

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
07. Dezember 2017 (07.12.2017)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2017/207664 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
G02B 21/00 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2017/063216

(22) Internationales Anmeldedatum:
31. Mai 2017 (31.05.2017)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2016 110 067.6
31. Mai 2016 (31.05.2016) DE

(71) Anmelder: LEICA MICROSYSTEMS CMS GMBH
[DE/DE]; Ernst-Leitz-Straße 17-37, 35578 Wetzlar (DE).

(72) Erfinder: WIDZGOWSKI, Bernd; Bahnhofstraße 6, 69221 Dossenheim (DE). KRISHNAMACHARI, Vishnu Vardhan; Hauptstraße 63, 64342 Seeheim-Jugenheim (DE). FRIEDRICH, Lars; Schimperstraße 18, 68167 Mannheim (DE). KREMER, Manuel; Rohrbacher Straße 106, 69181 Leimen (DE). GISKE, Arnold; Am Kantenbuckel 1, 69207 Sandhausen (DE).

(74) Anwalt: BRADL, Joachim; Leica Microsystems GmbH, Corporate Patents + Trademarks Dept., Ernst-Leitz-Str. 17-37, 35578 Wetzlar (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP,

(54) Title: OPTICAL ARRANGEMENT FOR PULSED ILLUMINATION, METHOD FOR PULSED ILLUMINATION AND MICROSCOPE

(54) Bezeichnung: OPTISCHE ANORDNUNG ZUR GEPULSTEN BELEUCHTUNG, VERFAHREN ZUR GEPULSTEN BELEUCHTUNG UND MIKROSKOP

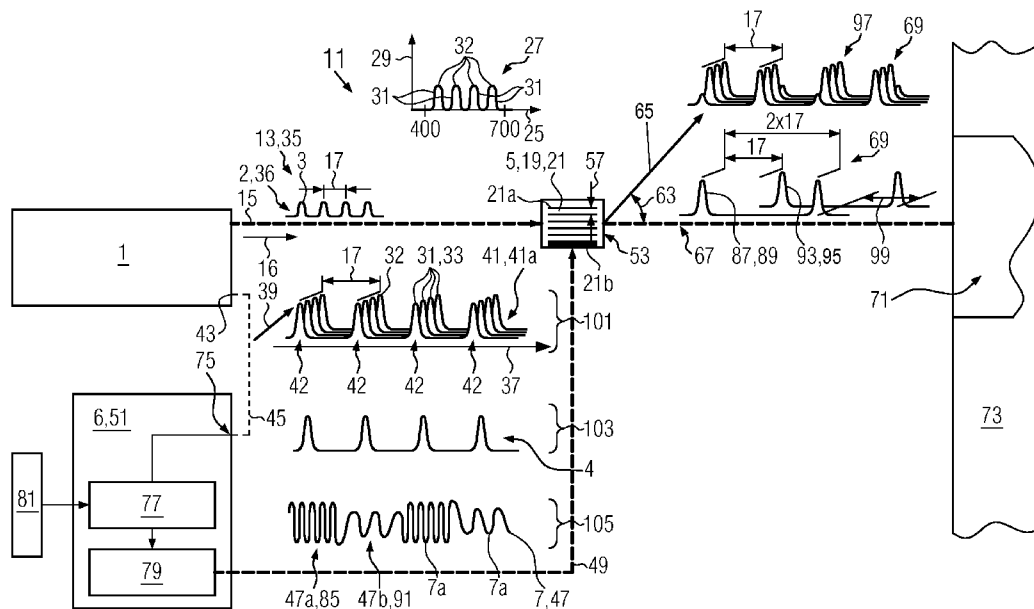


FIG. 1

(57) Abstract: The invention relates to an optical arrangement (11), a microscope and a method for illuminating a sample space (71) with a sequence (36) of laser light pulses (3). Known optical arrangements (11) allow a pulse repetition frequency (13) of generated pulses to be reduced, but are cost-intensive, may reduce the stability of the laser light source (1) and cannot be adapted to every illumination situation. The optical arrangement (11) according to the invention eliminates these disadvantages by providing at least one laser light source (1) for generating the sequence (36) of laser light pulses (3) along the optical beam path (15) and a wavelength-selective pulse picker (19) situated in the optical beam path (15), wherein the pulse picker (19) with a predefined illumination clock timing (41) synchronizable with the laser light pulses (3) has an open state (42), in which it is light-transmissive for at least one laser light pulse



WO 2017/207664 A1

KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

(3) toward the sample space (71). In this case, the open state (42) has at least two different transmission states (33) which differ with regard to the respective transmission spectrum (31) thereof, wherein the two transmission states (33) can be switched on and/or off independently of one another.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine optische Anordnung (11), ein Mikroskop und ein Verfahren zur Beleuchtung eines Probenraums (71) mit einer Folge (36) von Laserlichtpulsen (3). Bekannte optische Anordnungen (11) erlauben es, eine Pulswiederholfrequenz (13) erzeugter Pulse zu verringern, sind allerdings kostenintensiv, können die Stabilität der Laserlichtquelle (1) verringern und nicht an jede Beleuchtungssituation angepasst werden. Die erfindungsgemäße optische Anordnung (11) räumt diese Nachteile aus, indem mindestens eine Laserlichtquelle (1) zur Erzeugung der Folge (36) von Laserlichtpulsen (3) entlang des optischen Strahlengangs (15) und ein sich im optischen Strahlengang (15) befindlicher, wellenlängenselektiver Pulspicker (19) vorgesehen sind, wobei der Pulspicker (19) in einem vorgegebenen, mit den Laserlichtpulsen (3) synchronisierbaren Beleuchtungstakt (41) einen Offenzustand (42) aufweist, in dem er für wenigstens einen Laserlichtpuls (3) zum Probenraum (71) hin lichtdurchlässig ist. Dabei weist der Offenzustand (42) wenigstens zwei unterschiedliche Transmissionszustände (33) auf, die sich bezüglich ihres jeweiligen Transmissionspektrums (31) unterscheiden, wobei die beiden Transmissionszustände (33) unabhängig voneinander ein-und/oder ausschaltbar sind.

**Optische Anordnung zur gepulsten Beleuchtung, Verfahren zur gepulsten Beleuchtung und
Mikroskop**

Die Erfindung betrifft eine optische Anordnung zur Beleuchtung eines Probenraums mit einer Folge von Laserlichtpulsen, die in einem Lasertakt erzeugt werden, ein Mikroskop und ein Verfahren zur
5 Beleuchtung eines Probenraums mit einer Folge von Laserlichtpulsen.

Aus dem Stand der Technik bekannte optische Anordnungen erlauben es zwar, die Pulswiederholfrequenz, diese entspricht dem Lasertakt, der erzeugten Pulse zu verringern, sind allerdings kostenintensiv, können die Stabilität der Laserlichtquelle verringern und können nicht an jede Beleuchtungssituation angepasst werden.

10 Eine optische Anordnung, mit welcher dies erzielt werden kann, ist beispielsweise in der EP 2 081 074 B1 beschrieben. Dort ist ein sogenannter Pulsepicker (deutsch: Pulselektor) zwischen einem modengekoppelten Faseroszillator und einem optischen Faserverstärker eines Superkontinuumlasers angeordnet. Das Vorsehen des Pulse Pickers an dieser Stelle – also im Superkontinuumlaser – kann nachteilig sein und zusätzliche Kosten verursachen.

15 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es somit eine optische Anordnung, ein Mikroskop und ein Verfahren zu schaffen, die kostengünstig sind, vielseitige Beleuchtungsanwendungen erlauben und zudem die Stabilität eines Lasersystems nicht beeinflussen.

Optische Anordnungen zur Beleuchtung können zum Beispiel in der Fluoreszenz-Mikroskopie, insbesondere unter Verwendung von Konfokal- oder Lichtblattmikroskopen, eingesetzt werden. In
20 diesen Anwendungsfällen werden mit gepulsten Lasern Farbstoffe (Luminophore bzw. Fluorophore) angeregt, welche ein der Anregung nachfolgendes Nachleuchten aufweisen. Das Nachleuchten (Lumineszenz bzw. Fluoreszenz) erfordert meist die Anregung in einem bestimmten Spektralbereich, d.h. bei einer bestimmten Wellenlänge. Werden mehrere Luminophore simultan verwendet, so ist es wünschenswert, die Lumineszenz unterschiedlicher Luminophore unterscheiden
25 zu können, insbesondere wenn diese ein unterschiedliches zeitliches Verhalten der Lumineszenz aufweisen. Diese Schwierigkeiten sind bekannt und werden im Stand der Technik beispielsweise durch einzelne Laser gelöst, welche jeweils ein Luminophor anregen und separat angesteuert werden

Die eingangs erwähnte optische Anordnung zur Beleuchtung eines Probenraums mit einer Folge von Laserlichtpulsen, die in einem Lasertakt erzeugt werden, löst die obigen Aufgaben dadurch, dass die
30 optische Anordnung einen optischen Strahlengang, mindestens eine Laserlichtquelle zur Erzeugung der Folge von Laserlichtpulsen entlang des optischen Strahlenganges und einen sich im optischen Strahlengang befindlichen, Wellenlänge selektiven Pulsepicker aufweist. Der Pulsepicker weist in einem

vorgegebenen, mit den Laserlichtpulsen synchronisierbaren Beleuchtungstakt einen Offenzustand auf, in dem der Pulspicker für wenigstens einen Laserlichtpuls zum Probenraum hin durchlässig ist, wobei der Offenzustand wenigstens zwei unterschiedliche Transmissionszustände aufweist, die sich bezüglich ihres jeweiligen Transmissionspektrums unterscheiden, und wobei die beiden

5 Transmissionszustände unabhängig voneinander ein- und/oder ausschaltbar sind.

Das erfindungsgemäße Mikroskop, insbesondere ein PIE- Mikroskop, löst die obigen Aufgaben mit einer optischen Anordnung gemäß der Erfindung.

Das eingangs erwähnte erfindungsgemäße Verfahren löst die obigen Aufgaben, indem bei diesem die Laserlichtpulse durch einen wellenlängenselektiven Pulspicker geschickt werden, der synchron zum
10 Lasertakt zwischen wenigstens zwei unterschiedlichen Transmissionspektren umgeschaltet wird.

Die vorliegende Erfindung unterscheidet sich damit von den bisher bekannten Lösungen, die keine wellenlängenselektive, mit den Laserlichtpulsen synchronisierte Reduktion der Pulsfrequenz erlauben.

Im Folgenden werden weitere Ausgestaltungen der Erfindung beschrieben, deren zusätzliche oder
15 alternative technische Merkmale jeweils für sich vorteilhaft sind und beliebig miteinander kombiniert werden können.

Die verwendete Laserlichtquelle kann Licht mehrerer Farben bzw. Wellenlängen emittieren und kann bevorzugt ein Superkontinuumlaser oder ein Ramankammlaser sein. Der Superkontinuumlaser kann eine Pumplichtquelle und eine nichtlineare Faser aufweisen. Unter einer nichtlinearen Faser ist eine
20 Faser zu verstehen, in der nichtlineare optische Effekte, wie zum Beispiel Selbstphasenmodulation, der eingekoppelten Laserpulse der Pumplichtquelle auftreten. Die Laserlichtquelle emittiert gepulstes Licht mit mindestens einem Laserlichtimpuls bzw. Laserpuls.

Der optische Strahlengang ist als optischer Pfad zu verstehen, entlang dem sich die elektromagnetischen Wellen des Lichts, bzw. bei Pulsen des elektromagnetischen Wellenpakets
25 fortpflanzen. Der optische Strahlengang ist geradlinig und kann durch optische Elemente wie Spiegel, Prismen, Gitter oder ähnliche verändert werden. Der optische Strahlengang wird im Wesentlichen durch die Laserlichtquelle bestimmt.

Ein Transmissionszustand ist als eine Einstellung oder ein Modus der optischen Anordnung zu verstehen. Jeder Transmissionszustand ist durch ein jeweiliges Transmissionspektrum
30 gekennzeichnet, wobei die Transmissionspektren bevorzugt mindestens ein Transmissionsmaximum

aufweisen. Verschiedene Transmissionszustände unterscheiden sich durch ihre Transmissionspektren, wobei die Transmissionspektren zweier unterschiedlicher Transmissionszustände partiell identisch sein können und sich lediglich in definierten Wellenlängenbereichen unterscheiden können.

- 5 Bevorzugt ist mit der Vielzahl möglicher Transmissionszustände das Emissionsspektrum der Laserlichtquelle abdeckbar. Im Falle eines Superkontinuumlasers können somit beispielsweise alle Wellenlängen des sichtbaren Spektrums oder eine ganze Oktave abgedeckt sein. Hierunter ist zu verstehen, dass verschiedene Transmissionszustände über das Emissionsspektrum der Laserlichtquelle hinweg verteilt Transmissionsmaxima aufweisen können, Wellenlängenbereiche
10 ohne ein Transmissionsmaximum eines Transmissionszustandes allerdings auch vorhanden sein können.

- Das Umschalten zwischen den wenigstens zwei unterschiedlichen Transmissionspektren umfasst in einer Ausgestaltung des Verfahrens das Erzeugen eines mindestens eine Frequenz umfassende Frequenzfolge und das Anlegen der Frequenzfolge an einen Schallwandler und Um- oder
15 Hinzuschalten der Frequenz der Frequenzfolge.

Da der Offenzustand mit dem Lasertakt synchronisierbar ist, ist somit sichergestellt, dass ein Laserpuls im Pulspicker auf eine Kombination von Transmissionszuständen trifft, die zumindest bis zum nächsten Beleuchtungstakt, welcher dem nächsten Lasertakt entsprechen kann, unverändert bleibt.

- 20 Der Beleuchtungstakt des Pulspickers kann eine niedrigere Frequenz aufweisen als der Lasertakt, so dass zwischen zwei Takten des Beleuchtungstakts eine Beleuchtung des Probenraumes verhindert wird, mit anderen Worten kein Laserlichtpuls zum Probenraum hin durchgelassen wird. Der Beleuchtungstakt kann allerdings auch dem Lasertakt entsprechen, sodass bei jedem Takt des Lasertakts ein Laserlichtpuls den Probenraum beleuchten kann.

- 25 Unter dem eingangs erwähnten PIE-Mikroskop ist ein Mikroskop zu verstehen, welches eine Probe mit verschachtelten (Englisch: interleaved), mit anderen Worten zeitversetzten und zeitlich ineinandergreifenden, Pulsfolgen anregt (Englisch: excite). Mit dem erfindungsgemäßen Mikroskop kann in besonders vorteilhafter Weise diese sogenannte „Pulsed Interleaved Excitation (PIE)“-Funktionalität, sprich die Anregung mit verschachtelten Pulsen, in Verbindung mit einem gepulsten
30 Mehrfarbenlaser oder mehreren zueinander synchronisierten gepulsten Mehrfarbenlasern bzw. einem Superkontinuumlaser realisiert werden, die bei einer optischen Untersuchung einer Probe mit

einem Mikroskop, insbesondere mit einem Rastermikroskop und ganz besonders bevorzugt mit einem konfokalen Rastermikroskop zum Einsatz kommt.

In einer weiteren Ausgestaltung der optischen Anordnung weist der Pulspicker wenigstens drei unterschiedliche Transmissionszustände auf, die unabhängig voneinander schaltbar sind. Dies hat
5 den Vorteil, dass drei Luminophore in der Probe verwendet werden können, wobei die unterschiedlichen Transmissionspektren der drei unabhängig voneinander schaltbaren Transmissionszustände mit den Anregungsspektren der Luminophore im Wesentlichen übereinstimmen können.

Somit können die drei Luminophore zu beliebigen Zeitpunkten im Beleuchtungstakt angeregt
10 werden, wobei jede beliebige Kombination der Transmissionszustände möglich ist. Bei drei Transmissionszuständen, die jeweils ein- oder ausgeschaltet sein können, ergeben sich somit acht mögliche Kombinationen.

In weiteren Ausgestaltungen können vier, fünf, sechs oder mehr ganzzahlige Transmissionszustände möglich sein.

15 In einer weiteren Ausgestaltung der optischen Anordnung weist der wellenlängenselektive Pulspicker ein elektro-optisches Element auf. Dieses hat den Vorteil, dass es sehr kurze Schaltzeiten im Bereich weniger Nanosekunden bis hin zu wenigen hundert Pikosekunden ermöglicht. Ein elektro-optisches Element basiert auf dem Kerr-Effekt in einem Kristall und resultiert in einer wellenlängenabhängigen Rotation der Polarisation des durch das elektro-optische Element hindurchtretenden Lichtes, wobei
20 die Wellenlängenabhängigkeit mittels der am elektro-optischen Element angelegten Spannung veränderbar ist.

In einer weiteren Ausgestaltung der erfindungsgemäßen optischen Anordnung weist der wellenlängenselektive Pulspicker ein akusto-optisches Element auf. Auch ein akusto-optisches Element weist kurze Schaltzeiten auf. Im Gegensatz zur Verwendung eines elektro-optischen ist die
25 Schaltzeit eines akusto-optischen Elements abhängig von den Versuchsbedingungen.

Da ein akusto-optisches Element auf einer Schallwelle basiert, die in einem Medium erzeugt wird und sich fortpflanzt, bestimmen unter anderem die Schallgeschwindigkeit im verwendeten Medium, als auch der Durchmesser des zu modulierenden Lichtstrahls im Medium die Umschaltzeit.

Wird beispielsweise von einer ersten Frequenz auf eine zweite Frequenz umgeschaltet, so eilt die
30 Schallwelle mit der ersten Frequenz der Schallwellen mit der zweiten Frequenz voraus, wobei die

Phasenfront, die sich im Übergangsbereich zwischen der ersten und der zweiten Frequenz befindet, über den gesamten Strahldurchmesser propagieren muss, bis von einem erfolgten Umschalten die Rede sein kann.

Ein akusto-optisches Element basiert ferner auf der Beugung elektromagnetischer Wellen an der akustischen Welle, welche ein Dichtegitter ausbildet. Am Dichtegitter werden jeweils lediglich die Wellenlängen gebeugt, welche die Bragg-Bedingung erfüllen.

In einer Ausgestaltung der Erfindung können die verbleibenden Wellenlängen, die am Dichtegitter nicht gebeugt werden und somit nicht zum Probenraum gelangen dennoch aus dem Pulspicker austreten und für andere Anwendungen genutzt werden. Denkbare Anwendungsfälle sind zum Beispiel das Beleuchten und Erzeugen eines Stroboskopeffektes, wobei sich durch das Beugen einzelner Wellenlängen bzw. Wellenlängenbereiche am Dichtegitter das Erscheinungsbild des ursprünglich breitbandigen, bevorzugt weiß erscheinenden Lichtes je nach Zusammensetzung der Transmissionszustände ändert.

Im einfachsten Fall tritt das nicht gebeugte Licht in eine Strahlfalle ein und wird in dieser vollständig absorbiert.

In einer weiteren Ausgestaltung der erfindungsgemäßen optischen Anordnung weist das akusto-optische Element einen Kristall auf, wobei mindestens ein mit dem Kristall verbundener Schallwandler vorgesehen ist. Mit dem Schallwandler, der bewegungsübertragend am Kristall befestigt sein kann, wird auf einfache Weise eine Schallwelle in den Kristall eingekoppelt und im Kristall übertragen. Dabei werden bevorzugt akustische Longitudinalwellen erzeugt, deren Schwingung in Ausbreitungsrichtung erfolgt.

Akustische Transversalwellen sind ebenso denkbar, allerdings weisen diese im Allgemeinen eine geringere Schallgeschwindigkeit als Longitudinalwellen auf.

Der Kristall kann sich zwischen einem Eingangspfad, in den die Laserlichtpulse einkoppelbar sind, und einem Ausgangspfad, durch den der wenigstens eine Laserlichtpuls zum Probenraum hin auskoppelbar ist, befinden

Die Verwendung von Kristallen hat weiterhin den Vorteil, dass durch geeignete Schnitte der Kristalle eine Propagationsrichtung durch den Kristall hindurch festgelegt werden kann, deren optische Eigenschaften, wie zum Beispiel die Schallgeschwindigkeit, bekannt sind.

Erfindungsgemäß kann somit mindestens ein elektro-optisches Element und/oder mindestens ein akusto-optisches Element, bevorzugt ein akusto-optisches, steuerbares Filter (acousto-optical tunable filter: AOTF), an einer Stelle im optischen Strahlengang angeordnet sein, die – bezogen auf die Ausbreitungsrichtung des Lichts – der Laserlichtquelle, d.h. beispielsweise dem

5 Superkontinuumlaser (Weißlichtlaser, WLL) oder dem Ramankammlaser oder einer nicht-linearen (photokristallinen) optischen Faser bzw. einer entsprechend gepulsten Laserlichtquelle nachgeordnet ist.

Der gesamten Offenbarungsgehalt der WO 2011/154501 A1 wird hier mit einbezogen und sämtliche hier beschriebenen Ausführungsformen erstrecken sich auch im Kontext auf optischen Bauteile wie
10 z.B. AOTF, AOM, AOD, EOM, EOD, AOBM und AOBS, welche in der WO 2011/154501 A1 auf Seite 2, zweiter Absatz bis Seite 3, erster Absatz beschrieben sind.

Problematisch mit gepulsten Laserlichtquellen, welche Licht mit mehreren Farben bzw. Wellenlängen emittieren (z.B. Superkontinuumlaser oder Ramankammlaser), ist, dass üblicherweise nur ein Pulsepicker zum Selektieren der einzelnen Lichtpulse nur für alle Farben gleichzeitig realisiert werden
15 kann, indem z.B. zwischen der Pumplichtquelle und einer nichtlinearen Faser eines Superkontinuumlasers ein elektro- oder akusto-optisches Element platziert wird. Die Funktionalität der Repetitionsratenreduktion tritt zwar ein, wirkt aber auf alle Farben simultan. D.h. insbesondere ist folgende Konfiguration mit einem Superkontinuumlaser mit handelsüblichem Pulsepicker, wie z.B. aus der EP 2 081 074 B1 bekannt, nicht möglich:

20 Beleuchtung mit einem ersten Anregungslicht mit einer Wellenlänge von 629 nm mit einer Repetitionsrate von 40 MHz, einem zweiten Anregungslicht mit einer Wellenlänge von 485 nm mit einer Repetitionsrate von 20 MHz und einem dritten Anregungslicht mit einer Wellenlänge von 557 nm mit einer Repetitionsrate von 40 MHz, wobei z.B. die Abfolge der Lichtpulse des zweiten und dritten Anregungslichts um eine vorgebbare Zeitdauer (z.B. 12,5 ns oder 25 ns) relativ zur Pulslage
25 des ersten Anregungslichts mit der Wellenlänge 629 nm zeitlich verschoben ist.

Eine solche zeitliche Abfolge des ersten bis dritten Anregungslichts wäre z.B. bei einer Abbildung einer mit Fluoreszenzfarbstoffen versehenen Probe mithilfe eines Mikroskops und insbesondere mit einem Rastermikroskop und ganz besonders bevorzugt mit einem konfokalen Rastermikroskop insbesondere für PIE hilfreich, wobei die Fluoreszenzfarbstoffe der Probe mit dem ersten bis dritten
30 Anregungslicht angeregt werden können und die Probe mit dem Mikroskop bzw. dem Rastermikroskop bzw. dem konfokalen Rastermikroskop abgebildet bzw. untersucht wird.

Das Problem kann dadurch gelöst werden, dass ein AOTF, bei welchem die Farbselektion über das Setzen einer Schwingungsfrequenz geschieht, mit Hilfe eines digital gemischten Steuersignals, d.h. einer digital gemischten Frequenzfolge, synchron zur Laserrepetitionsrate angesteuert wird. Bevorzugt kann die Frequenzfolge mit einem digitalen Frequenzsynthesizer (Frequenzfolgegenerator) erzeugt werden.

Das elektro-optische Element und/oder das akusto-optische Element wird/werden hierbei mit einer hierzu geeigneten Frequenzfolge angesteuert, die zur Repetitionsrate der Laserlichtpulse der Laserlichtquelle in einer vorgebbaren zeitlichen Beziehung steht und insbesondere synchron dazu ist.

Eine solche geeignete Frequenzfolge kann mittels einer digitalen Synthetisierung erzeugt werden, wie dies z.B. in der WO 2011/154501 A1 beschrieben ist.

Dabei wird in bestimmter Abfolge die Frequenz zwischen mindestens zwei zu den gewünschten Farben bzw. Wellenlängen entsprechenden Werten alternierend eingestellt, und aufgrund der Synchronisierung pro Lichtpuls des Lasers jeweils die zu der gerade am AOTF anliegenden Schwingungsfrequenz entsprechende Farbe ausgewählt.

In einer Ausgestaltung der optischen Anordnung ist eine Ansteuereinheit zur Erzeugung einer Frequenzfolge für den Pulpicker vorgesehen, wobei der Transmissionszustand des Pulpickers abhängig von der Frequenz der Frequenzfolge ist.

Die Frequenzfolge kann an den Schallwandler des Pulpicker angelegt werden, wobei der Schallwandler mit der Frequenz der Frequenzfolge schwingt. Im Kristall breitet sich folglich eine mit dieser Frequenz schwingende Schallwelle aus, die entsprechend der Schallgeschwindigkeit im Material, insbesondere im Kristall, ein Dichtegitter mit einer Raumfrequenz ausbildet, welche direkt proportional zur Frequenz der Frequenzfolge ist.

Ferner kann in einer weiteren Ausgestaltung der optischen Anordnung die Frequenzfolge eine Überlagerung wenigstens zweier Teilsignale unterschiedlicher Frequenz aufweisen. Dies hat den Vorteil, dass jede Frequenz der Teilsignale zu einem Dichtegitter unterschiedlicher Raumfrequenz führt. Zwei unterschiedliche Wellenlängen bzw. Wellenlängenbereiche eines Pulses, der entlang des optischen Strahlengangs auf den Pulpicker trifft, können somit unabhängig voneinander eingeschaltet werden.

Das Einschalten entspricht physikalisch dem Erfüllen der Bragg-Bedingung, wobei in diesem Fall Licht der betreffenden Wellenlänge in eine vorbestimmte Richtung gebeugt wird und bevorzugt in diese Richtung ein Ausgang des Pulspicker liegt, durch den das gebeugte Licht hindurchtreten kann.

Da das in den Pulspicker eintretende Licht gepulst ist, ist auch ein gemäß einem

5 Transmissionszustand selektierter spektraler Anteil gepulst. Auf die Erhöhung der Pulsdauer aufgrund einer verringerten Bandbreite wird an dieser Stelle nicht eingegangen, da die Lumineszenz im Allgemeinen eine Anstiegszeit im Bereich von Pikosekunden bis Mikrosekunden aufweist und sich somit die Anregung eines Luminophors mit einer Pulsdauer von 10 fs nicht von der Anregung mit einer Pulsdauer von beispielsweise 300 fs unterscheidet.

10 Die Ansteuereinheit kann eine Überlagerungseinheit umfassen, mit der mindestens zwei Frequenzen in der Frequenzfolge überlagerbar sind. Insbesondere umfasst die Ansteuereinheit eine digitale Datenverarbeitungsvorrichtung zur Erzeugung einer digitalen, aus mehreren Frequenzen zusammengesetzten Frequenzfolge und mindestens einen Digital-Analogwandler zur Umwandlung der digitalen Frequenzfolge in eine analoge Frequenzfolge. Die digitale

15 Datenverarbeitungsvorrichtung kann dabei eine digitale Frequenzberechnungsvorrichtung zur Berechnung und Erzeugung mindestens zweier digitaler Frequenzfolgeanteile unterschiedlicher Frequenz umfassen. Ferner kann in der Ansteuereinheit eine digitale Überlagerungsvorrichtung zur Überlagerung der mindestens zwei digitalen Frequenzfolgeanteile und Berechnung der daraus resultierenden digitalen Frequenzfolge vorgesehen sein. Die durch den Digital-Analogwandler
20 erzeugte analoge Frequenzfolge kann in einen Verstärker einspeisbar sein und von diesem verstärkt an den Schallwandler weitergegeben werden.

Die Ansteuereinheit kann als digitaler Frequenzsynthesizer ausgestaltet sein und kann mehrere Kanäle aufweisen, mit welchen jeweils simultan unterschiedliche Schwingungsfrequenzen erzeugt werden können und mit welchen simultan ein elektro-optisches Element und/oder ein akusto-
25 optisches Element beaufschlagt werden kann.

In einer weiteren Ausgestaltung der erfindungsgemäßen optischen Anordnung weist die Frequenzfolge einen mit dem Lasertakt synchronisierten Steuertakt auf. Dies hat den Vorteil, dass die Frequenzfolge zum Zeitpunkt eines im Pulspicker eintreffenden Laserpulses nicht geändert wird und somit jeder Laserpuls eine eindeutige Zusammensetzung von Transmissionszuständen im
30 Offenzustand des Pulspickers erfährt.

Die Frequenzfolge kann gepulst sein.

In einer weiteren Ausgestaltung sind in der optischen Anordnung gespeicherte, änderbare Beleuchtungsparameter vorhanden, von denen die Frequenz der Frequenzfolge und/oder der Steuertakt abhängen. Die Beleuchtungsparameter können somit für jeden Transmissionszustand eine Abfolge enthalten, welche das Ein- oder Ausschalten des jeweiligen Transmissionszustandes steuert.

5 Das Ein- oder Ausschalten kann periodisch erfolgen oder aber aperiodisch zu vorgegebenen, mit mindestens einem Takt des Lasertaktes übereinstimmenden Zeitpunkten erfolgen. Jeder Transmissionszustand kann hierbei eine unterschiedliche Abfolge des Ein- oder Ausschaltens aufweisen.

In einer weiteren Ausgestaltung ist mindestens ein wenigstens zweifarbiges Transmissionszustand
10 vorhanden, in dem das Transmissionspektrum wenigstens zwei voneinander getrennte Wellenlängenmaxima aufweist. Dies hat den Vorteil, dass Luminophore, deren Lumineszenz sich nicht gegenseitig beeinflusst (kein Cross-talk) zeitgleich angeregt werden können. Eine der Anregungswellenlängen kann größer und eine zweite der Anregungswellenlängen kleiner als eine Anregungswellenlänge eines dritten Luminophors sein. Zwei voneinander getrennte
15 Wellenlängenmaxima sind vorteilhaft, wenn es erwünscht ist, dass das dritte Luminophor nicht zusammen mit dem ersten oder zweiten Luminophor angeregt wird.

Die Zahl der Transmissionszustände ist dabei in einer weiteren Ausgestaltung von der Anzahl unterschiedlicher Frequenzen in der Frequenzfolge abhängig. Folglich kann jedem Transmissionszustand ein unterschiedliches Wellenlängenmaximum zugeordnet sein, insbesondere
20 ist jedem Transmissionszustand genau ein unterschiedliches Wellenlängenmaximum zugeordnet.

Mit anderen Worten ist im Puls picker eine Überlagerung mehrerer Schallwellen vorhanden. Jede der Schallwellen weist eine unterschiedliche Frequenz auf, die mit der Raumfrequenz des ausgebildeten Dichtegitters korreliert. Ferner wird an jedem Dichtegitter einer Raumfrequenz genau eine Wellenlänge bzw. ein Wellenlängenbereich gebeugt, und zwar diejenige, welche die Bragg-
25 Bedingung erfüllt. Die Anzahl der möglichen Wellenlängenmaxima kann dabei maximal der Anzahl unterschiedlicher Frequenzen in der Frequenzfolge entsprechen.

Die optische Anordnung zur Beleuchtung einer Probe mit Laserpulsen, kann ein gepulstes Lasersystem umfassen, welches in einer Pulsfolge Pulse in mindestens zwei unterschiedlichen Wellenlängenbereichen emittiert und welches ein Pulstriggermodul zur Erzeugung eines mit den
30 Pulsen des Lasersystems synchronisierten Triggersignals aufweist. Ferner kann eine Ansteuereinheit mit gespeicherten, änderbaren Beleuchtungsparametern und mit einem Triggereingang, an den das

Pulstriggermodul des gepulsten Lasersystems anschließbar ist vorgesehen sein, wobei die Ansteuereinheit in Abhängigkeit der gespeicherten Beleuchtungsparameter und des Triggersignals eine sich zeitlich periodisch ändernde Frequenzfolge generiert, welches sich aus mindestens zwei Frequenzen zusammensetzt. Ferner kann die optische Anordnung ein akusto-optisches Bauteil mit einem Eingangspfad, in den das vom gepulsten Lasersystem erzeugte Licht einkoppelbar ist, einen Ausgangspfad, durch den das durch das akusto-optische Bauteil transmittierte Licht gemäß den Beleuchtungsparametern auskoppelbar ist, und einem Kristall, der mit mindestens einem Schallwandler verbunden ist umfassen, wobei an den Schallwandler die Frequenzfolge anlegbar ist, und wobei mit dem Schallwandler ein, die Frequenzfolge repräsentierendes Dichtegitter im Kristall generierbar ist.

Hierbei kann wenigstens ein Schallgeber an einem Kristall befestigt sein, wobei Licht des Lasersystems in den Kristall einkoppelbar ist und zumindest partiell durch den Kristall transmittiert wird und aus dem Kristall austritt. Die Ansteuereinheit kann die Frequenzfolge an den mindestens einen Schallgeber übertragen und der Schallgeber in Abhängigkeit von der Frequenzfolge akustische Wellen im Kristall generieren.

Das akusto-optische Bauteil der optischen Anordnung kann eine Ausbreitungsrichtung einer durch das akusto-optische Bauteil erzeugten und das Dichtegitter ausbildenden akustischen Welle aufweisen, die nichtkollinear zum Eingangspfad verläuft. Mit anderen Worten verlaufen die akustische Welle und die Pulse unter einem Winkel zueinander.

Die optische Anordnung kann mindestens zwei am Kristall angebrachte Schallwandler aufweisen, wobei das hierdurch erzeugte Dichtegitter bevorzugt ein stehendes Dichtegitter sein kann. Die stehende Welle entsteht dabei bei Überlagerung von zwei akustischen Wellen, die durch den Kristall laufen. Typischerweise liegt jedem Schallwandler ein Absorber gegenüber, um Reflexionen der akustischen Wellen zu minimieren, wodurch die Schaltlaufzeit minimiert wird.

Das Dichtegitter der optischen Anordnung kann mindestens zwei Raumfrequenzen aufweisen, wobei durch Beugung an den jeweiligen Raumfrequenzen Pulse mit mindestens zwei unterschiedlichen Wellenlängen über den Ausgangspfad aus dem akusto-optischen Bauteil auskoppelbar sind. Die Raumfrequenzen können den zwei Frequenzen der Ansteuereinheit entsprechen.

Das im Kristall ausgebildete Dichtegitter kann beim Durchgang eines Pulses durch den Kristall stationär bezüglich einer Hüllkurve des Dichtegitters sein. Da das Dichtegitter im Kristall bewegt ist, ist die durch Interferenz zusammensetzende Frequenzfolge nicht stationär bezüglich des Kristalls,

jedoch stationär zur Hüllkurve. Somit ist die Synchronisierung zwischen den eintreffenden Laserpulsen und den Dichtegitter-Abschnitten möglich. Ferner ist sichergestellt, dass zum Zeitpunkt des Eintreffens eines Pulses der Wechsel der Frequenzzusammensetzung der akustischen Welle bereits abgeschlossen ist und unbestimmte Frequenzzustände (Oberwellen oder Ähnliches) nicht auftreten.

Die von der Ansteuereinheit generierte Frequenzfolge kann in isochrone Signalabschnitte jeweils konstanter Frequenzzusammensetzung aufteilbar sein, wobei eine Zeitdauer der Signalabschnitte einer Periodendauer der vom Lasersystem emittierten Pulsfolge entsprechen kann. Die Signalabschnitte können gleich lang (zeitlich) sein, wobei das Zeitfenster eines Signalabschnittes genauso lang sein kann wie die Zeit zwischen zwei aufeinanderfolgenden Pulsen.

Durch den Schallwandler können aus den Signalabschnitten jeweils konstanter Frequenzzusammensetzung Dichtegitterabschnitte jeweils konstanter Raumfrequenzzusammensetzung generierbar sein.

Ferner kann sich der Eingangspfad und das Dichtegitter in einem Interaktionsbereich kreuzen, und jeder, den Interaktionsbereich durchlaufende Laserpuls kann jeweils nur einen Dichtegitterabschnitt passieren.

Der Laserpuls kann den Dichtegitterabschnitt im Wesentlichen zentral bezüglich der Ausbreitungsrichtung der akustischen Welle passieren.

Das Verfahren zum Betreiben einer optischen Anordnung kann die folgenden Schritte umfassen:

das Erzeugen einer Abfolge äquidistanter Pulse mindestens zweier unterschiedlicher Wellenlängenbereiche und das Ausgeben eines mit der Pulsfolge synchronen Lasertakts;

das Auslesen von Beleuchtungsparametern und Generieren einer Frequenzfolge durch das Überlagern mindestens zweier Frequenzen in Abhängigkeit der Beleuchtungsparameter und des Lasertakts;

das Übertragen der Frequenzfolge an einen Schallwandler und das Erzeugen eines, die Frequenzfolge repräsentierenden Dichtegitters in einem Kristall;

das Einkoppeln der äquidistanten Pulse in den Kristall; und

das wellenlängenselektive Auskoppeln von Pulsen aus dem Kristall.

Ferner kann das Verfahren das Erzeugen eines weiteren Dichtegitters und das Überlagern des Dichtegitters mit dem weiteren Dichtegitter zur Erzeugung eines stehenden Dichtegitters umfassen.

Das zeitliche Angleichen von Signalabschnitten jeweils gleicher Frequenzzusammensetzung an eine Periodendauer der Abfolge der Pulse, als auch das Erzeugen eines Dichtegitterabschnittes aus dem
5 Signalabschnitt kann als jeweils weiterer Verfahrensschritt vorgesehen sein.

Im Verfahren kann das Passieren eines Pulses durch jeweils genau einen Dichtegitterabschnitt synchronisiert sein.

Ganz besonders vorteilhaft ist das Konzept skalierbar. So ist es z.B. möglich, dass Lichtpulse von vier unterschiedlichen Farben (die von derselben Laserlichtquelle stammen) entweder eine zwischen vier
10 entsprechenden Schwingungsfrequenzen alternierende Pulsabfolge in den Anregungsstrahlengang eines Mikroskops einzukoppeln, oder eine Frequenzabfolge mit je zwei Frequenzen zum gleichen Puls, alternierend zu zwei anderen Frequenzen zum nächsten folgenden Puls anzulegen, je nachdem, wie die konkrete Applikation dies erfordert.

Durch die Freiheiten einer digitalen Synthetisierung der im Prinzip beliebiger Frequenzmischungen
15 und Frequenzabfolgen sind auch Sonderkonfigurationen des Pulspickers möglich, wie z.B. zwei Farben mit jedem Takt des Lasertakts herauszubeugen, bei der dritten und vierten Farbe z.B. nur jeden zweiten Puls mit entsprechender für das „PIE“ Verfahren üblichen zeitlichen Verschiebung, und bei der fünften Farbe nur jeden vierten Puls. Unter dem Begriff Farbe ist eine Wellenlänge bzw. ein Wellenlängenbereich zu verstehen, die/der aufgrund eines Transmissionsmaximums vom Pulspicker
20 zum Probenraum gelangt. Dies geschieht durch das Beugen bzw. Herausbeugen aus dem akusto-optischen Element.

Die Gitteränderungen im akusto-optischen Kristall sollten entsprechend schnell (insbesondere in Abhängigkeit der Pulswiederholfrequenz des Lichts, dessen Pulswiederholfrequenz zu verringern ist) geändert werden können, um geringe Umschaltzeiten zu erlauben. Hilfreiche Maßnahmen sind unter
25 anderem eine geeignete Auswahl der Materialien mit hoher akustischer Geschwindigkeit. Alternativ oder zusätzlich kann eine Verkleinerung des optischen Strahldurchmessers, bis zum Fokussieren in den AOTF Kristall erfolgen. Dies verkleinert die Wechselwirkungsfläche bzw. das Wechselwirkungsvolumen des zu veränderten Lichts mit dem Dichtegitter im akusto-optischen Kristall bzw. ermöglicht es, dieses möglichst gering zu halten.

Bevorzugt wird die Pulswiederholfrequenz des Lichts (von mindestens einer Wellenlänge), dessen Pulswiederholfrequenz zu verringern ist, derart verringert, dass pro Zeitintervall nur noch ein Teil der ursprünglichen Pulse in einer Anwendung genutzt werden können.

Beispielsweise können in einer Ausgestaltung von ursprünglichen 100 Pulsen in einem Zeitintervall
5 nur noch 95 bis 5 Pulse pro Zeitintervall für eine Anwendung genutzt werden.

Soweit mit der synthetisierten Frequenzfolge darstellbar kann diese zur Erzeugung einer nahezu beliebigen Folge von Pulsen unterschiedlicher Wellenlängen und deren zeitlichen vorgebbaren Abfolge genutzt werden.

Ohne Einschränkung der Allgemeinheit kann die vorliegende Erfindung für eine Vielzahl von
10 Anwendungen eingesetzt werden. Insbesondere neben der bereits erwähnten Anwendung für die Mikroskopie, Rastermikroskopie und/oder konfokalen Rastermikroskopie kann die optische Anordnung bzw. das Verfahren auch für Anwendungen in der Spektroskopie verwendet werden.

Im Allgemeinen kann die erfindungsgemäße optische Anordnung bzw. das erfindungsgemäße Verfahren für Anwendungen genutzt werden, welche das Licht eines Superkontinuums Lasers
15 und/oder eines Raman-Kammlasers und/oder einer Lichtquelle mit einer nicht-linearen (photokristallinen) optischen Faser und/oder einer entsprechend gepulsten Laserlichtquelle nutzen und eine vorgegebene Abfolge und/oder Kombination von Laserpulsen vorgegebener Wellenlängen fordern.

Im Folgenden wird eine Ausgestaltung der Erfindung anhand der beigefügten Zeichnung näher
20 beschrieben. Gleiche technische Merkmale und technische Merkmale mit gleicher technischer Wirkung werden dabei der Übersichtlichkeit halber mit den gleichen Bezugszeichen versehen.

Es zeigt:

Fig. 1 einen schematischen Aufbau der erfindungsgemäßen optischen Anordnung in einer
möglichen Ausgestaltung.

25 Fig. 1 zeigt ein Ausführungsbeispiel der erfindungsgemäßen optischen Anordnung 11, welche eine Laserlichtquelle 1 umfasst, die gepulstes Laserlicht 2 erzeugt. Das Laserlicht 2 ist schematisch anhand einer Folge 36 von vier Lichtpulsen 3 gezeigt, die entlang eines optischen Strahlengangs 15 propagieren. Die Lichtpulse 3, auch Laserpulse 3 oder Laserlichtpulse 3 genannt, weisen in der gezeigten Ausführungsform eine Pulswiederholfrequenz 13 von 80 MHz auf, wobei die

Pulswiederholffrequenz 13 dem reziproken Wert einer Periodendauer 17 entspricht und einen Lasertakt 35 kennzeichnet. In diesem Lasertakt 35 werden die einzelnen Laserlichtpulse 3 von der Laserlichtquelle 1 erzeugt und emittiert. Im gezeigten Ausführungsbeispiel hat die Periodendauer 17 einen Wert von 12,5 ns.

5 Der optische Strahlengang 15 ist mit einer gestrichelten Linie gezeichnet und in diesem befindet sich ein wellenlängenselektiver Pulspicker 19. Der im gezeigten Ausführungsbeispiel gezeigte Pulspicker 19 enthält ein akusto-optisches Element 21, welches als akusto-optisches einstellbares Filter 5, kurz AOTF 5, ausgestaltet ist. Das akusto-optische Element 21 weist einen Kristall 21a auf, an dem ein Schallwandler 21b befestigt ist. In anderen nicht gezeigten Ausgestaltungen kann der Pulspicker 19
10 als elektro-optisches Element 22 ausgestaltet sein.

Das Laserlicht 2 kann bevorzugt breitbandig sein und den sichtbaren Spektralbereich 23, d.h. Wellenlängen 25 von ca. 400 nm bis 700 nm einschließen. Ein exemplarisches Spektrum 27 des Laserlichts 2 ist in Fig. 1 gezeigt. Dieses trägt eine Intensität 29 des Laserlichts 2 über die Wellenlänge 25 auf. Im Spektrum 27 des Laserlichts 2 liegen vier unterschiedliche Transmissionspektren 31, die
15 jeweils einem Transmissionszustand 33 zugeordnet sind. Jedes der Transmissionspektren 31 weist ein unterschiedliches Wellenlängenmaximum 32 auf.

Die Fig. 1 zeigt ferner eine symbolische erste Teildarstellung 101 von vier Transmissionszuständen 33, die sich entlang einer Zeitachse 37 wiederholen und durch die zugehörigen Transmissionspektren 31 symbolisiert sind. Die Transmissionspektren 31 sind entlang einer Wellenlängenachse 39
20 aufgetragen, die sich nach schräg oben in die Zeichenebene hinein erstreckt (vgl. das Spektrum 27).

Mit Bezugszeichen sind jeweils nur vier der sich im Beleuchtungstakt 41 wiederholenden und insgesamt sechzehn gezeigten Transmissionszustände 33 bzw. Transmissionspektren 31 versehen.

Die Transmissionszustände 33 treten in einem Beleuchtungstakt 41 auf, welcher im gezeigten Beispiel dem Lasertakt 35 entspricht und auch als Steuertakt 41a bezeichnet werden kann. Im
25 Beleuchtungstakt 41 ist das AOTF 5 jeweils in einer Offenstellung 42.

In der ersten Teildarstellung 101 der in Fig. 1 gezeigten Ausgestaltung der optischen Anordnung 11 mit vier möglichen Transmissionszuständen 33 ist eine Gesamtheit der möglichen ein- bzw. ausschaltbaren Transmissionszustände 33 in zeitlicher Abhängigkeit gezeigt.

Mit anderen Worten stehen diese sechzehn Transmissionszustände 33 innerhalb eines Zeitraums von vier Beleuchtungstakten 41, d.h. vier Offenstellungen 42 für die Beleuchtung zur Verfügung und können unabhängig voneinander in jeder der Offenstellungen 42 ein- bzw. ausgeschaltet werden.

Die Transmissionszustände 33 sind somit temporär diskret und an den Beleuchtungstakt 41
5 gebunden.

Die Laserlichtquelle 1 weist einen Triggerausgang 43 auf, über welchen ein erzeugtes Triggersignal 4 mittels einer Triggerleitung 45 übertragen wird. Das Triggersignal 4 ist in einer zweiten Teildarstellung 103 gezeigt und hängt von der Pulswiederholfrequenz 13 der Laserlichtquelle 1 ab. Insbesondere entspricht die Frequenz des Triggersignals 4 der Pulswiederholfrequenz 13.

10 Das AOTF 5 ist im optischen Strahlengang 15 – bezogen auf die Ausbreitungsrichtung 16 des Lichts 2 – der Laserlichtquelle 1 nachgeordnet. Das AOTF 5 wird von einem als Ansteuereinheit 51 ausgestalteten Bauelement 6 angesteuert, welche das AOTF 5 mit einer von der Ansteuereinheit 51 ausgegebenen Frequenzfolge 47 beaufschlagt. Das in einer dritten Teildarstellung 105 gezeigte Signal 7 ist eine Frequenzfolge 47 und wird über eine Steuerleitung 49 von der Ansteuereinheit 51 an das
15 AOTF 5 übertragen.

Dadurch breitet sich in dem AOTF 5 eine entsprechende Schwingungswelle 53 aus bzw. durchläuft den AOTF 5, wodurch sich ein Bragg-Gitter 55 ausbildet, mit welchem das Laserlicht 2 wechselwirkt und an welchem das Laserlicht 2 gebeugt wird, wenn das Bragg-Gitter 55 einen geeigneten wirksamen Gitterabstand 57 und eine geeignete Ausbreitungsrichtung hat. Das Bragg-Gitter 55 ist als
20 Dichtegitter 59 zu verstehen.

Es ist zu beachten, dass die in Fig. 1 gezeigten Orientierungen des optischen Strahlengangs vor bzw. nach dem AOTF 5 bezüglich der Schwingungswelle 53, als auch ein Winkel 63 zwischen einer nullten Ordnung 65 und einer ersten Ordnung 67 rein schematisch dargestellt sind.

Im Allgemeinen ist der optische Strahlengang 15 unter einem Winkel zur Schwingungswelle 53 in das
25 AOTF 5 eingekoppelt, die nullte Ordnung 65 wird durch das AOTF 5 nicht abgelenkt und lediglich die erste Ordnung 67 wird gebeugt.

Der reziproke Wert des Gitterabstands 57 entspricht einer Raumfrequenz 61.

Nach dem Durchlaufen des Laserlichts 2 durch das AOTF 5 ergeben sich daher zumindest die nullte 65 und die erste Beugungsordnung 67 des veränderten Lichts 69, was schematisch in der Fig. 1 rechts neben dem AOTF 5 angedeutet ist.

5 Nun könnte die nullte 65 und/oder die erste Beugungsordnung 67 des veränderten Lichts 69 für eine Anwendung (allgemeiner Art) verwendet werden. Im konkreten Ausführungsbeispiel wird jedoch nur die erste Beugungsordnung 67 des veränderten Lichts 69 verwendet, und zwar wird dieses veränderte Licht 69 einem Probenraum 71 eines Mikroskops 73 zugeleitet, mit welchem eine mit Fluoreszenzfarbstoffen versehene Probe (beides nicht gezeigt) abgebildet werden kann.

10 Die Ansteuereinheit 51 weist einen Triggereingang 75 auf, in welchen das Triggersignal 4 des Triggerausgangs 43 der Laserlichtquelle 1 eingegeben wird.

In der Ansteuereinheit 51 ist eine Einrichtung in Form mindestens eines digitalen Frequenzsynthesizers 77 (Frequenzfolgegenerators) vorgesehen, mit welcher eine digitale Synthese derart erfolgt, dass eine geeignete zeitliche Abfolge mindestens einer Schwingungsfrequenz 7a bzw. Frequenzfolge erzeugt wird, und zwar in Abhängigkeit vom Triggersignal 4. In der Fig. 1 sind zwei 15 Schwingungsfrequenzen 7a in der Frequenzfolge 47 aufeinanderfolgend kombiniert.

In einer Frequenzfolge 7 können verschiedene Schwingungsfrequenzen 7a zeitlich aneinander gereiht werden (wie in Fig. 1). Dabei können auch mehrere Schwingungsfrequenzen 7a gleichzeitig auftreten, d.h. überlagert sein.

20 Die so erzeugte Frequenzfolge 7 wird mit einem in der Ansteuereinheit 51 vorgesehenen Verstärker 79 (in diesem Beispiel in Form eines Analogverstärkers ausgebildet) verstärkt und über eine geeignete Leitung, der Steuerleitung 49 (siehe gestrichelte Linie), dem AOTF 5 zugeleitet. Zur Erzeugung der Frequenzfolge 47 kann die Ansteuereinheit 51 Beleuchtungsparameter 81 aus einem Beleuchtungsparameterspeicher auslesen und dem digitalen Frequenzsynthesizer 77 zur Verfügung stellen. Die Frequenzfolge 47 setzt sich aus zwei Teilsignalen 47a und 47b zusammen, kann sich aber 25 auch aus mehr als zwei Teilsignalen 47a, 47b zusammensetzen.

Hierbei bewirkt der – lediglich schematisch angedeutete – höherfrequente Anteil 85 der Frequenzfolge 7, dass jeweils ein erster Lichtpuls 87 eines Pulszugs mit einer blauen Farbe, d.h. einer ersten Wellenlänge 89, in die erste Beugungsordnung 67 gebeugt wird und somit dem Mikroskop 73 zugeleitet werden kann.

Die anderen Lichtpulsanteile 97 des veränderten Lichts 69 mit anderen Wellenlängen dieses Pulszugs durchlaufen das AOTF 5 ungebeugt und können einer Strahlfalle (nicht gezeigt) zugeführt werden, sollten sie für eine Anwendung nicht benötigt werden.

5 Mit dem niederfrequenten Anteil 91 der Frequenzfolge 7 wird jeweils ein zweiter Lichtpuls 93 mit einer roten Farbe, d.h. einer zweiten Wellenlänge 95, in die erste Beugungsordnung 67 gebeugt und dem Mikroskop 73 zugeleitet.

In diesem Ausführungsbeispiel wird jeder zweite Lichtpuls 3 der Pulsfolgefrequenz 13 des Laserlichts 2 mit einer blauen bzw. roten Wellenlänge 25 in die erste Beugungsordnung 67 gebeugt, wobei der herausgebeugte blaue (der erste Lichtpuls 87) und der herausgebeugte rote Lichtpuls (der zweite
10 Lichtpuls 93) der Pulsfolgefrequenz 13 jeweils aus einem anderen Laserpuls 3 der Laserlichtquelle 1 stammen und daher in einem zeitlichen Abstand 99 zeitlich versetzt zueinander sind. Insoweit weisen die in die erste Beugungsordnung 67 gebeugten Lichtpulse 87 bzw. 93 gleicher Wellenlänge 25 jeweils einen Pulsabstand 99 von 25 ns auf, wobei auf einen blauen Lichtpuls (der erste Lichtpuls 87) nach 12,5 ns ein roter Lichtpuls (der zweite Lichtpuls 93) folgt.

Bezugszeichen

	1	Laserlichtquelle
	2	Laserlicht
	3	Lichtpuls
5	4	Triggersignal
	5	akusto-optisches einstellbares Filter
	6	Bauelement
	7	Signal
	7a	Schwingungsfrequenz
10	11	optische Anordnung
	13	Pulswiederholffrequenz
	15	optischer Strahlengang
	17	Periodendauer
	19	wellenlängenselektiver Pulspicker
15	21	akusto-optisches Element
	21a	Kristall
	21b	Schallwandler
	22	elektro-optisches Element
	23	sichtbarer Spektralbereich
20	25	Wellenlänge
	27	Spektrum
	29	Intensität
	31	Transmissionspektrum
	33	Transmissionszustand
25	35	Lasertakt
	36	Folge
	37	Zeitachse
	39	Wellenlängenchse
	41	Beleuchtungstakt
30	41a	Stuertakt
	42	Offenstellung
	43	Triggerausgang
	45	Triggerleitung

	47	Frequenzfolge
	49	Steuerleitung
	51	Ansteuereinheit
	53	Schwingungswelle
5	55	Bragg-Gitter
	57	Gitterabstand
	59	Dichtegitter
	61	Raumfrequenz
	63	Winkel
10	65	nullte Ordnung
	67	erste Ordnung
	69	verändertes Licht
	71	Probenraum
	73	Mikroskop
15	75	Triggereingang
	77	digitaler Frequenzsynthesizer
	79	Verstärker
	81	Beleuchtungsparameter
	85	höherfrequenter Anteil
20	87	erster Lichtpuls
	89	erste Wellenlänge
	91	niederfrequenter Anteil
	93	zweiter Lichtpuls
	95	zweite Wellenlänge
25	97	anderer Lichtpulsanteil
	99	zeitlicher Abstand
	101	erste Teildarstellung
	103	zweite Teildarstellung
	105	dritte Teildarstellung

Ansprüche

1. Optische Anordnung (11) mit einem optischen Strahlengang (15) zur Beleuchtung eines Probenraumes (71) mit einer Folge (36) von Laserlichtpulsen (13), die in einem Lasertakt (35) erzeugt werden,
5 mit mindestens einer Laserlichtquelle (1) zur Erzeugung der Folge (36) von Laserlichtpulsen (3) entlang des optischen Strahlengangs (15), und
mit einem sich im optischen Strahlengang (15) befindlichen, wellenlängenselektiven Pulspicker (19), der in einem vorgegebenen, mit den Laserlichtpulsen (3) synchronisierbaren Beleuchtungstakt (41) einen Offenzustand (42) aufweist, in dem der Pulspicker (19) für
10 wenigstens einen Laserlichtpuls (3) zum Probenraum (71) hin lichtdurchlässig ist,
wobei der Offenzustand (42) wenigstens zwei unterschiedliche Transmissionszustände (33) aufweist, die sich bezüglich ihres jeweiligen Transmissionspektrums (31) unterscheiden, und wobei die beiden Transmissionszustände (33) unabhängig voneinander ein- und/oder ausschaltbar sind.
- 15 2. Optische Anordnung (11) nach Anspruch 1, wobei der Pulspicker (19) wenigstens drei unterschiedliche Transmissionszustände (33) aufweist, die unabhängig voneinander schaltbar sind.
3. Optische Anordnung (11) nach Anspruch 1 oder 2, wobei der wellenlängenselektive Pulspicker (19) ein elektro-optisches Element (22) aufweist.
- 20 4. Optische Anordnung (11) nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der wellenlängenselektive Pulspicker (19) ein akusto-optisches Element (21) aufweist.
5. Optische Anordnung (11) nach Anspruch 4, wobei das akusto-optische Element (21) einen Kristall (21a) aufweist, wobei mindestens ein mit dem Kristall (21a) verbundener Schallwandler (21b) vorgesehen ist.
- 25 6. Optische Anordnung (11) nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei eine Ansteuereinheit (51) zur Erzeugung einer Frequenzfolge (47) für den Pulspicker (19) vorgesehen und der Transmissionszustand (33) des Pulspickers (19) abhängig von der Frequenz (7a) der Frequenzfolge (47) ist.

7. Optische Anordnung (11) nach Anspruch 5 oder 6, wobei die Frequenzfolge (47) eine Überlagerung wenigstens zweier Teilsignale (47a, 47b) unterschiedlicher Frequenz (7a) aufweist.
8. Optische Anordnung (11) nach einem der Ansprüche 5 bis 7, wobei die Frequenzfolge (47) einen mit dem Lasertakt (35) synchronisierten Steuertakt (41a) aufweist.
9. Optische Anordnung (11) nach einem der Ansprüche 5 bis 8, wobei gespeicherte, änderbare Beleuchtungsparameter (81) vorhanden sind, von denen die Frequenz (7a) der Frequenzfolge (47) und/oder der Steuertakt (41a) abhängen.
10. Optische Anordnung (11) nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei mindestens ein wenigstens zweifarbigem Transmissionszustand (33) vorhanden ist, in dem das Transmissionspektrum (31) wenigstens zwei voneinander getrennte Wellenlängenmaxima (32) aufweist.
11. Optische Anordnung (11) nach einem der Ansprüche 5 bis 10, wobei die Zahl der Transmissionszustände (33) von der Anzahl unterschiedlicher Frequenzen (7a) in der Frequenzfolge (47) abhängig ist.
12. Mikroskop (73), insbesondere PIE-Mikroskop mit einer optischen Anordnung (11) nach einem der Ansprüche 1 bis 11.
13. Verfahren zur Beleuchtung eines Probenraums (71) mit einer Folge (36) von Laserlichtpulsen (3), die in einem Lasertakt (35) erzeugt werden, wobei die Laserlichtpulse (3) durch einen wellenlängenselektiven Pulpicker (19) geschickt werden, der synchron zum Lasertakt (35) zwischen wenigstens zwei unterschiedlichen Transmissionspektren (31) umgeschaltet wird.
14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei das Umschalten zwischen den wenigstens zwei unterschiedlichen Transmissionspektren (31) ferner umfasst:
- das Erzeugen einer mindestens eine Frequenz (7a) umfassenden Frequenzfolge (47) und
 - das Anlegen der Frequenzfolge (47) an einen Schallwandler (21b) und Um- oder Hinzuschalten der Frequenz (7a) der Frequenzfolge (47).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/063216

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G02B21/00
ADD.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G02B

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 2 081 074 B1 (FIANIUM LTD [GB]) 5 March 2014 (2014-03-05) cited in the application the whole document	1-14
X	EP 2 423 727 A1 (LEICA MICROSYSTEMS [DE]) 29 February 2012 (2012-02-29) abstract; figures paragraph [0020] - paragraph [0027] ----- -/--	1-8, 10-14

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 16 August 2017	Date of mailing of the international search report 24/08/2017
---	--

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Windecker, Robert
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/063216

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FRANK J H ET AL: "A white light confocal microscope for spectrally resolved multidimensional imaging", JOURNAL OF MICROSCOPY, BLACKWELL SCIENCE, GB, vol. 227, 3 September 2007 (2007-09-03), pages 203-215, XP002516159, ISSN: 0022-2720, DOI: 10.1111/J.1365-2818.2007.01803.X the whole document	1-5,12, 13
X	----- DE 10 2009 056092 A1 (PICOQUANT GMBH UNTERNEHMEN FUER OPTOELEKTRONISCHE FORSCHUNG UND ENTWIC) 1 June 2011 (2011-06-01) the whole document	1,12,13
A	----- WO 01/80507 A2 (UNIV CALIFORNIA [US]; JALALI BAHRAM [US]; KELKAR PARAG V [US]) 25 October 2001 (2001-10-25) abstract; figures page 9, line 14 - line 17	1
A	----- WO 2011/154501 A1 (LEICA MICROSYSTEMS [DE]) 15 December 2011 (2011-12-15) cited in the application abstract; figures -----	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/EP2017/063216

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
EP 2081074	B1	05-03-2014	DK 2081074 T3	16-06-2014
			DK 2492735 T3	01-12-2014
			DK 2492736 T3	24-11-2014
			DK 2495598 T3	19-01-2015
			EP 2081074 A1	22-07-2009
			EP 2492735 A1	29-08-2012
			EP 2492736 A1	29-08-2012
			EP 2495598 A1	05-09-2012
			EP 2913701 A1	02-09-2015
			US 2009097512 A1	16-04-2009
			US 2013188241 A1	25-07-2013
			US 2013208736 A1	15-08-2013
			US 2013208737 A1	15-08-2013
			US 2013208738 A1	15-08-2013
US 2013208739 A1	15-08-2013			
US 2014369370 A1	18-12-2014			
EP 2423727	A1	29-02-2012	DE 102010037190 A1	01-03-2012
			EP 2423727 A1	29-02-2012
			US 2012050849 A1	01-03-2012
DE 102009056092	A1	01-06-2011	NONE	
WO 0180507	A2	25-10-2001	AU 7290301 A	30-10-2001
			US 2002067747 A1	06-06-2002
			WO 0180507 A2	25-10-2001
WO 2011154501	A1	15-12-2011	CN 103080820 A	01-05-2013
			EP 2580618 A1	17-04-2013
			JP 5934701 B2	15-06-2016
			JP 2013534643 A	05-09-2013
			US 2011304900 A1	15-12-2011
			WO 2011154501 A1	15-12-2011

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

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 G02B

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

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

EPO-Internal, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 2 081 074 B1 (FIANIUM LTD [GB]) 5. März 2014 (2014-03-05) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1-14
X	EP 2 423 727 A1 (LEICA MICROSYSTEMS [DE]) 29. Februar 2012 (2012-02-29) Zusammenfassung; Abbildungen Absatz [0020] - Absatz [0027] ----- -/--	1-8, 10-14



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

16. August 2017

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

24/08/2017

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

Bevollmächtigter Bediensteter

Windecker, Robert

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	FRANK J H ET AL: "A white light confocal microscope for spectrally resolved multidimensional imaging", JOURNAL OF MICROSCOPY, BLACKWELL SCIENCE, GB, Bd. 227, 3. September 2007 (2007-09-03), Seiten 203-215, XP002516159, ISSN: 0022-2720, DOI: 10.1111/J.1365-2818.2007.01803.X das ganze Dokument	1-5,12, 13
X	----- DE 10 2009 056092 A1 (PICOQUANT GMBH UNTERNEHMEN FUER OPTOELEKTRONISCHE FORSCHUNG UND ENTWIC) 1. Juni 2011 (2011-06-01) das ganze Dokument	1,12,13
A	----- WO 01/80507 A2 (UNIV CALIFORNIA [US]; JALALI BAHRAM [US]; KELKAR PARAG V [US]) 25. Oktober 2001 (2001-10-25) Zusammenfassung; Abbildungen Seite 9, Zeile 14 - Zeile 17	1
A	----- WO 2011/154501 A1 (LEICA MICROSYSTEMS [DE]) 15. Dezember 2011 (2011-12-15) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung; Abbildungen	1-14

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2017/063216

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 2081074	B1	05-03-2014	DK 2081074 T3 16-06-2014
			DK 2492735 T3 01-12-2014
			DK 2492736 T3 24-11-2014
			DK 2495598 T3 19-01-2015
			EP 2081074 A1 22-07-2009
			EP 2492735 A1 29-08-2012
			EP 2492736 A1 29-08-2012
			EP 2495598 A1 05-09-2012
			EP 2913701 A1 02-09-2015
			US 2009097512 A1 16-04-2009
			US 2013188241 A1 25-07-2013
			US 2013208736 A1 15-08-2013
			US 2013208737 A1 15-08-2013
			US 2013208738 A1 15-08-2013
			US 2013208739 A1 15-08-2013
US 2014369370 A1 18-12-2014			

EP 2423727	A1	29-02-2012	DE 102010037190 A1 01-03-2012
			EP 2423727 A1 29-02-2012
			US 2012050849 A1 01-03-2012

DE 102009056092	A1	01-06-2011	KEINE

WO 0180507	A2	25-10-2001	AU 7290301 A 30-10-2001
			US 2002067747 A1 06-06-2002
			WO 0180507 A2 25-10-2001

WO 2011154501	A1	15-12-2011	CN 103080820 A 01-05-2013
			EP 2580618 A1 17-04-2013
			JP 5934701 B2 15-06-2016
			JP 2013534643 A 05-09-2013
			US 2011304900 A1 15-12-2011
			WO 2011154501 A1 15-12-2011
