nützlich, um elektronisches Verschießen zum Begrenzen der Bewegung während einer Halbbilddauer zu verwenden.

[0061] Das elektronische Signal von dem Abbildungsmittel **106** und der Steuereinheit **128** wird dann einem Bildinvertierungsmittel **132** zugeführt, das es elektrisch konvertiert, um ein Negativbild entweder mit Luminanz, Chrominanz oder Luminanz und Chrominanz des diesem von der Steuereinheit **128** zugeführten Bilds zu erhalten. Ein triviales Beispiel der Funktion des Bildinvertierungssystems **132** würde sein, dass ein Bild eines schwarzen Punkts auf einem weißen Hintergrund zu einem weißen Punkt auf einem schwarzen Hintergrund konvertiert wird, wenn sowohl Luminanz als auch Chrominanz invertiert werden. Sowohl die Steuereinheit **128** als auch das Bildinvertierungssystem **132** können als interne oder integrale Komponenten der Abbildungsmittel **106** eingeschlossen werden.

[0062] Alternativ kann interne oder schaltbare Programmierung der Steuereinheit **128** zum Erzielen von Bildinvertierung verwendet werden. Dies ist besonders nützlich, wenn erwünscht ist, dass das Mikroskop jederzeit in der invertierten Betriebsart arbeitet, wobei eine oder beide der Luminanz- oder Chrominanzinformationen invertiert werden.

[0063] Abhängig davon, wie die Chrominanzinformation durch das Bildinvertierungssystem **132** zu verarbeiten ist, kann dann die resultierende Farbe in dem Endbild, das das Bildinvertierungssystem **132** verlässt, entweder ein farbkorrektes Bild oder ein farbnegatives Bild des dem System **128** gelieferten Bilds darstellen. Weiter kann es abhängig davon, welcher Typ von Bildern von der Probe **74** erhalten wird, erwünscht sein, das Bild ohne Durchführung der invertierenden Konversion zu betrachten. Dementsprechend kann das Bildinvertierungssystem **132** sowohl das invertierte Bild als auch das nichtinvertierte Bild weiterleiten. Auf diese Weise liefert das Bildinvertierungssystem **132** so viele wie vier Arten von Ausgabebildern. Die erste Art ist das normale positive Bild, die zweite Art ist das negative Bild mit Farbe in dem Negativ (wenn Luminanz und Chrominanz invertiert sind), die dritte Art ist, wenn Farbe nicht in dem Negativ enthalten ist, aber die Helligkeit negativ ist (wenn nur Luminanz invertiert ist, was besonders nützlich sein kann, wenn das System zum Betrachten von Proben mit Verfärbungen verwendet wird, wie zum Beispiel Vitalfärbungen, oder bekannter Farbe) und die vierte Art ist, wenn Farbe negativ ist, Hellig-

keit jedoch nicht negativ ist (was für Untersuchung von Farbunterschieden verwendbar ist, die bei Invertierung derselben hervorgehoben werden, aufgrund der Charakteristiken des menschlichen Auges oder der Kamera oder des Videomonitors).

[0064] In der Ausführungsform von **Fig. 1** macht das Bildinvertierungssystem **132** nichts, um die Auflösung oder den Kontrast des Bilds zu ändern. Die Auflösung und die Kontrastinformation wird lediglich von den verwendeten optischen Verfahren abgeleitet, die Dunkelfeldbeleuchtung, optimale Korrektur der Optik zum Liefern hervorragender Bildqualität und Photoneffizienz, Schwingungssteuerung und Dämpfung, und sorgfältige Beachtung von Photonenetats, um im wesentlichen alle die die Lichtquelle **14** verlassenden Photonen zu berücksichtigen, zur Sicherstellung, dass sie zu dem scharfen Endbild beitragen. Steuerung von Streulicht im Mikroskop **10** ist ein wichtiger Faktor beim Schalten des Endbilds mit hohem Kontrast.

[0065] Das menschliche Sehsystem ist viel besser für Verarbeitung von Information ausgelegt und an diese gewöhnt, wenn Bildinformationen als Schwarz oder Farbe auf einem im wesentlichen weißen Hintergrund dargeboten werden, so wie Text normalerweise auf Papier angezeigt wird. Das Dunkelfeldbild ist dem normalen Betrachter visuell nicht vertraut und daher hat das Gehirn Schwierigkeiten, die meisten Informationen aus dem Bild zu extrahieren. Ein gutes Beispiel ist die Schwierigkeit, die wir beim Versuch haben, Bildinformationen beim Betrachten eines photographischen Negativs entweder einer Farb- oder Schwarz- und Weißszene zu interpretieren oder zu verstehen. Wenn wir ein positives Bild des selben Negativs betrachten, können wir einfach die Informationen "korrekt" interpretieren, obwohl sowohl das positive als auch das negative Bild die gleichen Informationen enthalten und das eine nur die Luminanz- und Chrominanzumkehrung des anderen darstellt. Es ist festgestellt worden, dass das von dem IDC-System erzeugte Bild allgemein nicht durch digitale Bildverarbeitungstechniken verbessert werden muss, da es in dem Bereich von Informationen angeordnet zu sein scheint, der am besten durch das menschliche Gehirn interpretiert wird. Die einzigen Anpassungen, die sich oft als hilfreich herausgestellt haben, sind Anpassungen des Schwarz- und Weißpegelversatzes auf dem analogen oder digitalen Steuersystem, um mehr Informationen über schwache Merkmale zu liefern.

[0066] In normalem Gebrauch wird die Beleuchtungssteuerung, die lineare Anpassung des Lichtpegels von null bis zum Maximum der Fähigkeit der Lichtquelle **14** liefert, in Verbindung mit den elektronischen Verstärkungssteuerungen der Abbildungsmittel **106** verwendet, um das beste Bild für die gewünschten Informationen zu liefern. Um die feinen Details in einer Probe zu untersuchen, werden hohe Beleuchtungspegel verwendet, und niedrige elektronische Verstärkung wird verwendet, so dass elektro-

nisches Rauschen minimiert und Feinauflösung maximiert wird. Für langfristige Untersuchungen bei niedrigerer Auflösung wird der Lichtpegel auf dem niedrigstmöglichen Pegel gehalten, und die elektronische Verstärkung wird auf die höchstmögliche Einstellung umgeschaltet, so dass ein verwendbares Bild aus der Sichtweise der Probe betrachtet bei einem niedrigen Lichtpegel geliefert wird. Für hochempfindliche Detektion kleiner Partikeln, von Hintergrundorganismen oder Strukturen werden sowohl der Lichtpegel als auch die Verstärkung auf ihr Maximum gesetzt, was starken Kontrast in feinen Strukturen und hohe optische Verstärkung erzeugt, so dass diese kleinen Strukturen eine Erscheinung mit hohem Kontrast und eine elektronisch stark rauschende und daher einfach unterscheidbare Erscheinung annehmen.

[0067] Alternativ kann das Bildinvertierungssystem **132** in einem computergestützten Bildverarbeitungssystem (nicht gezeigt) realisiert werden, wobei das Abbildungsmittel eine Analogkamera ist und der Computer eine Bildeinfangkarte zum Konvertieren des analogen Bilds in ein digitales Bild enthält, oder wo das Abbildungsmittel eine Digitalkamera darstellt und der Computer die digitalen Daten direkt verarbeitet. Der Vorteil der Verwendung des computergestützten Bildverarbeitungssystems dieses Typs von Mikroskopie besteht darin, dass Farbe auf dem erfassten Bild in einer definierten Weise abgebildet werden kann, um am besten zur Anwendung zu passen. Kontrasterweiterungs- und Pseudofarbtechniken zusammen mit anderen bekannten Bildverarbeitungstechniken wie zum Beispiel Kantenvergrößerung, können nützlich zum Extrahieren weiterer Informationen aus den erhaltenen Bildern sein.

[0068] Das erfasste und verarbeitete Endbild wird der Bedienungsperson auf einem Monitor **136** angezeigt, der ein Analogmonitor oder ein Computermonitor sein kann. Es kann erwünscht sein, Schalter wie zum Beispiel **140** und **144** zum Auswählen des betrachteten Videomodus vorzusehen. In der Ausführungsform von **Fig. 1** wählt ein Schalter **140** das positive Videobild aus, das über einen Anschluss **148** geliefert wird, und der Schalter **144** wählt das negative Videobild über den Anschluss **152** aus.

[0069] Das Endbild kann unter Verwendung von analogen Mitteln wie zum Beispiel auf Videoband oder digital als digitale Video- oder digitale Bilddateien entweder als Einzelvideobild (wie zum Beispiel TIFF- oder JPEG-Dateien) oder Bewegungsvideobild (wie zum Beispiel MPEG-, MPEG2- oder AVI-Dateien) aufgezeichnet werden. Aktuelle IDC-Systeme verwenden Recorder mit S-VHS-Format, oder professionelle RGB-Videorecorder. Es ist geplant, dass DVD oder ein RAID-Array oder ähnliche digitale Aufzeichnungsstrategien als die Aufzeichnungsmittel angeboten werden, wie diese im Handel erhältlich und kostenwirksamer werden. Zeitraffer-Videorecorder vom "Casino-" Typ werden auch seit kurzem mit dem IDC verwendet, um Untersuchungen von Pro-

ben über lange Zeitspannen von Stunden bis zu Tagen zu ermöglichen.

[0070] Wie in **Fig. 2** gezeigt ist, erfolgt digitales Einfangen von dem Abbildungsmittel **106**, dessen S-Videosignal **300** dem Bildinvertierungssystem **132** zugeführt wird, welches Luminanzinverter **301** und Chrominanzinverter **302** und einen Luminanzinvertierungs-/Nichtinvertierungsschalter **303** und Chrominanzinvertierungs-/Nichtinvertierungsschalter **304** enthält. Das Signal von dem Bildinvertierungssystem **132** wird einem S-Videorecorder **305** zugeführt und das Signal wird zu einem Zeitrafferrecorder **306**, Monitor **136** und einem in den Computer **307** eingebauten Bildeinfangsystem durchgeführt. Die momentan mit IDC-Systemen gelieferten Bildeinfangsysteme enthalten IOMEGA Buzz-Bildeinfangsysteme oder ein MATROX Genesis – Bildeinfangsystem in Verbindung mit einem geeigneten PC-Computersystem. Das Buzz bietet ein kostengünstiges Verfahren für universales Einfangen von Bildern. Das Genesis ist ein Bildeinfangsystem professioneller Qualität, das Sammlung von mehr Details ermöglicht.

[0071] Dieses Verfahren von Mikroskopie kann mit Hochleistungsobjektiven hoher numerischer Apertur oder mit Objektiven niedriger Leistung verwendet werden. Der Hauptbegrenzungsfaktor ist die numerische Apertur des Objektivs, so dass die Objektivapertur kleiner als der innere Beleuchtungskegel des Beleuchtungssystems ist. Dies gestaltet Mikroskope in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung ideal zum Untersuchen von Zellen, wie zum Beispiel Biopsie beim Menschen oder Pflanzenzellen, zuerst bei kleinen Vergrößerungen und dann späterer Umschaltung auf höhere Vergrößerungen für detaillierte Analyse.

[0072] Wie den Fachleuten in diesem Gebiet klar sein wird, ist es möglich, auf Elektrochemie, Elektrolumineszenz, Fluoreszenz, Flüssigkristall oder Bildverstärker basierende Schemata zu verwenden, um die Konversion von positiv zu negativ in diesem Verfahren zu liefern. Wenn solche Mittel verwendet werden, dann können konventionelle Binokulare oder Trinokulare verwendet werden, um das Bild des Objekts zu betrachten, aber ein gewisser Teil des Kontrastes und der Auflösung wird verloren gehen.

[0073] Es ist weiter erwogen, dass ultrafeine Fokussierung des Mikroskops durch gesteuerte Verzerrung der Schwingungssteuerabstützungen **78** des Mikroskops **10** erreicht werden kann. Wenn zum Beispiel ein Hydraulikzylinder (nicht gezeigt) verwendet wird, um die Abstützungen **78** aneinander zu koppeln, dann wird das Hinzufügen von Fluid zu dem Hydraulikzylinder die Abstützungen **78** auseinander drücken und das Objektiv **40** sehr gering in Richtung auf die Probe **74** ablenken, wodurch eine sehr feine Fokussierung geliefert wird. Wenn eine sehr feine Schraube (nicht gezeigt) verwendet wird, um einen Kolben (nicht gezeigt) mit sehr kleiner Bohrung in einen Zylinder (nicht gezeigt) zu treiben, der mit Hydrauliköl gefüllt ist und das resultierende Drucköl dem

die Abstützungen **78** verbindenden Hydraulikzylinder zugeführt wird, dann kann ein sehr ultrafeiner Fokus realisiert werden. Eine solche Einstellschraube kann unter Computer- oder externer elektrischer Steuerung sein. Der gleiche Funktionstyp kann mit einem Schraubenmechanismus entweder in Spannung oder Kompression zwischen den Abstützungen **78** erreicht werden, so dass Anpassung des Schraubenmechanismus den feinen Fokus erzielt.

[0074] Es ist ferner erwogen, dass der Mikroskop **10** eine oder mehrere piezoelektrische Stäben **78** (nicht gezeigt) zwischen den Abstützungen **78** verwenden kann, um die ultrafeine Fokussierung des Mikroskops zu erreichen. Variationen der Spannung der piezoelektrischen Stäben werden den Fokus des Mikroskops leicht verschieben. Alternativ können die Stäben in zwei Einheiten hergestellt werden und können eine piezoelektrische Schicht sandwichartig eingefügt zwischen den oberen und unteren Hälften der Abstützungen einschließen, so dass das piezoelektrische Element seine Dicke variieren und hierdurch die Länge der Abstützungen ändern kann.

[0075] **Fig. 3** zeigt eine solche Konfiguration von zwei Abstützungen, die piezoelektrische Elemente für aktive Z-Positionssteuerung einschließen. Der obere Teil des Körpers des Mikroskops **82** wird mit den oberen Hälften jeder Abstützung **202** verbunden. Die untere Oberfläche der Abstützung **202** wird an eine isolierende und leitfähige obere Elektrode **203** geklebt, die den Anschluss des Piezoelements an eine Spannungsquelle ermöglicht. Die Elektrode **203** ist an das piezoelektrische Element **204** angeschlossen, das an die untere Elektrode **205** geklebt ist. Die Elektrode **205** wird an die untere Hälfte der Abstützung **201** geklebt. Eine zwischen den Elektroden **203** und **205** angelegte Spannung verursacht eine Änderung in der Abmessung des Piezoelements **204** und bewegt das Abbildungsmittel und verknüpfte Optik in bezug zu dem Probenobjekt **74**. Eine weitere Anwendung dieses piezoelektrischen Systems besteht in der Bewegung der Mikroskop-Z-Einstellung synchron mit einer schwingenden Probe **74**, um Bilder von Proben zu erhalten, die feststehende Frequenzschwingungen durchmachen oder zeigen, welche offenbar die Bewegung der Probe angehalten haben, zumindest in der Z-Ebene. Alternativ kann eine dreiaxige Piezohalterung verwendet werden, um das Objektiv an dem Mikroskopkörper zu befestigen. Durch Antreiben dieser Halterung in synchronisierten dreidimensionalen Mustern kann es möglich sein, die Bewegung eines Probenobjekts in schneller Oszillation durch Anpassen der Bewegung des Objektivs an die Bewegung des Objekts einzufrieren.

[0076] Es ist möglich, dass Reflexionen von der Oberfläche der CCD-Kamera oder einem anderen Abbildungsmittel in dem Raum zwischen der CCD-Kamera und der Rücklinse des Objektivs **40** oder der Röhrenlinse hin- und herspringen können. Es ist geplant, dass ein Vorteil durch Einführen eines Photonenventils erhalten werden kann, wie zum Bei-

spiel eines Einwegespiegels (nicht gezeigt), um von dem Abbildungsmittel zu der Objektivlinse zurückkehrendes Licht zu beseitigen und dadurch eine mögliche Quelle von Streulicht zu beseitigen und den Kontrast zu verbessern.

[0077] Die Gesamtgröße des Mikroskops **10** kann wesentlich durch Einbau der Lichtquelle **14** in das interne Gehäuse des Kondensors **38** reduziert werden. Ein solches Verfahren wurde durch Zeiss in dem Dunkelfeld-Kondensator von 1930 vorgeschlagen. Wenn ein Hellfeld- und Dunkelfeldkombinationskondensator wie zum Beispiel der oben beschriebene koaxiale von Barnard verwendet wird, dann kann die Größe sehr klein gehalten werden, während sowohl Hellfeld- als auch IDC-Betriebsarten aufrechterhalten werden.

[0078] Um ein extrem robustes und kompaktes IDC-Mikroskop niedriger Leistung für Feldgebrauch in rauen Umgebungen zu schaffen, können eine oder mehrere lichtemittierende Dioden (nicht gezeigt) als die Lichtquelle verwendet werden, und ein konischer Kondensator vom Prisma-Typ kann verwendet werden, um diesen Beleuchtungstyp am besten zu nutzen.

[0079] Wo Farbkorrektur ein wichtiger Faktor ist, kann eine Gruppe von lichtemittierenden Dioden verschiedener Wellenlängen mit einem LED-Steuermittel verwendet werden, um die relative Helligkeit von jeder der LED zu variieren. Auf diese Weise kann ein farbangepasstes Beleuchtungssystem erhalten werden. Abhängig davon, wie die LED angeordnet sind, kann die Farbe und die Position und der Stil von Beleuchtung variiert werden, um die Anforderungen der Anwendung zu erfüllen.

[0080] **Fig. 4** zeigt einen Ausschnitt des Innenaufbaus eines Objektivs für ein IDC-Mikroskop. Licht tritt in das Objektiv **40** durch die erste Linse **400** ein, die hier als eine Ölimmersionslinse gezeigt ist, Streulicht oder Licht hoher numerischer Apertur, das, wie durch Verwendung von Photonen-Techniken bestimmt, keinen Teil in dem scharfen Bild bilden soll, fällt auf die untere Oberfläche einer Halterung **408** für die Linse **405** ein. Scharf eingestelltes Licht geht durch die Linse **405** hindurch. Die geometrischen Lichteinfangmerkmale der Halterung **408** sind auf der oberen **416** und unteren **412** Oberfläche der Halterung **408** angeordnet. Das Detail **460** zeigt, dass die Merkmale **412** und **416** nicht symmetrisch sind, sondern stattdessen Oberflächen **444** und **448** auf der unteren Oberfläche aufweisen, die ausgelegt sind, um ankommendes Licht **480** als reflektiertes Licht **470** von der optischen Achse weg und in die geometrische Oberfläche **404** auf der Innenseite der Objektivhalterung oder des Objektivgehäuses zu reflektieren. Wenn die Außenkante einer Linse **405** flach ist, da kann die Außenkante flach schwarz gestrichen werden, um Reflexionen und Streulicht zu reduzieren. Wenn die Kante der Linse es wie bei der doppelten konvexen Linse **424** und der plankonvexen Linse **432** zulässt, wird die Außenkante zu einer feinen Spitze oder einer feinen Oberfläche poliert, so dass interne Reflexionen oder

Diffusionen minimiert werden. Streulicht im oberen Abschnitt des Objektivs wird durch geometrische Lichteinfangflächen **416** auf den Linsenhalterungen **408** gesteuert. Die oberen Linsen werden in der Komponente **412** mit den Linsen **424** und **432** und den geometrischen Lichteinfangflächen **420**, **422**, **428** angebracht. Streulicht wird durch eine Aperturblende **440** und ihre innere geometrische Lichtsteuerfläche **436**, die in Verbindung mit der Oberfläche **347** wirken, am Verlassen des Objektivs gehindert. Reflexionen von der Röhrenlinse oder dem Abbildungsmittel werden weiter durch eine geometrische Lichteinfangfläche **436** gesteuert.

[0081] Die oben beschriebenen Ausführungsformen der Erfindung sollen Beispiele der vorliegenden Erfindung sein und Änderungen und Abwandlungen können daran durch die Fachleute vorgenommen werden, ohne vom Umfang der Erfindung abzuweichen, die lediglich durch die hierzu anliegenden Ansprüche definiert ist.

### Patentansprüche

1. Mikroskopierverfahren, bei dem ein Dunkelfeldbild einer Probe unter Verwendung eines Mikroskops (**10**) erhalten wird, das ein Dunkelfeldbeleuchtungssystem (**38**) hat, gekennzeichnet durch die Schritte:

elektronisch das Dunkelfeldbild zu invertieren (**132**), um entweder ein Bild mit invertierter Luminanz oder ein Bild mit invertierter Chrominanz oder ein Bild mit invertierter Chrominanz und Luminanz zu erhalten; und das invertierte Bild dem Benutzer als ein beobachtbares Bild (**136**) darzubieten.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Dunkelfeldbild vielfarbig ist und sowohl die Luminanz- als auch die Chrominanzkomponente des Dunkelfeldbildes invertiert werden.

3. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch die Schritte, Chrominanz- und Luminanzkomponenten des Dunkelfeldbildes zu erhalten und die Chrominanzkomponente aber nicht die Luminanzkomponente zu invertieren, wodurch ein modifiziertes farbnegatives Bild des Dunkelfeldbildes erhalten wird.

4. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch die Schritte, Chrominanz- und Luminanzkomponenten des Dunkelfeldbildes zu erhalten, die Luminanzkomponente, aber die nicht die Chrominanzkomponente zu invertieren, wodurch ein modifiziertes farbrichtiges Bild des Dunkelfeldbildes erhalten wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, gekennzeichnet durch den Schritt, Farbe vom Dunkelfeldbild in das invertierte Bild in vorbestimmter

Weise abzubilden.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Dunkelfeldbeleuchtungssystem eine Apertur für einen äußeren Beleuchtungskegel hat, die größer ist als 1,33 NA.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, gekennzeichnet durch den Schritt, wenigstens eines der folgenden Lichtbereiche beim Beleuchten der Probe abzuschwächen (34):

- a) rotes Ende des sichtbaren Lichtspektrums;
- b) blaues Ende des sichtbaren Lichtspektrums;
- c) Infrarotlicht;
- d) Ultraviolettlicht;
- e) Licht, das nicht erforderlich ist, Fluorophore anzuregen, die mit der Probe verwendet werden;
- f) Licht, das nicht an die beste optische Wirkungsweise einer Objektivlinse angepaßt ist, die mit dem Mikroskop verwendet wird;
- g) Licht, das nicht den besten sphärischen und chromatischen Aberrationspunkten einer Objektivlinse entspricht, die mit dem Mikroskop verwendet wird.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, gekennzeichnet durch den Schritt, die Probe nur den Verhältnissen von infrarotem zu sichtbarem und von ultraviolettem zu sichtbarem Licht bei den Verhältnissen oder weniger als den Verhältnissen auszusetzen, denen die Probe natürlicherweise ausgesetzt worden wäre.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, gekennzeichnet durch den Schritt, das Mikroskop entlang seiner vertikalen optischen Achse zusätzlich zu der Abstützung abzustützen (78), die durch den C-förmigen Rahmen bewirkt wird.

10. Mikroskop (10), das ein Dunkelfeldbeleuchtungssystem (38) und Abbildungsmittel (106) aufweist, um ein Signal (300) zu liefern, das ein Dunkelfeldbild einer Probe darstellt, gekennzeichnet durch Bildinversionsmittel (132), die mit den Abbildungsmitteln (106) verbunden sind, um elektronisch eine Chrominanzkomponente (302) des Dunkelfeldbildes, aber nicht eine Luminanzkomponente (301) desselben zu invertieren, wodurch ein abgewandeltes farb-negatives Bild des Dunkelfeldbildes für Darbietung zu einem Beobachter zu erhalten.

11. Mikroskop (10), mit einem Dunkelfeldbeleuchtungssystem (38) und Abbildungsmitteln (106) zum Liefern eines Signals (300), das ein Dunkelfeldbild einer Probe darstellt, gekennzeichnet durch Bildinvertierungsmittel (132), die mit den Abbildungsmitteln (106) verbunden sind, um elektronisch eine Luminanzkomponente (301) des Dunkelfeldbildes aber nicht eine Chrominanzkomponente (302) desselben zu invertieren, wodurch ein abgewandeltes farb-richtiges Bild des Dunkelfeldbildes für Darbie-

tung zu einem Beobachter erhalten wird.

12. Mikroskop nach Anspruch 10 oder 11, gekennzeichnet durch Mittel zum Abbilden von Farbe vom Dunkelfeldbild in ein abgewandeltes Bild in definierter Weise.

13. Mikroskop nach einem der Ansprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Dunkelfeldbeleuchtungssystem eine Apertur für einen äußeren Beleuchtungskegel aufweist, die größer ist als 1,33 NA.

14. Mikroskop nach einem der Ansprüche 10 bis 13, gekennzeichnet durch Filtermittel (34) zum Dämpfen wenigstens einer der folgenden Lichtbereiche bei der Beleuchtung der Probe:

- a) rotes Ende des sichtbaren Lichtspektrums;
- b) blaues Ende des sichtbaren Lichtspektrums;
- c) Infrarotlicht;
- d) Ultraviolettlicht;
- e) Licht, das nicht erforderlich ist, Fluorophore anzuregen, die mit der Probe verwendet werden;
- f) Licht, das nicht an die beste optische Wirkungsweise einer Objektivlinse angepaßt ist, die mit dem Mikroskop verwendet wird;
- g) Licht, das nicht den besten sphärischen und chromatischen Aberrationspunkten einer Objektivlinse entspricht, die mit dem Mikroskop verwendet wird.

15. Mikroskop nach einem der Ansprüche 10 bis 14, gekennzeichnet durch Filtermittel (34), um die Probe im wesentlichen nur Verhältnissen von infraroten zu sichtbaren und ultraviolettem zu sichtbarem Licht auszusetzen, die den Verhältnissen entsprechen oder geringer sind als die Verhältnisse, denen die Probe natürlicherweise ausgesetzt worden wäre.

16. Mikroskop nach einem der Ansprüche 10 bis 15, gekennzeichnet durch Stützmittel (78) außerhalb eines C-förmigen Rahmens, um das Mikroskop entlang seiner vertikalen optischen Achse abzustützen.

17. Mikroskop nach einem der Ansprüche 10 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Abbildungsmittel eine monochrome oder Schwarz-weiß-Kamera einschließen, die benutzt wird, um das Dunkelfeldbild zu erhalten.

18. Mikroskop nach Anspruch 17, gekennzeichnet durch Mittel zum Erzeugen eines Farbbildes von dem monochromen oder schwarz-weiß Dunkelfeldbild.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

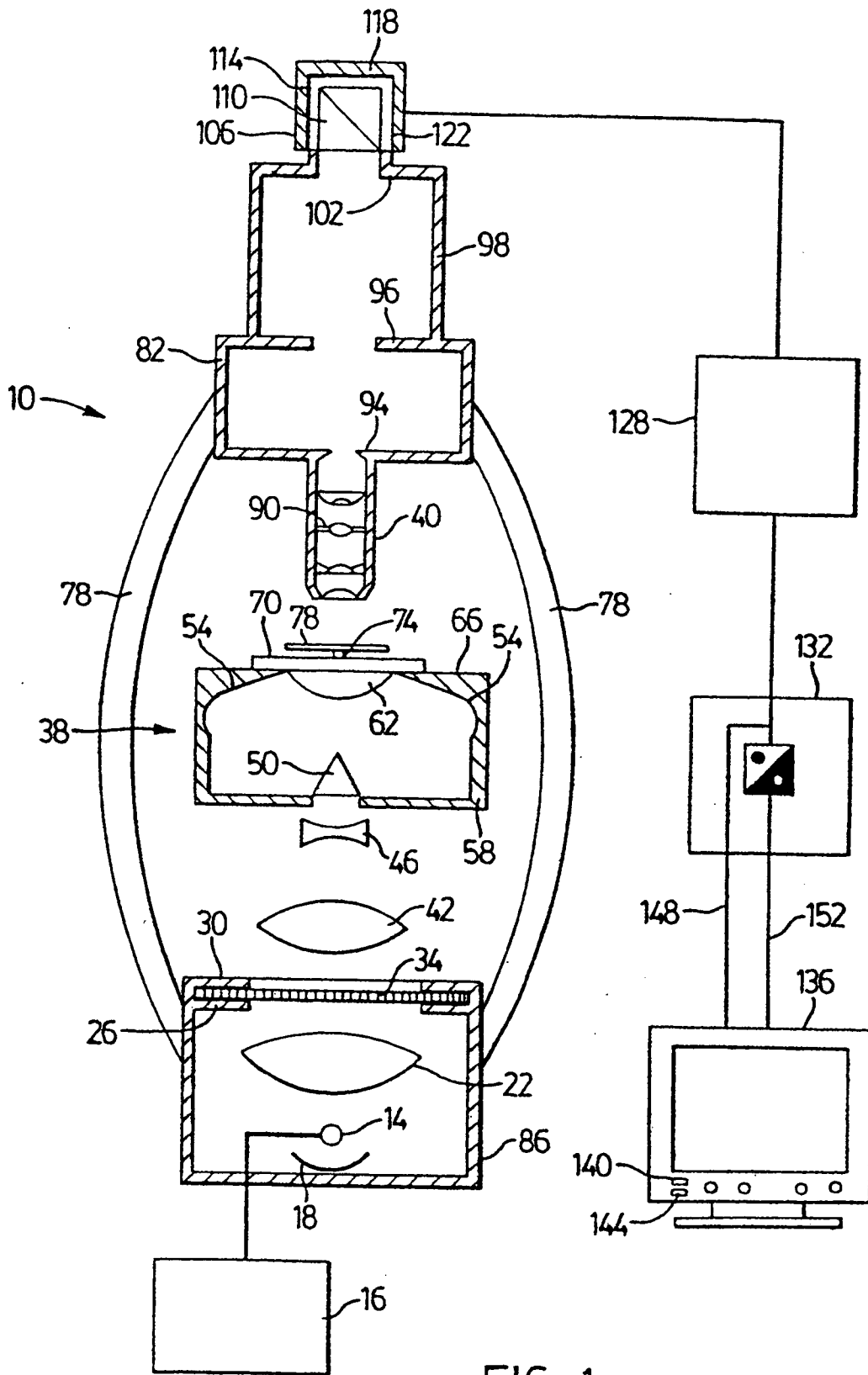
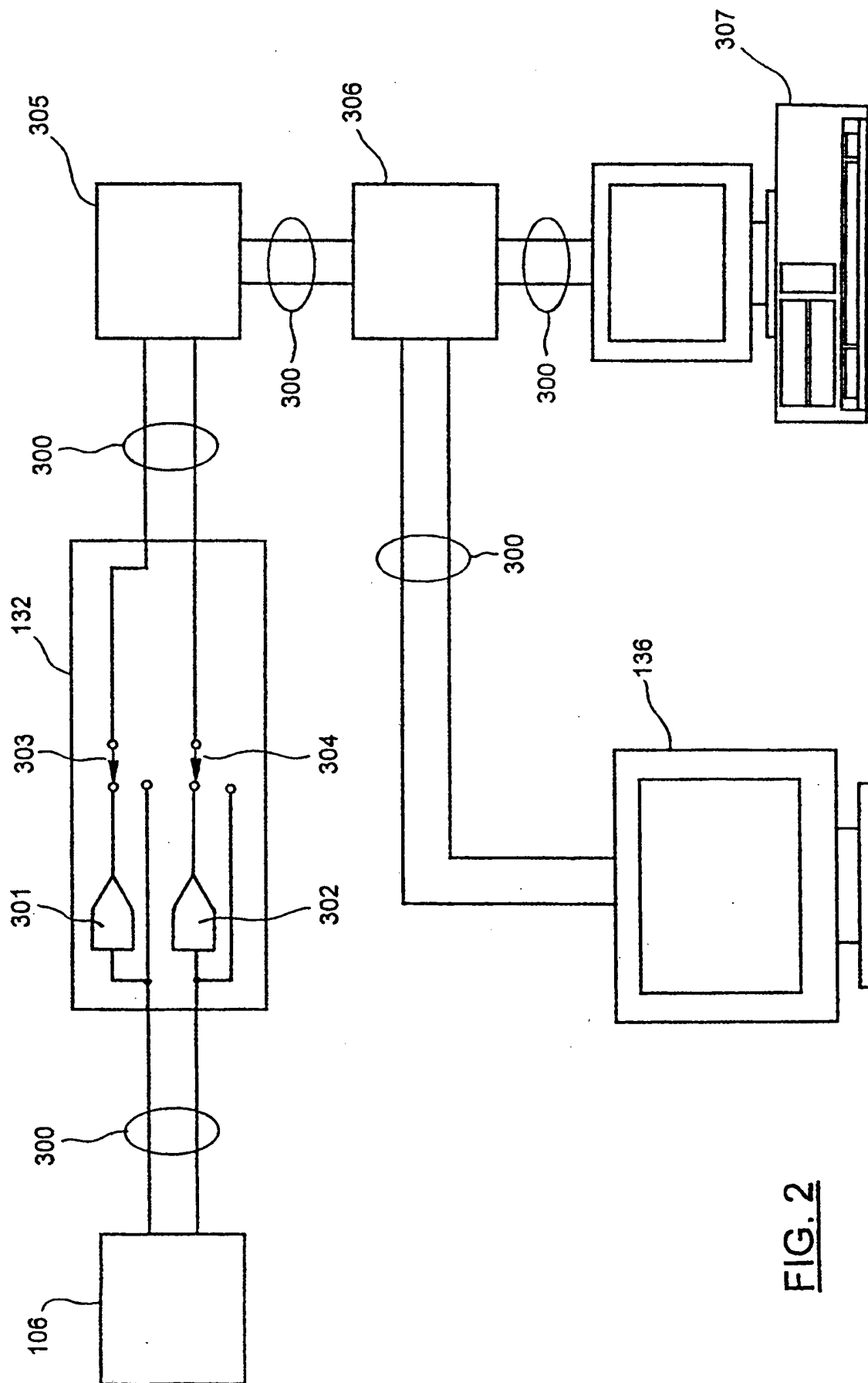


FIG. 1



**FIG. 2**

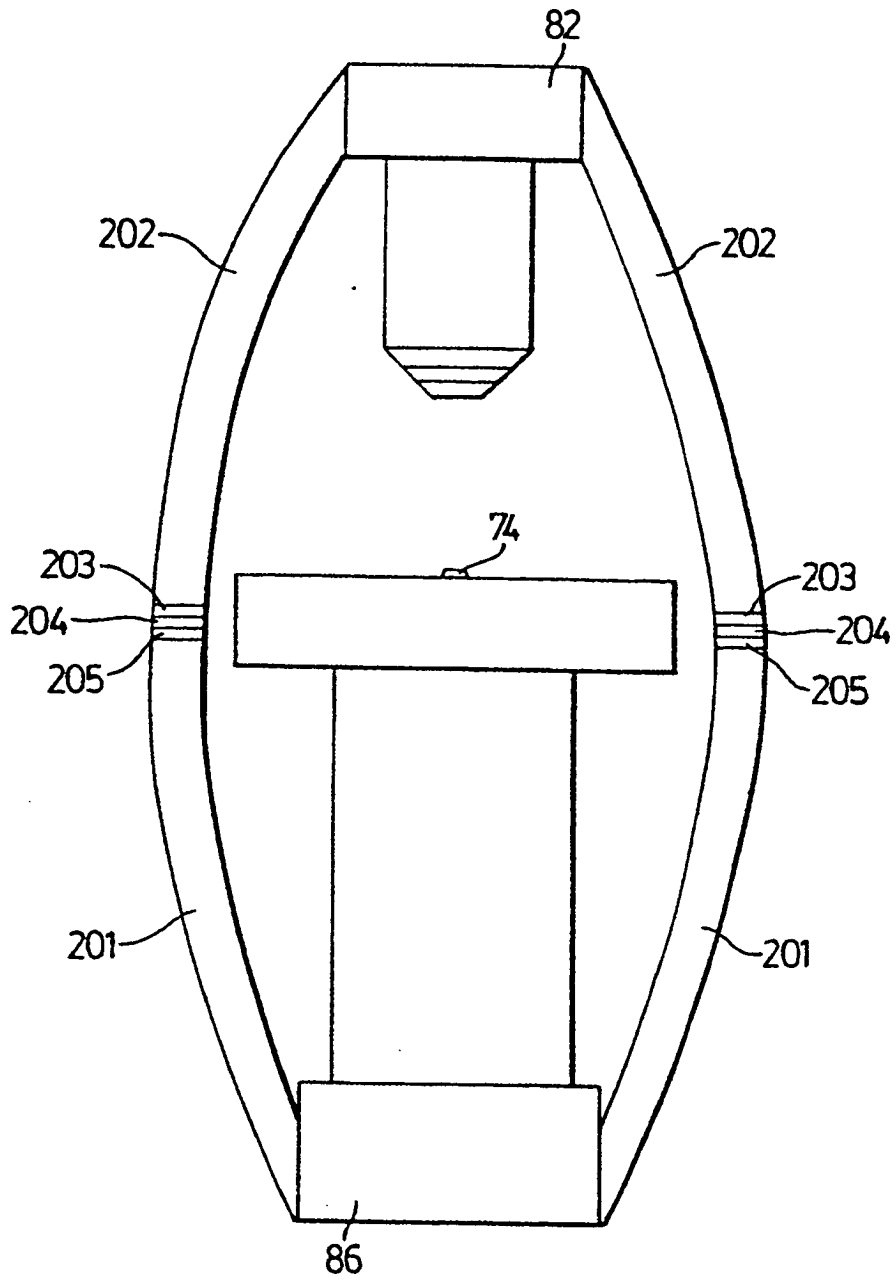
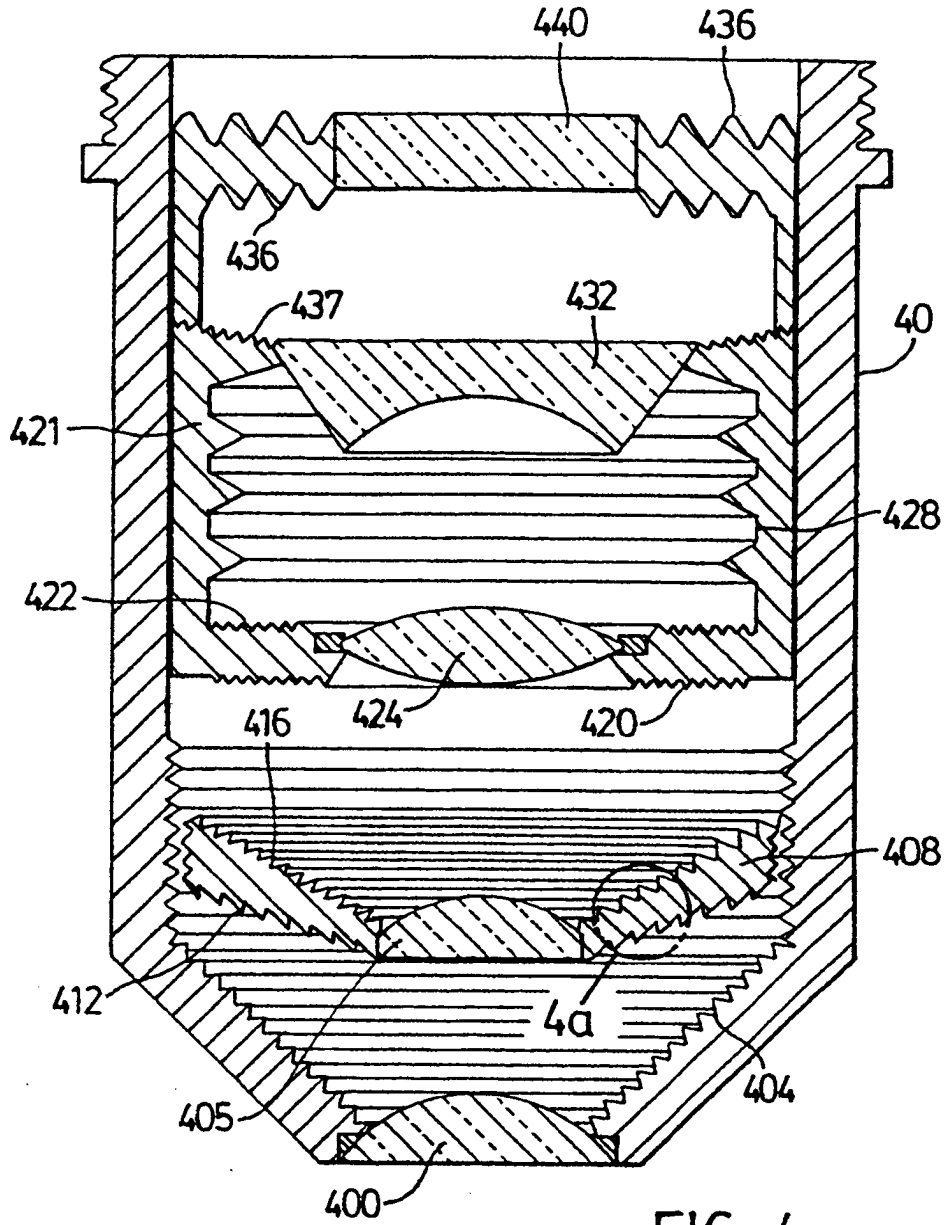
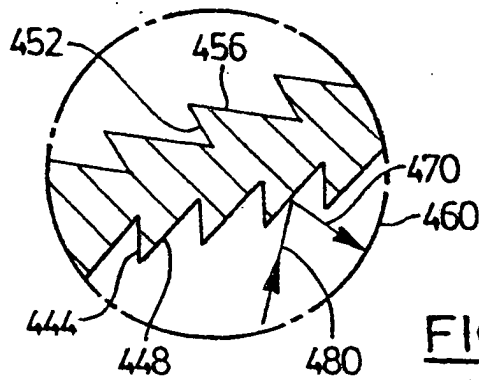


FIG. 3





**FIG. 4**



**FIG. 4a**