

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

(19) Weltorganisation für geistiges
Eigentum

Internationales Büro

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum
22. November 2012 (22.11.2012)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2012/156150 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation:
G02B 21/24 (2006.01) **G02B 21/00** (2006.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2012/056210
- (22) Internationales Anmeldedatum:
4. April 2012 (04.04.2012)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
10 2011 075 809.7 13. Mai 2011 (13.05.2011) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **CARL ZEISS MICROSCOPY GMBH** [DE/DE]; Carl-Zeiss-Promenade 10, 07745 Jena (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **WOLFF, Horst** [DE/DE]; Landshuter Straße 30, 93354 Siegenburg (DE). **SVEJDAR, Daniel** [DE/DE]; Bachstraße 11, 85414 Kirchdorf (DE). **EICHINGER, Markus** [DE/DE]; Richard-Wagner-Str. 24, 82299 Türkenfeld (DE).
- (74) Anwalt: Patentanwälte **GEYER, FEHNERS & PARTNER**; Perhamerstraße 31, 80687 München (DE).

- (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

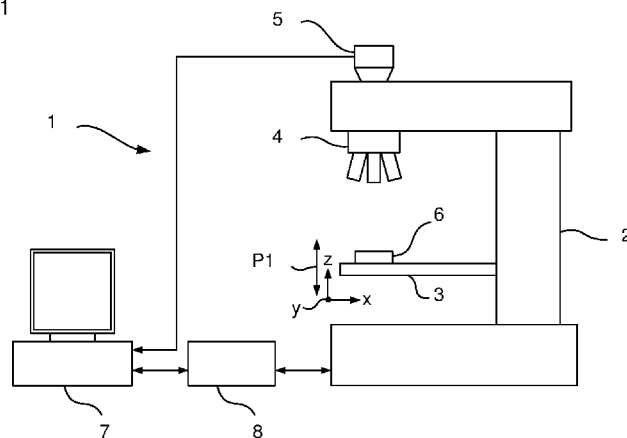
Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR DEFINING A Z-RANGE IN A SAMPLE, IN WHICH A Z-STACK OF THE SAMPLE IS TO BE RECORDED BY MEANS OF A MICROSCOPE

(54) Bezeichnung : VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUM FESTLEGEN EINES Z-BEREICHES IN EINER PROBE, IN DEM EIN Z-STAPEL DER PROBE MITTELS EINES MIKROSKOPS AUFZUNEHMEN IST

Fig. 1



(57) Abstract: The invention provides a method for defining a z-range in a sample, in which a z-stack of the sample is to be recorded by means of a microscope, wherein the z-range is automatically defined on the basis of a z-value situated in the sample and taking account of at least one predetermined parameter.

(57) Zusammenfassung: Es wird bereitgestellt ein Verfahren zum Festlegen eines z-Bereiches in einer Probe, in dem ein z-Stapel der Probe mittels eines Mikroskops aufzunehmen ist, wobei auf der Basis eines in der Probe liegenden z-Wertes und unter Berücksichtigung zumindest eines vorbestimmten Parameters der z-Bereich automatisch festgelegt wird.

WO 2012/156150 A1

Verfahren und Vorrichtung zum Festlegen eines z-Bereiches in einer Probe, in dem ein z-Stapel der Probe mittels eines Mikroskops aufzunehmen ist

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zum Festlegen eines z-Bereiches in einer Probe, in dem ein z-Stapel der Probe mittels eines Mikroskops aufzunehmen ist.

10 In der Mikroskopie gehört die Aufnahme eines z-Stapels bzw. die Aufnahme von Bildserien in der z-Richtung (z. B. entlang der optischen Achse des Mikroskops) seit vielen Jahren zum Stand der Technik. Bei der Aufnahme eines solchen z-Stapels werden in einem festgelegten z-Bereich mehrere Einzelaufnahmen an unterschiedlichen z-Werten (Fokusebenen) innerhalb des z-Bereiches durchgeführt, um z. B. ein Objekt in der Probe, wie beispielsweise eine Zelle, in unterschiedlichen Ebenen aufzunehmen und dann basierend auf den Einzelaufnahmen des z-

15 Stapels z. B. eine dreidimensionale Rekonstruktion des z-Bereiches und somit des Objektes durchzuführen oder ein Bild des Objektes mit erweiterter Tiefenschärfe zu berechnen.

Bisher bestimmt der Benutzer des Mikroskops die wesentlichen Parameter für die Aufnahme des z-Stapels. Wenn mehrere gleichartige Proben im Rahmen eines Experimentes aufzunehmen sind, werden neben der Bestimmung der Parameter vor Beginn des Experimentes üblicherweise zumindest einige Parameter vor der aktuellen Aufnahmeserie nochmals manuell eingestellt. Zu den wesentlichen Parametern für die Aufnahme des z-Stapels gehören die Anzahl der z-Ebenen, in denen ein Bild aufgenommen wird, der Abstand der einzelnen z-Ebenen und der Bereich, in dem der z-Stapel aufgenommen wird.

25

Wenn der Bereich festgelegt ist, muß lediglich die Anzahl der z-Ebene oder der Abstand der einzelnen z-Ebenen noch festgelegt werden. Der jeweils andere Parameter ergibt sich dann unter Berücksichtigung des festgelegten z-Bereiches.

Gerade die Festlegung des Bereiches, in dem der z-Stapel aufgenommen werden soll, ist selbst für erfahrene Mikroskopieanwender schwierig, da die Festlegung subjektiven Eindrücken unterworfen ist und insbesondere von der konkreten Darstellung am entsprechenden Bildschirm abhängt. So ist es z. B. nicht möglich, Intensitäten des Objektes in z-Ebenen mit dem Auge zu quantifizieren und dies später wieder genau so zu reproduzieren. Ferner ist der Schritt des Festlegens in der Regel sehr zeitaufwendig, was auch noch eine in der Regel unerwünscht hohe Belastung der Probe mit sich bringt, da nur langsam die manuelle Einstellung der oberen und unteren Grenze des z-Bereiches möglich ist.

Zudem birgt die manuelle Einstellung immer die Schwierigkeit von großen Abweichungen der Aufnahme eines z-Stapels einer ersten Probe und der Aufnahme eines z-Stapels einer zweiten Probe im Rahmen eines Experimentes, da an Stelle eines objektiven Kriteriums lediglich der optische Eindruck, den der Benutzer von der jeweiligen Probe hat, bestimmt, in welchem Bereich der z-Stapel aufgenommen wird.

Ausgehend hiervon ist es daher Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren oder eine Vorrichtung zum Festlegen eines z-Bereiches in einer Probe, in dem ein z-Stapel der Probe mittels eines Mikroskops aufzunehmen ist, zur Verfügung zu stellen, mit denen die eingangs beschriebenen Schwierigkeiten möglichst vollständig überwunden werden können.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe gelöst durch ein Verfahren zum Festlegen eines z-Bereiches in einer Probe, in dem ein z-Stapel der Probe mittels eines Mikroskops aufzunehmen ist, wobei auf der Basis eines in der Probe liegenden z-Wertes und unter Berücksichtigung zumindest eines vorbestimmten Parameters der z-Bereich automatisch festgelegt wird.

Da der z-Bereich bei dem erfindungsgemäßen Verfahren automatisch ausgehend von einem in der Probe liegenden z-Wert (der insbesondere für eine Fokus-Ebene der Probe steht) und zumindest einem vorbestimmten Parameter festgelegt wird, können die eingangs beschriebenen Schwierigkeiten überwunden werden. Es ist keine manuelle Interaktion des Benutzers zur Festlegung des z-Bereiches mehr notwendig, wodurch eine schnelle, gute und hoch reproduzierbare Festlegung des z-Bereiches möglich ist.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren kann einer der vorbestimmten Parameter ein Schärfemaß (z.B. eine Kontrastfunktion) der Probe sein, das z. B. ohne Zutun eines Benutzers ermittelt und ausgewertet werden kann. Damit kann sehr objektiv der z-Bereich in der Probe festgelegt werden, in dem das aufzunehmende Objekt liegt.

So kann z.B. ein Wert des vorbestimmten Parameters festgelegt sein, der Einfluß auf die Ausdehnung des z-Bereichs hat oder die Grenzen des z-Bereichs festlegt. Dieser vorbestimmte Parameter ist insbesondere ein probenunabhängiger Parameter. Hierunter wird hier
5 verstanden, daß der Parameter bei verschiedenen Proben genutzt werden kann und eher selten vom Benutzer, insbesondere unerfahrenen Benutzern, geändert werden muß.

Als Parameterwert eignet sich erfindungsgemäß ein relativer Prozentwert x bezogen auf einen maximalen oder minimalen Parameterwert des vorbestimmten Parameters. Im Zusammenhang
10 mit einer Schärfemaßbestimmung gibt der relative Prozentwert x an, daß eine Grenze des z-Bereichs dann erreicht ist, wenn das Schärfemaß bzw. der Schärfewert an einer z-Position auf den x-ten Prozentanteil bezüglich des maximalen Schärfewertes an der gegebenen Probenposition abgefallen ist.

15 Natürlich können bei dem erfindungsgemäßen Verfahren als Parameter beliebige Schärfemaßfunktionale zur Bestimmung eines Schärfemaßes dienen. Typischerweise sind dies bei Autofokus-Algorithmen z.B. die Entropie, die Summe über Gradienten-Beträge oder Summe der Intensitäten.

20 Ferner kann bei dem erfindungsgemäßen Verfahren der in der Probe liegende z-Wert automatisch, insbesondere durch ein Autofokussierverfahren, bestimmt werden. Mit dem Autofokussierverfahren kann der schärfste in der Probe liegende z-Wert (Fokusposition) bestimmt werden. Somit kann vollständig automatisch der z-Bereich in der Probe festgelegt werden, da sowohl der in der Probe liegende z-Wert automatisch bestimmt wird, als auch der z-
25 Bereich basierend auf diesem z-Wert und auf dem Parameter z. B. des Autofokussierverfahrens (z. B. ein Schärfemaß) automatisch festgelegt wird.

Im erfindungsgemäßen Verfahren kann der z-Bereich insbesondere anhand der Daten des automatischen Bestimmens (z.B. des Autofokussierverfahrens, das bevorzugt als z-Wert die z-
30 Position in der Probe mit dem höchsten Schärfewert (Fokusposition) ermittelt) des in der Probe liegenden z-Wertes festgelegt werden. Damit kann z.B. das für die Bestimmung des in der Probe liegenden z-Wertes durchgeführte Autofokussierverfahren auch gleich für die Festlegung des z-Bereiches benutzt werden, wodurch die Festlegung des z-Bereiches sehr schnell erfolgen kann.

35

Ferner kann bei dem erfindungsgemäßen Verfahren die obere und untere Grenze des z-Bereiches symmetrisch oder asymmetrisch zu dem in der Probe liegenden z-Wert bestimmt werden. Wenn der z-Wert beispielsweise durch ein Autofokussierverfahren bestimmt ist, kann

durch Auswertung des Abfalls des Schärfewertes die obere und untere Grenze des z-Bereichs symmetrisch oder asymmetrisch zu dem in der Probe liegenden z-Wert (was hier dann der Fokusposition entspricht) bestimmt werden. Damit ist beispielsweise eine sehr schnelle z-Bereichsbestimmung möglich.

5

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren kann anhand eines vorbestimmten Wertes des zumindest einen Parameters eine Grenze des festzulegenden z-Bereichs bestimmt werden. Natürlich ist es möglich, zwei vorbestimmte Werte des zumindest einen Parameters vorzugeben, um beide Grenzen des festzulegenden z-Bereichs bestimmen zu können.

10

Wenn nur eine Grenze des z-Bereichs basierend auf dem vorbestimmten Wert des zumindest einen vorbestimmten Parameters bestimmt wird, ist es bevorzugt, daß der z-Bereich symmetrisch zu dem in der Probe liegenden z-Wert bestimmt wird. Die symmetrische Bestimmung des z-Bereiches ist besonders vorteilhaft, wenn der in der Probe liegende z-Wert mittels eines Autofokussierverfahrens als schärfster z-Wert (Fokusposition) bestimmt wurde.

15

Des weiteren kann bei dem erfindungsgemäßen Verfahren ausgehend von dem in der Probe liegenden z-Wert (bei der Bestimmung des z-Wertes mittels einem Autofokussierverfahrens sollte der in der Probe liegende z-Wert der Fokusposition entsprechen) schrittweise mit größer werdendem Abstand in z-Richtung jeweils der Wert einer Kenngröße ermittelt werden, die als der vorbestimmte Parameter zur Festlegung des z-Bereiches dient. Bei der Kenngröße kann es sich z. B. um eine Meßgröße oder um eine Observable und insbesondere um ein Schärfemaß handeln, das beispielsweise auf Kontrast, Intensität, usw. basiert.

20

Die schrittweise Ermittlung des Wertes des vorbestimmten Parameters (z.B. Schärfewert) kann nicht nur in z-Richtung, sondern auch in entgegengesetzter Richtung (-z-Richtung) durchgeführt werden. Die Schrittlänge ist bevorzugt konstant, kann aber auch variieren (z. B. zu- oder abnehmen). Die z-Richtung ist z. B. die Richtung hin zum Objektiv des Mikroskops, so daß dann die -z-Richtung die Richtung weg vom Objektiv ist. Natürlich kann es auch umgekehrt sein.

30

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren kann nach Festlegung des z-Bereiches der z-Stapel der Probe in dem z-Bereich aufgenommen werden.

35

Ferner können bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Festlegung des z-Bereichs Einzelaufnahmen der Probe in verschiedenen z-Ebenen gemacht werden, wobei zumindest ein Teil der Einzelaufnahmen für den aufzunehmenden z-Stapel der Probe genutzt wird. Damit ist es sehr schnell möglich, den z-Bereich automatisch festzulegen und auch noch die Aufnahme

des z-Stapels durchzuführen, da Einzelaufnahmen zur Festlegung des z-Bereichs für die Aufnahme des z-Stapels genutzt werden.

5 Ferner kann bei dem erfindungsgemäßen Verfahren (z.B. nach Aufnahme des z-Stapels der Probe) zumindest ein weiterer z-Bereich jeweils auf der Basis eines in der Probe liegenden z-Wertes und unter Berücksichtigung zumindest eines vorbestimmten Parameters automatisch festgelegt werden. Der vorbestimmte Parameter bzw. die vorbestimmten Parameter für den zumindest einen weiteren z-Bereich ist bzw. sind insbesondere derselbe Parameter wie für den zuvor festgelegten z-Bereich.

10

Bei dem z-Bereich kann es sich um dieselbe Probe bzw. denselben Abschnitt der Probe und/oder um eine andere Probe bzw. einen anderen Abschnitt der Probe handeln, der insbesondere lateral bzw. quer zur z-Richtung relativ zum zuvor festgelegten z-Bereich versetzt sein kann.

15

Somit kann beispielsweise eine Mosaikaufnahme durchgeführt werden. Auch ist es möglich, dasselbe Objekt in einer Zeitserie bzw. über lange Zeit zu beobachten. Auf jeden Fall kann für jeden z-Stapel der optimale z-Bereich automatisch festgelegt werden. Durch die hierdurch optimierte Anzahl der Einzelaufnahmen (nicht zu viel, nicht zu wenig) kann die gesamte Aufnahmedauer, Bilddatenmenge und auch die Lichtbelastung der Probe verringert werden. Damit können unnötige Einzelaufnahmen innerhalb eines z-Stapels vermieden werden, wodurch die gesamte Aufnahmedauer und auch die Lichtbelastung der Probe verringert werden kann.

25 Natürlich muß nicht für die Aufnahme jedes z-Stapels in erfindungsgemäßer Weise der z-Bereich festgelegt werden. Wenn z. B. bei einer Zeitserie die Änderung des z-Bereiches von der Aufnahme eines z-Stapels zum nächsten z-Stapel relativ gering ist, kann der z-Bereich des vorhergehenden z-Stapels nochmals verwendet werden. Auch ist es möglich, den z-Bereich eines nächsten z-Stapels (in einer Zeitserie und/oder räumlich beabstandet) durch Interpolation basierend auf zumindest zwei schon festgelegten z-Bereichen (z. B. durch lineare Interpolation) oder durch Extrapolation basierend auf zumindest einem bereits festgelegten z-Bereich festzulegen.

30

Insbesondere kann anhand des aufgenommenen z-Stapels bzw. der aufgenommenen z-Stapel eine dreidimensionale Darstellung des aufgenommenen z-Bereiches rekonstruiert werden oder ein Bild des Objektes mit erweiterter Tiefenschärfe berechnet und bevorzugt dargestellt werden.

Bei dem Mikroskop zur Aufnahme der Probe kann es sich um ein Weitfeldmikroskop oder um ein konfokales Mikroskop (z. B. ein konfokales Mikroskop mit einem Einfach- oder Multi-Punkt-Scanner, Streifenscanner oder Spinning-Disc) handeln. Ebenso kann das Mikroskop mit strukturierter Beleuchtung arbeiten und/oder als Fluoreszenzmikroskop ausgebildet sein. Wenn
5 das Mikroskop als konfokales Mikroskop ausgebildet ist, wird als Schärfemaß insbesondere die mittlere oder die summierte Intensität der jeweiligen konfokalen Aufnahme verstanden.

Das erfindungsgemäße Verfahren zum Festlegen eines z-Bereiches in einer Probe kann in vorteilhafter Weise bei voll- und teil-automatisierten Scanning- und Screening-Systemen
10 eingesetzt werden. Dies führt in vorteilhafter Weise für den Benutzer eines solchen Systems zu einem deutlich geringeren Aufwand zum Einstellen und Konfigurieren.

Bei automatischen Systemen zur Aufnahme von Präparaten auf Objektträgern kann das erfindungsgemäße Verfahren zum Festlegen eines z-Bereiches in einer Probe auch zur
15 Bestimmung der Proben- bzw. Präparatdicke an verschiedenen x/y-Positionen verwendet werden. Dabei kann zumindest an einer x/y-Position die Probendicke durch Interpolation oder Extrapolation basierend auf zumindest einem schon bestimmten Probendickenwert ermittelt werden.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren kann der in der Probe liegende z-Wert mittels der automatischen Bestimmung einer Fokusebene ermittelt werden. Dabei kann die Vergrößerung bei der automatischen Bestimmung der Fokusebene gleich, größer oder kleiner sein als die Vergrößerung, die dann bei der Aufnahme des z-Stapels vorliegt. Die entsprechende Anpassung, sofern nötig, für die Aufnahme des z-Stapels kann basierend auf den bekannten
20 unterschiedlichen Vergrößerungen automatisch durchgeführt werden. Insbesondere können die Abstände der einzelnen z-Ebenen (für die Einzelaufnahmen) nach den optischen Gesetzen (z. B. Schärfentiefe) angepaßt werden.
25

Ferner kann das erfindungsgemäße Verfahren zum Festlegen eines z-Bereiches in einer Probe vorteilhaft bei Systemen zum automatischen Screening von Multiwell-Platten oder Kulturschalen
30 eingesetzt werden. In verschiedenen Wells (Vertiefungen) einer Multiwell-Platte können sich unterschiedliche Proben befinden bzw. solche, die unterschiedliche Höhe und Schärfenebene aufweisen. Eine automatische Konfiguration pro Vertiefung einer Multiwell-Platte erleichtert dem Benutzer die Arbeit extrem bzw. spart viel Zeit. In ähnlicher Weise kann an verschiedenen
35 Probenpositionen in einer einzelnen Kulturschale mit dem erfindungsgemäßen Verfahren der z-Bereich optimal festgelegt werden.

Die Aufgabe wird ferner gelöst durch eine Vorrichtung zum Festlegen eines z-Bereiches in einer Probe, in dem ein z-Stapel der Probe mittels eines Mikroskops aufzunehmen ist, wobei die Vorrichtung eine Steuereinheit aufweist, die dazu ausgebildet ist, auf der Basis eines in der Probe liegenden z-Wertes und unter Berücksichtigung zumindest eines vorbestimmten Parameters den z-Bereich automatisch festzulegen.

Somit kann mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung automatisch der z-Bereich festgelegt werden, wodurch die eingangs beschriebenen Schwierigkeiten überwunden werden können.

Vorteilhafte Weiterbildungen der erfindungsgemäßen Vorrichtung sind in den abhängigen Vorrichtungsansprüchen angegeben.

Insbesondere kann die Vorrichtung das Mikroskop selbst enthalten, wobei das Mikroskop, wie bereits beschrieben, ein Weitfeldmikroskop, ein konfokales Mikroskop oder ein sonstiges Mikroskop sein kann. Insbesondere kann das Mikroskop als Fluoreszenzmikroskop ausgebildet sein.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung kann so weitergebildet werden, daß mit ihr das erfindungsgemäße Verfahren (einschließlich seiner Weiterbildungen) durchgeführt werden kann. Auch kann das erfindungsgemäße Verfahren so weitergebildet werden, daß es die in Verbindung mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung (einschließlich ihren Weiterbildungen) beschriebenen Verfahrensschritte aufweist.

Es versteht sich, daß die vorstehend genannten und die nachstehend noch zu erläuternden Merkmale nicht nur in den angegebenen Kombinationen, sondern auch in anderen Kombinationen oder in Alleinstellung einsetzbar sind, ohne den Rahmen der vorliegenden Erfindung zu verlassen.

Nachfolgend wird die Erfindung beispielsweise anhand der beigefügten Zeichnungen, die auch erfindungswesentliche Merkmale offenbaren, noch näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 eine schematische Darstellung einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Mikroskops;

Fig. 2a-2c Schnittdarstellungen eines aufzunehmenden Objektes 9 in einer Probe 6, wobei unterschiedliche z-Aufnahmeebenen eingezeichnet sind;

Fig. 3a-3c schematische Darstellungen des Schärfemaßverlaufes für das Objekt 9 gemäß Figuren 2a-2c;

- Fig. 4 ein Ablaufdiagramm einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens;
- Fig. 5 eine Draufsicht zur Erläuterung einer Mosaikaufnahme der Zelle 9;
- Fig. 6 eine Seitenansicht für die Mosaikabschnitte K21-K24;
- 5 Fig. 7 eine Seitenansicht gemäß Fig. 7 zur Erläuterung des bisher bekannten Vorgehens;
- Fig. 8 eine Darstellung zur Erläuterung der Bestimmung des z-Bereiches für eine Zelle deren z-Ausdehnung mit der Zeit größer wird;
- Fig. 9 eine Darstellung gemäß Fig. 8 zur Erläuterung des bisher bekannten Vorgehens;
- Fig. 10 eine Darstellung zur Erläuterung der Bestimmung des z-Bereiches für eine Zelle 9,
10 die ihre z-Position mit der Zeit ändert;
- Fig. 11 eine Darstellung gemäß Fig. 10 zur Erläuterung des bisher bekannten Vorgehens;
- Fig. 12 eine Darstellung eines nicht gaußförmigen Schärfeverlaufes zur Bestimmung des z-Bereiches, und
- Fig. 13 eine weitere Darstellung eines nicht gaußförmigen Schärfeverlaufes zur Bestimmung
15 des z-Bereiches.

Bei der in Fig. 1 gezeigten Ausführungsform umfaßt das erfindungsgemäße Mikroskop 1 ein Stativ 2 mit einem Probentisch 3 und einer Mikroskopoptik 4, die schematisch als
20 Objektivrevolver mit drei Objektiven dargestellt ist. Der Abstand zwischen der Mikroskopoptik 4 (Objektivrevolver) und dem Probentisch 3 ist zur Einstellung der Fokusslage (z-Position) bzw. zur Fokussierung veränderbar, wie durch den Doppelpfeil P1 in Fig. 1 angedeutet ist.

Das Mikroskop 1 umfaßt ferner eine Aufnahmeeinheit 5 (beispielsweise eine CCD-Kamera), mit
25 der das vergrößerte Bild einer zu untersuchenden Probe 6 aufgenommen werden kann. Die Aufnahmeeinheit 5 ist mit einem schematisch dargestellten Computer 7 verbunden, der im Betrieb das Mikroskop 1 über einen Steuermodul 8 steuert.

Das Mikroskop 1 enthält einen nicht gezeigten z-Trieb, mit dem der Abstand zwischen dem
30 Probentisch 3 und der Mikroskopoptik 4 (in z-Richtung) veränderbar ist, sowie einen nicht gezeigten xy-Motor für den Probentisch 3, mit dem die Position des Probentisches 3 in der xy-Ebene (die y-Richtung erstreckt sich senkrecht zur Zeichenebene von Figur 1) einstellbar ist, wobei sowohl der z-Trieb als auch der xy-Motor mittels des Steuermoduls 8 gesteuert werden.

35 Das erfindungsgemäße Mikroskop 1 ist so ausgebildet, daß mit ihm Bildserien mit unterschiedlichen Fokuslagen (unterschiedliche z-Werte) der Probe 6 bzw. eines Objektes innerhalb der Probe 6, wie z. B. einer zu untersuchende Zelle, aufgenommen werden können, um daraus eine dreidimensionale Darstellung des aufgenommenen Objektes rekonstruieren zu

können. Eine solche Bildserie wird häufig auch z-Stapel genannt, wobei in der Regel neben dem Abstand der einzelnen z-Ebenen noch der z-Bereich, in dem der z-Stapel aufgenommen wird, festzulegen ist.

- 5 Dazu wird bei dem erfindungsgemäßen Mikroskop 1 zunächst eine Autofokussierung durchgeführt, bei der Werte eines Schärfemaßes in Abhängigkeit der z-Position durch Aufnahme von Bildern in unterschiedlichen z-Positionen und einer anschließenden Auswertung gewonnen werden. Ein solcher Schärfemaßverlauf ist in Fig. 3a schematisch dargestellt.
- 10 Zur Gewinnung des Schärfemaßverlaufes können herkömmliche Autofokussierverfahren eingesetzt werden. Beispielsweise kann als Schärfemaß ein skalares Funktional $S(B(x,y,z))$ eingesetzt werden, das für jedes mit der Aufnahmeeinheit 5 aufgenommenes Bild $B(x,y,z)$ einen skalaren Wert (den Schärfemaßwert) liefert, der mit zunehmender Bildschärfe ansteigt (wie in Fig. 3a gezeigt ist) und bei maximaler Bildschärfe einen Extremwert aufweist. Natürlich ist es
- 15 auch möglich, daß das skalare Funktional so konstruiert ist, daß der Schärfemaßwert mit zunehmender Bildschärfe abfällt und bei maximaler Bildschärfe ein Minimalwert vorliegt. Da in der Regel die Funktionale S so konstruiert sind, daß sie bei maximaler Bildschärfe ein Maximum aufweisen, wird hiervon in der weiteren Beschreibung ausgegangen.
- 20 Die Schärfefunktionale S liefern ein Skalar als Schärfenmaßwert, da in der Rechenvorschrift des jeweiligen Schärfefunktionalen über die beiden Aufnahmedimensionen der zweidimensionalen Aufnahme summiert bzw. integriert wird. Daher hängt der skalare Schärfemaßwert bei gegebenem Bildabschnitt im wesentlichen nur noch von z und somit der Fokusslage ab. Daher kann bei einem gegebenen Bildausschnitt das Funktional S als von der
- 25 Fokusposition z abhängig betrachtet werden (also $S(z)$).

- Der maximale Schärfemaßwert $S_{\max}$ liegt hier bei der z-Position z_c vor, was der durch die Linie L1 angedeuteten z-Ebene entspricht (Fig. 2a), wobei hier schematisch ein xz-Schnitt durch die Probe 6 dargestellt ist und das aufzunehmende Objekt der Zellkern 10 einer Zelle 9 sein soll,
- 30 die schematisch dargestellt ist. Wie der Darstellung in Fig. 2a zu entnehmen ist, liegt die z-Ebene mit dem z-Wert z_c genau in der Mitte des Zellkernes 10.

- Da bei der durchgeführten Autofokussierung der in Fig. 3a gezeigte Schärfemaßverlauf erhalten wird, kann dieser neben der Ermittlung der z-Ebene mit der größten Schärfe gleich dazu
- 35 genutzt werden, die untere und obere Grenze des z-Bereiches für den z-Stapel automatisch festzulegen. Das Schärfemaß (Schärfefunktional) S ist somit ein vorbestimmter Parameter für die Festlegung des z-Bereiches.

Bei der hier beschriebenen Ausführungsform wird als untere Grenze der z-Wert z_L festgelegt, bei dem der Schärfemaßwert $S_{mid} = S_{max} \cdot 50 \%$ beträgt. Die Lage der entsprechenden z-Ebene ist in Fig. 2b durch die Linie L2 angedeutet.

- 5 In gleicher Weise wird die obere Grenze des z-Bereiches bestimmt. Auch hier soll der Schärfemaßwert $S_{mid} = S_{msax} \cdot 50 \%$ betragen, so daß der z-Wert z_R ermittelt wird. Die entsprechende Lage der z-Ebene ist in der Darstellung von Fig. 2c durch die Linie L3 angedeutet.
- 10 Somit kann automatisch der z-Bereich (hier von z_L bis z_R) festgelegt werden, ohne daß der Benutzer eingreifen muß. Ausgehend von dem so festgelegten z-Bereich wird dann mittels des Computers 7 automatisch der optimale Schnittabstand (z-Abstand für die einzelnen Aufnahmen des z-Stapels) ermittelt und eingestellt. Dabei werden bevorzugt Parameter der Aufnahme, wie z. B. die numerische Apertur der Mikroskopoptik 4, etc. in bekannter Art und Weise
- 15 berücksichtigt.

Natürlich muß der Prozentwert nicht 50 % betragen, sondern kann auch andere Werte annehmen. Insbesondere können die Prozentwerte zur Bestimmung der Schärfemaßgrenzwerte für den unteren und oberen Grenzwert z_L , z_R unterschiedlich sein.

20

Es sind somit ein vorbestimmter Parameter (das Schärfefunktional) sowie zwei Werte des vorbestimmten Parameters (die jeweils den Abfall des Schärfewertes relativ zum maximalen Schärfewert für die obere und untere Grenze des festzulegenden z-Bereiches angeben) zur automatischen Festlegung des z-Bereichs vorgegeben.

25

- Mit den so bestimmten Aufnahmeparametern (also dem z-Bereich sowie dem z-Abstand) wird dann der gewünschte z-Stapel des Zellkerns 10 mittels des Mikroskops 1 aufgenommen (es werden also mehrere Einzelaufnahmen innerhalb des bestimmten z-Bereiches und mit dem bestimmten z-Abstand erstellt), um daraus dann z. B. eine dreidimensionale Darstellung des
- 30 Zellkerns 10 generieren zu können.

Die für die Autofokussierung aufgenommenen Bilder der Probe 6 weisen in der Regel eine geringere Auflösung auf als die dann für den z-Stapel aufgenommenen Bilder, wodurch eine schnelle Autofokussierung mit geringer Belastung der Probe 6 möglich ist.

35

Nachfolgend wird in Verbindung mit Fig. 4 eine Abwandlung zur Festlegung des z-Bereiches beschrieben. Zunächst wird ein Autofokus-Lauf durchgeführt, um den z-Wert z_C größter

Bildschärfe zu bestimmen (Schritt S1). Dabei kann die in Verbindung mit Fig. 3a beschriebene Autofokussierung verwendet werden oder auch jedes andere bekannte Verfahren.

Im nachfolgenden Schritt S2 wird die Startposition initialisiert (als Startposition z wird hier z_C gewählt), der Schärfemaßwert $S(z_C)$ bestimmt und die Schrittweite dz gewählt, wobei
5 beispielsweise als Schrittweite dz die Schärfentiefe des Mikroskops 1 bzw. der verwendeten Mikroskopoptik 4 gewählt werden kann. Als Schärfemaß $S(z)$ kann z. B. ein skalares Schärfefunktional verwendet werden, das beispielsweise Entropie-Maße berücksichtigt, eine Bild-Frequenz-Analyse oder eine einfache Summe über Gradienten durchführt. Grundsätzlich
10 sind alle Bildschärfemaße, welche für herkömmliche Autofokussierungsalgorithmen geeignet sind, auch für das Schärfefunktional S gemäß Schritt S2 geeignet.

Es werden dann nacheinander die Schritte S3 bis S6 durchgeführt, wobei der Wert G_L zur Festlegung der unteren bzw. linken Grenze des z -Bereiches dient und hier einen Wert von
15 beispielsweise 0,5 aufweist. Solange der Schärfemaßwert $S(z)$ für die an den unterschiedlichen Positionen durchgeführten Bildaufnahmen größer ist als $G_L \cdot S(z_C)$, werden weitere Aufnahmen durchgeführt. Sobald diese Bedingungen nicht mehr erfüllt sind, ist der vorliegende z -Wert der Wert der unteren Grenze z_L .

20 Sobald dieser Grenzwert bestimmt ist (Schritt S7), werden die Schritte S8-S13 durchgeführt, um den oberen Grenzwert z_R zu bestimmen. Als Wert für G_R in Schritt S12 wird hier wiederum 0,5 verwendet. Natürlich müssen die Werte G_L und G_R nicht gleich sein, sondern können auch unterschiedlich sein.

25 Nach Durchführung der Schritte S1-S13 sind die beiden Grenzwerte des z -Bereiches automatisch bestimmt, so daß der z -Bereich automatisch festgelegt wurde. Es kann dann in bekannter Art und Weise der z -Stapel aufgenommen werden.

Um die Geschwindigkeit der Festlegung des z -Bereiches zu erhöhen, kann auf die Schritte S8
30 bis S13 verzichtet werden, um den Wert z_R zu ermitteln. In diesem Fall kann man z. B. einen symmetrischen z -Bereich um z_C herum durch folgende Gleichung festlegen $z_R = z_C + (z_C - z_L)$.

Bei den Schritten S3 und S9 wurde als Schrittweite die Schärfentiefe der verwendeten Mikroskopoptik 4 gewählt. Natürlich sind auch kleinere oder größere Schrittweiten möglich.
35 Wenn man eine höhere Genauigkeit wünscht, kann man eine geringere Schrittweite wählen, wobei Werte bis zu der halben Schärfentiefe von Vorteil sind. Wenn man eine höhere Geschwindigkeit bei der Ermittlung des z -Bereiches wünscht, kann man eine größere Schrittweite wählen. Diese kann z. B. bis zum 1,5-fachen der Schärfentiefe betragen.

Bei der in Verbindung mit Fig. 4 beschriebenen Bestimmung des z-Bereiches kann statt einem Autofokuslauf im Schritt S1 ein beliebiger z-Wert innerhalb der Zelle 9 vorgegeben werden. Aufgrund der Schritte S2 bis S13 kann, selbst wenn der z-Wert nicht in der Ebene der optimalen
5 Schärfe liegt, der relevante und gewünschte z-Bereich äußerst genau festgelegt werden.

Wenn eine Mosaikaufnahme der Zelle 9 bzw. eines sonstigen aufzunehmenden Objektes durchzuführen ist, kann die erfindungsgemäße Festlegung des z-Bereiches für jedes Mosaikelement separat durchgeführt werden, was zu einer Vermeidung von unnötigen
10 Einzelaufnahmen führt, wie nachfolgend im Detail beschrieben wird.

In Fig. 5 ist in Draufsicht das aufzunehmende Objekt 9 gezeigt und sind zwölf Mosaikabschnitte K11-K33 eingezeichnet, wobei in jedem der Mosaikabschnitte K11-K33 die Aufnahme eines z-Stapels mittels des Mikroskops 1 (Fig. 1) durchzuführen ist. In Fig. 6 ist in einer Seitenansicht
15 das aufzunehmende Objekt 9 im Bereich der Mosaikabschnitte K21, K22, K23 und K24 dargestellt. Da für jeden der Mosaikabschnitte K21-K24 vor der Aufnahme zunächst der z-Bereich automatisch in der beschriebenen Art und Weise festgelegt wird, ist der z-Bereich für den Mosaikabschnitt K21-K24 optimal festgelegt, wie durch die gestrichelten Linien in Fig. 6, die die obere und untere Grenze des z-Bereiches darstellen, gezeigt ist.

20 In Fig. 7 ist zum Vergleich die bisher bekannte Lösung angegeben, bei der vor Beginn der Messung die Festlegung des z-Bereiches durchgeführt wird. Dabei wird der z-Bereich natürlich basierend auf dem Abschnitt der Zelle 9 festgelegt, der die größte z-Ausdehnung aufweist, wie dies schematisch in Fig. 7 dargestellt ist. Dies führt nachteilig dazu, daß beispielsweise im
25 Mosaikabschnitt K21 bei der Aufnahme des entsprechenden z-Stapels unnötige Einzelaufnahmen durchgeführt werden, die nicht die Zelle 9 selbst enthalten. Dies führt zu einer insgesamt unnötig langen Meßzeit und auch zu einer starken und nicht notwendigen Belastung der Probe durch Einzelaufnahmen, die eigentlich nicht notwendig sind.

30 Bei der Mosaikaufnahme kann, wie beschrieben wurde, für jeden Mosaikabschnitt K11-K34 eine automatische Festlegung des z-Bereiches durchgeführt werden. Es ist jedoch auch möglich, nicht für jeden Mosaikabschnitt K11-K34 den z-Bereich in der angegebenen Art und Weise automatisch festzulegen. Beispielsweise kann für zumindest einen Mosaikabschnitt (hier z. B. der Mosaikabschnitt K12) der z-Bereich durch Interpolation aus den bereits festgelegten z-
35 Bereichen von zwei oder mehreren benachbarten Mosaikabschnitten (beispielsweise die Mosaikabschnitte K11 und K13) festgelegt werden. Auch eine Festlegung mittels Extrapolation basierend auf zumindest einem bereits festgelegten z-Bereich ist möglich.

Ein weiteres Beispiel der vorteilhaften Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zum Festlegen eines z-Bereiches wird in Verbindung mit Fig. 8 beschrieben. Dort ist die aufzunehmende Zelle 9 schematisch zu drei verschiedenen Zeitpunkten t_1 , t_2 und t_3 dargestellt, wobei angenommen wird, daß die Zelle 9 wächst, so daß unter anderem ihre
5 Ausdehnung in z-Richtung mit zunehmender Zeit größer wird.

Erfindungsgemäß wird daher vor der Aufnahme eines z-Stapels (bevorzugt vor jeder Aufnahme eines z-Stapels) die erfindungsgemäße Festlegung des z-Bereiches automatisch durchgeführt, so daß stets optimal angepaßte Grenzen für den z-Bereich zu allen Zeitpunkten t_1 - t_3 vorliegen,
10 wie durch die gestrichelten Linien, die die Ober- und Untergrenze darstellen sollen, dargestellt ist.

Im Vergleich dazu ist in Fig. 9 der herkömmliche Ansatz gezeigt. Bisher mußte man die größte Ausdehnung in z-Richtung in Abhängigkeit der Zeit t annehmen und darauf basierend den z-
15 Bereich bestimmen. Dies führt dazu, daß der z-Bereich für die Zeitpunkte t_1 und t_2 viel zu groß gewählt ist, so daß wiederum unnötige Einzelaufnahmen während der Aufnahme eines z-Stapels durchgeführt werden, die die Meßzeit verlängern und eine unerwünschte Probenbelastung nach sich ziehen. Des weiteren muß man einen gewissen Sicherheitsabstand vorsehen, so daß die obere und untere Grenze zum Zeitpunkt t_3 zu weit von der Zelle 9 entfernt
20 ist. Dies führt somit dazu, daß selbst zum Zeitpunkt t_3 unnötige Einzelaufnahmen in z-Abschnitten oberhalb und unterhalb der Zelle 9 gemacht werden, wobei diese unnötigen Einzelaufnahmen in diesen z-Abschnitten auch noch zu den Zeitpunkten t_1 und t_2 durchgeführt werden.

In Fig. 10 ist der Fall gezeigt, daß sich die Position der Zelle 9 in z-Richtung in Abhängigkeit der Zeit ändert. Dies kann beispielsweise der Fall sein, wenn die Zelle 9 in einer Nährlösung vorhanden ist, so daß ein Fixieren in z-Richtung nicht oder nur sehr schwierig möglich ist. Mit dem erfindungsgemäßen Festlegen des z-Bereiches ist dies aber unproblematisch, da vor Durchführung der Messung stets der optimale z-Bereich automatisch festgelegt wird, wie
30 wiederum durch die gestrichelten Linien, die die obere und untere Grenze des z-Bereiches andeuten, dargestellt ist. Zu jedem der gezeigten Zeitpunkte t_1 , t_2 und t_3 wird der optimale z-Bereich bestimmt und festgelegt, so daß dann der z-Stapel zu diesen Zeiten t_1 - t_3 aufgenommen werden kann.

Der bisherige Ansatz bestand darin, eine Annahme über den minimalen und maximalen z-Wert der Zelle 9 zu treffen, die während der Messungen auftreten, und darauf basierend den z-Bereich festzulegen, was beispielsweise zu den in Fig. 11 gezeigten Grenzen (die wiederum durch gestrichelte Linien dargestellt sind) führt. Aufnahmen des z-Stapels zu den Zeiten t_1 , t_2

und t3 führen dann zu einer Vielzahl von unnötigen Einzelaufnahmen, da die Grenzen sehr weit von der Zelle 9 entfernt sind im Vergleich zu der Darstellung von Fig. 10.

5 Natürlich können die in Verbindung mit Fig. 5 bis 11 beschriebenen vorteilhaften Ausführungsformen auch beliebig untereinander kombiniert werden.

10 In Fig. 12 ist das Schärfemaß S in ähnlicher Weise wie in Fig. 3b dargestellt, wobei bei Fig. 12 ein nicht gaußförmiger Schärfeverlauf angenommen wird. In diesem Fall kann z. B. die untere Grenze des z-Bereiches durch den Abfall des Schärfemaßwertes auf 50 % bezogen auf den lokalen Maximalwert bestimmt werden, wie in Fig. 12 angedeutet ist. Da der Schärfeverlauf in Richtung größer werdender z-Werte ansteigt und nicht wieder abfällt oder oberhalb eines voreingestellten Schwellwertes liegt, kann als obere Grenze für den z-Bereich z. B. automatisch die Suchgrenze die Autofokusroutine verwendet werden. Alternativ ist es möglich, die obere Grenze basierend auf der ermittelten unteren Grenze zu bestimmen.

15

In Fig. 13 ist der Fall gezeigt, daß aufgrund des Schärfeverlaufes nur die obere Grenze ermittelt werden kann. In diesem Fall wird dann die untere Grenze in ähnlicher Weise wie die obere Grenze bei der Variante gemäß Fig. 12 bestimmt.

20 Die beschriebene Art der Bestimmung des z-Bereiches geht davon aus, daß diese Bestimmung für einen Aufnahmekanal des Mikroskops 1 durchgeführt wird. Wenn die Probe 9 eingefärbt ist, z. B. mit unterschiedlich fluoreszierenden Markierungsstoffen, kann für jeden Aufnahmekanal separat der z-Bereich festgelegt werden und auch die Aufnahme des z-Stapels für den entsprechenden Kanal mit dem zugeordneten z-Bereich durchgeführt werden.

25

Bei den beschriebenen Ausführungsformen wurde davon ausgegangen, daß das Mikroskop 1 als Weitfeldmikroskop ausgebildet ist. Natürlich muß das Mikroskop 1 kein Weitfeldmikroskop sein. Beispielsweise kann das Mikroskop 1 als konfokales Mikroskop ausgebildet sein. In diesem Fall kann man anstatt von dem Schärfemaß und dem Schärfemaßwert von einer mittleren Intensität und einem mittleren Intensitätswert sprechen. Alle anderen Aspekte können in gleicher oder ähnlicher Weise wie bei den oben beschriebenen Ausführungsformen verwirklicht sein.

30

Patentansprüche

1. Verfahren zum Festlegen eines z-Bereiches in einer Probe, in dem ein z-Stapel der
5 Probe mittels eines Mikroskops aufzunehmen ist,
wobei auf der Basis eines in der Probe liegenden z-Wertes und unter Berücksichtigung
zumindest eines vorbestimmten Parameters der z-Bereich automatisch festgelegt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem ein Schärfemaß der Probe als der vorbestimmte
10 Parameter berücksichtigt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, bei dem eine Kontrastfunktion als der vorbestimmte
Parameter berücksichtigt wird.
- 15 4. Verfahren nach einem der obigen Ansprüche, bei dem der in der Probe liegende z-Wert
automatisch, insbesondere durch ein Autofokussierverfahren, bestimmt wird.
5. Verfahren nach Anspruch 4, bei dem Daten des automatischen Bestimmens des in der
Probe liegenden z-Wertes auch zur Festlegung des z-Bereiches genutzt werden.
20
6. Verfahren nach einem der obigen Ansprüche, bei dem die obere und untere Grenze des
z-Bereiches symmetrisch zu dem in der Probe liegenden z-Wert bestimmt werden.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, bei dem die obere und untere Grenze des
25 z-Bereichs asymmetrisch zu dem in der Probe liegenden z-Wert bestimmt werden.
8. Verfahren nach einem der obigen Ansprüche, bei dem ausgehend von dem in der Probe
liegenden z-Wert schrittweise mit größer werdendem Abstand in z-Richtung jeweils der Wert
des vorbestimmten Parameters ermittelt wird.

9. Verfahren nach einem der obigen Ansprüche, bei dem anhand eines vorbestimmten Wertes des zumindest einen vorbestimmten Parameters eine Grenze des festzulegenden z-Bereichs bestimmt wird.
- 5 10. Verfahren nach einem der obigen Ansprüche, bei dem nach Festlegung des z-Bereiches der z-Stapel der Probe in dem z-Bereich aufgenommen wird.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, bei dem zur Festlegung des z-Bereichs Einzelaufnahmen der Probe in verschiedenen z-Ebenen gemacht werden, wobei zumindest ein
10 Teil der Einzelaufnahmen für den aufzunehmenden z-Stapel der Probe genutzt wird.
12. Verfahren nach einem der obigen Ansprüche, bei dem zumindest ein weiterer z-Bereich jeweils auf der Basis eines in der Probe liegenden z-Wertes und unter Berücksichtigung zumindest eines vorbestimmten Parameters automatisch festgelegt wird.
- 15 13. Verfahren nach Anspruch 12, bei dem der zumindest eine weitere z-Bereich für denselben Abschnitt der Probe festgelegt wird, für den der zuvor festgelegte z-Bereich festgelegt wurde, wobei die z-Bereiche bevorzugt zu verschiedenen Zeitpunkten festgelegt werden.
- 20 14. Verfahren nach Anspruch 12, bei dem der zumindest eine weitere z-Bereich für einen Abschnitt der Probe festgelegt wird, der lateral versetzt ist zu dem Abschnitt der Probe, für den der zuvor festgelegte z-Bereich festgelegt wurde.
- 25 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, bei dem zumindest zwei weitere z-Bereiche jeweils auf der Basis eines in der Probe liegenden z-Wertes und unter Berücksichtigung zumindest eines vorbestimmten Parameters automatisch festgelegt werden, wobei zumindest ein erster der weiteren z-Bereiche für denselben Abschnitt der Probe festgelegt wird, für den bereits zeitlich vorher ein z-Bereich festgelegt wurde, und zumindest ein anderer der weiteren
30 z-Bereiche für einen Abschnitt der Probe festgelegt wird, der lateral versetzt ist zu dem Abschnitt der Probe, für den bereits zeitlich vorher ein z-Bereich festgelegt wurde.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 15, bei dem nach Festlegen des zumindest einen weiteren z-Bereiches der z-Stapel der Probe in dem zumindest einen weiteren z-Bereich
35 aufgenommen wird.

17. Verfahren nach einem der obigen Ansprüche, bei dem basierend auf einem in der Probe liegenden z-Wert und unter Berücksichtigung eines vorbestimmten Parameters die Ausdehnung der Probe in z-Richtung automatisch bestimmt wird.
- 5 18. Vorrichtung zum Festlegen eines z-Bereiches in einer Probe, in dem ein z-Stapel der Probe mittels eines Mikroskops aufzunehmen ist,
wobei die Vorrichtung eine Steuereinheit (7) aufweist, die dazu ausgebildet ist, auf der Basis eines in der Probe liegenden z-Wertes und unter Berücksichtigung zumindest eines vorbestimmten Parameters den z-Bereich automatisch festzulegen.
- 10 19. Vorrichtung nach Anspruch 18, bei der die Steuereinheit (7) ein Schärfemaß oder eine Kontrastfunktion der Probe als den vorbestimmten Parameter berücksichtigt.
- 15 20. Vorrichtung nach Anspruch 18 oder 19, die eine Bestimmungseinheit (7, 8) aufweist, die den in der Probe liegenden z-Wert bestimmt, insbesondere durch ein Autofokussierverfahren, und der Steuereinheit (7) mitteilt.
- 20 21. Vorrichtung nach Anspruch 20, bei der die Steuereinheit (7) Daten der Bestimmungseinheit zur Festlegung des z-Bereiches verwendet.
22. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 18 bis 21, bei der die Steuereinheit (7) die obere und untere Grenze des z-Bereiches symmetrisch zu dem in der Probe liegenden z-Wert bestimmt.
- 25 23. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 18 bis 21, bei der die Steuereinheit (7) die obere und untere Grenze des z-Bereichs asymmetrisch zu dem in der Probe liegenden z-Wert bestimmt.
- 30 24. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 18 bis 23, bei der die Steuereinheit (7) ausgehend von dem in der Probe liegenden z-Wert schrittweise mit größer werdendem Abstand in z-Richtung jeweils den Wert des vorbestimmten Parameters ermittelt.
- 35 25. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 18 bis 24, bei der die Steuereinheit (7) anhand eines vorbestimmten Wertes des zumindest einen vorbestimmten Parameters eine Grenze des z-Bereichs bestimmt.
26. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 18 bis 25, die das Mikroskop (1) aufweist, das nach Festlegung des z-Bereiches den z-Stapel der Probe in den z-Bereich aufnimmt.

27. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 18 bis 25, bei der zur Festlegung des z-Bereichs mittels des Mikroskops Einzelaufnahmen der Probe in verschiedenen z-Ebenen gemacht werden, wobei die Steuereinheit (7) zumindest einen Teil der Einzelaufnahmen für den aufzunehmenden z-Stapel der Probe nutzt.

28. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 18 bis 27, bei der die Steuereinheit (7) zumindest einen weiteren z-Bereich jeweils auf der Basis eines in der Probe liegenden z-Wertes und unter Berücksichtigung zumindest eines vorbestimmten Parameters automatisch festlegt.

29. Vorrichtung nach Anspruch 28, bei der die Steuereinheit (7) den zumindest einen weiteren z-Bereich für denselben Abschnitt der Probe festlegt, für den der zuvor festgelegte z-Bereich festgelegt wurde, wobei die Steuereinheit die z-Bereiche bevorzugt zu verschiedenen Zeitpunkten festlegt.

30. Vorrichtung nach Anspruch 28, bei der die Steuereinheit (7) den zumindest einen weiteren z-Bereich für einen Abschnitt der Probe festlegt, der lateral versetzt ist zu dem Abschnitt der Probe, für den der zuvor festgelegte z-Bereich festgelegt wurde.

31. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 18 bis 27, bei der die Steuereinheit (7) zumindest zwei weitere z-Bereiche jeweils auf der Basis eines in der Probe liegenden z-Wertes und unter Berücksichtigung zumindest eines vorbestimmten Parameters automatisch festlegt, wobei zumindest ein erster der weiteren z-Bereiche für denselben Abschnitt der Probe festgelegt wird, für den bereits zeitlich vorher ein z-Bereich festgelegt wurde, und zumindest ein anderer der weiteren z-Bereiche für einen Abschnitt der Probe festgelegt wird, der lateral versetzt ist zu dem Abschnitt der Probe, für den bereits zeitlich vorher ein z-Bereich festgelegt wurde.

32. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 28 bis 31, bei der das Mikroskop (1) nach Festlegung des zumindest einen weiteren z-Bereiches den z-Stapel der Probe im zumindest einen weiteren z-Bereich aufnimmt.

33. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 18 bis 32, bei der die Steuereinheit (7) dazu ausgebildet ist, auf der Basis eines in der Probe liegenden z-Wertes und unter Berücksichtigung eines vorbestimmten Parameters die Ausdehnung der Probe in z-Richtung automatisch zu bestimmen.

Fig. 1

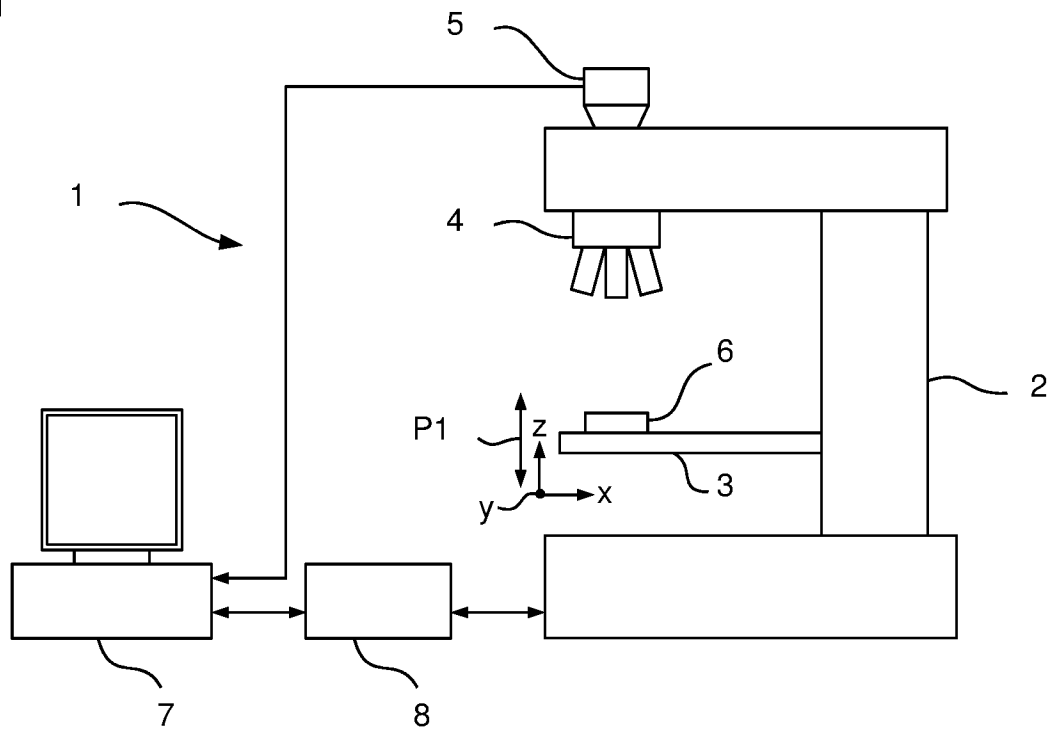


Fig. 2a

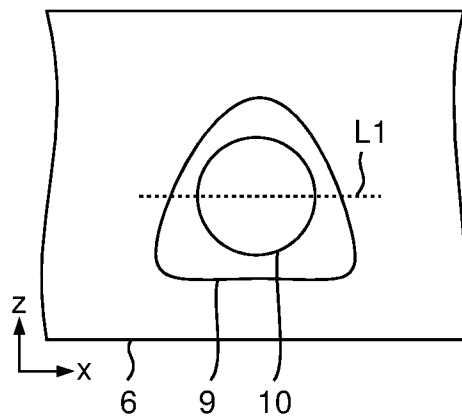


Fig. 3a

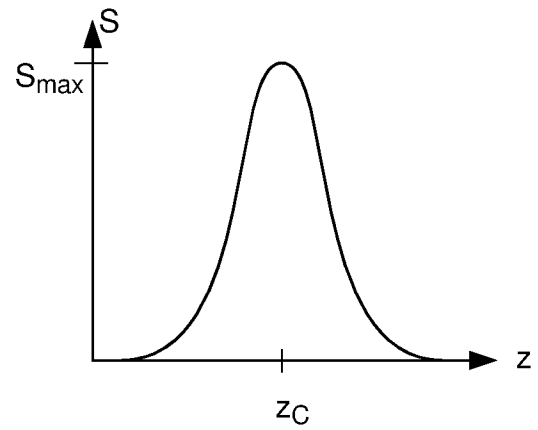


Fig. 2b

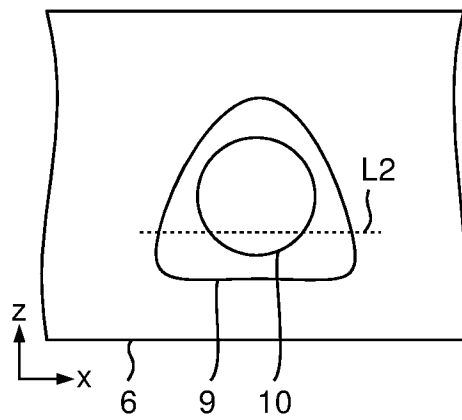


Fig. 3b

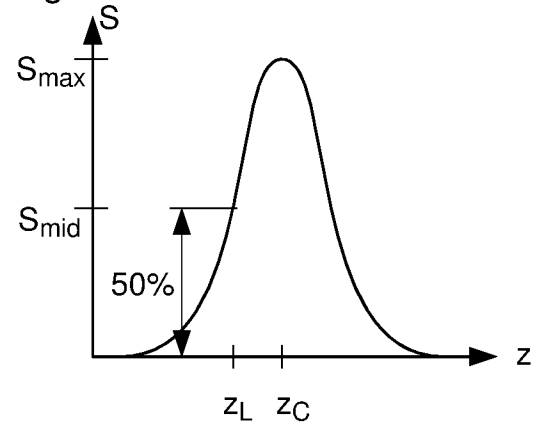


Fig. 2c

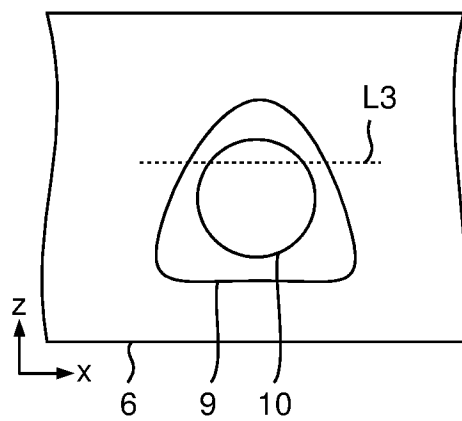


Fig. 3c

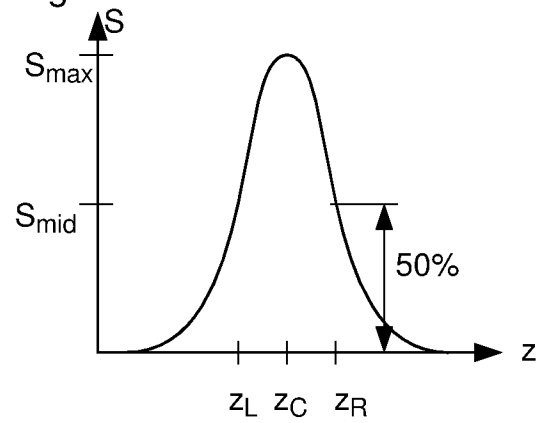
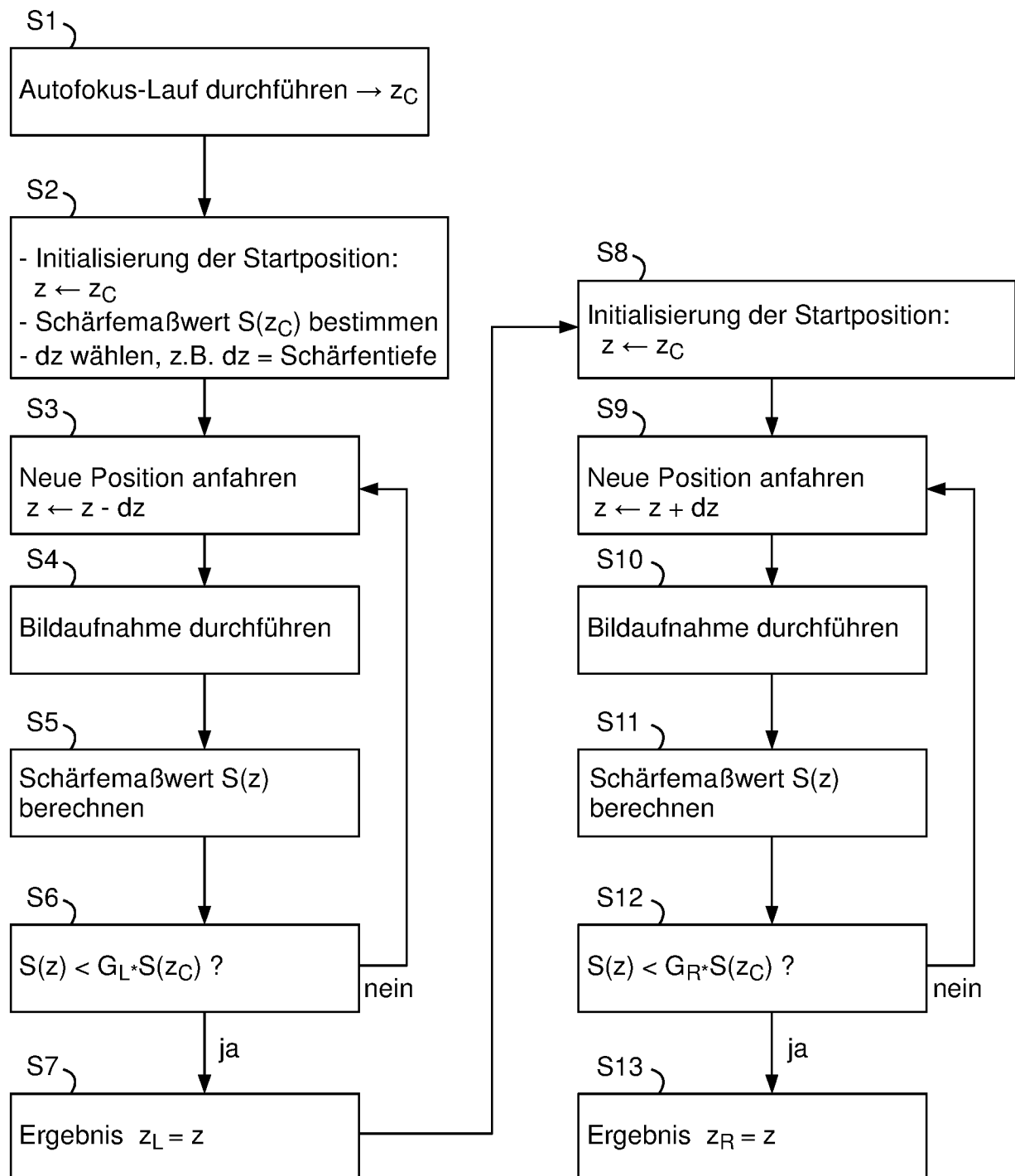


Fig. 4



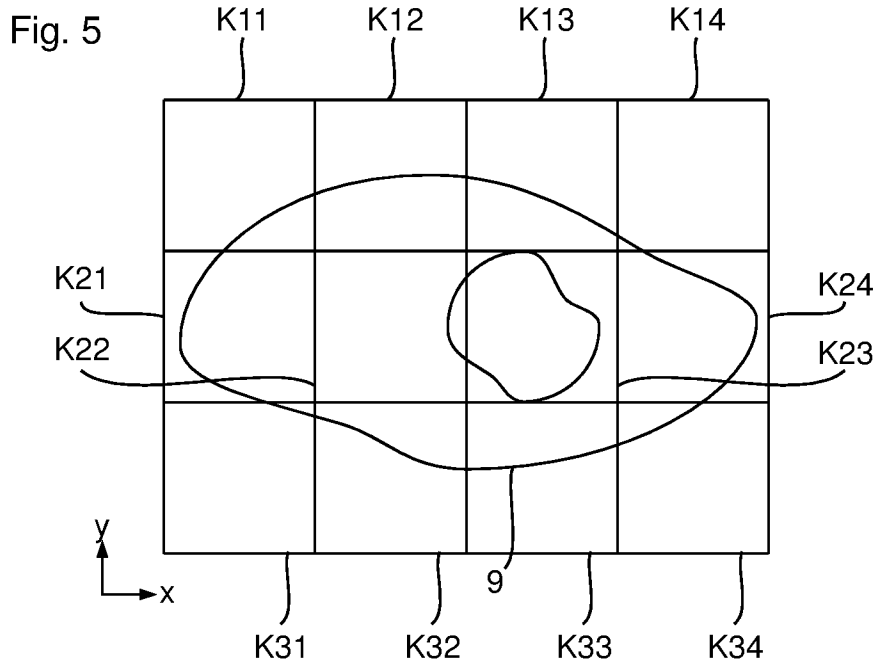


Fig. 6

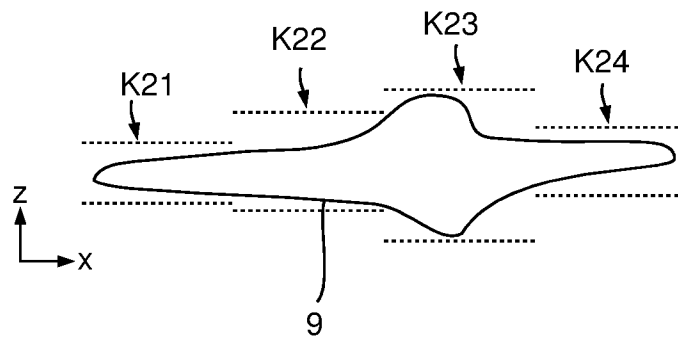


Fig. 7

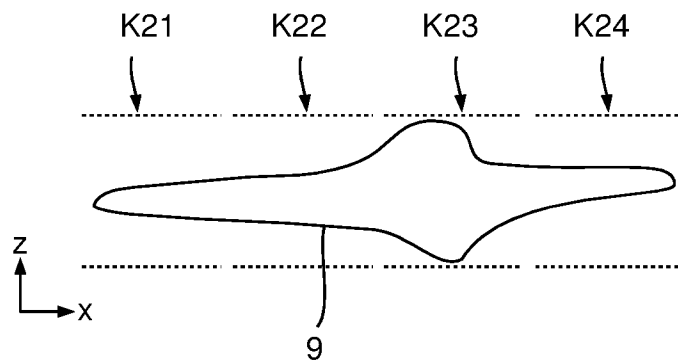


Fig. 8

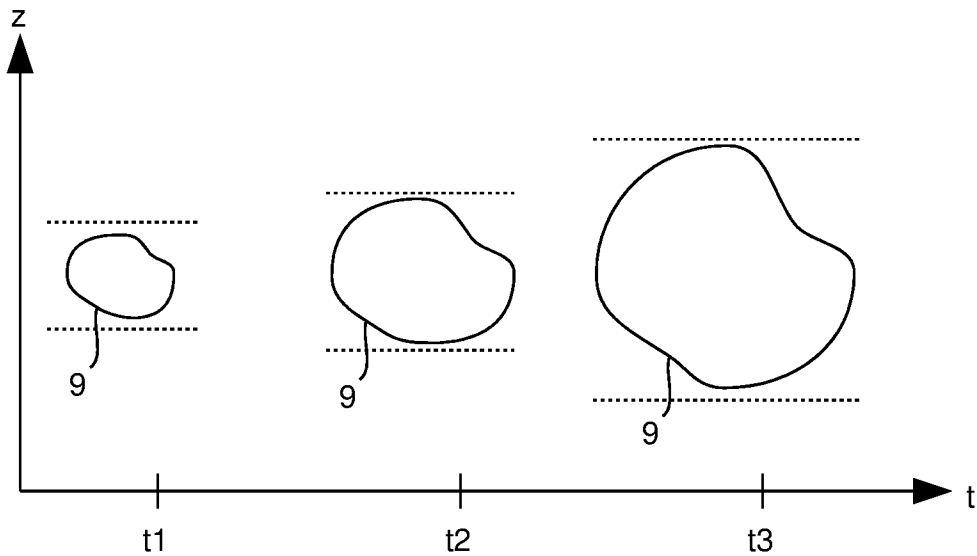


Fig. 9

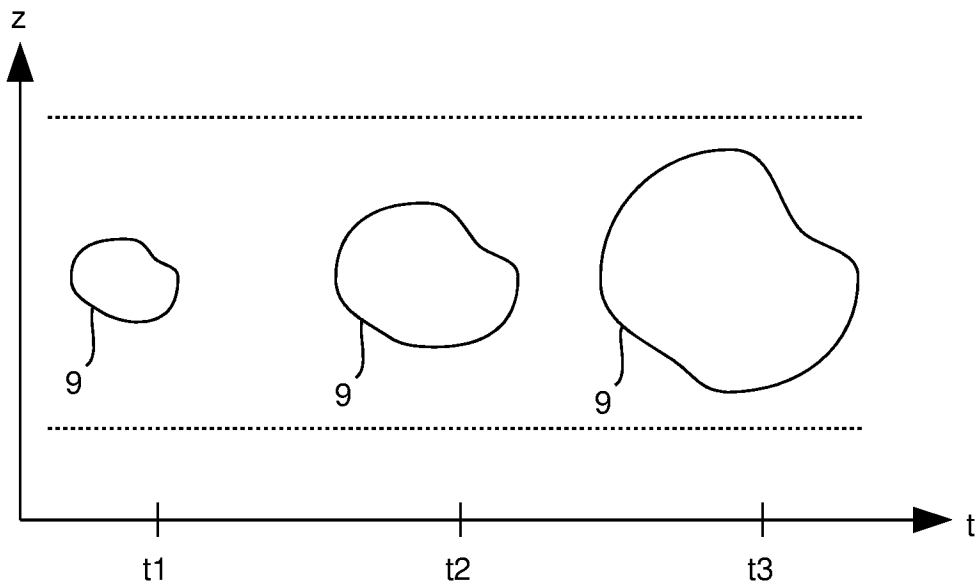


Fig. 10

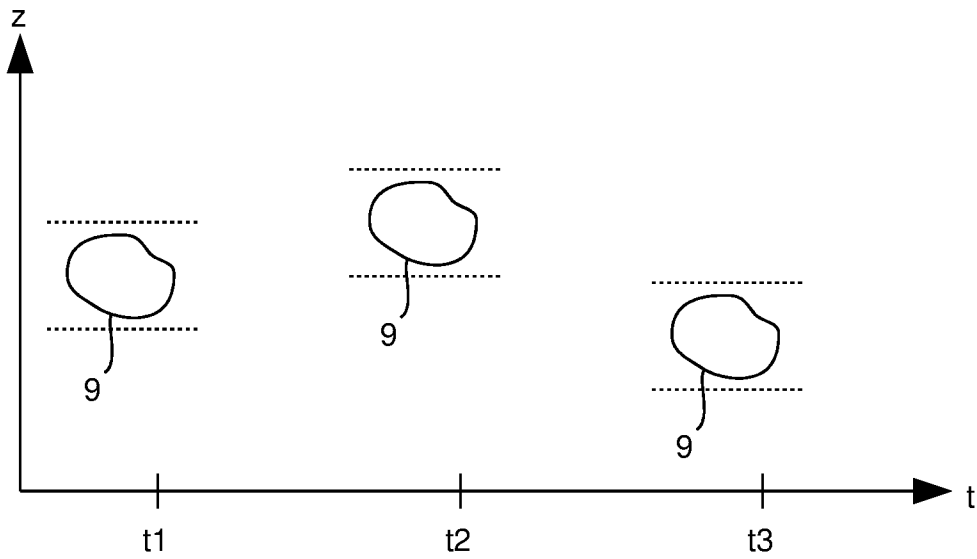


Fig. 11

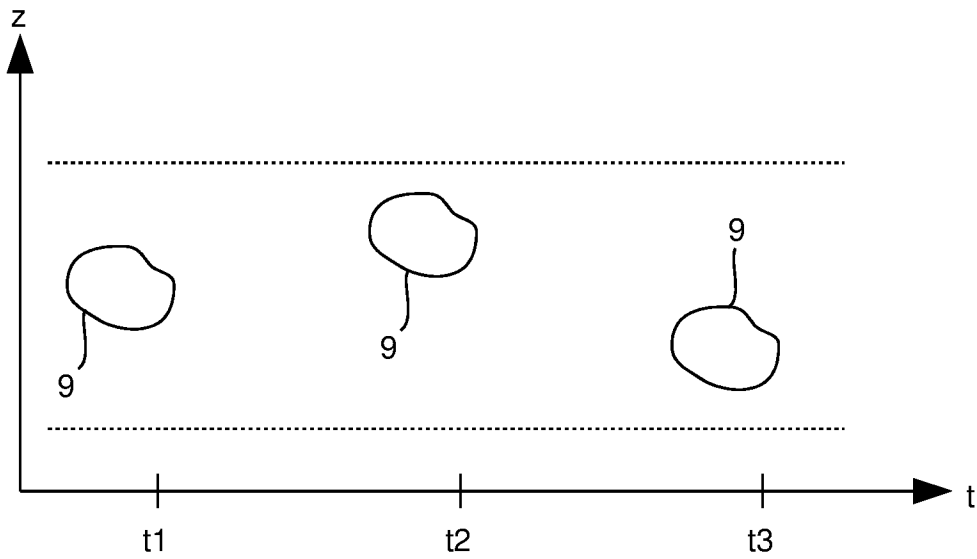


Fig. 12

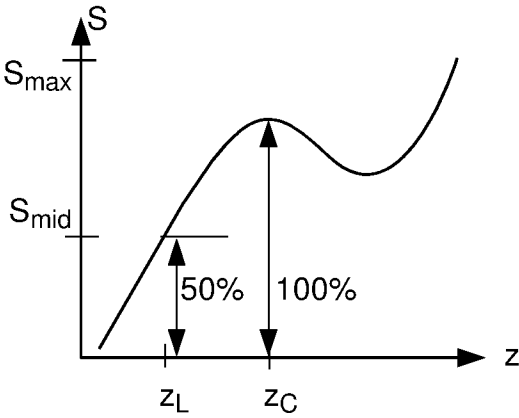
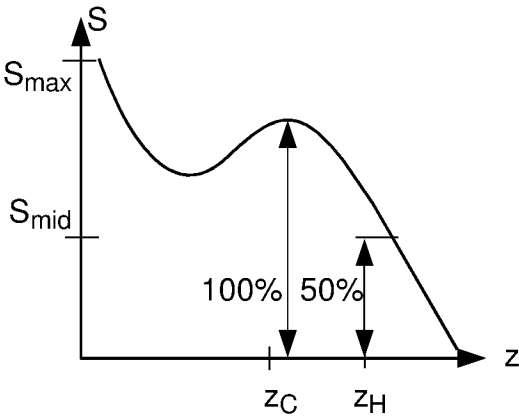


Fig. 13



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/056210

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G02B21/24 G02B21/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G02B

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/028745 A1 (LEICA MICROSYSTEMS [DE]; SIECKMANN FRANK [DE]) 13 March 2008 (2008-03-13) figures 1-21 page 14, line 6 - page 26, line 8 -----	1-33
X	US 2005/280818 A1 (YAMASHITA YUSUKE [JP] ET AL) 22 December 2005 (2005-12-22) abstract figures claims -----	1,18
X	DE 10 2007 003059 A1 (UNIV ILMENAU TECH [DE]) 24 July 2008 (2008-07-24) the whole document -----	1,18



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 June 2012

Date of mailing of the international search report

09/07/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Windecker, Robert

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/056210

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008028745 A1	13-03-2008	DE 102006042242 A1	27-03-2008
		EP 2064578 A1	03-06-2009
		EP 2381287 A1	26-10-2011
		WO 2008028745 A1	13-03-2008

US 2005280818 A1	22-12-2005	NONE	

DE 102007003059 A1	24-07-2008	AT 470127 T	15-06-2010
		DE 102007003059 A1	24-07-2008
		DE 202008017776 U1	29-07-2010
		EP 2109753 A1	21-10-2009
		WO 2008087059 A1	24-07-2008

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. G02B21/24 G02B21/00
ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
G02B

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 2008/028745 A1 (LEICA MICROSYSTEMS [DE]; SIECKMANN FRANK [DE]) 13. März 2008 (2008-03-13) Abbildungen 1-21 Seite 14, Zeile 6 - Seite 26, Zeile 8 -----	1-33
X	US 2005/280818 A1 (YAMASHITA YUSUKE [JP] ET AL) 22. Dezember 2005 (2005-12-22) Zusammenfassung Abbildungen Ansprüche -----	1,18
X	DE 10 2007 003059 A1 (UNIV ILMENAU TECH [DE]) 24. Juli 2008 (2008-07-24) das ganze Dokument -----	1,18



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. Juni 2012

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

09/07/2012

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Windecker, Robert

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2012/056210

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2008028745 A1	13-03-2008	DE 102006042242 A1	27-03-2008
		EP 2064578 A1	03-06-2009
		EP 2381287 A1	26-10-2011
		WO 2008028745 A1	13-03-2008

US 2005280818 A1	22-12-2005	KEINE	

DE 102007003059 A1	24-07-2008	AT 470127 T	15-06-2010
		DE 102007003059 A1	24-07-2008
		DE 202008017776 U1	29-07-2010
		EP 2109753 A1	21-10-2009
		WO 2008087059 A1	24-07-2008
