

(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. Januar 2017 (19.01.2017)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2017/009383 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation:
G02B 21/14 (2006.01) *G02B 21/36* (2006.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2016/066671
- (22) Internationales Anmeldedatum:
13. Juli 2016 (13.07.2016)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
10 2015 111 426.7 14. Juli 2015 (14.07.2015) DE
- (71) Anmelder: FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG
E. V. [DE/DE]; Hansastraße 27c, 80686 München (DE).
- (72) Erfinder: SCHENK, Friedrich; Rotbendenstr. 3, 52076
Aachen (DE). DIEDERICH, Benedict; Dasselstr. 79,
50674 Köln (DE).
- (74) Anwalt: NAEVEN, Ralf; König & Naeven Patent- und
Rechtsanwaltskanzlei, Kackertstraße 10, 52072 Aachen
(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, 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, KN, KP,
KR, 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,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: PHASE-CONTRAST MICROSCOPY METHOD, OPTICAL UNIT, AND PHASE-CONTRAST MICROSCOPE

(54) Bezeichnung : VERFAHREN ZUR PHASENKONTRASTMIKROSKOPIE, OPTIKEINHEIT SOWIE
PHASENKONTRASTMIKROSKOP

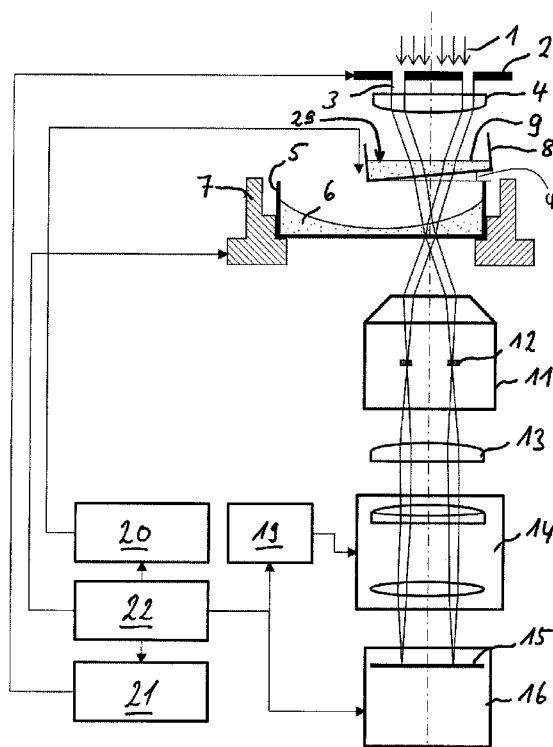


Fig. 1

(57) Abstract: A phase-contrast microscopy method to be carried out on a specimen which is arranged in a specimen vessel (5) containing an object liquid (6), a portion of an illumination beam (3, 27) which is not scattered by the specimen and serves as direct radiation being applied to a phase shift element (12), is characterized in that the illumination beam (3, 27), prior to entering the object liquid (6), is deflected by means of an optical deflection element (8, 24) that can be modified in terms of its position and/or shape in order to compensate for any change of the main radiation direction (28) of the illumination beam (3, 27), said change resulting from the optical diffraction on the object liquid (6). An optical unit comprises an optical deflection element (8) with an entry surface (25, 29) and an emergence surface (23, 26) and means for the controlled modification of the angle between the entry surface (25, 29) and the emergence surface (23, 26), a viscous mass (9) being arranged between the entry surface (25, 29) and the emergence surface (23, 26), is characterized in that the entry surface (25, 29) is defined by a surface of the viscous mass (9) formed in a gravitational field. The invention finally relates to a phase-contrast microscope for carrying out said method.

(57) Zusammenfassung:

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



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

— hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17 Ziffer iii)

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe g)

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

- hinsichtlich der Identität des Erfinders (Regel 4.17 Ziffer i)
- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii)

Ein Verfahren zur Phasenkontrastmikroskopie an einer Probe, welche in einem eine Objektflüssigkeit (6) aufweisenden Probenbehälter (5) angeordnet ist, bei dem ein von der Probe ungebeugter, als Direktstrahlung dienender Anteil eines Beleuchtungsbündels (3, 27) auf ein Phasenverschiebungselement (12) gegeben wird, kennzeichnet sich dadurch, dass zur Kompensation einer aufgrund optischer Brechung an der Objektflüssigkeit (6) gegebenen Änderung der Hauptstrahlungsrichtung (28) des Beleuchtungsbündels (3, 27) das Beleuchtungsbündel (3, 27) vor Eintritt in die Objektflüssigkeit (6) mittels eines in Position und/oder Form veränderbaren optischen Ablenkungselements (8, 24) abgelenkt wird. Eine Optikeinheit, umfassend ein optisches Ablenkungselement (8) mit einer Eintrittsfläche (25, 29) und einer Austrittsfläche (23, 26) und Mitteln zur steuerbaren Veränderung des Winkels zwischen Eintrittsfläche (25, 29) und Austrittsfläche (23, 26), wobei zwischen Eintrittsfläche (25, 29) und Austrittsfläche (23, 26) eine viskose Masse (9) angeordnet ist, kennzeichnet sich dadurch, dass die Eintrittsfläche (25, 29) durch eine in einem Schwerefeld gebildete Oberfläche der viskosen Masse (9) vorgegeben ist. Schließlich wird ein Phasenkontrastmikroskop zur Anwendung des Verfahrens vorgestellt.

Verfahren zur Phasenkontrastmikroskopie, Optikeinheit sowie Phasenkontrastmikroskop

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Phasenkontrastmikroskopie gemäß dem Oberbegriff des Anspruchs 1, eine Optikeinheit gemäß dem Oberbegriff des Anspruchs 4 sowie ein Phasenkontrastmikroskop gemäß dem Oberbegriff des Anspruchs 7.

Die Phasenkontrastmikroskopie erfolgt überwiegend im Durchlicht und wird an transparenten Objekten wie zum Beispiel lebenden Zellen eingesetzt. Ohne besondere Maßnahmen zur Erhöhung des Kontrastes zwischen von einer Probe ungebeugter Direktstrahlung und von der Probe gebeugter Strahlung ist die Sichtbarkeit der Probe in der Regel unbefriedigend. Ein Einfärben zur Erhöhung des Kontrastes hat insbesondere bei lebenden Zellen einen ungewünschten Einfluss auf die Probe.

Mittels der Phasenkontrastmikroskopie kann eine Kontrasterzeugung ohne Veränderung der Probe erreicht werden. Hierfür ist es bekannt, mittels einer im Kondensor angeordneten und zumeist ringförmigen Phasenblende ein Beleuchtungsbündel mit einer ausreichenden Beleuchtungsapertur zu erzeugen. Ein von der Probe ungebeugter Anteil des Beleuchtungsbündel, welches das Hauptmaximum in ursprünglicher Ausbreitungsrichtung der Strahlung ist und im Folgenden Direktstrahlung genannt wird, wird mittels eines in der bildseitigen Objektivbrennebene angeordneten und in der Regel in Form eines Phasenrings vorliegenden Phasenverschiebungselements, welches ein phasenverschiebendes Verzögerungselement sowie einen Graufilter umfasst, phasenverschoben und abgeschwächt. Die Probenstrahlung erfährt beim Durchlaufen der Probe ebenfalls eine Phasenverschiebung. Durch Interferenz der mittels des Phasenverschiebungselements manipulierten Direktstrahlung mit der Probenstrahlung wird die zwischen Direktstrahlung und Probenstrahlung gegebene resultierende Phasenverschiebung in eine Amplitudenänderung umgewandelt, wodurch im Zwischenbild der Probe die gewünschte Kontrasterhöhung erreicht wird. Wichtig für den Phasenkontrast ist es, dass die Abbildung der Öffnung der Phasenblende vom Phasenverschiebungselement in der hinteren Objektivbrennebene vollständig abgedeckt wird, also keine

Direktstrahlung am Phasenverschiebungselement vorbeiläuft und das Zwischenbild stört.

Wenn die zu untersuchende Probe in Flüssigkeit, im Folgenden als Objektflüssigkeit bezeichnet, in einem offenen Probenbehälter angeordnet ist, bildet sich ein Objektflüssigkeitsmeniskus, welcher insbesondere am Rand des Probenbehälters in der Regel zu einem vom rechten Winkel zur Schwerkraftrichtung und damit zur Hauptstrahlungsrichtung des Beleuchtungsbündels abweichenden Verlauf der Oberfläche der Objektflüssigkeit aufweist und somit das Beleuchtungsbündel entsprechend bricht. Dieser Meniskus- oder Randeffekt hebt den Phasenkontrasteffekt zum Teil auf und führt zu Artefakten im Zwischenbild. Dies ist insbesondere bei genormten Zellkulturgefäßen, so genannten Mikrotiterplatten der Fall, die aus einer Vielzahl voneinander isolierter, üblicherweise runder napfförmiger Probenbehälter, so genannter Wells, bestehen, in denen die zu untersuchenden Zellen umgeben von einem Nährmedium kultiviert werden können. Die gängigsten Formate der Mikrotiterplatten weisen zwischen 6 und 1536 einzelner Wells auf einer Grundfläche von 128 x 85 mm auf. Es entsteht ein konkav gekrümmter Objektflüssigkeitsmeniskus innerhalb jedes Wells, dessen störender Einfluss mit abnehmendem Durchmesser des Wells größer wird. Je stärker der Meniskus ausgebildet ist, also insbesondere zum Rand des Wells hin, umso größer ist der Anteil der Direktstrahlung, welche am Phasenring vorbei geführt wird, so dass das Mikroskop zunehmend im Hellfeld arbeitet, womit der Kontrast beim Abbilden der Zellen signifikant sinkt. Da es außerdem zu einer stärkeren Belichtung eines abbildenden Kamerachips kommt, kann eine Überbelichtung im resultierenden Mikroskopiebild die Folge sein.

Es sind mehrere Ansätze bekannt, dem dargestellten Problem im Zusammenhang mit der Ausbildung des Objektflüssigkeitsmeniskus bei Mikrotiterplatten zu begegnen. So offenbart die EP 1 859 866 A1 eine Mikrotiterplatte mit einer hydrophoben Materialkombination für die Innenwandung der Wells, womit die Ausbildung eines Meniskus der Objektflüssigkeitsoberfläche verhindert werden soll. Hier sind die damit verbundenen höheren Herstellungskosten der Mikrotiterplatte nachteilig.

Aus der US 2010/0197004 A1 oder der US 6 074 614 A ist es bekannt, die Mikrotiterplatte mit einem speziell geformten Plattendeckel zu versehen, welcher transparente Zylinder aufweist, die bei aufgelegtem Deckel in die einzelnen Wells hineinragen und dort mit der die Probe aufweisenden Objektflüssigkeit in Kontakt treten. Die Unterseite dieser Zylinder ist eben, so dass die Objektflüssigkeitsoberfläche flach gedrückt und der Meniskus mechanisch zerstört wird.

Aus der US 6 238 911 B1 ist es bekannt, die Mikrotiterplatte mit einem Plattendeckel abzudecken, der oberhalb eines jeden Wells eine zur Objektflüssigkeitslinse inverse Kunststofflinse aufweist. Auf diese Weise wird eine optische Korrektur bewirkt. Neben den besonderen Herstellungskosten ist nachteilig, dass die Ausgleichskunststofflinsen des Plattendeckels auf eine spezielle Oberflächenkrümmung der Objektflüssigkeit in den Wells ausgerichtet sind. Falls die Objektflüssigkeitsart wechselt, funktioniert die optische Korrektur gegebenenfalls nicht mehr, da unterschiedliche Objektflüssigkeiten unterschiedliche hydrostatische Wechselwirkungen zur Well-Innenwandung aufweisen, so dass sich unterschiedliche Oberflächenkrümmungen bilden.

Ein Verfahren zur Phasenkontrastmikroskopie sowie ein Phasenkontrastmikroskop der eingangs genannten Art sind aus der US 2012/0257040 A1 bekannt. Dort wird vorgeschlagen, anstelle einer üblichen Ringblende eine verstellbare Einheit einzusetzen, mit der der Querschnitt des Beleuchtungsbündels veränderbar ist. Hierzu wird ein Flüssigkristall-Display (LCD) eingesetzt, das als Phasenblende mit formveränderbarer Öffnung fungiert. Mittels einer über einen halbdurchlässigen Spiegel zuschaltbaren Bertrand-Linse wird kontrolliert, ob die Direktstrahlung komplett auf den Phasenring fällt. Erforderlichenfalls wird die Form der mit dem LCD realisierten Phasenblende verändert, um eine möglichst gute Überdeckung der Direktstrahlung mit dem Phasenring zu erreichen. Allerdings dürfte die flexible Verformung der Blende durch das LCD allein nicht zur Behebung der negativen Auswirkungen des Meniskuseffektes in der Lage sein. Das LCD kann nämlich nur Anpassungen der Phasenblendenform innerhalb der zur Bestrahlungsrichtung senkrechten Ebene bewirken, was als alleinige Maßnahme nur zu einer geringfügigen Korrektur der Verzerrungen der Direktstrahlung führt. Zudem funktioniert dies im befriedigenden Maße nur, solange die Meniskuskrümmung einen gewissen Grad nicht übersteigt. Der

Objektflüssigkeitsmeniskus innerhalb des Wells einer Mikrotiterplatte verschiebt nämlich nicht nur das Abbild der Blendenöffnung innerhalb der hinteren Objektivbrennebene, sondern verschlechtert auch die Abbildungsbeziehung zwischen der Blendenöffnung und dem Phasenring in axialer Richtung durch einen örtlich variierenden Abbildungsmaßstab. Es kommt zu einer Art Bildfeldwölbung und einer Verzeichnung des Abbildes der Blendenöffnung. Somit kann die Blendenöffnung nicht scharf in der hinteren Objektivbrennebene abgebildet werden.

Eine Optikeinheit gemäß dem Oberbegriff des Anspruchs 4 ist aus der US 3 514 192 A bekannt. Das flüssigkeitsgefüllte Prisma ist mit transparenten Begrenzungswänden versehen, deren Winkel zueinander veränderbar sind, so dass die mittels des Prismas erzeugte Brechung steuerbar ist. Es ist bekannt, das flüssigkeitsgefüllte adaptive Prisma zur Kompensation von Bildbewegungen oder zur Minimierung von chromatischer Dispersion einzusetzen.

Es ist nun Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Phasenkontrastmikroskopie, eine Optikeinheit sowie ein Phasenkontrastmikroskop der eingangs genannten Art zur Verfügung zu stellen, die auf alternative Weise den Nachteilen durch eine Krümmung der Objektflüssigkeitsoberflächen an den Probenbehältern entgegenwirken.

Bei einem Verfahren zur Phasenkontrastmikroskopie der eingangs genannten Art wird die Aufgabe durch die kennzeichnenden Merkmale des Anspruchs 1 gelöst. Demnach wird zur Kompensation einer aufgrund optischer Brechung an der Objektflüssigkeit gegebenen Änderung der Hauptstrahlungsrichtung des Beleuchtungsbündels das Beleuchtungsbündel vor Eintritt in die Objektflüssigkeit mittels eines in Position und/oder Form veränderbaren optischen Ablenkungselements abgelenkt.

Die Kompensation kann vorteilhaft so gestaltet werden, dass die Hauptstrahlungsrichtung des Beleuchtungsbündels nach Verlassen des Probenbehälters parallel zu seiner vor Ablenkung durch das Ablenkungselement gegebenen ursprünglichen Hauptstrahlungsrichtung ist. Es kommt lediglich zu einem seitlichen Versatz in der Hauptstrahlungsrichtung, der jedoch durch eine entsprechende

entgegengesetzte seitliche Verschiebung des Beleuchtungsbündels vor dessen Eintreten in das Ablenkungselement korrigiert werden kann. Letzteres erfolgt z.B. durch eine entsprechende Verschiebung der Quelle des Beleuchtungsbündels, z.B. einer Phasenblende.

Auf diese Weise kann die Wirkung der Objektflüssigkeitsoberfläche auf das Beleuchtungsbündel zumindest teilweise kompensiert und eine Überdeckung der Direktstrahlung mit dem Phasenverschiebungselement erreicht werden. Die Veränderbarkeit des Anpassungselements in Form und/oder Position erlaubt es, die Ablenkung des Beleuchtungsbündels in Abhängigkeit vom Winkel der Objektflüssigkeit zur optischen Achse des Mikroskops zu wählen.

Die Hauptstrahlungsrichtung des Beleuchtungsbündels im Sinne dieser Erfindung ist seine sich in Strahlrichtung erstreckende Mittelachse, im Fall eines symmetrischen Beleuchtungsbündels, wie dies insbesondere bei einer ringförmigen Phasenblende gegeben sein kann, seine Symmetrieachse.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch so ausgeführt werden, dass eine Überlappung von Direktstrahlung und Phasenverschiebungselement z.B. mittels einer Bertrandlinsen-Einheit, kontrolliert und zur Optimierung der Überlappung die Querschnittsgeometrie des Beleuchtungsbündels und/oder die in einer Ebene senkrecht zur optischen Achse des Beleuchtungsbündels gegebene Position vor dessen Auftreffen auf das Ablenkungselement mittels mindestens eines veränderbaren optischen Anpasselements verändert wird.

Die Kompensation des Einflusses des Meniskus der Objektflüssigkeit kann durch die Einwirkung des veränderbaren optischen Anpasselements, welches vorzugsweise in Strahlungsrichtung vor dem Ablenkungselement angeordnet ist, unterstützt werden. Wenn das Beleuchtungsbündel mittels einer Phasenblende geformt wird, können die Änderung der Position des Beleuchtungsbündels und/oder seiner Querschnittsgeometrie durch eine Formänderung der Öffnung der Phasenblende erfolgen, welche dann gleichzeitig das optische Anpasselement darstellt. Die formveränderbare Phasenblende kann beispielsweise – wie aus dem oben

dargestellten Stand der Technik gemäß der US 2012/0257040 A1 bekannt – mittels eines LCD realisiert werden. Ist schließlich sichergestellt, dass die Abbildung der Phasenblendenöffnung vollständig auf das Phasenverschiebungselement fällt, ist der Kontrast des Bildes der zu mikroskopierenden Probe maximal. Denkbar ist auch die Herstellung des Beleuchtungsbündels ohne Phasenblende, jedoch mittels einer geeigneten Strahlungsquelle, z.B. einem LED-Array. Das Anpasselement kann in diesem Fall das LED-Array sein, wobei für unterschiedliche Formen des Beleuchtungsbündels die LEDs unterschiedlich geschaltet werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch so ausgeführt werden, dass im Strahlengang vor dem Probenbehälter ein optisches Muster erzeugt, eine im Bereich des Probenbehälters erzeugte optische Verzerrung des Musters erfasst und das Maß der Musterverzerrung zur automatischen Steuerung der Position und/oder Form des optischen Ablenkungselements und/oder zur Steuerung des optischen Anpassungselements genutzt wird. Die Erzeugung des optischen Musters, z.B. mit einer regelmäßigen Gitterstruktur, kann durch eine gesonderte Einheit oder ebenfalls durch das LCD erfolgen. Auf diese Weise kann eine vollautomatische Optimierung des Kontrastes des Mikroskopbildes durch Regelung insbesondere der Parameter für das Ablenkelement und/oder das Anpasselement eingerichtet werden.

Bei einer Optikeinheit gemäß dem Oberbegriff des Anspruchs 4 wird die erfindungsgemäße Aufgabe dadurch gelöst, dass die Eintrittsfläche durch eine in einem Schwerfeld gebildete Oberfläche der viskosen Masse vorgegeben ist. Damit ist eine sehr effektive und einfache aber wirkungsvolle Variante eines adaptiven Ablenkungselements gegeben.

In einem Phasenkontrastmikroskop eingesetzt, dient das Ablenkungselement dazu, die Hauptstrahlungsrichtung des Beleuchtungsbündels bei Bedarf abzulenken. Die Optikeinheit ist jedoch auch außerhalb eines Phasenkontrastmikroskops einsetzbar, um die Variabilität des adaptiven Ablenkungselements zur gesteuerten Manipulation einer das Ablenkungselement durchlaufenden Strahlung nutzen zu können.

Die viskose Masse hat eine höhere optische Dichte als die das Ablenkungselement umgebende Atmosphäre, insbesondere Luft, und kann z.B. aus einer Flüssigkeit, beispielsweise Wasser, oder einem Gel bestehen. Die viskose Masse kann auch in Material und/oder optischer Eigenschaft der optischen Dichte der Objektflüssigkeit im Probenbehälter entsprechen.

Das Ablenkungselement kann einen offenen Behälter mit der viskosen Masse umfassen, so dass die Eintrittsfläche von der Oberfläche der viskosen Massen unmittelbar gebildet ist.

Um unerwünschte Auswirkungen einer Bewegungen der Oberfläche der viskosen Masse, z.B. aufgrund von Erschütterungen, zu mildern oder gänzlich auszuschließen, kann die Optikeinheit auch so ausgebildet sein, dass die Eintrittsfläche durch ein mittelbar oder unmittelbar auf der Oberfläche der viskosen Masse schwimmendes oder aufliegendes, starres und transparentes Abdeckungselement gebildet ist. Das Abdeckungselement weist bevorzugt einen erhöhten Rand auf, um ein Überschwappen der viskosen Masse auf die obere Oberfläche des Abdeckungselements zu vermeiden. Durch die Oberfläche der viskosen Masse ist die Lage des Abdeckungselements im Raum und damit auch die Lage der Eintrittsfläche vorgegeben.

Erfindungsgemäß kann die Optikeinheit mit Mitteln zum Verschwenken des Ablenkungselements um mindestens eine Schwenkachse versehen sein. Im Schwerfeld bleibt die die Eintrittsfläche vorgebende obere Oberfläche der viskosen Masse, vorzugsweise eine Flüssigkeit, auch bei einer Schwenkbewegung um eine zur Schwerkrafttrichtung senkrechten Schwenkachse horizontal ausgerichtet, während die durch einen in einer transparenten Bodenwand eines Trägers für die viskose Masse gegebene Austrittsfläche bei der Schwenkbewegung ihren Winkel zur Schwerkrafttrichtung ändert. Somit ändert sich auch der Winkel zwischen der Austrittsfläche und der Eintrittsfläche, womit ein adaptives Ablenkungselement realisiert wird. Vorzugsweise sind zwei linear zueinander unabhängige Schwenkachsen vorgesehen.

Bei einem Phasenkontrastmikroskop der eingangs genannten Art wird die Aufgabe durch die kennzeichnenden Merkmale des Anspruchs 7 gelöst. Bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Phasenkontrastmikroskops ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen 8 bis 14.

Alternativ zur Optikeinheit mit einem adaptiven Ablenkungselement kann auch ein in seiner Form konstantes Ablenkungselement genutzt werden, dessen Oberflächen auf einer Eintrittsseite für das Beleuchtungsbündel einerseits und auf einer Austrittsseite für das Beleuchtungsbündel andererseits räumlich unterschiedliche Winkel zueinander aufweisen. So könnte zum Beispiel die Eintrittsseite eben geformt sein und die Austrittsfläche einen einfach oder mehrfach gekrümmten Verlauf aufweisen. Ein solches Ablenkungselement könnte derart platziert werden, dass das Beleuchtungsbündel senkrecht in die Eintrittsseite eintritt und an der Austrittsseite an einer Stelle austritt, an der die Austrittsfläche nicht parallel zur Eintrittsfläche verläuft, so dass das Beleuchtungsbündel entsprechend gebrochen wird. Wird ein solches optisches Element nun seitlich verschoben, ändert sich für das Beleuchtungsbündel die Winkelbeziehung zwischen Eintrittsfläche und Austrittsfläche, so dass auch die Ablenkung des Beleuchtungsbündels entsprechend geändert wird.

Es ist auch denkbar, für das formkonstante Ablenkungselement Mittel zur Ausführung von Schwenkbewegungen um mindestens eine zur Eintrittsfläche parallele Schwenkachse oder Drehungen, z.B. um eine zur Richtung der eintretenden Beleuchtung parallelen Rotationsachse, vorzusehen, um die Möglichkeiten zur Ablenkung des Beleuchtungsbündels zu erhöhen.

Das erfindungsgemäße Phasenkontrastmikroskop kann vorteilhaft auch so ausgebildet sein, dass das Ablenkungselement vorzugsweise prismaartig ist und eine von einer ersten Begrenzungswand gebildete Eintrittsfläche und eine einer zweiten Begrenzungswand gebildete Austrittsfläche sowie Mittel zur steuerbaren Veränderung des Winkels zwischen Eintrittsfläche und Austrittsfläche aufweist, wobei zwischen Eintrittsfläche und Austrittsfläche eine viskose Masse angeordnet ist.

Dabei kann das Ablenkungselement so gestaltet sein, dass beliebige Bestrahlungsrichtungen vorgesehen werden können, insbesondere auch in horizontaler Richtung, so dass keine Abhängigkeit mehr von der Ausrichtung des Schwerfeldes besteht. Dabei kann ein das Ablenkungselement bildendes Gefäß auch oben offen oder auch von einer flexiblen Haut, z.B. einer Membran, abgedeckt sein, so dass die viskose Masse der Bewegung der Begrenzungswand oder mehrerer Begrenzungswände folgen kann. Zur Vermeidung eines Austritts der viskosen Masse können Dichtungen oder die Begrenzungswände miteinander verbindende flexible, z.B. folienartige, Wandelemente, z.B. aus einem Gummi, vorgesehen werden, welche die Bewegung benachbarter Begrenzungswände zueinander erlauben.

Bei den Mitteln zur gesteuerten Bewegung der mindestens einen Begrenzungswand kann es sich um mit Motoren ausgestattete oder hydraulisch oder pneumatisch angetriebene Aktoren handeln.

Die erfindungsgemäße Optikeinheit kann aus mit Mitteln zur translatorischen und/oder rotatorischen Bewegung des Ablenkungselements ausgestattet sein. Diese Maßnahmen erhöhen die Möglichkeiten zur Manipulation der Strahlung mittels des adaptiven Ablenkungselements weiter.

Wie bereits weiter oben dargestellt, wird die Überlappung von Direktstrahlung und Phasenverschiebungselement optisch kontrolliert, wozu bevorzugt eine Bertrand-Linseneinheit mit mindestens einer in ihrer Fokusslage variablen formbaren Linse eingesetzt wird. Die Fokusslage kann mit Mitteln zur Steuerung der mindestens einen formbaren Linse eingestellt werden. Auf diese Weise ist es möglich, die Bertrand-Linseneinheit dauerhaft im Mikroskop zu belassen und zwischen einem Betriebszustand zur Mikroskopie, d.h. zur Betrachtung der Probe, und einem Betriebszustand zur Kontrolle der Überlappung der Direktstrahlung mit dem Phasenverschiebungselement, d.h. zur Kontrolle der korrekten Abbildung der Phasenblendenöffnung auf das Phasenverschiebungselement, umzuschalten. Ein Einschwenken einer Bertrandlinse oder der Einsatz eines halbdurchlässigen Spiegels ist somit nicht mehr erforderlich.

Im Folgenden werden anhand von Figuren eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Phasenkontrastmikroskopie und bevorzugte Ausführungsformen einer Optikeinheit sowie des erfindungsgemäßen Phasenkontrastmikroskops dargestellt. Es zeigen schematisch

- Fig. 1: ein Phasenkontrastmikroskop;
- Fig. 2a: einen Ausschnitt des Phasenkontrastmikroskops ohne Ablenkung des Beleuchtungsbündels durch ein Ablenkungselement;
- Fig. 2b: die Position des Phasenrings in der in Fig. 2a dargestellten Situation;
- Fig. 3a: den Ausschnitt gemäß Fig. 2a mit Ablenkung des Beleuchtungsbündels;
- Fig. 3b: die Position des Phasenrings in der in Fig. 3a dargestellten Situation;
- Fig. 4: einen weiteren Ausschnitt des Phasenkontrastmikroskops mit Bertrand-Linseneinheit in einem ersten Betriebszustand der Bertrand-Linseneinheit,
- Fig. 5: den Ausschnitt gemäß Fig. 4 in einem zweiten Betriebszustand der Bertrand-Linseneinheit und
- Fig. 6: eine alternative Ausführungsform eines Ablenkungselements.

Fig. 1 zeigt schematisch ein Phasenkontrastmikroskop, wobei die einzelnen Bestandteile zur Vereinfachung der Darstellung von den tatsächlichen Größenverhältnissen abweichen. Ein von einer nicht dargestellten Lichtquelle erzeugtes Quell-Strahlungsbündel 1 trifft auf eine Phasenblende 2, durch die ein Beleuchtungsbündel 3 tritt. In den Fig. 2 und 3 ist die Querschnittsform des Beleuchtungsbündels 3 nicht dargestellt sondern lediglich schematisch ein Bereich

angedeutet, innerhalb dessen das Beleuchtungsbündel 3 mit einer hier mit durchgezogener Linie dargestellten Hauptstrahlungsrichtung 28 verläuft.

Nach Austritt aus der Phasenblende 2 trifft das Beleuchtungsbündel 3 auf einen Kondensor 4, der das Beleuchtungsbündel 3 auf eine hier nicht gesondert dargestellte Probe fokussiert, die sich innerhalb eines Probenbehälters 5 befindet, welcher eine Objektflüssigkeit 6 aufweist. Der Probenbehälter 5 kann zum Beispiel der Napf einer Mikrotiterplatte sein. Der Probenbehälter 5 kann jedoch auch ein einzelner Behälter oder eine sonstige Behälterkombination sein. In den Fig. 1, 2a und 3a wird der Probenbehälter 5 von einer Objekthalterung 7 getragen, deren Position vorzugsweise mittels einer Steuerung 22 veränderbar ist. In entsprechender Weise würde auch eine Mikrotiterplatte oder ein sonstiges Objekt mit mindestens einem Probenbehälter 5 von der Objekthalterung 7 getragen.

Zwischen dem Kondensor 4 und dem Probenbehälter 5 befindet sich ein adaptives Ablenkungselement 8, in dem sich eine Ablenkungselement-Flüssigkeit 9 befindet. Die Ablenkungselement-Flüssigkeit 9 ist für die Strahlung des Beleuchtungsbündels 3 transparent, bildet im Falle der Fig. 1 für das Beleuchtungsbündel 3 eine Eintrittsfläche 29 und kann beispielsweise Wasser sein. Vorzugsweise aber nicht zwingend werden für das Ablenkungselement 8 Flüssigkeiten verwendet, die vom optischen Verhalten dem der Objektflüssigkeit 6, z.B. eines Nährmediums, entsprechen. Hierbei sind Flüssigkeiten mit gegenüber Wasser erhöhter Viskosität eher als vorteilhaft anzusehen.

Wie in den Fig. 2a und 3a gezeigt, kann die Ablenkungselement-Flüssigkeit 9 zum Teil mit einer Abdeckung 10 versehen sein, die ebenfalls transparent für die eingesetzte Strahlung des Beleuchtungsbündels 3 ist und somit dessen Eintrittsfläche 29 zum Ablenkungselement 8 bildet. Die Abdeckung 10, die beispielsweise durch eine Petrischale gebildet sein kann, verhindert, dass Wellen oder andere Unebenheiten der Oberfläche der Ablenkungselement-Flüssigkeit 9, die zum Beispiel durch Vibrationen erzeugt werden, einen unerwünschten Einfluss nehmen. Die Funktionsweise des Ablenkungselements 8 wird weiter unten näher dargestellt.

Im weiteren Verlauf passiert das Beleuchtungsbündel 3 ein Objektiv 11, welches einen Phasenring 12 aufweist. Der Phasenring 12 umfasst ein phasenverschiebendes Verzögerungselement sowie einen Graufilter (beides hier nicht im Detail dargestellt), wodurch der auftreffende Anteil des Beleuchtungsbündels 3 abgeschwächt und in der Phase verschoben wird. Im Anschluss an das Objektiv 11 durchläuft die Strahlung eine je nach Art des Phasenkontrastmikroskops optionale Tubuslinse 13 sowie eine Bertrandlinsen-Einheit 14, bevor sie auf den Bildsensor 15 einer Kamera 16 trifft.

Um das Ziel einer möglichst kontrastreichen Abbildung der durchleuchteten Probe zu erreichen, soll mittels eines von der Probe ungebeugten Anteils des Beleuchtungsbündels 3 die ringförmige Öffnung der Phasenblende 2 vollständig auf den Phasenring 12 abgebildet werden. Dieser im Folgenden als Direktstrahlung bezeichnete von der Probe ungebeugte Anteil des Beleuchtungsbündels 3 wird – wie bereits erwähnt – im Phasenring 12 abgeschwächt und phasenverschoben. Ein von der Probe gebeugter Anteil des Beleuchtungsbündels 3 hingegen läuft am Phasenring 12 vorbei und interferiert mit der Direktstrahlung zu der kontrastreichen Mikroskopabbildung der Probe. Die Abbildung wird mit einem Okular oder – wie hier als vorteilhafte Variante dargestellt – einem Bildsensor 15 einer Kamera 16 betrachtet.

Fig. 2a zeigt eine Situation, bei der das Beleuchtungsbündel 3 auf das Zentrum des Probenbehälters 5 trifft. Dort ist ein Meniskus der Oberfläche der Objektflüssigkeit 6 nicht oder nur schwach ausgebildet. Das Beleuchtungsbündel 3 fällt somit ohne durch den Probenbehälter 6 und seine Objektflüssigkeit 6 eine wesentliche Brechung zu erfahren auf das Objektiv 11 und den Phasenring 12 (siehe Fig. 1). Der Phasenring 12 und die Phasenblende 2 sind für diesen durch den Probenbehälter 5 ungestörten Strahlungsverlauf gegeneinander ausgerichtet, so dass die Direktstrahlung vollständig auf den Phasenring 12 fällt.

Fig. 3a dagegen zeigt die Situation, in der ein Probenbereich untersucht werden soll, der näher zum Rand des Probenbehälters 5 positioniert ist, wo aufgrund der Meniskusbildung der Spiegel der Objektflüssigkeit 6 bereits eine merkliche Neigung zur Horizontalen ausgebildet hat. Ohne besondere Maßnahmen würde das Beleuchtungsbündel 3 beim Eintritt in die Objektflüssigkeit 6 gebrochen, wodurch die

Direktstrahlung den Phasenring 12 zumindest zum Teil verfehlen würde. Um diesem Effekt entgegenzuwirken, wird das Ablenkungselement 8 geneigt, so dass eine für die Strahlung als Austrittsfläche 23 dienende untere Grenzfläche des Ablenkungselements 8 nicht mehr senkrecht zur Hauptstrahlungsrichtung 28 ist und an der Austrittsfläche 23 eine Brechung des Beleuchtungsbündels 3 mit einer Änderung der Hauptstrahlungsrichtung 28 erfolgt. Das Maß der Neigung des Ablenkungselements 8 und damit der Ablenkung der Hauptstrahlrichtung ist so zu wählen, dass die Hauptstrahlungsrichtung 28 nach Austritt des Beleuchtungsbündels 3 aus dem Probenbehälter 5 parallel zur optischen Achse des sich in Strahlrichtung an den Probenbehälter 5 anschließenden Teils des Mikroskops ist. Ist die optische Dichte des Ablenkungselements 8 gleich der optischen Dichte der Objektflüssigkeit 6, wird die Neigung bevorzugt so gewählt, dass die Austrittsfläche 23 parallel zur Tangente an der Oberflächenkrümmung der Objektflüssigkeit 6 ausgerichtet ist. Bei sich unterscheidenden optischen Dichten von Ablenkungselement 8 und Objektflüssigkeit 6 sind entsprechende Winkel zwischen der Tangente an der Oberflächenkrümmung und der Austrittsfläche 23 zielführend. Maßgeblich für die Tangente ist der Ort des Schnittpunktes der Hauptstrahlungsrichtung 28 oder optischen Achse des Beleuchtungsbündels 3 mit der Oberfläche der Objektflüssigkeit 6. Um eine entsprechende Kipp- oder Schwenkbewegung zu ermöglichen, ist das Ablenkungselement 8 auf einer um zwei Schwenkachsen schwenkbare und hier nicht dargestellte Halterung gelagert. Die beiden Schwenkachsen sind senkrecht zur Hauptstrahlungsrichtung 28 des Beleuchtungsbündels 3.

Aufgrund der Schwenkung verändert das Ablenkungselement 8 seine Form, da die Oberfläche der Ablenkungselement-Flüssigkeit 9 weiterhin senkrecht zur Richtung der Schwerkraft ausgerichtet ist. Das Ablenkungselement 8 bildet somit mittels der in Fig. 2a und 3a nicht dargestellten Mittel zum Verschwenken ein adaptives Prisma.

Das Beleuchtungsbündel 3 erfährt bei einem um einen Winkel φ verschwenkten Ablenkungselement 8 durch die Austrittsfläche 23 eine Brechung, d.h. eine Ablenkung der Hauptstrahlungsrichtung 28, und wird an der Oberfläche der Objektflüssigkeit 6 gebrochen. Beim Austritt aus dem Probenbehälter 6 erfährt das Beleuchtungsbündel 3 eine weitere Brechung, so dass die Hauptstrahlungsrichtung 28 wieder parallel zu der

vor Auftreffen auf das Ablenkungselement 8 gegebenen ursprünglichen Hauptstrahlungsrichtung 28 läuft. Es hat lediglich eine seitliche Verschiebung stattgefunden.

Die aufgrund der Brechungen an Ablenkungselement 8 und Objektflüssigkeit 6 gegebene Parallelverschiebung des Beleuchtungsbündels 3 wird kompensiert durch eine entsprechende Verschiebung der Phasenblende 2 und ihrer Öffnung 30. Die Verschiebung der Phasenblende ist in Fig. 3b symbolisiert dargestellt. Eine derartige Verschiebung ist in der in Fig. 2a gezeigten Situation nicht erforderlich, wie Fig. 2b symbolisch darstellt. Eine Verzerrung der Abbildung aufgrund des Flüssigkeitsmeniskus der Objektflüssigkeit 6 wird auf diese Weise weitgehend oder im Idealfall vollständig vermieden.

Die in den Fig. 1, 2a und 3a nur schematisch dargestellte Phasenblende 2 kann somit durch einen üblichen starren Phasenblendenkörper realisiert sein, der lediglich innerhalb einer zu seiner Mittelebene parallelen Ebene verschiebbar ist.

Alternativ ist es auch möglich, die Phasenblende 2 durch eine Flüssigkeitskristallanzeige (LCD) zu realisieren, wie sie aus der US 2012/0257040 A1 – wie eingangs dargestellt – bekannt ist. Auf diese Weise kann eine mechanische Verschiebung innerhalb der Ebene vermieden werden. Das LCD könnte als elektronisch veränderbare Phasenblende 2 fungieren, wobei vorteilhafter Weise nicht nur eine Verschiebung der Phasenblendenöffnung 30 als Ganzes möglich ist, sondern auch eine Veränderung der Form der Phasenblendenöffnung 30 durchgeführt werden kann. Letzteres kann erforderlich werden, sofern – zum Beispiel auf Grund der besonderen Stärke der Krümmung des Meniskus der Objektflüssigkeit 6 – es doch zu einer verzerrten Abbildung der Phasenblendenöffnung 30 kommt.

Die in Fig. 1 dargestellte Bertrandlinsen-Einheit 14 wird im Folgenden anhand der Fig. 4 und 5 näher erläutert. Die hier dargestellte Variante der Bertrandlinsen-Einheit 14 ist nicht zwingend. Es ist alternativ möglich, in dem erfinderischen Phasenkontrastmikroskop eine an sich bekannte Bertrandlinse in den Strahlengang des Phasenkontrastmikroskops einzuschwenken oder mit einem halbdurchlässigen Spiegel

für die Zuschaltung einer externen Bertrandlinse zu sorgen. Es ist aus dem Stand der Technik bekannt, dass eine Bertrandlinse zur Kontrolle der Abbildung der Öffnung der Phasenblende 2 auf den Phasenring 12 eingesetzt wird.

Als vorteilhafte Ausbildungsvariante zeigen die Fig. 1 sowie ausschnittsweise Fig. 4 und 5 ein Phasenkontrastmikroskop mit Bertrandlinsen-Einheit 14, welche sich permanent im Strahlengang des Phasenkontrastmikroskops befinden kann. Um zwischen einer Abbildung der Objektebene, innerhalb der die Probe im Probenbehälter 5 angeordnet ist, und einer Abbildung der bildseitigen Mikroskopbrennebene, in der der Phasenring 12 sitzt, auf den Bildsensor 15, umschalten zu können, ist die Bertrandlinsen-Einheit 14 schaltbar und umfasst eine z.B. elektronisch deformierbare Linse 17. Hierdurch ist es möglich, ein optisches System zu erzeugen, welches in der Lage ist, bei Bedarf sowohl ein Bild der rückseitigen Brennebene bzw. des dort liegenden Phasenrings 12 zu liefern als auch das System auf die Probe zu fokussieren. Zur Umschaltung auf einen Bertrand-Linsenbetrieb (erster Betriebszustand) wird die fokusvariable Linse 17 von einer kleinen auf eine große Brennweite umgeschaltet, so dass das koordinierte Strahlenbündel zwischen Objektiv 11 und Tubuslinse 13 in der Weise verändert wird, dass ein Bild des Phasenrings 12 auf dem Bildsensor 15 erzeugt wird. Diese Situation ist in Fig. 4 dargestellt.

Fig. 5 zeigt die Situation bei „ausgeschalteter“ Bertrandlinsen-Einheit 14. In diesem Fall ist die Probe auf dem Bildsensor 15 scharf abgebildet

Das erfindungsgemäße Phasenkontrastmikroskop ermöglicht ein automatisiertes Einstellen der Position oder der Schwenkwinkel des Ablenkungselements 8 und/oder der Position und ggf. der Form der Phasenblende 2. Dabei kann beispielsweise wie folgt vorgegangen werden:

Zunächst wird die Krümmung der Oberfläche der Objektflüssigkeit 6 in Abhängigkeit der Position des Probenbehälters innerhalb seiner X-Y-Ebene aus bekannten Parametern, wie zum Beispiel die Temperatur T , die Viskosität V , der Durchmesser des Probenbehälters D sowie dem Füllstand der Objektflüssigkeit 6, vor dem Abbildungsvorgang analytisch angenähert. Die Oberflächenkrümmung lässt sich dabei

der Einfachheit halber über die Winkel φ' und θ' zwischen der Tangente der Oberflächenkrümmung und der planen Fläche des Bodens des Probenbehälters 8 beschreiben. Um nun die zur Kompensation der Brechung des Beleuchtungsbündels 3 an der Objektflüssigkeit 6 nötige Ablenkung des Beleuchtungsbündels 3 zu gewährleisten, werden unter der Annahme zumindest ähnlicher optischer Dichten von Ablenkungselement 8 und Objektflüssigkeit 6 die Auslenkwinkel φ und θ des Ablenkungselements (in Fig. 1 ist lediglich φ dargestellt) zunächst den Winkelwerten φ' und θ' der Tangente der Objektflüssigkeitsoberfläche oberhalb des Zentrums der zu beobachtenden Probenstelle gleichgesetzt. Bei stark unterschiedlichen optischen Dichten können auch angepasste Winkelwerte eingesetzt werden. Außerdem wird die Phasenblende 2 um ein zu der erwarteten Parallelverschiebung der Hauptstrahlrichtung 28 passendes Maß in ihrer zur Strahlrichtung des Quell-Lichtbündels 1 senkrechten x-/y-Ebene verschoben.

Anschließend wird mittels der Bertrandlinsen-Einheit 14 zur Abbildung des Phasenrings 12 auf den Bildsensor 15 geschaltet. Dies erfolgt mittels einer in Fig. 1 schematisch dargestellten Steuerung 19 für die Bertrandlinsen-Einheit 14. Das auf dem Bildsensor 15 der Kamera 16 erzeugte Abbild des Phasenrings wird automatisiert ausgewertet und hinsichtlich der Überlappung des Abbildes der Öffnung der Phasenblende 2 mit dem Phasenring 12 überprüft. Durch schrittweises Verstellen der Parameter für Roll- und Nickwinkel φ bzw. θ des Ablenkungselements 8 mittels einer Ablenkungselementsteuerung 20 sowie einer x-/y-Verschiebung und erforderlichenfalls einer Formänderung der Phasenblende 2 mittels einer Phasenblendensteuerung 21 lässt sich die Überlappung der Abbilder der Öffnung der Phasenblende 2 einerseits und des Phasenrings 2 andererseits in situ beobachten und optimieren. Die Überlappung der Abbilder lässt sich nicht nur anhand des Zwischenbildes des Phasenrings 12 beurteilen, sondern alternativ oder zusätzlich direkt anhand des wiederhergestellten Bildkontrastes des Objektbildes, zu dem durch Umschalten der Bertrandlinsen-Einheit 14 zurückgeschaltet werden kann.

Alternativ zum schrittweisen Verändern des Schwenkens des Ablenkungselements 8 und der Phasenblende 2 kann die Oberflächenkrümmung direkt aus der Zwischenbildebene ermittelt werden, indem anstelle der Phasenblendenöffnung ein

bestimmtes Muster, zum Beispiel eine Gitterstruktur, auf die hintere Objektivbrennebene abgebildet wird. Das Muster, welches in den Fig. nicht dargestellt ist, kann vorteilhaft mittels eines elektronisch steuerbaren adaptiven Elements erzeugt werden, zum Beispiel mittels desselben LCD, das auch als Phasenblende 2 fungieren kann. Anhand von im Bildsensor 15 festgestellten Verzerrungen des aufgegebenen Musters kann über Algorithmen die Form der durch die Krümmung der Oberfläche der Objektflüssigkeit 6 erzeugten Musterverzerrung ermittelt werden. Aus diesen Informationen können die Parameter zur Adaption der Phasenblende 2 und des Ablenkungselements 8 berechnet werden.

Fig. 6 zeigt schematisch ein alternatives Ablenkungselement 24 aus einem massiven Material, z.B. Glas, oberhalb eines nur ausschnittsweise dargestellten Probenbehälters 5. Eine obere Eintrittsfläche 25 ist eben ausgestaltet, während eine gegenüberliegende Austrittsfläche 26 konvex gekrümmt ist. Es sind mehrere alternative Hauptstrahlungsrichtungen 27a bis 27 e des Beleuchtungsbündels 3 symbolisiert dargestellt. Während das Beleuchtungsbündel 3 mit der Hauptstrahlungsrichtung 27a ungebrochen das Ablenkungselement 24 durchläuft, erfährt das Beleuchtungsbündel 3 im Falle der Hauptstrahlungsrichtungen 27b bis 27e eine stärkere Brechung.

In der in Fig. 6 dargestellten Situation führt die vom Ablenkungselement 24 bewirkte Ablenkung der Hauptstrahlungsrichtung 27d zu der gewünschten Kompensation der durch die Objektflüssigkeit 6 erzeugten Brechung. Soll eine andere Stelle der hier nicht dargestellten Probe im Probenbehälter 5 untersucht werden, welche eine andere Krümmung der Oberfläche der Objektflüssigkeit 6 aufweist, kann es erforderlich sein, das Ablenkungselement 24 relativ zum Probenbehälter 5 zu verschieben, um die Ablenkung des Beleuchtungsbündels 3 an die andere Krümmung der Oberfläche der Objektflüssigkeit 6 anzupassen. Die Relativbewegung zwischen Ablenkungselement 24 und dem Probenbehälter 5 wird durch eine Translation des Ablenkungselements 24 im Phasenkontrastmikroskop bewirkt.

Bezugszeichenliste

- 1 Quell-Strahlungsbündel
- 2 Phasenblende
- 3 Beleuchtungsbündel
- 4 Kondensor
- 5 Probenbehälter
- 6 Objektflüssigkeit
- 7 Objekthalterung
- 8 Ablenkungselement
- 9 Ablenkungselement-Flüssigkeit
- 10 Abdeckung
- 11 Objektiv
- 12 Phasenring
- 13 Tubuslinse
- 14 Bertrandlinsen-Einheit
- 15 Bildsensor
- 16 Kamera
- 17 deformierbare Linse
- 19 Steuerung Bertrandlinsen-Einheit
- 20 Ablenkungselementsteuerung
- 21 Phasenblendensteuerung
- 22 Steuerung Objekthalterung
- 23 Austrittsfläche
- 24 Ablenkungselement
- 25 Eintrittsfläche
- 26 Austrittsfläche
- 27 Beleuchtungsbündel
- 28 Hauptstrahlungsrichtung
- 29 Eintrittsfläche
- 30 Öffnung der Phasenblende

Patentansprüche

1. Verfahren zur Phasenkontrastmikroskopie an einer Probe, welche in einem eine Objektflüssigkeit (6) aufweisenden Probenbehälter (5) angeordnet ist, bei dem ein von der Probe ungebeugter, als Direktstrahlung dienender Anteil eines Beleuchtungsbündels (3, 27) auf ein Phasenverschiebungselement (12) gegeben wird, **dadurch gekennzeichnet, dass** zur Kompensation einer aufgrund optischer Brechung an der Objektflüssigkeit (6) gegebenen Änderung der Hauptstrahlungsrichtung (28) des Beleuchtungsbündels (3, 27) das Beleuchtungsbündel (3, 27) vor Eintritt in die Objektflüssigkeit (6) mittels eines in Position und/oder Form veränderbaren optischen Ablenkungselements (8, 24) abgelenkt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass eine am Ort des Phasenverschiebungselements (12) gegebene Überlappung von Direktstrahlung und Phasenverschiebungselement (12) kontrolliert und zur Optimierung der Überlappung die Querschnittsgeometrie des Beleuchtungsbündels (3, 27) und/oder die in einer Ebene senkrecht zur Hauptstrahlungsrichtung (28) des Beleuchtungsbündels (3, 27) gegebene Position vor dessen Auftreffen auf das Ablenkungselement (8, 24) mittels mindestens eines veränderbaren optischen Anpasselements verändert wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass im Strahlengang vor dem Probenbehälter (5) ein optisches Muster erzeugt, eine im Bereich des Probenbehälters (5) erzeugte optische Verzerrung des Musters erfasst und das Maß der Musterverzerrung zur automatischen Steuerung der Position und/oder Form des optischen Ablenkungselements (8, 24) und/oder mit Rückbezug auf Anspruch 2 zur Steuerung des optischen Anpasselements genutzt wird.

4. Optikeinheit, umfassend ein optisches Ablenkungselement (8) mit einer Eintrittsfläche (25, 29) und einer Austrittsfläche (23, 26) und Mitteln zur steuerbaren Veränderung des Winkels zwischen Eintrittsfläche (25, 29) und Austrittsfläche (23, 26), wobei zwischen Eintrittsfläche (25, 29) und Austrittsfläche (23, 26) eine viskose Masse (9) angeordnet ist, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Eintrittsfläche (25, 29) durch eine in einem Schwerfeld gebildete Oberfläche der viskosen Masse (9) vorgegeben ist.
5. Optikeinheit nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Eintrittsfläche (25, 29) durch ein mittelbar oder unmittelbar auf der Oberfläche der viskosen Masse (9) schwimmendes oder aufliegendes, starres und transparentes Abdeckungselement (10) gebildet ist.
6. Optikeinheit nach Anspruch 4 oder 5, gekennzeichnet durch Mittel zum Verschwenken des Ablenkungselements (8) um mindestens eine Schwenkachse.
7. Phasenkontrastmikroskop, geeignet zur Mikroskopie einer Probe, welche in einem eine Objektflüssigkeit (6) aufweisenden Probenbehälter (5) angeordnet ist, mit
- Mitteln zur Erzeugung eines Beleuchtungsbündels (3, 27) und
- einer Objekthalterung (7) zur Aufnahme des Probenbehälters (5),
gekennzeichnet durch
mindestens ein im Strahlverlauf des Beleuchtungsbündels (3, 27) vor der Objekthalterung (7) angeordnetes, zur Veränderung der Richtung der Hauptstrahlungsrichtung (28) des Beleuchtungsbündels (3, 27) optisches Ablenkungselement (8, 24) sowie Mittel zur Veränderung der Position und/oder Form des optischen Ablenkungselements (8, 24).
8. Phasenkontrastmikroskop nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Ablenkungselement (8, 24) um mindestens eine zur Strahlrichtung des einfallenden Beleuchtungsbündels (3, 27) senkrechten Achse schwenkbar ist.
9. Phasenkontrastmikroskop nach Anspruch 7 oder 8, gekennzeichnet durch eine Optikeinheit nach einem der Ansprüche 4 bis 6.

10. Phasenkontrastmikroskop nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Ablenkungselement (8, 24) in mindestens einer zur Strahlrichtung des Beleuchtungsbündels (3, 27) senkrechten Richtung verschiebbar ist und eine für den Austritt des Beleuchtungsbündels (3, 27) vorgesehene, gekrümmte Austrittsfläche (26) aufweist.
11. Phasenkontrastmikroskop nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Ablenkungselement (8) prismaartig ist und eine von einer ersten Begrenzungswand gebildete Eintrittsfläche (25, 29) und eine von einer zweiten Begrenzungswand gebildete Austrittsfläche (23, 26) sowie Mittel zur steuerbaren Veränderung des Winkels zwischen Eintrittsfläche (25, 29) und Austrittsfläche (23, 26) aufweist, wobei zwischen Eintrittsfläche (25, 29) und Austrittsfläche (23, 26) eine viskose Masse (9) angeordnet ist.
12. Phasenkontrastmikroskop nach einem der Ansprüche 7 bis 11, gekennzeichnet durch Mittel zur Beobachtung der Überlappung eines von der Probe ungebeugten, als Direktstrahlung dienenden Anteils des Beleuchtungsbündels (3, 27) mit einem Phasenverschiebungselement (12) sowie durch mindestens ein veränderbares optisches Anpasselement zur Veränderung der Querschnittsgeometrie des Beleuchtungsbündels (3, 27) und/oder seiner in einer Ebene senkrecht zur Hauptstrahlungsrichtung (28) des Beleuchtungsbündels (3, 27) gegebenen Position.
13. Phasenkontrastmikroskop nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Mittel zur Beobachtung der Überlappung eine Bertrand-Linseneinheit (14) mit mindestens einer in ihrer Fokusslage variablen formbaren Linse (17) und Mittel (19) zur Steuerung der mindestens einen formbaren Linse (17) umfassen.
14. Phasenkontrastmikroskop nach einem der Ansprüche 7 bis 13, gekennzeichnet durch im Strahlengang vor dem Probenbehälter (5) angeordnete Mittel zur Erzeugung eines optischen Musters, Mittel zur Bestimmung der im Bereich des Probenbehälters bewirkten optischen Verzerrung des Musters sowie Mittel (20) zur Steuerung der Position und/oder Form des optischen Ablenkungselements (8, 24)

und/oder mit Rückbezug auf Anspruch 12 oder 13 zur Steuerung des optischen Anpasselements vorgesehen sind.

1/2

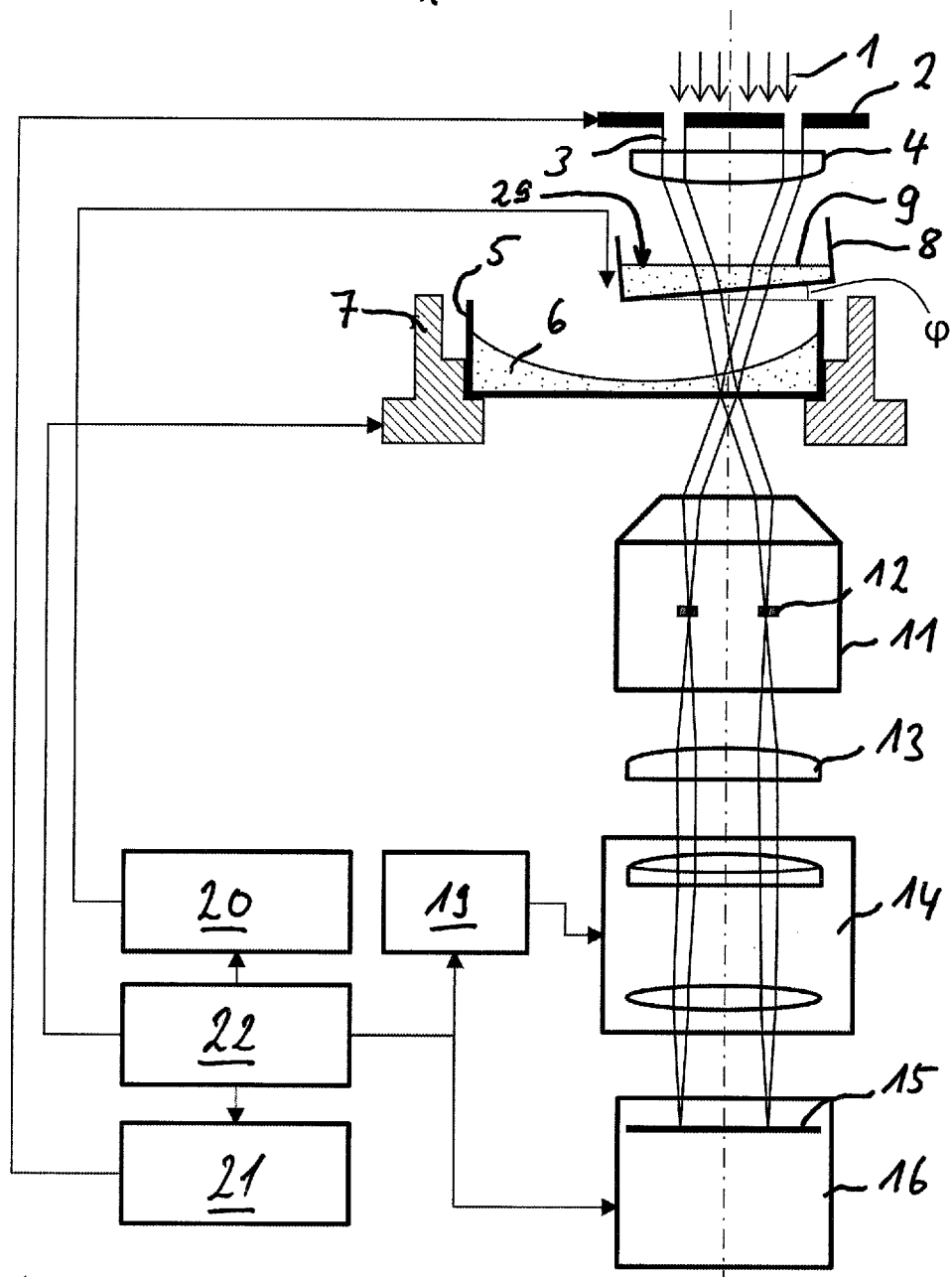


Fig. 1

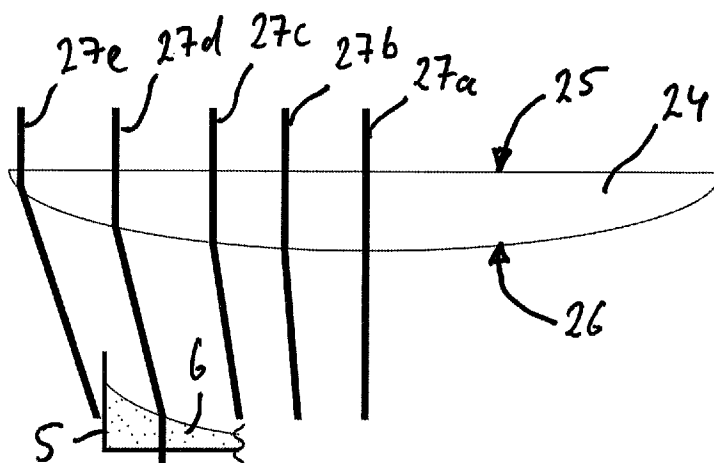


Fig. 6

2/2

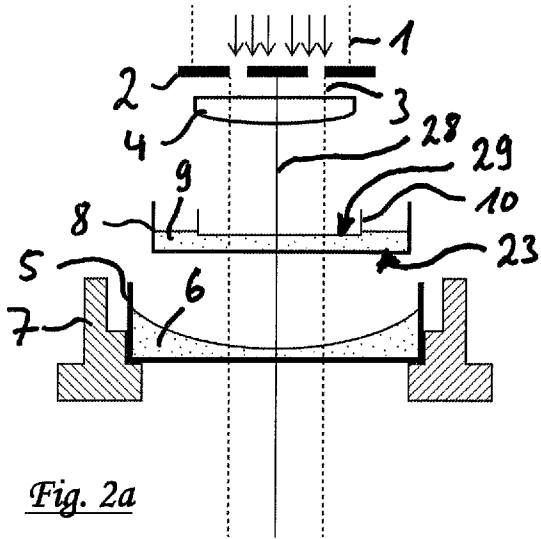


Fig. 2a

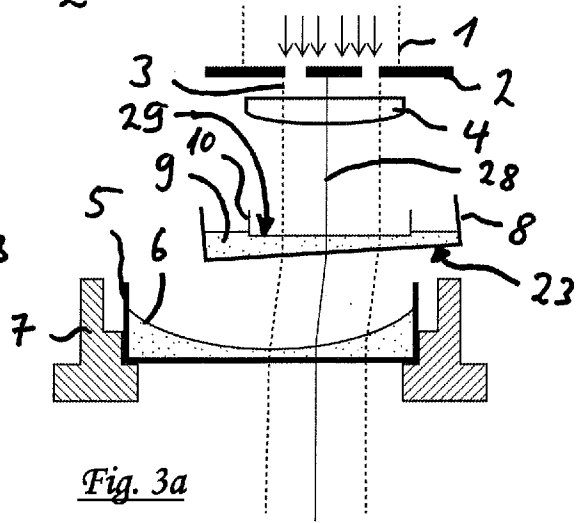


Fig. 3a

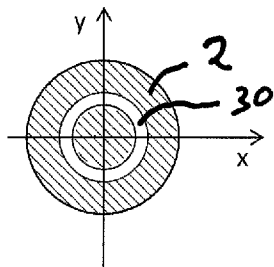


Fig. 2b

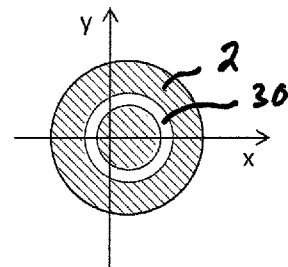


Fig. 3b

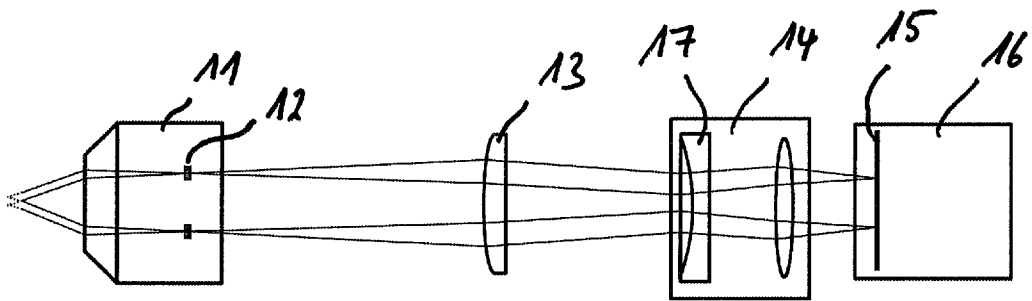


Fig. 4

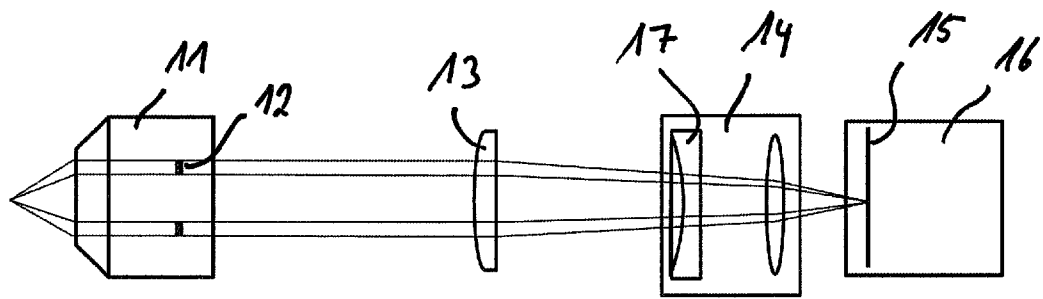


Fig. 5