

(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
19. Oktober 2017 (19.10.2017)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2017/178528 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

G02B 21/08 (2006.01) G02B 21/36 (2006.01)
G02B 21/16 (2006.01) G02B 27/48 (2006.01)

(74) Anwalt: PATENTANWÄLTE GEYER, FEHNERS &
PARTNER MBB; Perhamerstraße 31, 80687 München
(DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2017/058778

(22) Internationales Anmeldedatum:
12. April 2017 (12.04.2017)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2016 107 041.6
15. April 2016 (15.04.2016) DE

(71) Anmelder: CARL ZEISS MICROSCOPY GMBH
[DE/DE]; Carl-Zeiss-Promenade 10, 07745 Jena (DE).

(72) Erfinder: KLEPPE, Ingo; Kaninchenweg 31, 07749 Jena
(DE). KALKBRENNER, Thomas; Forstweg 35, 07745
Jena (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK,
DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH,
KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,
MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA,
NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO,
RS, RU, RW, SA, 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, ST,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG,
KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH,
CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: MICROSCOPE COMPRISING GROUPS OF LIGHT EMITTERS FOR ILLUMINATION, AND MICROSCOPY
METHOD

(54) Bezeichnung : MIKROSKOP MIT GRUPPEN VON LICHTEMITTERN ZUR BELEUCHTUNG SOWIE
MIKROSKOPIEVERFAHREN

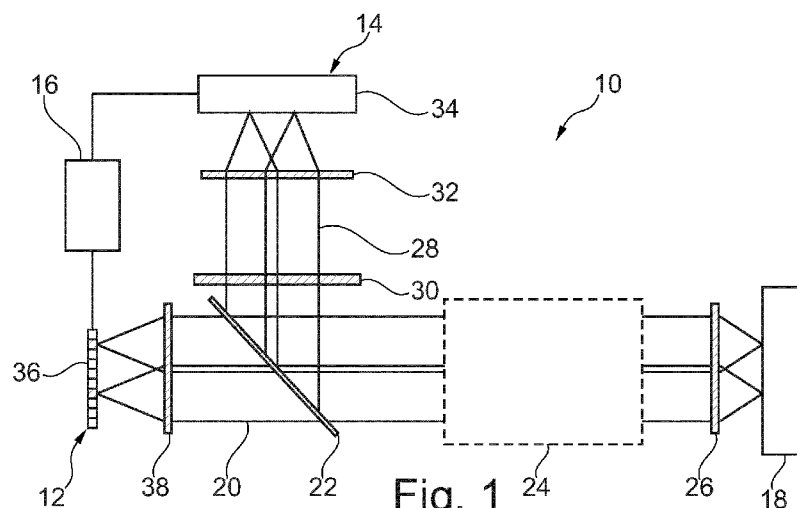


Fig. 1

(57) Abstract: The invention relates to a microscope (10) for imaging an object (18) in an object field, comprising an illumination device (12, 112, 212, 312) for wide-field illumination of the object (18), wherein the illumination device (12, 112, 212, 312) has a plurality of light sources (36), a detection device (14) for recording a wide-field image of the object (18), and a control device (16) for controlling the detection device (14) and the illumination device (12, 112, 212, 312). The control device (16) divides the light sources (36) into at least two groups (50a, 50b), wherein the light sources (36) of all groups combined fill the object field entirely. The control device (16) for each group switches on all light sources (36) of said group (50a, 50b), causes the detection device (14) to record a single image of the object (18), switches off the light sources (36) of said group (50a, 50b), and thus interconnects all groups, and generates a plurality of single images. From the generated single images, an image of the object (18) is generated by the control device (16).

(57) Zusammenfassung:

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



WO 2017/178528 A1



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, KM, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz
3)

Die Erfindung betrifft ein Mikroskop (10) zur Abbildung eines Objekts (18) in einem Objektfeld, umfassend eine Beleuchtungseinrichtung (12, 112, 212, 312) zur Weitfeldbeleuchtung des Objekts (18), wobei die Beleuchtungseinrichtung (12, 112, 212, 312) eine Vielzahl von Lichtquellen (36) aufweist, eine Detektionseinrichtung (14) zur Aufnahme eines Weitfeldbilds des Objekts (18), und eine Steuereinrichtung (16) zur Steuerung der Detektionseinrichtung (14) und der Beleuchtungseinrichtung (12, 112, 212, 312). Die Steuereinrichtung (16) teilt die Lichtquellen (36) in m indestens zwei Gruppen (50a, 50b) ein, wobei die Lichtquellen (36) aller Gruppen zusammen das Objektfeld lückenlos füllen, wobei die Steuereinrichtung (16) für jede Gruppe (50a, 50b) alle Lichtquellen (36) dieser Gruppe (50a, 50b) einschaltet, die Detektionseinrichtung (14) veranlasst, ein Einzelbild des Objekts (18) aufzunehmen, die Lichtquellen (36) dieser Gruppe (50a, 50b) ausschaltet, und so alle Gruppen durchschaltet sowie mehrere Einzelbilder erzeugt, und wobei die Steuereinrichtung (16) aus den erzeugten Einzelbildern ein Bild des Objekts (18) erzeugt.

MIKROSKOP MIT GRUPPEN VON LICHTEMITTERN ZUR BELEUCHTUNG SOWIE MIKROSKOPIEVERFAHREN

- 5 Die Erfindung betrifft ein Mikroskop zur Abbildung eines Objekts in einem Objektfeld, wobei das Mikroskop eine Beleuchtungseinrichtung zur Weitfeldbeleuchtung des Objekts, welche eine Vielzahl von Lichtquellen aufweist, eine Detektionseinrichtung zur Aufnahme eines Weitfeldbilds des Objekts und eine Steuereinrichtung zur Steuerung der Detektionseinrichtung und der Bewegungseinrichtung umfasst. Ferner betrifft die Erfindung ein Mikroskopieverfahren zur
10 Abbildung eines Objektes in einem Objektfeld, das im Weitfeld mit einer Beleuchtungseinrichtung, welche eine Vielzahl von Lichtquellen aufweist, beleuchtet wird.

- In der klassischen Lichtmikroskopie besteht bei der Untersuchung dreidimensional ausgedehnter Objekte, d. h. von Objekten, deren Ausdehnung entlang der optischen Achse
15 größer ist als die Tiefenschärfe der verwendeten Objektive ist, das Problem, dass dem scharfen Bild außerfokale Bildanteile, welche unscharf abgebildet werden, überlagert sind. Dies verhindern konfokale Abbildungen, bei welchen mittels eines Pinholes aus ober- und unterhalb der Fokalebene stammendes Licht ausgeblendet wird und somit nicht zur Abbildung beiträgt. Auf diese Weise entsteht ein sogenannter optischer Schnitt. Durch Aufnahme mehrerer
20 optischer Schnittbilder in verschiedenen Fokusslagen kann ein „z-Stapel“ gewonnen werden, welcher eine dreidimensionale Darstellung des Objekts ermöglicht.

- Ein anderer Weg zur Erzeugung optischer Schnitte ist die Anwendung strukturierter Beleuchtung. Beispielfhaft sei auf die EP 1556728 B1 verwiesen. Die Verbesserung der
25 Tiefendiskriminierung wird hier dadurch erreicht, dass ein Objekt mit periodischer Struktur beleuchtet wird, eine Registrierung der so entstehenden Helligkeitsverteilung erfolgt, die Phasenlage der periodischen Struktur verschoben wird und die registrierten Helligkeitsverteilungen miteinander verrechnet werden, um eine Objekthelligkeitsverteilung zu erhalten. Diese Vorgehensweise nutzt das Prinzip, dass das Objekt unterschiedlich beleuchtet
30 wird und aufgrund der unterschiedlichen Beleuchtung eine Tiefendiskriminierung berechnet werden kann.

- Darüber hinaus ist es auch möglich, eine Tiefendiskriminierung dadurch zu erreichen, dass ein Bild mit homogener Beleuchtung und ein Bild mit einer zufälligen Intensitätsverteilung erzeugt
35 wird, wie dies beispielsweise in Daryl Lim *et al.*, „Wide-field fluorescence sectioning with hybrid

speckle and uniform-illumination microscopy", 15. August 2008, Vol. 33, Nr. 16, Optical Letters, beschrieben wird.

5 Für andere Verfahren mit gleicher Wirkung sei auf L. H. Schäfer *et al.*, „Structured illumination microscopy: artefact analysis and reduction utilizing a parameter optimization approach“, Vol. 216, Pt 2, November 2004, Seiten 165 bis 174, Journal of Microscopy, und G. Danuser and C. Waterman-Storer, “Quantitative fluorescent speckle microscopy of cytoskeleton dynamics”, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 2006, 35:361-87, verwiesen.

10 Aufgabe der Erfindung ist es, ein Mikroskop sowie ein Mikroskopieverfahren bereitzustellen, mittels welchen eine verbesserte Tiefendiskriminierung erreicht werden kann.

Die Erfindung ist in den Ansprüchen 1 und 9 definiert. Die abhängigen Ansprüche beschreiben bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung.

15

Die Erfindung schafft ein Mikroskop zur Abbildung eines Objektes in einem Objektfeld, wobei das Mikroskop eine Beleuchtungseinrichtung, eine Detektionseinrichtung oder eine Steuereinrichtung umfasst. Die Beleuchtungseinrichtung dient zur Erzeugung einer Weitfeldbeleuchtung des Objekts und weist eine Vielzahl von Lichtquellen auf. Die Detektionseinrichtung ist zur Aufnahme eines Weitfeldbilds des Objekts vorgesehen. Die Steuerung steuert die Detektionseinrichtung und die Beleuchtungseinrichtung. Die Steuereinrichtung teilt die Lichtquellen in mindestens zwei Gruppen ein, wobei die Lichtquellen aller Gruppen zusammen das Objektfeld lückenlos füllen. Für jede Gruppe schaltet die Steuereinrichtung alle Lichtquellen einer Gruppe ein, veranlasst die Detektionseinrichtung, ein Einzelbild des Objekts aufzunehmen, und schaltet die Lichtquellen dieser Gruppe aus. Die Steuereinrichtung erzeugt aus den erzeugten Einzelbildern, insbesondere unter Berücksichtigung der Lage der einzelnen Lichtquellen für das entsprechende Einzelbild, ein Bild des Objekts.

30 Beleuchtung und Abbildung erfolgen im Weitfeld, also nicht konfokal. Das somit durch die Abbildung definierte Objektfeld auf oder im Objekt wird durch die Gruppen lückenlos, d.h. vollständig abgedeckt. Die Gruppen sind individuell schaltbar und die Lichtquellen je nach Betriebsmodus verschieden den Gruppen zuordenbar. In Ausführungsformen sind die Lichtquellen der Gruppen als individuelle Lichtemitter ausgeführt, z.B. als in einer Ebene angeordnete Lichtemitter, insbesondere LEDs, die einzeln ein- und ausgeschaltet werden können. Damit wird das Objekt mit unterschiedlichen Beleuchtungsmustern beleuchtet und für jedes Beleuchtungsmuster wird ein Einzelbild des Objektes aufgenommen.

35

Die Vielzahl der Lichtquellen ermöglicht es, das Objekt zur Tiefendiskriminierung verschiedenartig, d.h. mit verschiedenen Beleuchtungsmustern, zu beleuchten. In Ausführungsformen nimmt die Steuereinrichtung die Zuordnung der Lichtquellen zu einzelnen Gruppen betriebsmodusabhängig vor, z.B. abhängig von einem zuvor bereit gestellten Einstellsignal, das einen bestimmten Betriebsmodus anfordert.

Ferner ist in Ausführungsformen die Beleuchtung des Objekts hinsichtlich der optischen Eigenschaften des Objekts angepasst. Ein weiterer Vorteil des Mikroskops ist, dass zur Erzeugung der unterschiedlichen Beleuchtung für die Einzelbilder keine Teile des Mikroskops mechanisch bewegt werden müssen. Beispielsweise ist es nicht vorgesehen, ein Gitter oder einen Diffusor im Beleuchtungsstrahlengang zu bewegen. Auf das Einfügen eines Diffusors zur Erzeugung einer quasi-stochastischen Intensitätsverteilung wird verzichtet. Da keine mechanischen Teile bewegt werden müssen, ist die Messdauer reduziert. Die Schaltzeit der Lichtquellen ist kürzer als die Dauer zur Bewegung von mechanischen Teilen.

Die Steuereinrichtung teilt die Lichtquellen in verschiedene Gruppen ein, wobei die Lichtquellen aller Gruppen zusammen das Objekt in einem vorgegeben Bereich, d.h. im Objektfeld vollständig, also lückenlos, beleuchten. Dies bedeutet, dass die Lichtquellen aller Gruppen in das Objektfeld projiziert unmittelbar aneinander angrenzen. Es bestehen keine Lücken in der Beleuchtung des Objekts. Dadurch ist es möglich, das Objekt mit einer regelmäßigen Intensitätsverteilung, insbesondere homogen, zu beleuchten. Die regelmäßige Intensitätsverteilung der Beleuchtung liegt dann vor, wenn die Lichtquellen aller Gruppen eingeschaltet sind und/oder wenn die Lichtquellen einer Gruppe eingeschaltet sind. Eine regelmäßige Beleuchtung des Objekts ist dann gegeben, wenn die in das Objektfeld projizierte Intensitätsverteilung für jede Lichtquelle gleich ist und die eingeschalteten Lichtquellen – bei in das Objektfeld projizierter Betrachtung – regelmäßig verteilt sind. Für besonders gute Homogenität überlappen sich in Ausführungsformen die in das Objektfeld projizierten Intensitätsverteilungen der einzelnen Lichtquellen. Eine optionale homogene Beleuchtung des Objekts wird in Ausführungsformen erreicht, die Lichtquellen derart in das Objektfeld projizieren, dass sich die Intensitätsverteilungen der Überlappbereiche der einzelnen Lichtquellen so aufsummieren, dass die Summe der Strahlungsintensität an jedem Punkt des Objekts konstant oder nahezu konstant ist. Beispielsweise beträgt die Variation der Strahlungsintensität über das Objekt weniger als 5%, 10% oder 20%.

Die Einteilung der Lichtquellen in die einzelnen Gruppen kann automatisch oder manuell erfolgen und richtet sich insbesondere nach den Eigenschaften des Objekts. In Ausführungsformen ist die Einteilung der Lichtquellen in die Gruppen so ausgeführt, dass ein Bleichen von Fluoreszenzfarbstoffen in dem Objekt verhindert ist. Die gelingt zum Beispiel

dadurch, dass eine bestimmte Stelle des Objekts nur einmal beleuchtet wird, wenn die Lichtquellen zweier Gruppen nacheinander eingeschaltet werden. Mögliche Arten der Einteilung in Gruppen werden im Folgenden im Einzelnen noch näher erläutert.

- 5 Die Beleuchtungseinrichtung umfasst in Ausführungsformen ein Bildschirm oder ein Display, wobei Pixel der Beleuchtungseinrichtung die Lichtquellen sind. In einer anderen Ausführungsform weist die Beleuchtungseinrichtung ein Array aus Light Emitting Diodes (LED) oder anderen punktförmigen Lichtquellen auf. Optional sind die einzelnen Lichtquellen identisch ausgebildet.

10

Die Steuereinrichtung ist mit den einzelnen Lichtquellen, beispielsweise über elektrische Leitungen, verbunden, so dass sie hierüber die jeweiligen Lichtquellen einzeln ein- oder ausschaltet und sie so auch betriebsmodusabhängig in die Gruppen einteilt.

- 15 Die Steuereinrichtung schaltet alle Lichtquellen einer ersten Gruppe ein, veranlasst die Detektionseinrichtung ein Einzelbild zu erzeugen und schaltet dann alle Lichtquellen der ersten Gruppe aus. Diese Vorgehensweise wird für alle Gruppen wiederholt, so dass für jede Gruppe ein Einzelbild erzeugt wird, dessen Beleuchtung sich von der der anderen Einzelbilder unterscheidet. Die Steuereinrichtung erzeugt aus den Einzelbildern ein Gesamtbild des Objekts,
20 das eine verbesserte Tiefenschärfe hat. Bei der Berechnung des Gesamtbilds wird optional die Lage der einzelnen Lichtquellen in der jeweils eingeschalteten Gruppe berücksichtigt.

- In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Verrechnung der Einzelbilder zum Gesamtbild bei einem modularen, nachrüstbaren, z.B. mobilen System direkt auf einer Kamera der
25 Detektionseinrichtung, beispielsweise mithilfe eines Field Programmable Gate Array (FPGA). Ferner fungiert in Ausführungsformen, die Detektionseinrichtung als Trigger für die Ansteuerung der Lichtquellen. Auf diese Weise kann eine schnelle Ausgabe des Gesamtbilds mit erhöhter Tiefendiskriminierung erreicht werden.

- 30 Um bekannte Verfahren nachzubilden, bei denen zur Tiefendiskriminierung ein Gitter durch den Beleuchtungsstrahlengang bewegt wird, und deren Berechnungsverfahren zur Tiefendiskriminierung verwenden zu können, teilt in Ausführungsformen die Steuereinrichtung die Lichtquellen derart in Gruppen ein, dass die Lichtquellen eine Beleuchtung des Objekts bereitstellen, die einer homogenen Beleuchtung mit nachgeschaltetem Gitter entspricht. Es ist
35 dafür vorgesehen, dass die Lichtquellen mindestens einer der Gruppen, insbesondere aller Gruppen, im Objektfeld unmittelbar aneinander angrenzen. Auf diese Weise lässt sich ein Beleuchtungsmuster im Objektfeld erzeugen, das beispielsweise gitterförmig oder streifenförmig ist. Wenn die Lichtquellen jeder Gruppe unmittelbar aneinander angrenzen, tauchen im

Beleuchtungsmuster der einzelnen Gruppen im beleuchteten Bereich keine Lücken in der Intensitätsverteilung auf. Vorzugsweise grenzen die Lichtquellen der anderen Gruppen im Objektfeld unmittelbar aneinander an, so dass sich die Lichtquellen der verschiedenen Gruppen im Objektfeld zu einer Beleuchtung mit regelmäßiger Intensitätsverteilung ergänzen. In

5 Ausführungsformen sind die Lichtquellen einer ersten Gruppe und einer zweiten Gruppe jeweils streifenförmig angeordnet, wobei sich die Streifen zu einem Gesamtfeld ergänzen. Bevorzugt sind durch die zwei Gruppen mehrere alternierende Streifen ausgebildet. Jede Lichtquelle ist genau einer Gruppe zugeordnet, so dass die Gruppen Mengen von Lichtquellen bilden, die paarweise disjunkt (pairwise disjoint) sind.

10

Ein Vorteil der Verwendung einer Vielzahl von Lichtquellen zur Erzeugung eines gitterförmigen oder streifenförmigen Beleuchtungsmusters ist es, dass die Gitterabstände bzw. die Streifenabstände durch eine variable Zuordnung der Lichtquellen zu den Gruppen auf einfache Art und Weise an die im Objekt vorherrschenden Gegebenheiten angepasst werden können. So

15 lassen sich Beleuchtungsmuster mit verschiedenen Gitterkonstanten oder Streifenabständen realisieren, was bei gegebenen mechanischen Gittern nicht möglich wäre.

20

Eine weitere Ausführungsform sieht vor, dass die Beleuchtung eine quasi-stochastische Intensitätsverteilung hat, wie sie beispielsweise im Stand der Technik durch Speckle-Muster realisiert ist. Diese Form der Beleuchtung ist realisiert, indem die Lichtquellen so eingeteilt werden, dass für mindestens eine der Gruppen, insbesondere alle Gruppen, im Objektfeld Lücken bestehen. Diese bedeutet insbesondere, dass bei dieser Form der Einteilung der Lichtquellen in Gruppen das Beleuchtungsmuster keine bereichsweise Beleuchtung mit regelmäßiger Intensitätsverteilung hat, wie beispielsweise beim Vorsehen einer Streifen- oder

25 Gitterbeleuchtung, sondern dass die Lichtquellen unregelmäßig, z.B. zufällig in Gruppen eingeteilt werden. Der Vorteil dieser Ausführungsform ist es, dass im Vergleich zum Stand der Technik ein Einbrennen (Bleichen) der Probe und damit verbundene Artefakte vermieden sind. Insbesondere teilt die Steuereinrichtung die Lichtquellen derart ein, dass alle Lichtquellen zusammen eine Beleuchtung des Objekts mit regelmäßiger Intensitätsverteilung, insbesondere

30 eine homogene Beleuchtung, realisieren, so dass die Anzahl der zu erzeugenden Einzelbilder im Vergleich zur Beleuchtung mithilfe von Laser-Speckle verringert ist, da bei der Speckle-Beleuchtung eine Intensitätsverteilung bei der Beleuchtung des Objekts an einer vorgegebenen Stelle nicht einstellbar wäre. Somit kann mit der geringstmöglichen Anzahl an Beleuchtungszyklen der zu untersuchende Bereich des Objekts vollständig und regelmäßig

35 beleuchtet werden, wobei der Kontrast durch die Einteilung der Lichtquellen in die einzelnen Gruppen maximiert werden kann. Bei einer normalen Speckle-Lichtquelle wäre eine Kontrolle der Intensitätsverteilung nicht möglich.

Aus dem Stand der Technik ist eine Erhöhung der Tiefendiskriminierung bekannt, indem ein Einzelbild mit einer lückenlosen Beleuchtung erzeugt wird und anschließend ein Einzelbild mit einer Speckle-Beleuchtung. Diese Variante zur Erzeugung eines Gesamtbilds mit erhöhter Tiefendiskriminierung ist in Ausführungsformen dadurch realisiert, dass die Lichtquellen einer ersten Gruppe in dem Objektfeld unmittelbar zueinander benachbart sind und die Lichtquellen einer zweiten Gruppe eine Teilmenge der Lichtquellen der ersten Gruppe bilden. Vorzugsweise liegen die Lichtquellen der ersten Gruppe in dieser Ausführungsform unmittelbar aneinander angrenzend, so dass eine regelmäßige, insbesondere homogene, Beleuchtung des Objekts realisiert ist. Beispielsweise bilden die Lichtquellen der ersten Gruppe auf der Detektionseinrichtung ein Rechteck oder Kreis, welche lückenlos von den Lichtquellen der ersten Gruppe gefüllt sind. Zur Erzeugung einer Speckle-Beleuchtung werden aus den Lichtquellen der ersten Gruppe zufällig oder quasi-stochastisch Lichtquellen ausgewählt und der zweiten Gruppe zugeordnet. Auch hier kann die Auswahl der Lichtquellen für die zweite Gruppe hinsichtlich der Probe optimiert sein.

In vielen Fällen ist es gewünscht, das Objekt in mehreren Farben oder Wellenlängenbereichen abzubilden. Dazu ist es bevorzugt, dass die Lichtquellen jeweils ausgebildet sind, Strahlung in mindestens zwei unterschiedlichen Wellenlängenbereichen zu erzeugen, wobei die Steuereinrichtung die Lichtquellen zur Abgabe von Strahlung mit unterschiedlichen Wellenlängenbereichen ansteuert, wobei vorzugsweise die Steuereinrichtung für jeden Wellenlängenbereich einen Satz von Gruppen vorsieht, und wobei weiter vorzugsweise die Lichtquellen eines Satzes das Objektfeld lückenlos füllen und sich die Sätze von Gruppen unterscheiden. Die Lichtquellen können beispielsweise ausgebildet sein, direkt Strahlung in mindestens zwei wählbaren verschiedenen Wellenlängenbereichen zu erzeugen. Alternativ ist es möglich, für jeden Wellenlängenbereich ein Array von Lichtquellen vorzusehen, deren Strahlung mithilfe einer Strahlvereinigungseinrichtung zusammengeführt wird, so dass die in das Objektfeld projizierte Intensitätsverteilung für jedes Paar (bei mehr als zwei Wellenlängenbereiche: n-Tupel) von zusammengehörenden Lichtquellen identisch ist und am gleichen Ort im Objektfeld liegt. Die Steuereinrichtung steuert die Lichtquellen an und teilt sie wellenlängenabhängig in Gruppen ein. Für jeden Wellenlängenbereich wird ein Satz von Gruppen vorgesehen, wobei für jeden Satz von Gruppen die oben angestellten Überlegungen gelten. Optional beleuchten die Lichtquellen eines Satzes von Gruppen das Objektfeld lückenlos, so dass, wenn die Lichtquellen eines Satzes von Gruppen gemeinsam eingeschaltet werden, das Objektfeld mit einer regelmäßigen Intensitätsverteilung beleuchtet wird. Sind die Lichtquellen für einen Wellenlängenbereich in Gruppen eingeteilt, so unterscheiden sich die Einteilungen der Lichtquellen der jeweiligen Wellenlängenbereiche. Somit werden die einzelnen Lichtquellen je nach Wellenlängenbereich der Beleuchtung unterschiedlich in Gruppen eingeteilt, so dass sich die Gruppen für die verschiedenen Wellenlängenbereiche

unterscheiden. Beispielsweise ist ein und dieselbe Lichtquelle, je nachdem in welchem Wellenlängenbereich sie leuchten soll, in unterschiedliche Gruppen eingeteilt. Ein bevorzugter Vorteil dieser Ausführungsform ist es, dass gleichzeitig Einzelbilder mit verschiedenen Wellenlängenbereichen der Beleuchtung erzeugt werden können, wobei je nach

5 Wellenlängenbereich ein eigenes Beleuchtungsmuster verwendet werden kann, so dass Übersprechen (Crosstalk) zwischen den Wellenlängenbereichen minimiert werden kann. Insbesondere werden die Gruppen für die verschiedenen Wellenlängenbereiche derart eingeteilt, dass Lichtquellen nicht gleichzeitig Strahlung mit den unterschiedlichen Wellenlängenbereichen aussenden, sondern nur Strahlung eines Wellenlängenbereichs.

10 Vorzugsweise sind die Lichtquellen derart in Gruppen eingeteilt, dass Lichtquellen, die gleichzeitig Licht unterschiedlicher Wellenlängenbereiche aussenden, derart im Objektfeld voneinander beabstandet sind, dass ein Übersprechen verhindert werden kann. Insbesondere bilden die Gruppen für alle Wellenlängenbereiche Mengen von Lichtquellen, die paarweise disjunkt sind. Darüber hinaus lässt sich im Vergleich zum Stand der Technik das

15 Beleuchtungsmuster individuell je nach Wellenlängenbereich anpassen, und somit kann eine höhere Variabilität erzielt werden.

Wenn ein Gesamtbild des Objekts erzeugt werden soll, das den größtmöglichen Bereich des Objekts anzeigt, ist es bevorzugt, dass alle verfügbaren Lichtquellen verwendet werden. Auf

20 diese Weise lässt sich ein maximal großes Objektfeld erreichen. Alternativ ist es möglich, die Beleuchtung auf Interessensbereiche im Objektfeld zu konzentrieren, beispielsweise auf Ausschnitte des Objektes, in denen eine vorbestimmte Struktur vorhanden ist. Dazu ist es bevorzugt, dass die Steuereinrichtung aus allen verfügbaren Lichtquellen einige auswählt und in die Gruppen einteilt. Die restlichen bleiben dauerhaft dunkel. Für diesen Zweck wird bevorzugt

25 zuerst ein vorläufiges Bild aufgenommen, bei dem alle Lichtquellen eingeschaltet sind, und anschließend werden Lichtquellen ausgewählt und in Gruppen eingeteilt, die einen Teilbereich des Objekts beleuchten. Dieser Teilbereich entspricht einem vom Benutzer wählbaren Interessensgebiet.

30 Zur Vereinfachung der Beleuchtungseinrichtung kann es vorgesehen sein, dass die Lichtquellen in Spaltenform angeordnet oder ausgebildet sind, wobei die Lichtquellen lediglich spaltenweise ein- und ausschaltbar sind. Dieser Ausführungsform erzeugt ein streifenförmiges Beleuchtungsmuster oder gitterförmiges Beleuchtungsmuster. Auf diese Weise lässt sich der Aufbau der Beleuchtungseinrichtung vereinfachen. Die Spalten können auch als Reihen

35 aufgefasst werden.

Die Erfindung schafft ein Mikroskopieverfahren zur Abbildung eines Objekts in einem Objektfeld, das die folgenden Schritte umfasst:

- a) Beleuchten des Objekts im Weitfeld mit einer Beleuchtungseinrichtung, welche eine Vielzahl von Lichtquellen aufweist,
- b) Einteilen der Lichtquellen in mindestens zwei Gruppen, wobei die Lichtquellen aller Gruppen zusammen das Objektfeld lückenlos füllen,
- 5 c) Einschalten aller Lichtquellen einer Gruppe, Erzeugen eines Einzelbilds des Objekts für diese Gruppe im Weitfeld und Ausschalten der Lichtquellen dieser Gruppe,
- d) Wiederholen des Schritts c) für jede Gruppe, und
- e) Erzeugen eines Bilds des Objektfelds aus den Einzelbildern, insbesondere unter Berücksichtigung der Lage der einzelnen Lichtquellen für das entsprechende Einzelbild.

10

Das Mikroskopieverfahren kann insbesondere an dem oben beschriebenen Mikroskop durchgeführt werden. Die im Zusammenhang mit dem Mikroskop beschriebenen Vorteile, bevorzugte Ausführungsformen und Varianten gelten analog für das Mikroskopieverfahren.

- 15 Es ist bevorzugt, dass die Lichtquellen mindestens einer der Gruppen das Objektfeld in Form eines Gitters oder mindestens eines Streifens beleuchten.

Es ist ferner bevorzugt, dass die Lichtquellen mindestens einer der Gruppen das Objektfeld quasi-stochastisch beleuchten.

20

Es ist außerdem bevorzugt, dass die Lichtquellen einer ersten Gruppe derart ausgewählt werden, dass ihre Lichtquellen das Objekt homogen beleuchten, und dass die Lichtquellen einer zweiten Gruppe aus den Lichtquellen der ersten Gruppe quasi-stochastisch ausgewählt werden.

- 25 Es ist bevorzugt, dass je Lichtquelle Strahlung mit mindestens zwei unterschiedlichen Wellenlängenbereichen erzeugt wird, wobei für jeden Wellenlängenbereich einen Satz von Gruppen vorgesehen wird, wobei die Lichtquellen eines Satzes das Objektfeld lückenlos füllen und sich die Sätze von Gruppen unterscheiden.

- 30 Es ist ferner bevorzugt, dass die Lichtquellen aller Gruppen der Gesamtzahl der Lichtquellen entsprechen.

- Es ist bevorzugt, dass zunächst ein vorläufiges Bild aufgenommen wird, bei dem alle Lichtquellen eingeschaltet sind, und anschließend die Lichtquellen derart in Gruppen eingeteilt werden, dass
35 die Lichtquellen aller Gruppen lediglich einen Teilbereich des Objekts beleuchten.

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
5 erfindungswesentliche Merkmale offenbaren, noch näher erläutert. Es zeigen:

- Fig. 1 schematisch den Aufbau eines Mikroskops;
Fig. 2a – 2c schematisch Ausführungsformen einer Beleuchtungseinrichtung des in Fig. 1
 gezeigten Mikroskops; und
10 Fig. 3a – 3g Möglichkeiten, die Lichtquellen der Beleuchtungseinrichtung des Mikroskops der
 Figuren 1 und 2 in Gruppen einzuteilen.

Ein Mikroskop 10 umfasst eine Beleuchtungseinrichtung 12, eine Detektionseinrichtung 14 und
eine Steuereinrichtung 16. Das Mikroskop 10 ist zur Erzeugung eines Bilds eines Objekts 18 im
15 Weitfeld ausgebildet. Dazu erzeugt die Beleuchtungseinrichtung 12 Beleuchtungsstrahlung 20
im Weitfeld, mittels welcher das Objekt 18 beleuchtet wird. Die Beleuchtungsstrahlung 20
passiert einen Strahlteiler 22, eine Zoomoptik 24 und ein Objektiv 26. Die Zoomoptik 24 hat die
Aufgabe, die Beleuchtungseinrichtung 12 mit unterschiedlichen Vergrößerungsmaßstäben auf
das Objekt 18 abzubilden. Das Objektiv 26 dient zur Fokussierung der Beleuchtungsstrahlung
20 20 auf das Objekt 18.

Im Objekt 18 sind Fluoreszenzfarbstoffe vorhanden, welche durch die Beleuchtungsstrahlung
20 zur Abgabe von Emissionslicht angeregt werden. Das vom Objekt 18 emittierte oder
reflektierte Licht wird vom Objektiv 26 gesammelt und als Abbildungsstrahlung 28 von der
25 Zoomoptik 24 dem Strahlteiler 22 zugeführt. Der Strahlteiler 22 ist als dichroitischer Spiegel
ausgebildet, welcher die Beleuchtungsstrahlung 22 transmittieren lässt und die
Abbildungsstrahlung 28 aufgrund der unterschiedlichen Wellenlängenbereiche von Emissions-
und Absorptionsspektrums des im Objekt 18 vorhandenen Fluoreszenzfarbstoffs reflektiert. Der
Strahlteiler 22 lenkt die Abbildungsstrahlung 28 zu einem Emissionsfilter 30, welcher
30 ausgebildet ist, Strahlung im Spektralbereich der Beleuchtungsstrahlung 20 zu blockieren und
Strahlung im Wellenlängenbereich des Emissionsspektrums der Fluoreszenzfarbstoffe zu
transmittieren. Vom Emissionsfilter 30 gelangt die Abbildungsstrahlung 28 auf die
Detektionseinrichtung 14. Die Detektionseinrichtung 14 umfasst eine Abbildungsoptik 32 und
einen Sensor 34. Die Abbildungsoptik 32 fokussiert die Abbildungsstrahlung 28 auf den Sensor
35 34. Der Sensor 34 wandelt die Abbildungsstrahlung 28 in elektrische Signale um, welche an die
Steuereinrichtung 16 weitergeleitet werden. Dazu ist die Steuereinrichtung 16 datentechnisch
über eine elektrische Leitung mit der Detektionseinrichtung 14 verbunden. Die

Steuereinrichtung 16 erzeugt Einzelbilder des Objekts 18 aus den elektrischen Signalen und aus den Einzelbildern ein tiefaufgelöstes Gesamtbild des Objektes 18.

Die Beleuchtungseinrichtung 12 umfasst in der in Fig. 1 gezeigten Ausführungsform eine
5 Vielzahl von Lichtquellen 36 und eine Beleuchtungsoptik 38. Die Lichtquellen 36 sind jeweils ausgebildet, Strahlung in verschiedenen, wählbaren Wellenlängenbereichen abzugeben. Sie sind in der dargestellten Ausführungsform in einem Array angeordnet. Die Beleuchtungsoptik 38 hat eine Brennweite, welche dem Abstand zwischen den Lichtquellen 36 und der
10 Beleuchtungsoptik 38 entspricht, so dass die Beleuchtungsstrahlung 20 nach Durchgang durch die Beleuchtungsoptik 38 parallelisiert ist. Die Lichtquellen 36 sind mit der Steuereinrichtung 16 über eine elektrische Leitung verbunden, so dass die Steuereinrichtung 16 die Lichtquellen 36 einzeln ein- und ausschalten kann, sowie die Abgabe von Strahlung in den einzelnen
Wellenlängenbereichen steuern kann. Auf diese Weise können beliebige Beleuchtungsmuster erzeugt werden. In einer vereinfachten Ausführungsform kann Steuereinrichtung 16 die
15 Lichtquellen 36 lediglich in Spalten und/oder Reihen ein- oder ausschalten, so dass nur streifen- oder gitterförmige Beleuchtungsmuster möglich sind.

Die Lichtquellen 36 werden mithilfe der Zoomoptik 24 und dem Objektiv 26 derart in ein
Objektfeld des Objekts 18 abgebildet, dass sich dort eine Anordnung der Lichtquellen 36 in
20 Form des Arrays ergibt. Auch Pixel des Sensors 34 sind in einem Array angeordnet, welches man durch die Zoomoptik 24 und das Objektiv 26 in das Objektfeld des Objekts 18 projiziert ansehen kann. Diese Projektionen der Lichtquellen 36 und der Pixel des Sensors 34 überlappen, so dass jeder Lichtquelle 36 ein Pixel des Sensors 34 zugeordnet ist. Auf diese
Weise ist eine nicht scannende Abbildung des Objekts 18 möglich, d.h. Objekt 18 und
25 Beleuchtung/Abbildung werden nicht relativ zueinander bewegt und man kann dennoch das Objekt 18 mit unterschiedlichen Beleuchtungszuständen, die einem Abrastern entsprechen, beleuchten und abbilden.

Ausführungsformen der Beleuchtungseinrichtung 112, 212, 312 werden nun im Zusammenhang
30 mit der Fig. 2a bis 2c diskutiert. Der Aufbau des Mikroskops 10 der Fig. 2a bis 2c ist identisch zum Aufbau gemäß Fig. 1, abgesehen von der Beleuchtungseinrichtung 12. Der Übersichtlichkeit halber ist die Verbindung der Lichtquellen 36 mit der Steuereinrichtung 16 in den Figuren 2a bis 2c nicht eingezeichnet. Die Beleuchtungseinrichtungen 112, 212, 312 können anstatt der Beleuchtungseinrichtung 12 verwendet werden.

35

Die Beleuchtungseinrichtung 112 der Fig. 2a weist ebenso eine Vielzahl von Lichtquellen 36 und weiter eine erste Linse 140, eine zweite Linse 142, ein Lochblendenarray 144 und die
Beleuchtungsoptik 38 auf. Die erste Linse 140 und die zweite Linse 142 sind derart angeordnet,

dass sie die Lichtquellen 36 jeweils punktförmig auf eine in dem Lochblendenarray 144 vorgesehene entsprechende Öffnung abbildet. Die Beleuchtungsoptik 38 hat eine Brennweite, die mit dem Abstand zwischen dem Lochblendenarray 144 und der Beleuchtungsoptik 38 übereinstimmt, so dass die Beleuchtungsstrahlung 20 wiederum parallelisiert ist. Die erste Linse 140, die zweite Linse 142 und das Lochblendenarray 144 dienen dazu, punktförmige Beleuchtungsquellen bereitzustellen. Auf diese Weisen können Lichtquellen 36 verwendet werden, die selbst nicht punktförmig sind, sondern eine gewisse Ausdehnung besitzen.

Die Beleuchtungseinrichtung 212, wie sie in Fig. 2b gezeigt ist, umfasst eine Vielzahl von Lichtquellen 36, ein Mikrolinsenarray 246, das Lochblendenarray 144 und die Beleuchtungsoptik 38. Das Mikrolinsenarray 246 umfasst eine Vielzahl von Mikrolinsen, welche entsprechend den Lichtquellen 36 angeordnet sind. Auch die Löcher des Lochblendenarrays 144 sind entsprechend den Lichtquellen 36 und den Linsen des Mikrolinsenarrays 246 angeordnet. Die Linsen des Mikrolinsenarrays 246 dienen dazu, die Lichtquellen 36 auf die Löcher des Lochblendenarrays 144 zu fokussieren. Die Brennweite der Beleuchtungsoptik 38 ist wiederum derart, dass sie dem Abstand zwischen dem Lochblendenarray 144 und der Beleuchtungsoptik 38 entspricht, so dass die Beleuchtungsstrahlung 20 nach Durchgang durch die Beleuchtungsoptik 38 wieder parallelisiert ist. Das Mikrolinsenarray 246 erfüllt insbesondere die gleiche Aufgabe wie die erste Linse 140 und die zweite Linse 142 der in Fig. 2a gezeigten Ausführungsform der Beleuchtungseinrichtung 112.

Die Beleuchtungseinrichtung 312 umfasst eine Vielzahl von Lichtquellen 36, eine optionale Streuscheibe 348 und die Beleuchtungsoptik 38. Die Streuscheibe 348 streut das von den Lichtquellen 36 stammende Licht diffus, so dass im Objektfeld eine besonders homogene Intensitätsverteilung der Beleuchtung erreicht werden kann.

Die Abstände zwischen einzelnen Lichtquellen 36 und die jeweilige Ausführungsform der Beleuchtungseinrichtungen 12, 112, 212, 312 ist derart, dass die Projektion der Lichtquellen 36 in das Objektfeld eine regelmäßige, mindestens annähernd homogene Beleuchtung des Objekts 18 bewirkt. Beispielsweise lassen sich Lichtquellen 36, die eine große Ausdehnung besitzen, mittels der ersten Linse 140 und der zweiten Linse 142 oder mittels des Mikrolinsenarrays 246 derart auf das Lochblendenarray 144 abbilden, dass die Abbildung des Lochblendenarrays 144 in das Objektfeld zu stark überlappenden Beleuchtungskegeln der einzelnen Lichtquellen 36 führt. Somit ist eine mindestens annähernd homogene Beleuchtung des Objekts 18 erreicht.

Die Steuereinrichtung 16 teilt die Lichtquellen 36 in je nach Betriebsmodus verschiedene Gruppen ein, wie dies in den Figuren 3a bis 3g beispielhaft dargestellt ist. Beispielsweise, wie in

Fig. 3a gezeigt, teilt die Steuereinrichtung 16 die Lichtquellen 36 in zwei Gruppen 50a, 50b ein, wobei die zu der ersten Gruppe 50a gehörenden Lichtquellen 36 mit „1“ bezeichnet sind und die zu der zweiten Gruppe 50b gehörenden Lichtquellen 36 mit „2“ bezeichnet sind. Die Lichtquellen 36 jeder Gruppe 50a, 50b sind derart angeordnet, dass Lichtquellen 36 innerhalb einer Gruppe unmittelbar nebeneinanderliegen, z.B. aneinander angrenzen. Durch die
 5 Abbildung der Lichtquellen 36 in das Objektfeld grenzen benachbarte Lichtquellen 36 auch in dem Objektfeld unmittelbar aneinander, so dass Lichtquellen 36 einer Gruppe eine regelmäßige, insbesondere homogene Beleuchtung, von Ausschnitten des Objektfelds erzeugen. Es wird z. B. in Fig. 3a eine streifenförmige Beleuchtung des Objekts 18 für jedes
 10 Einzelbild bereitgestellt.

Die Steuereinrichtung 16 schaltet zuerst alle Lichtquellen 36 an, die gerade zur ersten Gruppe 50a gehören, und veranlasst die Detektionseinrichtung 14, ein Einzelbild des Objekts 18 zu erzeugen. Im Anschluss daran werden die Lichtquellen 36 der ersten Gruppe 50a ausgeschaltet und die Lichtquellen 36 der aktuellen zweiten Gruppe 50b eingeschaltet, und die
 15 Steuereinrichtung 16 bewirkt, dass die Detektionseinrichtung 14 ein weiteres Einzelbild des Objekts 18 aufnimmt. Nun werden von der Steuereinrichtung 16 die Einzelbilder miteinander verrechnet, um ein Gesamtbild des Objekts 18 mit erhöhter Tiefendiskriminierung zu erzeugen. Dabei kann die Lage der für jedes Einzelbild eingeschalteten Lichtquellen 36 zur Berechnung verwendet werden. In einer alternativen Ausführungsform wird das Bild ohne Berücksichtigung, welche der Lichtquellen 36 bei dem jeweiligen Einzelbild eingeschaltet waren, berechnet. Dies erfolgt beispielsweise mit folgender Formel:

$$I_f = \sum_{i=1}^N I_i - \sqrt[N]{\prod_{i=1}^N I_i}$$

25 I_f gibt das Gesamtbild an, I_i die Einzelbilder und N die Anzahl der Einzelbilder; in dem Beispiel von Fig. 2a ist N gleich zwei. Die Einzelbilder I_i werden summiert, was ein gewöhnliches Weitfeldbild ohne optischen Schnitt erzeugt. Dann werden die Einzelbilder I_i miteinander multipliziert, was einem logischen „UND“ entspricht. Das Ergebnis wird normiert, beispielsweise
 30 mit der N -ten Wurzel. Auf diese Weise werden die schwach modulierten Anteile ermittelt, was dem außerfokalen Anteil der Strahlung, die nicht oder nur schwach mit der Beleuchtung moduliert wird, entspricht. Die Subtraktion dieser Bildinformation von der oben beschriebenen Gesamtsumme führt zu einem optischen Schnitt, so dass das Gesamtbild I_f eine bessere Tiefendiskriminierung hat.

35

Eine weitere mögliche Einteilung der Lichtquellen 36 in Gruppen ist in Fig. 3b gezeigt. Hier sind die Lichtquellen 36 in drei Gruppen 50a, 50b, 50c eingeteilt, wobei jede Gruppe eine streifenförmige Beleuchtung des Objekts 18 bereitstellt. Auch hier sind wieder Lichtquellen 36 innerhalb einer Gruppe unmittelbar aneinander angrenzend angeordnet, so dass im Objektfeld
5 eine homogene Beleuchtung bereitgestellt wird. Die zu der ersten Gruppe 50a gehörenden Lichtquellen 36 sind mit „1“ bezeichnet, die zur zweiten Gruppe 50b gehörenden Lichtquellen 36 mit „2“ und die zur dritten Gruppe 50c gehörenden Lichtquellen 36 mit „3“. Mit der in Figuren 3a und 3b gezeigten Einteilung der Lichtquellen 36 in die Gruppen wird eine Beleuchtung des Objekts 18 erreicht, die der Situation entspricht, in der das Objekt 18 aus einer Beleuchtung
10 beleuchtet wird, durch die ein streifenförmiges Gitter gezogen wird.

Eine andere Variante der Einteilung der Lichtquellen 36 in Gruppen ist in Fig. 3c exemplarisch dargestellt. Hier sind die Lichtquellen 36 statistisch auf zwei Gruppen 50a, 50b verteilt, wobei wieder die zu der ersten Gruppe 50a gehörenden Lichtquellen 36 mit „1“ bezeichnet sind und
15 die zu der zweiten Gruppe 50b gehörenden Lichtquellen 36 mit „2“. Das Objekt 18 wird dadurch quasi-stochastisch beleuchtet. Mit dieser Variante kann eine Speckle-Beleuchtung, wie sie im Stand der Technik bekannt ist, imitiert werden, wobei, wenn alle Lichtquellen 36 der beiden Gruppen eingeschaltet werden, das Objekt 18 auch homogen beleuchtet wurde. Dies wäre bei einer herkömmlichen Speckle-Beleuchtung nicht realisierbar.

20 Eine weitere Form der Einteilung der Lichtquellen 36 in Gruppen zeigt Figur 3d. Hier werden alle Lichtquellen 36 der ersten Gruppe 50a zugeteilt und die zweite Gruppe 50b umfasst Lichtquellen 36, die zufällig aus den Lichtquellen 36 der ersten Gruppe 50a ausgewählt werden. Diese Lichtquellen 36, die sowohl der ersten Gruppe 50a als auch der zweiten Gruppe 50b
25 zugeteilt sind, werden mit „12“ bezeichnet, die nur der ersten Gruppe 50 zugeordnet sind mit „1“. In dieser Ausführungsform kann eine aus dem Stand der Technik bekannte Beleuchtung imitiert werden, bei der das Objekt 18 zunächst homogen beleuchtet wird und anschließend mit einer Speckle-Beleuchtung.

30 Fig. 3e zeigt eine Einteilung in Gruppen, bei der die Lichtquellen 36 ausgebildet sind, Strahlung in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen zu erzeugen. Leuchten die Lichtquellen 36 mit dem ersten Wellenlängenbereich, so werden sie mit „1“ und „2“ bezeichnet, im zweiten Wellenlängenbereich mit „a“ und „b“. Für jeden Wellenlängenbereich werden die Lichtquellen 36 jeweils in Gruppen eingeteilt; in der in Fig. 3e gezeigten Ausführungsform jeweils in zwei
35 Gruppen 50a, 50b. In dieser Ausführungsform werden die Lichtquellen 36 derart eingeteilt, dass die Lichtquellen 36 streifenförmig entweder Strahlung im ersten Wellenlängenbereich (1) oder Strahlung im zweiten Wellenlängenbereich (a) gleichzeitig aussenden und dann ein Einzelbild aufgenommen wird. In dem anschließenden Schritt wird der Wellenlängenbereich der einzelnen

Lichtquellen 36 vertauscht und wieder ein Einzelbild aufgenommen. Auf diese Weise sendet jede Lichtquelle 36 zu einem Zeitpunkt/Einzelbild nur Licht eines Wellenlängenbereichs aus.

In einer anderen Ausführungsform zur Einteilung der Lichtquellen 36 in Gruppen, wie sie in Fig. 3f gezeigt ist, werden die Lichtquellen 36 je Wellenlängenbereich in vier Gruppen 50a, 50b, 50c, 50d eingeteilt. In dem ersten Wellenlängenbereich werden die Gruppen mit „1“, „2“, „3“, „4“ bezeichnet und in dem zweiten Wellenlängenbereich mit „a“, „b“, „c“, „d“. Das erste Einzelbild wird mit einer Beleuchtung aufgenommen, bei der die Lichtquellen 36, die mit „1“ und „a“ bezeichnet sind, eingeschaltet sind, das zweite Einzelbild mit den Lichtquellen 36 mit „2“ und „b“, ein drittes Einzelbild mit Lichtquellen 36 mit „3“ und „c“ und ein viertes Einzelbild, bei dem die Lichtquellen 36 eingeschaltet sind, die mit „4“ und „d“ bezeichnet sind. Zwischen zwei eingeschalteten Lichtquellen 36 befindet sich somit immer eine Reihe von Lichtquellen 36, die nicht eingeschaltet sind. Auf diese Weise lässt sich Crosstalk bei der Detektion zwischen den einzelnen Wellenlängenbereichen vermeiden.

15

Eine weitere Ausführungsform zur Einteilung der Lichtquellen 36 in Gruppen ist in Fig. 3g gezeigt. Hier wird nur ein Teil der Lichtquellen 36 in Gruppen eingeteilt. Dies geschieht beispielsweise wie folgt. Zunächst wird ein vorläufiges Bild des Objekts 18 aufgenommen, bei dem alle Lichtquellen 36 eingeschaltet sind. Dann wird in dem vorläufigen Bild ein Interessensbereich bestimmt, in welchem beispielsweise abzubildende Strukturen in dem Objekt 18 vorhanden sind. Daran anschließend werden diejenigen Lichtquellen 36 ausgewählt, die für die Beleuchtung des im Interessensbereich entsprechenden Ausschnitts des Objekts 18 entsprechen. Diese Lichtquellen 36 werden dann wie beispielsweise zuvor ausgeführt in Gruppen eingeteilt.

25

Patentansprüche

- 5 1. Mikroskop zur Abbildung eines Objekts (18) in einem Objektfeld, umfassend
- eine Beleuchtungseinrichtung (12, 112, 212, 312) zur Weitfeldbeleuchtung des Objekts (18), wobei die Beleuchtungseinrichtung (12, 112, 212, 312) eine Vielzahl von Lichtquellen (36) aufweist,
 - eine Detektionseinrichtung (14) zur Aufnahme eines Weitfeldbilds des Objekts (18), und
 - 10 - eine Steuereinrichtung (16) zur Steuerung der Detektionseinrichtung (14) und der Beleuchtungseinrichtung (12, 112, 212, 312),
- dadurch gekennzeichnet, dass**
- die Steuereinrichtung (16) die Lichtquellen (36) in mindestens zwei Gruppen (50a, 50b) einteilt, wobei die Lichtquellen (36) aller Gruppen zusammen das Objektfeld lückenlos füllen,
 - 15 - wobei die Steuereinrichtung (16) für jede Gruppe (50a, 50b) alle Lichtquellen (36) dieser Gruppe (50) einschaltet, die Detektionseinrichtung (14) veranlasst, ein Einzelbild des Objekts (18) aufzunehmen, die Lichtquellen (36) dieser Gruppe (50a, 50b) ausschaltet, und so alle Gruppen durchschaltet sowie mehrere Einzelbilder erzeugt,
 - wobei die Steuereinrichtung (16) aus den erzeugten Einzelbildern ein Bild des Objekts
 - 20 (18) erzeugt.
2. Mikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Lichtquellen (36) mindestens einer der Gruppen (50a, 50b) in dem Objektfeld unmittelbar aneinander angrenzen.
- 25 3. Mikroskop nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen den Lichtquellen (36) mindestens einer der Gruppen (50a, 50b) in dem Objektfeld Lücken bestehen.
4. Mikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Lichtquellen (36) einer ersten Gruppe (50a) in dem Objektfeld unmittelbar zueinander benachbart sind und die
- 30 Lichtquellen (36) einer zweiten Gruppe (50b) eine Teilmenge der Lichtquellen (36) der ersten Gruppe (50a) bilden.
5. Mikroskop nach einem der obigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass
- die Lichtquellen (36) jeweils ausgebildet sind, Strahlung mit mindestens zwei
 - 35 unterschiedlichen Wellenlängenbereichen zu erzeugen,

- wobei die Steuereinrichtung (16) die Lichtquellen (36) zur Abgabe von Strahlung mit unterschiedlichen Wellenlängenbereichen ansteuert, und
 - wobei die Steuereinrichtung (16) für jeden Wellenlängenbereich einen Satz von Gruppen (50a, 50b) vorsieht, wobei die Lichtquellen (36) eines Satzes das Objektfeld lückenlos füllen
 - 5 und sich die Sätze von Gruppen (50a, 50b) unterscheiden.
6. Mikroskop nach einem der obigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Lichtquellen (36) aller Gruppen zusammen die Gesamtzahl der Lichtquellen (36) sind.
- 10 7. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Lichtquellen (36) aller Gruppen ein Teil aller Lichtquellen (36) der Beleuchtungseinrichtung (12, 112, 212, 312) sind.
- 15 8. Mikroskop nach einem der obigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Lichtquellen (36) in Spalten angeordnet sind, wobei die Lichtquellen (36) lediglich in Spalten ein- und ausschaltbar sind.
9. Mikroskopieverfahren zur Abbildung eines Objekts (18) in einem Objektfeld, umfassend die Schritte:
- 20 a) Beleuchten des Objekts (18) im Weitfeld mit einer Beleuchtungseinrichtung (12, 112, 212, 312), welche eine Vielzahl von Lichtquellen (36) aufweist,
- gekennzeichnet**, durch
- b) Einteilen der Lichtquellen (36) in mindestens zwei Gruppen (50a, 50b), wobei die Lichtquellen (36) aller Gruppen zusammen das Objektfeld lückenlos füllen,
- 25 c) Einschalten aller Lichtquellen (36) einer Gruppe (50a, 50b), Erzeugen eines Einzelbilds des Objekts (18) für diese Gruppe (50a, 50b) im Weitfeld und Ausschalten der Lichtquellen (36) dieser Gruppe (50a, 50b),
- d) Wiederholen des Schritts c) für jede Gruppe und
- e) Erzeugen eines Bilds des Objektfelds aus den Einzelbildern.
- 30
10. Mikroskopieverfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Lichtquellen (36) mindestens einer der Gruppen (50a, 50b) das Objektfeld in Form eines Gitters oder mindestens eines Streifens beleuchten.
- 35 11. Mikroskopieverfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Lichtquellen (36) mindestens einer der Gruppen (50a, 50b) das Objektfeld quasi-stochastisch beleuchten.

12. Mikroskopieverfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Lichtquellen (36) einer ersten Gruppe (50a) derart ausgewählt werden, dass ihre Lichtquellen (36) das Objekt (18) homogen beleuchten, und dass die Lichtquellen (36) einer zweiten Gruppe (50b) aus den Lichtquellen (36) der ersten Gruppe (50a) quasi-stochastisch ausgewählt werden.

5

13. Mikroskopieverfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass je Lichtquelle (36) Strahlung mit mindestens zwei unterschiedlichen Wellenlängenbereichen erzeugt wird, wobei für jeden Wellenlängenbereich einen Satz von Gruppen (50a, 50b) vorgesehen wird, wobei die Lichtquellen (36) eines Satzes das Objektfeld lückenlos füllen und sich die Sätze von Gruppen (50a, 50b) unterscheiden.

10

14. Mikroskopieverfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Lichtquellen (36) aller Gruppen der Gesamtzahl der Lichtquellen (36) entsprechen.

15. Mikroskopieverfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass zunächst ein vorläufiges Bild aufgenommen wird, bei dem alle Lichtquellen (36) eingeschaltet sind, und anschließend die Lichtquellen (36) derart in Gruppen (50a, 50b) eingeteilt werden, dass die Lichtquellen (36) aller Gruppen lediglich einen Teilbereich des Objekts (18) beleuchten.

20

12 50b 50a 36 36

1	1	2	2	1	1	2	2
1	1	2	2	1	1	2	2
1	1	2	2	1	1	2	2
1	1	2	2	1	1	2	2
1	1	2	2	1	1	2	2
1	1	2	2	1	1	2	2
1	1	2	2	1	1	2	2
1	1	2	2	1	1	2	2

Fig. 3a

12 50c 50b 50a 36 36

1	2	3	1	2	3	1	2
1	2	3	1	2	3	1	2
1	2	3	1	2	3	1	2
1	2	3	1	2	3	1	2
1	2	3	1	2	3	1	2
1	2	3	1	2	3	1	2
1	2	3	1	2	3	1	2
1	2	3	1	2	3	1	2

Fig. 3b

12 50b 50a 36 36

1	2	2	1	1	1	2	1
1	1	1	2	2	1	2	2
2	1	2	1	2	1	1	1
1	1	2	2	1	2	2	2
1	2	2	1	1	2	1	2
1	1	1	2	1	1	2	1
2	1	2	1	2	1	1	1
1	2	1	2	1	1	2	1

Fig. 3c

50b 50a 12 50a 36 36

1	12	1	1	1	1	1	1
1	12	12	1	12	1	12	1
12	1	1	12	1	12	12	12
1	12	12	12	1	12	1	1
1	1	12	1	12	12	12	12
12	12	1	12	1	12	12	12
1	1	1	1	12	1	12	12
12	1	12	1	1	12	1	1

Fig. 3d

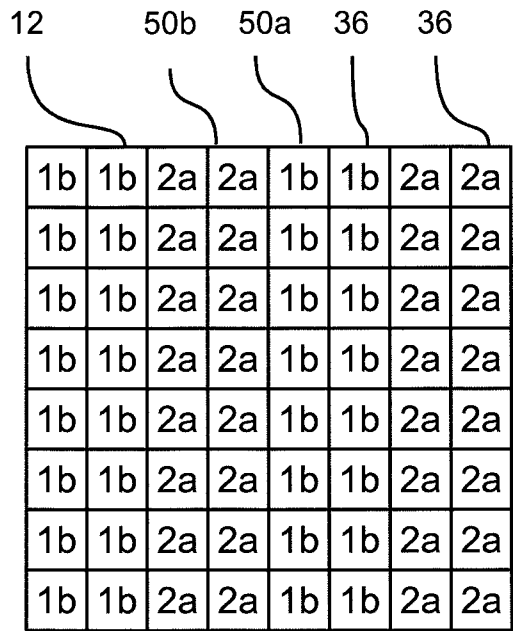


Fig. 3e

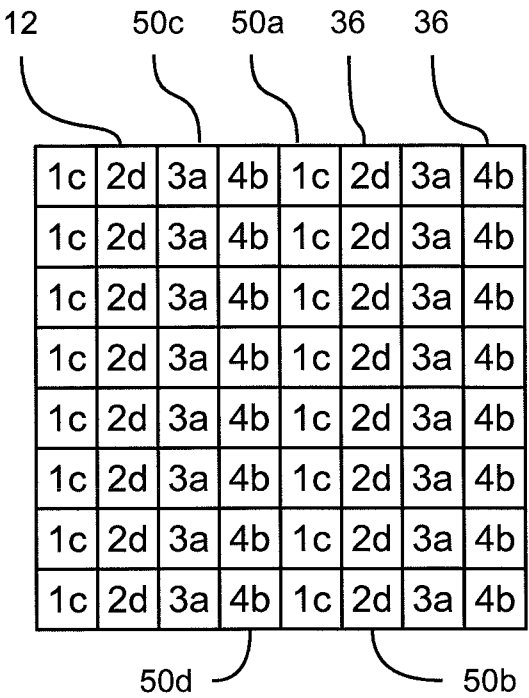


Fig. 3f

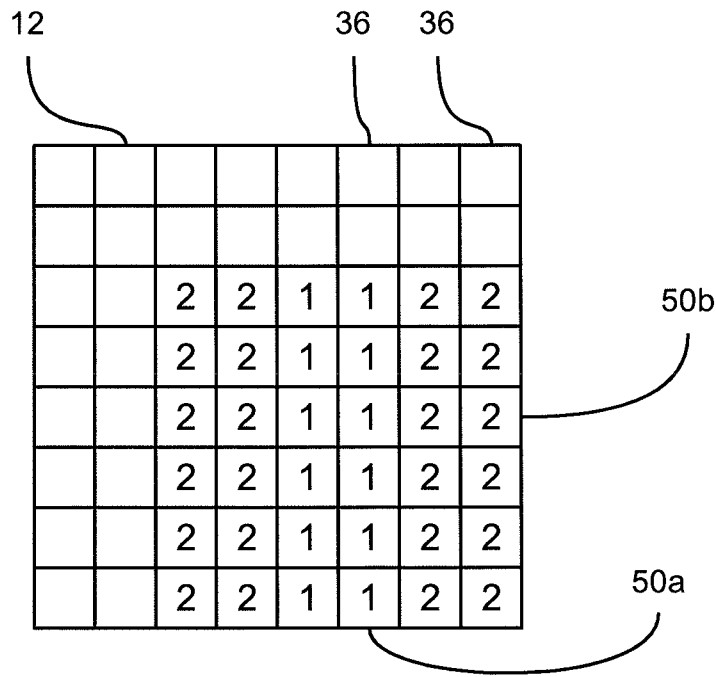


Fig. 3g

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/058778

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G02B21/08 G02B21/16 G02B21/36
ADD. G02B27/48

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	V. POHER ET AL: "Optical sectioning microscopes with no moving parts using a micro-stripe array light emitting diode", OPTICS EXPRESS, vol. 15, no. 18, 3 September 2007 (2007-09-03), page 11196, XP055388356, ISSN: 2161-2072, DOI: 10.1364/OE.15.011196	1-4, 6-10,14, 15
Y	figures 1-4,6 page 11197 - page 11199 page 11204 - page 11206 ----- -/--	5,13



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

6 July 2017

Date of mailing of the international search report

13/07/2017

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

Beutter, Matthias

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/058778

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LIONEL CHAUDET ET AL: "Development of optics with micro-LED arrays for improved opto-electronic neural stimulation", SPIE - INTERNATIONAL SOCIETY FOR OPTICAL ENGINEERING. PROCEEDINGS, vol. 8586, 22 February 2013 (2013-02-22), page 85860R, XP055388359, US ISSN: 0277-786X, DOI: 10.1117/12.2002070 ISBN: 978-1-5106-0753-8	1,9
Y	the whole document	5,11-13
Y	----- HAU-VEI HAN ET AL: "Resonant-enhanced full-color emission of quantum-dot-based micro LED display technology", OPTICS EXPRESS, vol. 23, no. 25, 14 December 2015 (2015-12-14), page 32504, XP055388361, ISSN: 2161-2072, DOI: 10.1364/OE.23.032504 figures 6,9,10 page 32515	5,13
Y	----- SCHELLENBERG M ET AL: "Digital-micromirror-device-based confocal 4D microscopy", EMERGING DIGITAL MICROMIRROR DEVICE BASED SYSTEMS AND APPLICATIONS IV, SPIE, 1000 20TH ST. BELLINGHAM WA 98225-6705 USA, vol. 8254, no. 1, 8 March 2012 (2012-03-08), pages 1-11, XP060024361, DOI: 10.1117/12.908304 [retrieved on 1901-01-01]	11,12
A	figure 7 pages 825407-7 - pages 825407-9 -----	1,9

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 INV. G02B21/08 G02B21/16 G02B21/36
 ADD. G02B27/48

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

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	V. POHER ET AL: "Optical sectioning microscopes with no moving parts using a micro-stripe array light emitting diode", OPTICS EXPRESS, Bd. 15, Nr. 18, 3. September 2007 (2007-09-03), Seite 11196, XP055388356, ISSN: 2161-2072, DOI: 10.1364/OE.15.011196	1-4, 6-10,14, 15
Y	Abbildungen 1-4,6 Seite 11197 - Seite 11199 Seite 11204 - Seite 11206 ----- -/-	5,13



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

6. Juli 2017

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

13/07/2017

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

Beutter, Matthias

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	LIONEL CHAUDET ET AL: "Development of optics with micro-LED arrays for improved opto-electronic neural stimulation", SPIE - INTERNATIONAL SOCIETY FOR OPTICAL ENGINEERING. PROCEEDINGS, Bd. 8586, 22. Februar 2013 (2013-02-22), Seite 85860R, XP055388359, US ISSN: 0277-786X, DOI: 10.1117/12.2002070 ISBN: 978-1-5106-0753-8	1,9
Y	das ganze Dokument	5,11-13
Y	HAU-VEI HAN ET AL: "Resonant-enhanced full-color emission of quantum-dot-based micro LED display technology", OPTICS EXPRESS, Bd. 23, Nr. 25, 14. Dezember 2015 (2015-12-14), Seite 32504, XP055388361, ISSN: 2161-2072, DOI: 10.1364/OE.23.032504 Abbildungen 6,9,10 Seite 32515	5,13
Y	SCHELLENBERG M ET AL: "Digital-micromirror-device-based confocal 4D microscopy", EMERGING DIGITAL MICROMIRROR DEVICE BASED SYSTEMS AND APPLICATIONS IV, SPIE, 1000 20TH ST. BELLINGHAM WA 98225-6705 USA, Bd. 8254, Nr. 1, 8. März 2012 (2012-03-08), Seiten 1-11, XP060024361, DOI: 10.1117/12.908304 [gefunden am 1901-01-01]	11,12
A	Abbildung 7 Seiten 825407-7 - Seiten 825407-9	1,9