



(12) **Patentschrift**

(21) Aktenzeichen: **10 2014 213 348.3**
(22) Anmeldetag: **09.07.2014**
(43) Offenlegungstag: **14.01.2016**
(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: **04.07.2024**

(51) Int Cl.: **G02B 21/24 (2006.01)**
G02B 21/32 (2006.01)
G02B 21/00 (2006.01)
G02B 21/34 (2006.01)
G02B 21/06 (2006.01)
G01N 35/00 (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)

Innerhalb von neun Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:
Carl Zeiss Microscopy GmbH, 07745 Jena, DE

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

(72) Erfinder:
**Schön, Peter, Dr., 99425 Weimar, DE; Steinmeyer,
Ralf, Dr., 30165 Hannover, DE; Sommer, Maik,
37136 Seeburg, DE; Becker, Klaus, 37339
Breitenworbis, DE**

(56) Ermittelter Stand der Technik:

DE	101 42 788	A1
DE	199 16 748	A1
US	2005 / 0 012 990	A1
US	2013 / 0 164 828	A1
US	2014 / 0 118 820	A1
JP	2004- 271 471	A

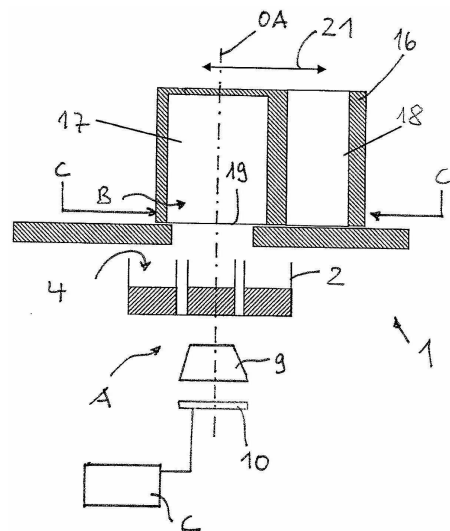
(54) Bezeichnung: **Durchlichtmikroskop und Verfahren zur Durchlichtmikroskopie**

(57) Hauptanspruch: Durchlichtmikroskop zur Abbildung von töpfchenförmigen, Flüssigkeit enthaltenden Probengefäßen (4), wobei das Durchlichtmikroskop (1) aufweist:

- einen Beleuchtungsstrahlengang (B) zur Beleuchtung des Probengefäßes (4) mit einem Beleuchtungsstrahlenbündel von oben längs einer optischen Achse (OA),
- einen Abbildungsstrahlengang (A) zur Abbildung des Probengefäßes (4) von unten längs der optischen Achse (OA) und
- einen Pipettierzugangskanal zum Einbringen eines Reagens in das Probengefäß (4), dadurch gekennzeichnet, dass das Durchlichtmikroskop weiter aufweist
- einen Block (16), der eine Durchgangsöffnung (19) für das Beleuchtungsstrahlenbündel und einen Durchgangskanal (18), aufweist, wobei der Durchgangskanal (18) zum Einführen einer Pipette ausgebildet ist und so den Pipettierzugangskanal bereitstellt und ein zum Probengefäß (4) hin liegendes Ende des Durchgangskanals (18) und die Durchgangsöffnung (19) in einer Ebene senkrecht zur optischen Achse (OA) nebeneinander liegen,
- eine Führung für den Block (16), welche für den Block (16) eine erste Position, in welcher der Durchgangskanal (18) zur optischen Achse (OA) ausgerichtet ist, und eine zweite Position, in welcher die Durchgangsöffnung zur optischen Achse (OA) ausgerichtet ist, und eine Bahn zwischen der ersten Position und der zweiten Position fest-

legt, wobei die Bahn eine einzige Bewegung festlegt, und

- einen Antrieb, der den Block (16) zwischen der ersten Position und der zweiten Position mit der einzigen Bewegung bewegt.



Beschreibung

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf ein Durchlichtmikroskop zur Abbildung von töpfchenförmigen, Flüssigkeit enthaltenden Probengefäßen, wobei das Durchlichtmikroskop aufweist: einen Beleuchtungsstrahlengang zur Beleuchtung des Probengefäßes mit einem Beleuchtungsstrahlenbündel von oben längs einer optischen Achse, einen Abbildungsstrahlengang zur Abbildung des Probengefäßes von unten längs der optischen Achse und einen Pipettierzugangskanal zum Einbringen eines Reagens in das Probengefäß.

[0002] Die Erfindung bezieht sich weiter auf ein Verfahren zur Durchlichtmikroskopie von töpfchenförmigen, Flüssigkeit enthaltenden Probengefäßen, wobei das Probengefäß mit einem Beleuchtungsstrahlenbündel von oben längs einer optischen Achse beleuchtet wird, das Probengefäß von unten längs der optischen Achse abgebildet wird und über einen Pipettierzugangskanal ein Reagens in das Probengefäß eingebracht wird.

[0003] In den Biowissenschaften spielt die Mikroskopie lebender Zellen eine wichtige Rolle. Diese werden üblicherweise in Gefäßen wie Mikrotiterplatten oder Petrischalen kultiviert. Die Zellen befinden sich am Gefäßboden und sind von einem Nährmedium umgeben. Mikroskopiert werden sie mit einem inversen Mikroskop, bei diesem befindet sich das Objektiv unterhalb des Probengefäßbodens. Die Beleuchtung der Probe kann über Auflicht oder Durchlicht erfolgen. Für Durchlichtbilder wird eine Leuchte oberhalb des Probengefäßes angebracht. Da aber biologische Zellen nur wenig absorbierende Bestandteile enthalten, sind Hellfeld-Durchlichtbilder typischerweise nur sehr schwach kontrastiert. Mit Hilfe diverser Durchlichtkontrastverfahren wie Phasenkontrast, DIC u. a. lässt sich zwar der geringe Brechzahlunterschied der einzelnen Zellbestandteile zueinander und zum umgebenden Medium in einen Intensitätsunterschied umwandeln, der dann ein kontrastiertes Durchlichtbild liefert, aber aus diesem kann häufig nur wenig über Funktionen oder Verteilungen bestimmter Stoffe innerhalb der Zelle ausgesagt werden. Die Fluoreszenzmikroskopie löst dieses Problem, indem bestimmte Substanzen (Fluorophore), über die die Zelle bereits verfügt oder die in sie eingebracht wurden, mithilfe einer Auflichtbeleuchtung angeregt werden, die dann wiederum ein Signal emittieren, welches vom Objektiv aufgefangen und zur Kamera oder den Okularen weitergeleitet wird. Weil dabei aber nur diejenigen Strukturen sichtbar sind, deren Fluorophore angeregt werden, können Informationen über die Größe und Form der einzelnen Zellen verloren gehen. Deshalb werden Auf- und Durchlicht häufig miteinander kombiniert, da sie komplementäre Informationen liefern.

[0004] Lebende Zellen sind keine statischen Objekte, sondern sie verändern sich permanent - sie leben. An ihnen lassen sich insbesondere die Wirkungen von Umwelteinflüssen auf lebende Organismen studieren. Zu diesen Einflüssen gehört auch die stoffliche Zusammensetzung des Nährmediums. Wird diese verändert, reagiert die Zelle darauf. Die Reaktionszeiten können im Bereich von Minuten und Stunden liegen, aber auch von Sekunden. Es kann somit von entscheidender Bedeutung sein, dass unmittelbar nach oder sogar während einer Veränderung der Zellumgebung die Beobachtung stattfindet. Die Umgebungsveränderung wird üblicherweise dadurch erreicht, dass die Substanz, deren Wirkung untersucht werden soll, zur Nährlösung hinzupipettiert wird. Da die Probengefäße nach oben offen sind, geschieht auch die Reagenzienzugabe von oben. Somit ist ein räumlicher Konflikt mit der Durchlichtbeleuchtung programmiert.

[0005] Es gibt eine Reihe von Möglichkeiten, diesen Konflikt zu lösen, die jeweils mit spezifischen Vor- und Nachteilen verbunden sind. Die US 2012 / 0 034 596 A1 beschreibt eine Vorrichtung, bei der das Probengefäß in einer Halterung von einem Bereich, in dem eine Reagenzienzugabe erfolgen kann, in einen anderen Bereich, wo sich die optischen Elemente zur Mikroskopie befinden, transportiert werden kann. Die Zugabe erfolgt dabei direkt von oben an einer beliebigen Stelle des Probengefäßes. Der Nachteil dieses Verfahrens ist, dass die Probe zwischen Zugabe und Beobachtung recht weit bewegt werden muss und Reaktionen der Zellen, die unmittelbar nach der Zugabe erfolgen, nicht erfasst werden können. Außerdem werden in der Regel Vergleichsbilder vor der Zugabe benötigt, d. h. zunächst muss eine für die Mikroskopie passende Stelle der Probe gefunden werden, danach fährt das Probengefäß zur Zugabeposition und anschließend wieder zurück. Das führt zu vielen Probenbewegungen, die für die Zellen auch Stress bedeuten und zu Reaktionen führen können, die nichts mit der eigentlichen Reagenzienzugabe zu tun haben.

[0006] Um eine Zugabe an der Beobachtungsposition zu realisieren, kann man auch die Pipette schräg von der Seite ansetzen. Das ist bei Probengefäßen mit großen Öffnungen wie z. B. Petrischalen möglich, führt jedoch bei Mikrotiterplatten mit z. B. 96 oder 384 Töpfchen, wie sie häufig verwendet werden, zu großen Schwierigkeiten, da die Pipette nicht steil genug platziert werden kann, um ein Eintauchen ins Nährmedium zu garantieren. Zwar ist es auch möglich, oberhalb des Mediums zu pipettieren, doch besteht dann das Risiko, dass an der Pipettenspitze ein Tropfen der zu pipettierenden Flüssigkeit zurückbleibt. Das führt zu einer Abweichung zwischen der gewünschten und der tatsächlichen Konzentration der pipettierten Flüssigkeit im Nährmedium. Insbesondere bei kleinen zu pipettierenden Volumina

kann der relative Fehler sehr hohe Werte annehmen oder sich die zu pipettierende Menge gar nicht von der Pipettenspitze lösen, was zu fehlerhaften Versuchsergebnissen führen kann.

[0007] Dem lässt sich begegnen, indem gebogene Pipettenspitzen verwendet werden, deren letztes Ende senkrecht in die Flüssigkeit eintauchen kann. Selbst in diesem Fall ist nur sehr wenig Manövriertplatz zwischen dem Probengefäß und der darüber liegenden Durchlichtbeleuchtung vorhanden. So kann es vorkommen, dass vor der Zugabe zunächst die Durchlichtbeleuchtung oder Teile davon (z. B. ein Kondensator) angehoben werden müssen, bevor die Pipettenspitze positioniert werden kann, um dann anschließend die Beleuchtung wieder abzusenken. Insbesondere bei der Verwendung von Mikrotiterplatten mit vielen Töpfchen gewinnt die Möglichkeit der Automatisierung an Bedeutung. Sie lässt sich auch im eben beschriebenen Fall realisieren, erfordert aber eine Vielzahl an Bewegungen, die sequenziell ausgeführt werden: Anheben der Beleuchtung, seitliches Einfahren der Pipettenspitze, Absenken der Pipettenspitze, Absenken der Beleuchtung. Jetzt ist zwar die gleichzeitige Zugabe und Durchlichtbeobachtung möglich, aber die seitlich im Bild stehende Spitze beeinträchtigt die Qualität der Durchlichtbilder. Es kann folglich notwendig sein, vor der Bildaufnahme die Pipette wieder aus dem Beleuchtungsstrahlengang zu entfernen.

[0008] Eine weitere Schwierigkeit bei gebogenen Pipettenspitzen besteht darin, dass bereits eine leichte Verdrehung dazu führt, dass das abgelenkte Endstück nicht mehr senkrecht nach unten zeigt, sondern schräg steht. Bei kleinen Töpfchen, wie sie z. B. bei Mikrotiterplatten mit 384 Töpfchen vorliegen, werden dann Kollisionen mit dem Töpfchenrand sehr wahrscheinlich. Will man vermeiden, geknickte Pipetten verwenden zu müssen, kann die Beleuchtungsoptik so weit angehoben werden, dass eine gerade Pipettenspitze zwischen Probe und Beleuchtung platziert werden kann und die Abknickung erst danach geschieht. Eine derartige Lösung wurde am Fraunhofer-Institut für Physikalische Messtechnik im CellCultivator realisiert. Hierbei sind aber Durchlichtbeleuchtung und Reagenzienzugabe nur sequenziell möglich und der Hub der Optik ist beträchtlich. Außerdem müssen nach wie vor verschiedene Bewegungen ausgeführt werden, für die jeweils ein eigenes Antriebssystem notwendig ist: Anheben der Beleuchtung, horizontales Positionieren der Zugabevorrichtung, Absenken der Pipettenspitze.

[0009] Die JP 2004-271 471 A und die US 2005/0012990 A1 beschreiben gattungsgemäße Durchlichtmikroskope. Die DE 199 16 748 A1 beschreibt eine Anordnung für ein inverses automatisiertes 1-Kanal Fluoreszenzmikroskop mit Autofokussystem und klimatisierter Probenkammer.

[0010] Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Durchlichtmikroskop und ein Verfahren zur Durchlichtmikroskopie anzugeben, so dass ein Reagens ohne die beschriebenen Nachteile in ein Probengefäß zugegeben werden kann.

[0011] Die Aufgabe wird gelöst mit der in den Ansprüchen 1 und 7 definierten Erfindung.

[0012] Es ist vorgesehen ein Durchlichtmikroskop zur Abbildung von töpfchenförmigen, Flüssigkeit enthaltenden Probengefäßen, wobei das Durchlichtmikroskop aufweist:

- einen Beleuchtungsstrahlengang zur Beleuchtung des Probengefäßes mit einem Beleuchtungsstrahlenbündel von oben längs einer optischen Achse,
- einen Abbildungsstrahlengang zur Abbildung des Probengefäßes von unten längs der optischen Achse und
- einen Pipettierzugangskanal zum Einbringen eines Reagens in das Probengefäß, wobei das Durchlichtmikroskop weiter aufweist
- einen Block, der eine Durchgangsöffnung für das Beleuchtungsstrahlenbündel und einen Durchgangskanal, durch die der Pipettierzugangskanal läuft, aufweist, wobei der Durchgangskanal und die Durchgangsöffnung in einer Ebene senkrecht zur optischen Achse nebeneinander liegen,
- eine Führung für den Block, welche für den Block eine erste Position, in welcher der Durchgangskanal zur optischen Achse ausgerichtet ist, und eine zweite Position, in welcher die Durchgangsöffnung zur optischen Achse ausgerichtet ist, und eine Bahn zwischen der ersten Position und der zweiten Position festlegt, wobei die Bahn eine einzige Bewegung festlegt, und
- einen Antrieb, der den Block zwischen der ersten Position und der zweiten Position mit der einzigen Bewegung bewegt.

[0013] Es ist auch vorgesehen ein Verfahren zur Durchlichtmikroskopie von töpfchenförmigen, Flüssigkeit enthaltenden Probengefäßen, wobei

- das Probengefäß mit einem Beleuchtungsstrahlenbündel von oben längs einer optischen Achse beleuchtet wird,
- das Probengefäß von unten längs der optischen Achse abgebildet wird und
- über einen Pipettierzugangskanal ein Reagens in das Probengefäß eingebracht wird, wobei
- ein Block verwendet wird, der eine Durchgangsöffnung für das Beleuchtungsstrahlenbündel und einen Durchgangskanal, durch die

der Pipettierzugangskanal läuft, aufweist, wobei der Durchgangskanal und die Durchgangsöffnung in einer Ebene senkrecht zur optischen Achse nebeneinander liegen,

- der Block zwischen einer ersten Position, in welcher der Durchgangskanal zur optischen Achse ausgerichtet ist, und einer zweiten Position, in welcher die Durchgangsöffnung zur optischen Achse ausgerichtet ist, mit einer einzigen Bewegung festlegt bewegt wird.

[0014] Die Durchlichtbeleuchtung und die Reagenzienzugabe werden sequenziell ausgeführt, wobei die Durchlichtbeleuchtung und der Zugabekanal durch eine einzige Bewegung auf die optische Achse geschaltet werden.

[0015] Das kann z. B. durch ein Drehen des Blocks geschehen, der in mindestens zwei Positionen gedreht werden kann, wobei in der einen Position sich die Durchlichtbeleuchtung über der Probe befindet, und in einer anderen Position ein freier Kanal für die Reagenzienzugabe zur Verfügung steht. In diesen Pipettierzugang kann dann entweder manuell oder über einen Roboter eine Pipette eingeführt werden.

[0016] Optional kann die Pipettiereinrichtung bereits im Gerät vorgehalten werden. Hierbei spielt es prinzipiell keine Rolle, wie die Durchlichtbeleuchtung ausgeführt ist: ob als Punktquelle mit oder ohne zusätzliche Optik, oder ob als Flächenlicht mit oder ohne zusätzliche Optik. Es ist jedoch vorteilhaft, wenn große Massen weit entfernt von der Drehachse vermieden werden. Daher ist eine Durchlichtbeleuchtung ohne Umlenkspiegel vorzuziehen. Eine solche Beleuchtung kann länger ausfallen als handelsübliche Pipetten. Das führt zu Konflikten, wenn sowohl die Durchlichtbeleuchtung als auch der Pipettierzugang ein gemeinsames Gehäuse erhalten sollen, da in diesem Fall die Pipettenspitze nicht mehr die Probe erreicht.

[0017] Die beiden Positionen (Durchlichtbeleuchtung, Pipettierzugang) können durch laterales Verschieben des Blocks eingestellt werden. Auch in diesem Fall ist nur eine Bewegung nötig, um vom Durchlicht zur Pipettierung umzuschalten. Gleichzeitig kann in diesem Fall der Beleuchtungsstrahlengang problemlos mittels eines Umlenkspiegels abgelenkt werden, so dass ein gemeinsames Gehäuse für das Durchlicht und den Zugabekanal vorgesehen werden kann.

[0018] Bei der Reagenzienzugabe ist es wichtig, dass die Zugabe in der richtigen Höhe erfolgt. Wird zu weit oben pipettiert, taucht die Pipettenspitze nicht in die Nährlüssigkeit ein und Teilmengen oder die gesamte zu pipettierende Substanz können an der Spitze verbleiben. Wird zu weit unten pipettiert,

kann die Pipettenspitze auf den Probengefäßboden aufstoßen und an dieser Stelle die Probe zerstören. Es erfordert eine hohe Geschicklichkeit, im freien Raum zu pipettieren und die Pipette ruhig zu halten. Deshalb ist ein Anschlag, auf den ein Teil der Pipette oder der Pipettenspitze aufgesetzt werden kann, von Vorteil. Hierzu bietet sich zum Beispiel ein ohnehin vorhandener Kragen der Pipettenspitze an. Die Höhe dieses Anschlags oberhalb der Pipettierposition kann entweder fest eingestellt sein oder variabel gewählt werden, um den Zugabekanal an die verwendete Pipette bzw. Pipettenspitze sowie an die Höhe der Probenebene anzupassen. Diese Höhe kann um mehrere Millimeter variieren. Mikrotiterplatten z. B. können dünne Folienböden oder 1 mm dicke Polystyrolböden aufweisen. Außerdem liegen sie üblicherweise nicht auf diesem Boden auf, sondern verfügen über einen umlaufenden abgesetzten Rand, der unterhalb der einzelnen Töpfchen einen Luftraum von mehreren Millimetern schafft. Dieser Wert schwankt jedoch von Hersteller zu Hersteller und ist auch nur durch eine Mindestangabe standardisiert. Auch dieser Standard wird gerade bei den für die Mikroskopie genutzten Mikroplatten häufig unterschritten, um die Nutzung von Objektiven mit hoher numerischer Apertur und dadurch bedingt großem Durchmesser zu ermöglichen. Entsprechend befindet sich die Probenebene in unterschiedlichen Höhen relativ zur Probenhalterung und damit auch zum Pipettierzugang.

[0019] Ein mögliches Verfahren auf diese Variabilität zu reagieren, sieht folgendermaßen aus: Der Pipettieranschlag oder die gesamte Zuführeinheit wird höhenverstellbar ausgeführt. Vor Beginn der Zugabe erfragt ein Programm die verwendete Pipettenspitze und sucht aus einer Liste die entsprechende Länge vom Kragende bis zur Spitze. Als nächstes wird das Objektiv so entlang der optischen Achse verfahren, dass die Probe in der Fokusebene liegt. Aus der Position des Objektivs errechnet das Programm die Höhe der Probenebene. (Bei Fokussiervorrichtungen, die nicht das Objektiv, sondern die Probenhalterung bewegen, entfällt dieser Schritt, da sich die Probenebene in diesem Fall nicht in der Höhe ändert.) Gegebenenfalls erfragt das Programm auch die gewünschte Höhe der Zugabe oberhalb der Probenebene, sofern dafür kein Wert voreingestellt wird. Aus diesen Informationen wird die passende Höhe des Pipettenanschlags errechnet und entsprechend eingestellt. Die Höheneinstellung des Pipettenanschlags kann auch auf die Durchlichtbeleuchtung ausgedehnt werden, so dass beide über ein einziges System simultan bewegt werden. Dadurch wird erreicht, dass der Fokus der Durchlichtbeleuchtung ebenfalls immer passend zur Fokusebene steht.

[0020] Es versteht sich, dass die vorstehend genannten und die nachstehend noch zu erläuternden Merkmale nicht nur in den angegebenen Kombi-

nationen, sondern auch in anderen Kombinationen oder in Alleinstellung einsetzbar sind, ohne den Rahmen der vorliegenden Erfindung zu verlassen.

[0021] Nachfolgend wird die Erfindung beispielsweise anhand der beigefügten Zeichnungen, die auch erfindungswesentliche Merkmale offenbaren, noch näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1a-c eine Schemadarstellung einer ersten Bauweise eines Durchlichtmikroskops,

Fig. 2 eine Schemadarstellung einer zweiten Bauweise eines Durchlichtmikroskops,

Fig. 3 eine Schemadarstellung einer dritten Bauweise eines Durchlichtmikroskops,

Fig. 4 eine Schemadarstellung einer Ausführungsform eines Durchlichtmikroskops,

Fig. 5 eine Weiterbildung des Durchlichtmikroskops der **Fig. 1a-c**,

Fig. 6 eine Ansicht eines Elementes des Mikroskops der **Fig. 4**,

Fig. 7 eine Weiterbildung des Mikroskops der **Fig. 4**,

Fig. 8 eine Darstellung eines Pipettenanschlages beim Mikroskop der **Fig. 4** und

Fig. 9 ein Blockschaltbild für ein Verfahren zur Durchlichtmikroskopie.

[0022] Die **Fig. 1a-c** zeigen drei unterschiedliche Bauweisen eines Durchlichtmikroskops 1, das zum Mikroskopieren einer Mikrotiterplatte 2 im Durchlicht ausgebildet ist. Das Mikroskop 1 bildet einzelne Töpfchen 4 der Mikrotiterplatte 2 im Durchlicht längs einer optischen Achse OA mit einem Abbildungsstrahlengang A ab. Zur Durchlichtbeleuchtung ist eine Ringlichtquelle 3 vorgesehen, welche das zu mikroskopierende Töpfchen 4 der Mikrotiterplatte 2 von oben beleuchtet. Die Ringlichtquelle 3 ist Teil eines Beleuchtungsstrahlenganges B und strahlt Strahlung dabei auf das Töpfchen 4 ab. Der Lichtkegel, mit dem der Boden des Töpfchens 4 beleuchtet werden kann, ist mit 5 bezeichnet. Mittels einer Pipettenspitze 6 wird ein Reagens in eine Flüssigkeit 8 eingetropft, die sich im Töpfchen 4 befindet. Die Pipettenspitze 6 wird durch einen Pipettierzugangskanal geführt, der im wesentlichen von einer Öffnung 7 in der Ringlichtquelle 3 gebildet ist, die auf der optischen Achse OA liegt. Dadurch kann die Pipettenspitze längs der optischen Achse OA eingeführt und das Reagens zugegeben werden, während gleichzeitig ein Objektiv 9 mit Kamera 10 in einem Abbildungsstrahlengang das Töpfchen 4 und z. B. dort einen Boden des Töpfchens vergrößert abbildet.

[0023] Die **Fig. 1b** und **1c** zeigen eine optionale Weiterbildung des Mikroskops 1 der **Fig. 1a** dahingehend, dass das Ringlicht 3 höhenverstellt werden

kann. Dadurch ändert sich der Winkel der einfallenden Strahlung. Je nach Höhe des Ringlichtes gelangt ein unterschiedlicher Teil der Strahlung in den Lichtkegel 5. Eine Situation wie in **Fig. 1b**, dass der durch die Öffnung 7 bedingte Bereich so groß ist, dass aufgrund des Aspektverhältnisses eines Töpfchens 4 kein Licht den Boden des Töpfchens erreicht, wird vermieden. Durch ein Verschieben der Ringlichtquelle 3 längs der optischen Achse OA kann sichergestellt werden, dass das Licht den Boden des Töpfchens und damit die Probe erreicht.

[0024] **Fig. 2** zeigt eine Weiterbildung des Mikroskops der **Fig. 1a**, wobei Elemente des Abbildungsstrahlengangs A der Übersichtlichkeit halber nicht eingezeichnet sind. Im Beleuchtungsstrahlengang B ist zwischen der Ringlichtquelle 3 und der Mikrotiterplatte 2 ein Kondensator 11 angeordnet, der eine Bohrung 12 passend zur Öffnung 7 hat. Somit bilden die Öffnung 7 und die Bohrung 12 den Pipettierzugangskanal, durch den eine Pipettenspitze 6 geschoben werden kann. Gleichzeitig vergrößert der Kondensator 11 die Ausleuchtung des zu mikroskopierenden Töpfchens 4.

[0025] **Fig. 3** zeigt eine Abwandlung des Mikroskops 1 der **Fig. 2**, bei der der Beleuchtungsstrahlengang B statt einer Ringlichtquelle 3 eine herkömmliche Lichtquelle 13 mit nachgeordneter Optik 14 aufweist, die einen Umlenkspiegel 15 beleuchtet, welcher die Beleuchtungsstrahlung längs der optischen Achse OA einkoppelt. Der beleuchtete Umlenkspiegel 15 übernimmt damit die Funktion der Ringlichtquelle 3, da er wie diese eine Öffnung 7 zum Freigeben des Pipettierzugangskanals hat.

[0026] Natürlich kann der Umlenkspiegel 15 als Ersatz für die Ringlichtquelle 3 auch für die Bauweise gemäß **Fig. 1a-c** zum Einsatz kommen.

[0027] Wesentlich ist es lediglich, dass das leuchtende Element (beispielsweise die Ringlichtquelle 3 oder der Umlenkspiegel 15) die Öffnung 7 für den Pipettierzugangskanal aufweist.

[0028] **Fig. 4** zeigt eine Ausführungsform eines erfindungsgemäßen Durchlichtmikroskops 1. Das Mikroskop 1 der **Fig. 4** ist ebenfalls zum Mikroskopieren einer Mikrotiterplatte 2 ausgebildet. Elemente, die denen der Mikroskope der **Fig. 1a-c**, 2 oder 3 entsprechen, sind in **Fig. 4** mit denselben Bezugszeichen versehen.

[0029] Im Mikroskop 1 der **Fig. 4** erfolgt die Zugabe des Reagens und die Mikroskopie der Probe zeitlich nacheinander. Dazu weist das Mikroskop 1 einen Block 16 auf, der eine Kammer 17 zur Aufnahme der Elemente des Beleuchtungsstrahlengangs B und einen Durchgangskanal 18 aufweist.

[0030] Die Kammer 17 hat an ihrem unteren Ende eine Durchgangsöffnung 19, durch die Beleuchtungsstrahlung auf das zu mikroskopierende Töpfchen 4 der Mikrotiterplatte 2 längs der optischen Achse OA abgegeben werden kann. In der Kammer 17 befindet sich beispielsweise eine Lichtquelle für die Abgabe der Beleuchtungsstrahlung und eine entsprechende Optik zum Konditionieren der Beleuchtungsstrahlung (der Einfachheit halber in **Fig. 4** nicht eingezeichnet).

[0031] **Fig. 5** zeigt schematisch einen Schnitt durch den Block 16 entlang der Linie C-C. Wie zu sehen ist, kann der Block 16 um eine Drehachse 20 rotiert werden. Dies ist die Bewegung längs des Pfeiles 21. Die Drehbewegung längs des Pfeiles 21 ist eine einzige Bewegung, die den Block 16 zwischen zwei Endpositionen bewegt. **Fig. 5** zeigt die erste dieser beiden Endpositionen, die so liegt, dass die Kammer 17 mit den Elementen des Beleuchtungsstrahlengangs B zur optischen Achse OA ausgerichtet ist. Die Darstellung der **Fig. 5** zeigt für die optische Achse OA verständlicherweise nur den Durchtrittspunkt.

[0032] Die Rotation, d. h. die einzige Bewegung längs des Pfeiles 21, kann alternativ den Durchgangskanal 18 über die Mikrotiterplatte 2 und das dort zu mikroskopierende Töpfchen 4 schwenken. Dann wird die zweite der zwei Endpositionen erreicht, bei der der Durchgangskanal 18 auf der optischen Achse OA liegt und das Reagens in das Töpfchen 4 der Mikrotiterplatte 2 eingebracht werden kann.

[0033] Natürlich kann der Block 16 auch abgewandelt werden. So kann beispielsweise statt der oben geschlossenen Kammer 17, in der die Elemente des Beleuchtungsstrahlengangs aufgenommen sind, auch ein Beleuchtungskanal im Block 16 vorgesehen und Elemente des Beleuchtungsstrahlengangs über dem Block angeordnet werden, wenn am Block 16 über der Durchgangsöffnung 19 ein entsprechender Umlenkspiegel vorgesehen ist, der nur dann Strahlung empfängt, wenn der Block 16 in die in **Fig. 4** bzw. 5 gezeigte Stellung bewegt ist.

[0034] Eine weitere Abwandlung besteht darin, dass die einzige Bewegung keine Drehbewegung, sondern eine Linearbewegung ist. Der Block 16 wird dann zwischen den beiden Endpositionen verschoben.

[0035] Die **Fig. 6** und **7** zeigen Abwandlungen der Mikroskope der **Fig. 1a-c** bzw. **4**. Sie umfassen eine Inkubationskammer 22, wie sie beispielsweise aus der DE 102005033927 A1 für ein Mikrotiterplatten auslesendes Mikroskop bekannt ist. Die Inkubationskammer 22 hat einen Tisch 23, auf dem die Mikrotiterplatte 2 längs des Pfeils 24 verschoben werden kann. Sie ist mit einem Deckel 25 abgedeckt und

durch eine seitliche Probenhalterung 28 seitlich abgeschlossen. Das Bewegen der Mikrotiterplatte 2 erfolgt entweder durch den Tisch 23 in der Inkubationskammer oder alternativ durch Bewegen der seitlichen Aufnahmen 28. Der Vorteil der letzten Lösung liegt darin, dass der inkubierte Raum sehr klein gehalten werden kann und somit nur geringe Gasvolumina und kurze Aufheizzeiten vonnöten sind.

[0036] Der Vorteil beider Bauweisen liegt darin, dass die komplette Durchlichtbeleuchtung außerhalb des inkubierten Raums liegt. Hier besteht ein Unterschied zur DE 102005033927 A1. Dadurch können z. B. sämtliche elektrische Elemente außerhalb des Bereiches erhöhter Temperatur und Luftfeuchte der Inkubationskammer 22 erhalten werden.

[0037] Die Inkubationskammer 22 kann entweder mit dem ringförmigen leuchtenden Element, z. B. der Ringlichtquelle gemäß **Fig. 1a-c** verwendet werden oder auch mit dem Mikroskop gemäß **Fig. 4**, d. h. einer zeitlichen Abfolge von Pipettierung und mikroskopischer Abbildung.

[0038] Bei der Bauweise der **Fig. 1a-c** ist es vorteilhaft, dass der Deckel 25 Teil des Mikroskopes ist und einen transparenten Teil 25a aufweist, der in einer Pipettierdüse 26 endet, welche längs der optischen Achse OA durch die Öffnung 7 der Ringlichtquelle (bzw. des Umlenkspiegels 15) läuft und das Einführen der Pipettierspitze erleichtert. Der Deckel 25 kann zum weiteren Abschließen des inkubierten Raums auch bei der Bauweise der **Fig. 7** verwendet werden (dort ist er natürlich optional). Er weist dann ein Loch 29 auf, durch das das Reagens eingegeben werden kann, wenn der Block 16 in der zweiten Endposition ist, in welcher der Durchgangskanal 18 zur optischen Achse OA ausgerichtet ist.

[0039] **Fig. 8** zeigt eine optionale Weiterbildung in Form einer Pipettenhalterung 33, die entweder bei der Bauweise der **Fig. 1a-c**, **2** und **3** oder auch bei der Bauweise der **Fig. 4**, **5** und **7** zur Anwendung kommen kann. Bei der letztgenannten Variante liegt die Halterung 33 im Durchgangskanal 18, bei der erstgenannten Bauweise in der Öffnung 7. **Fig. 8** verdeutlicht das durch das Bezugszeichen 7/18. Die Halterung 33 weist eine Aufnahme 35 auf, die sich an ihrem unteren Ende in einen Kragen 30 verjüngt. Der Kragen 30 dient als Anschlag 36 für eine an der Pipettenspitze 6 vorgesehene Schulter 32. Die Halterung 33 definiert damit die exakte Lage der Pipettenspitze 6, wenn eine Pipette 6 in die Aufnahme 35 eingeschoben wird.

[0040] Wie ein Pfeil 34 verdeutlicht, kann die Halterung 33 längs der optischen Achse OA verstellt werden, um die bereits im allgemeinen Teil der Beschreibung erwähnte Anpassung an unterschiedliche Pipettenspitzenlängen vorzunehmen und sicherzu-

stellen, dass das untere Ende 37 der Pipettenspitze 6 unterhalb eines Flüssigkeitsniveaus 38 der Flüssigkeit 8 im Töpfchen 4 der Mikrotiterplatte 2 liegt.

[0041] Die Erfindung bezieht sich gleichermaßen auf ein Durchlichtmikroskop wie ein Verfahren zur Durchlichtmikroskopie. Die entsprechenden Verfahrensschritte werden gegebenenfalls unter Zuhilfenahme eines Steuergerätes C durchgeführt, das exemplarisch für das Mikroskop der **Fig. 4** eingezeichnet ist, jedoch gleichermaßen für die anderen Ausführungsformen des Mikroskops vorgesehen werden kann.

[0042] Die Bewegung des Blockes 16 erfolgt längs des Pfeils 21, welcher die Bewegungsbahn symbolisiert, unter Steuerung des Steuergerätes C, wobei der Block 16 von einem (nicht dargestellten) Antrieb betätigt wird.

[0043] **Fig. 9** zeigt schematisch ein Blockschaltbild für ein Verfahren zur Durchlichtmikroskopie, wobei die Halterung 33 zur Anwendung kommt.

[0044] In einem Schritt S1 wird zuerst geprüft, welche Pipettenspitze 6 verwendet wird. Unter Kenntnis dieser Information wird der Abstand zwischen der Schulter 23 und dem unteren Ende 27 der Pipettenspitze 6 ermittelt. Dies erfolgt in einem Schritt S2.

[0045] In einem Schritt S3 wird geprüft, ob die gewünschte Probenebene im Fokus des Objektivs 6 liegt. Ist dies der Fall („+“-Verzweigung), wird mit Schritt S5 weitergefahren. Ist dies nicht der Fall („-“-Verzweigung), wird in einem Schritt S4 zuerst das Objektiv in den Fokus gefahren.

[0046] Im Schritt S5 wird die Fokusposition eingelesen und die Höhe der Probe ermittelt. Aus dieser Probenhöhe ist automatisch aufgrund der weiter bekannten Art der Probe die Höhe des Flüssigkeitsniveaus 38 bekannt. Nun wird unter Kenntnis des Abstandes zwischen unterem Ende 37 und Schulter 32 sowie Flüssigkeitsniveau 38 die Soll-Höhe für den Kragen 30 und damit die Halterung 33 berechnet (S6). Alternativ kann auch eine vom Nutzer vorgegebene Höhe der Pipettenspitze oberhalb der Probenebene als Parameter verwendet werden. Dann ist die Höhe der Flüssigkeit nicht mehr relevant.

[0047] Anschließend wird in einem Schritt S7 die Halterung 33 in Richtung des Pfeils 34, d. h. längs der optischen Achse OA so verstellt, dass eine in die Halterung 33 eingesetzte Pipette 31 mit der Pipettenspitze 6, deren Werte in den Schritten S1 und S2 ermittelt wurden, bezüglich dem Flüssigkeitsniveau 38 so liegt, dass das untere Ende 37 der Pipettenspitze 6 präzise in die Flüssigkeit 8 eintaucht. Natürlich kann Schritt S7 auch teilmanuell erfolgen. Man gibt dann dem Nutzer eine Information, auf welcher

Höhe er den Anschlag stellen muss, um die gewünschte Pipettierhöhe oberhalb der Probenebenen zu erreichen.

Patentansprüche

1. Durchlichtmikroskop zur Abbildung von töpfchenförmigen, Flüssigkeit enthaltenden Probengefäßen (4), wobei das Durchlichtmikroskop (1) aufweist:

- einen Beleuchtungsstrahlengang (B) zur Beleuchtung des Probengefäßes (4) mit einem Beleuchtungsstrahlenbündel von oben längs einer optischen Achse (OA),

- einen Abbildungsstrahlengang (A) zur Abbildung des Probengefäßes (4) von unten längs der optischen Achse (OA) und

- einen Pipettierzugangskanal zum Einbringen eines Reagens in das Probengefäß (4), **dadurch gekennzeichnet**, dass das Durchlichtmikroskop weiter aufweist

- einen Block (16), der eine Durchgangsöffnung (19) für das Beleuchtungsstrahlenbündel und einen Durchgangskanal (18), aufweist, wobei der Durchgangskanal (18) zum Einführen einer Pipette ausgebildet ist und so den Pipettierzugangskanal bereitstellt und ein zum Probengefäß (4) hin liegendes Ende des Durchgangskanals (18) und die Durchgangsöffnung (19) in einer Ebene senkrecht zur optischen Achse (OA) nebeneinander liegen,

- eine Führung für den Block (16), welche für den Block (16) eine erste Position, in welcher der Durchgangskanal (18) zur optischen Achse (OA) ausgerichtet ist, und eine zweite Position, in welcher die Durchgangsöffnung zur optischen Achse (OA) ausgerichtet ist, und eine Bahn zwischen der ersten Position und der zweiten Position festlegt, wobei die Bahn eine einzige Bewegung festlegt, und

- einen Antrieb, der den Block (16) zwischen der ersten Position und der zweiten Position mit der einzigen Bewegung bewegt.

2. Durchlichtmikroskop nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die einzige Bewegung eine Drehbewegung ist, bevorzugt eine Drehbewegung in einer Ebene, die senkrecht zur optischen Achse (OA) steht.

3. Durchlichtmikroskop nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die einzige Bewegung eine lineare Bewegung entlang genau einer Achse ist, bevorzugt entlang genau einer Achse, die senkrecht zur optischen Achse (OA) steht.

4. Durchlichtmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Durchgangskanal (18) einen ringförmigen Kragen (30) aufweist, der als Anschlag (36) für eine Pipettenspitze (6) ausgebildet ist.

5. Durchlichtmikroskop nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Anschlag (36) längs der optischen Achse (OA) verschieblich ist.

6. Durchlichtmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein transparenter Deckel (25a) über dem Probengefäß (4) vorgesehen ist, der auf der optischen Achse (OA) ein Loch zum Durchleiten des Reagens hat.

7. Verfahren zur Durchlichtmikroskopie von töpfchenförmigen, Flüssigkeit enthaltenden Probengefäßen (4), wobei

- das Probengefäß (4) mit einem Beleuchtungsstrahlenbündel von oben längs einer optischen Achse (OA) beleuchtet wird,
- das Probengefäß von unten längs der optischen Achse (OA) abgebildet wird und
- über einen Pipettierzugangskanal ein Reagens in das Probengefäß (4) eingebracht wird, **dadurch gekennzeichnet**, dass
- ein Block (16) verwendet wird, der eine Durchgangsöffnung (19) für das Beleuchtungsstrahlenbündel und einen Durchgangskanal (18) aufweist, wobei der Durchgangskanal (18) zum Einführen einer Pipette ausgebildet ist und so den Pipettierzugangskanal bereitstellt und ein zum Probengefäß (4) hin liegendes Ende des Durchgangskanals (18) und die Durchgangsöffnung (19) in einer Ebene senkrecht zur optischen Achse (OA) nebeneinander liegen, und
- der Block (16) zwischen einer ersten Position, in welcher der Durchgangskanal (18) zur optischen Achse (OA) ausgerichtet ist, und einer zweiten Position, in welcher die Durchgangsöffnung (19) zur optischen Achse (OA) ausgerichtet ist, mit einer einzigen Bewegung festlegt bewegt wird.

8. Verfahren nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass die einzige Bewegung eine Drehbewegung ist, bevorzugt eine Drehbewegung in einer Ebene, die senkrecht zur optischen Achse (OA) steht.

9. Verfahren nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass die einzige Bewegung eine lineare Bewegung entlang genau einer Achse ist, bevorzugt entlang genau einer Achse, die senkrecht zur optischen Achse (OA) steht.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Durchgangskanal (18) einen ringförmigen Kragen (30) aufweist, der als Anschlag (36) für eine Pipettenspitze (6) ausgebildet ist.

11. Verfahren nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Anschlag (36) längs der optischen Achse (OA) verschieblich ist.

12. Verfahren nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet**, dass aus einer Angabe über die verwendete Pipettenspitze (6) ein Abstand zwischen einem unterem Ende (37) der Pipettenspitze (6) und einem Boden, einem Rand oder einem Flüssigkeitsniveau (38) des Probengefäßes (4) ermittelt wird und der Anschlag (36) so eingestellt wird, dass das untere Ende (37) der Pipettenspitze (6) in vorbestimmter Lage zum Flüssigkeitsniveau (38) liegt, bevorzugt unter dem Flüssigkeitsniveau (38) liegt.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein transparenter Deckel (25a) über dem Probengefäß (4) vorgesehen wird, der auf der optischen Achse (OA) ein Loch zum Durchleiten des Reagens hat.

Es folgen 6 Seiten Zeichnungen

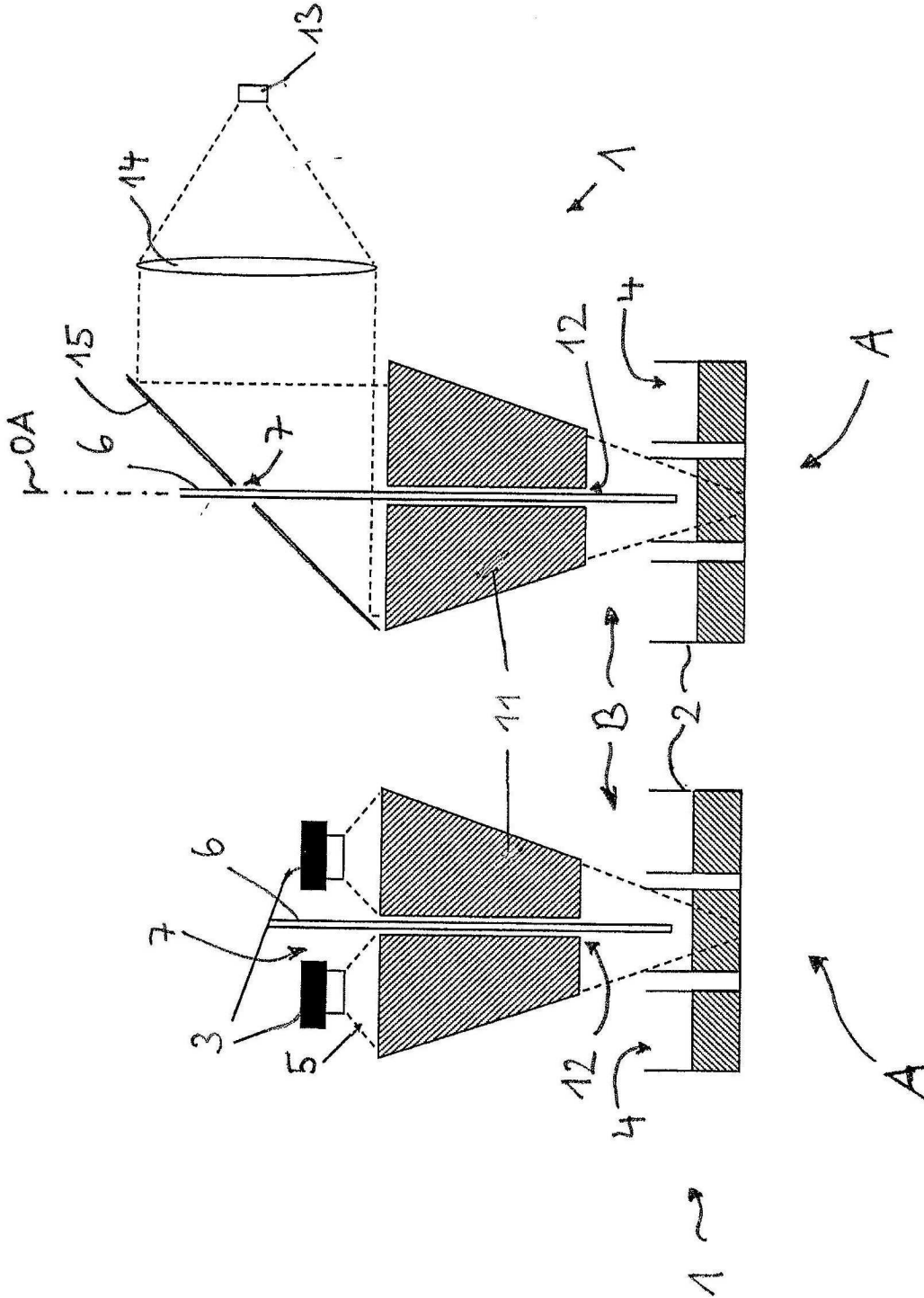


Fig. 3

Fig. 2

Fig. 4

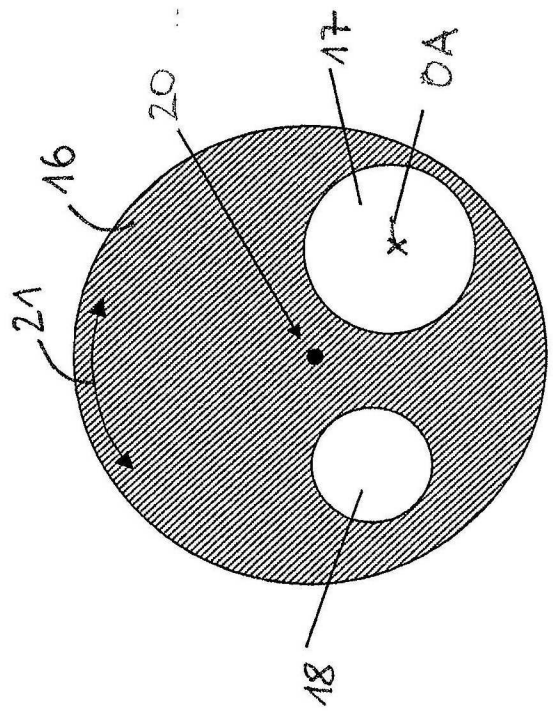
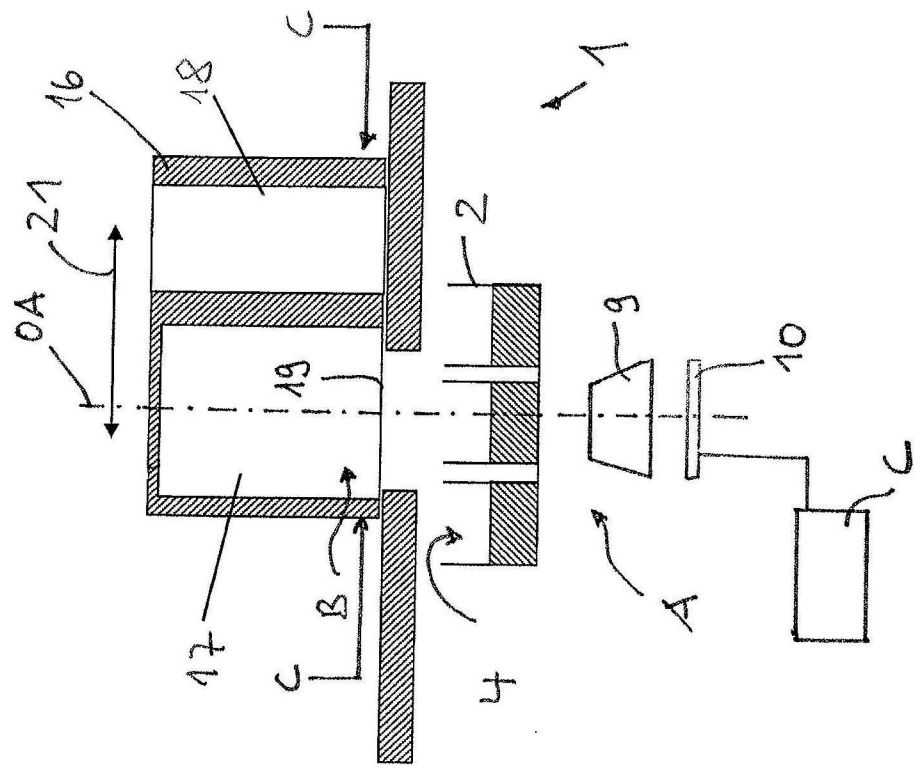
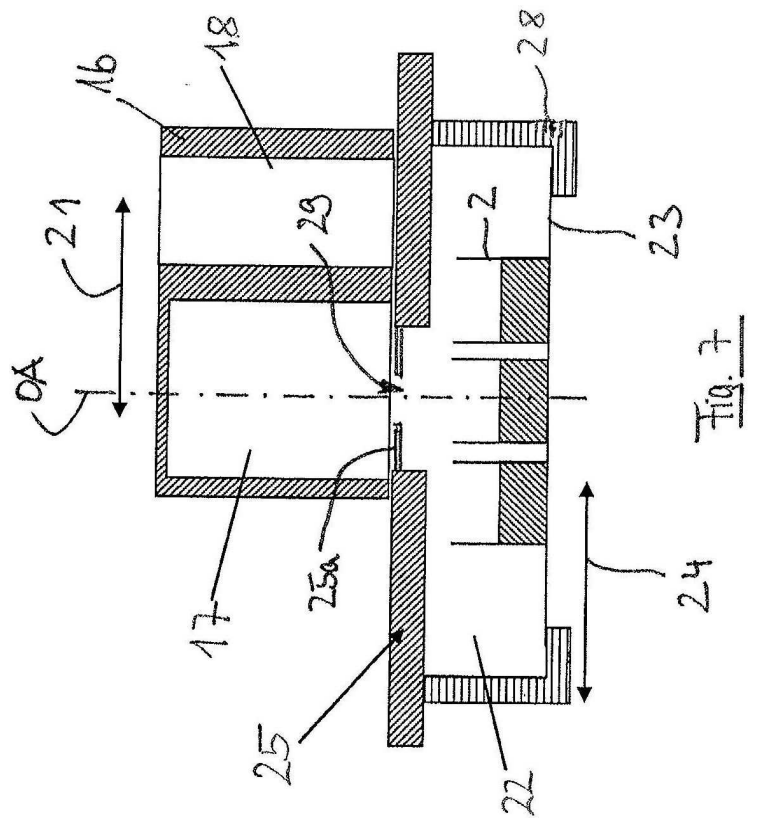
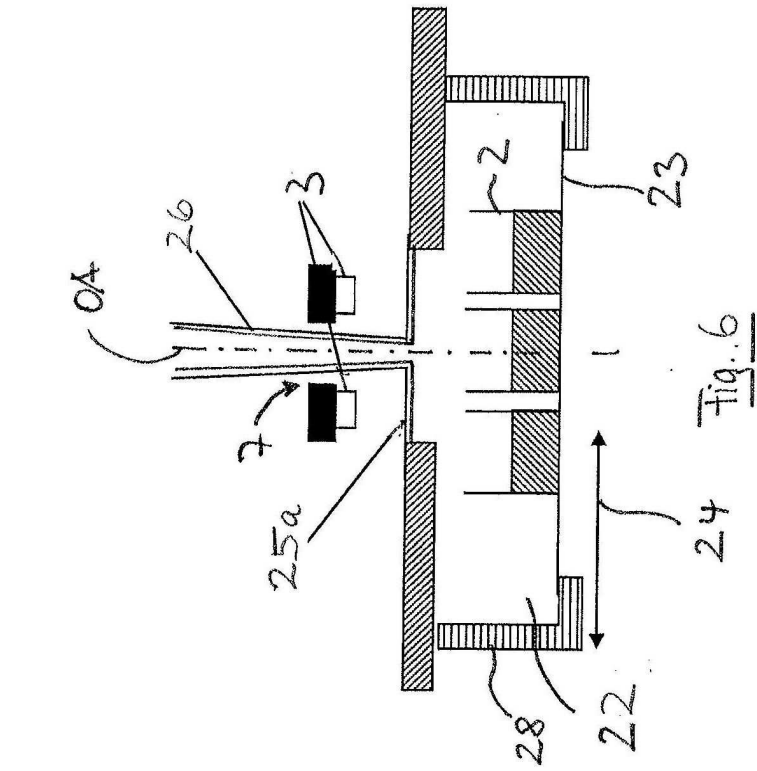


Fig. 5



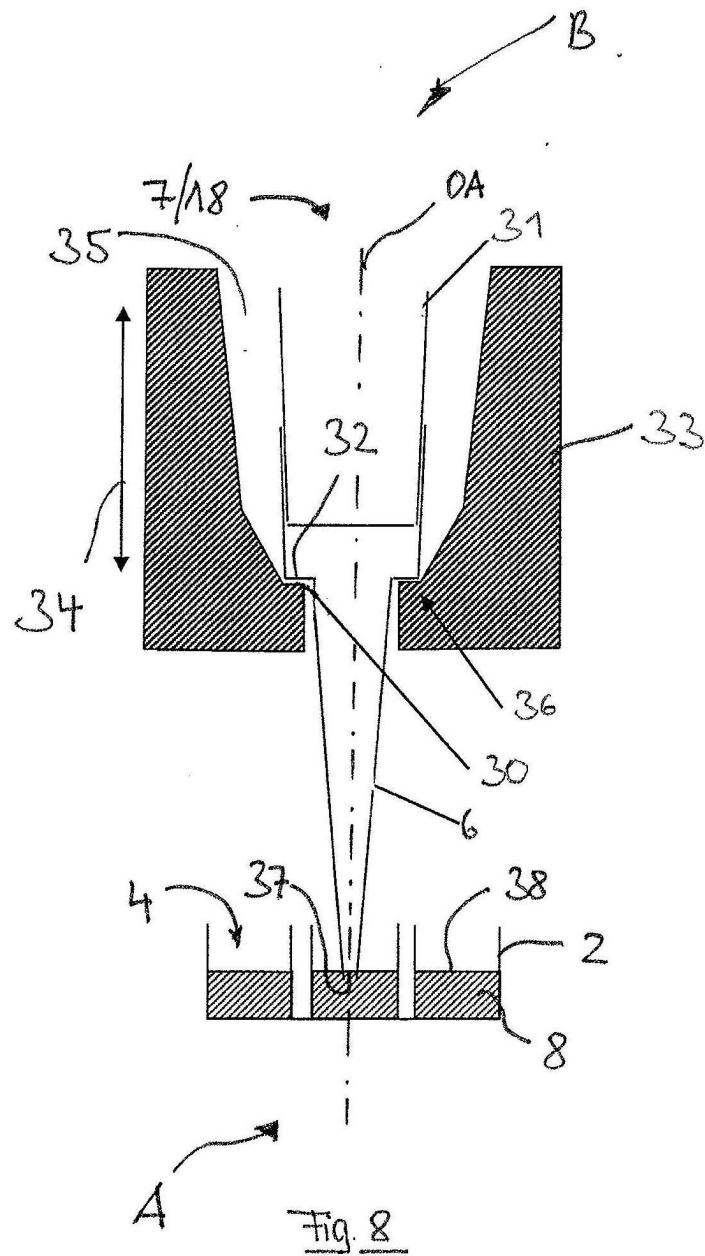


Fig. 9

