



(10) **DE 10 2013 002 640 A1** 2014.08.21

(12) **Offenlegungsschrift**

(21) Aktenzeichen: **10 2013 002 640.7**

(22) Anmeldetag: **15.02.2013**

(43) Offenlegungstag: **21.08.2014**

(51) Int Cl.: **G02B 21/00 (2006.01)**  
**G02B 21/14 (2006.01)**

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

(74) Vertreter:  
**Weber & Heim Patentanwälte, 81479, München, DE**

(72) Erfinder:  
**Schaffer, Jörg, Dr., 37085, Göttingen, DE**

(56) Ermittelter Stand der Technik:

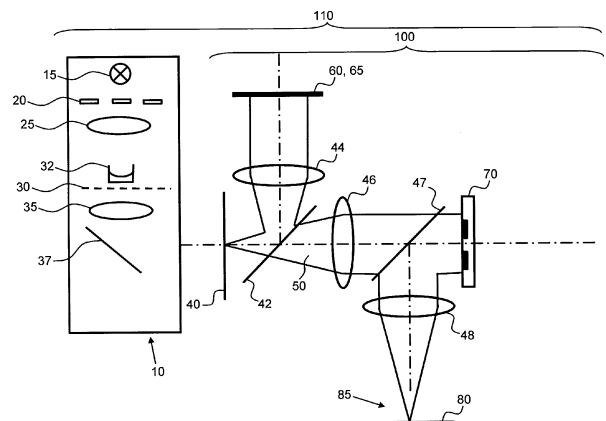
JP	2010- 008 792	A
JP	2007- 293 267	A
JP	2010- 271 537	A
JP	2000- 089 129	A

Rechercheantrag gemäß § 43 Abs. 1 Satz 1 PatG ist gestellt.

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUM BETREIBEN EINES LICHTMIKROSKOPS UND OPTIKANORDNUNG**

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Betreiben eines Lichtmikroskops, welches zumindest folgende Komponenten aufweist: eine Modulatorblende zum Beschränken eines Lichtquerschnitts, eine Probenebene, welche sich in einem Strahlengang hinter der Modulatorblende befindet und in welcher eine Probe positionierbar ist, einen Phasenring, der in dem Strahlengang hinter der Probenebene angeordnet ist und über dessen Querschnitt auftreffendes Licht unterschiedlich beeinflusst wird, und eine Pupillenkamera zum Aufzeichnen eines Pupillenbilds. Das Verfahren weist die Schritte auf, dass mit einem Strahlteiler, der sich im Strahlengang vor dem Phasenring befindet, Licht, das von der Probe kommt, teilweise zu der Pupillenkamera und teilweise zu dem Phasenring geleitet wird, dass ein Pupillenbild, welches durch den Phasenring unbeeinflusst ist, aufgezeichnet wird und gleichzeitig ein Probenbild ausgegeben wird, dass mit elektronischen Bildverarbeitungsmitteln in dem aufgezeichneten Pupillenbild Lage und Größe einer Abbildung der Modulatorblende, welche durch eine Probe beeinflusst und durch den Phasenring unbeeinflusst ist, ermittelt wird, dass eine Relativverstellung zwischen dem Phasenring und der Modulatorblende abhängig von der ermittelten Lage und der ermittelten Größe der Abbildung der Modulatorblende mit elektronischen Steuerungsmitteln durchgeführt wird. Zudem betrifft die Erfindung eine entsprechende Optikanordnung.



## Beschreibung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung bezieht sich in einem ersten Aspekt auf ein Verfahren zum Betreiben eines Lichtmikroskops nach dem Oberbegriff des Anspruchs 1.

**[0002]** In einem zweiten Gesichtspunkt betrifft die Erfindung eine Optikanordnung nach dem Oberbegriff des Anspruchs 6.

**[0003]** Bei Verfahren zum Betreiben eines Lichtmikroskops weist das Lichtmikroskop zumindest folgende Komponenten auf: eine Modulatorblende zum Beschränken eines Lichtquerschnitts, eine Probenebene, welche sich in einem Strahlengang hinter der Modulatorblende befindet und in welcher eine Probe positionierbar ist, einen Phasenring, der in dem Strahlengang hinter der Probenebene angeordnet ist und eine Pupillenkamera zum Aufzeichnen eines Pupillenbilds. Über den Querschnitt des Phasenrings wird auftreffendes Licht unterschiedlich beeinflusst. Bei dem Verfahren wird eine Relativverstellung zwischen dem Phasenring und der Modulatorblende durchgeführt, wobei die Relativverstellung abhängig von einer ermittelten Lage und einer ermittelten Größe der Abbildung der Modulatorblende durchgeführt wird.

**[0004]** Das Lichtmikroskop kann prinzipiell ein beliebiges Lichtmikroskop sein, bei dem eine Modulatorblende und ein Phasenring, die sich in Pupillenebenen befinden können, abhängig voneinander positioniert werden müssen. Insbesondere kann es sich um ein Phasenkontrastmikroskop handeln. Ein Phasenring kann auch als Phasenkontrasteinrichtung bezeichnet werden und weist über seinen Querschnitt zumindest zwei Querschnittsbereiche auf, die sich im Grad der Lichtdurchlässigkeit und/oder in einer erzeugten Phasenverschiebung unterscheiden. Von Licht, das auf den Phasenring trifft, werden daher Teilbündel, die auf verschiedene Querschnittsbereiche treffen, unterschiedlich abgeschwächt und/oder phasenverschoben. Durch diese Phasenverschiebung kann ein ursprünglicher Phasenversatz zwischen den Teilbündeln als Intensitätsunterschied in einem Interferenzbild der Teilbündel dargestellt werden. Die Form des Phasenrings kann dabei grundsätzlich beliebig, beispielsweise rechteckig, sein.

**[0005]** Mit der Relativverstellung soll eine geeignete Ausrichtung des Phasenrings und der Modulatorblende zueinander erreicht werden. So umfasst die Modulatorblende einen lichtdurchlässigen Bereich, der auf einen bestimmten Bereich des Phasenrings abgebildet werden soll, wenn es zu keiner Beeinflussung durch die Probe kommt. Die Relativverstellung erfolgt in der Regel über eine einstellbare Modulatorblende. Diese umfasst einen meist ringförmigen, lichtdurchlässigen Bereich, dessen Größe und Position quer zu dem Strahlengang des Mikroskops einstellbar sind.

**[0006]** Eine Optikanordnung ist zum Anordnen in einem Strahlengang eines Lichtmikroskops geeignet, welches eine Modulatorblende zum Beschränken eines Lichtquerschnitts, eine Probenebene, welche im Strahlengang hinter der Modulatorblende angeordnet ist und in welcher eine Probe positionierbar ist, und Optiken zum Erzeugen eines Zwischenbildes der Probenebene aufweist. Die Optikanordnung umfasst einen Phasenring, über dessen Querschnitt auftreffendes Licht unterschiedlich beeinflussbar ist, und eine Pupillenkamera zum Aufzeichnen eines Pupillenbilds. Eine Relativverstellung zwischen der Modulatorblende und dem Phasenring kann abhängig von einer im Pupillenbild ermittelten Lage und Größe der Abbildung der Modulatorblende durchgeführt werden.

**[0007]** Der Phasenring ist in einem Betriebszustand, in dem sich die Optikanordnung in einem Strahlengang eines Lichtmikroskops befindet, im Strahlengang hinter der Probenebene angeordnet.

**[0008]** Bei einer Gestaltung des Lichtmikroskops als Phasenkontrastmikroskop kann ein beliebiges Lichtmikroskop genutzt werden, solange es zusammen mit der Optikanordnung als Phasenkontrastmikroskop betrieben werden kann. Daher kann jedes Lichtmikroskop, das eine Modulatorblende aufweist, die für eine Phasenkontrastbeleuchtung geeignet ist, in der vorliegenden Offenbarung als Phasenkontrastmikroskop aufgefasst werden.

**[0009]** Die Optiken zum Erzeugen eines Zwischenbildes der Probenebene können Teil eines Objektivs sein oder auch das Objektiv und eventuell weitere optische Mittel umfassen. Die vorgenannten Abbildungsmittel erzeugen eine Abbildung des Zwischenbildes und somit der Probenebene an dem Probenbildausgabeanschluss. An diesem kann eine Kamera oder ein Okular zur direkten Betrachtung angeschlossen werden.

**[0010]** Für eine Qualität des aufgezeichneten Probenbildes ist die Ausrichtung der Modulatorblende und des Phasenrings relativ zueinander entscheidend. Zu diesem Zweck weist das Phasenkontrastmikroskop, das in JP 2010-008793 A beschrieben sind, einen verstellbaren Phasenring und eine verstellbare Modulatorblende auf. Eine Ausgabe des Probenbildes erfolgt sowohl über eine Kamera als auch über ein Okular.

**[0011]** Zudem ist in JP 2005-004088 A eine gattungsgemäße Optikanordnung für ein Phasenkontrastmikroskop beschrieben. Hierbei ist die Modulatorblende axial verstellbar.

**[0012]** Für eine geeignete Positionierung der Modulatorblende relativ zum Phasenring kann eine unerwünschte Beeinflussung durch die Probenform pro-

blematisch sein. Dies kann beispielsweise bei Proben in Probenöpfchen eintreten, welche insbesondere bei Mikrotiter-Platten oder Multiwell-Platten eingesetzt werden. Ist die Probe in einer Flüssigkeit gelöst, so bildet die Flüssigkeit aufgrund der Oberflächenspannung einen Wassermeniskus. Durch dessen gebogene Oberfläche wird Licht in Durchlichtmessungen unerwünscht beeinflusst. Die gebogene Oberfläche der Probenflüssigkeit bewirkt zunächst eine Maßstabsänderung der Abbildung der Modulatorblende. Dieser Effekt ist abhängig von einem momentan betrachteten Probenbereich. Zudem führt eine Verschiebung der Probe, um einen Probenbereich am Rand des Probengefäßes zu untersuchen, zu einer Verschiebung der Abbildung der Modulatorblende quer zu einer optischen Achse des Lichtmikroskops.

**[0013]** Deshalb muss bei einem Wechsel der Probe sowie bei einer Verschiebung der Probe eine erneute Justage der Modulatorblende relativ zum Phasenring erfolgen. Dazu wird bei bekannten Optikanordnungen ein Umbau vorgenommen, durch den anstelle eines Probenbildes ein Pupillenbild ausgegeben wird. Dies kann beispielsweise durch Einfügen einer Bertrand-Linse in den Strahlengang oder durch Verwendung eines Teleskopokulars erfolgen. Unter einer Pupillenebene soll eine Ebene verstanden werden, die über die Fouriertransformation mit der Probenebene zusammenhängt. Die Modulatorblende und der Phasenring sind in der Regel jeweils in einer Pupillenebene angeordnet. Daher kann in dem Pupillenbild deren Ausrichtung kontrolliert werden. Nach einer Relativverstellung zwischen diesen wird herkömmlicherweise wieder zurück zu einer Ausgabe des Probenbildes gewechselt.

**[0014]** Dieses Vorgehen ist zum einen zeitaufwändig. Zum anderen besteht die Gefahr, dass aufgrund einer mangelhaften Ausrichtung zwischen der Modulatorblende und dem Phasenring Probenbilder zu verschiedenen Probenbereichen nicht miteinander vergleichbar sind.

**[0015]** Basierend auf dieser Problematik wurde in US 6,238,911 B1 vorgeschlagen, Korrekturdeckel auf die Probengefäße zu setzen. Die Korrekturdeckel haben eine gebogene Oberfläche, um über eine Linsenwirkung die Folgen der gebogenen Oberfläche der Probenflüssigkeiten auszugleichen. Hieran ist nachteilig, dass vorhandene Probengefäße, für die keine speziellen Korrekturdeckel vorhanden sind, weiterhin den vorgenannten Nachteilen unterliegen. Zudem wird durch die Korrekturdeckel ein Zugang zu der Probenflüssigkeit beschränkt. Dadurch wird das Einbringen von Wirkstoffen oder anderen Substanzen in die Probengefäße behindert.

**[0016]** Um negative Folgen der Probenoberfläche einzuschränken, wird in der vorgenannten Schrift

JP 2010-008793 A anstelle einer ringförmigen Modulatorblende eine Spaltblende verwendet. Entsprechend ist der Phasenring dort stabförmig. Dadurch muss im Wesentlichen nur eine Richtung der Strahlablenkung durch die Probenoberfläche berücksichtigt werden. Zwar kann so das Ausrichten der Modulatorblende und des Phasenrings zueinander vereinfacht werden. Die erreichte Auflösung ist hierbei jedoch nicht isotrop. Zudem ist der manuelle Justageaufwand weiterhin hoch.

**[0017]** Als eine Aufgabe der Erfindung kann angesehen werden, ein Verfahren zum Betreiben eines Lichtmikroskops und eine Optikanordnung zum Anordnen in einem Strahlengang eines Lichtmikroskops anzugeben, mit denen Probenbilder möglichst guter Qualität bei einem möglichst geringen Aufwand für den Benutzer erzeugt werden können.

**[0018]** Diese Aufgabe wird durch das Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 1 und durch die Optikanordnung mit den Merkmalen des Anspruchs 6 gelöst.

**[0019]** Vorteilhafte Varianten des erfindungsgemäßen Verfahrens und bevorzugte Ausgestaltungen der erfindungsgemäßen Optikanordnung sind Gegenstand der abhängigen Ansprüche und werden außerdem in der folgenden Beschreibung, insbesondere im Zusammenhang mit den Figuren, erläutert.

**[0020]** Ein erfindungsgemäßes Verfahren zum Betreiben eines Lichtmikroskops, welches zumindest folgende Komponenten aufweist: eine Modulatorblende zum Beschränken eines Lichtquerschnitts, eine Probenebene, welche sich in einem Strahlengang hinter der Modulatorblende befindet und in welcher eine Probe positionierbar ist, einen Phasenring, der in dem Strahlengang hinter der Probenebene angeordnet ist und über dessen Querschnitt auftreffendes Licht unterschiedlich beeinflusst wird, und eine Pupillenkamera zum Aufzeichnen eines Pupillenbilds, weist die Verfahrensschritte auf, dass mit einem Strahlteiler, der sich im Strahlengang vor dem Phasenring befindet, Licht, das von der Probe kommt, teilweise zu der Pupillenkamera und teilweise zu dem Phasenring geleitet wird, dass ein Pupillenbild, welches durch den Phasenring unbeeinflusst ist, aufgezeichnet wird und gleichzeitig ein Probenbild ausgegeben wird, dass mit elektronischen Bildverarbeitungsmitteln in dem aufgezeichneten Pupillenbild Lage und Größe einer Abbildung der Modulatorblende, welche durch eine Probe beeinflusst und durch den Phasenring unbeeinflusst ist, ermittelt wird, dass eine Relativverstellung zwischen dem Phasenring und der Modulatorblende abhängig von der ermittelten Lage und der ermittelten Größe der Abbildung der Modulatorblende mit elektronischen Steuerungsmitteln durchgeführt wird.

**[0021]** Eine erfindungsgemäße Optikanordnung zum Anordnen in einem Strahlengang eines Lichtmikroskops, welches eine Modulatorblende zum Beschränken eines Lichtquerschnitts, eine Probenebene, welche sich im Strahlengang hinter der Modulatorblende befindet und in welcher eine Probe positionierbar ist, und Optiken zum Erzeugen eines Zwischenbilds der Probenebene aufweist, weist mindestens folgende Komponenten auf: einen Phasenring, über dessen Querschnitt auftreffendes Licht unterschiedlich beeinflussbar ist, Abbildungsmittel, mit denen bei einer Anordnung der Optikanordnung im Strahlengang des Lichtmikroskops das Zwischenbild über den Phasenring an einem Probenbildausgabeanschluss abbildbar ist, eine Pupillenkamera zum Aufzeichnen eines Pupillenbilds und einen Strahlteiler, der im Strahlengang vor dem Phasenring angeordnet ist, zum Leiten von Licht, das von der Probe kommt, teilweise zu der Pupillenkamera und teilweise zu dem Phasenring, wobei die Abbildungsmittel dazu gestaltet sind, zusammen mit dem Strahlteiler ein Pupillenbild zu erzeugen, welches durch den Phasenring unbeeinflusst ist, und das Pupillenbild gleichzeitig zum Abbilden des Zwischenbilds am Probenbildausgabeanschluss zu erzeugen, wobei elektronische Bildverarbeitungsmittel vorhanden sind, mit denen in einem aufgezeichneten Pupillenbild Lage und Größe einer Abbildung der Modulatorblende, welche durch eine Probe beeinflusst und durch den Phasenring unbeeinflusst ist, ermittelbar ist und wobei elektronische Steuerungsmittel vorhanden sind, mit denen eine Relativverstellung zwischen der Modulatorblende und dem Phasenring abhängig von der ermittelten Lage und Größe der Abbildung der Modulatorblende durchführbar ist.

**[0022]** Als ein Kerngedanke der Erfindung kann angesehen werden, die Relativverstellung auf Grundlage einer Auswertung eines Pupillenbilds durchzuführen, in welchem eine Abbildung der Modulatorblende nicht von dem Phasenring beeinflusst oder überlagert ist.

**[0023]** Herkömmlicherweise wird bei einer manuellen Relativverstellung ein Pupillenbild betrachtet, in dem die Abbildungen der Modulatorblende und des Phasenrings überlagern. Während ein Benutzer dieses Pupillenbild betrachtet, führt er die Relativverstellung aus, bis die Abbildungen der Modulatorblende und des Phasenrings in Deckung gebracht sind.

**[0024]** Ein schnelleres und präziseres Bestimmen einer geeigneten Relativverstellung wird durch elektronische Bildverarbeitungsmittel ermöglicht. Eine Positionsermittlung der Abbildung der Modulatorblende kann mit Bildverarbeitungsmitteln besonders genau durchgeführt werden, wenn keine Überlagerung mit einer Abbildung des Phasenrings zu berücksichtigen ist. Dies wird gemäß der Erfindung durch die Anordnung des Strahlteilers vorm Phasenring er-

reicht. Dadurch können die Bildverarbeitungsmittel beispielsweise durch prinzipiell bekannte Auswertungen zur Kantenfindung und/oder auf Grund von Helligkeitsverteilungen eine Position und Größe der Abbildung der Modulatorblende ermitteln. Komplexere Bildverarbeitungsmethoden, die eine Abbildung des Phasenrings miteinbeziehen, sind nicht erforderlich. Zudem können Geschwindigkeitsvorteile gegenüber dem Fall erreicht werden, dass ein Phasenring über Bereiche seines Querschnitts Licht stark absorbiert und womöglich nur für die übrigen Bereiche, in denen Licht größtenteils weitergeleitet wird, genügend Licht für eine elektronische Bildauswertung empfangen wird.

**[0025]** Indem über Bildverarbeitungsmittel und elektronische Steuerungsmittel die Relativverstellung automatisch erfolgt, braucht dem Benutzer nicht zwingend ein Pupillenbild bereitgestellt zu werden. Vorteilhafterweise kann daher eine Betrachtung der Probe durch den Benutzer gleichzeitig zu einer Aufzeichnung und Auswertung einer Abbildung der Modulatorblende in einer Pupillenebene erfolgen. Es ist somit nicht erforderlich, dass zunächst allein ein Pupillenbild ausgegeben wird, mit dem eine Lage der Abbildung der Modulatorblende bestimmt wird, und erst anschließend ein Probenbild ausgegeben wird.

**[0026]** Unter einer Pupillenkamera soll eine Kamera verstanden werden, die so angeordnet ist, dass auf ihrer lichtempfindlichen Fläche ein Pupillenbild abgebildet wird. Dabei kann eine Kamera mit einem oder mehreren ortsauflösenden Lichtdetektoren gebildet sein.

**[0027]** Die Optikanordnung und das Verfahren gemäß der Erfindung können für beliebige Lichtmikroskope geeignet sein, bei denen eine Modulatorblende vor der Probenebene und ein Phasenring hinter der Probenebene relativ zueinander eingestellt werden sollen. Außer bei einem Phasenkontrastmikroskop ist dies beispielsweise bei der Hoffmann-Modulationskontrastmikroskopie der Fall. Hierbei kann die Modulatorblende einen, insbesondere rechteckigen, Spalt aufweisen. Durch die Position des Spalts wird Licht ausschließlich schräg auf die Probenebene geführt. Der Phasenring umfasst mehrere Bereiche mit unterschiedlicher Lichtdurchlässigkeit. Beispielsweise können ein Bereich mit möglichst vollständiger Lichtdurchlässigkeit, ein teildurchlässiger Bereich und ein Bereich mit im Wesentlichen keiner Lichtdurchlässigkeit vorhanden sein. Ein Phasengradient in der Probe bestimmt den Winkel einer Brechung von auftreffendem Licht. Daher wird abhängig vom Phasengradienten Licht auf einen der verschiedenen Bereiche des Phasenrings geleitet. Somit können Phasengradienten der Probe in Helligkeitsunterschiede überführt werden.

**[0028]** Je nach Mikroskopieverfahren kann der Phasenring eine Phasenverschiebung, eine Lichtabsorption, eine Strahlablenkung und/oder eine Polarisationsänderung bewirken. So kann die Erfindung auch für Mikroskope eingesetzt werden, die den Differentialinterferenzkontrast (DIC) oder PlasDIC nutzen. Bei letzterem wird der Phasenring durch zwei Polarisatoren und ein dazwischen angeordnetes Wollaston-Prisma gebildet, wobei die Polarisatoren hinsichtlich der Durchlassrichtungen zueinander gekreuzt angeordnet sind. Das Wollaston-Prisma teilt Licht polarisationsabhängig auf zwei räumlich getrennte Pfade auf.

**[0029]** Unabhängig von der konkreten Ausgestaltung des Mikroskops wird das erfindungsgemäße Verfahren bevorzugt während des Mikroskopbetriebs durchgängig ausgeführt. Dadurch wird das Verfahren auch nach jedem Verschieben der Probe automatisch durchgeführt. So kann eine durch die Probe oder die Probenflüssigkeit veränderte Auswirkung auf die Abbildung der Modulatorblende umgehend erkannt und berücksichtigt werden. Es kann vorgesehen sein, dass verschiedene Relativverstellungen abhängig vom untersuchten Probenbereich automatisch vorgenommen werden.

**[0030]** Die Relativverstellung kann prinzipiell sowohl mit einer einstellbaren Modulatorblende als auch mit einem einstellbaren Phasenring erfolgen. Die Nutzung einer einstellbaren Modulatorblende hat den Vorteil, dass solche bereits bei zahlreichen Lichtmikroskopen Anwendung findet. Bei diesen müssen also weniger Komponenten zum Ausführen des erfindungsgemäßen Verfahrens hinzugefügt werden.

**[0031]** Besondere Vorteile werden aber erreicht, wenn die Relativverstellung mit einem Phasenring durchgeführt wird, über dessen Querschnitt eine Lichtintensität und eine Phasenbeeinflussung von Licht variabel einstellbar sind. Hierbei wird, bevorzugt ausschließlich, der Phasenring abhängig von einer durch die Probe bedingte Beeinflussung der Position und Größe der Abbildung der Modulatorblende eingestellt. Es ist somit keine Verstellung der Beleuchtung über die Modulatorblende nötig. Durch die unveränderte Beleuchtung können Probenbilder zu verschiedenen Probenbereichen besonders gut miteinander verglichen werden.

**[0032]** Ein einstellbarer Phasenring kann gegenüber einer einstellbaren Modulatorblende außerdem zu einer größeren nachweisbaren Lichtmenge führen. So wird abhängig von der Geometrie des genutzten Probengefäßes schräg einfallendes Licht an Wänden des Probengefäßes beschnitten. Ein Verstellen der Modulatorblende kann dazu führen, dass ein noch größerer Anteil des einfallenden Lichts durch die Wände beschnitten wird. Dies wird durch einen einstellbaren Phasenring vorteilhafterweise vermieden.

**[0033]** Als weiterer Vorteil kann bei einem einstellbaren Phasenring auch eine Phasenverschiebung zwischen Hintergrundlicht und von der Probe abgelenktem Licht variabel einstellbar sein. Dies ist mit einer einstellbaren Modulatorblende nicht möglich.

**[0034]** Zudem werden über einen einstellbaren Phasenring kompaktere Bauformen der Optikanordnung der Erfindung ermöglicht. So sind für einen Phasenring oder eine Modulatorblende, die über die elektronischen Steuerungsmittel einstellbar sind, elektronische Stellglieder erforderlich. Bei einem einstellbaren Phasenring können diese nahe an den übrigen Komponenten der Optikanordnung angeordnet sein. Dies ist besonders wichtig, wenn die Optikanordnung als separate Vorrichtung angeboten wird, mit der ein herkömmliches Lichtmikroskop in einfacher Weise ausgerüstet werden soll.

**[0035]** Zweckmäßigerweise können eine Form des Phasenrings und der Modulatorblende gleich gewählt sein. Beispielsweise können beide rechteckförmig oder ringförmig sein. Die Relativverstellung erfolgt bevorzugt so, dass der Phasenring und die Abbildung der Modulatorblende konzentrisch zueinander liegen. Haben der Phasenring und die Modulatorblende eine Ringform, so stimmen folglich die Mittelpunkte der Ringformen des Phasenrings und der Abbildung der Modulatorblende überein.

**[0036]** Weiterhin kann mit der Relativverstellung eine durch die Probe bedingte Verformung der Abbildung der Modulatorblende kompensiert werden. So kann die Abbildung einer ringförmigen Modulatorblende geringfügig von einer Ringform abweichen. Dies kann kompensiert werden, indem der Phasenring auf die ermittelte Form der Abbildung der Modulatorblende eingestellt wird.

**[0037]** Schließlich kann auch eine durch die Probe hervorgerufene Größenbeeinflussung der Abbildung der Modulatorblende erfasst und kompensiert werden. So kann als Relativverstellung die Größe eines Bereichs des Phasenrings, in dem eine bestimmte Phasenbeeinflussung und/oder Lichtabschwächung erfolgt, umso größer eingestellt werden, je stärker die Probe die Abbildung der Modulatorblende vergrößert. Insbesondere kann der genannte Bereich des Phasenrings in Deckung mit der Abbildung der Modulatorblende gebracht werden.

**[0038]** Die vorgenannten Einstellungen können prinzipiell erreicht werden, indem allein das Pupillenbild ausgewertet wird. Für noch genauere Ergebnisse kann aber auch das Probenbild herangezogen werden. Hierzu kann vorgesehen sein, dass das Probenbild mit einer Probenkamera aufgezeichnet wird, dass das aufgezeichnete Probenbild mit elektronischen Bildverarbeitungsmitteln im Hinblick auf eine Bewertungsgröße ausgewertet wird und dass die Re-

lativverstellung zwischen dem Phasenring und der Modulatorblende zusätzlich abhängig von der Auswertung durchgeführt wird.

**[0039]** Abhängig von der genutzten Bewertungsgröße wird eine Helligkeitsverteilung im Probenbild in verschiedener Weise ausgewertet. Beispielsweise kann als Bewertungsgröße ein Kontrast im Probenbild bestimmt werden. Durch die Relativverstellung soll sodann der Kontrast maximiert werden. Die Relativverstellung kann von einer Einstellung ausgehen, die zuvor über das Pupillenbild ermittelt und vorgenommen wurde. Zum Maximieren des Kontrasts kann die Relativverstellung sodann iterativ erfolgen. Hierzu kann beispielsweise eine zufällig ausgewählte Einstellungsänderung des Phasenrings oder der Modulatorblende erfolgen, woraufhin die Kontraständerung bestimmt wird. Die Einstellungsänderungen können zweckmäßigerweise auf eine oder mehrere Änderungsarten beschränkt sein, beispielsweise eine Größenänderung und/oder eine Verschiebung eines Bereichs des Phasenrings.

**[0040]** In analoger Weise kann eine Relativverstellung auch bei einer anderen Bewertungsgröße erfolgen. So kann als Bewertungsgröße eine Kantenaufhellung im Probenbild bestimmt werden. Sie werden auch als Halos bezeichnet und sollten möglichst gering sein. Unter einer Kantenaufhellung ist zu verstehen, dass an einer Kante, die zwei Bildbereiche verschiedener Helligkeiten voneinander trennt, ein heller Bereich oder ein heller Umriss der Kante auftritt. Diese hellen Bereiche entsprechen nicht einer Probenstruktur. Vielmehr beruhen sie darauf, dass unterschiedliche Probenbereiche verschiedene Phasenverschiebungen erzeugen, während am Phasenring eine bestimmte Phasenverschiebung eingestellt ist. Idealerweise sollte daher die Phasenverschiebung, die mit dem Phasenring bereitgestellt wird, abhängig von der jeweiligen Probe oder dem jeweiligen Probenbereich geändert werden. Um die Kantenaufhellung im Probenbild zu minimieren, können die elektronischen Steuermittel dazu eingerichtet sein, die Größe einer Phasenverschiebung, die mit dem Phasenring erzeugt wird, zu variieren. Für verschieden große Phasenverschiebungen werden jeweils die Kantenaufhellungen im Probenbild ermittelt. Die PhasenringEinstellung, die zur geringsten Kantenaufhellung führt, wird sodann als PhasenringEinstellung ausgewählt und beibehalten.

**[0041]** Die Form und Größe des Bereichs stärkerer Lichtabschwächung des einstellbaren Phasenrings kann demnach allein abhängig vom Pupillenbild oder auch zusätzlich abhängig vom Probenbild eingestellt werden. Die Größe der Phasenverschiebung in diesem Bereich wird hingegen allein aus dem Probenbild ermittelt.

**[0042]** Der Strahlteiler kann prinzipiell beliebiger Art sein und beispielsweise einen teildurchlässigen Spiegel umfassen. Dieser kann auch so gestaltet sein, dass er polarisationsabhängig Licht entweder reflektiert oder transmittiert. Bevorzugt wird mit dem Strahlteiler ein größerer Lichtanteil zum Probenbildausgabeanschluss als zur Pupillenkamera geleitet. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis im Probenbild wird dann durch die gleichzeitige Erzeugung des Pupillenbilds nur geringfügig beeinflusst. Bevorzugt werden mit dem Strahlteiler mehr als 70% des auftreffenden Lichts zum Probenbildausgabeanschluss weitergeleitet. Dieser Anteil kann verhältnismäßig groß ausfallen, da der Strahlteiler im Strahlengang vor dem Phasenring angeordnet ist. Weil durch den Phasenring eine beträchtliche Lichtabschwächung beabsichtigt ist, kann durch den Strahlteiler vor dem Phasenring leichter als hinter dem Phasenring genügend Licht zur Pupillenkamera abgezweigt werden, damit diese ein Pupillenbild ausreichend guter Qualität aufzeichnen kann.

**[0043]** Der Phasenring weist bevorzugt mindestens eine phasenverschiebende Matrix mit Flüssigkristallbereichen auf, die zwischen Zuständen schaltbar sind, in welchen sie eine Phase von durchlaufendem Licht unterschiedlich beeinflussen. Solche Phasenringen können auch als Liquid Crystal Phase Modulator oder LCPM bezeichnet werden. Durch unterschiedliche Ausrichtungen der Flüssigkristalle können zwei oder auch mehr verschiedene Phasenbeeinflussungen des durchlaufenden Lichts eingestellt werden. Durch einen LCPM kann in einfacher und schneller Weise eine bestimmte Phasenverschiebung für einen beliebig geformten Querschnittsbereich eingestellt werden. Dabei wird außerhalb dieses Bereichs eine andere Phasenverschiebung erzeugt.

**[0044]** Alternativ ist ein reflektierender Phasenring möglich, der mit einem Spiegel mit matrixförmig an dessen Rückseite angeordneten Piezoelementen gebildet ist. Über die Piezoelemente können Krümmungen der Spiegeloberfläche eingestellt werden. Über die Querschnittsfläche des Spiegels sind somit die Lichtlaufwege für auftreffendes Licht und damit die Phasenverschiebungen unterschiedlich.

**[0045]** Prinzipiell kann der Phasenring zusätzlich über mehrere mechanisch bewegbare Blendenflügel verfügen. Hierdurch kann auch eine Lichtabschwächung erreicht werden.

**[0046]** Wird eine Matrix mit Flüssigkristallbereichen verwendet, kann der Phasenring auch zusätzlich polarisationsbeeinflussende Mittel vor der Matrix aus Flüssigkristallbereichen aufweisen. Mit den polarisationsbeeinflussenden Mitteln ist zum Einstellen einer Lichtabsorption durch die Flüssigkristallbereiche eine Polarisationsrichtung von Licht einstellbar. Bei den

polarisationsbeeinflussenden Mitteln kann es sich insbesondere um eine  $\lambda/2$ -Platte handeln.

**[0047]** Bevorzugt weist der Phasenring zum Einstellen einer Lichtabsorption eine weitere Matrix mit unabhängig voneinander einstellbaren Matrixelementen auf. Die Anzahl an Matrixelementen der weiteren Matrix und der phasenverschiebenden Matrix stimmen bevorzugt überein. Vorzugsweise ist die weitere Matrix ebenfalls mit schaltbaren Flüssigkristallbereichen gebildet. Für eine möglichst gute Bildqualität werden mit beiden Matrizen bevorzugt gleiche Formen eingestellt. Dadurch kann für denselben Anteil des Lichts sowohl eine Lichtabschwächung als auch eine bestimmte Phasenverschiebung erreicht werden.

**[0048]** Bei einer bevorzugten Variante der erfindungsgemäßen Optikanordnung ist der Phasenring ein transmittierender Phasenring, mit dem Licht zum Erzeugen des Probenbilds durchlassbar ist. Durch die transmittierende Ausführung kann die Optikanordnung verhältnismäßig einfach in ein Mikroskopstativ integriert werden. Hierdurch können die Abbildungsmittel der Optikanordnung auch zumindest teilweise durch Linsen und/oder Spiegel gebildet sein, die ohnehin in einem Mikroskopstativ vorhanden sind.

**[0049]** Bei einer bevorzugten Alternative ist der Phasenring ein reflektierender Phasenring, mit dem Licht zum Erzeugen des Probenbilds reflektierbar ist. Bei einer Gestaltung des Phasenrings als LCPM kann hiermit eine bessere Bildqualität erreicht werden. Zudem werden bei einer reflektierenden Gestaltung die Flüssigkristalle des LCPM zweimal durchlaufen, womit die maximal mögliche Phasenverschiebung doppelt so groß wie bei einer vergleichbaren transmittierenden Ausführung ist.

**[0050]** Bei einem reflektierenden Phasenring kann im Strahlengang vor dem Phasenring ein weiterer Strahlteiler vorhanden sein. Dieser leitet Licht, das von einem Objektiv und somit von der Probe kommt, zum Phasenring weiter und leitet Licht, das vom Phasenring kommt, zum Probenbildausgabeanschluss weiter. Dieser Strahlteiler kann insbesondere polarisationsabhängig Licht transmittieren oder reflektieren. Dadurch kann erreicht werden, dass Licht vom Objektiv kommend im Wesentlichen vollständig zum Phasenring geleitet wird und Licht vom Phasenring im Wesentlichen vollständig zum Probenbildausgabeanschluss geleitet wird.

**[0051]** Ein besonders leichtes Nachrüsten herkömmlicher Lichtmikroskope wird ermöglicht, wenn die Optikanordnung Anschlussmittel aufweist zum Verbinden mit einem Kameraanschluss des Lichtmikroskops, insbesondere eines Phasenkontrastmikroskops. An dem Kameraanschluss des Lichtmi-

kroskops kann ein Zwischenbild der Probenebene bereitgestellt werden, welches von der Optikanordnung weiter abgebildet wird. Vorteilhafterweise sind bei dieser Ausführung der Erfindung nicht zwingend Veränderungen im Strahlengang innerhalb eines Mikroskopstativs des Lichtmikroskops erforderlich. Vielmehr genügt es, die Optikanordnung an einem Kameraanschluss eines herkömmlichen Lichtmikroskops anzuschließen. Zweckmäßigerweise kann dabei das Objektiv des Lichtmikroskops ohne Phasenring zur Phasenschiebung und Lichtabschwächung ausgestattet sein.

**[0052]** Eine große Flexibilität im Einsatz und ein leichtes Nachrüsten werden erreicht, wenn die Optikanordnung als Zwischentubus gebildet ist. Dieser weist erste Anschlussmittel zum Verbinden mit einem Tubusanschluss eines Lichtmikroskops auf und zweite Anschlussmittel zum Anschließen einer Kamera und/oder eines Okulars. Wie zuvor beschrieben, kann auch hier ein herkömmliches Lichtmikroskop leicht nachgerüstet werden. Dabei sind keine Umbauten an optischen Komponenten erforderlich, die am Mikroskopstativ gehalten werden. Zusätzliche Vorrichtungen zum Anschließen an den Tubusanschluss eines herkömmlichen Lichtmikroskops können vorteilhafterweise bei der vorliegenden Ausführungsform weiterhin genutzt werden, indem sie an die zweiten Anschlussmittel der Optikanordnung verbunden werden.

**[0053]** Die Erfindung betrifft auch ein Lichtmikroskop mit einer erfindungsgemäßen Optikanordnung. Diese kann, wie zuvor beschrieben, als nachrüstbare Vorrichtung ausgeführt sein. Alternativ kann der Phasenring der Optikanordnung aber auch innerhalb eines Mikroskopstativs des Lichtmikroskops aufgenommen sein. Im Sinne der Erfindung kann unter einem Mikroskopstativ eine Mikroskopbasis verstanden werden, welche zumindest Halterungsmittel für ein Objektiv und für eine Probenhalterung oder einen Probentisch umfasst. Insbesondere kann ein Mikroskopstativ optische Komponenten zum Erzeugen eines Zwischenbilds der Probenebene umfassen. Ist der Phasenring innerhalb des Mikroskopstativs aufgenommen, können die Abbildungsmittel der Optikanordnung zumindest teilweise durch optische Komponenten gebildet sein, die ohnehin an Mikroskopstativen vorhanden sind. Die Gesamtzahl optischer Komponenten kann dadurch geringer gehalten werden, womit Vorteile in der Abbildungsqualität und besonders raumsparende Ausführungsformen realisierbar sind.

**[0054]** Die erfindungsgemäße Optikanordnung ist bevorzugt zur automatischen Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens und dessen Varianten eingerichtet. Zusätzliche bevorzugte Verfahrensvarianten ergeben sich durch den Betrieb der Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Optikanordnung.

**[0055]** Weitere Merkmale und Vorteile der Erfindung werden mit Bezug auf die beigegeführten schematischen Figuren beschrieben. Hierin zeigen:

**[0056]** Fig. 1 eine ringförmige Modulatorblende;

**[0057]** Fig. 2 einen ringförmigen Phasenring;

**[0058]** Fig. 3 einen Phasenring und die Abbildung einer Modulatorblende;

**[0059]** Fig. 4 einen Phasenring und eine Abbildung einer Modulatorblende, wobei ein Ringbereich der Abbildung der Modulatorblende größer ist als ein Ringbereich des Phasenrings;

**[0060]** Fig. 5 einen Phasenring und eine Abbildung einer Modulatorblende, die relativ zum Phasenring versetzt ist;

**[0061]** Fig. 6 eine schematische Darstellung eines ersten Ausführungsbeispiels eines erfindungsgemäßen Lichtmikroskops mit einer erfindungsgemäßen Optikanordnung und

**[0062]** Fig. 7 eine schematische Darstellung eines weiteren Ausführungsbeispiels eines erfindungsgemäßen Lichtmikroskops mit einer erfindungsgemäßen Optikanordnung.

**[0063]** Gleiche und gleich wirkende Bestandteile sind in den Figuren in der Regel mit denselben Bezugszeichen gekennzeichnet.

**[0064]** Fig. 1 zeigt schematisch eine Modulatorblende **20** eines erfindungsgemäßen Lichtmikroskops. Die Modulatorblende **20** hat einen lichtdurchlässigen Bereich und einen lichtblockierenden Bereich. Im dargestellten Beispiel ist der lichtdurchlässige Bereich ringförmig. Die Modulatorblende wird in einer Pupillenebene eines Kondensors des Lichtmikroskops positioniert. Durch die Position des lichtdurchlässigen Bereichs und des lichtblockierenden Bereichs wird erreicht, dass im Wesentlichen kein Licht senkrecht, das heißt entlang einer optischen Achse, in die Probenebene des Lichtmikroskops geführt wird. Vielmehr gelangt das Licht allein schräg auf die Probenebene. Eine solche Konfiguration ist für die Bildqualität eines als Phasenkontrastmikroskop betriebenen Lichtmikroskops wichtig.

**[0065]** Auch bei anderen Mikroskopieverfahren wird eine Modulatorblende verwendet. So wird beispielsweise beim Hoffmann-Phasenkontrast eine Modulatorblende mit einer in der Regel schlitzförmigen Öffnung genutzt. Das Verfahren, die Optikanordnung und das Lichtmikroskop der Erfindung können daher auch für andere Mikroskopieverfahren als dem (Zernike-)Phasenkontrastverfahren genutzt werden. Im Folgenden wird auf Ausführungen für das Phasen-

kontrastverfahren eingegangen. Für andere Mikroskopieverfahren kann eine andere Gestaltung, insbesondere Formung, der Modulatorblende und des Phasenrings vorgesehen sein.

**[0066]** Mit der ringförmigen Modulatorblende **20** fällt Licht schräg auf eine Probe in der Probenebene ein. Ein Teil des schräg einfallenden Lichts wird abgelenkt, insbesondere gebeugt oder gebrochen. Ein großer Anteil des Lichts bewegt sich aber ohne Ablenkung in der Probe im Wesentlichen geradlinig fort. Dieser Lichtanteil wird auch als Hintergrundlicht bezeichnet. Das von der Probe abgelenkte Licht kann eine Phasenverschiebung relativ zum Hintergrundlicht erfahren haben. Diese Phasenverschiebung wird bei einem Phasenkontrastmikroskop sichtbar gemacht, indem die Phasenverschiebung in eine Lichtintensitätsdifferenz überführt wird. Dies wird durch Interferenz des Hintergrundlichts mit dem von der Probe abgelenkten Licht erreicht. Dazu ist eine zusätzliche Phasenverschiebung zwischen dem Hintergrundlicht und dem abgelenkten Licht erforderlich, welche über einen Phasenring erzeugt wird. Zudem erfolgt über den Phasenring eine Lichtabschwächung des Hintergrundlichts.

**[0067]** Ein solcher Phasenring **70** ist schematisch in Fig. 2 dargestellt. Der Phasenring **70** hat im dargestellten Beispiel eine Ringform und wird ebenfalls in einer Pupillenebene des Lichtmikroskops angeordnet, das heißt in einer Ebene, die zu der Ebene der Modulatorblende **20** konjugiert ist. Für die Positionierung des Phasenrings **70** ist wichtig, dass der lichtdurchlässige Bereich der Modulatorblende **20** auf den in Fig. 2 schraffiert dargestellten Bereich abgebildet wird. In diesem Bereich wird auftreffendes Licht abgeschwächt und in der Phase relativ zu Licht verschoben, welches außerhalb des schraffierten Bereichs auf den Phasenring trifft.

**[0068]** In Fig. 3 ist schematisch der Fall gezeigt, dass der Phasenring **70** in Deckung gebracht ist mit einer Abbildung der Modulatorblende **20**, das heißt einer Abbildung in die Ebene des Phasenrings **70**. Die Deckung soll im Mikroskopbetrieb erreicht werden, wo die Abbildung der Modulatorblende **20** durch eine in der Probenebene angeordnete Probe beeinflusst sein kann.

**[0069]** Dies ist insbesondere bei Proben bedeutsam, die in einer Flüssigkeit in einem Probentöpfchen vorliegen. Solche Probentöpfchen werden beispielsweise in Mikrotiter- oder Multiwell-Platten verwendet. Die Probenflüssigkeit bildet im Allgemeinen eine gebogene Oberfläche zu den Wänden des Probengefäßes hin aus. Diese gebogene Oberfläche kann wie eine Linse wirken.

**[0070]** Wird ein zentraler Bereich innerhalb des Probengefäßes untersucht, so kann die gebogene Ober-



fläche der Probenflüssigkeit eine Vergrößerung oder Verkleinerung einer Abbildung bewirken. Ein solcher Fall ist schematisch in **Fig. 4** gezeigt. Hier ist eine Abbildung der Modulatorblende **20** vergrößert gegenüber dem Beispiel aus **Fig. 3**. Idealerweise sollten daher in diesem Fall die Abmessungen des Phasenrings **70** vergrößert oder die Abmessungen des lichtdurchlässigen Bereichs der Modulatorblende verkleinert werden.

**[0071]** Weitere Schwierigkeiten werden durch eine gebogene Oberfläche der Probenflüssigkeit erzeugt, wenn ein Bereich außerhalb des Zentrums des Probengefäßes untersucht wird. In diesem Fall kann die gebogene Oberfläche der Probenflüssigkeit eine Neigung des durchlaufenden Lichts bewirken. Dies resultiert in einer Verschiebung der Abbildung der Modulatorblende **20** innerhalb der Ebene des Phasenrings **70**, wie in **Fig. 5** dargestellt. Erfolgt keine Relativverstellung zwischen der Modulatorblende **20** und dem Phasenring **70**, wird die Bildqualität signifikant verschlechtert. Für eine gute Bildqualität ist es deshalb erforderlich, dass eine Einstellung der Modulatorblende und des Phasenrings zueinander für jede Probe neu vorgenommen wird. Zudem sollte diese Einstellung bei einer Änderung eines momentan untersuchten Probenbereichs angepasst werden.

**[0072]** Durch das erfindungsgemäße Lichtmikroskop und die erfindungsgemäße Optikanordnung können diese Einstellungsänderungen automatisch ausgeführt werden, während einem Benutzer weiterhin ein Probenbild ausgegeben wird. Es ist also nicht erforderlich, die Ausgabe des Probenbilds zu unterbrechen, um eine Auswirkung der Oberfläche der Probenflüssigkeit auf die Position und die Abmessungen der Abbildung der Modulatorblende zu ermitteln. Dadurch können Messunterbrechungen vermieden und der Benutzerkomfort verbessert werden. Zudem kann in kurzer Zeit eine besonders genaue Anpassung des Phasenrings und der Modulatorblende relativ zueinander erfolgen.

**[0073]** Ein erstes Ausführungsbeispiel eines erfindungsgemäßen Lichtmikroskops, mit dem diese Vorteile erreicht werden, ist schematisch in **Fig. 6** dargestellt. Das Lichtmikroskop **110** umfasst ein Mikroskopstativ **10** und eine erfindungsgemäße Optikanordnung **100**.

**[0074]** Eine Lichtquelle **15**, die zum Mikroskopstativ **10** gehören kann oder an diese anschließbar sein kann, sendet Licht **50** in Richtung einer Probenebene **30**. Zunächst durchläuft das Licht eine Modulatorblende **20**. Diese befindet sich in einer Pupillenebene, das heißt einer Ebene, die zu der Probenebene **30** durch eine Fouriertransformation bestimmt ist. Sodann wird das Licht mit einem Kondensator **25** auf die Probenebene **30** fokussiert. In dieser kann eine Probe **32** positioniert werden. Dargestellt ist hierbei ei-

ne gebogene Oberfläche der Probenflüssigkeit. Licht von der Probe wird mit Optiken **35**, die insbesondere ein Objektiv umfassen können, weitergeleitet, womit in einer Zwischenbildebene **40** ein Bild der Probe **32** erzeugt werden kann. Im dargestellten Beispiel umfasst das Mikroskopstativ **10** zudem Umlenkmittel **37**, beispielsweise einen Spiegel, durch den die Zwischenbildebene im Bereich eines Anschlusses des Mikroskopstativs **10** erzeugt wird. Bei diesem Anschluss kann es sich um einen Kameraanschluss und/oder einen Anschluss für einen Tubus oder Zwischentubus handeln.

**[0075]** Die erfindungsgemäße Optikanordnung **100** umfasst mechanische Verbindungsmittel (nicht dargestellt), mit denen sie an den Anschluss des Mikroskopstativs **10** befestigt ist. Vorteilhafterweise kann dadurch die Optikanordnung **100** auch mit herkömmlichen Mikroskopstativen genutzt werden.

**[0076]** Als wesentliche Komponenten weist die Optikanordnung **100** eine Pupillenkamera **65**, einen Probenbildausgabeanschluss **85** und einen einstellbaren Phasenring **70** auf.

**[0077]** Die Pupillenkamera **65** befindet sich in einer Pupillenebene **60**. Dadurch kann sie ein Bild der Modulatorblende **20** aufzeichnen. Gleichzeitig zu dieser Aufzeichnung wird im Bereich des Probenbildausgabeanschlusses **85** in einer Bildebene **80** ein Bild der Probe **32** erzeugt.

**[0078]** Hierzu ist zunächst hinter der Zwischenbildebene **40** ein Strahlteiler **42** angeordnet, der einen Teil des auftreffenden Lichts **50** reflektiert und den übrigen Teil transmittiert. Mit einem dieser Anteile wird über eine Optik **44** ein Pupillenbild in der Pupillenebene **60** erzeugt. Der übrige Teil des Lichts **50** wird mit einer Optik **46** in Richtung des Phasenrings **70** und der Bildebene **80** geleitet.

**[0079]** Zwischen der Optik **46** und dem Phasenring **70** ist ein weiterer Strahlteiler **47** angeordnet, der auftreffendes Licht **50** entweder transmittiert oder reflektiert. Von der Optik **46** kommendes Licht **50** wird im Wesentlichen vollständig vom Strahlteiler **47** zum Phasenring **70** geleitet, im dargestellten Beispiel also im Wesentlichen vollständig transmittiert. Der Phasenring **70** ist hier also reflektierender Phasenring **70** ausgeführt, wodurch er einen Anteil des auftreffenden Lichts **50** zurückwirft. Dieser zurückgeworfene Anteil wird vom Strahlteiler **47** im Wesentlichen vollständig in Richtung der Bildebene **80** geleitet, im dargestellten Fall also reflektiert. Diese Strahlteilung kann beispielsweise polarisationsabhängig erfolgen. Für eine geeignete Polarisationsrichtung des Lichts können weitere, nicht dargestellte polarisationsändernde Mittel im Strahlengang angeordnet werden. Alternativ kann der Strahlteiler **47** auch ein teildurch-

lässiger Spiegel sein, beispielsweise ein 50:50-Teiler, womit jedoch größere Lichtverluste einhergehen.

**[0080]** Zum Erzeugen eines Probenbilds in der Bildebene **80** ist vor dieser und hinter dem Strahlteiler **47** eine weitere Optik **48** vorhanden.

**[0081]** Die Optiken **44**, **46** und **48** können jeweils durch eine einzelne Linse oder auch eine Linsengruppe aus mehreren miteinander verkitteten oder voneinander beabstandeten Linsen gebildet sein. Zusätzlich oder an Stelle von Linsen können auch gebogene Spiegel verwendet werden.

**[0082]** Die Anzahl insgesamt erforderlicher Optiken **44**, **46** und **48** kann bei gleichzeitig verhältnismäßig einfachem Optikdesign gering gehalten werden, wenn die Abstände von diesen zueinander oder zu einer Pupillen- oder Bildebene jeweils  $1 f$  beziehungsweise  $2 f$  betragen. Dabei bezeichnet  $f$  die Brennweite der jeweiligen Optik **44**, **46** und **48** und kann für die verschiedenen Optiken **44**, **46** und **48** unterschiedlich sein.

**[0083]** Am Probenbildausgabeanschluss **85** kann eine Probenkamera und/oder ein Okular angeschlossen sein. Bevorzugt ist der Probenbildausgabeanschluss **85** für eine mechanisch lösbare Verbindung zu einer Kamera oder einem Okular gebildet, beispielsweise über einen Schraub- oder Steckverschluss.

**[0084]** Die Einstellung des Phasenrings **70** soll abhängig von der Beeinflussung der Abbildung der Modulatorblende **20** durch die Probe **32**, das heißt durch die Oberfläche der Probenflüssigkeit, erfolgen. Hierzu wird zunächst das Pupillenbild, das mit der Pupillenkamera **65** aufgezeichnet wird, mit elektronischen Bildverarbeitungsmitteln (nicht dargestellt) ausgewertet. Diese erkennen eine Lage oder Position der Modulatorblendenabbildung im Pupillenbild. Insbesondere werden eine durch die Probe **32** bedingte Größenänderung und Verschiebung der Modulatorblendenabbildung erkannt.

**[0085]** Diese Daten werden von elektronischen Steuerungsmitteln (nicht dargestellt) genutzt, um den Phasenring **70** einzustellen. Prinzipiell kann auch vorgesehen sein, dass die elektronischen Steuerungsmittel die Modulatorblende **20** an Stelle des Phasenrings **70** verstellen können. Um keine apparativen Änderungen an herkömmlichen Mikroskopstativen vornehmen zu müssen, wird aber bevorzugt der Phasenring **70** eingestellt. Über die Querschnittsfläche des Phasenrings **70** sind die Größe, Form und Position eines Bereichs einstellbar, in dem eine Lichtabschwächung und eine Phasenverschiebung anders ist, als in einem restlichen Bereich des Phasenrings **70**.

**[0086]** Wird beispielsweise mit den Bildverarbeitungsmitteln erkannt, dass durch die Probe **32** die Modulatorblende **20** vergrößert dargestellt wird, so wird auch der genannte Bereich des Phasenrings **70** gegenüber einer Ausgangseinstellung vergrößert. Wird erkannt, dass die Probe **32** eine Verschiebung der Abbildung der Modulatorblende **20** bewirkt, so wird der genannte Bereich des Phasenrings **70** in dieselbe Richtung verschoben. Insbesondere kann vorgesehen sein, dass der vorgenannte lichtabschwächende und phasenverschiebende Bereich des Phasenrings **70** in Deckung gebracht wird mit einer Abbildung der Modulatorblende **20**, welche durch die Probe **32** beeinflusst ist.

**[0087]** Damit eine Phasenverschiebung über die Querschnittsfläche des Phasenrings **70** variabel einstellbar ist, umfasst dieser bevorzugt eine phasenverschiebende Matrix mit Flüssigkristallbereichen. Abhängig von einer einstellbaren Ausrichtung der Flüssigkristalle in den verschiedenen Bereichen kann die Phase von durchlaufendem Licht unterschiedlich verschoben werden.

**[0088]** Zudem soll eine lichtabschwächende Wirkung erreicht werden. Hierzu umfasst der Phasenring bevorzugt zusätzliche polarisationsbeeinflussende Mittel, mit denen eine Polarisationsrichtung über den Querschnitt von auftreffendem Licht variabel einstellbar ist. Die polarisationsbeeinflussenden Mittel können insbesondere eine weitere Matrix mit schaltbaren Flüssigkristallbereichen aufweisen. Diese weitere Matrix kann im dargestellten Strahlengang auch vor dem Strahlteiler **47** im Bereich einer Pupillenebene angeordnet sein.

**[0089]** Während die elektronischen Steuerungsmittel den Phasenring **70** einstellen, erfolgt bereits die Ausgabe eines Probenbilds. Somit gibt die Optikanordnung **100** bereits ein Probenbild aus, während das Pupillenbild ausgewertet wird und der Phasenring **70** automatisch eingestellt wird.

**[0090]** Die elektronischen Steuerungsmittel können auch dazu gestaltet sein, den Phasenring **70** zusätzlich abhängig vom erzeugten Probenbild einzustellen. Hierzu umfasst die Optikanordnung **100** zunächst eine Probenkamera, die an dem Probenbildausgabeanschluss **85** angeschlossen ist. Ein hiermit aufgezeichnetes Probenbild wird mit den elektronischen Bildverarbeitungsmitteln automatisch im Hinblick auf eine Bewertungsgröße ausgewertet. Abhängig von einem Auswertungsergebnis wird der Phasenring **70** verstellt. Dieser Vorgang kann iterativ erfolgen. Hierbei bestimmen die Bildverarbeitungsmittel, ob die Verstellung am Phasenring **70** zu einer Verbesserung im Hinblick auf die Bewertungsgröße geführt hat. Abhängig davon erfolgt eine nächste Verstellung des Phasenrings **70**.

**[0091]** Bei der Bewertungsgröße kann es sich um einen Bildkontrast handeln. So kann in einer ersten Verstellung des Phasenrings **70** eine Vergrößerung des lichtabschwächenden und phasenverschiebenden Bereichs erfolgen. Führt dies zu einer Reduzierung im Bildkontrast, wird in einer darauf folgenden Verstellung des Phasenrings **70** der genannte Bereich verkleinert und es wird erneut der Bildkontrast ausgewertet. In dieser Weise kann iterativ eine Einstellung mit möglichst großem Bildkontrast ermittelt werden.

**[0092]** Zusätzlich oder alternativ kann auch eine unerwünschte Kantenaufhellung im Probenbild ermittelt werden. Um diese zu minimieren, kann insbesondere die Größe einer Phasenverschiebung des lichtabschwächenden und phasenverschiebenden Bereichs des Phasenrings **70** variiert werden.

**[0093]** Durch die reflektierende Gestaltung des Phasenrings **70** durchläuft Licht **50** dessen Flüssigkristallbereiche zweimal, womit eine maximal mögliche Phasenverschiebung doppelt so groß ist wie bei einer transmittierenden Gestaltung des Phasenrings **70**.

**[0094]** Nutzt der Phasenring **70** eine phasenverschiebende Matrix aus Flüssigkristallbereichen, so ist bei einer reflektierenden Ausgestaltung zudem die Bildqualität im Allgemeinen besser als bei einer transmittierenden Ausführung.

**[0095]** Aber auch ein transmittierend ausgeführter Phasenring **70** bietet Vorteile. Ein erfindungsgemäßes Lichtmikroskop **110** und eine erfindungsgemäße Optikanordnung **100** mit einem solchen Phasenring **70** sind schematisch in **Fig. 7** gezeigt. Durch die transmittierende Ausführung kann der Strahlteiler **47** entfallen. Zudem ist eine prinzipiell kompaktere Bauform möglich. Des Weiteren ist eine transmittierende Gestaltung besonders geeignet, wenn die Optikanordnung **100** innerhalb des Mikroskopstativs **10** aufgenommen sein soll. In diesem Fall können die Optiken **46** und **48** auch durch Optiken gebildet sein, die in herkömmlichen Mikroskopstativen bereits vorhanden sind.

**[0096]** Für die Auswertung des Pupillenbildes, das mit der Pupillenkamera **65** aufgenommen wird, ist es vorteilhaft, dass der Strahlteiler **42** im Strahlengang vor dem Phasenring **70** angeordnet ist. Hierdurch kommt es im Pupillenbild zu keiner Überlagerung mit einer Abbildung des Phasenrings **70**.

**[0097]** Durch die erfindungsgemäße Optikanordnung und das erfindungsgemäße Verfahren können die Auswirkungen einer Probe auf die Abbildung einer Modulatorblende besonders genau und zeitlich effizient berücksichtigt werden. Für einen möglichst hohen Benutzungskomfort kann dies automatisch erfolgen. Insbesondere können Proben, die in einer Flüssigkeit

mit gebogener Oberfläche gelöst sind, so besonders einfach und akkurat untersucht werden.

#### Bezugszeichenliste

<b>10</b>	Mikroskopstativ
<b>15</b>	Lichtquelle
<b>20</b>	Modulatorblende
<b>25</b>	Kondensator
<b>30</b>	Probenebene
<b>32</b>	Probe
<b>35</b>	Optik, Objektiv
<b>37</b>	Spiegel, Umlenkmittel
<b>40</b>	Zwischenbildebene
<b>42, 47</b>	Strahlteiler
<b>44, 46, 48</b>	Optiken
<b>50</b>	Licht
<b>60</b>	Pupillenebene
<b>65</b>	Pupillenkamera
<b>70</b>	Phasenring
<b>80</b>	Probenbildebene
<b>85</b>	Probenbildausgabeanschluss
<b>100</b>	Optikanordnung
<b>110</b>	Lichtmikroskop

**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**

- JP 2010-008793 A [0010, 0016]
- JP 2005-004088 A [0011]
- US 6238911 B1 [0015]

## Patentansprüche

1. Verfahren zum Betreiben eines Lichtmikroskops, wobei das Lichtmikroskop zumindest folgende Komponenten aufweist:

- eine Modulatorblende (20) zum Beschränken eines Lichtquerschnitts,
- eine Probenebene (30), welche sich in einem Strahlengang hinter der Modulatorblende (20) befindet und in welcher eine Probe (32) positionierbar ist,
- einen Phasenring (70), der in dem Strahlengang hinter der Probenebene (30) angeordnet ist und über dessen Querschnitt auftreffendes Licht (50) unterschiedlich beeinflusst wird, und
- eine Pupillenkamera (65) zum Aufzeichnen eines Pupillenbilds,

bei dem mit einem Strahlteiler (42), der sich im Strahlengang vor dem Phasenring (70) befindet, Licht (50), das von der Probe (32) kommt, teilweise zu der Pupillenkamera (65) und teilweise zu dem Phasenring (70) geleitet wird,

bei dem ein Pupillenbild, welches durch den Phasenring (70) unbeeinflusst ist, aufgezeichnet wird und gleichzeitig ein Probenbild ausgegeben wird,

bei dem mit elektronischen Bildverarbeitungsmitteln in dem aufgezeichneten Pupillenbild Lage und Größe einer Abbildung der Modulatorblende (20), welche durch eine Probe (32) beeinflusst und durch den Phasenring (70) unbeeinflusst ist, ermittelt wird,

bei dem eine Relativverstellung zwischen dem Phasenring (70) und der Modulatorblende (20) abhängig von der ermittelten Lage und der ermittelten Größe der Abbildung der Modulatorblende (20) mit elektronischen Steuerungsmitteln durchgeführt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Relativverstellung mit einem Phasenring (70) durchgeführt wird, über dessen Querschnitt eine Lichtintensität und/oder eine Phasenbeeinflussung von Licht (50) variabel einstellbar sind.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Probenbild mit einer Probenkamera aufgezeichnet wird,

dass das aufgezeichnete Probenbild mit elektronischen Bildverarbeitungsmitteln im Hinblick auf eine Bewertungsgröße ausgewertet wird,

dass die Relativverstellung zwischen dem Phasenring (70) und der Modulatorblende (20) zusätzlich abhängig von der Auswertung des Probenbilds durchgeführt wird.

4. Verfahren nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass als Bewertungsgröße ein Kontrast im Probenbild bestimmt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass als Bewertungsgröße eine Kantenauffhellung im Probenbild bestimmt wird.

6. Optikanordnung zum Anordnen in einem Strahlengang eines Lichtmikroskops,

wobei das Lichtmikroskop eine Modulatorblende (20) zum Beschränken eines Lichtquerschnitts, eine Probenebene (30), welche sich im Strahlengang hinter der Modulatorblende (20) befindet und in welcher eine Probe (32) positionierbar ist, und Optiken (35) zum Erzeugen eines Zwischenbilds der Probenebene (30) aufweist,

– mit einem Phasenring (70), über dessen Querschnitt auftreffendes Licht (50) unterschiedlich beeinflussbar ist,

– mit Abbildungsmitteln (44, 46, 48), mit denen bei einer Anordnung der Optikanordnung im Strahlengang des Lichtmikroskops das Zwischenbild über den Phasenring (70) an einem Probenbildausgabeanschluss (85) abbildbar ist,

– mit einer Pupillenkamera (65) zum Aufzeichnen eines Pupillenbilds und

– mit einem Strahlteiler (42), der im Strahlengang vor dem Phasenring (70) angeordnet ist, zum Leiten von Licht (50), das von der Probe (32) kommt, teilweise zu der Pupillenkamera (65) und teilweise zu dem Phasenring (70),

wobei die Abbildungsmittel (44, 46, 48) dazu gestaltet sind, zusammen mit dem Strahlteiler (42) ein Pupillenbild zu erzeugen, welches durch den Phasenring (70) unbeeinflusst ist, und das Pupillenbild gleichzeitig zum Abbilden des Zwischenbilds am Probenbildausgabeanschluss (85) zu erzeugen,

wobei elektronische Bildverarbeitungsmittel vorhanden sind, mit denen in einem aufgezeichneten Pupillenbild Lage und Größe einer Abbildung der Modulatorblende (20), welche durch eine Probe (32) beeinflusst und durch den Phasenring (70) unbeeinflusst ist, ermittelbar ist und

wobei elektronische Steuerungsmittel vorhanden sind, mit denen eine Relativverstellung zwischen der Modulatorblende (20) und dem Phasenring (70) abhängig von der ermittelten Lage und Größe der Abbildung der Modulatorblende (20) durchführbar ist.

7. Optikanordnung nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Phasenring (70) mindestens eine phasenverschiebende Matrix mit Flüssigkristallbereichen aufweist, die zwischen Zuständen schaltbar sind, in welchen sie eine Phase von durchlaufendem Licht (50) unterschiedlich beeinflussen.

8. Optikanordnung nach einem der Ansprüche 6 oder 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Phasenring (70) polarisationsbeeinflussende Mittel vor der phasenverschiebenden Matrix aus Flüssigkristallbereichen aufweist, mit denen zum Einstellen einer Lichtabsorption durch die Flüssigkristallbereiche eine Polarisationsrichtung von Licht (50) einstellbar ist.

9. Optikanordnung nach einem der Ansprüche 6 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Phasenring (70) zum Einstellen einer Lichtabsorption eine

weitere Matrix mit unabhängig voneinander einstellbaren Matrixelementen aufweist.

10. Optikanordnung nach einem der Ansprüche 6 bis 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass die weitere Matrix mit schaltbaren Flüssigkristallbereichen gebildet ist.

11. Optikanordnung nach einem der Ansprüche 6 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Phasenring (70) ein transmittierender Phasenring (70) ist, mit dem Licht (50) zum Erzeugen des Probenbilds durchlassbar ist.

12. Optikanordnung nach einem der Ansprüche 6 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Phasenring (70) ein reflektierender Phasenring (70) ist, mit dem Licht (50) zum Erzeugen des Probenbilds reflektierbar ist, dass im Strahlengang vor dem Phasenring (70) ein weiterer Strahlteiler (47) vorhanden ist, der Licht (50), das von einem Objektiv (35) kommt, zum Phasenring (70) weiterleitet und der Licht (50), das vom Phasenring (70) kommt, zum Probenbildausgabeanschluss (85) weiterleitet.

13. Optikanordnung nach einem der Ansprüche 6 bis 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass Anschlussmittel vorhanden sind zum Verbinden mit einem Kameraanschluss eines Lichtmikroskops.

14. Optikanordnung nach einem der Ansprüche 6 bis 13, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Optikanordnung als Zwischentubus gebildet ist, welcher erste Anschlussmittel zum Verbinden mit einem Tubusanschluss eines Lichtmikroskops aufweist und zweite Anschlussmittel zum Anschließen einer Kamera und/oder eines Okulars.

15. Lichtmikroskop, **dadurch gekennzeichnet**, dass eine Optikanordnung nach einem der Ansprüche 6 bis 14 vorhanden ist.

16. Lichtmikroskop nach Anspruch 15, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Phasenring (70) innerhalb eines Mikroskopstativs (10) aufgenommen ist.

Es folgen 5 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig. 1

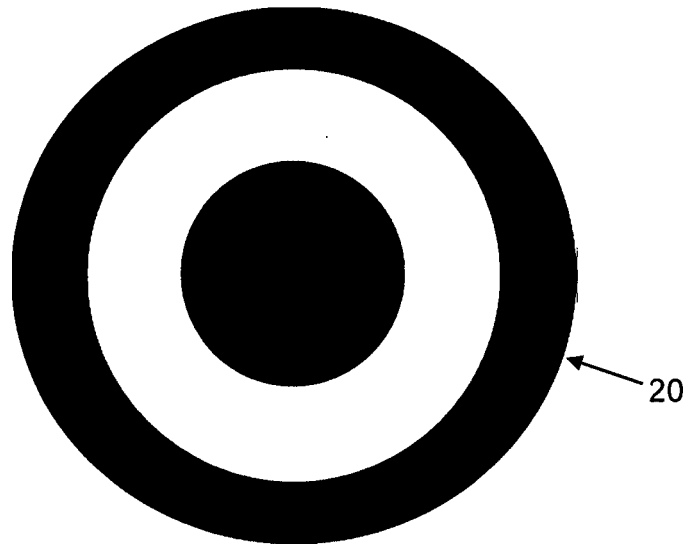


Fig. 2

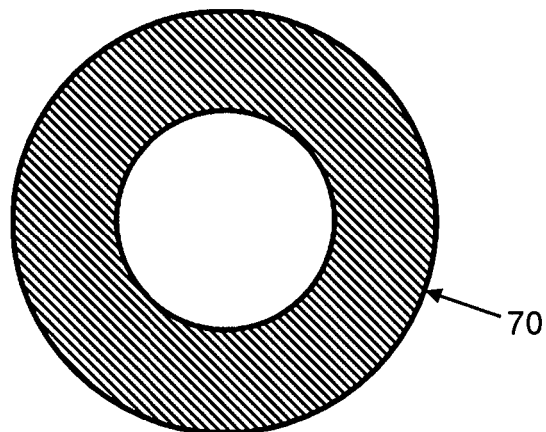


Fig. 3

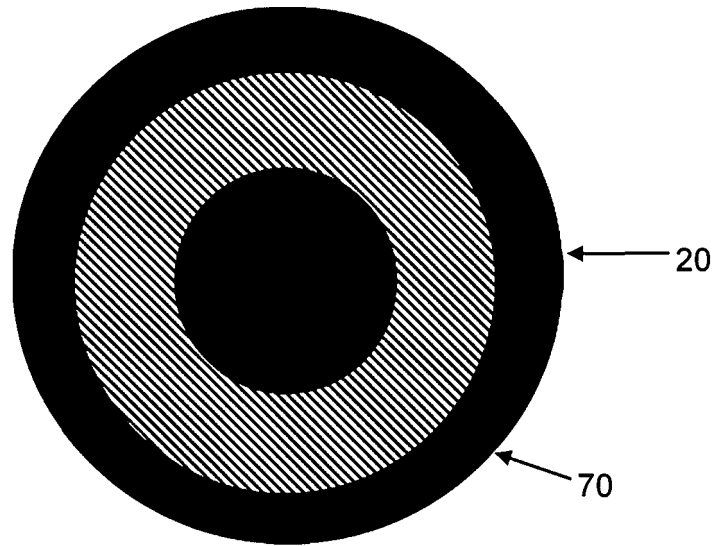


Fig. 4

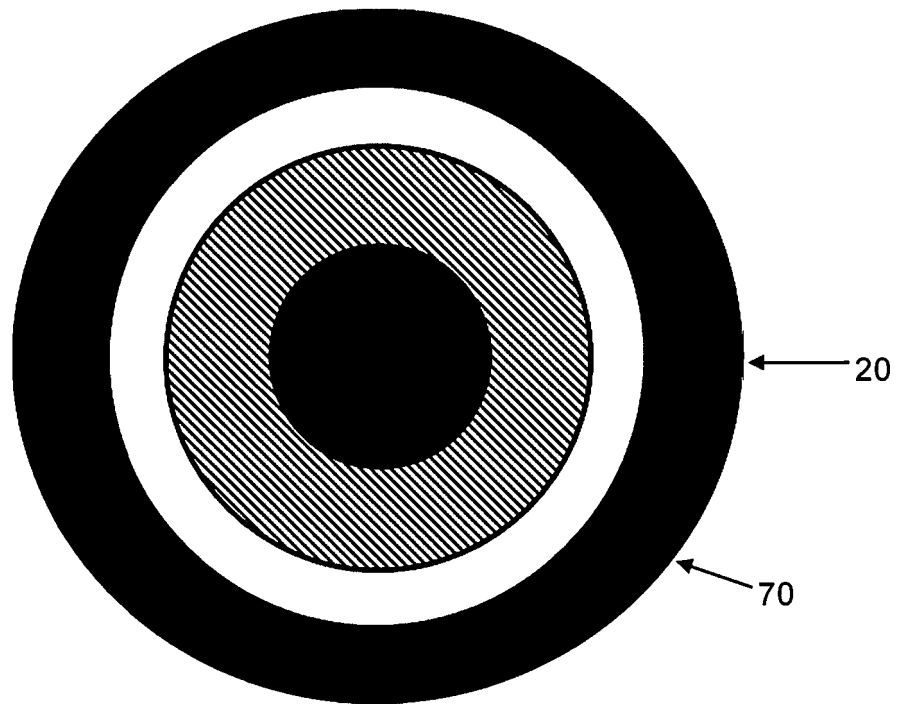
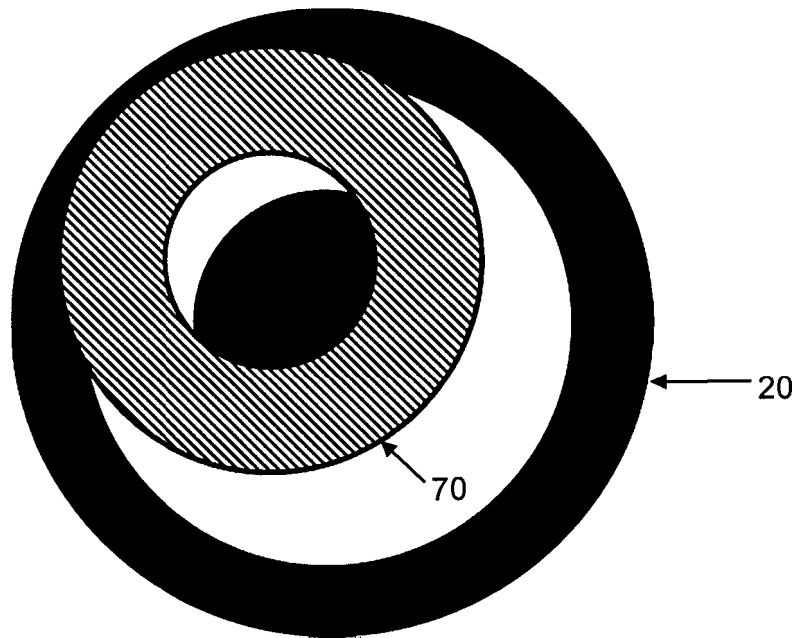




Fig. 5



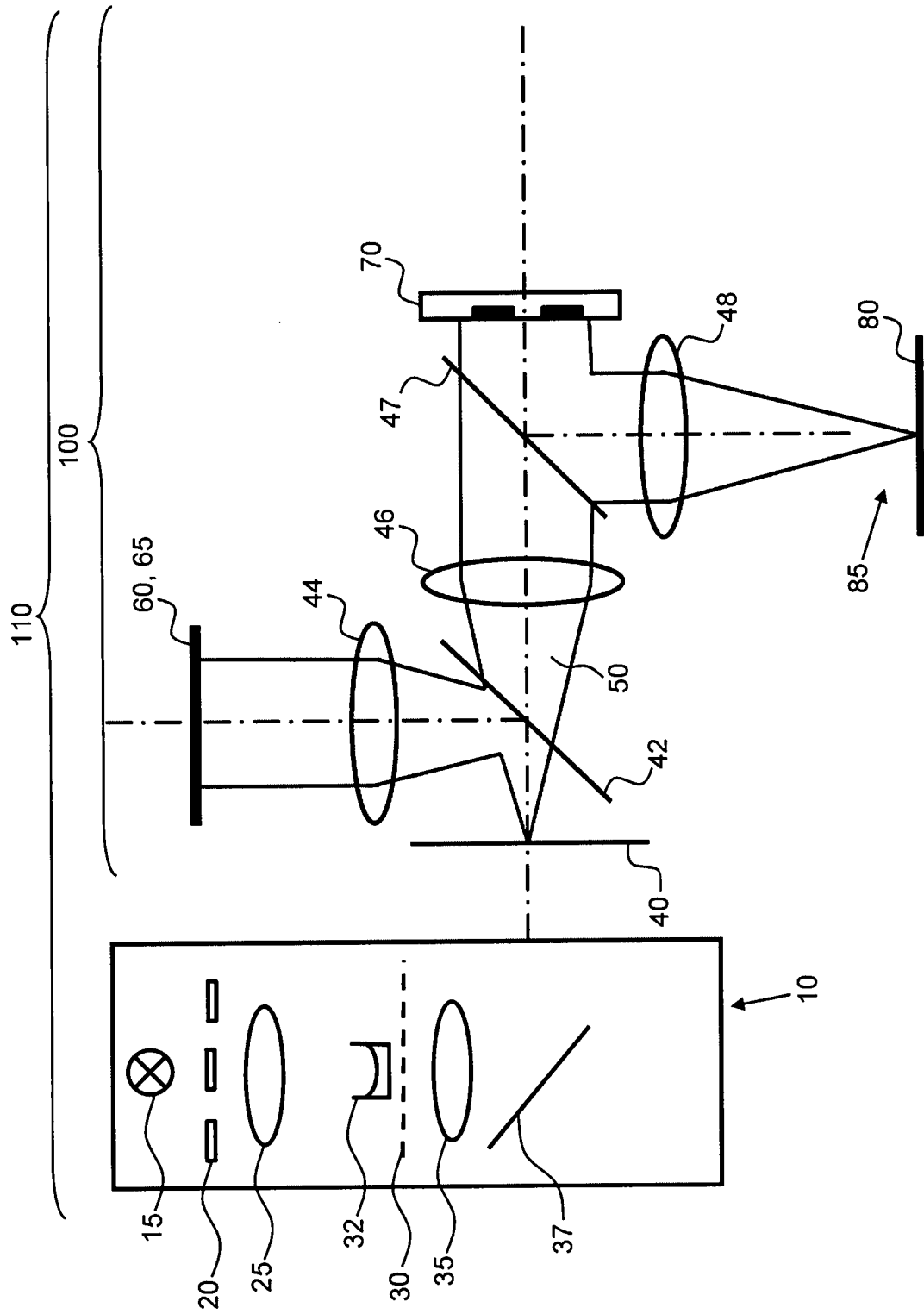


Fig. 6

Fig. 7

