



(12) **Offenlegungsschrift**

(21) Aktenzeichen: **10 2017 105 103.1**
(22) Anmeldetag: **10.03.2017**
(43) Offenlegungstag: **13.09.2018**

(51) Int Cl.: **G02B 21/36** (2006.01)
G02B 27/22 (2006.01)
G03B 35/00 (2006.01)

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

(74) Vertreter:
**Patentanwälte GEYER, FEHNERS & PARTNER
mbB, 80687 München, DE**

(72) Erfinder:
**Kleppe, Ingo, Dr., 07749 Jena, DE; Wald, Matthias,
Dr., 07751 Jena, DE**

(56) Ermittelte Stand der Technik:

DE	10 2014 102 215	A1
US	2016 / 0 062 100	A1
US	2016 / 0 313 231	A1
US	2016 / 0 334 613	A1

BROXTON, Michael [u.a.]: Wave optics theory and 3-D deconvolution for the light field microscope. In: Optics Express. 2013, Bd. 21, H. 21, S. 25418-25439. ISSN 1094-4087 (E). URL: <https://www.osapublishing.org/oe/viewmedia.cfm?uri=oe-21-21-25418&seq=0> [abgerufen am 2017-08-21]

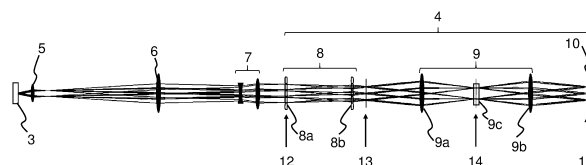
COHEN, Noy [u.a.]: Enhancing the performance of the light field microscope using wavefront coding. In: Optics Express. 2014, Bd. 22, H. 20, S. 24817-24839. ISSN 1094-4087 (E). DOI: 10.1364/OE.22.024817. URL: <https://www.osapublishing.org/oe/viewmedia.cfm?uri=oe-22-20-24817&seq=0> [abgerufen am 2017-08-21]

Rechercheantrag gemäß § 43 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen.

(54) Bezeichnung: **3D-Mikroskopie**

(57) Zusammenfassung: Bei einem Mikroskopieverfahren zur dreidimensionalen Abbildung eines Objektes (3) wird dieses durch einen Abbildungsstrahlengang in ein erstes Bild (12) abgebildet, das in einer ersten Bildebene liegt. In der ersten Bildebene ist ein erstes Mikrolinsenarray (8a) angeordnet. Ihm ist ein zweites Mikrolinsenarray (8b) nachgeordnet, das dieselbe Teilung hat. Die beiden Mikrolinsenarrays (8a, 8b) segmentieren das erste Bild (12) lateral in Segmente (15, 16) und bilden es in ein zweites Bild (13) ab, in dem die Segmente des voneinander beabstandet und durch Lücken (17) getrennt sind. In einer Pupillenebene (14) nach den Mikrolinsenarrays (8a, 8b) steht eine Phasenmaske (9c), die für jedes Segment (15, 16) des zweiten Bildes (13) gemäß einer Punktbildverwaschungsfunktion einen Spot (18, 19) erzeugt. Ein Detektor (11) erfasst Form und Struktur der Spots. Eine Steuereinrichtung (11) ermittelt für jedes Segment (15, 16) aus dieser Form und/oder Struktur der Spots (18, 19) eine laterale Intensitätsverteilung und eine Tiefenangabe und erzeugt daraus ein tiefenaufgelöstes Bild des Objektes (3).



Beschreibung

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur dreidimensionalen Abbildung eines Objektes, wobei das Objekt durch einen Abbildungsstrahlengang in ein erstes Bild abgebildet wird, das in einer ersten Bildebene liegt, in der ersten Bildebene ein erstes Mikrolinsenarray angeordnet wird, nach dem ersten Mikrolinsenarray eine Intensitätsverteilung erfasst und daraus Bilddaten gewonnen und aus diesen ein tiefenaufgelöstes Bild des Objektes erzeugt wird.

[0002] Die Erfindung bezieht sich weiter auf eine Kamera zur dreidimensionalen Objekt-Abbildung mit einer Abbildungsvorrichtung, die das Objekt in ein erstes Bild, das in einer ersten Bildebene liegt, abbildet, wobei die Kamera aufweist ein erstes Mikrolinsenarray zur Anordnung in der ersten Bildebene des Mikroskops oder in einer mittel Zwischenoptik daraus abgeleiteten weiteren Bildebene, einen dem ersten Mikrolinsenarray nachgeordneten Detektor, der Bilddaten erzeugt, und eine Steuereinrichtung zur Erzeugung eines elektronischen, tiefenaufgelösten Bildes des Objektes aus den Bilddaten.

[0003] Im Stand der Technik sind verschiedene Ansätze bekannt, um mittels Mikroskopie eine Tiefenauflösung zu erreichen und damit eine 3D-Mikroskopie zu schaffen. Die Veröffentlichung M. Broxton et al., Optics Express, Vol. 21, Nr. 21, S. 25418-25439, schlägt hierfür die sog. Lichtfeldmikroskopie vor. Bei diesem Mikroskopieverfahren wird zur dreidimensionalen Abbildung eines Objektes in einer Bildebene des Mikroskops oder in einer mittels Zwischenoptik daraus abgeleiteten weiteren Bildebene ein Mikrolinsenarray angeordnet, das die Strahlung auf einen Detektor leitet. Das Design ist dabei so gewählt, dass die Bildfelder der einzelnen Linsen des Mikrolinsenarrays die Ebene, in der der Detektor liegt, vollständig ausfüllen. Eine entsprechende Bildverarbeitung des Lichtfeldes, welches der Detektor erfasst, liefert eine Abbildung mit einer größeren Tiefenschärfe und ermöglicht Schnitte aus verschiedenen Tiefenlagen des Objektes. Dies realisiert eine 3D-Mikroskopie. Die Lichtfeldmikroskopie reduziert jedoch die laterale Auflösung auf den Durchmesser eines einzelnen Linsenelementes des Mikrolinsenarrays, das in der Bildebene sitzt. Die Veröffentlichung N. Cohen, et al., Optics Express, Vol. 22, Nr. 20, S. 24817-24839, verbessert die laterale Auflösung der Lichtfeldmikroskopie, indem in der rückseitigen Fokalebene des Objektivs eine erste Phasenmaske und direkt auf den Mikrolinsenarray eine zweite Phasenmaske vorgesehen werden, und die rechnerische Auswertung der Bilddaten an diese Änderung angepasst wird.

[0004] Die US 7433042 B1 beschreibt die Verwendung eines Mikrolinsenarrays, das als Tubuslinse eines Mikroskops eingesetzt wird und dem unmittelbar eine farbfiltierende Maske nachgeordnet ist, die für jede

Linse des Mikrolinsenarrays mehrere Farbfilterbereiche vorsieht. Auf diese Weise kann eine Farbinformation des mikroskopierten Bildes gewonnen werden.

[0005] Die Veröffentlichung R. Berlich, et al., Optics Express, Vol. 24, Nr. 6, S. 5946-5960, befasst sich mit der dreidimensionalen Auflösung eines Objektes durch Manipulation der Punktbildverwaschungsfunktion.

[0006] Die Veröffentlichung N. Hagen und M. Kudenov, Optical Engineering, Vol. 52, Nr. 9, September 2013, S. 090901-1-090901-23 erläutert verschiedene Möglichkeiten, aus einer einzigen Mikroskopieaufnahme Farbinformation zu extrahieren.

[0007] Weiter sind tiefenauflösende Verfahren bekannt, die nicht simultan arbeiten, also eine Vielzahl von Aufnahmen benötigen. Ein Beispiel hierfür ist die sog. Lichtblattmikroskopie oder die Laser-Scanning-Mikroskopie mit konfokaler Abrasterung der Probe. Diese Verfahren haben aufgrund der Tatsache, dass sie mehrere Aufnahmen benötigen, einen erheblichen Geschwindigkeitsnachteil. Die erläuterten Lichtfeldverfahren hingegen leiden unter lateraler Auflösung durch Reduktion der effektiven numerischen Apertur in der Pupille.

[0008] Der Erfindung liegt deshalb die Aufgabe zugrunde, ein dreidimensionales Mikroskopieverfahren derart weiterzubilden, dass aus einer einzigen Abbildung der Probe dreidimensionale Information mit möglichst geringem lateralen Auflösungsverlust und möglichst einfachem optischen Aufbau gewonnen werden kann.

[0009] Die Erfindung ist in den Ansprüchen 1, betreffend ein Mikroskopieverfahren, und 6, betreffend eine Kamera zur dreidimensionalen Objekt-Abbildung mit einem Mikroskop, definiert. Die Erfindung umfasst weiter ein Mikroskop mit einer solchen Kamera.

[0010] Im Mikroskopieverfahren wird zur dreidimensionalen Abbildung eines Objektes das Objekt durch einen Abbildungsstrahlengang in eine erste Bildebene abgebildet. In der ersten Bildebene wird ein erstes Mikrolinsenarray angeordnet. Nach dem ersten Mikrolinsenarray wird eine Intensitätsverteilung erfasst. Daraus werden Bilddaten gewonnen, mittels denen ein tiefenaufgelöstes Bild des Objektes erzeugt wird. Insofern entspricht das Mikroskopieverfahren der Lichtfeldmikroskopie. Zusätzlich wird nun jedoch dem ersten Mikrolinsenarray ein zweites Mikrolinsenarray nachgeordnet. Beide Mikrolinsenarrays haben dieselbe Teilung. Sie erzeugen zusammen in einer zweiten Bildebene eine lateral segmentierte Version des ersten Bildes.

[0011] Dieses zweite Bild hat mehrere Segmente. Jedes Segment ist von den benachbarten Segmen-

ten beabstandet. Die beiden Mikrolinsenarrays schaffen somit Segmente, die voneinander durch Lücken beabstandet sind. Dieses segmentierte Bild liegt jedoch so nicht vor, denn der durch die Lücken geschaffene Raum wird für eine Phasenmanipulation genutzt, die für jedes Segment im zweiten Bild einen Spot erzeugt, der durch die Phasenmanipulation gemäß einer von der Tiefenlage im Objekt abhängigen Punktbildverwaschungsfunktion strukturiert ist. Die Phasenmanipulation ist so gestaltet, dass Form und/oder Struktur des Spots eine Tiefenlage des zugeordneten Punktes im Objekt kodiert. Die derart erzeugten Spots stellen gegenüber den ursprünglichen Segmenten eine Vergrößerung dar, die durch die geschaffenen Lücken möglich ist. Die Spots überdecken die Lücken mindestens teilweise. Die Intensitätsverteilung wird in der zweiten Bildebene erfasst, wobei Form und/oder Struktur des Spots für jedes Segment aufgelöst wird. Für jedes Segment wird in einer Bildverarbeitung aus der Form und/oder Struktur des Spots die laterale Intensitätsverteilung des ursprünglichen Segmentes (also vor der Phasenmanipulation) und zusätzlich eine Angabe über die Tiefenstruktur am jeweiligen Objektpunkt ermittelt. Daraus wird das tiefen aufgelöste Bild des Objektes erzeugt.

[0012] Die beiden Mikrolinsenarrays segmentieren das erste Bild lateral und sorgen dafür, dass im zweiten Bild die Segmente durch Lücken getrennt sind. Die Lücken werden für die nachfolgende Phasenmanipulation ausgenutzt, die aufgrund der tiefenabhängig manipulierten Punktbildverwaschungsfunktion die Segmente in Spots aufweitet, welche größer sind als die ursprünglichen Segmente. Form und/oder Struktur der Spots hängt von der Tiefenlage rückstreuender oder strahlungsemitterender (z. B. fluoreszierender) Elemente des Objekts im jeweiligen Segment ab. Durch die Lücken bleiben die aufgeweiteten Spots ausreichend voneinander beabstandet und können in einer nachfolgenden Auswertung der Intensitätsverteilung, welche Form und/oder Struktur der Spots auflöst, sowohl hinsichtlich der lateralen Intensitätsverteilung in jeweiligen Spots als auch hinsichtlich einer Tiefenstruktur ausgewertet werden. Da die Segmente weiterhin laterale Ortsinformation tragen, bewahrt das Mikroskopieverfahren bzw. die Kamera anders als in der Lichtfeldmikroskopie die laterale Ortsinformation des ersten Bildes und beschränkt diese nicht zwingend auf die Teilung des ersten Mikrolinsenarrays. Somit ist die laterale Auflösung nicht in dem Maß auf Kosten der Tiefenauflösung kompromittiert, wie dies bei der Lichtfeldmikroskopie der Fall ist.

[0013] Für die Anordnung der zwei Mikrolinsenarrays gibt es mehrere Möglichkeiten. In Ausführungsformen sind die zwei Mikrolinsenarrays so ausgebildet, dass ein telezentrisches Zwischenbild erhalten wird, aus dem dann eine Relaisoptik eine Pupillenebene generiert, in welcher die Phasenmani-

pulation ausgeführt werden kann. Die beiden Mikrolinsenarrays befinden sich dann in einem Abstand, der der Summe der Brennweiten der beiden Arrays entspricht. In anderen Ausführungsformen wird eine nichttelezentrische Zwischenbildebene erzeugt. Dann kann auf die Relaisoptik zur Erzeugung einer weiteren Pupille verzichtet werden. Der phasenmanipulierende Pupilleneingriff erfolgt direkt am zweiten Mikrolinsenarray. Es befindet sich in der Brennebene des ersten Mikrolinsenarrays.

[0014] Um die Segmentierung zu erleichtern, ist es zu bevorzugen, wenn das erste Bild gegenüber dem üblichen Mikroskopbild durch eine nachvergrößernde Optik aufgeweitet ist.

[0015] Die Phasenmanipulation kann für den gesamten Querschnitt des Strahlengangs ausgelegt sein. Dann wird ein einziges phasenmanipulierendes Element (z. B. eine Phasenmaske oder spatial light modulator) in den Strahlengang, z.B. die Pupillenebene, gestellt. Der Strahlengang kann daher reflektiv oder transmittiert bezüglich des Elementes ausgeführt werden. Alternativ ist es möglich, die Phasenmanipulation so auszuführen, dass für einzelne Segmente individuelle Phasenmaskenelemente vorgesehen sind. Diese Bauweise bietet sich insbesondere für die Ausführungsform mit nichttelezentrischem Zwischenbild an, bei dem die Phasenmanipulation am zweiten Mikrolinsenarray ausgeführt wird. Das zweite Mikrolinsenarray hat dann nicht nur eine Vielzahl aus Minilinsen, die jeweils eine abbildende Wirkung haben, sondern mit den Minilinsen sind zugleich phasenmanipulierende Elemente kombiniert, beispielsweise Phasenmaskenelemente.

[0016] Um ein Übersprechen zwischen den Abbildungen der einzelnen Mikrolinsen zu minimieren, wird bevorzugt ein Zusammenhang zwischen Brennweite f und Teilung (Abstand) der Mikrolinsen des ersten Mikrolinsenarray eingehalten, der der Beziehung

$$(f/p) = \alpha / (2 \text{ NA})$$

genügt. Dabei ist p der Abstand der Mikrolinsenzentren. α ist die Fläche des Strahlbündelquerschnitts im Verhältnis zur Fläche der Mikrolinse; nimmt bei kompletter Ausleuchtung der Mikrolinse also den Wert 1 an. NA ist die numerische Apertur im Zwischenbild, für das die Kamera ausgelegt ist.

[0017] Die Kamera zur dreidimensionalen Objekt-Abbildung kann an einem herkömmlichen Weitfeldmikroskop eingesetzt werden. Es muss lediglich das erste Mikrolinsenarray in die Bildebene des Mikroskops gesetzt werden. Wo dies baulich nicht möglich ist, beispielsweise weil ein Mikroskopflansch keine ausreichende Zugang oder Raum gibt, kann die Ka-

mera eine Zwischenoptik aufweisen, welche das erste Bild in der ersten Bildebene in eine weitere Bildebene umsetzt, in der dann das Mikrolinsenarray liegt. Dieses Vorgehen ist aus der genannten Arbeit von M. Broxton et al. bekannt.

[0018] Die nachrüstbare Kamera verleiht einer Abbildungsvorrichtung, z. B. einer Funduskamera oder einem Mikroskop, das bislang keine besondere dreidimensionale Objekt-Abbildung erlaubte, eine entsprechende 3D-Fähigkeit.

[0019] Die Erfindung wird nachfolgend unter Bezugnahme auf die Zeichnung beispielhalber noch näher erläutert. In der Zeichnung zeigt:

Fig. 1 eine Schemadarstellung eines Mikroskops mit einer Kamera zur 3D-Mikroskopie,

Fig. 2 eine schematische Darstellung des Strahlengangs im Mikroskop mit Kamera

Fig. 3 die Abfolge verschiedener Bilder, die im Mikroskop gemäß **Fig. 1** bzw. Strahlengang gemäß **Fig. 2** entstehen,

Fig. 4 und 5 mögliche Varianten für die Anordnung eines Mikrolinsenarraypaares in der Kamera der **Fig. 2** bzw. 1,

Fig. 6 eine Darstellung einer Phasenmaske, und

Fig. 7 Darstellungen der Wirkung dieser Phasenmaske.

[0020] **Fig. 1** zeigt schematisch ein Mikroskop **1** zur dreidimensionalen Mikroskopie. **Fig. 2** zeigt schematisch den zugehörigen Strahlengang des Mikroskops **1**. Das Mikroskop **1** ist exemplarisch zur Weitfeldmikroskopie eingerichtet und umfasst einen Probenstisch **2**, auf dem sich das zu mikroskopierende Objekt **3** befindet. Beim Mikroskop **1** handelt es sich um ein herkömmliches Weitfeldmikroskop; es ist allerdings um eine Kamera ergänzt, deren optische Elemente in den **Fig. 1** und **Fig. 2** mit dem Bezugszeichen **4** versehen sind. Zusätzlich zu diesen optischen Elementen umfasst die Kamera **4** noch ein Steuergerät **11**, das als eigenständiges Steuergerät ausgebildet sein kann, oder durch eine spezielle Funktion eines Steuergerätes realisiert sein kann, das bereits ohnehin im Mikroskop **1** für andere Zwecke vorgesehen ist. Das Steuergerät **11** kann insbesondere als Softwaremodul für einen üblichen Computer ausgebildet sein. Es empfängt über eine Leitung Bilddaten und verarbeitet diese.

[0021] Das Mikroskop **1** bildet das Objekt **3** über ein Objektiv **5** und eine Tubuslinse **6**, die als herkömmliche Feldlinse fungiert, ab. Nachgeordnet der Tubuslinse **6** ist in dieser Ausführungsform eine Vergrößerungsoptik **7**, die jedoch optional ist. Objektiv **5** und Tubuslinse **6** erzeugen ein Weitfeldbild **12** in einer Bildebene, die aufgrund der nachgeordneten Kamera

4 nur eine Zwischenbildebene ist. Das Bild **12** in der Zwischenbildebene wird von einem Mikrolinsenarraypaar **8**, umfassend ein erstes Mikrolinsenarray **8a** und ein zweites Mikrolinsenarray **8b**, aufgenommen. Die beiden Mikrolinsenarrays **8a**, **8b** haben die gleiche Teilung. Das erste Mikrolinsenarray **8a** ist in der Zwischenbildebene angeordnet. Da im Strahlengang der **Fig. 2** noch weitere Zwischenbildebene bzw. Bildebenen folgen, wird die Bildebene, welche von Objektiv **5**, Tubuslinse **6** und Vergrößerungsoptik **7** bereitgestellt wird, hier als erste Bildebene oder erste Zwischenbildebene bezeichnet.

[0022] Die Vergrößerungsoptik **7** hat die Wirkung, dass das Bild in der ersten Zwischenbildebene gegenüber der Größe, die von Objektiv **5** und Tubuslinse **6** bereitgestellt werden würde, aufgeweitet ist. Diese Aufweitung schafft keine zusätzliche Bildinformation, erleichtert aber die des nachfolgenden Mikrolinsenarraypaares **8**.

[0023] Das Mikrolinsenarraypaar **8** unterteilt das erste Bild **12** in Segmente. Die Art der Segmentierung wird nachfolgend anhand der **Fig. 3** noch näher erläutert. Das segmentierte Bild **13b** findet sich in einer zweiten Zwischenbildebene und wird von dort mittels einer Phasenmanipulationseinrichtung **9** in ein finales Bild **15** auf einen Detektor **10** abgebildet. Die Phasenmanipulationseinrichtung **9** umfasst eine Relaisoptik **9a**, **9b**, welche die zweite Zwischenbildebene in eine finale Bildebene überträgt, in welcher das finale Bild **15** der Detektor **10** liegen, wobei eine zwischengeschaltete Pupillenebene **14** entsteht, in der eine Phasenmaske **9c** angeordnet ist.

[0024] **Fig. 2** zeigt die Abfolge der entsprechenden Bildebenen. **Fig. 3** zeigt die zugeordneten Bilder. In der ersten Zwischenbildebene entsteht das erste Bild **12**, das aufgrund der nachfolgenden Optik nur ein erstes Zwischenbild ist. Das Mikrolinsenarraypaar **8** teilt das erste Zwischenbild **12** in einzelne Segmente **15**, **16** ein, wobei die Einteilung durch die Teilung der Mikrolinsenarrays **8a**, **8b** vorgegeben ist. Gleichzeitig wird das erste Zwischenbild **12** vom Mikrolinsenarraypaar **8** so aufgeweitet, dass die einzelnen Segmente von den benachbarten Segmenten beabstandet sind. **Fig. 3** zeigt zur Veranschaulichung die Segmentierungsabfolge. Links ist das erste Bild **12**. Das nächste Bild ist in Realität nicht vorhanden und soll nur die segmentierende Wirkung im ersten Bild **12** zeigen. Dann folgt das vom Mikrolinsenarraypaar tatsächlich erzeugte zweite Zwischenbild **13**, in dem zwischen den Segmenten **15**, **16**, die im ersten Zwischenbild **12** nahtlos aneinander lagen nun eine Lücke **17** besteht. Dies gilt für alle Segmente, in die das erste Zwischenbild **12** aufgeteilt wurde.

[0025] Die Lücken **17** bieten Platz für die nachfolgende Phasenmanipulation mittels der Phasenmanipulationseinrichtung **9**. Sie nimmt über ihre Relaisop-

tik **9a**, **9b** das zweite Zwischenbild **13** auf und bildet es in das finale Bild **15** auf den Detektor **10** ab, wobei in einer zwischengeordneten Pupillenebene **14** eine Phasenmanipulation durch eine Phasenmaske **9b** erfolgt. Die Phasenmanipulation durch die Phasenmaske **9b** unterwirft jedes Segment **15**, **16** einer Punktbildverwaschungsfunktion, die von der Tiefenlage im Objekt **3** abhängt. Somit entsteht aus jedem Segment **15**, **16** ein entsprechender Spot **18**, **19**. Er ist gegenüber dem ursprünglichen Segment **15**, **16** aufgeweitet, belegt also eine größere Fläche im endgültigen Bild **15**. Aufgrund der Lücken **17**, die durch das Mikrolinsenarraypaar **8** im zweiten Zwischenbild **13** geschaffen wurden, besteht jedoch Platz für die Aufweitung der Segmente **15**, **16** in die Spots **18**, **19**.

[0026] Um ein Übersprechen zwischen den Abbildungen der einzelnen Mikrolinsen zu minimieren, wird bevorzugt ein Zusammenhang zwischen Brennweite f und Abstand der Zentren der Mikrolinsen (nachfolgend als Teilung bezeichnet) des ersten Mikrolinsenarray eingehalten, der der Beziehung

$$(f/p) = \alpha / (2 \text{ NA}) \quad (1)$$

genügt. Dabei ist p der Abstand der Mikrolinsenzentren. α ist die Fläche des Strahlbündelquerschnitts im Verhältnis zur Fläche der Mikrolinse; nimmt bei kompletter Ausleuchtung der Mikrolinse also den Wert **1** an. NA ist die numerische Apertur im Zwischenbild **12**, für das die Kamera **4** ausgelegt ist.

[0027] Diesem Zusammenhang liegt folgende, den Erfindern zuzuschreibende Erkenntnis zu Grunde: Durch den Ausleuchtungsparameter α lässt sich die Bedingung, dass möglichst kein Übersprechen der Abbildungen zwischen den Mikrolinsen auftreten soll, durch die Forderung $\alpha < 1$ ausdrücken. Definiert man ein relative Größe k , die beschreibt, wie groß das Bildfeld einer einzelnen Mikrolinse relativ zur Größe eines Airyscheibchens ist ($k := p/\text{Airydurchmesser}$), lässt sich über eine Mindestgröße für k ein Zustand vorschreiben, bei dem keine Phaseninformation zur anschließenden Strahlformung durch Beugung und damit Verteilung über weitere Mikrolinsen verloren geht. Wäre k beispielsweise deutlich kleiner als **1** Airy, wäre die Phaseninformation zur Strahlformung in einem Kanal nicht mehr komplett vorhanden. Daraus folgt, dass k mindestens größer als **1** Airy, aber besser auch größer **2** Airy sein muss, um genügend z -Information in jeder Mikrolinsenabbildung zu transportieren. Dann ist die Bildinformation besonders gut kodierbar. Aus beiden Bedingungen ergibt sich eine optionale Einschränkung für die Beschaffenheit der Mikrolinsenarrays, für ihr Verhältnis aus Mikrolinsenabstand (p) zur Brennweite (f):

$$\frac{f}{p^2} = \frac{\alpha}{2,44 \lambda k} \quad (2)$$

gilt. Da die Größe eines Airyscheibchens durch dessen Durchmesser $d = 1,22 \lambda / \text{NA}$ gegeben ist und $k = p / d$ gilt, erhält man aus Gleichung (2) die überraschend übersichtliche, obige Gleichung (1).

[0028] Ebenfalls ist ein Brennweitenverhältnis der Mikrolinsenarrays bevorzugt, das eine hinreichende Verkleinerung erzielt, um ausreichend Platz für die Verbreiterung des Lichtbündels durch die z -Kodierung pro Mikrolinse zu schaffen. Das hängt ersichtlich davon ab, wie viele z -Ebenen erfasst werden sollen.

[0029] Fig. **3** zeigte schematisch eine Aufweitung zu länglichen Spots **18**, **19**, deren Drehlage von der Tiefe im Objekt **3** abhängt, aus der die Bildinformation für die Segmente **15**, **16** stammte. Das finale Bild **15** wird vom Detektor **10** erfasst, dessen Ortsauflösung so gestaltet ist, dass Form und/oder Struktur der Spots **18**, **19** aufgelöst wird. Die Steuereinrichtung **11** ermittelt aus den Bilddaten des Detektors **10** dann sowohl eine Information über die Tiefenlage (in Fig. **3** exemplarisch durch die Drehlage der länglichen Spots **18**, **19** symbolisiert) als auch über die laterale Intensitätsverteilung, die im ursprünglichen Segment **15**, **16** vorhanden war. Auf diese Weise wird ein dreidimensional aufgelöstes Bild des Objektes **3**, also eine Tiefenangabe ermittelt, ohne dass die laterale Auflösung auf die Teilung des Mikrolinsenarray **8a**, **8b** herabgesetzt wäre.

[0030] Es sei darauf hingewiesen, das in Fig. **3** die Segmente **15**, **16** lediglich exemplarisch rechteckig eingezeichnet sind. Dies dient der Veranschaulichung. Es sind auch andere Segmentformen möglich, z. B. kreisförmige Segmente. Gleiches gilt für die Spots **18**, **19**, die ausschließlich zur Veranschaulichung als längliche Spots gezeichnet sind.

[0031] Es sind im Stand der Technik verschiedene Phasenmasken bekannt, die eine tiefenabhängige Punktbildverwaschungsfunktion erzeugen. Beispiele für solche Phasenmasken finden sich in der WO 2012/039636 und der DE 102012224306 A1. Beide Veröffentlichungen schildern die Phasenmasken zwar in anderem Zusammenhang, nämlich in Kombination mit der sogenannten Lokalisierungsmikroskopie (beispielsweise PALM-Verfahren), die dort geschilderte Phasenmanipulation ist aber gleichermaßen zur Erzeugung der tiefenabhängigen Punktbildverwaschungsfunktion mit der Kamera **4** geeignet. Der Offenbarungsgehalt dieser Druckschriften wird in dieser Hinsicht hier voll umfänglich eingebunden.

[0032] Im Strahlengang der Fig. **2** erzeugt das Mikrolinsenarraypaar **8** das zweite Zwischenbild **13**,

und die Phasenmanipulationseinrichtung **9** setzt dieses unter Erzeugung der zwischengelagerten Pupillenebene **14** in das finale Bild **15** um. Dazu kann, wie **Fig. 4** zeigt, das Mikrolinsenarraypaar **8** in einer telezentrischen Anordnung ausgestaltet sein, d. h. das erste Mikrolinsenarray **8a** und das zweite Mikrolinsenarray **8b** sind um die Summe ihrer Brennweiten beabstandet. Es ist jedoch auch eine Ausgestaltung ohne telezentrisches Zwischenbild möglich. Diese Ausführungsform ist in **Fig. 5** veranschaulicht. Das zweite Mikrolinsenarray **8b** befindet sich dann zum ersten Mikrolinsenarray **8a**, welches in der ersten Zwischenbildebene des ersten Zwischenbildes **12** sitzt in einem Abstand, welcher der Brennweite der ersten Mikrolinsenarrays **8a** entspricht. Dann kann auf die Relaisoptik **9a, 9b** verzichtet werden, und die Phasenmanipulation erfolgt direkt am zweiten Mikrolinsenarray **9b**. In **Fig. 5** ist exemplarisch eine auf die Vorderseite des Mikrolinsenarrays **8b** aufgetragene, phasenmanipulierende Struktur in Form einer Phasenmaske **9c** eingetragen. Natürlich kann die entsprechende Struktur auch innerhalb des zweiten Mikrolinsenarrays **8b** angeordnet werden oder auf dessen Rückseite. Gleichermaßen ist es möglich, eine entsprechende Phasenmaske unmittelbar dem zweiten Mikrolinsenarray **8b** vor- oder nachzuordnen. Der Vorteil des nicht-telezentrischen Aufbaus ist zum einen seine Kompaktheit, da das finale Bild **15** relativ kurz nach dem zweiten Mikrolinsenarray **8b** entsteht und der Detektor **10** dort angeordnet ist. Zum anderen ist das Kanalübersprechen zwischen benachbarten Mikrolinsenarrays sehr gering. Auch entfällt der Justieraufwand für die Relaisoptik **9a, 9b**.

[0033] Für beide Varianten, d. h. für **Fig. 4** mit nachgeordneter Relaisoptik **9a, 9b** und **Fig. 5** ohne diese Relaisoptik, kommen verschiedene Varianten für die Phasenmaske in Frage. Hierbei sind zwei grundsätzlich unterschiedliche Ansätze zu unterscheiden. Die Phasenmaske kann über den gesamten Querschnitt des Strahlengangs der **Fig. 4** eine einheitliche Phasenmanipulation ausführen. Alternativ dazu ist es möglich, ein Array von einzelnen Phasenmaskenelemente vorzusehen, die für einzelne Segmente individuell die Punktbildverwaschungsfunktion tiefenabhängig modifizieren. Für die Bauweise der **Fig. 4** ist das optional, bei **Fig. 5** erhält man diese Wirkung automatisch.

[0034] Die vom Steuergerät **11** durchgeführte Verarbeitung der Bilddaten kann auf die Algorithmik der eingangs genannten Lichtfeldmikroskopie zugreifen. Wie die z-Information in der Intensitätsverteilung über dem Detektor **10** kodiert ist, hängt letztlich von der gewählten Phasenmaske ab. Es wird deshalb nachfolgend eine generelle Beschreibung der Vorgehensweise zur Verarbeitung der Bilddaten unabhängig von der konkreten Phasenmaske gegeben.

[0035] Eine Entfaltung der Bilder erfolgt in Ausführungsformen auf Basis der Punktbildverwaschungsfunktion (PSF), die den einzelnen Pixeln des Detektors **10** zugeordnet ist. Dies ist analog zum Verfahren, wie es von Broxton et al. (Zitat siehe oben) beschrieben wird - mit dem Unterschied, dass die PSF nun pixelindividuell ist. Sie ist in Ausführungsformen vorbekannt und wurde aus der Verteilung der PSF über dem zweiten Mikrolinsenarray **8b** ermittelt.

[0036] Es genügt in der Regel die Annahme, dass die Verteilung der PSF für alle Mikrolinsen des zweiten Mikrolinsenarrays **8b** dieselbe ist, sodass es in Ausführungsformen zur Ermittlung der PSF pro Pixel ausreicht, die Variation der PSF für eine einzelne Mikrolinse zu kennen. Da jeder Mikrolinse eine Pixelgruppe zugeordnet ist, ergibt sich aus der Variation der PSF pro Mikrolinse auf einfache Weise die PSF pro Pixel für jedes Pixel des Detektors **10**.

[0037] Die PSF für eine einzelne Mikrolinse ist in Ausführungsformen vorbekannt, z.B. aus einer experimentellen Bestimmung, beispielsweise durch Vermessen von beads als Probenkörpern. In anderen Ausführungsformen wird eine analytisch beschreibbare Phasenmaske verwendet. Dann erfolgt eine analytische Herleitung der PSF ähnlich wie in Broxton et al., S. 25427, Gleichung 5 - nun jedoch unter Berücksichtigung auch des zweiten Mikrolinsenarrays **8b**. Die PSF für eine Mikrolinse lässt sich zudem in einem wellenoptischen Modell numerisch berechnen. In weiteren Ausführungsformen ist sie aus einer wellenoptischen Simulation des Gesamtaufbaus (einschließlich der Phasenmaske) vorbekannt. Die PSF einer Mikrolinse kann in Ausführungsformen analog zur Lichtfeldmikroskopie diskretisiert werden (vgl. Broxton et al., Abschnitt **3.2**) und Rauschen mit modelliert werden.

[0038] Die Entfaltung und somit Bildkonstruktion erfolgt in Ausführungsformen unter Verwendung der PSF pro Pixel analog zu Broxton et al. in einem Lucy-Richardson-Formalismus (vgl. Broxton et al., Abschnitt **3.4**). Klassische lineare Entfaltungsverfahren kommen aufgrund der Ortsabhängigkeit der PSF hingegen nicht in Betracht.

[0039] Alternativ ist es in einer vereinfachten Ausführungsform möglich, die einzelnen Pixel des Detektors zu Ebenen im Objekt **3** zuzuordnen, ohne eine Entfaltung vorzunehmen. **Fig. 6** zeigt eine Draufsicht auf eine Phasenmaske **9c**, die beispielsweise im Aufbau der **Fig. 2** zum Einsatz kommen kann. Sie bewirkt eine spiralförmige Punktbildverwaschungsfunktion. Das Abbild eines Punktes in der Fokalebene wird durch diese Phasenmaske **9c** in zwei nebeneinanderliegende Spots aufgeteilt. Als Funktion des Abstands von der Fokalebene rotieren diese Spots um ein gemeinsames Zentrum. Aufgrund der Spiralförmigkeit der PSF ändert sich dabei der Abstand der Spots

auch etwas. Diese Verhältnisse zeigt die **Fig. 7**, welche exemplarisch das Abbild eines Punktes zeigt, der in der Fokalebene liegt (mittlere Darstellung der **Fig. 7**), etwas unterhalb der Fokalebene (linke Darstellung der **Fig. 7**) bzw. etwas oberhalb der Fokalebene angeordnet ist (rechte Darstellung der **Fig. 7**).

ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

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

Zitierte Patentliteratur

- US 7433042 B1 [0004]
- WO 2012/039636 [0031]
- DE 102012224306 A1 [0031]

Zitierte Nicht-Patentliteratur

- M. Broxton et al., Optics Express, Vol. 21, Nr. 21, S. 25418-25439 [0003]
- N. Cohen, et al., Optics Express, Vol. 22, Nr. 20, S. 24817-24839 [0003]
- R. Berlich, et al., Optics Express, Vol. 24, Nr. 6, S. 5946-5960 [0005]
- N. Hagen und M. Kudenov, Optical Engineering, Vol. 52, Nr. 9, September 2013, S. 090901-1-090901-23 [0006]

Patentansprüche

1. Verfahren zur dreidimensionalen Abbildung eines Objektes (3), wobei

- das Objekt (3) durch einen Abbildungsstrahlengang in ein erstes Bild (12) abgebildet wird, das in einer ersten Bildebene liegt,
- in der ersten Bildebene ein erstes Mikrolinsenarray (8a) angeordnet wird,
- nach dem ersten Mikrolinsenarray (8a) eine Intensitätsverteilung erfasst und daraus Bilddaten gewonnen und aus diesen ein tiefenaufgelöstes Bild des Objektes (3) erzeugt wird, **dadurch gekennzeichnet**, dass
- dem erstem Mikrolinsenarray (8a) ein zweites Mikrolinsenarray (8b) nachgeordnet wird, das dieselbe Teilung wie das erste Mikrolinsenarray (8a) hat,
- mittels erstem und zweitem Mikrolinsenarray (8a, 8b) das erste Bild (12) lateral in Segmente (15, 16) segmentiert und in ein zweites Bild (13) abgebildet wird, in dem die Segmente (15, 16) voneinander beabstandet und durch Lücken (17) getrennt sind,
- nach dem ersten Mikrolinsenarray (8a) eine Phasenmanipulation (9c) durchgeführt wird, die für jedes Segment (15, 16) in der zweiten Bildebene gemäß einer Punktbildverwaschungsfunktion einen Spot (18, 19) erzeugt, dessen Form und/oder Struktur die Tiefenlage im Objekt (3) kodiert und die Lücken (17) im zweiten Bild (13) überdeckt,
- die Intensitätsverteilung für das zweite Bild (13) erfasst wird, wobei Form und/oder Struktur der Spots (18, 19) aufgelöst wird, und
- für jedes Segment (15, 16) aus der Form und/oder Struktur der Spots (18, 19) eine laterale Intensitätsverteilung und eine Tiefenangabe ermittelt und daraus das tiefenaufgelöste Bild des Objektes (3) erzeugt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass im Abbildungsstrahlengang mittels einem Objektiv (5) und einer Tubuslinse (6) das Objekt (3) abgebildet wird, wobei mittels einer Nachvergrößerungsoptik (7) zusätzlich das erste Bild (12) aufgeweitet wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass zweite Mikrolinsenarray (8b) in einem Abstand vom ersten Mikrolinsenarray (8a) angeordnet wird, der der Summe der Brennweiten der beiden Mikrolinsenarrays (8a, 8b) entspricht, und dem zweiten Mikrolinsenarray (8b) eine Relaisoptik (9a, 9b) folgt, die eine Pupillenebene (14) erzeugt, in der die Phasenmanipulation durchgeführt wird.

4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass das zweite Mikrolinsenarray (8b) in einem Abstand vom ersten Mikrolinsenarray (8a) angeordnet wird, der der Brennweite der ersten Mikrolinsenarrays (8a) entspricht, und ein Phasen-

manipulationselement (9c) mit dem zweiten Mikrolinsenarray (8b) kombiniert wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Phasenmanipulation mit einer auf alle Segmente (15, 16) wirkenden Phasenmaske (9c) oder einem Phasenmaskenarray durchgeführt wird, das für einzelne der Segmente (15, 16) individuelle Phasenmaskenelemente aufweist.

6. Mikroskopieverfahren nach einem der obigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein Zusammenhang zwischen Brennweite f und Abstand p der Zentren der Mikrolinsen des zweiten Mikrolinsenarrays (8b) eingehalten wird, der der Beziehung

$$(f/p) = \alpha / (2 \text{ NA})$$

genügt, wobei α ein Verhältnis zwischen einer Strahlbündelquerschnittfläche an jeder Mikrolinse des zweiten Mikrolinsenarrays (8b) und einer Fläche der Mikrolinse ist und NA eine numerischer Apertur im ersten Bild (12) ist.

7. Kamera zur dreidimensionalen Objekt-Abbildung mit einer Abbildungseinrichtung, die das Objekt (3) in ein erstes Bild (12), das in einer ersten Bildebene liegt, abbildet, wobei die Kamera (4) aufweist

- ein erstes Mikrolinsenarray (8a) zur Anordnung in der ersten Bildebene des Mikroskops (1) oder in einer mittel Zwischenoptik daraus abgeleiteten weiteren Bildebene,
- einen dem ersten Mikrolinsenarray (8a) nachgeordneten Detektor (10), der Bilddaten erzeugt, und
- eine Steuereinrichtung (11) zur Erzeugung eines tiefenaufgelösten Bildes des Objektes (3) aus den Bilddaten, **dadurch gekennzeichnet**, dass
- zwischen dem erstem Mikrolinsenarray (8a) und dem Detektor (10) ein zweites Mikrolinsenarray (8b) angeordnet ist, das dieselbe Teilung wie das erste Mikrolinsenarray (8a) hat,
- erstes und zweites Mikrolinsenarray (8a, 8b) ausgebildet sind, das erste Bild (12) lateral in Segmente (15, 16) zu segmentieren und in ein zweites Bild (13) abzubilden, in dem die Segmente (15, 16) voneinander beabstandet und durch Lücken (17) getrennt sind,
- nach dem ersten Mikrolinsenarray (8a) eine Phasenmanipulationseinrichtung (9) angeordnet ist, die für jedes Segment (15, 16) in der zweiten Bildebene gemäß einer Punktbildverwaschungsfunktion einen Spot (18, 19) erzeugt, dessen Form und/oder Struktur die Tiefenlage im Objekt (3) kodiert und die Lücken (17) im zweiten Bild (13) überdeckt,
- der Detektor (10) in der zweiten Bildebene liegt und Form und/oder Struktur der Spots (18, 19) erfasst und
- die Steuereinrichtung (11) für jedes Segment (15, 16) aus der Form und/oder Struktur des Spots (18, 19) eine laterale Intensitätsverteilung und eine Anga-

be über die Tiefenlage ermittelt und daraus das tiefenaufgelöste Bild des Objektes (3) erzeugt.

8. Kamera nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass das zweite Mikrolinsenarray (8b) in einem Abstand vom ersten Mikrolinsenarray (8a) angeordnet ist, der der Summe der Brennweiten der beiden Mikrolinsenarrays (8a, 8b) entspricht, und dem Paar von Mikrolinsenarrays (8a, 8b) eine Relaisoptik (9a, 9b) folgt, die eine Pupillenebene (14) erzeugt, in der eine Phasenmaske (9c) angeordnet ist, so dass die Phasenmanipulationseinrichtung (9) durch die Relaisoptik (9a, 9b) und die Phasenmaske (9c) gebildet ist.

9. Kamera nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass das zweite Mikrolinsenarray (8b) in einem Abstand vom ersten Mikrolinsenarray (8a) angeordnet ist, der der Brennweite der ersten Mikrolinsenarrays (8a) entspricht, und die Phasenmanipulationseinrichtung (9) als mit zweiten Mikrolinsenarray (8b) kombinierte oder dort angeordnete Phasenmaske (9c) ausgebildet ist.

10. Kamera nach einem der Ansprüche 7 bis 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Phasenmanipulationselement eine auf alle Segmente (15, 16) wirkende Phasenmaske (9c) oder ein Phasenmaskenarray ist, das für einzelne der Segmente (15, 16) individuelle Phasenmaskenelemente aufweist.

11. Kamera nach einem der Ansprüche 7 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein Zusammenhang zwischen Brennweite f und Abstand p der Zentren der Mikrolinsen des zweiten Mikrolinsenarrays (8b) besteht, der der Beziehung

$$(f/p) = \alpha / (2 \text{ NA})$$

genügt, wobei α ein Verhältnis zwischen einer Strahlbündelquerschnittfläche an jeder Mikrolinse des zweiten Mikrolinsenarrays (8b) und einer Fläche der Mikrolinse ist und NA eine numerische Apertur in der ersten Bildebene ist.

12. Mikroskop mit einer Kamera (4) nach einem der Ansprüche 7 bis 11.

13. Mikroskop nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass es einen Abbildungsstrahlengang mit einem Objektiv (5) und einer diesem nachgeordneter eine Tubuslinse (6) und eine nachvergrößernde Optik (7) aufweist, die das erste Bild (12) aufweitet.

Es folgen 4 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

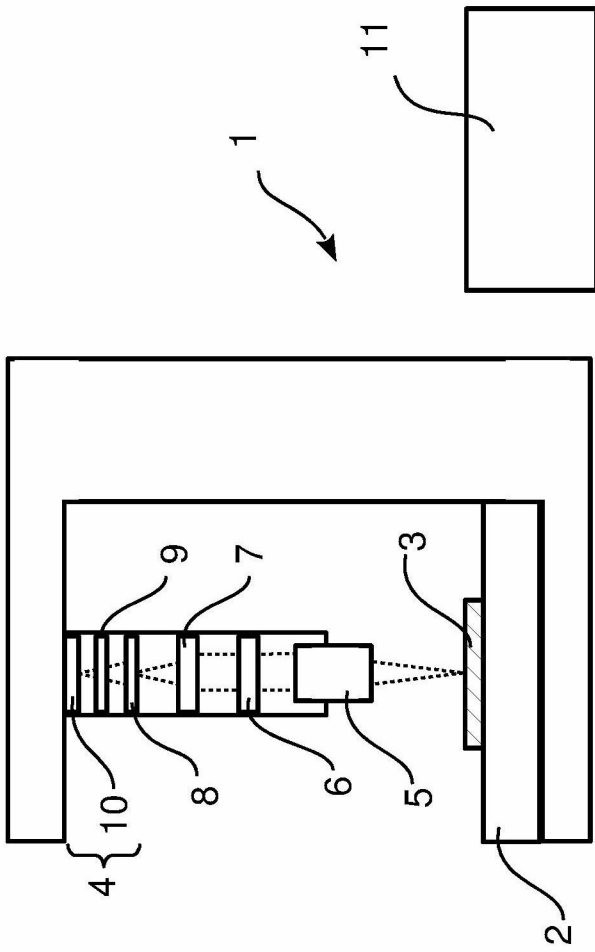


FIG. 1

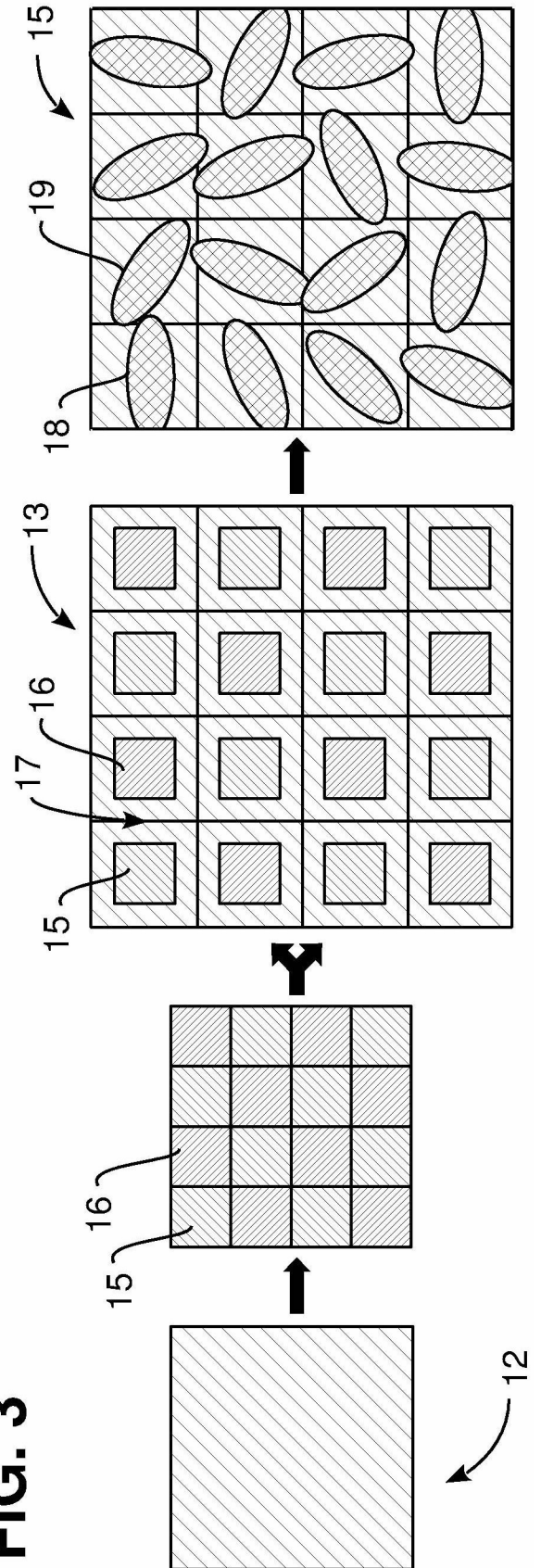
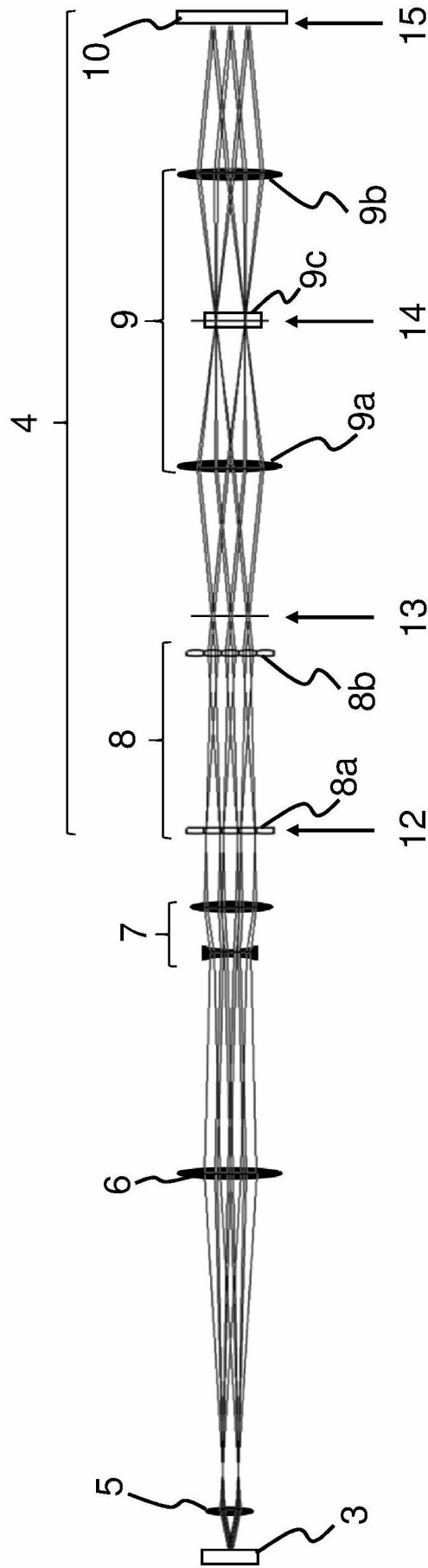


FIG. 3

FIG. 2



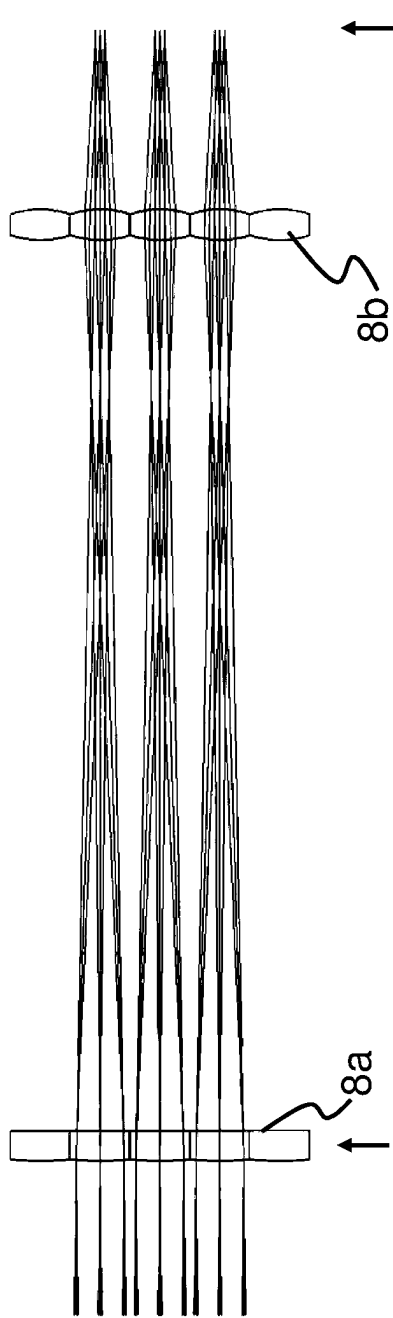


FIG. 4

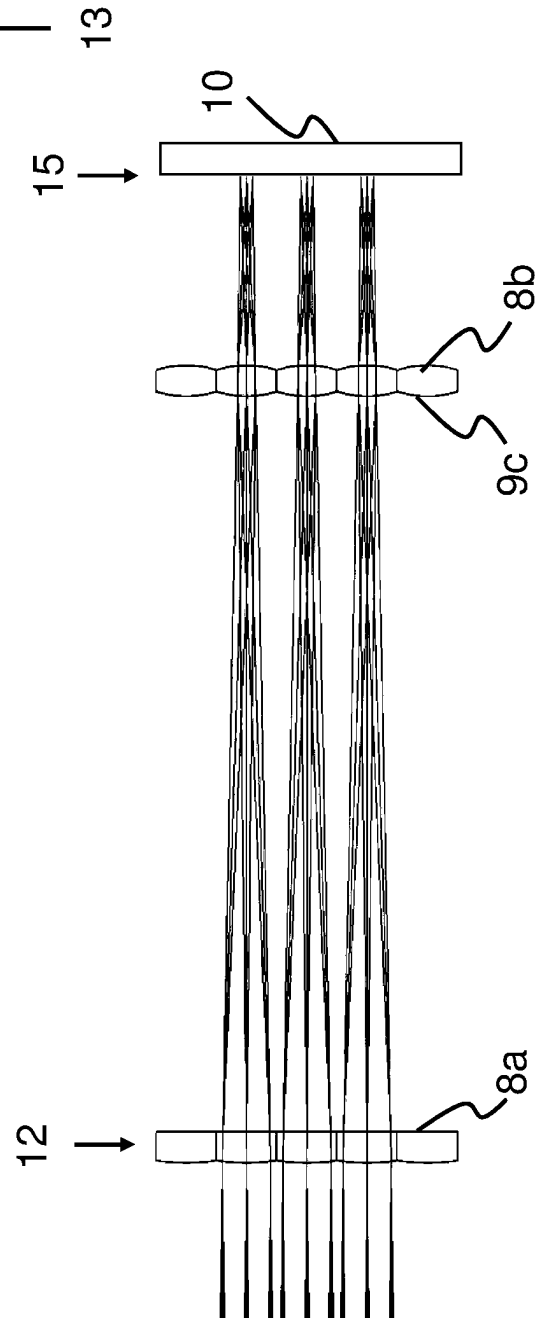


FIG. 5

FIG. 6

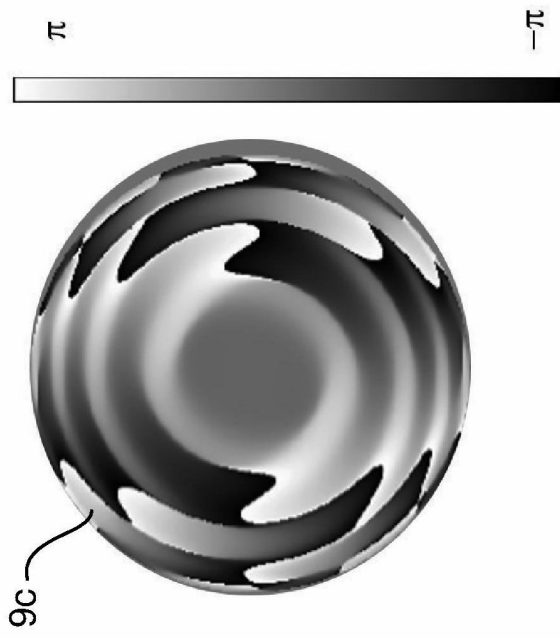


FIG. 7

