



(19)
 Bundesrepublik Deutschland
 Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2004 034 970 A1** 2006.02.02

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2004 034 970.3**

(22) Anmeldetag: **16.07.2004**

(43) Offenlegungstag: **02.02.2006**

(51) Int Cl.⁸: **G02B 21/00** (2006.01)

(71) Anmelder:

Carl Zeiss Jena GmbH, 07745 Jena, DE

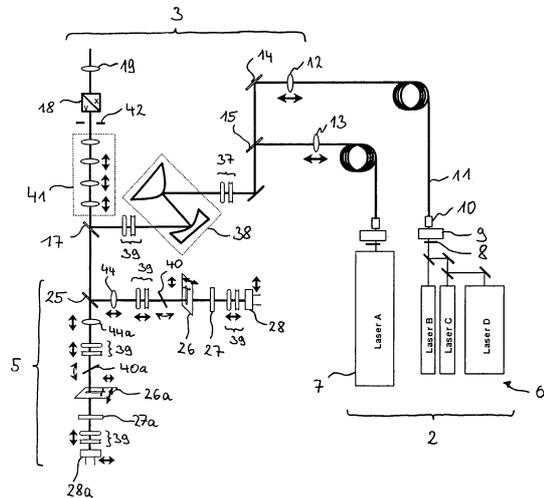
(72) Erfinder:

Wolleschensky, Ralf, 99510 Apolda, DE; Steinert, Jörg, 07743 Jena, DE; Funk, Jörg-Michael, Dr., 07743 Jena, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Lichtrastermikroskop und Verwendung**

(57) Zusammenfassung: Bei einem konfokalen Laserscanningmikroskop mit einer Beleuchtungsanordnung (2), die einen Beleuchtungsstrahl zum Beleuchten eines Probenbereichs (23) bereitstellt, einer Scananordnung (3, 4), die den Beleuchtungsstrahl scannend über die Probe führt, und einer Detektoranordnung (5), die über die Scananordnung (3, 4) den beleuchteten Probenbereich (23) mittels einer konfokalen Blende (26) auf mindestens eine Detektoreinheit (28) abbildet, ist vorgesehen, daß die Beleuchtungsanordnung (2) der Scananordnung (3, 4) einen linienförmigen Beleuchtungsstrahl bereitstellt, die Scananordnung (3, 4) den linienförmigen Beleuchtungsstrahl scannend über die Probe f führt und die konfokale Blende als Schlitzblende (26) oder als konfokale Blende wirkender schlitzförmiger Bereich (28, 48) der Detektoreinheit (28) ausgebildet ist.



Beschreibung

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf ein konfokales Laserscanningmikroskop mit einer Beleuchtungsanordnung, die einen Beleuchtungsstrahl zum Beleuchten eines Probenbereichs bereitstellt, einer Scananordnung, die den Beleuchtungsstrahl scannend über die Probe führt, und einer Detektoranordnung, die über die Scananordnung den beleuchteten Probenbereich mittels einer konfokalen Blende auf mindestens eine Detektoreinheit abbildet.

Stand der Technik

[0002] Konfokale Laserscanningmikroskope der eingangs genannten Art sind im Stand der Technik bekannt, beispielhalber sei hierzu auf die DE 197 02 753 A1 verwiesen. In jüngster Zeit wurden vermehrt mikroskopische Aufbauten, insbesondere konfokal abbildende Laserscanningmikroskope, für spektroskopische Aufnahmetechniken eingesetzt. Auf diese Weise ist es möglich, die spektroskopischen Eigenschaften eines ausgewählten Probenbereichs zerstörungs- und berührungslos zu vermessen. Die konfokale optische Mikroskopie ermöglicht dabei die selektive Detektion optischer Signale, welche innerhalb eines beugungsbegrenzten Konfokalvolumens erzeugt werden, dessen Größe im Mikrometerbereich liegt. Laserscanningmikroskope mit abtastenden Laserstrahlen und/oder Probenvorschubeinheiten können mit hoher Ortsauflösung zwei- oder dreidimensionale Darstellungen der untersuchten Probe erzeugen. Durch diese Eigenschaft hat sich die konfokale Laserscanningmikroskopie für fluoreszierende Proben im biomedizinischen Bereich nahezu als Standard durchgesetzt.

[0003] Aufgrund des hohen chemischen Aussagegehaltes ist aus applikativer Sicht insbesondere die konfokale Raman-Mikroskopie sehr attraktiv. Die EP 0 542 962 B1 beschreibt einen Aufbau zur konfokalen Raman-Mikroskopie, bei der geeignetes Auslesen eines ortsauflösenden Flächendetektors zur Herstellung der Konfokalitätsbedingung verwendet wird.

[0004] Ein Problem der Raman-Spektroskopie im Vergleich zur klassischen Fluoreszenz-Spektroskopie besteht in den häufig um mehrere Größenordnungen geringeren Signalintensitäten. Die Integrationszeit pro Meßpunkt beträgt in der Praxis häufiger mehr als 1 Minute. Daraus resultieren Meßzeiten von oftmals vielen Stunden oder Tagen, was einer konfokalen Raman-Mikroskopie für die Aufnahme zwei- oder dreidimensionaler mikroskopischer Bilder mit hoher Punktdichte naturgemäß enge Grenzen setzt. Eine Verringerung der Integrationszeit wäre zwar theoretisch durch Erhöhung der Laserleistung denkbar, jedoch führt dies schnell zur Probenzerstörung.

[0005] Vor ähnlichen Problemen steht man im Be-

reich der nicht-linearen optischen Mikroskopie, die z. B. mit der Second Harmonic Generation attraktive Kontrastierungsmethoden anbietet, deren praktischer Einsatz jedoch ebenfalls durch geringe Signalintensitäten und damit verbundene lange Meßzeiten stark begrenzt ist.

[0006] Aus der US 6.134.002 ist ein konfokaler Mikroskopaufbau bekannt, bei dem als Detektor ein Spektralanalysator eingesetzt wird. Der Analysator nimmt Strahlung in einem Eintrittsspalt auf, wobei der linienförmige Spaltbereich einem Linienbereich auf der Probe entspricht. Es wird ein Punktbild auf der Probe gescannt. Die zu detektierende Strahlung wird zum Analysator über einen als Hauptfarbteiler wirkenden Strahlteiler ausgekoppelt, welcher entweder zwischen zwei Scanspiegeln einer Scaneinheit liegt oder in Richtung auf die Probe gesehen der Scaneinheit vorgeordnet ist. In der erstgenannten Variante ist das durch die zwei Scanspiegel gescannte Punktbild auf der Probe nur in einer Raumrichtung descannt, so daß der Spektralanalysator mit längs einer Zeile gescannter Strahlung beaufschlagt wird. In der zweiten Variante ist die Strahlung durch die Scanspiegel vollständig descannt und somit ruhend und wird deshalb nach einem Pinhole mit einer Zylinderoptik nochmals aufgeweitet. Der aus US 6.134.002 bekannte Aufbau erreicht eine Beschleunigung der Bildaufnahme durch Verkürzung der Spektralanalysezeiten, weshalb er zwingend auf einen Spektralanalysator mit schlitzförmigem Eingangsbereich als Detektor angewiesen, also hinsichtlich der Vielfalt möglicher Detektoren stark eingeschränkt ist. Die eingangs genannte Problematik hinsichtlich einer möglichen Probenbeschädigung durch hohe Laserleistung ist auch bei einem Aufbau nach US 6.134.002 gegeben.

Aufgabenstellung

[0007] Der Erfindung liegt deshalb die Aufgabe zugrunde, ein Laserscanningmikroskop so weiterzubilden, daß es auch spektroskopische Signale geringer Intensität in möglichst kurzer Zeit aufnehmen kann.

[0008] Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop der eingangs genannten Art gelöst, bei dem die Beleuchtungsanordnung der Scananordnung einen linienförmigen Beleuchtungsstrahl bereitstellt, die Scananordnung den linienförmigen Beleuchtungsstrahl scannend über die Probe führt und die konfokale Blende als Schlitzblende oder als konfokale Blende wirkender schlitzförmiger Bereich der Detektoreinheit ausgebildet ist.

[0009] Die vorliegende Erfindung widmet sich der beschriebenen Problematik durch Kombination einer linienförmigen Probenbeleuchtung und einer konfokalen Detektion mittels einer Schlitzblende oder ei-

nes als Schlitzblende wirkenden Bereiches. Im Gegensatz zu Punktscannern, wie sie die US 6.134.002 verwendet, wird also ein linienförmiger Bereich auf der Probe beleuchtet und konfokal auf einen zumindest linienförmigen Detektor abgebildet.

[0010] Verglichen mit einem konfokalen, herkömmlichen Punkt-Laserscanningmikroskop ist bei gleicher Bildaufnahmezeit, bei gleicher in der Probe abgebildeter Fläche, bei gleichem Sehfeld und bei gleicher Laserleistung pro Pixel ein um einen Faktor verbessertes Signal/Rausch-Verhältnis realisiert, wenn man mit n die Anzahl der Pixel in der Detektorzeile bezeichnet. Hierfür ist ein Wert von 500 bis 2.000 typisch. Die Voraussetzung hierzu ist, daß die die Probe beleuchtende Linie die n -fache Leistung, eines Laserfokus eines vergleichbaren konfokalen Punktscanners aufweist.

[0011] Möchte man mit dem erfindungsgemäßen Laserscanningmikroskop nicht die Detektionsgeschwindigkeit bzw. das Signal/Rausch-Verhältnis verbessern, kann alternativ im Vergleich zum konfokalen Punktscanner bei gleicher Bildaufnahmezeit und gleichem Signal/Rausch-Verhältnis die Strahlenbelastung der Probe um den Faktor n gesenkt werden, wenn die für einen konfokalen Punktscanner punktförmig aufgebrauchte Strahlungsleistung nun auf die Beleuchtungslinie verteilt wird.

[0012] Das zeilenabtastende Laserscanningmikroskop ermöglicht also im Vergleich zum konfokalen Punktscannern, intensitätsschwache Signale empfindlicher Probensubstanzen bei gleichen Signal/Rausch-Verhältnis und gleicher Probenbelastung um den Faktor n schneller, bei gleicher Aufnahmezeit mit einem um den Faktor \sqrt{n} verbesserten Signal/Rausch-Verhältnis oder bei gleicher Aufnahmezeit mit gleichem Signal/Rausch-Verhältnis und einer um den Faktor n geringeren Probenbelastung abzubilden.

[0013] Je nach gewünschter Auflösung wird man eine unterschiedlich breite Linie auf der Probe beleuchten und konfokal detektieren wollen. Eine veränderliche Beleuchtung ist deshalb bevorzugt. Dies kann prinzipiell bereits bei der Erzeugung der linienförmigen Beleuchtung bewirkt werden. Da die Erzeugung einer linienförmigen Beleuchtung jedoch in einem Laserscanningmikroskop zweckmäßigerweise in einem Beleuchtungsmodul erfolgt, kann der Aufwand für eine Verstellbarkeit relativ groß werden, wenn im Beleuchtungsmodul Strahlung aus unterschiedlichen Strahlquellen zusammengeführt wird. Es ist deshalb bevorzugt, eine Zoomoptik zu verwenden, welche eine Zoomfunktion realisiert werden dazu die Linienbreite eines bereits erzeugten linienförmigen Beleuchtungsstrahls variiert und welche vorzugsweise in einem Bereich des Strahlengangs liegt, in dem Beleuchtungsstrahlung und zu detektie-

rende Strahlung durch dieselben optischen Elemente geführt werden, d. h. noch nicht separiert sind. Bei Laserscanningmikroskopen kann der abgetastete Bildbereich durch geeignete Ansteuerung des Scanners in einer Zoomfunktion ausgewählt werden, allerdings nur bei Einzelpunktabtastung in Kombination mit einem Galvanometerscanner. Bei den hier vorliegenden parallel scannenden, d. h. mehrere Punkte gleichzeitig abtastenden Laserscanningmikroskopen ist eine Zoomfunktion durch Verstellung der Scananordnung nicht realisierbar, da die einzelnen abgetasteten Punkte der Linie in einem festen geometrischen Verhältnis zueinander stehen. Die durch die Zoom-Optik erreichte variable Vergrößerung ermöglicht eine Größenverstellung des abgescannten Feldes für solche parallel arbeitende Multipunktscanner, bei denen eine Zoomfunktion durch Eingriff an der Scananordnung aufgrund der festen geometrischen Beziehung der parallel über die Probe geführten Punkte nicht möglich ist. Der für einzelpunktabtastende konfokale Raster-Mikroskope an und für sich bekannte Ansatz, die Ablenkeinrichtung so anzusteuern, daß ein Bildfeld in gewünschter und einstellbarer Größe abgetastet wird, ist bei solchen parallel abtastenden Systemen ebensowenig möglich, wie bei Systemen, die mit Resonanzscannern, d. h. in Resonanzschwingung angetriebenen Drehspiegeln, arbeiten, da dort die maximale Auslenkung so gut wie nicht verstellbar ist.

[0014] Eine möglich Lage für die Zoomoptik ist direkte Vorordnung zur Scannereinheit (auf die Probe hin gesehen). Eine vorzugsweise motorisiert angetriebene Zoomoptik ermöglicht über eine Anpassung des von ihr bewirkten Zoom-Faktors, das diagonale Sehfeld in einem bestimmten Verstellbereich kontinuierlich zu variieren. Besonders bevorzugt ist eine Zoomoptik, die in drei optischen Freiheitsgraden verstellbar ist, so daß bei Variation der Linienbreite wichtige Parameter wie Fokusslage, Pupillenlage und Abbildungsmaßstab unverändert bleiben.

[0015] Ein Objektiv erreicht dann seine maximale Auflösung, wenn die Eintrittspupille vollständig ausgeleuchtet ist. Es ist deshalb zweckmäßig, geeignete Mittel vorzusehen, daß die Zoom-Optik die Eintrittspupille des Objektivs immer vollständig ausleuchtet, unabhängig von der Einstellung der Zoom-Optik. Eine zweckmäßige Weiterbildung der Erfindung sieht folglich vor, daß in der Austrittspupille der Zoom-Optik ein als Blende wirkendes Element angeordnet ist, das nicht größer ist, als die kleinste Austrittspupillengröße, die im Betrieb der Zoom-Optik auftritt. Dadurch ist eine von der Einstellung der Zoom-Optik unabhängige Größe der Eintrittspupille bewirkt. Zweckmäßigerweise ist diese Größe gleich oder kleiner als die Größe der Objektiv-Eintrittspupille.

[0016] Im Betrieb der Zoom-Optik kann bei Einstellung einer Vergrößerung kleiner 1,0 die Austrittspupil-

le sehr klein werden. Möchte man diese geringe Austrittspupillengröße als untere Grenze für die Auslegung vermeiden, ist es zweckmäßig, der Zoom-Optik ein Teleskop vorzuschalten, das eine entsprechende Pupillenaufweitung bewirkt. Zweckmäßigerweise wird man dieses Teleskop im Strahlengang nur dann aktivieren, wenn die Zoomoptik verkleinernd wirkt. Die Begriffe „vergrößern“ und „verkleinern“ sind hier auf die Abbildung der Probe bezogen.

[0017] Die Aktivierung dieses Teleskopes stellt sicher, daß die Ausgangspupille des Zooms, die bei einer Vergrößerung von 1,0 gegeben ist, als untere Grenze bei der Auslegung zugrundegelegt werden kann, ohne daß bei verkleinernder Wirkung der Zoom-Optik die Ausgangspupille so klein würde, daß möglicherweise die Objektivpupille unterfüllt wird. Bedingt durch die Austauschbarkeit des Objektivs ist es zweckmäßig, das als Blende wirkende Element austauschbar zu gestalten, möchte man bewußt die Objektivpupille unterfüllen, d. h. nicht vollständig ausleuchten. Als Element kommt dann beispielsweise eine verstellbare Irisblende oder ein Mechanismus mit verschiedenen austauschbaren Blenden, beispielsweise ein Blendenrad mit verschiedenen Lochblenden in Frage.

[0018] In einer besonders kompakt bauenden Ausführungsform ist das als Blende wirkende Element durch die Scaneinheit realisiert; zum Beispiel kann die begrenzte Ausdehnung von Scannerspiegeln als Blende wirken.

[0019] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird also eine Zoom-Optik verwendet, welche eine ausgangsseitige Pupille aufweist, in der eine Blende vorgesehen ist. In der Praxis kann diese Blende auch durch die Begrenzung einer Spiegelfläche der Scannereinheit realisiert sein. Durch die Wirkung dieser ausgangsseitigen Blende der Zoom-Optik wird unabhängig vom Verstellen der Zoom-Vergrößerung immer eine festgelegte Pupillengröße auf die Scananordnung bzw. auf das Objektiv des konfokalen Laserscanningmikroskop abgebildet. Vorteilhafterweise verhindert die Blende zusätzlich das Auftreten von ungewolltem Streulicht im Bereich der Scananordnung.

[0020] Möchte man auch Zoom-Faktoren kleiner Eins einstellen, ist es zur Pupillenfüllung vorteilhaft, das Zylinderteleskop vorzuschalten. Vorzugsweise erfolgt dieses Einschalten automatisiert, beispielsweise in Form eines Einschwenkvorgangs. Dadurch ist verhindert, daß die ausgangsseitige Pupille, beispielsweise die erwähnte Blende des Zoom-Objektivs unterstrahlt wird. Unabhängig von der Verstellung der Zoom-Optik ist somit am Ort der Objektivpupille stets eine Beleuchtungslinie einstellbarer Größe vorhanden, so daß Probenbereiche einstellbarer Größe untersucht werden können.

[0021] Beim Aktivieren des Zylinderteleskopes tritt unvermeidlich ein Bildhelligkeitssprung auf, da zum einen das Zylinderteleskop Strahlung absorbiert und zum anderen vor allem die Strahlungsintensität über eine nun längere Linie verteilt wird. Um für den Betrachter diese Wirkung auszugleichen, ist es in einer vorzugsweisen Weiterbildung vorgesehen, daß eine Steuereinrichtung bei in den Strahlengang geschaltetem Zylinderteleskop durch Verstellung eines Verstärkungsfaktors der Detektoranordnung oder der Scangeschwindigkeit der Scaneinrichtung eine durch das Zylinderteleskop bedingte Bildhelligkeitsminderung ausgleicht. Zweckmäßigerweise wird diese Änderung, die von der Steuereinrichtung vorgenommen wird, dem Benutzer angezeigt, beispielsweise durch entsprechende Umschaltung von Reglern eines Bedienprogrammes.

[0022] Die Erfinder erkannten, daß die Problematik einer axial variierenden Lage der (in Beleuchtungsrichtung gesehen) Eintrittspupille des Mikroskopobjektivs überraschenderweise durch geeignete Gestaltung der Zoom-Optik gelöst werden kann. Vorteilhaftweise wird die Zoomoptik also so ausgebildet, daß sie die Abbildungslänge (Abstand zwischen Eintritts- und Austrittspupille der Zoom-Optik) variierbar gestaltet, wodurch Schwankungen der axialen Pupillenlage der Eintrittspupille des Mikroskopobjektivs ausgleichbar sind. Die erfindungsgemäße Zoom-Optik erreicht also eine Doppelfunktion, indem zum einen die Scanfeldgröße durch Variation der Vergrößerung eingestellt werden kann, und zum anderen die Übertragungslänge so einstellbar ist, daß eine axial variierende Pupillenlage des Mikroskopobjektivs ausgeglichen ist.

[0023] Es ist weiter zweckmäßig, daß die Zoom-Optik von einer Steuereinheit angesteuert so verstellbar ist, daß in einer ersten Betriebsart die variable Abbildungslänge realisiert ist. Um die Zoom-Optik auf ein aktiviertes, z. B. eingeschwenktes Objektiv anzupassen, ist es zweckmäßig, in dieser Betriebsart die Vergrößerung konstant zu halten.

[0024] Wurde die Einstellung der Pupillenlage vorgenommen, kann man vorteilhafterweise eine weitere Betriebsart verwirklichen, in der für die Ausführung einer Zoomfunktion die Vergrößerung unter Ansteuerung durch die Steuereinheit verstellt wird, ohne daß Abbildungslänge variiert. Durch die Wirkung der Zoom-Optik in dieser Betriebsart kann das abgetastete Feld hinsichtlich seiner Größe verstellt werden. Verwendet man gleichzeitig eine zweiachsig ansteuerbare Scaneinheit, kann zusätzlich und abhängig vom Verstellen der Zoomvergrößerung ein beliebiger Bereich innerhalb des maximal zulässigen Scanfeldes als sogenannten „region of interest“ ausgewählt werden, wobei diese „region of interest“ nicht symmetrisch zur optischen Achse liegen muß. Im Detektionsstrahlengang wird dieser Versatz ebenso wie die

Zoomvergrößerung in Richtung auf den Detektor hin wieder aufgehoben, wodurch die Beobachtung spezifischer Bereiche in einer Probe möglich ist. Darüber hinaus kann man Bilder aus verschiedenen „region of interest“ gewinnen und anschließend zu einem besonders hochauflösenden Bild zusammensetzen.

[0025] Eine besonders zweckmäßige Bauweise der Zoom-Optik setzt vier Optikgruppen ein, um die variable Pupillenabbildung auszuführen. Es ist dann für die Herstellung günstig, die vier Optikgruppen in Beleuchtungsrichtung gesehen mit positiver Brechkraft, negativer Brechkraft sowie zweimal positiver Brechkraft zu versehen. Zweckmäßigerweise sind zumindest drei Optikgruppen unabhängig voneinander mittels Antrieben verstellbar, und die Bewegung erfolgt derart, daß die Fokussierung von unendlich nach unendlich erhalten bleibt und je nach Betriebsart die Vergrößerung bzw. Abbildungslänge (Pupillenlage) verstellt wird. Auch kann es vorteilhaft sein, die in Beleuchtungsrichtung gesehen letzte Gruppe mit einem üblicherweise in einem konfokalen Raster-Mikroskop der Scaneinheit vorgeordneten Scanobjektiv als eine Einheit auszubilden. Jede Gruppe besteht vorzugsweise mindestens aus einer Linse. Um möglichst gute Eigenschaften bezüglich des verfügbaren Spektralbereiches sowie die möglichen Aperturen/Feldwinkel zu erreichen, sind die Gruppen bezüglich der Abbildungsfehler vorzugsweise in sich selbst korrigiert.

[0026] Die erwähnte Auswahl einer „region of interest“ entweder nur durch die vom Zoom-Objektiv realisierte Zoomfunktion oder auch zusätzlich durch eine im möglichen Scanfeld asymmetrische Scannerbetriebsweise kann zusätzlich noch durch Verwendung eines den Strahlengang drehenden Elementes verbessert werden. Setzt man in eine Pupille des Beleuchtungsstrahlenganges beispielsweise ein Abbe-König-Prisma, kann das abgetastete, gezoomte Scanfeld gedreht werden. Im Detektionsstrahlengang wird diese Verdrehung durch das Prisma wieder aufgehoben. Ein solches Abbe-König-Prisma ist beispielsweise von LINOS Photonics, Deutschland, erhältlich und ist im Stand der Technik bekannt. Es wird für die erwähnte Bauweise drehbar im Strahlengang nahe einer Pupille angeordnet, da hier die Strahlbündel am engsten zusammengeführt sind und deshalb ein besonders kleines Prisma verwendet werden kann. Es führt je nach Drehwinkel eine Rotation um den doppelten Winkel des Bildfeldes ein.

[0027] Die linienförmige Beleuchtung kann auf vielfältige Art und Weise erzeugt werden. Besonders vorteilhaft ist jedoch der Einsatz mindestens eines asphärischen Spiegels. Das Grundprinzip der Strahlformung in der Beleuchtungsvorrichtung ist es dann, mittels eines asphärischen Spiegels eine Energieumverteilung zumindest in einer Schnittebene vorzunehmen und ein inhomogenes, insbesondere Gauß-ver-

teiltes Profil so umzuwandeln, daß in der Schnittebene eine weitgehend homogene Energieverteilung vorliegt. Bildet man den Spiegel in zwei Querschnittsrichtungen asphärisch aus, erhält man eine Homogenisierung in zwei Schnittebenen, also ein homogenisiertes Feld. Durch den Einsatz eines asphärischen Spiegels kann eine große spektrale Bandbreite für die Beleuchtungsstrahlung abgedeckt werden, bei gleichzeitiger homogener Ausleuchtung. Dabei wurde erkannt, daß die reflektierende Asphäre, die in einer Schnittebene im Bereich des Auftreffpunktes des Ursprungsstrahls stärker gekrümmt ist als in auftreffpunktfernen Bereichen, geeignet ist, eine Wellenlängenabhängigkeit bei Fokussierung und Energieumverteilung vermeidet, wobei gleichzeitig das Konzept der variierenden Krümmung des asphärischen Spiegels eine große Vielfalt an Energieumverteilungen eröffnet. Mit der Beleuchtungsvorrichtung lassen sich Gaußbündel beispielsweise derartig umformen, daß in über 80% des ausgeleuchteten Bereiches die Intensität nicht unter 80% des Maximalwertes fällt. Dies ist eine im wesentlichen homogene Verteilung im hier relevanten Sinne.

[0028] Eine Variante mit zweiachsiger asphärischer Krümmung kann besonders vorteilhaft zur Homogenisierung in einer Zwischenbildebene zum Einsatz kommen. Bei multipunktscannenden Mikroskopen ermöglicht die homogene Ausleuchtung eines Zwischenbildes vor dem Element, das die Punktwolke erzeugt (z.B. Nipkow-Scheibe), eine gleichmäßige Ausleuchtung der Probe mit örtlich im wesentlichen einheitlicher Strahlintensität. Auch ermöglicht die Konvertierungseinheit die volle Ausleuchtung einer Objektivpupille, so daß eine besonders gute (hoch aufgelöste) Abbildung erreicht wird, da eine homogen gefüllte Pupille die optische Auflösung auszuschoöpfen erlaubt.

[0029] Eine besonders einfach zu fertigende Ausführungsform ist ein Spiegel, der keilförmig und mit abgerundetem First ausgebildet ist. Ein solcher Spiegel kann auf einfache Weise aus einem Quader hergestellt werden und erzielt eine Brennlinie mit homogener Energieverteilung.

[0030] In einer mathematisch besonders einfach zu beschreibenden Variante wird der Spiegel durch eine konische Konstante sowie den Abrundungsradius des Firstes definiert und genügt in (x,y,z)-Koordinaten hinsichtlich der z-Koordinate der Gleichung $y^2/[c + (c^2 - (1 + Q)y^2)^{1/2}]$, wobei c der Abrundungsradius des Firstes und Q die konische Konstante ist.

[0031] Für die zeilenförmige Beleuchtung möchte man die Strahlung nicht nur homogen entlang einer längserstreckten Linie verteilen, sondern gegebenenfalls auch die Weite der Linie an den Durchmesser der Eintrittspupille des nachfolgenden optischen Systems anpassen. Um dies zu erreichen, muß der

asphärische Spiegel auch eine Strahlaufweitung quer zur Linienrichtung bewirken. Dies kann bei der eingangs genannten Variante eines keilförmigen Spiegels mit abgerundetem First besonders einfach dadurch erreicht werden, daß die Spiegelfläche oder zumindest der First entlang der First-Längsachse sphärisch oder asphärisch gekrümmt ist.

[0032] Der asphärische Spiegel mit abgerundetem First ist also dann zweidimensional gekrümmt, wobei in einer ersten Schnittrichtung (senkrecht zur Längsachse) ein Kegel mit abgerundeter Spitze, in einer zweiten Schnittrichtung (längs des Firstes) eine parabolische, sphärische oder asphärische Krümmung vorliegen kann. Letztere Krümmung stellt dann die Breite des ausgeleuchteten Feldes ein, wohingegen die asphärische Form senkrecht zur Längsachse die Aufweitung längs des Feldes bewirkt und aufgrund der Asphärität eine Energieumverteilung zur Folge hat. Längs des Feldes ist damit eine weitgehend homogene Energieumverteilung erreicht.

[0033] Ein zusätzlich längs des Firstes sphärisch oder parabolisch gekrümmter Spiegel läßt sich in einer einfachen mathematischen Beschreibung wie folgt fassen:

$$f(x, y) = \sqrt{(a(y) - r_x)^2 - x^2} - r_x,$$

wobei r_x der Krümmungsradius entlang des Firstes, d. h. in der oben genannten zweiten Schnittrichtung ist.

[0034] Um bei dem in zwei Richtungen gekrümmten Spiegel (z. B. in der ersten Schnittrichtung asphärisch, in der zweiten sphärisch) eine Anpassung zur vollen Ausleuchtung eines Zwischenbildes oder einer Eintrittspupille eines nachfolgenden optischen Systems zu bewirken, ist es zweckmäßig, dem Spiegel eine Sammeloptik, z. B. in Form eines Sammelspiegels, nachzuordnen. Üblicherweise wird man für die Erzeugung eines rechteckigen Feldes dabei einen zylindrischen oder torischen Sammelspiegel einsetzen. Für andere Feldformen mag die Spiegelform abweichen, so kann man beispielsweise auch für diesen zweiten Spiegel die genannte Asphäre verwenden, um eine Kombination aus Homogenisierung der Pupillenfüllung in einer ersten Richtung (durch eine der Asphären) und des Zwischenbildes in der verbleibenden Richtung (durch die andere Asphäre) zu erreichen. Auch kann durch die zusätzliche Asphäre eine Bildfehlerkompensation bewirkt werden. Natürlich kann man die zweite Asphäre auch zusätzlich zum Sammelspiegel vorsehen.

[0035] Für die Ausführungsform des asphärischen Spiegels mit sphärischer Krümmung in der zweiten Schnittebene ist es deshalb bevorzugt, daß der Sammelspiegel in x-Richtung einen Krümmungsradius gleich $r_x + 2 \cdot d$ aufweist, wobei d der Abstand zwi-

schen asphärischem Spiegel und Sammelspiegel ist. Der Krümmungsradius r_x des asphärischen Spiegels in der zweiten Schnittebene skaliert dann direkt die Höhe des ausgeleuchteten rechteckigen Feldes bzw. des Profils des Beleuchtungsstrahls.

[0036] Natürlich kann zur homogenen Pupillenausleuchtung auch ein in beiden Schnittrichtungen asphärischer Spiegel verwendet werden. Bei einer rotationssymmetrischen Asphäre bewirkt dies dann ein homogen ausgeleuchtetes Kreisfeld; ansonsten erhält man ein elliptisches Feld. Aus der derart beleuchteten Pupille kann man dann für ein scannendes Verfahren einzelne Bereiche auswählen und verwenden, z. B. mittels Nipkow-Scheiben, Schlitzenblenden o. ä.

[0037] Zur Ausleuchtung des asphärischen Spiegels ist es vorteilhaft, die Symmetrieachse des Spiegels unter einem Winkel zwischen 4° und 20° zur Einfallssachse des Ursprungsstrahles, der z. B. gaußförmig profiliert ist, zu legen, da dann ein kompakter Aufbau erhalten werden kann. Der nachgeordnete Sammelspiegel, der beispielsweise zylindrisch oder torisch ausgebildet sein kann, sammelt die von der Asphäre umverteilte Strahlungsenergie und kompensiert während der Propagation auflaufende Wellenaberrationen. Spielen solche Wellenaberrationen in einfachen Fällen keine Rolle, kann anstelle des Sammelspiegels auch eine sphärische Linse verwendet werden.

[0038] Vorzugsweise wird im Laserscanningmikroskop mittels einer zweiten optionalen unabhängig wirkenden Scaneinrichtung eine dezentrale Zoom-Funktion, d. h. Crop-Funktion realisiert.

[0039] Die konfokale Abbildung kann im Laserscanningmikroskop durch eine Schlitzenblende bewirkt werden. Bevorzugt ist eine Schlitzenblende, die hinsichtlich ihrer Schlitzenbreite kontinuierlich verstellt werden kann, um einen beliebigen Airy-Durchmesser am Detektor zu erzeugen. Die kontinuierliche Verstellung kann beispielsweise mittels Festkörpergelenk-Technologie realisierter Schlitzenblenden erreicht werden. Alternativ kann auch eine Schlitzenblendeneinheit mit mehreren austauschbaren Schlitzenblenden unterschiedlicher Schlitzenbreite verwendet werden. Beispielsweise kann man feste Spaltblenden, z. B. strukturierte Chrommasken, unterschiedlicher Breite auf einem Schieber anordnen.

[0040] In einer besonders einfach zu realisierenden Lösung wirkt die Detektoreinheit selbst als Schlitzenblende. Dazu kann beispielsweise eine Detektorzeile mit Pixeln in einer Reihe verwendet werden. Auch ist es möglich, daß die Detektoreinheit einen quer zur Schlitzenrichtung ortsauflösenden Flächenstrahlungssensor umfaßt, der in der konfokalen Ebene angeordnet ist, wobei die Auswahl eines Teilbereichs des Flä-

chenstrahlungssensors als konfokale Schlitzeblende wirkt. Auf diese Weise kann der Effekt einer Variation des Schlitzeblenden-Durchmessers durch eine entsprechende Auswahl des Auslesebereiches am Sensor, beispielsweise einem CCD- oder CMOS-Detektor-Array, realisiert werden.

[0041] Im Laserscanningmikroskop können natürlich verschiedenste spektrale Kanäle sowohl bei der Beleuchtung als auch bei der Detektion verwendet werden. Es ist diesbezüglich eine besonders große Vielfalt möglich, wenn die Scananordnung mittels eines Hauptfarbteilers die eingestrahlte Beleuchtungsstrahlung von vom Probenbereich zurückkehrender Strahlung trennt, wobei der Farbteiler der als Streifen Spiegel gemäß der DE 102 57 237 A1, deren Offenbarungsgehalt hier explizit eingebunden wird, realisiert sein kann.

[0042] Ein solcher Streifen Spiegel wirkt als spektral unabhängiger Hauptfarbteiler. Er liegt in einer Pupillenebene der Scananordnung, in der in der Probenebene reflektierte, d. h. kohärente Beleuchtungsstrahlung linienförmig abgebildet ist. Inkohärente, zu detektierende Signalstrahlung füllt dagegen die gesamte Pupillenebene aus und wird durch den schmalen Streifen Spiegel nur unwesentliche abgeschwächt. Der Begriff „Farbteiler“ umfaßt also auch nichtspektral wirkende Teilersysteme. Anstelle des beschriebenen spektral unabhängigen Farbteilers kann auch ein homogener Neutralteiler (z.B. 50/50, 70/30, 80/20 o.ä.) oder ein dichroitischer Teiler Verwendung finden.

[0043] Damit applikationsabhängig eine Auswahl möglich ist, ist der Hauptfarbteiler vorzugsweise mit einer Mechanik versehen, die einen einfachen Wechsel ermöglicht, beispielsweise durch ein entsprechendes Teilerrad, das einzelne, austauschbare Teiler enthält.

[0044] Ein dichroitischer Hauptfarbteiler ist besonders dann vorteilhaft, wenn kohärente, d. h. gerichtete Strahlung detektiert werden soll, wie z.B. Reflexion, Stokes'sche bzw. anti-Stokes'sche Raman-Spektroskopie, kohärente Raman-Prozesse höherer Ordnung, allgemein parametrische nicht-lineare optische Prozesse, wie Second Harmonic Generation, Third Harmonic Generation, Sum Frequency Generation, Zwei- und Mehrfotonenabsorption bzw. Fluoreszenz. Mehrere dieser Verfahren der nicht-linearen optischen Spektroskopie erfordern den Einsatz zweier oder mehrerer Laserstrahlen, die kollinear überlagert werden. Hierbei erweist sich die dargestellte Strahlvereinigung der Beleuchtungsstrahlung aus mehreren Lasern als besonders vorteilhaft. Grundsätzlich können die in der Fluoreszenzmikroskopie weitverbreiteten dichroitischen Strahlteiler verwendet werden. Auch ist es für Raman-Mikroskopie vorteilhaft, vor den Detektoren holografische Notch-Teiler oder

-Filter zu Unterdrückung eines Rayleigh-Streuanteils zu verwenden.

[0045] Bei Detektion mit mehreren separaten spektralen Kanälen wird die Signalstrahlung mit Hilfe eines Nebenfarbteilers in spektrale Anteile separiert, wobei jeder Nebenfarbteiler einen zusätzlichen Spektralkanal bereitstellt. Die einzelnen spektralen Anteile werden dann mit Hilfe von Rund- und/oder Zylinderoptiken auf den zur Objektebene konjugierten, streifenförmigen Bereich fokussiert. Dieser Schlitzeblenden-Bereich weist Teilkonfokalität auf und wird nach spektraler Filterung, beispielsweise durch ein Emissionsfilter, mit Hilfe einer Optikgruppe (z. B. unter Verwendung von Zylinderlinsen) auf einen geeigneten, in Schlitzeblendenrichtung ortsauflösenden Detektor abgebildet, z. B. eine CCD-Zeilenkamera oder einen optical multichannel analyzer.

[0046] Alternativ oder zusätzlich kann als Detektor auch ein Spektrometer verwendet werden, das die linienförmige Strahlung quer zur Linie spektral aufteilt und auf einen Flächenstrahlungsdetektor leitet. Als konfokale Blende kann dabei ein Eintrittsspalt des Spektrometers dienen. Möchte man zeitaufgelöste Prozesse analysieren, ist es zweckmäßig, als Detektoreinheit eine Streak-Kamera zu verwenden, welche die linienförmige Strahlung quer zur Linie zeitlich aufteilt und auf einen Flächenstrahlungsdetektor leitet.

[0047] Das ortsauflöste Signal des Detektors enthält dann in einer Koordinate die Ortskoordinate, in der anderen die Zeit- oder Wellnlängenkoordinate, die die zeitliche Entwicklung oder die spektrale Zusammensetzung des Strahlungssignals an den einzelnen Pixel entlang der Ortskoordinate widerspiegelt.

[0048] Bei der Detektion linearer oder nicht-linearer Raman-Signale kann man durch eine polarisationsabhängige Beleuchtung bzw. Detektion eine Symmetrie der zu untersuchenden Molekülschwingungen analysieren bzw. störende nicht-Raman-resonante Untergrundanteile unterdrücken. Es ist deshalb für solche Anwendungen bevorzugt, daß mindestens ein Polarisator in der Beleuchtungsanordnung und mindestens ein Polarisationsanalysator in der Detektoranordnung verwendet werden.

[0049] Bei der erwähnten Ausführungsform mit mehreren spektralen Kanälen, die jeweils eine Detektoreinheit umfassen, kann in jedem spektralen Kanal eine eigenständige Schlitzeblende verwendet werden. Zur baulichen Vereinfachung kann aber auch optional eine gemeinsame Schlitzeblende allen spektralen Kanälen vorgeordnet werden.

[0050] Zur einfachen Justierung der Lage des konfokalen schlitzeblenden Elementes (z. B. der Schlitzeblende oder des Detektors) kann man dieses Ele-

ment entsprechend verschiebbar ausbilden. Baulich einfacher ist aber eine in der Beleuchtungsanordnung und/oder der Detektoranordnung vorgesehene Korrektur-Vorrichtung mit mindestens einer planparallelen transparenten Platte, die in einer Halterung im Strahlengang gehalten ist und durch diese in einer Kipp- und/oder Schwenkbewegung um mindestens eine Achse antreibbar ist, um durch Veränderung der Kipplage der Platte einen bestimmten Parallelversatz der Strahlen im Strahlengang einzustellen.

[0051] Die Korrektur-Vorrichtung hat den Vorteil, daß eine einfache Kompensation oder Korrektur von in der Abbildung der optischen Anordnung entstehenden Fehlern möglich ist, insbesondere können einfach Umgebungs- oder Systemtemperatur, Stellung von wechselbaren oder beweglichen Elementen in der Anordnung, Farbfehler aufgrund Wellenlänge oder Welllängebereichen der genutzten Strahlung korrigiert werden. Je nach Anforderung kann dabei eine einachsige Kipp- bzw. Schwenkbewegung genügen. Möchte man einen zweiachsigen Parallelversatz vorsehen, kann entweder eine zweiachsig kipp- bzw. schwenkbare Platte verwendet werden, oder man kann zwei unterschiedlich einachsige kipp- oder schwenkbare Platten vorsehen. Wesentlich für die Erfindung ist es, daß die planparallele Platte mit der Halterung auf definierte und bekannte Weise im Strahlengang verkippt werden kann. Für eine zweiachsige Verstellung ist jede Kombination von Kipp- und Schwenkbewegung tauglich. Eine Kombination aus einer Kippbewegung und einer Schwenkbewegung ist dabei mechanisch relativ einfach zu realisieren und bringt trotz des bei der Schwenkbewegung auftretenden Verschiebens der planparallelen Platte entlang der optischen Achse überraschenderweise keinen Nachteil.

[0052] Die von der Vorrichtung bewirkte Korrektur kann ein Benutzer manuell einleiten, z.B. bei einer Justage im Werk. Besonders bevorzugt ist jedoch eine Weiterbildung mit einer Stelleinrichtung, die mindestens einen Betriebsparameter der optischen Anordnung erfaßt und die Kipplage abhängig vom Wert des Betriebsparameters einstellt. Die Kipplage kann beispielsweise in Kalibriertabellen abgelegt werden. Auch ist es möglich über aktive Regelkreise permanent, regelmäßig oder auf Anforderung hin eine Korrektur durch Einstellen der Kipplage zu optimieren. Für eine solche Ausgestaltung ist es bevorzugt, einen Regelkreis vorzusehen, der die Kipplage der Platte als Stellgröße verwendet, um die geschilderten Auswirkungen auf die abbildende optische Anordnung auszugleichen. So können auf einfache Weise in der optischen Anordnung eventuell vorhandene Temperatur- oder Langzeitdriftfehler ausgeglichen werden.

[0053] Da der Parallelversatz durch eine planparallele Platte bekanntermaßen von der Brechzahl des transparenten Plattenmaterials abhängt, können bei

polychromatischer Strahlung im Strahlengang der optischen Anordnung Farbquerfehler durch einen wellenlängenabhängigen Parallelversatz aufgrund einer Dispersion des Plattenmaterials entstehen. Durch Aufbau der planparallelen Platte aus einer oder mehrerer Teilplatten kann man solche, durch die planparallele Platte bedingten Farbquerfehler kompensieren.

[0054] Die Korrektur-Vorrichtung kann aber auch zur Verwendung betriebszustandabhängig variierender Farbquerfehler der optischen Abbildung selbst eingesetzt werden. Ist beispielsweise eine optische Anordnung in der Lage, mit unterschiedlichen Wellenlängen zu arbeiten, so kann ein wellenlängenabhängiger und damit betriebszustandsabhängiger Farbquerfehler auftreten. Die Korrektur-Vorrichtung kann dann die planparallele Platte je nach gerade in der optischen Anordnung benutzten Wellenlängenbereich und dadurch verursachten Farbquerfehler in eine andere Kipplage bringen, so daß im Endeffekt trotz Betrieb mit unterschiedlichen Wellenlängenbereichen dennoch eine unveränderte optische Abbildung in der Anordnung erfolgt. Auch für diese Korrektur kann natürlich wieder, wie bereits erwähnt, eine geeignete Stelleinrichtung, die auch einen Regelkreis aufweisen kann, verwendet werden.

[0055] Die Anforderungen an die Genauigkeit oder Feinfühligkeit, mit der der Antrieb über die Halterung erfolgt, ist, wie der zugängige Parallelversatzbereich auch, über die Dicke der planparallelen Platte einfach vorgebar.

[0056] Die Korrektur-Vorrichtung mindert, wie bereits erwähnt, die Anforderungen an verstellbare optische Elemente in der abbildenden optischen Anordnung. Dieser Vorteil ist besonders bedeutsam, wenn das konfokale Mikroskop austauschbare Strahlteiler aufweist, mit denen eine Anpassung auf verschiedene Applikationen, d.h. ein Wechsel der eingestrahnten oder ausgelesenen Wellenlängen erfolgt. Die Korrektur-Vorrichtung korrigiert die durch veränderbare optische Elemente bedingten Fehler ohne Eingriff auf die optische Abbildung. Darüber hinaus kann die Korrektur-Vorrichtung auch zwischen konfokaler Blende und Detektor eingesetzt werden und so den Strahlengang (Abbildung) zwischen Blende und Detektor geeignet parallelverschieben.

[0057] Über eine entsprechende Einstellung der Kipplage der planparallelen transparenten Platte kann man sowohl eine Kompensation von Abweichungen senkrecht zur Schlitzblende als auch eine Kompensation von Abweichungen parallel zur Schlitzblende ausgleichen.

[0058] Im ersteren Fall wird sichergestellt, daß das von der Probe kommende Licht exakt auf die Schlitzblende trifft und nicht oberhalb oder unterhalb der

Schlitzblende dezentriert ist. Im zweiten Fall wird sichergestellt, daß das von der Probe kommende Licht den Zeilendetektor korrekt trifft und zwischen Bildern von zwei Detektionskanälen im System, die beispielsweise jeder einen eigenen Zeilendetektor aufweisen, kein Pixelversatz besteht. Somit kann das konfokale Mikroskop eine subpixelgenaue Bilddeckung bei Mehrkanalausbildung erreichen.

[0059] Die Korrektur-Vorrichtung ist im konfokalen Mikroskop weiter dahingehend vorteilhaft, daß nunmehr eine schmale Detektorzeile verwendet werden kann, ohne daß eine Bewegung von Schlitzblende und Detektor nötig wird. Es ist dann vermieden, daß bei einer Dejustage (bedingt durch Kipp- und Keilfehler wechselbarer Elemente) bei einem zur Auflösungserhöhung erfolgten Abblenden der Schlitzblende unnötig Lichtfluß verloren geht und damit das Signal/Rausch-Verhältnis sinkt.

[0060] Da die Kipp- oder Keilfehler einzeln einschaltbarer optischer Elemente in der Regel reproduzierbar sind, kann die Kipplage der transparenten planparallelen Platte auf einfache Weise gewählt werden. Bei Wechsel eines einschaltbaren optischen Elementes ist lediglich ein bestimmter Antrieb der planparallelen transparenten Platte erforderlich, um die für die anzustrebende Konfiguration des Mikroskops neu erforderliche Kipplage einzustellen. Es ist deshalb eine Weiterbildung des Mikroskops bevorzugt, bei der im Strahlengang wechsel- oder verstellbare Elemente vorgesehen sind und die Stelleinrichtung eine Konfiguration der wechsel- oder verstellbaren Elemente als Betriebsparameter erfaßt und die Kipplage abhängig vom Wert des Betriebsparameters einstellt.

[0061] Ein Beispiel für einen solchen Parameter, bei dem nicht nur die Dejustierung der optischen Abbildung bezogen auf die Schlitzblende ausgeglichen wird, sondern auch ein Farbquerfehler, sieht in vorteilhafter Weise vor, im Strahlengang des Mikroskops Strahlung unterschiedlicher Wellenlänge zu führen, wobei die Stelleinrichtung die Kipplage entsprechend der Wellenlänge einstellt. Es ist dann jedem Detektionskanal eine oder mehrere planparallele Platten dem Detektor vorgeordnet und die Kipplage der planparallelen Platte wird von der Stelleinrichtung abhängig von der Wellenlänge bzw. dem Wellenlängenbereich im aktuellen Kanal eingestellt.

[0062] Eine besonders komfortable Benutzung erhält man, wenn ein Regelkreis vorgesehen ist, der die Strahlungsintensität an der Detektoreinheit maximiert, und/oder den Bildversatz minimiert indem die Kipplage der planparallelen Platte als Stellgröße eingesetzt wird. Somit können Langzeiteffekte oder Temperaturveränderungen, die Dejustagen nach sich ziehen, jederzeit ohne Einsatz eines Servicetechnikers auskorrigiert werden.

[0063] Das erfindungsgemäße Mikroskop sieht in einer Weiterbildung vor, daß die Probe weitfeldbeleuchtet wird und durch Scannen des Punkt- oder Punktgruppenspots abgebildet wird.

[0064] Die Erfindung setzt also nunmehr vorteilhafterweise eine Weitfeldbeleuchtung in Kombination mit einer gescannten Detektion ein. Mit dieser überraschend einfachen Maßnahme wird ein separater Detektor verzichtbar. Gleichzeitig erreicht man eine zusätzliche Fülle von Vorteilen.

[0065] Für die Weitfeldbeleuchtung können Strahlungsquellen verwendet werden, die am Laserscanningmikroskop für normale optische Beobachtung ohnehin vorhanden sind. Ein Umschaltmechanismus wird nicht mehr benötigt. Es ergibt sich also insgesamt eine bauliche Vereinfachung. Vorzugsweise wird die Weitfeldbeleuchtungsquelle eine Durchlichtbeleuchtung der Probe realisieren. Alternativ und zusätzlich ist natürlich auch eine Weitfeld-Auflichtbeleuchtung möglich, um beispielsweise Epi-Fluoreszenzmessungen oder Reflexionsmessungen durchzuführen. Auch kann man beide Modi (Auf- und Durchlicht) gleichzeitig realisieren.

[0066] Die Tiefendiskriminierungsfähigkeit der konfokalen Detektoranordnung läßt damit eine tiefenaufgelöste Transmissionsmessung zu.

[0067] Durch den Einsatz der meist ohnehin vorhandenen Weitfeldbeleuchtungsquellen, die üblicherweise verglichen mit dem zum Scannen vorgesehenen Anregungsbeleuchtungsquellen sehr breitbandig sind, kann ein Weißlicht-Durchlichtbetrieb realisiert werden, der aufgrund der Erfordernisse konfokaler Abbildung in herkömmlichen Laserscanningmikroskopen so nicht oder nur unter enormem lichtquellen-seitigen Aufwand möglich war. Gleiches gilt analog hinsichtlich Weitfeld-Auflichtfluoreszenzanregung.

[0068] Durch die Abtastung der weitfeldbeleuchteten Probe mit den gescannten Detektoren kann eine im Laserscanningmikroskop vorhandene spektrale Analysefähigkeit der Detektoranordnung auch im Transmissionsbetrieb ausgenutzt werden, was zu einer besseren Probencharakterisierung führt.

[0069] Die Weitfeldbeleuchtung kann unabhängig von der gescannten spotförmigen Beleuchtung betrieben werden. Natürlich kann die Steuereinheit auch einen gleichzeitigen Betrieb einleiten, in dem dann die Probe gleichzeitig im Transmissions- wie auch im herkömmlichen Fluoreszenzbetrieb analysiert wird.

[0070] Beispielsweise kann die Steuereinheit verschiedene spektrale Kanäle geeignet auslesen, so daß in einigen spektralen Kanälen Fluoreszenzinformation über die Probe, in anderen spektralen Kanä-

len Transmissionsinformation anfällt. Eine geeignete Zusammenführung dieser Information, beispielsweise in einem überlagerten Bild, gibt eine herkömmlichen Systemen überlegene Probenanalyse. Es ist deshalb bevorzugt, daß die Steuereinheit die Spot-Beleuchtungsanordnung und die Weitfeldbeleuchtungsquelle simultan im Betrieb steuert und die spektralen Kanäle der Spot-Detektoranordnung geeignet ausliest.

[0071] Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Ansatzes liegt darin, daß nun auch an mehreren Punkten gleichzeitig ein Durchlichtscan möglich ist, was herkömmliche, unter der Probe angeordneten separaten Detektoren mangels geeigneter Ortsauflösung nicht erlaubten. Die nun durch die Erfindung eröffnete Verwendung eines Multipunkt- oder Punktgruppenscanners im Durchlichtbetrieb mindert eventuelle Probleme durch zeitliche Fluktuationen der Weitfeldbeleuchtung, da diese durch geeignete Verlängerung der Integrationszeit bei Mehrpunkt- oder Punktgruppensystemen ausgeglichen werden kann. Es ist deshalb bevorzugt, daß die Weitfeldbeleuchtung und die gescannte punkt- oder punktgruppenförmige Beleuchtung gleichzeitig vorgenommen werden. Unter Punktgruppe wird dabei jede Anordnung von mehreren Punkten verstanden, insbesondere in Form einer Linie, die das Laserscanningmikroskop konfokal beleuchtet und abbildet. Durch diesen Ansatz werden weiter vorteilhaft geringere Probenbelastungen bzw. kürzere Meßzeiten realisiert, die im Stand der Technik so nicht möglich waren. Es ist deshalb besonders bevorzugt, daß die Spot-Detektoranordnung eine konfokale Punktgruppenabbildung verwirklicht, z. B. mit mindestens einer Nipkow-Scheibe und mindestens einem Matrixdetektor. Auch kann die Spotdetektoranordnung auch eine konfokale Schlitzeblende mit einem Zeilendetektor verwenden, wenn eine Linie als Punktgruppe dient.

[0072] Die Verwendung einer Weitfeldbeleuchtung erschließt schließlich völlig neue Kontrastierungsverfahren für die Durchlichtmessung. Es sind jetzt alle Kontrastierungsverfahren möglich, wie sie im Stand der Technik für herkömmliche optische Lichtmikroskope bekannt sind. Um dies zu realisieren, ist es zu bevorzugen, daß die Weitfeldbeleuchtungsquelle einen Kondensor aufweist, in den Kontrastierungsmittel schaltbar sind. Beispielsweise kann man Dunkel-feldbeleuchtung realisieren, indem im Kondensor eine geeignete Ringblende angeordnet wird.

[0073] Es sind aber auch noch weitere Kontrastierungsmethoden denkbar, wenn die Scananordnung ein Scanobjektiv aufweist, in dessen Pupillenebene geeignete Kontrastierungsmittel schaltbar sind. In Kombination mit der Einbringung von Kontrastierungsmitteln in den Kondensor sind dann nicht nur Dunkelfeldkontrast, sondern auch Phasenkontrast, VAREL-Kontrast, Polarisationskontrast oder Diffe-

rentialinterferenzkontrast möglich.

[0074] Eine zusätzliche Untersuchung zeitaufgelöster Prozesse ist im Laserscanningmikroskop mit Hilfe gegateter Detektorarrays und der bekannten Pump- und Probentechnik möglich.

[0075] Aufgrund der an der Spaltblende erzeugten Teilkonfokalität wird eine im Vergleich zur optischen Weitfeldbeleuchtung verbesserte Schnittdickenseparation erzielt. In Kombination mit einer schnellen z-Fokussierung erreicht der erfindungsgemäße Linienscanner daher auch die 3D-Rekonstruktion ausgehnter Proben. Eine schnelle z-Abtastung kann realisiert werden durch Bewegung der Probe in z-Richtung (z.B. durch schnelle mechanische Antriebe bzw. eine piezoelektrische Probenbewegung), durch Bewegung des Objektivs in z-Richtung (z.B. durch schnelle mechanische Antriebe bzw. eine piezoelektrische Objektivbewegung), durch Objektivinnenfokussierungen oder schnelle adaptive Optiken.

[0076] Das erfindungsgemäße Laserscanningmikroskop ermöglicht Verfahren zur Detektion schwacher spektroskopischer Signale in Mikroskopanordnungen. Die Einsatzgebiete erstrecken sich von der Mikrospektroskopie und Mikroanalytik zur „echten“ 2D- und 3D-mikroskopische Bildgebung. Ein bevorzugtes Verfahren beinhaltet hierbei die konfokale Stokes'sche bzw. anti-Stokes'sche Raman-Mikroskopie. Grundsätzlich kann jedoch jede spektroskopische Methode – und vorzugsweise solche mit intensitätsschwachen Signalen – mit dem erfindungsgemäßen Mikroskop zur mikroskopischen Kontrastierung verwendet werden. Als solche Methoden sind z.B. denkbar: Lumineszenzspektroskopie (Fluoreszenz, insbesondere Fluoreszenz-Polarisationsmessungen, Chemolumineszenz, Biolumineszenz, Phosphoreszenz), Infrarotmikroskopie, Circular-Dichroismus (CD)-Spektroskopie, Hyper-Raman-Spektroskopie, Stimulierte Ramanspektroskopie, Kohärente Stokes'sche bzw. anti-Stokes'sche Raman-Spektroskopie (CARS, CSRS sowie sämtliche kohärente Raman-Prozesse höherer Ordnung sog. HORSES), allgemein parametrische nichtlineare optische Prozesse, wie Second Harmonic Generation (SHG), Third Harmonic Generation THG, Sum Frequency Generation (SFG), Zwei- und Mehrphotonen-Absorption bzw. -Fluoreszenz.

[0077] Mehrere der zuletzt aufgeführten Methoden der nichtlinearen optischen Spektroskopie erfordern zwei oder mehrere Laser, deren Strahlen kollinear überlagert werden. Hierbei erweist sich die in dargestellte Strahlvereinigung mehrerer Laser als besonders vorteilhaft.

[0078] Potentielle Verwendungen der Erfindung umfassen sämtliche Methoden, bei denen routinemäßig eine hohe mikroskopische Ortsauflösung mit klassi-

scher optischer Spektroskopie verknüpft wird. Die Verwendung der Erfindung ist insbesondere dann vorteilhaft, wenn routinemäßig, d.h. ohne hohen Zeitaufwand 2D- und 3D-Substanzverteilungen quasi in Echtzeit verfolgt werden sollen. Ein vielversprechendes Anwendungsgebiet ist somit die chemischpharmazeutische Charakterisierung und Prozesskontrolle von Wirkstoffverteilungen in Fasern, Folien, Lacken, Dispersionen, Suspensionen, Emulsionen, Kunststoffen, Tabletten, etc. Besonders interessant ist hierbei die Analyse kristalliner und amorpher Festkörper (z.B. Analyse und Verteilung von Störstellen in Kristallen). Neben der mikroanalytischen Charakterisierung bestehender Substanzen ist auch Verfolgung chemischer Prozessabläufe denkbar, z.B. bei Umsetzungen in mikrofluidischen Reaktionsträgern, bei Kristallumlagerungen und der Festkörperpolymerisation.

[0079] Im Bereich der Medizintechnik ist insbesondere die orts aufgelöste, nicht-invasive Bestimmung von Wirkstoffen mit Hilfe Raman-spektroskopischer Methoden von besonderem Interesse. Der Einsatz der Raman-Spektroskopie im Bereich medizinischer Anwendungen wird häufig durch die erforderliche Laserleistungsdichte im Fokus und die damit verbundene Zerstörung des lebenden menschlichen Gewebes limitiert. Im Vergleich zu entsprechenden Punktscannern ermöglicht der Einsatz des erfindungsgemäßen Linienscanners bei gleicher Aufnahmezeit und gleichem SNR die Durchführung von Messungen mit einer um den Faktor n ($n = 500-2000$) geringeren Probenbelastung. Als praktische Anwendung sei die Bestimmung der inhomogenen Verteilung von Pigmenten und Antioxidantien im menschlichen Auge und der Haut genannt.

[0080] Ein weiteres potentielles Anwendungsgebiet der beschriebenen Erfindung bildet das High-Throughput-Raman-Screening von Mikrotiterplatten (multiwell plates) im Bereich der pharmazeutischen Wirkstoffentwicklung. Von besonderem Interesse sind hierbei oftmals Raman-spektroskopische Polymorphie-Studien, welche apparativ nicht nur weniger aufwendig als Röntgenstrukturanalysen sind, sondern auch in Proben mit überstehender Lösung durchgeführt werden können.

Ausführungsbeispiel

[0081] Die Erfindung wird nachfolgend unter Bezugnahme auf die Zeichnung beispielhalber noch näher erläutert. In den Zeichnungen zeigen:

[0082] [Fig. 1](#) eine schematische Darstellung eines Laserscanningmikroskops,

[0083] [Fig. 2](#) eine schematische Darstellung eines Strahlungsquellenmoduls, eines Scanmoduls sowie eines Detektormoduls für ein Laserscanningmikros-

kop,

[0084] [Fig. 3](#) eine schematische Darstellung des Strahlengangs in einer Beleuchtungsvorrichtung des Laserscanningmikroskops der [Fig. 2](#) in einer ersten Schnittebene,

[0085] [Fig. 4](#) den Strahlengang der [Fig. 3](#) in einer zweiten, senkrecht zur ersten Ebene gelegenen Schnittebene,

[0086] [Fig. 5](#) eine Computerdarstellung eines Asphärenspiegels, in der im Strahlengang der [Fig. 3](#) und [Fig. 4](#) verwendet wird,

[0087] [Fig. 6](#) eine Schnittdarstellung durch den Asphärenspiegel der [Fig. 5](#) zur Verdeutlichung der diesen Spiegel charakterisierenden Größen,

[0088] [Fig. 7](#) ein mit dem Strahlengang der [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) erreichtes Intensitätsprofil in einer Schnittebene,

[0089] [Fig. 8](#) eine schematische Darstellung eines Scanmoduls für das Laserscanningmikroskop der [Fig. 1](#) oder [Fig. 2](#),

[0090] [Fig. 9](#) eine schematische Darstellung zur Verdeutlichung des Korrekturbedarfs bei der Anordnung der [Fig. 8](#),

[0091] [Fig. 10](#) eine schematische Darstellung einer planparallelen Platte in der Anordnung der [Fig. 8](#),

[0092] [Fig. 11](#) eine perspektivische Darstellung der planparallelen Platte der [Fig. 8](#) mit motorischen Antrieb,

[0093] [Fig. 12](#) bis [Fig. 15](#) weitere Ausführungsformen eines Laserscanningmikroskops in Darstellungen ähnlich der [Fig. 2](#),

[0094] [Fig. 16](#) eine schematische Darstellung eines Scanmoduls sowie eines Detektormoduls eines Laserscanningmikroskops in Darstellungen ähnlich der [Fig. 2](#),

[0095] [Fig. 17](#) zwei Schemazeichnungen zur Veranschaulichung der Wirkungsweise des Detektormoduls der [Fig. 16](#).

[0096] [Fig. 18](#) eine schematische Darstellung des Strahlenganges zwischen einer im Laserscanningmikroskop der [Fig. 2](#) vorgesehenen Zoom-Optik und der mit dem Laserscanningmikroskop erfaßten Probe,

[0097] [Fig. 19](#) eine Kurve zur Veranschaulichung von Pupillendurchmessern im Aufbau gemäß [Fig. 18](#),

[0098] [Fig. 20a](#), [Fig. 20b](#) und [Fig. 21a](#), [Fig. 21b](#) sowie [Fig. 22a](#), [Fig. 22b](#) unterschiedliche Einstellungen der Zoomoptik der [Fig. 2](#), wobei die mit b bezeichneten Figuren eine Schnittdarstellung zeigen, die um 90° gegenüber den mit a bezeichneten Figuren gedreht ist,

[0099] [Fig. 23](#) ein Diagramm mit der Verstellung der vier Optikgruppen der Zoom-Optik der [Fig. 20](#) bis [22](#) für einen ersten Betriebsmodus mit konstanter Abbildungslänge,

[0100] [Fig. 24](#) ein Diagramm mit der Einstellung der vier Optikgruppen für einen zweiten Betriebsmodus mit konstanter Vergrößerung,

[0101] [Fig. 25](#) eine Darstellung ähnlich der [Fig. 23](#) und [Fig. 24](#), jedoch für eine Betriebsweise mit gleichzeitiger Variation von Abbildungslänge und Vergrößerung,

[0102] [Fig. 26](#) eine schematische Darstellung eines Scanfeldes zur Veranschaulichung möglicher Zoom-Wirkungen,

[0103] [Fig. 27](#) eine schematische Darstellung eines Laser-Scanningmikroskops mit einer Nipkow-Scheibe,

[0104] [Fig. 28](#) eine schematische Darstellung eines Laser-Scanningmikroskops mit paralleler Mehrpunktbeleuchtung und -abtastung.

[0105] [Fig. 1](#) zeigt schematisch ein Laserscanningmikroskop **1**, das im wesentlichen aus fünf Komponenten aufgebaut ist: einem Strahlungsquellenmodul **2**, das Anregungsstrahlung für die Laserscanningmikroskopie erzeugt, einem Scanmodul **3**, das die Anregungsstrahlung konditioniert und zum Scannen über eine Probe geeignet ablenkt, einem Mikroskopmodul **4**, das die vom Scanmodul bereitgestellte scannende Strahlung in einem mikroskopischen Strahlengang auf eine Probe richtet, sowie einem Detektormodul **5**, das optische Strahlung von der Probe erhält und detektiert. Das Detektormodul **5** kann dabei, wie es in [Fig. 1](#) dargestellt ist, spektral mehrkanalig ausgeführt sein.

[0106] Das Strahlungsquellenmodul **2** erzeugt Beleuchtungsstrahlung, die für die Laserscanningmikroskopie geeignet ist, also insbesondere Strahlung, die Fluoreszenz auslösen kann. Je nach Applikation weist das Strahlungsquellenmodul dazu mehrere Strahlungsquellen auf. In einer dargestellten Ausführungsform werden zwei Laser **6** und **7** im Strahlungsquellenmodul **2** vorgesehen, denen jeweils ein Lichtventil **8** sowie ein Abschwächer **9** nachgeschaltet sind und die ihre Strahlung über ein Koppelstelle **10** in eine Lichtleitfaser **11** einkoppeln. Das Lichtventil **8** wirkt als Strahlablenker, mit dem eine Strahlabschal-

tung bewirkt werden kann, ohne den Betrieb der Laser in der Lasereinheit **6** bzw. **7** selbst abschalten zu müssen. Das Lichtventil **8** ist beispielsweise als AOTF ausgebildet, das zur Strahlabschaltung den Laserstrahl vor der Einkopplung in die Lichtleitfaser **11** in Richtung einer nicht dargestellten Lichtfalle ablenkt.

[0107] In der beispielhaften Darstellung der [Fig. 1](#) weist die Lasereinheit **6** drei Laser B, C, D auf, wohingegen die Lasereinheit **7** nur einen Laser A beinhaltet. Die Darstellung in [Fig. 6](#) und [Fig. 7](#) ist also beispielhaft für eine Kombination aus Einzel- und Multiwellenlängenlaser, die einzeln oder auch gemeinsam an eine oder mehrere Fasern angekoppelt sind. Auch kann die Ankopplung über mehrere Fasern gleichzeitig erfolgen, deren Strahlung später nach Durchlaufen einer Anpaßoptik durch Farbvereiner gemischt wird. Es ist somit möglich, verschiedenste Wellenlängen oder -bereiche für die Anregungsstrahlung zu verwenden.

[0108] Die in die Lichtleitfaser **11** eingekoppelte Strahlung wird mittels verschieblichen Kollimationsoptiken **12** und **13** über Strahlvereinigungsspiegel **14**, **15** zusammengeführt und in einer Strahlformungseinheit **16** hinsichtlich des Strahlprofils verändert.

[0109] Die Kollimatoren **12**, **13** sorgen dafür, daß die vom Strahlungsquellenmodul **2** an das Scanmodul **3** zugeführte Strahlung in einen Unendlichstrahlengang kollimiert wird. Dies erfolgt jeweils vorteilhaft mit einer einzelnen Linse, die durch Verschiebung entlang der optischen Achse unter Steuerung (einer nicht dargestellten) zentralen Ansteuereinheit eine Fokussierungsfunktion hat, indem der Abstand zwischen Kollimator **12**, **13** und dem jeweiligen Ende der Lichtleitfaser veränderbar ist.

[0110] Die Strahlformungseinheit **16**, welche später noch eingehend erläutert wird, erzeugt aus dem rotationssymmetrischen, gaußförmig profilierten Laserstrahl, wie er nach den Strahlvereinigungsspiegeln **14**, **15** vorliegt, einen zeilenförmigen Strahl, der nicht mehr rotationssymmetrisch ist, sondern im Querschnitt zur Erzeugung eines rechteckig beleuchteten Feldes geeignet ist.

[0111] Dieser nachfolgend als zeilenförmig bezeichnete Beleuchtungsstrahl dient als Anregungsstrahlung und wird über einen Hauptfarbteiler **17** zu einem Scanner **18** geleitet. Auf den Hauptfarbteiler wird später noch eingegangen, hier sei lediglich erwähnt, daß er die Funktion hat, vom Mikroskopmodul **4** zurückkehrende Probenstrahlung von der Anregungsstrahlung zu trennen.

[0112] Der Scanner **18** lenkt den zeilenförmigen Strahl einachsrig ab, wonach er durch ein Scanobjektiv **19** sowie eine Tubuslinse **20** und ein Objektiv **21** in

einen Fokus **22** gebündelt wird, der in einem Präparat bzw. in einer Probe **23** liegt. Die optische Abbildung erfolgt dabei so, daß die Probe **23** in einer Brennlinie mit Anregungsstrahlung beleuchtet wird. Eine zweiachsige Ablenkung durch den Scanner **18** ist optional; sie kann, wie noch erläutert wird, zur Auswahl eines asymmetrisch zur optischen Achse liegenden Scan-Bereiches ROI eingesetzt werden.

[0113] Derart im linienförmigen Fokus **22** angeregte Fluoreszenz-Strahlung gelangt über das Objektiv **21**, die Tubuslinse **20** und das Scanobjektiv **19** zurück zum Scanner **18**, so daß in Rückrichtung nach dem Scanner **18** wieder ein ruhender Strahl vorliegt. Man spricht deshalb auch davon, daß der Scanner **18** die Fluoreszenz-Strahlung descannt. Die Probe wird auf der Linie parallel an mehreren Punkten gleichzeitig beleuchtet und abgetastet. Die Linie stellt somit eine Punktgruppe dar.

[0114] Der Hauptfarbteiler **17** läßt die in anderen Wellenlängenbereichen als die Anregungsstrahlung liegende Fluoreszenz-Strahlung passieren, so daß sie über einen Umlenkspiegel **24** im Detektormodul **5** umgelenkt und dann analysiert werden kann. Das Detektormodul **5** weist in der Ausführungsform der [Fig. 1](#) mehrere spektrale Kanäle auf, d.h. die vom Umlenkspiegel **24** kommende Fluoreszenz-Strahlung wird in einem Nebenfarbteiler **25** in zwei spektrale Kanäle aufgeteilt.

[0115] Jeder spektrale Kanal weist eine Schlitzblende **26** auf, die eine konfokale oder teil-konfokale Abbildung bezüglich der Probe **23** realisiert und deren Größe die Tiefenschärfe, mit der die Fluoreszenz-Strahlung detektiert werden kann, festlegt. Die Geometrie der Schlitzblende **26** bestimmt somit die Schnittebene innerhalb des (dicken) Präparates, aus der Fluoreszenz-Strahlung detektiert wird.

[0116] Der Schlitzblende **26** ist noch ein Blockfilter **27** nachgeordnet, das unerwünschte, in das Detektormodul **5** gelangte Anregungsstrahlung abblockt. Die derart abseparierte, aus einem bestimmten Tiefenabschnitt stammende, zeilenförmig aufgefächerte Strahlung wird dann von einem geeigneten Detektor **28** analysiert. Analog zum geschilderten Farbkanal ist auch der zweite spektrale Detektionskanal aufgebaut, der ebenfalls eine Schlitzblende **26a**, ein Blockfilter **27a** sowie einen Detektor **28a** umfaßt.

[0117] Neben der konfokalen Abtastung eines mit einer Brennlinie beleuchteten Probenbereiches ermöglicht das Laserscanningmikroskop **1** der [Fig. 1](#) in der dargestellten, diesbezüglich optionalen Bauweise auch weitere Betriebsarten. Dazu ist eine Halogenleuchte **29** vorgesehen, deren Strahlung über eine Lampenoptik **30** und einen Kondensor **31** entgegen der Blickrichtung der Scanoptik **19** auf die Probe **23** in einer Weitfeldbeleuchtung gerichtet wird. Von

dieser Beleuchtung transmittierte Anteile werden ebenfalls durch das Objektiv **21**, die Tubuslinse **20**, das Scanobjektiv **19** und den Scanner **18** im Scanverfahren abgetastet und mittels des Hauptfarbteilers **17** im Detektormodul **5** spektral analysiert. Die Detektion über den Scanner **18** bewirkt die Ortsauflösung in Form der Probenabtastung, und zugleich ist eine Weitfeldbeleuchtung über die Halogenlampe **29** möglich.

[0118] Das gleiche Konzept kann auch zur Auswertung rückreflektierter Strahlung und Epifluoreszenz-Strahlung eingesetzt werden, in dem über eine Quecksilberdampflampe **34** mit Lampenoptik **35** an einem Strahlteiler **36** Beleuchtungsstrahlung in den Tubus des Mikroskopmoduls **4** eingekoppelt wird. Diese Strahlung gelangt dann über das Objektiv **21** auf die Probe **23**. Auch hier erfolgt die Beleuchtung ohne Einwirkung des Scanners **18**. Die Detektion erfolgt dagegen wiederum über die Scanoptik **19** und den Scanner **18** im Detektormodul **5**. Das Detektormodul **5** hat für diese Weiterbildung somit eine Doppelfunktion, zum einen dient es als Detektor für gescannt eingestrahlte Anregungsstrahlung, wobei der Scanner **18** sowohl zur Einstrahlung der Anregungsstrahlung als auch zum Descannen der detektierenden Strahlung dient. Zum anderen wirkt das Detektormodul **5** als ortsauflösender Detektor, wenn auf die Probe nicht weiter strukturierte Strahlung eingestrahlt wird, nämlich entweder als Weitfeldbeleuchtung von unten oder über das Objektiv **21**.

[0119] Aber auch der Scanner **18** hat doppelte Wirkung, da er die Ortsauflösung durch punktgruppen- oder punktförmige Abtastung der Probe nicht nur bei punktgruppen- oder punktförmig eingestrahlter Anregungsstrahlung, sondern auch bei Weitfeldbeleuchtung erreicht.

[0120] Darüber hinaus ermöglicht das Laserscanningmikroskop **1** der [Fig. 1](#) nun einen Kombinationsbetrieb, bei dem sowohl punkt- oder punktgruppenförmig eingestrahlte Anregungsstrahlung aus dem Strahlungsquellenmodul **2** als auch Weitfeldbeleuchtung aus der Halogenlampe **29** bzw. der Quecksilberdampflampe **34** auf die Probe **23** gerichtet wird und mittels des Scanners **18** und des Detektormoduls **5** eine entsprechend punkt- oder punktgruppenförmige Abtastung der derlei mehrfach bestrahlten Probe erreicht wird. Durch geeignete Wahl der Nebenfarbteiler **25** bis **25c** kann somit die klassische Transmissions- oder Reflektionsmikroskopie mit Laserfluoreszenz-Messung kombiniert werden. Die so durch Abtastung mittels der Auswertung der Signale der Detektoren **28** bis **28c** gewonnenen Bildinformationen können dann eigenständig oder überlagert ausgewertet bzw. dargestellt werden.

[0121] Für die Weitfeldbeleuchtung ist vorzugsweise zwischen Lampenoptik **30** und Kondensor **31** eine

Feldblende vorgesehen, um den beleuchteten Bereich einstellen zu können. Weiter ist in den Kondensator **31** eine Aperturblende schaltbar. Sie liegt in konjugierter Lage zu den Pupillenebenen des Laserscanningmikroskops. Bei diesen Pupillenebenen handelt es sich um die Pupillenebene, in der der Scanner **18** liegt sowie die Ebene, in der der Hauptfarbteiler **17** angeordnet ist. Als Aperturblende sowie in der Pupillenebene kann man nun verschiedene optische Elemente einsetzen, um aus der klassischen Mikroskopie bekannte Kontrastierungsmethoden zu verwenden, wie beispielsweise Dunkelfeld, Phasenkontrast, VAREL-Kontrast oder Differenzialinterferenzkontrast. Geeignete Aperturblenden oder in die Pupillenebene einzubringenden Elemente sind beispielsweise in der Publikation „Microscopy from the very beginning“, Carl Zeiss Mikroskopie, D-07740 Jena, 1997, Seiten 18-23, erläutert sind. Der Offenbarungsgehalt dieser Firmenpublikation wird diesbezüglich explizit hier eingebunden. Für solche Kontrastierungseingriffe ist natürlich nicht nur die Pupillenebene geeignet. Auch andere Pupillenebenen sind dazu tauglich. Beispielsweise könnte der Eingriff auch in Nähe des Hauptfarbteilers **17** oder mittels einer Relayoptik nach dem Nebenfarbteiler **25** in einem (oder mehreren) spektralen Kanälen des Detektorstrahlenganges erfolgen.

[0122] Die Verwendung einer konfokalen Schlitz-Apertur im Detektormodul **5** ist nur beispielhaft. Prinzipiell können beliebige Mehrpunktanordnungen, wie Punktwolken oder Nipkow-Scheibenkonzepte, zur parallelen Punktgruppenabtastung verwendet werden. Wesentlich ist allerdings, daß der Detektor **28** ortsauflösend ist, damit eine parallele Erfassung mehrerer Probenpunkte beim Durchlauf des Scanners erfolgt.

[0123] Durch dieses Konzept entfallen die im Stand der Technik bislang erforderlichen nichtdeskannten Detektoren am Mikroskopmodul **4**. Außerdem kann durch die konfokale Detektion eine hohe Ortsauflösung erreicht werden, die ansonsten bei nichtdeskannter Detektion nur mit aufwendigen Matrixsensoren machbar wäre. Darüber hinaus können zeitliche Fluktuationen der einstrahlenden Weitfeldbeleuchtung, z.B. der Halogenlampe **29** oder der Quecksilberdampfampe **34** u.ä., können durch eine geeignete Integration im ortsauflösenden Detektor **28**, **28a** ausgeschaltet werden.

[0124] Für diese Betriebsart des Laserscanningmikroskops **1** ist natürlich der Hauptfarbteiler **17** sowie der Nebenfarbteiler **25** geeignet eingestellt. Dies ermöglicht auch, beide Beleuchtungsarten, d.h. Weitfeldbeleuchtung von unten und Beleuchtung durch das Objektiv **21** gleichzeitig vorzunehmen, wenn die Farbteiler als geeignete Dichroiten ausgestaltet sind. Auch sind beliebige Kombinationen mit gescannter Beleuchtung aus dem Strahlungsquellenmodul **2** mög-

lich. Eine entsprechende überlagerte grafische Darstellung der ausgewerteten Signale bietet dann eine gegenüber herkömmlichen Konzepten überragende Bildinformation.

[0125] Die Kombination einer konfokalen Zeilenabbildung, d.h. eines Linienscanners, mit einer spektralen mehrkanaligen Detektion ermöglicht eine hochparallele Datenaufnahme. Es ist eine Bildaufnahme rate von über 200 Bildern pro Sekunde erreichbar und eine Laserscanningmikroskopen bislang nicht realisierte Echtzeit-Fähigkeit gegeben. Alternativ ermöglicht das Laserscanningmikroskop **1** auch eine hochsensitive Detektion besonders schwacher Signalintensitäten. Verglichen mit einem konfokalen herkömmlichen Punkt-Laserscanningmikroskop ist bei gleicher Bildaufnahmezeit, bei gleicher in der Probe abgebildeter Fläche, bei gleichem Sehfeld und bei gleicher Laserleistung pro Pixel ein um einen Faktor \sqrt{n} verbessertes Signal-/Rauschverhältnis realisiert, wenn man mit n die Anzahl der Pixel in der Detektorzeile bezeichnet. Hierfür ist ein Wert von 500 bis 2.000 typisch.

[0126] Das Strahlquellenmodul **2** der Laserscanningmikroskops **1** erfüllt die dafür nötige Voraussetzung, nämlich daß die Beleuchtungszeile, die von der Strahlformungseinheit **16** bereitgestellt wird, die n -fache Leistung aufweist, wie der Laserfocus eines vergleichbaren konfokalen Punktscanners.

[0127] Alternativ kann im Vergleich zum konfokalen Einzel-Punktscanner bei gleicher Bildaufnahmezeit und gleichem Signal-/Rauschverhältnis die Probenbelastung, d.h. die Strahlungsmenge der die Probe ausgesetzt wird und die zum Ausbleichen der Probe führen kann, um den Faktor n gesenkt werden, wenn die bislang in einem konfokalen Punktscanner aufgewandte Strahlungsleistung nun auf die Zeile verteilt wird.

[0128] Das zeilenabtastende Laserscanningmikroskop mit der Strahlformungseinheit **16** ermöglicht also im Vergleich zum konfokalen Punktscannern, intensitätsschwache Signale empfindlicher Proben-substanzen bei gleichen Signal-/Rauschverhältnis und gleicher Probenbelastung um den Faktor n schneller, bei gleicher Aufnahmezeit mit einem um den Faktor \sqrt{n} verbesserten Signal-/Rauschverhältnis oder bei gleicher Aufnahmezeit mit gleichem Signal-/Rauschverhältnis und einer um den Faktor n geringeren Probenbelastung abzubilden.

[0129] [Fig. 2](#) zeigt im Detail eine Ausführungsform für ein Strahlungsquellenmodul **2**, ein Scanmodul **3** sowie ein Detektormodul **5** für das Laserscanningmikroskop **1**. Bereits in [Fig. 1](#) erscheinende Bauteile sind in [Fig. 2](#) mit denselben Bezugszeichen bezeichnet, weshalb bezüglich der Beschreibung der [Fig. 2](#) zumindest teilweise auf die [Fig. 1](#) verwiesen wird.

[0130] In [Fig. 2](#) ist zu sehen, daß die nach den beweglichen, d.h. verschieblichen Kollimatoren **12** und **13** vorliegenden Gauß'schen Strahlenbündel über eine Spiegelreihe in Form der Strahlvereinigungsspiegel **14**, **16** vereinigt und anschließend in ein Strahlbündel mit rechteckigem Strahlquerschnitt konvertiert werden. Im einfachsten Fall handelt es sich bei der Strahlformungseinheit **16** der [Fig. 1](#) um eine Zylinderoptik. In der Ausführungsform der [Fig. 2](#) wird jedoch ein Zylinderteleskop **37** verwendet, dem eine Asphäreneinheit **38** nachgeordnet ist, auf das eine Zylinderoptik **39** folgt. Bauweise und Funktion der Asphäreneinheit **37** werden nun nachfolgend anhand der [Fig. 3](#) bis [Fig. 7](#) erläutert.

[0131] Die [Fig. 3](#) und [Fig. 4](#) zeigen eine Beleuchtungsanordnung, mit der Strahlung der Strahlquellen hinsichtlich des Strahlprofils umgeformt werden kann. [Fig. 3](#) ist ein Schnitt in einer (z,x)-Ebene; [Fig. 4](#) ist ein Schnitt senkrecht dazu in einer (z,y)-Ebene. Ursprünglich liegt ein Strahl vor, der in jeder Schnitttrichtung senkrecht zur Ausbreitungsrichtung gaußförmig profiliert ist. Nach der Umformung liegt in einer Profilebene P ein Strahl vor, der im wesentlichen ein rechteckiges Feld ausleuchtet, wobei die Intensitätsverteilung entlang der Feldlängsachse nicht gaußförmig sondern kastenförmig ist.

[0132] Zur Strahlumformung wird ein Asphärenspiegel **38.1** genutzt, der die Strahlung aufweitet. Die aufgeweitete Strahlung wird mittels eines Sammelspiegels **38.2** wieder parallelisiert. Der Asphärenspiegel **38.1** ist mit einem Ursprungsstrahl **38.3** aus der Strahlquelle beaufschlagt, der ein rotationssymmetrisches gaußförmiges Strahlprofil aufweist. Der Asphärenspiegel **38.1** ist in dem in [Fig. 3](#) dargestellten Schnitt gemäß einem Krümmungsradius r_x gekrümmt, in dieser Ebene also sphärisch. Die asphärische Komponente kommt erst in dem in [Fig. 4](#) dargestellten und noch zu erläuternden Schnitt zum Tragen. Aufgrund der Sphärizität des Asphärenspiegels **38.1** entlang der x-Achse wird der vom Asphärenspiegel **38.1** abgegebene divergierende Strahl unter Beibehaltung des Gaußprofils aufgeweitet. Der Sammelspiegel **38.2**, der in der Schnittebene der [Fig. 3](#) ebenfalls sphärisch ist, sorgt für einen profilierten Strahl **38.5**, der in der Profilebene P in der Schnittdarstellung der [Fig. 3](#) ebenfalls Gaußprofil hat. Natürlich kann man, wenn diese Aufweitung unerwünscht ist, Asphärenspiegel **38.1** und Sammelspiegel **38.2** in der (z,x)-Ebene auch plan ausführen.

[0133] [Fig. 4](#) zeigt einen Schnitt senkrecht zur [Fig. 3](#). In dieser Ebene ist der Asphärenspiegel **38.1** asphärisch ausgebildet und der von der Strahlquelle abgegebene Ursprungsstrahl **38.3** wird nun energieumverteilend in einen divergierenden Strahl **38.4** umgesetzt. Der Asphärenspiegel **38.1** reflektiert mit zunehmenden Winkel zur optischen Achse OA zunehmend Strahlleistung, so daß im divergierenden Strahl

38.4 in der Schnittdarstellung der [Fig. 2](#) Energie umverteilt. Der Sammelspiegel **2** sammelt den in der Schnittdarstellung der [Fig. 4](#) im Querschnitt nicht mehr gaußförmigen, divergierenden Strahl **4** und parallelisiert die Strahlung zu einem profilierten Strahl **38.5**. In dieser Ebene ist deshalb in [Fig. 4](#) im Gegensatz zu [Fig. 3](#) eine nicht äquidistante Verteilung der zur Veranschaulichung eingezeichneten Teilstrahlen gezeigt.

[0134] Die Wirkung des in [Fig. 3](#) und [Fig. 4](#) auch mit einer konvexen Krümmung versehenen Asphärenspiegels **38.1** wird noch besser erkennbar, wenn man dessen in [Fig. 5](#) exemplarisch dargestellte Spiegelfläche **38.6** betrachtet. Die Spiegelfläche **38.6** weist zwei Dachflächen **38.7**, **38.8** auf, die in einem First **38.9** zusammenlaufen. Gleichzeitig ist die Spiegelfläche **38.6** entlang der x-Achse sphärisch gekrümmt (ein optionales Merkmal, s.o.), wie auch an der Krümmung des Firstes **38.9** deutlich wird. Die Spiegelfläche **38.6** ist also in einem (z,y)-Schnitt (parallel zur y-Achse) kegelig mit abgerundeter Spitze. In einem Schnitt parallel zur x-Achse ((z,x)-Schnitt) liegt dagegen eine sphärische Krümmung vor. Natürlich kann anstelle der sphärischen Krümmung längs der x-Achse eine plane Ausbildung oder ebenfalls eine asphärische Krümmung verwendet werden.

[0135] Die asphärische Krümmung in der (z,y)-Ebene bewirkt die in [Fig. 4](#) dargestellte Energieumverteilung, da durch das nur im Bereich der Spitze abgerundete Kegelprofil in zunehmende Winkel zur optischen Achse auch zunehmende Energieanteile reflektiert werden. Die sphärische Krümmung in der (z,x)-Ebene bewirkt dagegen eine profilbeibehaltende Aufweitung des Strahls, wie sie in [Fig. 3](#) dargestellt ist. Das ursprüngliche, rotationssymmetrische gaußförmige Profil wird somit zu einem annähernd rechteckigen Profil umgestaltet. Bei Asphärität in beiden Schnittebenen ist das Feld in beiden Schnittebenen homogenisiert.

[0136] [Fig. 6](#) zeigt eine Schnittlinie **38.12** der Spiegelfläche **38.6** in einem (z,y)-Schnitt, d. h. in einem Schnitt längs der y-Achse. Die Schnittlinie **38.12** ist zur Verdeutlichung nicht nur in [Fig. 6](#) sondern auch als dickere Linie in [Fig. 5](#) eingetragen. Ihre Form ist im wesentlichen durch zwei geometrische Faktoren bestimmt – zum einen durch eine Parabel **38.10**, die die Form der abgerundeten Spitze der Schnittlinie **38.12** festlegt, und zum anderen durch eine Asymptote **38.13**, die den Verlauf der Schnittlinie **38.12** fern der Spitze **38.11** definiert. Die Parabel **38.10** kann durch Angabe eines Krümmungsradius für die Spitze definiert werden. Die Asymptote **38.13** ist durch eine konische Konstante Q festgelegt. Für gegen Unendlich gehende y-Werte nähert sich die Schnittlinie **12** an die Gerade $1/(Q \cdot c) + y/(1 - (1 + Q)^{1/2})$ an. Die konische Konstante Q bestimmt also den Anstieg $1/(1 - (1 + Q)^{1/2})$ im äußeren sphärischen Bereich. Der Ra-

dius c legt die Krümmung im Bereich der Spitze **38.11** fest. Insgesamt wird die Schnittlinie deshalb durch die Gleichung $y^2/[c + (c^2 - (1 + Q)y^2)^{1/2}]$ definiert.

[0137] Die für eine Schnittrichtung erläuterte Asphärität kann natürlich auch in der anderen Schnittrichtung vorgesehen werden. Man erreicht damit ein homogen ausgeleuchtetes ellipsen- oder kreisförmiges Feld; letzteres bei einem rotationssymmetrischen Asphärenspiegel **38.1**. Alternativ kann auf die Sphärität in der x -Richtung verzichtet werden. Der Asphärenspiegel **38.1** hat dann zu jeder x -Koordinate die Profilform der Schnittlinie **38.12**.

[0138] Die in **Fig. 5** dargestellte Spiegelfläche hat einen Krümmungsradius $c = 10$ mm, eine konische Konstante $Q = -100$ sowie einen Krümmungsradius entlang der x -Achse von $r_x = 100$ mm. Der Parameter r_x wird üblicherweise sehr viel größer als der Durchmesser des Ursprungsstrahls **38.3** gewählt werden.

[0139] **Fig. 7** zeigt als Profil **38.14** dargestellte annähernde Gleichverteilung der Intensität **1** in der Profilebene als Darstellung entlang der y -Achse. Wie zu sehen ist, liegt in 80% des ausgeleuchteten Bereiches die Strahlungsintensität bei über 80% des Maximalwertes; ist also im wesentlichen homogen. Das Profil **38.14** ist annähernd kastenförmig, jedenfalls einem Rechteck sehr viel näher als dem ursprünglich vorhandenen Gaußprofil. Bei Asphärität in beiden Raumrichtungen wäre in **Fig. 7** statt „ y “, der Radius eines ausgeleuchteten Feldes aufgetragen.

[0140] Die konvexe oder konkave Spiegelfläche **38.6** des Asphärenspiegel **38.1** kann auf verschiedenste Weise gefertigt werden. So kann in einen Zylinder, der einen Krümmungsradius hat, der dem Krümmungsradius r_x der Spiegelfläche in der (z,x) -Ebene entspricht, das der Schnittlinie **38.12** entsprechende Profil eingearbeitet werden. Will man eine Spiegelfläche **38.6**, die in der (z,x) -Ebene nicht gekrümmt ist, d. h. deren Krümmungsradius in dieser Schnittebene als unendlich angenommen werden kann, kann die Bearbeitung an einem Quader oder Keil erfolgen, der dann im Bereich des Firstes entsprechend der durch die Parabel **38.10** vorgegebenen Krümmung c abgerundet wird. Bei r_x Radien kleiner 0 können Replika- oder Abformtechniken zur Ausbildung der Spiegelfläche **38.6** des Asphärenspiegels **38.1** eingesetzt werden.

[0141] Zur Erzeugung des profilierten Strahles **38.5** ist dem Asphärenspiegel **38.1**, wie in den **Fig. 3** und **Fig. 4** gezeigt, ein Sammelspiegel **38.2** nachgeordnet. Dieser ist z. B. als torischer Spiegel mit Krümmungsradien r_{tx} , r_{ty} ausgebildet und parallelisiert den divergierenden Strahl **38.4**. Dabei läuft der divergierende Strahl **38.4** sowohl bedingt durch die sphärische Krümmung (in der (z,x) -Ebene) des Asphärenspiegel **38.1** als auch durch das asphärische Profil

gemäß der Schnittlinie **38.12** bedingt auseinander. Zur Kollimation des divergierenden Strahles **38.4** ist der Sammelspiegel **38.2** deshalb als torischer Spiegel mit unterschiedlichen Krümmungsradien r_{tx} und r_{ty} ausgebildet. Die erstgenannte Divergenz stellt die Höhe des vom profilierten Strahl **38.5** auszuleuchtenden rechteckigen Feldes ein, die zweitgenannte Divergenz bewirkt die Aufweitung entlang der längeren Ausdehnung.

[0142] Um die Höheneinstellung des auszuleuchtenden rechteckigen Feldes besonders einfach vornehmen zu können, wird für den torischen Spiegel der Radius r_{tx} als $r_{tx} + 2 \cdot d$ gewählt, wobei d den Abstand zwischen Asphärenspiegel **38.1** und Sammelspiegel **38.2** auf der optischen Achse beschreibt. Man erhält dann einen Strahlaufweitungsfaktor von r_{tx}/r_x und damit etwa $1 + 2d/r_x$.

[0143] Anstelle des Sammelspiegels **38.2** kann natürlich auch eine entsprechende achromatische torische Linse verwendet werden. Ferner kann zur Behebung des veränderten Bündeldurchmessers quer zur homogenisierten Richtung mindestens ein Zylinderspiegel eingesetzt werden, welcher so dimensioniert ist, daß er zusammen mit dem Radius r_x des Asphärenspiegels **38.1** sowie dem Radius r_{tx} des Sammelspiegels **38.2** die Fokussierung und den Bündeldurchmesser quer zur homogenisierten Richtung gezielt verändert. Dieser Zylinderspiegel kann vor dem Asphärenspiegel **38.1** oder nach dem torischen Sammelspiegel **38.2** angeordnet werden. Seine Funktion kann man auch durch mindestens eine achromatische Zylinderlinse erreichen.

[0144] Die Beleuchtungsanordnung mit dem Asphärenspiegel **38.1** kann zur gleichmäßigen Füllung einer Pupille zwischen einer Tubuslinse und einem Objektiv dienen. Damit kann die optische Auflösung des Objektivs voll ausgeschöpft werden. Diese Variante ist zweckmäßig in einem punkt-scannenden Mikroskopsystem oder in einem linien-scannenden System (bei letzterem zusätzlich zu der Achse, in der auf bzw. in die Probe fokussiert wird).

[0145] Die wie erklärt linienförmig konditionierte Anregungsstrahlung wird auf den Hauptfarbteiler ¹⁷ gelenkt. Dieser ist in einer bevorzugten Ausführungsform als spektral-neutraler Teilerspiegel gemäß der DE 10257237 A1 ausgeführt, deren Offenbarungsgelalt hier vollumfänglich einbezogen ist. Der Begriff „Farbteiler“ umfaßt also auch nichtspektral wirkende Teilersysteme. Anstelle des beschriebenen spektral unabhängigen Farbteilers kann auch ein homogener Neutralteiler (z.B. 50/50, 70/30, 80/20 o.ä.) oder ein dichroitischer Teiler Verwendung finden. Damit applikationsabhängig eine Auswahl möglich ist, ist der Hauptfarbteiler vorzugsweise mit einer Mechanik versehen, die einen einfachen Wechsel ermöglicht, beispielsweise durch ein entsprechendes Tellerrad, das

einzelne, austauschbare Teiler enthält.

[0146] Ein dichroitischer Hauptfarbteiler ist besonders dann vorteilhaft, wenn kohärente, d. h. gerichtete Strahlung detektiert werden soll, wie z.B. Reflexion, Stokes'sche bzw. anti-Stokes'sche Raman-Spektroskopie, kohärente Raman-Prozesse höherer Ordnung, allgemein parametrische nicht-lineare optische Prozesse, wie Second Harmonic Generation, Third Harmonic Generation, Sum Frequency Generation, Zwei- und Mehrfotonenabsorption bzw. Fluoreszenz. Mehrere dieser Verfahren der nicht-linearen optischen Spektroskopie erfordern den Einsatz zweier oder mehrerer Laserstrahlen, die kollinear überlagert werden. Hierbei erweist sich die dargestellte Strahlvereinigung der Strahlung mehrerer Laser als besonders vorteilhaft. Grundsätzlich können die in der Fluoreszenzmikroskopie weitverbreiteten dichroitischen Strahlteiler verwendet werden. Auch ist es für Raman-Mikroskopie vorteilhaft vor den Detektoren holografische Notch-Teiler oder -Filter zu Unterdrückung des Rayleigh-Streuanteils zu verwenden.

[0147] Vorteilhafterweise wird, wie in [Fig. 2](#), [Fig. 12](#), [Fig. 14](#) und [Fig. 15](#) gezeigt, die Anregungsstrahlung bzw. Beleuchtungsstrahlung dem Scanner **18** über eine motorisch ansteuerbare Zoom-Optik **41** zugeführt. Damit kann der Zoom-Faktor angepaßt werden und das abgetastete Sehfeld ist in einem bestimmten Verstellbereich kontinuierlich variierbar. Besonders vorteilhaft ist eine Zoom-Optik, bei der während Anpassung der Fokusslage und des Abbildungsmaßstabes die Pupillenlage im kontinuierlichen Durchstimmvorgang erhalten bleibt. Die z. B. in [Fig. 2](#) dargestellten, durch Pfeile symbolisierten, drei Freiheitsgrade der Zoom-Optik **41** entsprechen genau der Zahl der Freiheitsgrade, die zur Anpassung der drei Parameter, Abbildungsmaßstab, Fokus-, Pupillenlage, vorgesehen sind. Besonders bevorzugt ist eine Zoom-Optik **41**, an deren ausgangsseitigen Pupille eine feste Blende **42** angeordnet ist. In einer praktischen einfachen Realisierung kann die Blende **42** auch durch die Begrenzung der Spiegelfläche des Scanners **18** vorgegeben sein. Die ausgangsseitige Blende **42** mit der Zoom-Optik **41** erreicht, daß unabhängig vom Verstellen der Zoomvergrößerung immer ein festgelegter Pupillendurchmesser auf das Scanobjektiv **19** abgebildet wird. Somit bleibt die Objektivpupille auch bei beliebiger Verstellung der Zoomoptik **41** vollständig ausgeleuchtet. Die Verwendung einer eigenständigen Blende **42** verhindert vorteilhaft das Auftreten ungewollter Streustrahlung im Bereich des Scanners **18**.

[0148] Mit der Zoom-Optik **41** wirkt das Zylinderteleskop **37** zusammen, das ebenfalls motorisch betätigbar ist und der Asphäreneinheit **38** vorgeordnet ist. Dies ist in der Ausführungsform der [Fig. 2](#) aus Gründen eines kompakten Aufbaus gewählt, muß aber nicht so sein.

[0149] Wird ein Zoom-Faktor kleiner 1,0 gewünscht, wird das Zylinderteleskop **37** automatisiert in den optischen Strahlengang eingeschwenkt. Es verhindert, daß die Aperturblende **42** unvollständig ausgeleuchtet ist, wenn das Zoomobjektiv **41** verkleinert ist. Das einschwenkbare Zylinderteleskop **37** gewährleistet somit, daß auch bei Zoom-Faktoren kleiner 1, d. h. unabhängig von der Verstellung der Zoomoptik **41** am Ort der Objektivpupille stets eine Beleuchtungslinie konstanter Länge vorliegt. Im Vergleich zu einem einfachen Sehfeld-Zoom sind somit Laserleistungsverluste in dem Beleuchtungsstrahl vermieden.

[0150] Da beim Einschwenken des Zylinderteleskops **37** ein Bildhelligkeitssprung in der Beleuchtungslinie unvermeidlich ist, ist in der (nicht dargestellten) Steuereinheit vorgesehen, daß die Vorschubgeschwindigkeit des Scanners **18** oder ein Verstärkungsfaktor der Detektoren im Detektormodul **5** bei aktiviertem Zylinderteleskop **37** entsprechend angepaßt ist, um die Bildhelligkeit konstant zu halten.

[0151] [Fig. 18](#) zeigt schematisch eine mögliche Ausführungsform für den Strahlengang der [Fig. 1](#) zwischen dem Hauptfarbteiler **17** und einer im Mikroskopmodul **4** angeordneten Probe **23**. Die Zoom-Optik **41**, die zur Vereinfachung in der Darstellung der [Fig. 19](#) nur zweigliedrig eingetragen ist, bewirkt im Beleuchtungsstrahlengang BS eine Pupillenabbildung. Gleichzeitig entsteht im Gegenstandsstrahlengang GS, der in [Fig. 18](#) gestrichelt gezeichnet ist, ein Zwischenbild ZB1 in der Zoom-Optik **41**. Die Zoom-Optik **41** fokussiert von Unendlich nach Unendlich. Die Ausgangspupille AP der Zoom-Optik **41** ist zweckmäßigerweise, wie bereits erwähnt, durch die Blende **42** beschnitten, so daß unabhängig vom Verstellen der Zoomvergrößerung immer ein festgelegter Pupillendurchmesser am nachgeordneten Scanobjektiv **19** vorliegt. Im Mikroskopmodul **4** ist zwischen Tubuslinse **20** und Objektiv **21** in der Objektivpupille OP eine Objektivblende OB angeordnet, die durch die Austrittspupille AP gefüllt oder sogar überausgeleuchtet wird. Dadurch kann die maximale Objektivauflösung erreicht werden.

[0152] [Fig. 19](#) zeigt die Wirkung der Blende **42** für die Füllung der Objektivpupille OP. Dabei ist auf der vertikalen Achse der Pupillendurchmesser d und auf der horizontalen Achse die von der Zoom-Optik **41** bewirkte Vergrößerung v aufgetragen. Kurve **60** ist die Funktion, gemäß der sich der Pupillendurchmesser ohne die Blende **42** ändern würde. Die gestrichelte Linie **61** zeigt den Pupillendurchmesser nach der Blende **42** in Abhängigkeit von der Vergrößerung v . Die strichpunktierte Linie **62** veranschaulicht schließlich den Verlauf des Pupillendurchmessers der Objektivpupille OP. Wie zu sehen ist, ist durch die Objektivblende OB, die kleiner als die Blende **42** ist, die Objektivpupille unabhängig von der Vergrößerung v . Natürlich kann die Objektivblende OB auch durch ent-

sprechende Fassungen im Objektiv **21** gegeben sein; es muß sich nicht um ein separates Bauteil handeln.

[0153] Die [Fig. 20a/b](#), [Fig. 21a/b](#) sowie [Fig. 22a/b](#) zeigen unterschiedliche Einstellungen des Zoomobjektivs **41**, wobei die Darstellung gegenüber der Darstellung der [Fig. 19](#) invertiert ist, d. h. die Beleuchtungsrichtung verläuft in den [Fig. 20](#) bis [22](#) von links nach rechts. Weiter ist in den [Fig. 20](#) bis [22](#), wie in [Fig. 19](#) auch, zur Vereinfachung der Scanner **18** nicht eingezeichnet. Wie zu sehen ist, besteht in der exemplarisch gezeigten Bauweise das Zoom-Objektiv aus vier optischen Gruppen G1 bis G4, wobei die Gruppe G1 positive Brechkraft hat und fest angeordnet ist. Die zweite Gruppe G2 hat negative Brechkraft und wird zusammen mit den Gruppen G3 und G4, die wieder positive Brechkraft haben, bewegt. Die Bewegung erfolgt derart, daß die Fokussierung von unendlich nach unendlich erhalten bleibt und die Vergrößerung bzw. die Pupillenlage je nach Betriebsart eingestellt wird.

[0154] Weiter ist es in einer Ausbildungsvariante zweckmäßig, die Gruppe G1 mit dem nachfolgenden Scanobjektiv als Einheit auszubilden; in dieser Variante ist das Scanobjektiv also in Beleuchtungsrichtung vor dem (nicht gezeigten) Scanner angeordnet.

[0155] Jede Gruppe besteht aus mindestens einer Linse. Um den Anforderungen an den gewünschten Spektralbereich sowie die angestrebte Apertur/Feldwinkel zu genügen, sind die Gruppen bezüglich der Abbildungsfehler so weit wie möglich in sich korrigiert.

[0156] Die [Fig. 23](#) bis [Fig. 25](#) zeigen schematisch und beispielhaft die Bewegung der Variooptik mit den Gruppen G1 bis G4, wobei die Brennweiten wie folgt lauten: Brennweite G1, 45 mm; Brennweite G2, -153 mm; Brennweite G3, 45 mm; Brennweite G4, 89 mm. Die Brennweiten skalieren mit der Übertragungslänge L.

[0157] Zur Veranschaulichung ist in den [Fig. 23](#) bis [Fig. 25](#) weiter die Lage der Austrittspupille AP sowie der Eintrittspupille EP eingezeichnet. Die Übertragungslänge L ergibt sich aus dem Abstand zwischen Eintrittspupille EP und Austrittspupille AP. Für [Fig. 20a](#) ist darüber hinaus die z-Koordinate, die entlang der optischen Achse gemessen wird, für die vier Gruppen G1 bis G4 eingetragen. Die Eintrittspupille ist dabei auf Position 0 gesetzt.

[0158] Die mit a bezeichneten Figuren zeigen jeweils eine Schnittebene, die gegenüber den mit b bezeichneten Figuren um 90° gedreht ist. Somit enthalten die [Fig. 20a](#), [Fig. 21a](#) und [Fig. 22a](#) den Pupillenstrahlengang sowie die [Fig. 20b](#), [Fig. 21b](#) sowie [Fig. 22b](#) den Objektstrahlengang. Aufgrund der im Ausführungsbeispiel verwendeten konfokalen

Schlitzblendenanordnung mit linienförmiger Beleuchtung liegt im Objektstrahlengang immer dann eine Linie vor, wenn im Pupillenstrahlengang eine Pupille bzw. in den [Fig. 20a](#), [Fig. 21a](#), [Fig. 22a](#) ein Knotenpunkt vorliegt. Bei einer andersartigen konfokalen Abbildung (z. B. mit Nipkow-Scheibe, Multipunktschanner, Einzelpunktschanner) sind die Verhältnisse natürlich anders.

[0159] In den [Fig. 21a/b](#) ist ein Vergrößerungsfaktor $v = 1,4$ eingestellt, wogegen die Stellung der [Fig. 22a/b](#) bei gleicher Abbildungslänge eine Vergrößerung von $v = 2,0$ bewirkt. Gegenüber den Abbildungslängen der [Fig. 21](#) und [22](#) ist in der Einstellung der [Fig. 20a/b](#) die Abbildungslänge beim selben Vergrößerungsfaktor wie [Fig. 21a/b](#) um 10 mm verlängert. Die in den Figuren eingezeichnete Lage der Austrittspupille AP zeigt dies deutlich.

[0160] Das Zoomobjektiv **41** kann also in zwei unterschiedlichen Betriebsmodi betrieben werden. Zum einen ist es möglich, die Vergrößerung v bei konstanter Abbildungslänge L zu verstellen. Eine Verstellung von der in [Fig. 21a/b](#) gezeichneten Lage in die Lage gemäß Figuren [22a/b](#) ist beispielsweise ein Betrieb im ersten Betriebsmodus, der einen Scanfeld-Zoom verwirklicht. Die dafür möglichen Einstellungen der Gruppen G2 bis G4 sind in [Fig. 23](#) zu sehen, in der die Koordinaten der Gruppen G1 bis G4 auf der z-Achse, wie sie zur [Fig. 20a](#) eingetragen ist, als Funktion der Vergrößerung v aufgetragen sind.

[0161] Der Begriff „Vergrößerung“ ist hier wiederum auf die Wirkung der Zoom-Optik, d. h. die Bildvergrößerung bezogen. Eine Bildvergrößerung wird natürlich dann erreicht, wenn die Zoom-Optik in Beleuchtungsrichtung tatsächlich eine Verkleinerung des zugeführten Bildes der Beleuchtungsquelle zur Folge hat, d. h. wenn beispielsweise eine Brennlinie verkürzt wird.

[0162] Entgegen der Beleuchtungsrichtung, d. h. in Detektionsrichtung, findet dagegen eine Vergrößerung statt.

[0163] [Fig. 24](#) zeigt einen zweiten Betriebsmodus, der mit konstanter Vergrößerung die Übertragungslänge verändert. Da die Auftragung entlang der z-Achse in Millimeter vorgenommen ist, sieht man deutlich, daß durch eine Verstellung der Zoom-Optik die Übertragungslänge z. B. um bis zu 20 mm variiert werden kann. Die Lage der Austrittspupille AP verschiebt sich gegenüber der (bei 0 mm befindlichen) Eintrittspupille sich von 180 auf 200 mm. Die Werte der Figur betreffen dabei eine Veränderung der Übertragungslänge bei einem Vergrößerungsfaktor von 1,0.

[0164] [Fig. 25](#) zeigt eine Betriebsweise, die eine Mischung aus der genannten ersten Betriebsweise

([Fig. 23](#)) sowie der zweiten Betriebsweise ([Fig. 24](#)) ist. Mit der gezeigten Ansteuerung der Optikgruppen G2 bis G4 (Optikgruppe G1 wird wiederum nicht verstellt) wird die Vergrößerung v gleichzeitig mit der Übertragungslänge L (letzteres ergibt sich aus der veränderten Lage der Austrittspupille in [Fig. 25](#)) variiert.

[0165] [Fig. 20](#) zeigt, wie mit Hilfe der Zoom-Optik **41** innerhalb des zur Verfügung stehenden maximalen Scanfeldes SF ein Bereich (region of interest) ROI ausgewählt werden kann. Beläßt man die Ansteuerung des Scanners **18** so, daß die Amplitude sich nicht verändert, wie dies beispielsweise bei Resonanz-Scanner zwingend erforderlich ist, bewirkt eine an der Zoom-Optik eingestellte Vergrößerung größer 1,0 eine Einengung des ausgewählten Bereiches ROI zentriert um die optische Achse des Scanfeldes SF. Steuert man den Scanner so an, daß er ein Feld asymmetrisch zur optischen Achse, d. h. zur Ruhelage der Scannerspiegel abtastet, so erhält man im Zusammenhang mit einer Zoomwirkung eine Offsetverschiebung OF des ausgewählten Bereiches ROI. Dies wird auch als „crop“-Funktion bezeichnet.

[0166] Durch die bereits erwähnte Wirkung des Scanners **18**, zu descannen, und durch den nochmaligen Durchlauf durch die Zoom-Optik **41**, wird die Auswahl des interessierenden Bereiches ROI im Detektionsstrahlengang wieder in Richtung auf den Detektor hin aufgehoben. Somit kann man eine beliebige innerhalb des Scanbildes SF liegende Auswahl für den Bereich ROI treffen. Zusätzlich kann man für verschiedene Auswahlen des Bereiches ROI Bilder gewinnen und diese dann zu einem hochauflösenden Bild zusammensetzen.

[0167] Möchte man den ausgewählten Bereich ROI nicht nur um einen Offset OF gegenüber der optischen Achse verschieben, sondern auch zusätzlich drehen, ist eine Ausführungsform zweckmäßig, die in einer Pupille des Strahlenganges zwischen Hauptfarbteiler **17** und Probe **23** ein Abbe-König-Prisma vorsieht, das bekanntermaßen eine Bildfeldrotation zur Folge hat. Auch diese wird in Richtung auf den Detektor hin wieder aufgehoben. Nun kann man Bilder mit verschiedenen Offsetverschiebungen OF und verschiedenen Drehwinkeln messen und anschließend zu einem hochauflösenden Bild verrechnen, beispielsweise gemäß einem Algorithmus, wie er in der Veröffentlichung, Gustafsson, M., „Doubling the lateral resolution of wide-field fluorescence microscopy using structured illumination“, in „Three-dimensional and multidimensional microscopy: Image acquisition processing VII“, Proceedings of SPIE, Vol. 3919 (2000), p 141–150, beschrieben ist.

[0168] Neben der motorisch angetriebenen Zoomoptik **41** sowie dem motorisch aktivierbaren Zylinderteleskop **37** sind auch im Detektormodul **5** des Laser-

scanningmikroskops der [Fig. 2](#) fernsteuerbare Justierelemente vorgesehen. Zur Kompensation von Farbblängsfehlern sind beispielsweise vor der Schlitzeblende eine Rundoptik **44** sowie eine Zylinderoptik **39** und unmittelbar vor dem Detektor **28** eine Zylinderoptik **39** vorgesehen, die jeweils in axialer Richtung motorisch verschiebbar sind.

[0169] Zusätzlich ist zur Kompensation eine Korrekturereinheit **40** vorgesehen, die nachfolgend anhand der [Fig. 8](#) bis [Fig. 11](#) beschrieben wird.

[0170] [Fig. 8](#) zeigt schematisch eine Ausführungsform für das Detektormodul **5** des Laserscanningmikroskops **1**. Es weist als Detektor **28** eine CCD-Zeile **43** auf, die über den Farbteiler **25** in den Strahlengang des Laserscanningmikroskops **1** eingebunden ist. Der Farbteiler **25** ist wechselbar, um mit Strahlung unterschiedlicher Wellenlängenbereiche erfassen zu können. Die Anpaßbarkeit durch den wechselbaren Farbteiler **25** kann dabei sowohl hinsichtlich im Laserscanningmikroskop verwendeter Anregungsstrahlung als auch hinsichtlich zu detektierender (Fluoreszenz-)Strahlung gegeben sein.

[0171] Die CCD-Zeile **43** erhält über den Farbteiler **25** Strahlung, die dann durch die als konfokale Blende wirkende Schlitzeblende **26** auf die CCD-Zeile **43** fällt.

[0172] Die Schlitzeblende **26** bildet zusammen mit einer vorgeordneten Rundoptik **44** sowie der ebenfalls vorgeordneten ersten Zylinderoptik **39** sowie der nachgeordneten zweiten Zylinderoptik ein Pinhole-Objektiv der Detektoranordnung **5**, wobei das Pinhole hier durch die Schlitzeblende **26** realisiert ist.

[0173] Der zur Fluoreszenzanregung beleuchtete linien- oder zeilenförmige Bereich der Probe **23**, der konfokal abgebildet wird, ist in [Fig. 8](#) schematisch dargestellt. Um eine unerwünschte Detektion von im System reflektierter Anregungsstrahlung an der CCD-Zeile **43** zu vermeiden, ist der zweiten Zylinderlinse **39** noch das Blockfilter **27** vorgeschaltet, das über geeignete spektrale Eigenschaften verfügt, um lediglich gewünschte Fluoreszenzstrahlung zu CCD-Zeile **43** gelangen zu lassen.

[0174] Ein Wechsel des Farbteilers **25** oder des Blockfilters **27** bringt unvermeidlich einen gewissen Kipp- oder Keilfehler bei Einschwenken mit sich. Der Farbteiler kann einen Fehler zwischen Probenbereich und Schlitzeblende **26**, das Blockfilter **27** einen Fehler zwischen Schlitzeblende **26** und CCD-Zeile **43** nach sich ziehen. Um zu verhindern, daß dann eine Neujustierung der Lage der Schlitzeblende **26** bzw. der CCD-Zeile **43** erforderlich ist, ist zwischen der Rundoptik **44** und der Schlitzeblende **26**, d.h. im Abbildungsstrahlengang zwischen Proben **23** und CCD-Zeile **43** die planparallele Platte **40** angeordnet,

die unter Steuerung eines Controllers C in verschiedene Kippstellungen gebracht werden kann. Die planparallele Platte **40** ist dazu in einer geeigneten (in [Fig. 8](#) nicht dargestellten) Halterung angebracht, die später noch anhand der [Fig. 11](#) erläutert werden wird.

[0175] Die planparallele Platte **40** bewirkt einen Parallelversatz, der in [Fig. 8](#) als leichter Versatz der optischen Achse OA eingezeichnet ist. Dieser Parallelversatz ist schematisch auch in [Fig. 10](#) zu sehen, die eine (später noch zu erläuternde) Ausführungsform einer zweiteiligen planparallelen Platte **40** betrifft. Das auf die Platte **40** schräg zur Plattenoberfläche einfallende Strahlenbündel E tritt als versetztes Strahlenbündel A aus. Ohne planparallele Platte **40** wäre der in [Fig. 10](#) gestrichelt eingezeichnete ausfallende Strahl gegeben.

[0176] Eine Veränderung der Kippstellung der planparallelen Platte **40** ermöglicht es, die Lage der Probenzeile gegenüber der Schlitzblende **26** (sowie bei Einsatz der Platte **40** nach der Schlitzblende **26** alternativ auch die Lage der Blende zur ebenfalls als Blende wirkenden CCD-Zeile **43**) so zu justieren, daß für gegebene Verhältnisse im Strahlengang, die sich durch Wechsel des Farbteilers **25** ändern mögen, immer eine optimale, d.h. zweiachsig zentrierte Lage gegeben ist. Dies ist in [Fig. 9](#) veranschaulicht, die in Draufsicht die Projektion der Schlitzblende **26** auf die Probenzeile **23** zeigt. Wie zu sehen ist, stellt sich aufgrund eines Kipp- oder Keilfehlers, der beispielsweise durch den Farbteiler **17** oder **25** oder den Blockfilter **27** bedingt sein kann, sowohl in x-Richtung ein Versatz dx als auch in y-Richtung ein Versatz dy zwischen Schlitzblende **26** und Probenzeile **23** ein.

[0177] Der Versatz dx hat zur Folge, daß das Signal-/Rauschverhältnis unnötig verschlechtert ist. Möchte man durch Abblenden der Schlitzblende **26**, d.h. durch Verringern ihrer Ausdehnung in x-Richtung die Tiefenauflösung im konfokalen Mikroskop verbessern, kann es geschehen, daß bei einem Versatz dx, der größer als die halbe Höhe der Probenzeile **23** ist, gar keine Strahlung mehr auf die CCD-Zeile gelangt. Der Versatz dx hat dann zur Folge, daß die mit dem Laserscanningmikroskop erreichbare Tiefenauflösung geringer ausfällt, als mit dem Gerät eigentlich erreichbar wäre. Analoges gilt für die alternativ oder kumulativ mögliche Variante zur Justierung von Schlitzblende **26** und CCD-Zeile **23**. Die durch Einstellung der Kipplage der planparallelen Platte **40** erreichte optische Justierung des Probenspotbildes zur Schlitzblende **26** bewirkt, daß in x-Richtung gesehen keine Flächenbereiche der CCD-Zeile **43** unnötig unbestrahlt bleiben.

[0178] Der Versatz dy bewirkt dagegen, daß die in y-Richtung durch die CCD-Zeile **43** erfaßte Ortsinformation nicht den tatsächlichen Emissions- oder Re-

flexionsverhältnissen an der Probe **23** entspricht. Artefakte im Bild (oder ein Bildersatz) können die Folge sein. Die Einstellung der Kipplage der Platte **40** ermöglicht es, den Versatz dy zu minimieren, vorzugsweise sogar auf Null zu bringen, so daß die Schlitzblende **26** mittig auf der CCD-Zeile **43** liegt und alle Pixel der CCD-Zeile **43** korrekt ausgeleuchtet werden. Dies ist insbesondere dann wichtig, wenn das Laserscanningmikroskop mehrere Detektorkanäle aufweist, die über den Nebenfarteiler **25** verschiedene Farbkanäle auslesen. Da aufgrund der individuellen Justierungen der Kanäle ansonsten unterschiedliche Versätze dy vorliegen würden, wäre bei einem solchen Mehrkanallaserscanningmikroskop ein Fehler bei der Zuordnung der einzelnen Farbkanäle in einem zusammengesetzten Bild die Folge.

[0179] Je nach Wellenlänge oder Wellenlängenbereich, die bzw. der in Detektormodul **5** ausgewertet wird, kann das Pinhole-Objektiv einen unterschiedlichen Farbquerfehler aufweisen. Gleiches gilt für vorgeschaltete Elemente, beispielsweise den Farbteiler **17**, **25** oder andere auf der optischen Achse OA liegende Optiken. Durch Einstellung der Kipplage der Platte **40** kann dieser Farbquerfehler gezielt kompensiert werden. Der Controller C steuert dazu die Platte **40** in eine Kipplage, wobei jede im Wellenlängenbereich bzw. jeder Wellenlänge, für die das Detektormodul **5** eingesetzt werden kann, eine eigene Kipplage zugeordnet ist.

[0180] Wird im Detektorkanal relativ breitbandig Strahlung geführt, kann die planparallele Platte selbst einen Farbquerfehler bewirken, wenn die Dispersion des transparenten Materials der planparallelen Platte **40** so ist, daß ein unterschiedlicher wellenlängenabhängiger Versatz des ausfallenden Strahlenbündels A gegenüber dem einfallenden Strahlenbündel E gegeben ist. Zur Kompensation ist die in [Fig. 10](#) dargestellte Bauweise der planparallelen Platte **40** in einer Ausführungsform vorgesehen, die aus zwei Teilplatten **40a**, **40b** besteht. Die Materialien dieser Teilplatten **40a**, **40b** sind unterschiedlich und so gewählt, daß sich im gegebenen Wellenlängenbereich die dispersiv bedingten Farbquerfehler möglichst aufheben. Beispielsweise bewirkt die Teilplatte **40a** für kürzere Wellenlängen einen stärkeren Versatz als die Teilplatte **40b**; umgekehrtes gilt für längere Wellenlängen. Somit ist eine Kompensation des Farbquerfehlers der planparallelen **40** erreicht. Zur Erzeugung eines farbusabhängigen oder eines gezielt farbusabhängigen Parallelversatzes können auch zwei getrennt kippbare Platten mit gegenläufiger Ablenkung und aus Materialien mit unterschiedlicher Dispersion verwendet werden.

[0181] Der Controller C stellt die Kipplage der Platte **40** auf Vorgabe eines Benutzers hin, nach Auswertung der aktuellen Konfiguration (insbesondere auch Umgebungs- oder Gerätetemperatur oder andere ex-

terne Einflußgrößen) des Laserscanningmikroskops oder in kontinuierlich oder intermittierend ablaufenden Regelvorgängen ein. Bei einer Regelung wird die Kippklage der Platte **40** als Stellgröße verwendet. Als geregelte Größe kann in einem Kalibrierschritt die Strahlungsintensität oder der Bildversatz auf der CCD-Zeile **43** ausgewertet werden.

[0182] Der vom Controller C gesteuerte Antrieb **40.11** ist in [Fig. 11](#) perspektivisch dargestellt. Wie zu sehen ist, wird die planparallele Platte **40** mittels zweier Schrittmotoren **40.12**, **40.13** um die x- bzw. y-Achse verstellt. Die Verststellung der x-Achse ist eine Kippbewegung mit einer Drehachse in der Mitte der Platte **40**. Die Drehung um die y-Achse ist eine Schwenkbewegung um eine außerhalb der Platte gelegene Achse.

[0183] Zur Kippung um die x-Achse ist eine Halteplatte **40.14** vorgesehen, an der ein Paar Blattfedern **40.15** angeschraubt ist, die einen Rahmen **40.16** befestigen, in welchem die planparallele Platte **40** gefaßt ist. Die Blattfedern **40.15** legen die Kippachse fest. Sie drücken eine am Rahmen **40.16** befestigte Rolle **40.17** auf eine Kurvenscheibe **40.18**, die vom Schrittmotor **40.12** angetrieben ist, welcher ebenfalls auf der Halteplatte **40.14** sitzt. Je nach Stellung der Kurvenscheibe **40.18** wird somit die Rolle **40.17** und damit der Rahmen **40.16** unterschiedlich ausgelenkt, wodurch die Kippung der Platte **40** um die x-Achse erreicht ist.

[0184] Die Halteplatte **40.14** ist ihrerseits ein Arm eines Hebels **40.19**, der um eine Schwenkachse **40.20** drehbar ist. Die Schwenkachse **40.20** stellt die Achse für die Bewegung der Platte **40** um die y-Ebene dar. Der andere Arm **40.21** des Hebels **40.19** trägt an seinem Ende eine Rolle **40.22**, die an einer Kurvenscheibe **40.23** anliegt, welche vom Schrittmotor **40.13** angetrieben wird. Ähnlich wie die Blattfedern **40.15** die Rolle **40.17** auf die Kurvenscheibe **40.18** drücken, ist an der Schwenkachse **40.20** ein Federelement vorgesehen, das die Rolle **40.22** auf die Kurvenscheibe **40.23** preßt.

[0185] Durch Ansteuerung der Schrittmotoren **40.12**, **40.13** kann der Controller C, der über nicht weiter bezeichnete Leitungen mit den Schrittmotoren verbunden ist, die Kipp- bzw. Schwenklage der planparallelen Platte **40** im Strahlengang der Detektoranordnung motorisch einstellen. Durch die inkrementelle Ansteuerung der Schrittmotoren **40.12**, **40.13** ist in Kombination mit einer zum Betriebsbeginn angefahrenen Referenzposition die aktuelle Stellung der Platte **40** zu jedem Betriebszeitpunkt dem Controller C bekannt, so daß die Stellung der Platte **40** in einem Regelkreis als Stellgröße verwendet werden kann bzw. gemäß abgespeicherten Vorgaben eingestellt werden kann.

[0186] Alternativ zur zweiachsigen Verststellung, wie sie beispielhalber in [Fig. 11](#) gezeigt ist, können auch zwei einachsige verstellbare Platten hintereinander geschaltet werden.

[0187] Zusätzlich zur Verststellung mittels der Korrekturereinheit **40** bzw. **40a** kann auch die Schlitzblende **26**, **26a** selbst verstellt werden. Dies geschieht insbesondere, um die Breite der Schlitzblende **26**, **26a** und damit den Airy-Durchmesser am Detektor anzupassen. Durch die Verststellung der Breite des Schlitzes der Schlitzblende **26** bzw. **26a** wird die Tiefenschärfe und damit die Diskriminierung des Tiefenschnittes in z-Richtung, d. h. entlang der optischen Achse in der Probe **23** eingestellt. Eine zusätzliche Querverschiebung dient zu einer Grobjustierung außerhalb des Justierbereiches der Korrekturereinheit **40** bzw. **40a**.

[0188] [Fig. 12](#) zeigt einen gegenüber [Fig. 1](#), [Fig. 2](#) abgewandelten Aufbau, bei dem eine Schlitzblende mit unterschiedlich großen festen Schlitzern auf einem Schieber angeordnet ist. Bei dieser Variante der Schlitzblende **26** kann es sich beispielsweise um eine geeignet strukturierte Chrommaske handeln, die motorisch verstellt wird. Im Unterschied zum Aufbau der [Fig. 2](#) ist die Schlitzblende ebenfalls dem Nebenfarbteiler **25** angeordnet; dies stellt eine Alternative zum Aufbau der [Fig. 2](#) dar.

[0189] [Fig. 13](#) zeigt eine vereinfachte Bauweise des Aufbaus der [Fig. 12](#), bei dem auf die Zoom-Verstellung verzichtet wurde, d. h. die Zoomoptik **41** sowie das Zylinderteleskop **37** entfallen. Auch ist [Fig. 13](#) ein Beispiel für eine Bauweise mit nur einem spektralen Kanal, d. h. auf die Ausbildung mehrerer spektraler Kanäle im Detektormodul **5** wurde verzichtet. Ein Nebenfarbteiler **25** ist nicht vorgesehen. Um die Bauweise der [Fig. 13](#) später einfach auf ein mehrkanaliges Detektormodul **5** aufrüsten zu können, ist es zweckmäßig anstelle des Nebenfarbteilers **25** ein (in [Fig. 13](#) nicht dargestelltes) Kompensationsglas anzuordnen, das später durch den Nebenfarbteiler ersetzt werden kann.

[0190] In [Fig. 14](#) ist eine weitere Ausführungsform eines Laserscanningmikroskops **1** gezeigt, dessen Detektoren **28**, **28a** nun als CCD-Zeilen ausgebildet sind, die in der konfokalen Ebene liegen, die ansonsten die Spaltblenden beinhalten und die somit deren Funktion übernehmen. Verwendet man ein geeignet auslesbares Detektorarray, kann der Effekt einer Variation der Schlitzblendengröße durch eine entsprechende Auswahl des Auslesebereichs auf dem Detektorarray realisiert werden.

[0191] [Fig. 15](#) zeigt eine weitere Bauvariante, bei der im den Beleuchtungsstrahlengang Polarisatoren **45**, **46** und in die Detektorpfade Analysatoren **47**, **47a** eingeschaltet sind. Diese Baugruppen können beispielsweise motorisch in den Strahlengang verfahr-

bar gestaltet sein. Eine polarisationsempfindliche Anregung bzw. Detektion ist insbesondere für die Auswertung linearer oder nicht linearer Raman-Signale von Vorteil, um eine Symmetrie einer untersuchten Molekülschwingung zuzuordnen zu können bzw. um störende nicht-Raman-resonante Untergrundsignale unterdrücken zu können.

[0192] Die bisher beschriebenen Ausführungsformen eines Laserscanningmikroskopes sehen spektral diskrete Detektorpfade im Detektormodul **5** vor. Möchte man einen breitbandigen spektralen Bereich simultan analysieren, kann die in [Fig. 16](#) systematisch dargestellte Konzeption zum Einsatz kommen. [Fig. 16](#) zeigt ausschnittsweise und vereinfacht das Scanmodul **3** sowie das Detektormodul **5**. Die die Schlitzblende **26** passierende Strahlung von der Probe wird in das Eintrittsfenster **48** eines Spektrometers **49** geleitet, das die zeilenförmig eintretende Strahlung quer zur Zeilenrichtung spektral zerlegt und auf eine zweidimensional auflösende Detektoreinrichtung leitet, im Ausführungsbeispiel eine CCD-Kamera **50**. Eine in [Fig. 17](#) dargestellte Brennlinie **51** auf der Probe wird dann in das in [Fig. 17](#) ebenfalls gezeigte Bild **52** aufgespalten, wobei die mit X bezeichnete Richtung die Ortsauflösung wiedergibt, die Richtung senkrecht dazu, in [Fig. 17](#) mit λ bezeichnet, kodiert dagegen die spektrale Zusammensetzung der Strahlung am gegebenen Ort. Zur Veranschaulichung ist in das Bild **52** eine Reihe von Kurven **53** eingetragen, die die spektrale Zusammensetzung symbolisieren. Realiter erhält man natürlich nicht Kurven **53**, sondern die in λ -Richtung angeordneten Pixel der CCD-Kamera **50** werden abhängig von der spektralen Zusammensetzung der am Ort aufgenommenen Strahlung von der Probe unterschiedlich intensiv beleuchtet.

[0193] In einer vereinfachten Ausführungsform kann die Schlitzblende **26** durch einen Eintrittsspalt des Spektrometers **49** realisiert werden, Schlitzblende **26** und als Eintrittsspalt ausgebildetes Eintrittsfenster **48** fallen dann zusammen.

[0194] Insbesondere bei Verwendung von holographischer Raman-Notch Filter ist es auch in der Raman-Mikroskopie denkbar, dass anstelle von Zweifach- und dReifach-Spektrometer Einfach-Monochromatoren Verwendung finden.

[0195] [Fig. 27](#) zeigt eine weitere mögliche Bauweise für ein Laserscanningmikroskop **1**, bei dem ein Nipkowscheiben-Ansatz zur Verwirklichung kommt. Das Lichtquellenmodul **2**, das in [Fig. 27](#) stark vereinfacht dargestellt ist, beleuchtet über ein Minilinsenarray **65** durch den Hauptfarbteiler **17** hindurch eine Nipkow-Scheibe **64**, wie sie beispielsweise in US 6.028.306, WO 88 07695 oder DE 2360197 A1 beschrieben ist. Die über das Minilinsenarray **65** beleuchteten Pinholes der Nipkow-Scheibe werden in

die im Mikroskopmodul **4** befindliche Probe abgebildet. Um auch hier die probenseitige Bildgröße variieren zu können, ist wiederum die Zoom-Optik **41** vorgesehen.

[0196] In Abwandlung zur Bauweise z. B. der [Fig. 2](#) ist beim Nipkow-Scanner die Beleuchtung im Durchgang durch den Hauptfarbteiler **17** vorgenommen und die zu detektierende Strahlung wird ausgespiegelt. Darüber hinaus ist der Detektor **28** nun ortsauflösend ausgeführt, damit die mit der Nipkow-Scheibe **64** erreichte Multipunktbeleuchtung auch entsprechend parallel abgetastet wird. Ferner ist zwischen der Nipkow-Scheibe **64** und der Zoom-Optik **41** eine geeignete feststehende Optik **63** mit positiver Brechkraft angeordnet, welche die durch die Pinholes der Nipkow-Scheibe **64** divergent austretende Strahlung in geeignete Bündeldurchmesser umwandelt. Der Hauptfarbteiler **17** ist für den Nipkow-Aufbau der [Fig. 11](#) ein klassischer dichroitischer Strahlteiler, d. h. nicht der zuvor erwähnte Strahlteiler mit schlitzförmig oder punktförmig reflektierendem Bereich.

[0197] Die Zoom-Optik **41** entspricht z. B. der zuvor erläuterten Bauweise, wobei natürlich der Scanner **18** durch die Nipkow-Scheibe **64** überflüssig wird. Er kann dennoch vorgesehen werden, wenn man die anhand [Fig. 10](#) erläuterte Auswahl eines Bereiches ROI vornehmen möchten. Gleiches gilt für das Abbe-König-Prisma.

[0198] Einen alternativen Ansatz mit Multipunktabtastung zeigt in schematischer Darstellung [Fig. 28](#), bei der mehrere Lichtquellen schräg in die Scannerpupille einstrahlen. Auch hier läßt sich durch Nutzung der Zoom-Optik **41** zur Abbildung zwischen Hauptfarbteiler **17** und Scanner **18** eine Zoomfunktion wie in [Fig. 26](#) dargestellt realisieren. Durch gleichzeitiges Einstrahlen von Lichtbündeln unter verschiedenen Winkeln in einer zur Pupille konjugierten Ebene, werden Lichtpunkte in einer zur Objektebene konjugierten Ebene erzeugt, die vom Scanner **18** gleichzeitig über einen Teilbereich des gesamten Objektfeldes geführt werden. Die Bildinformation entsteht durch Auswertung sämtlicher Teilbilder auf einem ortsauflösenden Matrixdetektor **28**.

[0199] Als weitere Ausführungsform kommt eine Multipunkt-Abtastung, wie in US 6.028.306 beschrieben, in Frage, deren Offenbarung vollumfänglich diesbezüglich hier einbezogen wird. Auch hier ist, wie in [Fig. 27](#) und [Fig. 28](#) ein ortsauflösender Detektor **28** vorzusehen. Die Probe wird dann durch eine Multipunktlichtquelle beleuchtet, die durch einen Strahl-expander mit nachgeordneten Mikrolinsenarray realisiert wird, das eine Multiaperturenplatte so beleuchtet, daß dadurch eine Multipunktlichtquelle realisiert ist.

[0200] Die beschriebene Erfindung stellt eine be-

deutende Ausweitung der Anwendungsmöglichkeiten von schnellen konfokalen Laserscanmikroskopen dar. Die Bedeutung einer solchen Weiterentwicklung lässt sich anhand der zellbiologischen Standardliteratur und den dort beschriebenen schnellen zellulären und subzellulären Vorgängen¹ und den eingesetzten Untersuchungsmethoden mit einer Vielzahl von Farbstoffen² ablesen.

[0201] Siehe z.B.:

¹B. Alberts et al. (2002): Molecular Biology of the Cell; Garland Science.

^{1,2}G. Karp (2002): Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments; Wiley Text Books.

^{1,2}R. Yuste et al. (2000): Imaging neurons – a laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

²R.P. Haugland (2003): Handbook of fluorescent Probes and research Products, 10th Edition; Molecular Probes Inc. and Molecular Probes Europe BV.

[0202] De Erfindung hat insbesondere große Bedeutung für die folgenden Prozesse und Vorgänge:

Entwicklung von Organismen

[0203] Die beschriebene Erfindung ist u.a. für die Untersuchung von Entwicklungsprozessen geeignet, die sich vor allem durch dynamische Prozesse im Zehntelsekunden bis hin zum Stundenbereich auszeichnen. Beispielanwendungen auf der Ebene von Zellverbänden und ganzen Organismen sind z.B. hier beschrieben:

- Abdul-Karim, M.A. et al. beschreiben 2003 in *Microvasc. Res.*, 66:113-125 eine Langzeitanalyse von Blutgefäßveränderungen im lebenden Tier, wobei Fluoreszenzbilder in Intervallen über mehrere Tage aufgenommen wurde. Die 3D-Datensätze wurden mit adaptiven Algorithmen ausgewertet, um die Bewegungstrajektorien schematisch darzustellen.

- Soll, D.R. et al. beschreiben 2003 in *Scientific World Journ.* 3:827-841 eine softwarebasierte Bewegungsanalyse von mikroskopischen Daten von Kernen und Pseudopodien lebender Zellen in allen 3 Raumdimensionen.

- Grossmann, R. et al. beschreiben 2002 in *Glia*, 37:229-240 eine 3D-Analyse der Bewegungen von Mikrogliazellen der Ratte, wobei die Daten über bis zu 10 Stunden aufgenommen wurden. Gleichzeitig kommen nach traumatischer Schädigung auch schnelle Reaktionen der Glia vor, so dass eine hohe Datenrate und entsprechendes Datenvolumen entsteht.

[0204] Das betrifft insbesondere folgende Schwerpunkte:

- Analyse lebender Zellen in einer 3D Umgebung, deren Nachbarzellen empfindlich auf Laserbeleuchtung reagieren und die von der Beleuchtung

der 3D-ROI geschützt werden müssen;

- Analyse lebender Zellen in einer 3D Umgebung mit Markierungen, die gezielt durch Laserbeleuchtung in 3D gebleicht werden sollen, z.B. FRET-Experimente;

- Analyse lebender Zellen in einer 3D Umgebung mit Markierungen, die gezielt durch Laserbeleuchtung gebleicht und gleichzeitig auch ausserhalb der ROI beobachtet werden sollen, z.B. FRAP- und FLIP-Experimente in 3D;

- Gezielte Analyse lebender Zellen in einer 3D Umgebung mit Markierungen und Pharmaka, die manipulationsbedingte Änderungen durch Laserbeleuchtung aufweisen, z.B. Aktivierung von Transmittern in 3D;

- Gezielte Analyse lebender Zellen in einer 3D Umgebung mit Markierungen, die manipulationsbedingte Farbänderungen durch Laserbeleuchtung aufweisen, z.B. paGFP, Kaede;

- Gezielte Analyse lebender Zellen in einer 3D Umgebung mit sehr schwachen Markierungen, die z.B. eine optimale Balance von Konfokalität gegen Detektionsempfindlichkeit erfordern.

- Lebende Zellen in einem 3D-Gewebeverband mit variierenden Mehrfachmarkierungen, z.B. CFP, GFP, YFP, DsRed, HcRed u.ä.

- Lebende Zellen in einem 3D-Gewebeverband mit Markierungen, die funktionsabhängige Farbänderungen aufweisen, z.B. Ca⁺⁺-Marker

- Lebende Zellen in einem 3D-Gewebeverband mit Markierungen, die entwicklungsbedingte Farbänderungen aufweisen, z.B. transgene Tiere mit GFP

- Lebende Zellen in einem 3D-Gewebeverband mit Markierungen, die manipulationsbedingte Farbänderungen durch Laserbeleuchtung aufweisen, z.B. paGFP, Kaede

- Lebende Zellen in einem 3D-Gewebeverband mit sehr schwachen Markierungen, die eine Einschränkung der Konfokalität zugunsten der Detektionsempfindlichkeit erfordern.

- Letztgenannter Punkt in Kombination mit den Vorangehenden.

Transportvorgänge in Zellen

[0205] Die beschriebene Erfindung ist für die Untersuchung von innerzellulären Transportvorgängen exzellent geeignet, da hierbei recht kleine motile Strukturen, z.B. Proteine, mit hoher Geschwindigkeit (meist im Bereich von Hundertstelsekunden) dargestellt werden müssen. Um die Dynamik von komplexen Transportvorgängen zu erfassen, kommen oft auch Anwendungen wie FRAP mit ROI-Bleichen zum Einsatz. Beispiele für solche Studien sind z.B. hier beschrieben:

- Umenishi, F. et al. beschreiben 2000 in *Biophys J.*, 78:1024-1035 eine Analyse der räumlichen Beweglichkeit von Aquaporin in GFP-transfizierten Kulturzellen. Hierzu wurden in den Zellmembranen Punkte

gezielt lokal gebleicht und die Diffusion der Fluoreszenz in der Umgebung analysiert.

- Gimpl, G. et al. beschreiben 2002 in Prog. Brain Res., 139:43-55 Experimente mit ROI-Bleichen und Fluoreszenz Imaging zur Analyse der Mobilität und Verteilung von GFP-markierten Oxytocin-Rezeptoren in Fibroblasten. Dabei stellen sich hohe Anforderungen an die räumliche Positionierung und Auflösung sowie die direkte zeitliche Folge von Bleichen und Imaging.
- Zhang et al. beschreiben 2001 in Neuron, 31:261-275 live cell Imaging von GFP-transfizierten Nervenzellen, wobei die Bewegung von Granuli durch kombiniertes Bleichen und Fluoreszenz Imaging analysiert wurde. Die Dynamik der Nervenzellen stellt dabei hohe Anforderungen an die Geschwindigkeit des Imaging.

Wechselwirkungen von Molekülen

[0206] Die beschriebene Erfindung ist insbesondere für die Darstellung molekularer und anderer subzellularer Wechselwirkungen geeignet. Hierbei müssen sehr kleine Strukturen mit hoher Geschwindigkeit (im Bereich um die Hundertstelsekunde) dargestellt werden. Um die für die Wechselwirkung notwendige räumliche Position der Moleküle aufzulösen, sind auch indirekte Techniken wie z.B. FRET mit ROI-Bleichen einzusetzen. Beispielanwendungen sind z.B. hier beschrieben:

- Petersen, M.A. und Dailey, M.E. beschreiben 2004 in Glia, 46:195-206 eine Zweikanalaufnahme lebender Hippokampuskulturen der Ratte, wobei die zwei Kanäle für die Marker Lectin und Sytox räumlich in 3D und über einen längeren Zeitraum aufgezeichnet werden.
- Yamamoto, H. et al. beschreiben 2003 in Clin. Exp. Metastasis, 20:633-638 ein Zweifarbimaging von humanen fibrosarcoma Zellen, wobei grünes und rotes fluoreszentes Protein (GFP und RFP) simultan in Echtzeit beobachtet wurde.
- Bertera, S. et al. beschreiben 2003 in Biotechniques, 35:718-722 ein Multicolorimaging von transgenen Mäusen markiert mit Timer reporter Protein, welches seine Farbe nach Synthese von grün in rot ändert. Die Bildaufnahme erfolgt als schnelle Serie 3-dimensional im Gewebe am lebenden Tier.

Signalübertragung zwischen Zellen

[0207] Die beschriebene Erfindung ist für die Untersuchung von meist extrem schnellen Signalübertragungsvorgängen hervorragend sehr gut geeignet. Diese meist neurophysiologischen Vorgänge stellen höchste Anforderungen an die zeitliche Auflösung, da die durch Ionen vermittelten Aktivitäten sich im Bereich von Hundertstel- bis kleiner als Tausendstelsekunden abspielen. Beispielanwendungen von Untersuchungen im Muskel- oder Nervensystem sind z.B. hier beschrieben:

- Brum G et al. beschreiben 2000 in J Physiol. 528: 419-433 die Lokalisation von schnellen Ca⁺ Aktivitäten in Muskelzellen des Frosches nach Reizung mit Caffeine als Transmitter. Die Lokalisation und Mikrometer-genaue Auflösung gelang nur durch Einsatz eines schnellen, konfokalen Mikroskopes.
- Schmidt H et al. beschreiben 2003 in J Physiol. 551:13-32 eine Analyse von Ca⁺ Ionen in Nervenzellfortsätzen von transgenen Mäusen. Die Untersuchung von schnellen Ca⁺-Transienten in Mäusen mit veränderten Ca⁺ bindenden Proteinen konnte nur mit hochauflösender konfokaler Mikroskopie durchgeführt werden, da auch die Lokalisation der Ca⁺ Aktivität innerhalb der Nervenzelle und deren genaue zeitliche Kinetik eine wichtige Rolle spielt.

Patentansprüche

1. Lichtrastermikroskop zur Erfassung mindestens eines Probenbereiches durch eine Relativbewegung zwischen Beleuchtungslicht und Probe, wobei das Beleuchtungslicht die Probe parallel in mehreren Punkten oder Bereichen beleuchtet und mehrere Punkte oder Bereiche simultan detektiert werden, wobei mehrere beleuchtete Probenpunkte auf einer Linie liegen und mit einem ortsauflösenden Detektor mehrere Punkte gleichzeitig detektiert werden, insbesondere konfokales Laserscanningmikroskop mit – einer Beleuchtungsanordnung (2), die einen Beleuchtungsstrahl zum Beleuchten eines Probenbereichs (23) bereitstellt, – einer Scananordnung (3, 4), die den Beleuchtungsstrahl scannend über die Probe führt, und – einer Detektoranordnung (5), die über die Scananordnung (3, 4) den beleuchteten Probenbereich (23) mittels einer konfokalen Blende (26) auf mindestens eine Detektoreinheit (28) abbildet, **dadurch gekennzeichnet**, daß – die Beleuchtungsanordnung (2) der Scananordnung (3, 4) einen linienförmigen Beleuchtungsstrahl bereitstellt, – die Scananordnung (3, 4) den linienförmigen Beleuchtungsstrahl scannend über die Probe führt und – die konfokale Blende als Schlitzblende (26) oder als konfokale Blende wirkender schlitzförmiger Bereich (28, 48) der Detektoreinheit (28) ausgebildet ist.

2. Laserscanningmikroskop nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch eine Zoomoptik, die im Beleuchtungsstrahlengang (BS) des Mikroskopes (1) einem ein Objekt (23) erfassenden Objektiv (21) vorgeschaltet ist, eine Zwischenabbildung (ZB1) des Objektes realisiert und eine Eintrittspupille (EP) des Beleuchtungsstrahlenganges mit variabler Vergrößerung (v) und/oder variabler Abbildungslänge (L) in eine Austrittspupille (AP) abbildet.

3. Laserscanningmikroskop nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß in der Austrittspupille

(AP) ein als Blende (**42**) wirkendes Element angeordnet ist, das eine von der Einstellung der Zoomoptik unabhängige Größe der Austrittspupille (AP) bewirkt, wobei die Größe der Austrittspupille (AP) vorzugsweise kleiner als die Größe der Eintrittspupille (OP) des Objektivs ist.

4. Laserscanningmikroskop nach Anspruch 2 oder 3, gekennzeichnet durch eine Zoomoptik, die von einer Steuereinheit angesteuert verstellbar ist, wobei die Steuereinheit in einer ersten Betriebsart eine variable Vergrößerung (v) bei konstanter Abbildungslänge (L) und in einer zweiten Betriebsart eine variable Abbildungslänge bei konstanter Vergrößerung (v) realisiert.

5. Laserscanningmikroskop nach Anspruch 2, 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Scaneinrichtung (**3, 4**) ein Zylinderteleskop (**37**) aufweist, das die Linienlänge des Beleuchtungsstrahls vergrößert und bei einem Zoomfaktor der Zoomoptik (**42**) kleiner Eins in den Strahlengang geschaltet ist.

6. Laserscanningmikroskop nach einem der obigen Ansprüche, gekennzeichnet durch eine Konvertierungseinheit (**16**) zur Erzeugung des linienförmigen Beleuchtungsstrahls aus einem im Querschnitt inhomogenen, insbesondere gaußförmigen Ursprungsstrahl (**16.3**), wobei die Konvertierungseinheit einen asphärischen, konvexen Spiegel (**16.1**) aufweist, der im Bereich des Auftreffpunktes des Ursprungsstrahls (**16.3**) stärker gekrümmt ist, als in auf-treffpunktfernen Bereichen.

7. Laserscanningmikroskop nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Spiegel (**16.1**) keilförmig mit abgerundetem First (**16.9**) ausgebildet ist.

8. Laserscanningmikroskop nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Spiegelfläche (**16.6**) in kartesischen, (x,y,z) -Koordinaten der Funktion $y^2/[c + (c^2 - (1 - Q)y^2)^{1/2}]$ genügt, wobei c ein Krümmungsradius des Firstes (**16.9**) und Q eine konische Konstante ist.

9. Laserscanningmikroskop nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Spiegelfläche zusätzlich entlang der Längsachse des Firstes (**16.9**) gekrümmt ist.

10. Laserscanningmikroskop nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß der asphärische Spiegel (**16.1**) der Funktion $f(x,y) = [a(y) - r_x]^2 - x^2]^{1/2} - r_x$ genügt, wobei r_x der Krümmungsradius entlang der Längsachse des Firstes (**16.9**) und $a(y)$ die Funktion des Anspruchs 8 ist.

11. Laserscanningmikroskop nach einem der Ansprüche 6 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß eine Symmetrieachse des Spiegels (**16.1**) unter einem

Winkel von 4° bis 20° zur Einfallsachse (OA) des Ursprungsstrahls (**16.3**) liegt.

12. Laserscanningmikroskop nach einem der Ansprüche 6 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß dem asphärischen Spiegel (**16.1**) ein Sammelspiegel (**16.2**) nachgeordnet ist.

13. Laserscanningmikroskop nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Sammelspiegel (**16.2**) zylindrisch oder torisch ist.

14. Laserscanningmikroskop nach Anspruch 10 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß der Sammelspiegel (**16.1**) in x -Richtung einen Krümmungsradius gleich $(r_x + 2 \cdot d)$ aufweist, wobei d der Abstand zwischen asphärischem Spiegel (**16.1**) und Sammelspiegel (**16.2**) ist.

15. Laserscanningmikroskop nach einem der obigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Scananordnung zwei unabhängig steuerbare und wirkende Scaneinrichtungen aufweist, von denen eine eine dezentrale Zoom-Funktion bewirkt.

16. Laserscanningmikroskop nach einem der obigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektoreinheit einen ortsauflösenden Flächenstrahlungssensor (**28**) umfaßt, der in der konfokalen Ebene angeordnet ist, wobei die Auswahl eines Teilbereiches des Flächenstrahlungssensors (**28**) als konfokale Schlitzblende wirkt.

17. Laserscanningmikroskop nach einem der obigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektoreinheit ein Spektrometer (**49**) aufweist, das die linienförmige Strahlung quer zur Linie spektral aufteilt und auf einen Flächenstrahlungsdetektor (**50**) leitet.

18. Laserscanningmikroskop nach einem der obigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Spektrometer (**49**) einen Eintrittsspalt (**48**) aufweist, der als konfokale Blende dient.

19. Laserscanningmikroskop nach einem der obigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektoreinheit eine Streak-Kamera aufweist, die die linienförmige Strahlung quer zur Linie zeitlich aufteilt und auf einen Flächenstrahlungsdetektor leitet.

20. Laserscanningmikroskop nach einem der obigen Ansprüche, gekennzeichnet durch mindestens einen Polarisator (**45, 46**) in der Beleuchtungsanordnung (**2**) und mindestens einen Polarisationsanalysator (**47**) in der Detektoranordnung (**5**).

21. Laserscanningmikroskop nach einem der obigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektoranordnung (**5**) mehrere spektrale Kanäle

aufweist, die jeweils eine Detektoreinheit (**28**, **28a**) umfassen.

22. Laserscanningmikroskop nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß allen spektralen Kanälen eine gemeinsame Schlitzeinheit (**26**) vorgeordnet ist.

23. Laserscanningmikroskop nach einem der obigen Ansprüche, gekennzeichnet durch eine hinsichtlich der Schlitzeinheit verstellbare Schlitzeinheit (**26**) oder durch eine Schlitzeinheit mit mehreren austauschbaren Schlitzeinheiten unterschiedlicher Schlitzeinheit.

24. Laserscanningmikroskop nach einem der obigen Ansprüche, gekennzeichnet durch eine in der Beleuchtungsanordnung (**2**) und/oder der Detektoranordnung (**5**) vorgesehene Korrektur-Vorrichtung mit mindestens einer planparallelen transparenten Platte (**40**, **9**), die in einer Halterung (**40**, **11**) im Strahlengang gehalten ist und durch diese in einer Kipp- und/oder Schwenkbewegung um mindestens eine Achse antreibbar ist, um durch Veränderung der Kipp- und/oder Schwenkwinkel (**40**, **9**) einen bestimmten Parallelversatz (dx , dy) der Strahlen im Strahlengang einzustellen.

25. Laserscanningmikroskop nach Anspruch 24, gekennzeichnet durch mindestens eine zweiachsig kipp- und/oder schwenkbare Platte (**40**, **9**) oder mindestens zwei unterschiedlich einachsig kipp- oder schwenkbare Platten.

26. Laserscanningmikroskop nach einem der Ansprüche 24 oder 25, gekennzeichnet durch eine Stelleinrichtung, die mindestens einen Betriebsparameter erfaßt und die Kipp- und/oder Schwenkwinkel abhängig vom Wert des Betriebsparameters einstellt.

27. Laserscanningmikroskop nach einem der Ansprüche 24 – 26, gekennzeichnet durch einen Regelkreis, der die Kipp- und/oder Schwenkwinkel (**40**, **9**) als Stellgröße verwendet.

28. Laserscanningmikroskop nach einem der Ansprüche 24 – 27, gekennzeichnet durch zwei unabhängig antreibbare Platten (**40**, **9**) aus Materialien unterschiedlicher Dispersion, um einen farbunabhängigen oder gezielt farbabhängigen Parallelversatz einzustellen.

29. Laserscanningmikroskop nach einem der Ansprüche 24 – 28, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Platte (**40**, **9**) aus zwei Teilplatten (**40**, **9a**, **40**, **9b**) mit Materialien unterschiedlicher Dispersion aufgebaut ist, um Farbquerfehler im Strahlengang zu kompensieren.

30. Laserscanningmikroskop nach einem der An-

sprüche 24 – 29, dadurch gekennzeichnet, daß die Platte (**40**, **9**) im Strahlengang der Detektoreinheit (**28**) vorgeordnet ist, um die Abbildung des Probenbereiches (**23**) auf die Detektoreinheit (**28**) oder eine Abbildung der Schlitzeinheit (**26**) auf die Detektoreinheit (**28**) zu zentrieren.

31. Laserscanningmikroskop nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß das Mikroskop im Strahlengang wechsel- oder verstellbare Elemente aufweist und die Stelleinrichtung eine Konfiguration der wechsel- oder verstellbaren Elemente als Betriebsparameter erfaßt.

32. Laserscanningmikroskop nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektoranordnung (**28**, **28a**) Strahlung unterschiedlicher Wellenlänge analysiert und die Stelleinrichtung die Wellenlänge im Strahlengang als Betriebsparameter erfaßt.

33. Laserscanningmikroskop nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß der Regelkreis die Strahlungsintensität an der Detektoreinheit (**28**) maximiert und/oder einen Bildversatz minimiert.

34. Laserscanningmikroskop nach einem der Ansprüche 24 bis 33, dadurch gekennzeichnet, daß sowohl zwischen Probenbereich (**23**) und konfokaler Blende (**26**) als auch zwischen Blende (**26**) und Detektoreinheit (**28**), eine zweiachsig kipp- und/oder schwenkbare Platte (**40**, **9**) oder zwei unterschiedlich einachsig kipp- und/oder schwenkbare Platten vorgesehen sind.

35. Verfahren zur Laserscanningmikroskopie, dadurch gekennzeichnet, daß ein konfokales Laserscanningmikroskop (**1**) gemäß einem der Ansprüche 1 – 34 verwendet wird und daß die Probe analysiert wird mittels Raman-Spektroskopie, insbesondere mittels kohärenter Stokes'scher oder anti-Stokes'scher oder Hyper-Raman- oder stimulierter Ramanspektroskopie oder Raman-Prozessen höherer Ordnung.

36. Verwendung von Anordnungen und/oder Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche

zur Untersuchung von Entwicklungsprozessen, insbesondere dynamischer Prozesse im Zehntelsekunden bis hin zum Stundenbereich, insbesondere auf der Ebene von Zellverbänden und ganzen Organismen, insbesondere nach mindestens einem der folgenden Punkte:

- Analyse lebender Zellen in einer 3D Umgebung, deren Nachbarzellen empfindlich auf Laserbeleuchtung reagieren und die von der Beleuchtung der 3D-ROI geschützt werden müssen;
- Analyse lebender Zellen in einer 3D Umgebung mit Markierungen, die gezielt durch Laserbeleuchtung in 3D gebleicht werden sollen, z.B. FRET-Experimente;
- Analyse lebender Zellen in einer 3D Umgebung mit

Markierungen, die gezielt durch Laserbeleuchtung gebleicht und gleichzeitig auch ausserhalb der ROI beobachtet werden sollen, z.B. FRAP- und FLIP-Experimente in 3D;

- Gezielte Analyse lebender Zellen in einer 3D Umgebung mit Markierungen und Pharmaka, die manipulationsbedingte Änderungen durch Laserbeleuchtung aufweisen, z.B. Aktivierung von Transmittern in 3D;
- Gezielte Analyse lebender Zellen in einer 3D Umgebung mit Markierungen, die manipulationsbedingte Farbänderungen durch Laserbeleuchtung aufweisen, z.B. paGFP, Kaede;
- Gezielte Analyse lebender Zellen in einer 3D Umgebung mit sehr schwachen Markierungen, die z.B. eine optimale Balance von Konfokalität gegen Detektionsempfindlichkeit erfordern.
- Lebende Zellen in einem 3D-Gewebeverband mit variierenden Mehrfachmarkierungen, z.B. CFP, GFP, YFP, DsRed, HcRed u.ä.
- Lebende Zellen in einem 3D-Gewebeverband mit Markierungen, die funktionsabhängige Farbänderungen aufweisen, z.B. Ca⁺-Marker
- Lebende Zellen in einem 3D-Gewebeverband mit Markierungen, die entwicklungsbedingte Farbänderungen aufweisen, z.B. transgene Tiere mit GFP
- Lebende Zellen in einem 3D-Gewebeverband mit Markierungen, die manipulationsbedingte Farbänderungen durch Laserbeleuchtung aufweisen, z.B. paGFP, Kaede
- Lebende Zellen in einem 3D-Gewebeverband mit sehr schwachen Markierungen, die eine Einschränkung der Konfokalität zugunsten der Detektionsempfindlichkeit erfordern.
- Letztgenannter Punkt in Kombination mit den Vorangehenden.

kleiner als Tausendstelsekunden abspielen, insbesondere bei Untersuchungen im Muskel- oder Nervensystem

Es folgen 17 Blatt Zeichnungen

37. Verwendung von Anordnungen und/oder Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche für die Untersuchung von innerzellulären Transportvorgängen, insbesondere zur Darstellung kleine motile Strukturen, z.B. Proteine, mit hoher Geschwindigkeit (meist im Bereich von Hundertstelsekunden) insbesondere für Anwendungen wie FRAP mit ROI-Bleichen

38. Verwendung von Anordnungen und/oder Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche für die Darstellung molekularer und anderer subzellulärer Wechselwirkungen, insbesondere der Darstellung sehr kleine Strukturen mit hoher Geschwindigkeit vorzugsweise unter Verwendung indirekter Techniken wie z.B. FRET mit ROI-Bleichen zur Auflösung submolekularer Strukturen

39. Verwendung von Anordnungen und/oder Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche schnellen Signalübertragungsvorgängen, insbesondere neurophysiologischen Vorgängen mit hoher zeitlicher Auflösung, da die durch Ionen vermittelten Aktivitäten sich im Bereich von Hundertstel- bis

Anhängende Zeichnungen

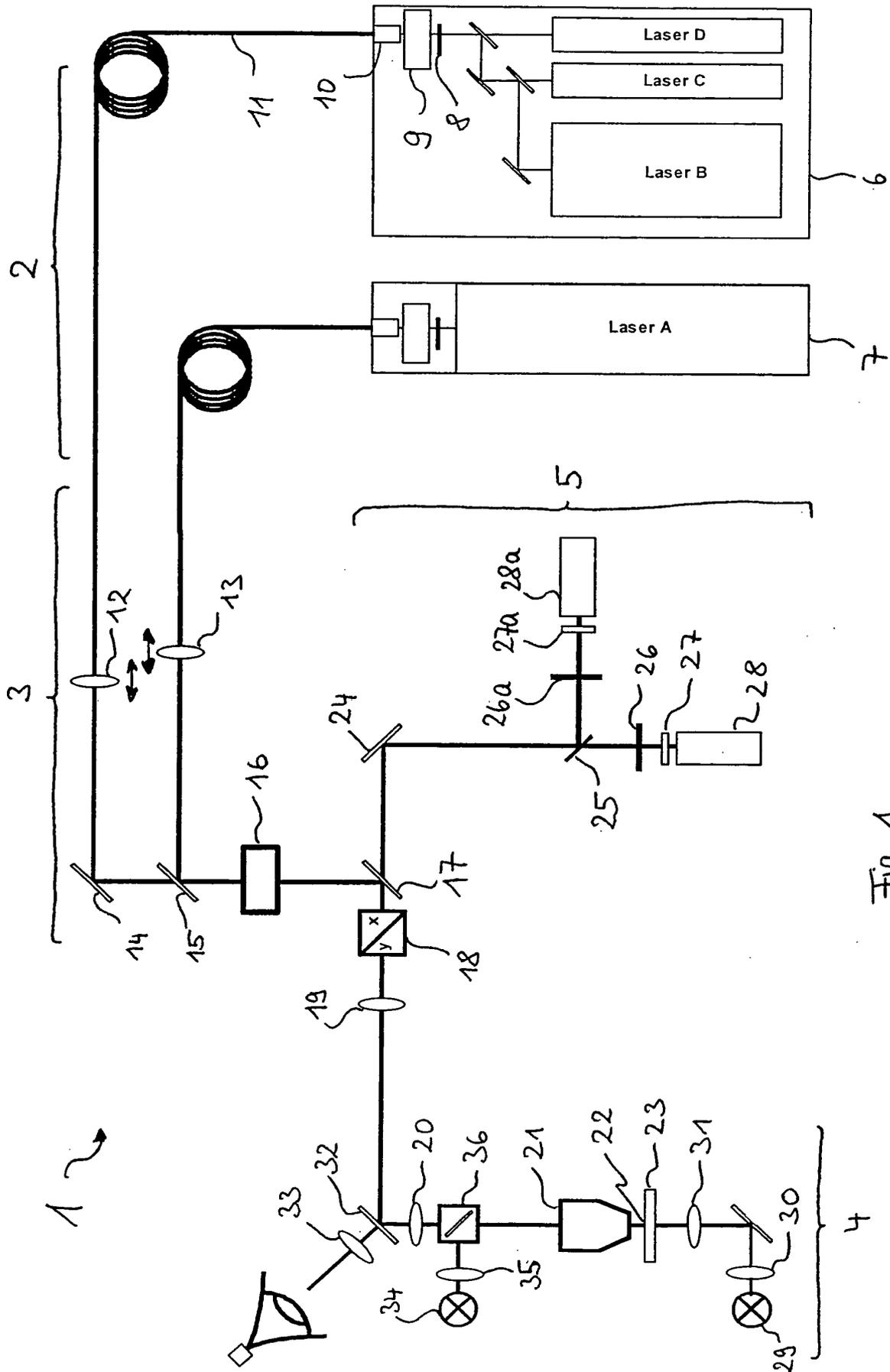


Fig. 1

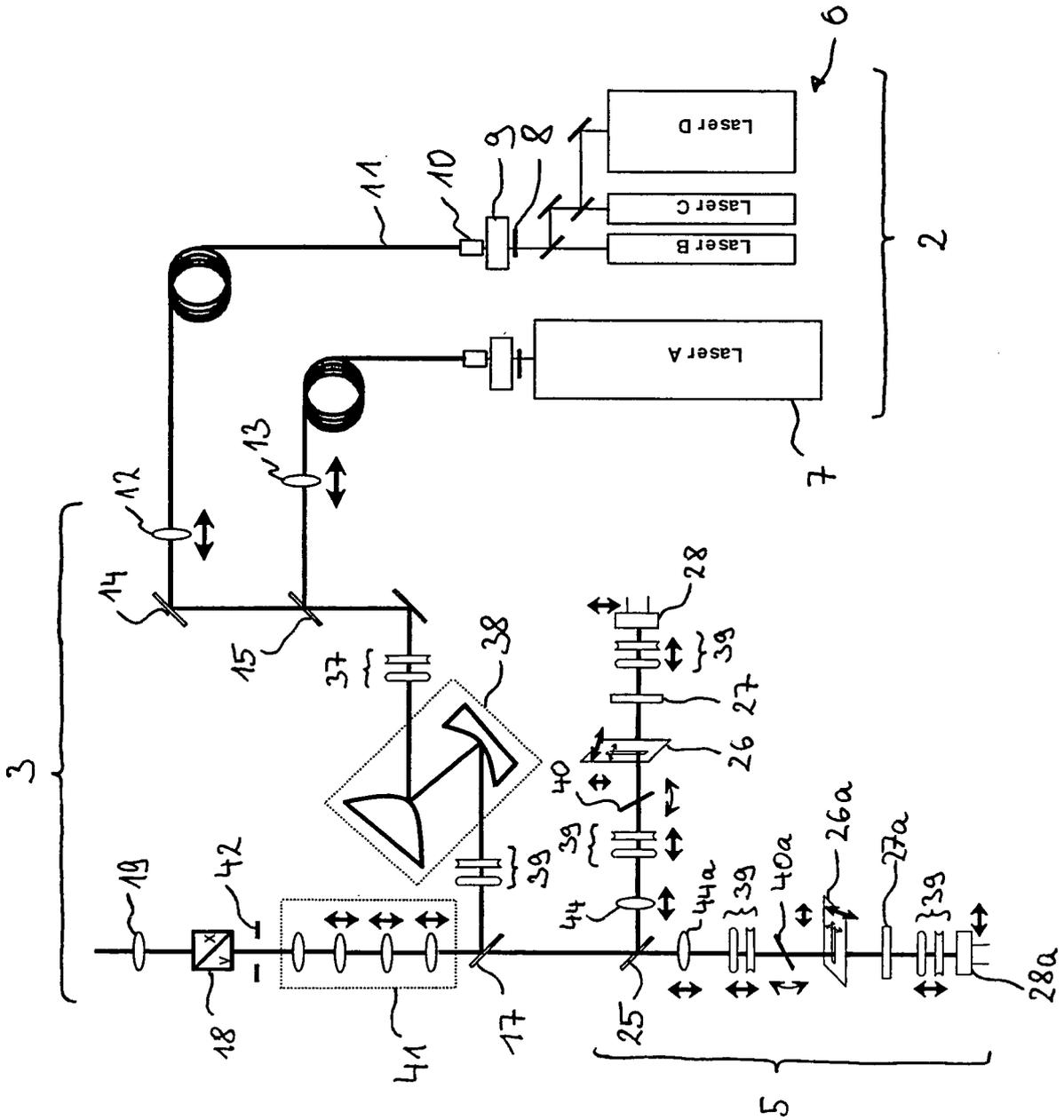
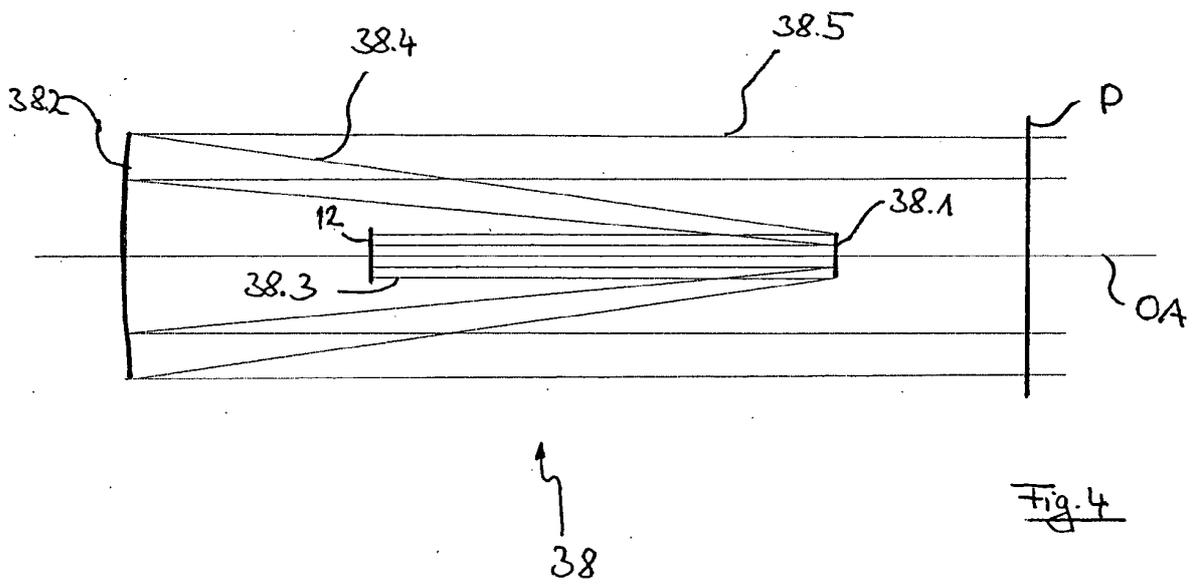
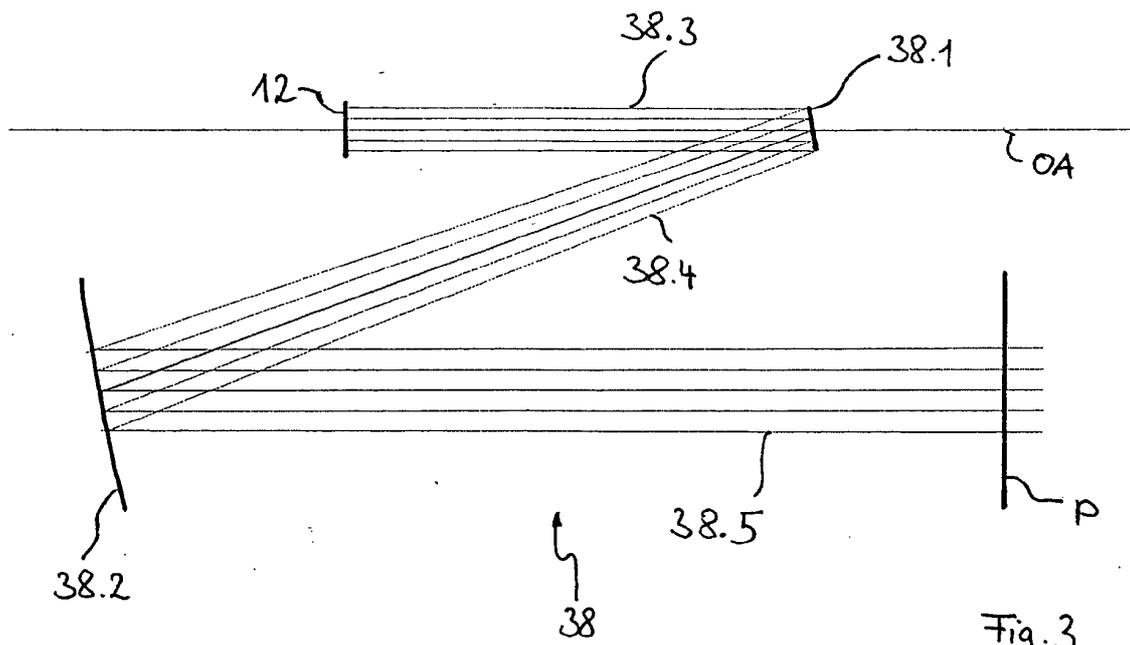
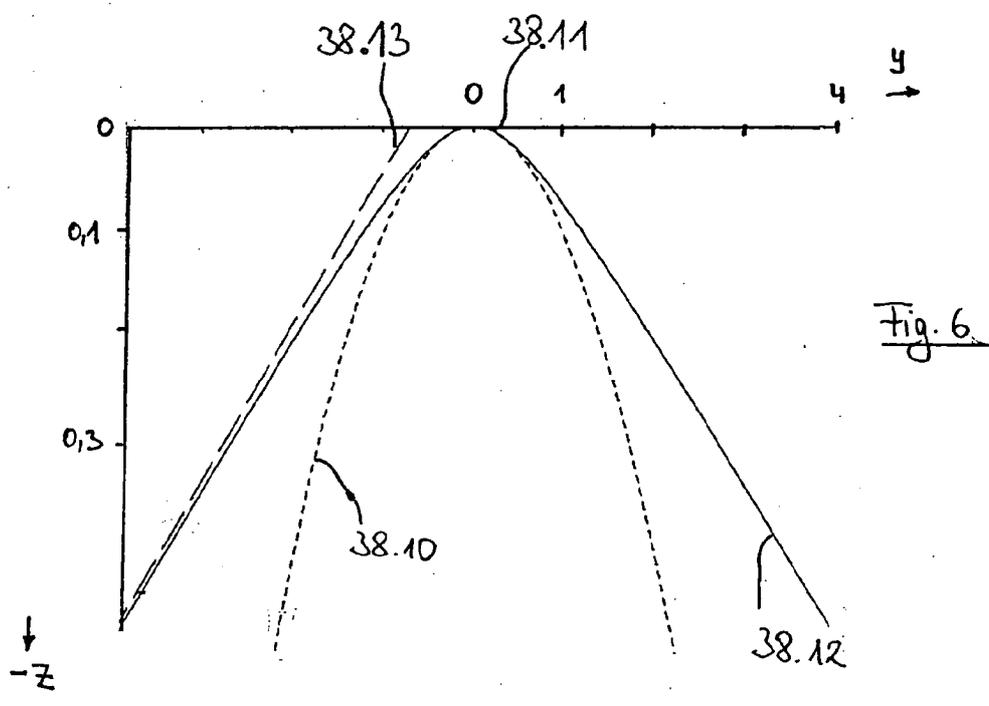
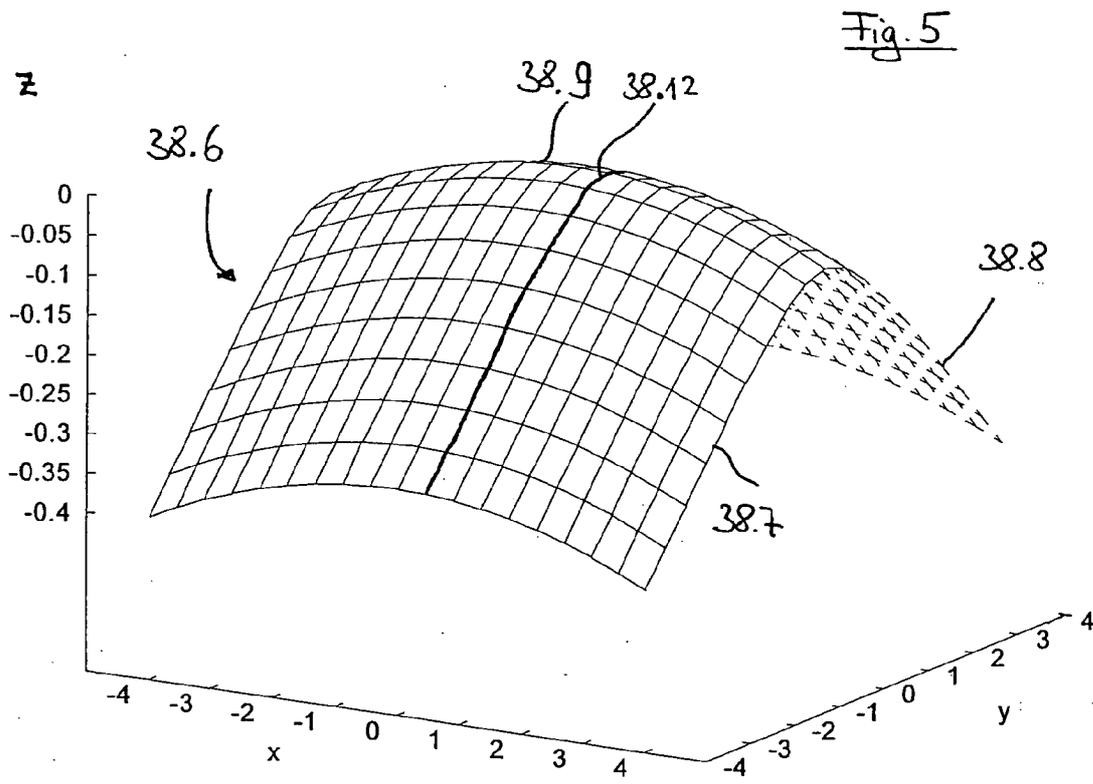


Fig. 2





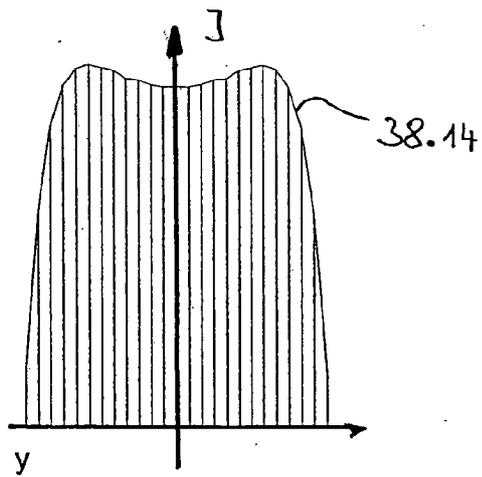


Fig. 7

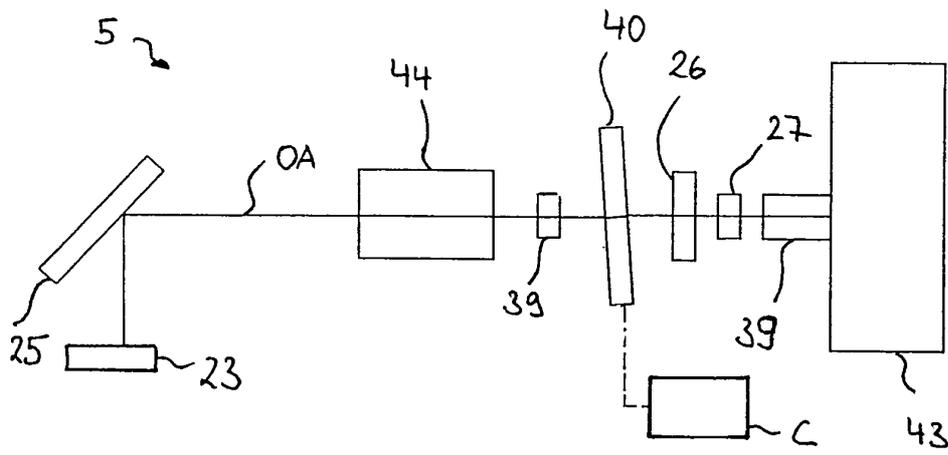


Fig. 8

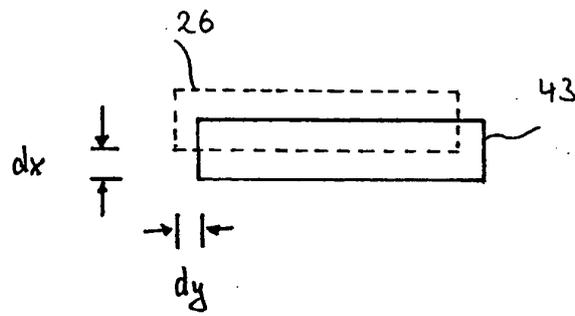


Fig. 9

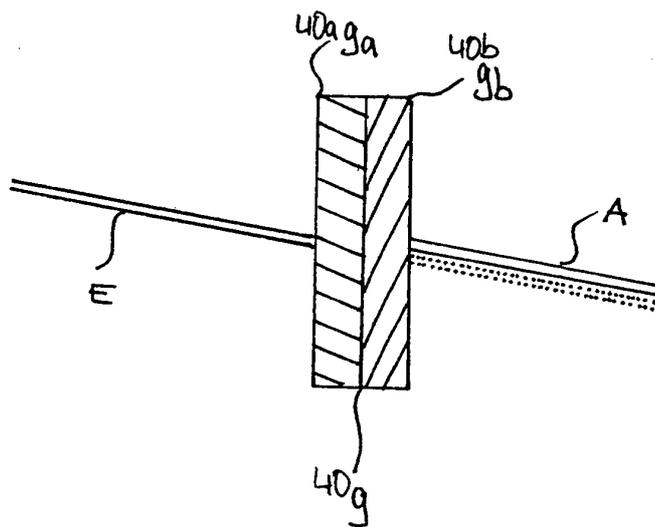


Fig. 10

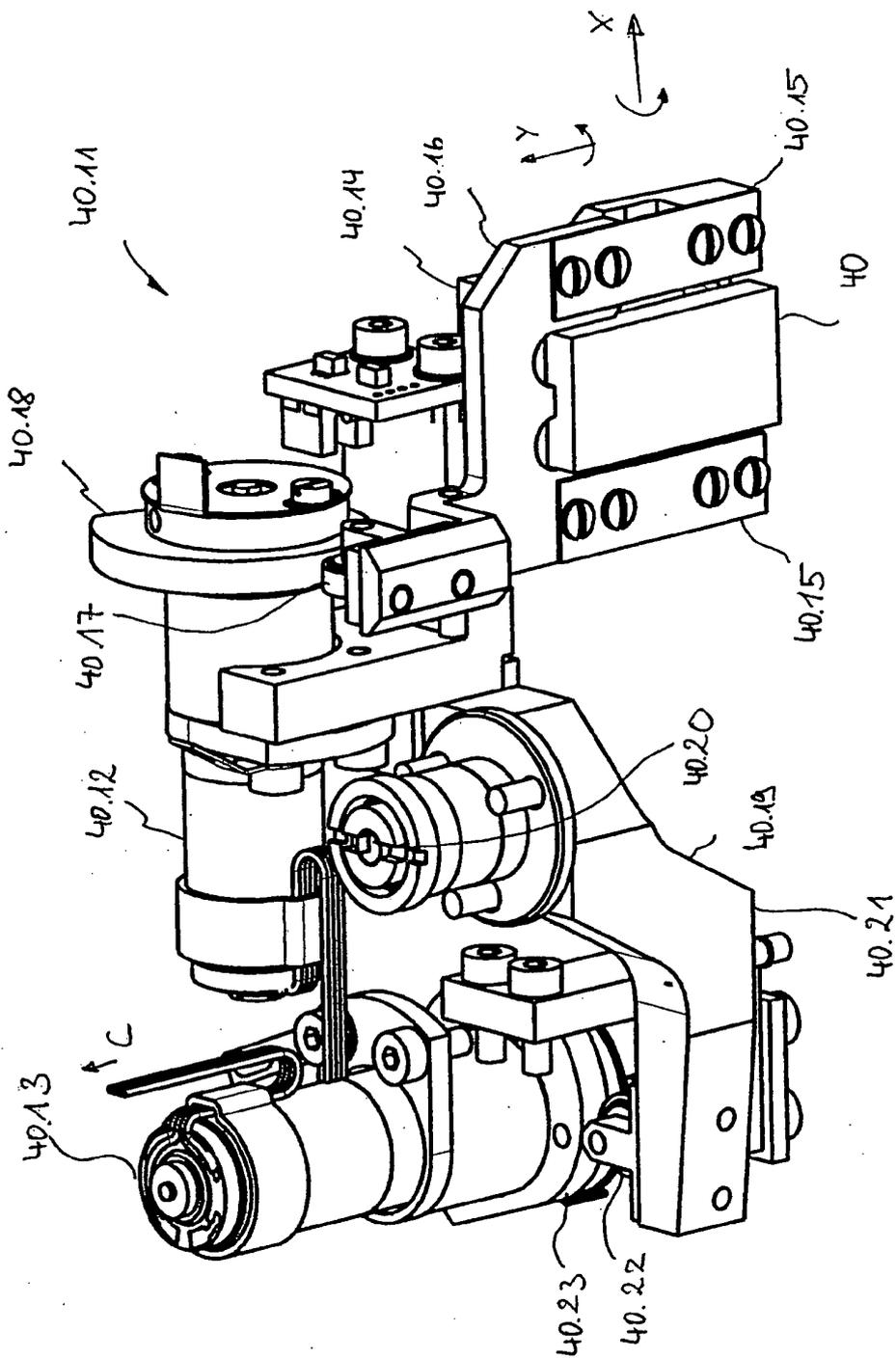


Fig. 11

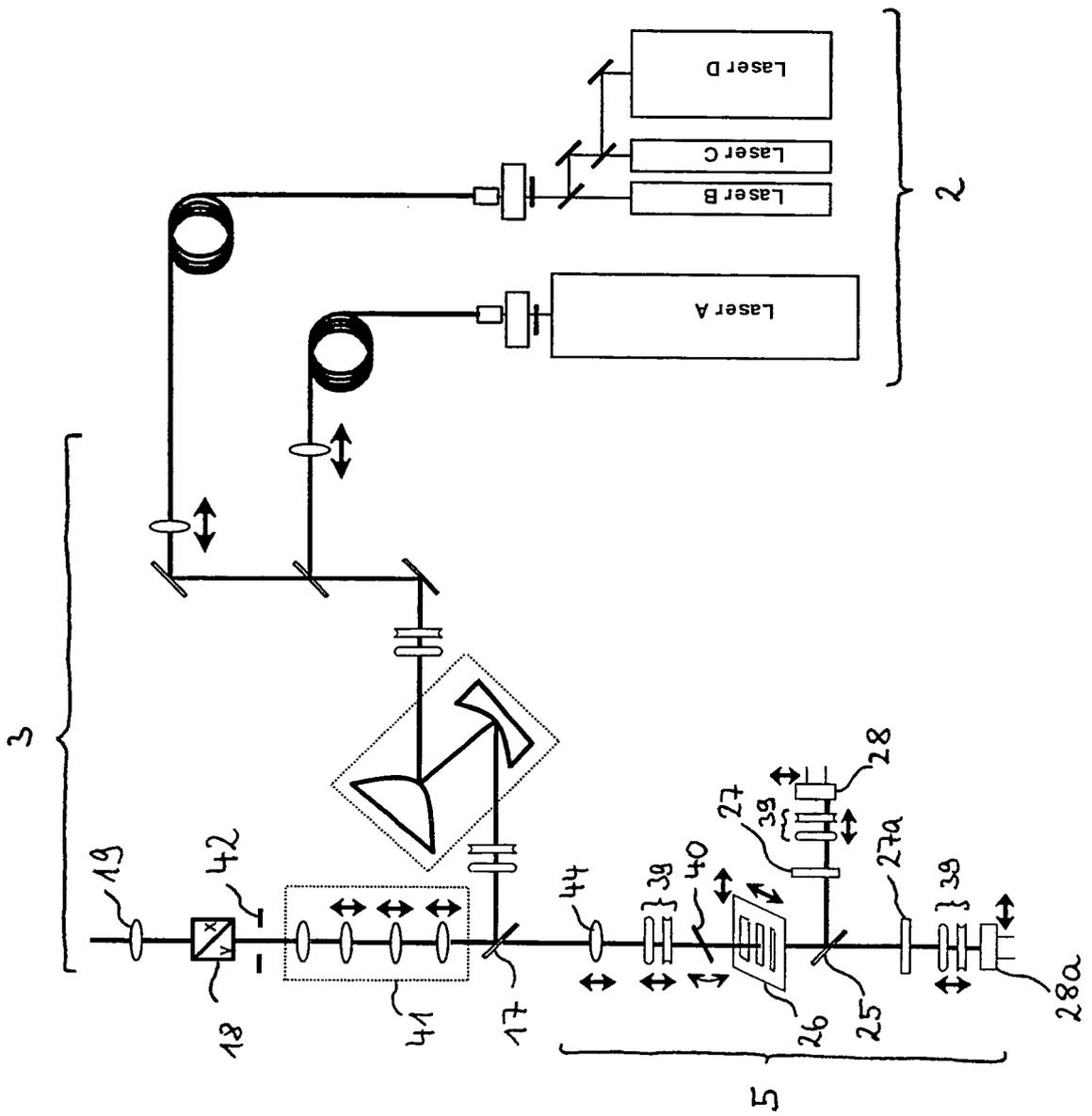


Fig. 12

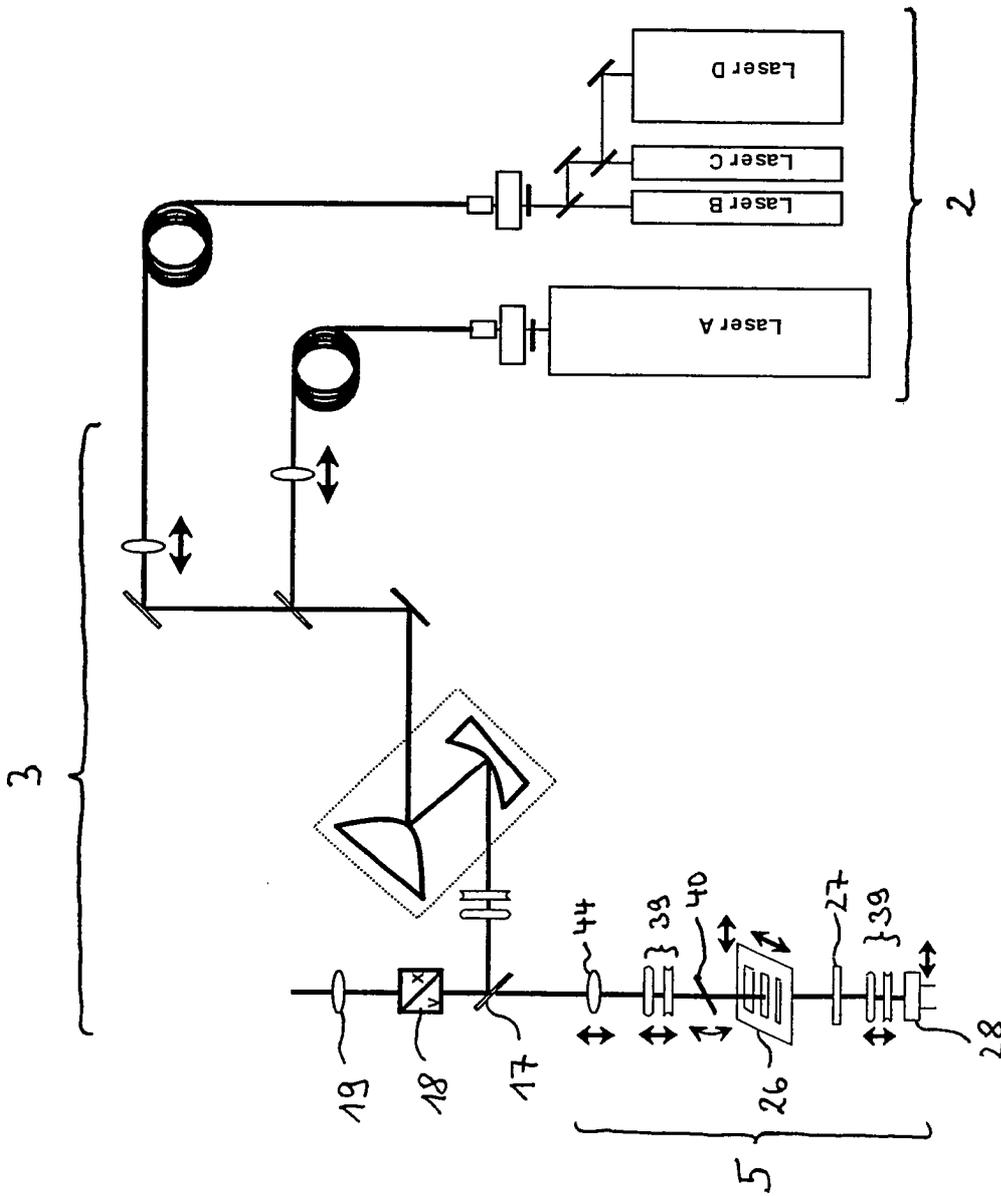


Fig. 13

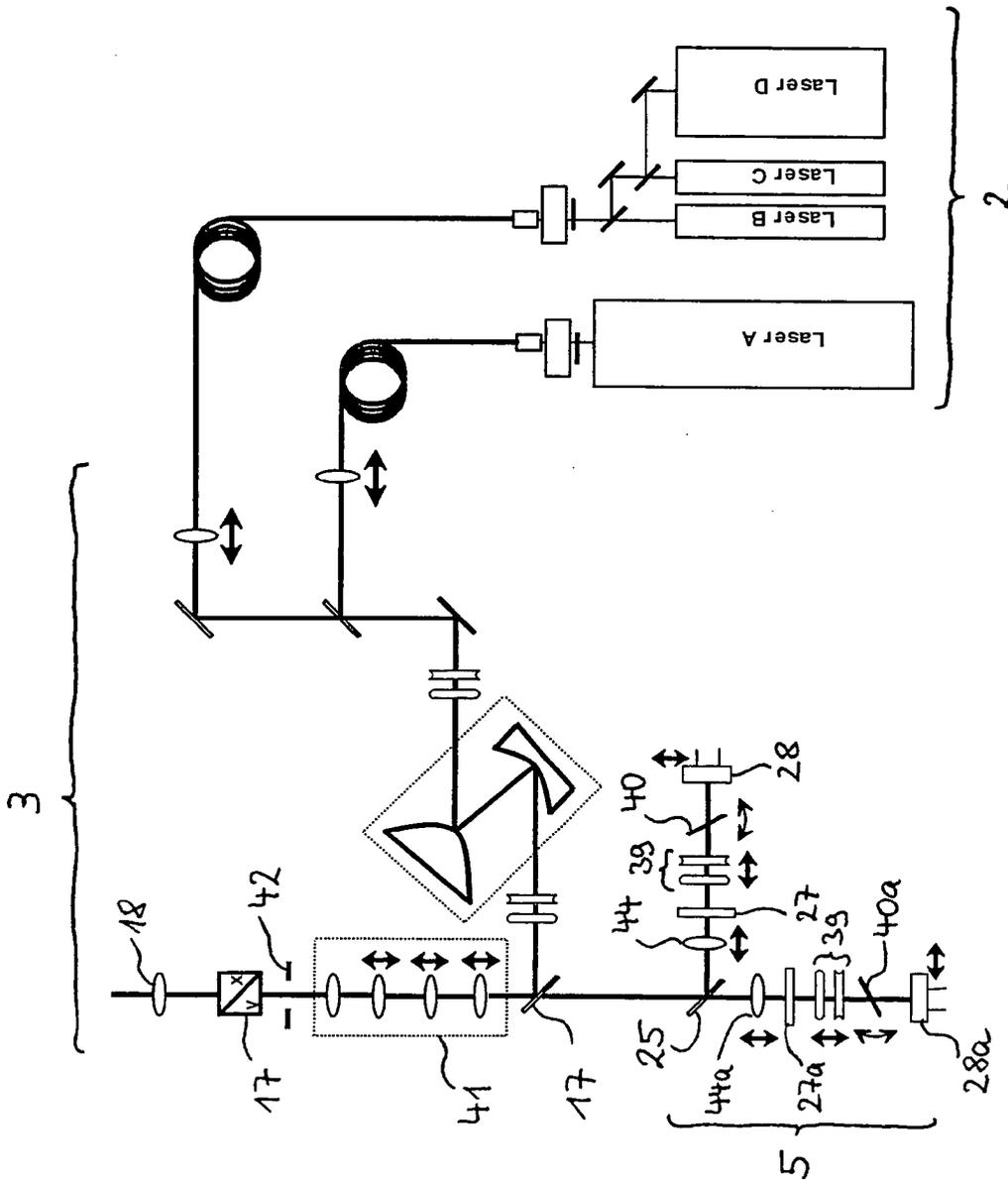


Fig. 14

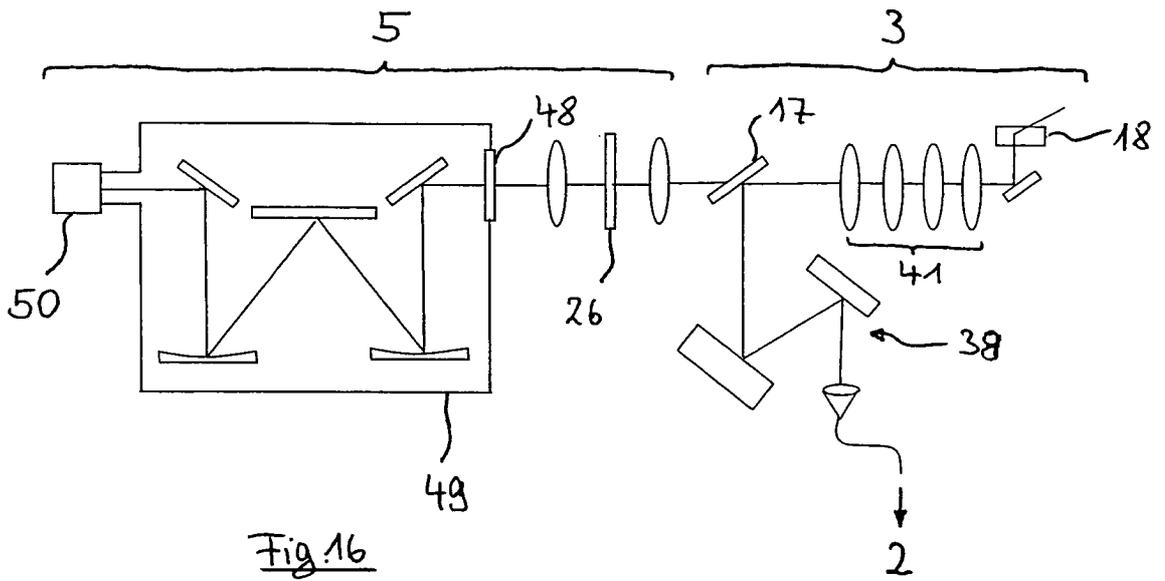


Fig. 16

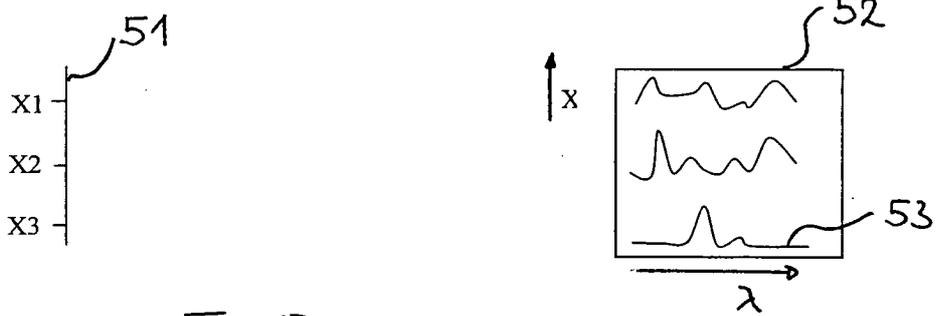
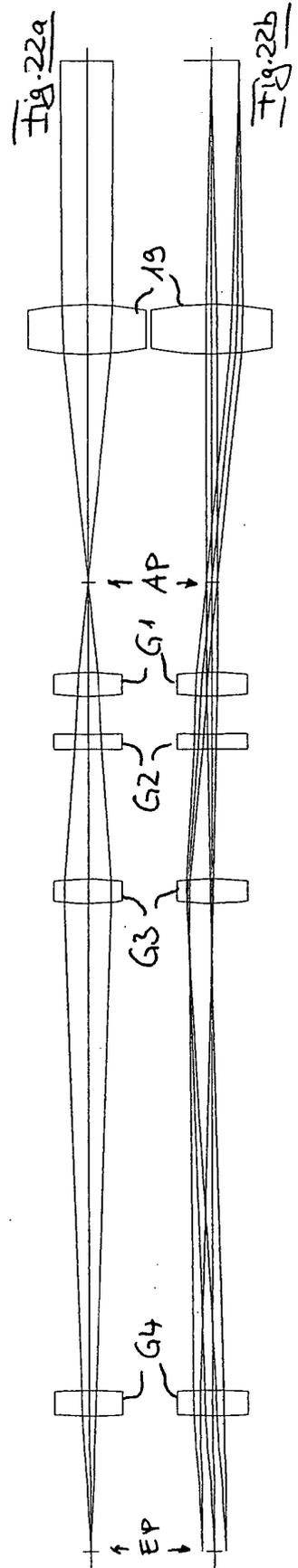
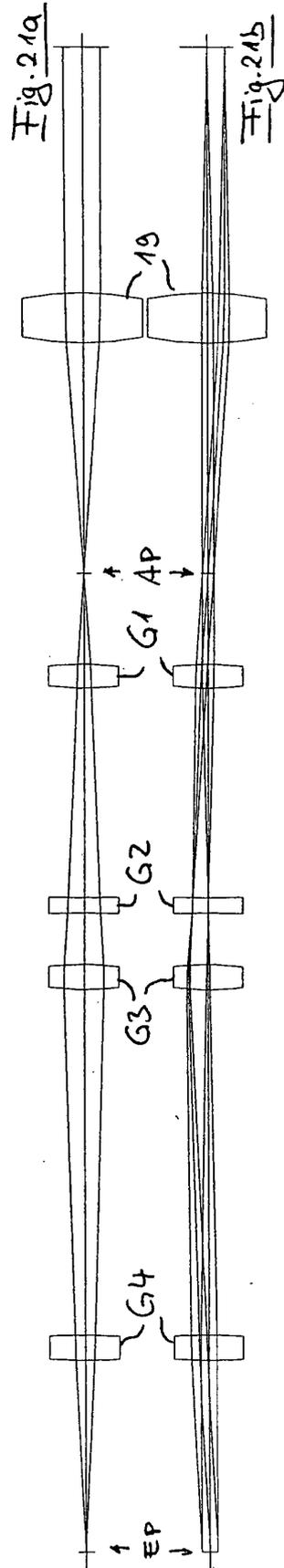
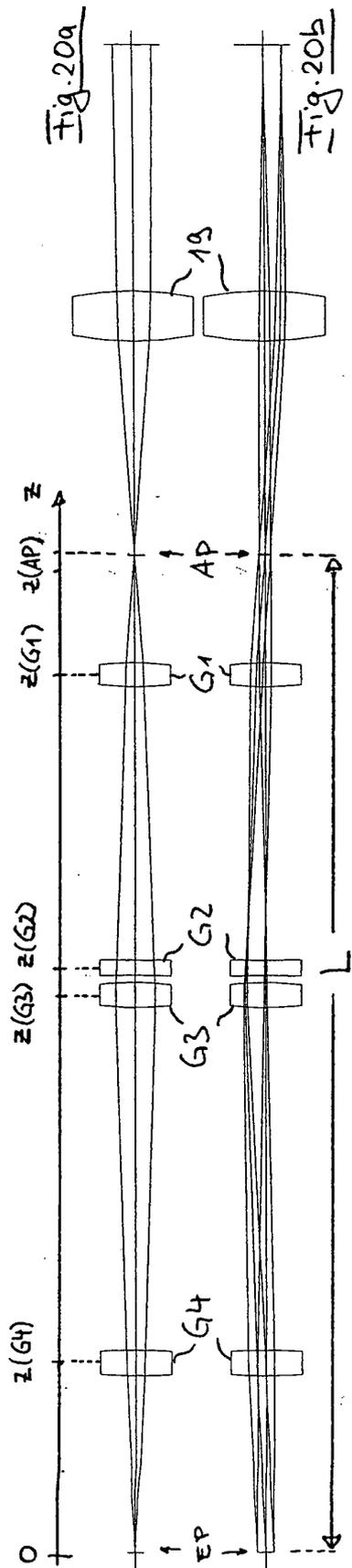
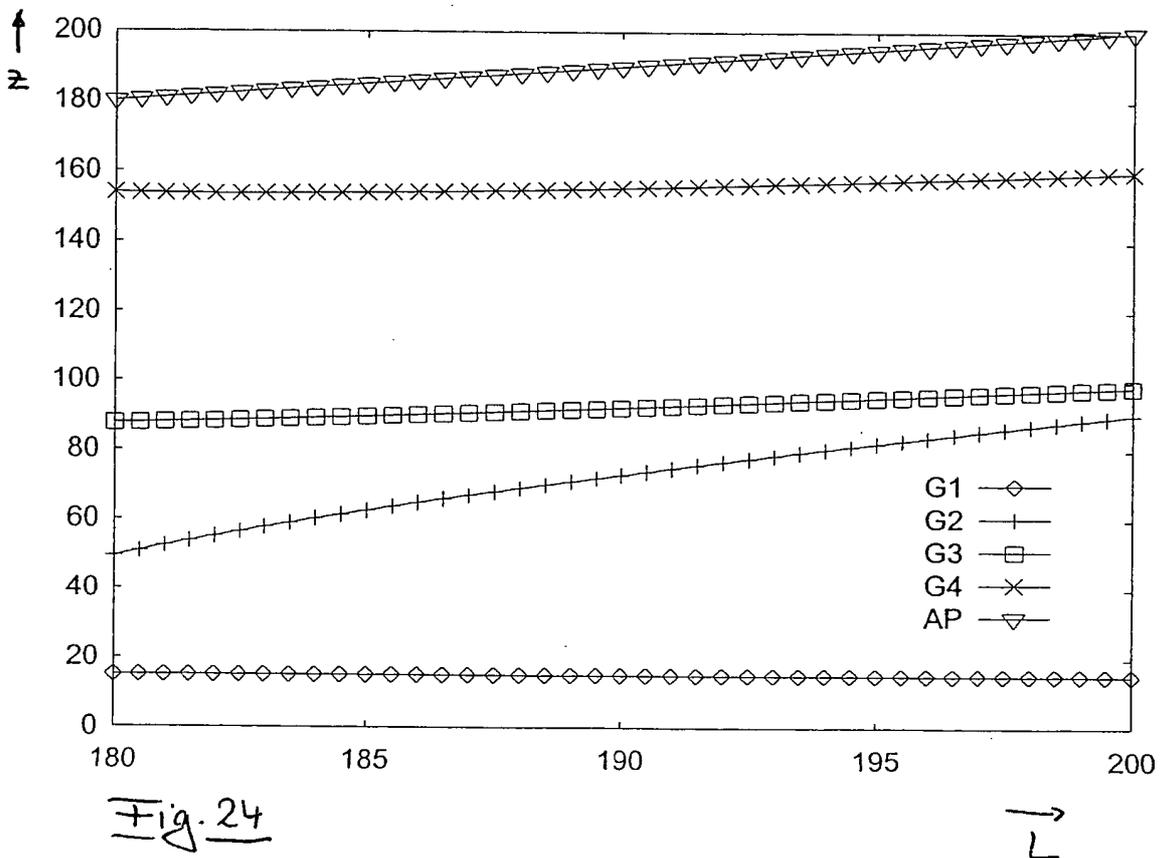
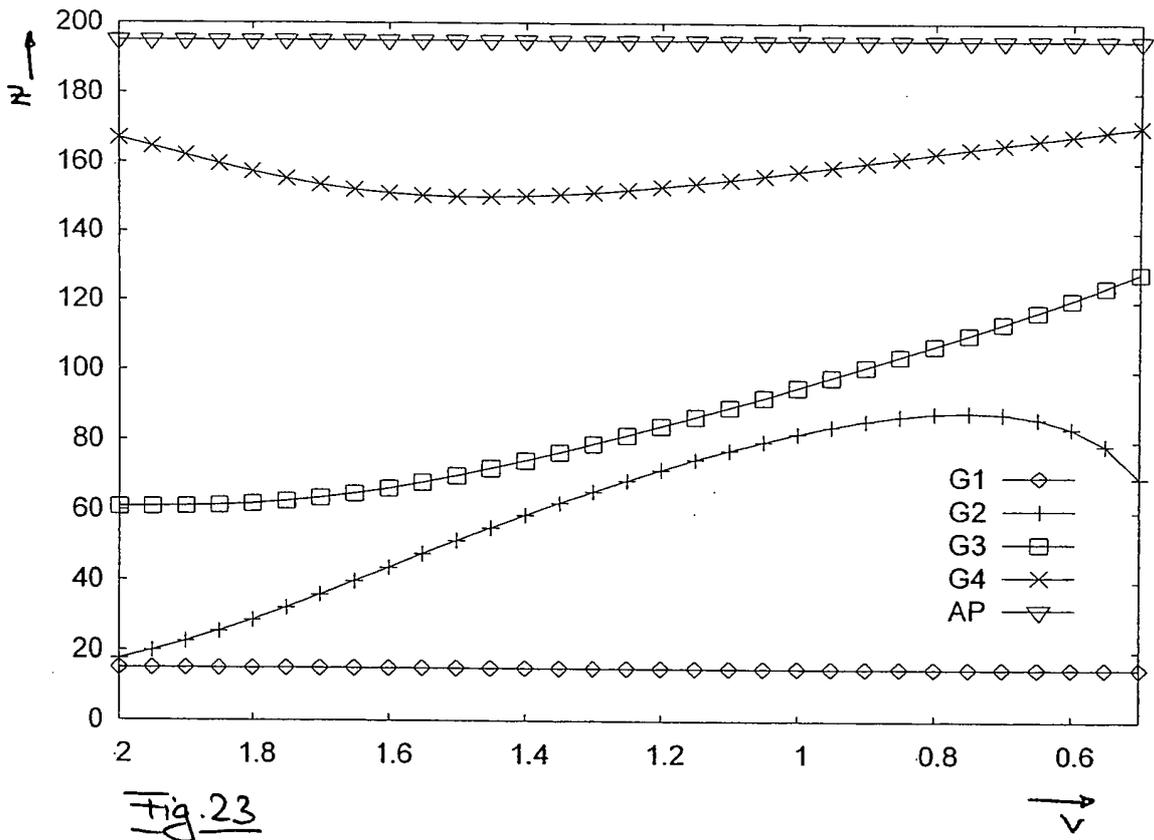


Fig. 17





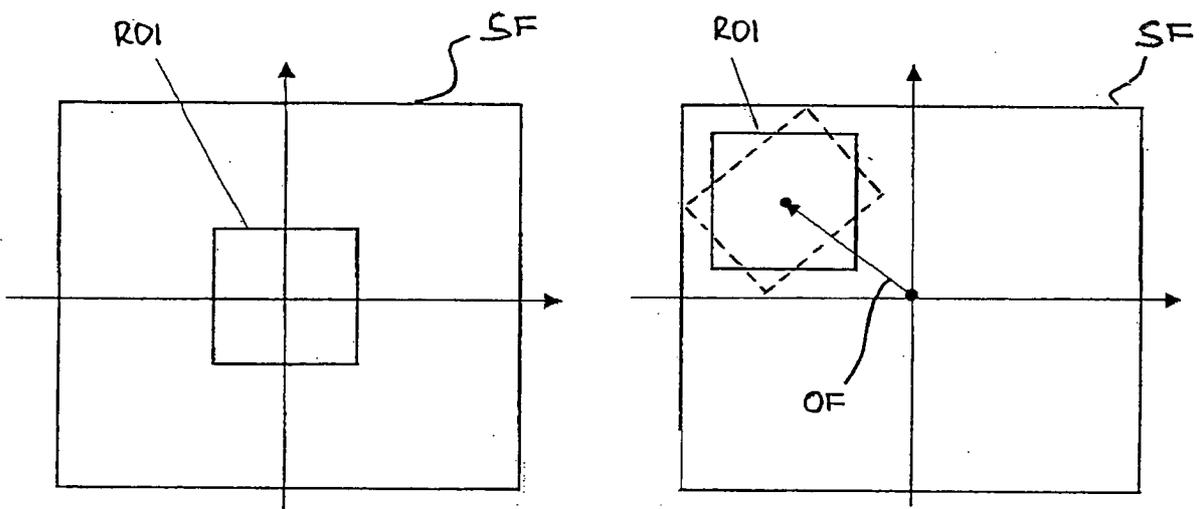
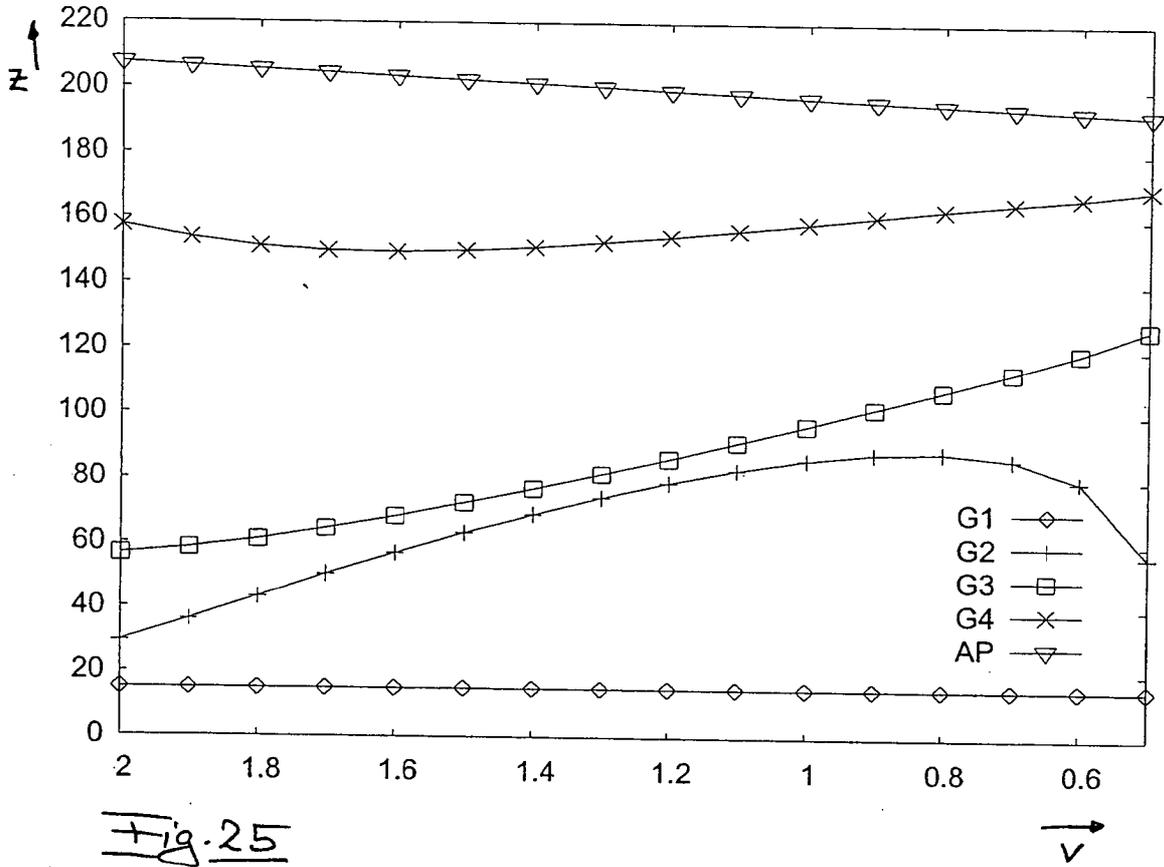


Fig. 26

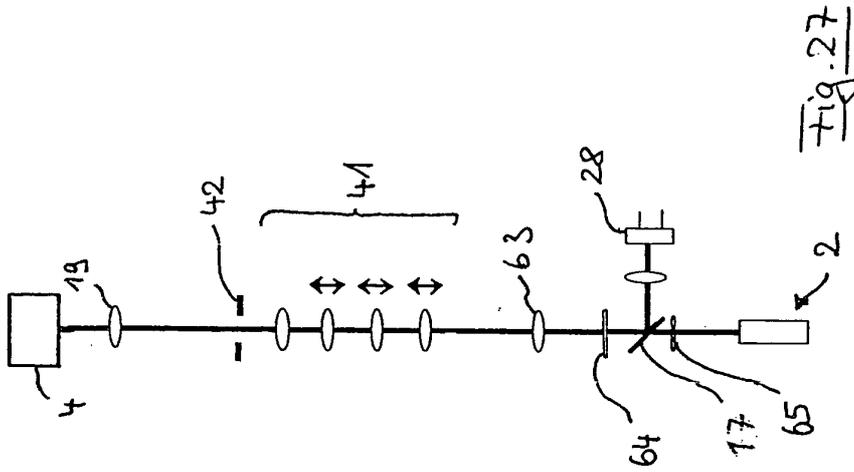


Fig. 27

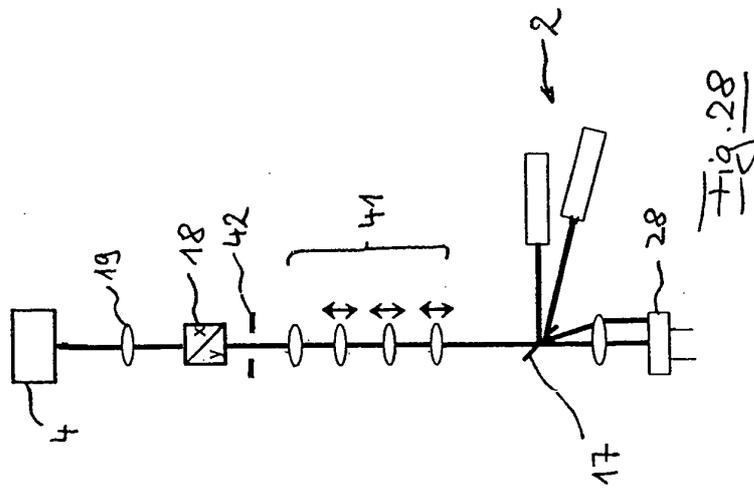


Fig. 28