



PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

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

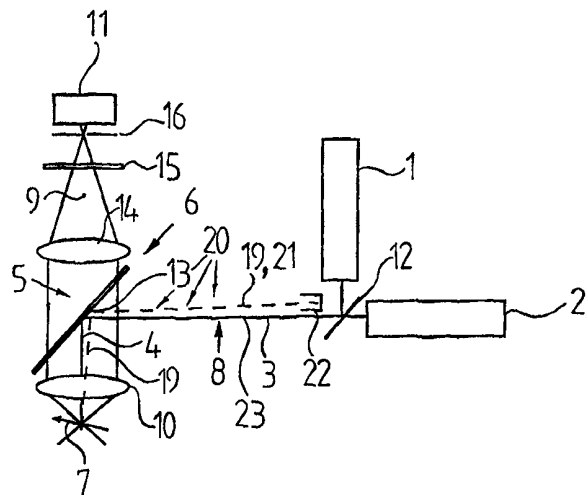
<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : G02B 21/00, G01N 21/64</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/16149</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 23. März 2000 (23.03.00)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/02910</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 13. September 1999 (13.09.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 42 153.2 15. September 1998 (15.09.98) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): LEICA MICROSYSTEMS HEIDELBERG GMBH [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 518, D-69120 Heidelberg (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ENGELHARDT, Johann [DE/DE]; Schießmauerweg 6, D-76669 Bad Schönborn (DE). ULRICH, Heinrich [DE/DE]; Langgewann 2, D-69121 Heidelberg (DE). HAY, William, C. [US/DE]; Am Mühlgraben 8, D-69493 Hirschberg (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>	

(54) Title: OPTICAL SYSTEM IN THE RAY PATH OF A CONFOCAL FLUORESCENCE MICROSCOPE

(54) Bezeichnung: OPTISCHE ANORDNUNG IM STRAHLENGANG EINES KONFOKALEN FLUORESCENZMIKROSKOPES

(57) Abstract

The invention relates to an optical system in the ray path of a confocal fluorescence microscope, comprising at least one laser light source (1, 2), a device positioned in the illuminating/detecting beam (3, 4, 5) for separating the exciting light (8) from the fluorescent light (9), an objective (10) arranged between the device and the object (7), and a detector (11) positioned downstream of the device situated in the detecting beam (5). The aim of the invention is to increase the fluorescence yield of the system while retaining its compact structure. To this end the separating device comprises a mirror (13) which is dimensioned and positioned in the illuminating and/or detecting beam (3, 4, 5) in such a way that for the dark-field illumination of the object (7) it reflects the non-expanded exciting beam arriving from the laser light source (1, 2) into the objective (10) and permits the transit of the fluorescence light (9) arriving from the object (7) in the direction of the detector (11) with full numerical aperture, the fluorescent light beam being reduced by the mirror (13) cross-section active in the detecting beam (5).



(57) Zusammenfassung

Eine optische Anordnung im Strahlengang eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops, mit mindestens einer Laserlichtquelle (1, 2), einer im Beleuchtungs-/Detektionsstrahlengang (3, 4, 5) angeordneten Einrichtung zur Trennung des Anregungslichts (8) von dem Fluoreszenzlicht (9), einem zwischen der Einrichtung und dem Objekt (7) angeordneten Objektiv (10) und einem der Einrichtung im Detektionsstrahlengang (5) nachgeordneten Detektor (11), ist zur Erhöhung der Fluoreszenzausbeute bei einfacher Bauweise dadurch gekennzeichnet, daß die Einrichtung einen Spiegel (13) umfaßt und daß der Spiegel (13) im Beleuchtungs-/Detektionsstrahlengang (3, 4, 5) derart angeordnet und dimensioniert ist, daß er zur Dunkelfeldbeleuchtung des Objekts (7) den von der Laserlichtquelle (1, 2) kommenden, nicht aufgeweiteten Anregungsstrahl in das Objektiv (10) reflektiert und das vom Objekt (7) kommende Fluoreszenzlicht (9) mit voller numerischer Apertur - vermindert um den im Detektionsstrahlengang (5) wirksamen Querschnitt des Spiegels (13) - in Richtung des Detektors (11) passieren läßt.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

**"Optische Anordnung im Strahlengang eines konfokalen
Fluoreszenzmikroskops"**

- Die Erfindung betrifft eine optische Anordnung im Strahlengang eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops, mit mindestens einer Laserlichtquelle,
- 5 einer im Beleuchtungs-/Detektionsstrahlengang angeordneten Einrichtung zur Trennung des am Objekt reflektierten Anregungslichts von dem vom Objekt abgestrahlten Fluoreszenzlicht, einem zwischen der Einrichtung und dem Objekt angeordneten Objektiv und einem der Einrichtung im Detektionsstrahlengang nachgeordneten Detektor.
- 10 Aus der Praxis ist es bereits seit Jahren bekannt, zur Trennung des am Objekt reflektierten Anregungslichts von dem vom Objekt abgestrahlten Fluoreszenzlicht dichroitische Strahlteiler zu verwenden. Bei der simultanen Mehrfarbanwendung finden entsprechend mehrfach dichroitische Strahlteiler Anwendung. Das vom reflektierten Anregungslicht befreite Fluoreszenzlicht
- 15 wird – nach Trennung mittels Strahlteiler – mittels eines besonderen Detektors detektiert. Die in der Praxis verwendeten Strahlteiler sind im allgemeinen teuer. Darüber hinaus eignen sich diese Strahlteiler für quantitative Vergleichsmessungen hoher Präzision und hoher Meßdynamik nur wenig, zumal diese Strahlteiler u.a. auch temperaturabhängig sind.
- 20 Darüberhinaus weisen dichroitische Strahlteiler Transmissionsverluste von etwa 10% für die Detektion auf.
- Würde man bspw. einen wellenlängenunabhängigen Strahlteiler einsetzen, würde dies die Kosten zweifelsohne herabsetzen. Nachteilig wäre hierbei jedoch, daß man dabei das Streulicht des Anregungslichts vor der Detektion
- 25 herausfiltern muß, bspw. durch Einsatz eines Sperrfilters. Dies ist wiederum in

baulicher Hinsicht aufwendig und verursacht abermals Kosten. Außerdem wird dadurch die Fluoreszenzausbeute verringert. Simultane Mehrfarbanwendungen sind dann jedoch nicht möglich.

Bei Verwendung eines einfachen Strahlteilers gelangt zudem ein
5 Streulichtreflex des Anregungslichts zurück in die Laserlichtquelle und stört die dort stattfindende stimulierte Emission, was sich wiederum durch unerwünschte Intensitätsschwankungen des Laserlichts bemerkbar macht.

Für höchstauflösende Anwendungen nutzt man zur Beleuchtung bzw. zum Scannen die gesamte numerische Apertur. Dies führt zu einem
10 Beleuchtungsfokus, der in lateraler Richtung sehr klein ist, so daß längere Aufnahmezeiten erforderlich sind. Für Anwendungen, bei denen die Auflösung eine untergeordnete Rolle spielt, ist diese Vorgehensweise aufgrund der längeren Aufnahmezeiten nachteilig.

Hinsichtlich der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie wird lediglich beispielhaft
15 verwiesen auf Engelhardt und Knebel in „Physik in unserer Zeit“, 24. Jahrg., 1993, Nr. 2 „Konfokale Laserscanning-Mikroskopie“ und D.K. Hamilton und T. Wilson in Appl. Phys. B 27, 1982, 211-213 „Three-Dimensional Surface Measurement Using the Confocal Scanning Microscope“.

Der vorliegenden Erfindung liegt nun die Aufgabe zugrunde, eine optische
20 Anordnung im Strahlengang eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops derart auszugestalten und weiterzubilden, daß gegenüber der gattungsbildenden Anordnung mit herkömmlichem dichroitischem Strahlteiler eine Erhöhung der Fluoreszenzausbeute bei einfacher Bauweise realisierbar ist.

Die erfindungsgemäße optische Anordnung im Strahlengang eines konfokalen
25 Fluoreszenzmikroskops löst die voranstehende Aufgabe durch die Merkmale des Patentanspruches 1. Danach ist die eingangs genannte optische Anordnung dadurch gekennzeichnet, daß die Einrichtung einen Spiegel umfaßt und daß der Spiegel im Beleuchtungs-/Detektionsstrahlengang derart angeordnet und dimensioniert ist, daß er zur Dunkelfeldbeleuchtung des
30 Objekts den von der Laserlichtquelle kommenden, nicht aufgeweiteten

Anregungsstrahl in das Objektiv reflektiert und das vom Objekt kommende Fluoreszenzlicht mit voller numerischer Apertur – vermindert um den im Detektionsstrahlengang wirksamen Querschnitt des Spiegels – in Richtung des Detektors passieren läßt.

- 5 In erfindungsgemäßer Weise ist zunächst erkannt worden, daß die Einrichtung einen Spiegel umfaßt und daß der Spiegel im Beleuchtungs-/Detektionsstrahlengang derart angeordnet und dimensioniert ist, daß er zur Dunkelfeldbeleuchtung des Objekts den von der Laserlichtquelle kommenden, nicht aufgeweiteten Anregungsstrahl in das Objektiv reflektiert und das vom
- 10 Objekt kommende Fluoreszenzlicht mit voller numerischer Apertur – vermindert um den im Detektionsstrahlengang wirksamen Querschnitt des Spiegels – in Richtung des Detektors passieren läßt.

- Erfindungsgemäß ist weiter erkannt worden, daß es sich bei der Einrichtung zum Trennen des am Objekt reflektierten Anregungslichts von dem vom
- 15 Objekt abgestrahlten Fluoreszenzlicht – anstelle eines herkömmlichen dichroitischen Strahlteilers – um einen Spiegel handeln kann, der im Beleuchtungs-/Detektionsstrahlengang angeordnet ist. Dieser Spiegel ist dabei derart – hinreichend klein – zu dimensionieren, daß er zur Dunkelfeldbeleuchtung des Objekts den von der Laserlichtquelle kommenden, nicht aufgeweiteten Anregungsstrahl in das Objektiv reflektiert und das vom
- 20 Objekt kommende Fluoreszenzlicht mit voller numerischer Apertur in Richtung des Detektors passieren läßt, wobei das Fluoreszenzlicht um den im Detektionsstrahlengang wirksamen Querschnitt des Spiegels vermindert ist. Der vom Objekt reflektierte Hauptreflex des Anregungslichts wird in
- 25 vorteilhafter Weise an dem Spiegel aus dem Detektionsstrahlengang herausreflektiert.

- Aufgrund der hinreichend kleinen Ausgestaltung des Spiegels bzw. der spiegelnden Fläche wird lediglich der nicht aufgeweitete Anregungsstrahl in das Objektiv reflektiert. Durch die Beleuchtung mit einer derart „kleinen“
- 30 numerischen Apertur (bspw. 10% der sonst üblichen Apertur) erzielt man eine

„Dunkelfeldbeleuchtung“, die entlang der optischen Achse einen elongierten Fokusbereich mit einem wohl definierten Fokusbereich lateral aufweist. Erfindungsgemäß wird eine hinreichende Beleuchtungstoleranz in der Objektlage entlang der optischen Achse erreicht, was sich auf spezielle
5 Anwendungen in der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie besonders günstig auswirkt. Des Weiteren ist eine Beleuchtung mit einer hohen intraszenischen Dynamik gewährleistet. Der Vorteil einer solchen hohen intraszenischen Dynamik liegt darin, daß bspw. zwei unmittelbar benachbarte Objekte unterschiedlicher absoluter Fluoreszenzintensität, z.B. Objekt A mit 100% und
10 Objekt B mit 0,05%, in der gleichen Konfokalebene ohne „Überleuchten“ des helleren Objekts getrennt voneinander meßbar sind.

In besonders vorteilhafter Weise ist der Spiegel derart dimensioniert bzw. klein ausgestaltet, daß er für das zu detektierende Fluoreszenzlicht im Detektionsstrahlengang einen Verlust von etwa 1% hervorruft. Dies ermöglicht
15 eine effiziente Detektion mit besonders hohem Dynamikbereich.

Der hier verwendete Spiegel könnte im Rahmen einer besonders einfachen Ausführungsform als unabhängiges Bauteil ausgeführt sein, wobei der Spiegel wiederum von einer Halterung getragen ist. Im Rahmen einer solchen Ausgestaltung entfällt der Einsatz eines herkömmlichen Strahlteilers
20 vollkommen, da hier nämlich im Strahlengang an entsprechender Stelle lediglich der kleine Spiegel angeordnet ist. Im Rahmen einer weiteren Alternative könnte der Spiegel als vorzugsweise integraler verspiegelter Bereich eines – ansonsten herkömmlichen – Strahlteilers ausgeführt sein, wobei der Spiegel bzw. der verspiegelte Bereich zumindest weitgehend in der
25 Mitte des Strahlteilers angeordnet bzw. ausgebildet ist. Dieser kleine – integrale – Spiegel könnte in etwa rund oder elliptisch bzw. oval ausgebildet sein. Letztendlich handelt es sich hier um einen verspiegelten Bereich in der Mitte eines Strahlteilers, der ebenso wie ein isolierter Spiegel den nicht aufgeweiteten Anregungsstrahl in das Objektiv reflektiert. Auch hier findet die
30 Beleuchtung mit einer äußerst kleinen numerischen Apertur zur Begünstigung der Dynamik statt.

Der nicht spiegelnde Bereich des Strahlteilers könnte in Richtung des Detektors in etwa 10% Reflexion und 90% Transmission aufweisen. Dabei könnte es sich im Konkreten um eine Anti-Reflex(AR)-Beschichtung auf der dem Detektor zugewandten Seite des Strahlteilers handeln. Dieser Strahlteiler
5 läßt das Fluoreszenzlicht gemäß dem üblichen – unendlichen – Strahlengang mit der vollen numerischen Apertur – reduziert um das auf den verspiegelten Bereich treffende Fluoreszenzlicht – in Richtung des Detektors passieren.

Durch den verspiegelten Bereich entsteht für das zu detektierende Fluoreszenzlicht ein äußerst geringer Verlust, nämlich in Abhängigkeit von der
10 Größe des Spiegels. Hier lassen sich Verluste von lediglich 1% realisieren, was zu der bereits zuvor erwähnten hohen Dynamik führt.

Des weiteren könnte der nicht spiegelnde Bereich des Strahlteilers derart ausgestaltet und ggf. beschichtet sein, daß die optischen Eigenschaften des nicht spiegelnden Bereichs des Strahlteilers zumindest weitgehend
15 temperaturunabhängig sind. Die Reproduzierbarkeit der Messung ist dadurch begünstigt.

Nun gelangt vom Objekt aus nicht nur Fluoreszenzlicht in den Detektionsstrahlengang, sondern auch Rückreflexe des Anregungslichts. Solche Rückreflexe sind unerwünscht. Zur Unterdrückung der Rückreflexe
20 des Anregungslichts am Objekt zurück in die Laserlichtquelle könnte das Objekt schief angeordnet sein. Dies bedeutet, daß das Objekt selbst nicht orthogonal zur optischen Achse angeordnet ist, so daß sich für das rückreflektierte Anregungslicht ein separater Strahlengang ergibt, der zum Beleuchtungsstrahlengang zumindest geringfügig – räumlich – versetzt ist. In
25 diesem besonderen Strahlengang lassen sich ohne weiteres herkömmliche Lichtfallen anordnen, um nämlich das rückreflektierte Anregungslicht wirksam auszublenden.

Im Falle einer erwünschten Objektverschiebung, bspw. zum Auffinden eines weiteren Objekts, ist es von besonderem Vorteil, wenn das Objekt in seiner
30 Ebene derart bewegbar ist, daß der beleuchtete Objektbereich stets den

gleichen Abstand zu dem Objektiv aufweist. Dadurch gelangt das am Objekt reflektierte und/oder gestreute Licht gemäß den voranstehenden Ausführungen nicht zurück in die Laserlichtquelle, sondern über den besonderen Strahlengang in eine Lichtfalle.

- 5 Alternativ zu der Vorkehrung einer Lichtfalle könnte der Spiegel – im Rahmen einer Ausgestaltung als isoliertes Bauteil – einen absorbierenden Bereich zur Absorption des vom Objekt gestreuten und/oder reflektierten Anregungslichts aufweisen. Die Vorkehrung besonderer Lichtfallen ist dabei nicht mehr erforderlich, wodurch sich eine räumliche Reduktion der Anordnung ergibt. So
- 10 könnte der Spiegel – im Rahmen einer runden oder elliptischen bzw. ovalen Ausgestaltung – einen spiegelnden bzw. reflektierenden Bereich und einen absorbierenden Bereich aufweisen.

Ebenso ist es möglich, daß der Strahlteiler neben dem verspiegelten Bereich einen absorbierenden Bereich zur Absorption des vom Objekt gestreuten

15 und/oder reflektierten Anregungslichts aufweist. Auch im Rahmen einer solchen Ausgestaltung kann die Vorkehrung einer besonderen Lichtfalle entfallen, so daß auch diese Ausgestaltung den Vorteil in sich birgt, die Anordnung mit geringstem Raumbedarf bauen zu können.

Schließlich ist es von ganz besonderem Vorteil, wenn durch ein geeignetes

20 Verhältnis von Strahldivergenz zur Wellenlänge der verwendeten Laserlichtquellen eine zumindest annähernd gleiche – axiale – Fokusslage möglich ist. Dadurch ist zum einen die notwendige Beleuchtungstoleranz in der Objektlage entlang der optischen Achse gegeben und ist zum anderen eine Beleuchtung mit einer hohen intraszenischen Dynamik gewährleistet.

- 25 Hierzu wird zur Vermeidung von Wiederholungen auf die voranstehenden Ausführungen verwiesen.

Es gibt nun verschiedene Möglichkeiten, die Lehre der vorliegenden Erfindung in vorteilhafter Weise auszugestalten und weiterzubilden. Dazu ist einerseits auf die dem Patentanspruch 1 nachgeordneten Ansprüche, andererseits auf

30 die nachfolgende Erläuterung von Ausführungsbeispielen der Erfindung

anhand der Zeichnung zu verweisen. In Verbindung mit der Erläuterung der bevorzugten Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Zeichnung werden auch im allgemeinen bevorzugte Ausgestaltungen und Weiterbildungen der Lehre erläutert. In der Zeichnung zeigt

5 Fig. 1 in einer schematischen Darstellung den grundsätzlichen Aufbau einer erfindungsgemäßen optischen Anordnung im Strahlengang eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops,

Fig. 2 in einer schematischen Darstellung einen Strahlteiler mit mittigem Spiegel,

10 Fig. 3 in einer schematischen Darstellung einen anstelle des Strahlteilers verwendbaren Spiegel als separates Bauteil und

Fig. 4 in einer schematischen Darstellung einen Spiegel mit integralem reflektierenden und absorbierenden Bereich.

Fig. 1 zeigt in einer schematischen Darstellung ein Ausführungsbeispiel einer
15 optischen Anordnung im Strahlengang eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops, wobei diese Anordnung – bei dem hier gewählten Ausführungsbeispiel – zwei Laserlichtquellen 1, 2, eine im Beleuchtungs-/Detektionsstrahlengang 3, 4, 5 angeordnete Einrichtung 6 zur Trennung des am Objekt 7 reflektierten Anregungslichts 8 von dem vom Objekt 7
20 abgestrahlten Fluoreszenzlicht 9, ein zwischen der Einrichtung 6 und dem Objekt 7 angeordnetes Objektiv 10 und einen der Einrichtung 6 im Detektionsstrahlengang 5 nachgeordneten Detektor 11 umfaßt.

Fig. 1 läßt schematisch erkennen, daß das Anregungslicht 8 über einen Strahlvereiniger 12 zu der Einrichtung 6 gelangt, von dieser in das Objektiv 10
25 reflektiert wird und von dort aus zum Objekt 7 gelangt. Das Fluoreszenzlicht 9 gelangt wiederum durch das Objektiv 10 hindurch zu der Einrichtung 6, passiert diese mit Ausnahme des in erfindungsgemäßer Weise als Spiegel 13 ausgebildeten reflektierenden Bereichs und gelangt über eine Tubuslinse 14, ein Sperrfilterrad 15 und eine Detektionslochblende 16 zu dem Detektor 11.

Erfindungsgemäß umfaßt die Einrichtung 6 einen Spiegel 13, wobei der Spiegel 13 im Beleuchtungs-/Detektionsstrahlengang 3, 4, 5 derart angeordnet und dimensioniert ist, daß er zur Dunkelfeldbeleuchtung des Objekts 7 den von den Laserlichtquellen 1, 2 kommenden, nicht
5 aufgeweiteten Anregungsstrahl bzw. das Anregungslicht 8 in das Objektiv 10 reflektiert und das vom Objekt 7 kommende Fluoreszenzlicht 9 mit voller numerischer Apertur – vermindert um den im Detektionsstrahlengang 4, 5 wirksamen Querschnitt des Spiegels 13 in Richtung des Detektors 11 passieren läßt.

10 Bei dem in den Fig. 1 und 2 gezeigten Ausführungsbeispiel ist die Einrichtung 6 als Strahlteiler ausgeführt, wobei dort mittig der Spiegel 13 integriert ist.

Fig. 3 zeigt eine alternative Ausgestaltung der Einrichtung 6 dahingehend, daß diese schlicht und einfach als singulärer Spiegel 13 ausgeführt ist, wobei es sich bei dem Spiegel 13 um ein eigenständiges Bauteil handelt. Der
15 Spiegel 13 könnte eine insgesamt verspiegelte Fläche gemäß der Darstellung in Fig. 3 aufweisen.

Bei dem in Fig. 4 dargestellten Ausführungsbeispiel ist der Spiegel 13 ebenfalls als separates Bauteil ausgeführt, wobei die Fläche des Spiegels 13 in eine reflektierende Spiegelfläche 17 und in eine absorbierende Fläche 18
20 unterteilt ist. Durch diese Maßnahme erübrigt sich die Vorkehrung einer separaten Lichtfalle für etwa rückreflektiertes Anregungslicht 19.

Sofern als Einrichtung 6 ein Strahlteiler beispielsweise gemäß der Darstellung in den Fig. 1 und 2, aber auch eine Ausführungsform nach den Fig. 3 und 4 verwendet wird, lassen sich die Rückreflexe bzw. läßt sich das rückreflektierte
25 Anregungslicht 19 dadurch „unschädlich“ machen, daß die Probe bzw. das Objekt 7 schief gestellt, d.h. nicht orthogonal zur optischen Achse 23 angeordnet ist. Dadurch wird das rückreflektierte Anregungslicht 19 geringfügig zum Beleuchtungsstrahlengang 20 bzw. zum Strahlengang des Anregungslichts 8 versetzt, so daß das rückreflektierte Anregungslicht 19
30 entlang eines eigenen Strahlengangs 21 rückreflektiert wird. Dort ist an

geeigneter Stelle eine Lichtfalle 22 angeordnet, die aufgrund der Ausrichtung des Strahlengangs 21 abseits des Beleuchtungsstrahlengangs 20 bzw. des Anregungslichts 8 liegt.

Hinsichtlich weiterer vorteilhafter Ausgestaltungen der vorliegenden Erfindung
5 wird zur Vermeidung von Wiederholungen auf die Ausführungen im
allgemeinen Teil der Beschreibung verwiesen.

Bezugszeichenliste

	1	Laserlichtquelle
	2	Laserlichtquelle
	3	Beleuchtungsstrahlengang
5	4	Beleuchtungs-/Detektionsstrahlengang
	5	Detektionsstrahlengang
	6	Einrichtung zur Trennung des am Objekt reflektierten Anregungslichts von dem vom Objekt abgestrahlten Fluoreszenzlicht
10	7	Objekt
	8	Anregungslicht
	9	Fluoreszenzlicht
	10	Objektiv
	11	Detektor
15	12	Strahlvereiniger
	13	Spiegel
	14	Tubuslinse
	15	Sperrfilterrad
	16	Detektionslochblende
20	17	Spiegelfläche
	18	absorbierende Fläche
	19	rückreflektiertes Anregungslicht
	20	Beleuchtungsstrahlengang
	21	Strahlengang des rückreflektierten Anregungslichts
25		

- 22 Lichtfalle
- 23 optische Achse

Patentansprüche

1. Optische Anordnung im Strahlengang eines konfokalen
Fluoreszenzmikroskops, mit mindestens einer Laserlichtquelle (1, 2),
einer im Beleuchtungs-/Detektionsstrahlengang (3, 4, 5) angeordneten
5 Einrichtung (6) zur Trennung des am Objekt (7) reflektierten
Anregungslichts (8) von dem vom Objekt (7) abgestrahlten
Fluoreszenzlicht (9), einem zwischen der Einrichtung (6) und dem
Objekt (7) angeordneten Objektiv (10) und einem der Einrichtung (6)
im Detektionsstrahlengang (5) nachgeordneten Detektor (11),
10 **dadurch gekennzeichnet**, daß die Einrichtung (6) einen Spiegel (13)
umfaßt und daß der Spiegel (13) im Beleuchtungs-
/Detektionsstrahlengang (3, 4, 5) derart angeordnet und dimensioniert
ist, daß er zur Dunkelfeldbeleuchtung des Objekts (7) den von der
Laserlichtquelle (1, 2) kommenden, nicht aufgeweiteten
15 Anregungsstrahl in das Objektiv (10) reflektiert und das vom Objekt (7)
kommende Fluoreszenzlicht (9) mit voller numerischer Apertur –
vermindert um den im Detektionsstrahlengang (5) wirksamen
Querschnitt des Spiegels (13) – in Richtung des Detektors (11)
passieren läßt.
- 20 2. Anordnung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der
Spiegel (13) derart dimensioniert ist, daß er für das zu detektierende
Fluoreszenzlicht (9) im Detektionsstrahlengang (5) einen Verlust von
etwa einem Prozent hervorruft.
- 25 3. Anordnung nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß
der Spiegel (13) als unabhängiges Bauteil ausgeführt ist.

4. Anordnung nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Spiegel (13) von einer Halterung getragen ist.
5. Anordnung nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Spiegel (13) als vorzugsweise integraler verspiegelter Bereich eines Strahlteilers ausgeführt ist.
6. Anordnung nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Spiegel (13) zumindest weitgehend in der Mitte des Strahlteilers angeordnet bzw. ausgebildet ist.
7. Anordnung nach Anspruch 5 oder 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Spiegel (13) in etwa rund ausgebildet ist.
8. Anordnung nach Anspruch 5 oder 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Spiegel (13) in etwa elliptisch ausgebildet ist.
9. Anordnung nach einem der Ansprüche 5 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß der nicht spiegelnde Bereich des Strahlteilers (6) in Richtung des Detektors (11) in etwa 10% Reflexion und 90% Transmission aufweist.
10. Anordnung nach einem der Ansprüche 5 bis 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß die optischen Eigenschaften des nicht spiegelnden Bereichs des Strahlteilers zumindest weitgehend temperaturunabhängig sind.
11. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß zur Unterdrückung des Rückreflexes des Anregungslichts (8) am Objekt (7) zurück in die Laserlichtquelle (1, 2) das Objekt (7) schief, d. h. nicht orthogonal zur optischen Achse (23), angeordnet ist.
12. Anordnung nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß für das rückreflektierte Anregungslicht (19) in dessen zum Beleuchtungsstrahlengang (20) zumindest geringfügig versetzten Strahlengang (21) eine Lichtfalle (22) vorgesehen ist.

13. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Objekt (7) in seiner Ebene derart bewegbar ist, daß der beleuchtete Objektbereich stets den gleichen Abstand zu dem Objektiv (10) aufweist.
- 5 14. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Spiegel (13) einen absorbierenden Bereich (18) zur Absorption des vom Objekt (7) gestreuten Anregungslichts (8) aufweist.
- 10 15. Anordnung nach einem der Ansprüche 5 bis 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Strahlteiler neben dem verspiegelten Bereich einen absorbierenden Bereich (18) zur Absorption des vom Objekt (7) gestreuten Anregungslichts (8) aufweist.
- 15 16. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 15, **dadurch gekennzeichnet**, daß durch ein geeignetes Verhältnis von Strahldivergenz zur Wellenlänge der verwendeten Laserlichtquellen (1, 2) eine zumindest annähernd gleiche Fokusslage realisierbar ist.

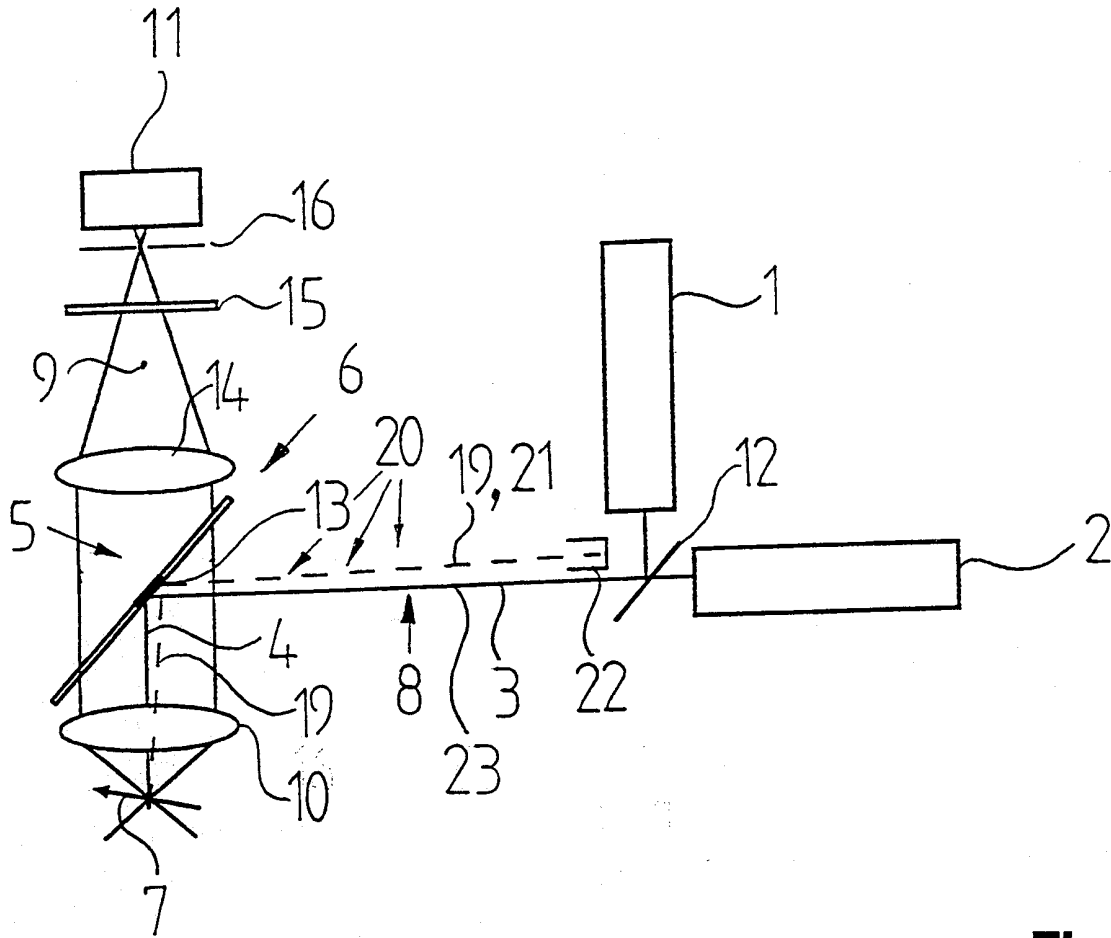


Fig. 1

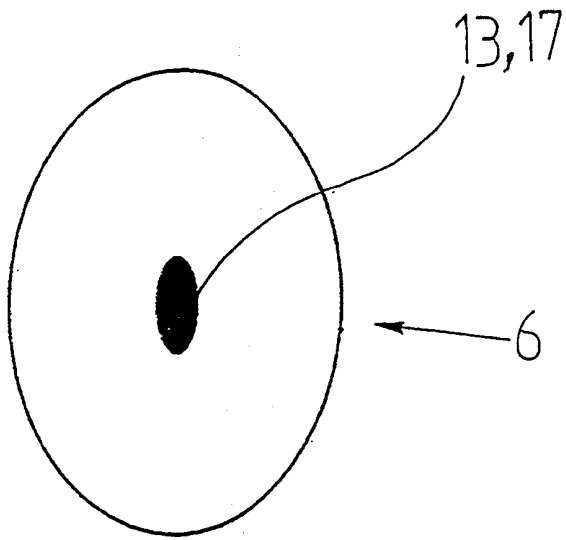


Fig. 2

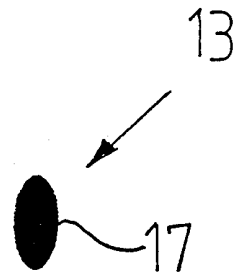


Fig. 3

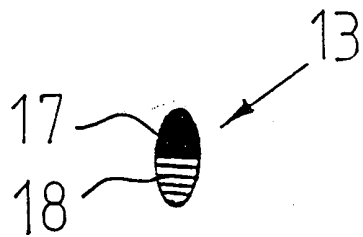


Fig. 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 99/02910

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G02B21/00 G01N21/64

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)
IPC 7 G02B G01N

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 practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1998, no. 09, 31 July 1998 (1998-07-31) -& JP 10 096862 A (BUNSHI BIO PHOTONICS KENKYUSHO:KK), 14 April 1998 (1998-04-14) abstract -& DATABASE WPI Week 199825 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 1998-281319 XP002131265 abstract	1,3,4
A	US 5 210 765 A (CHENERY SIMON ET AL) 11 May 1993 (1993-05-11) column 2, line 57 - line 68; figure 1 -/--	1,3,4

Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in 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 document 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 22 February 2000	Date of mailing of the international search report 02/03/2000
--	---

Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Scheu, M
--	---------------------------------------

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 99/02910

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 016, no. 085 (P-1319), 28 February 1992 (1992-02-28) -& JP 03 269405 A (FUJITSU LTD), 2 December 1991 (1991-12-02) abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-5, 9
A	<p>EP 0 801 301 A (KYOTO DAIICHI KAGAKU KK) 15 October 1997 (1997-10-15) figure 5A.5B</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1, 3, 4, 12, 14
A	<p>US 4 744 663 A (HAMASHIMA MUNEKI ET AL) 17 May 1988 (1988-05-17) figure 1</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 99/02910

Patent document cited in search report	A	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 10096862	A	14-04-1998	NONE	
US 5210765	A	11-05-1993	GB 2254444 A	07-10-1992
JP 03269405	A	02-12-1991	NONE	
EP 0801301	A	15-10-1997	JP 9281045 A US 5804451 A	31-10-1997 08-09-1998
US 4744663	A	17-05-1988	JP 62002102 A JP 61141449 A	08-01-1987 28-06-1986

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/02910

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 G02B21/00 G01N21/64

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G02B G01N

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)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1998, no. 09, 31. Juli 1998 (1998-07-31) -& JP 10 096862 A (BUNSHI BIO PHOTONICS KENKYUSHO:KK), 14. April 1998 (1998-04-14) Zusammenfassung -& DATABASE WPI Week 199825 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 1998-281319 XP002131265 Zusammenfassung	1,3,4
A	US 5 210 765 A (CHENERY SIMON ET AL) 11. Mai 1993 (1993-05-11) Spalte 2, Zeile 57 - Zeile 68; Abbildung 1 -/--	1,3,4

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" älteres Dokument, 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 anderen 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

22. Februar 2000

Absenddatum des Internationalen Recherchenberichts

02/03/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Scheu, M

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 016, no. 085 (P-1319), 28. Februar 1992 (1992-02-28) -& JP 03 269405 A (FUJITSU LTD), 2. Dezember 1991 (1991-12-02) Zusammenfassung ---	1-5,9
A	EP 0 801 301 A (KYOTO DAIICHI KAGAKU KK) 15. Oktober 1997 (1997-10-15) Abbildung 5A.5B ---	1,3,4, 12,14
A	US 4 744 663 A (HAMASHIMA MUNEKI ET AL) 17. Mai 1988 (1988-05-17) Abbildung 1 -----	1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/02910

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
JP 10096862 A	14-04-1998	KEINE	
US 5210765 A	11-05-1993	GB 2254444 A	07-10-1992
JP 03269405 A	02-12-1991	KEINE	
EP 0801301 A	15-10-1997	JP 9281045 A	31-10-1997
		US 5804451 A	08-09-1998
US 4744663 A	17-05-1988	JP 62002102 A	08-01-1987
		JP 61141449 A	28-06-1986