

(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
27. Dezember 2012 (27.12.2012)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2012/175424 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
G02B 21/00 (2006.01) **H01J 43/30** (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2012/061463

(22) Internationales Anmeldedatum:
15. Juni 2012 (15.06.2012)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2011 104 379.2 18. Juni 2011 (18.06.2011) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): **CARL ZEISS MICROSCOPY GMBH**
[DE/DE]; Carl-Zeiss-Promenade 10, 07745 Jena (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **LIEDTKE, Mirko**
[DE/DE]; Fritz-Reuter-Str. 19, 07745 Jena (DE).
SIMBÜRGER, Eva [DE/DE]; Schmerberger Weg 91B,
14548 Schwielowsee OT Caputh (DE). **SCHWEDT,**

Daniel [DE/DE]; Johann-Friedrich-Str. 38, 07745 Jena
(DE).

(74) Anwalt: **LORITZ, Rainer**; Carl Zeiss AG,
Patentabteilung, Carl-Zeiss-Promenade 10, 07745 Jena
(DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KY,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,
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,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: CONFOCAL SCANNING MICROSCOPE, OPERATING METHOD FOR SAME AND METHOD FOR
MANIPULATING A SAMPLE

(54) Bezeichnung : KONFOKALES RASTERMIKROSKOP UND BETRIEBSVERFAHREN FÜR EIN SOLCHES SOWIE
VERFAHREN ZUM MANIPULIEREN EINER PROBE

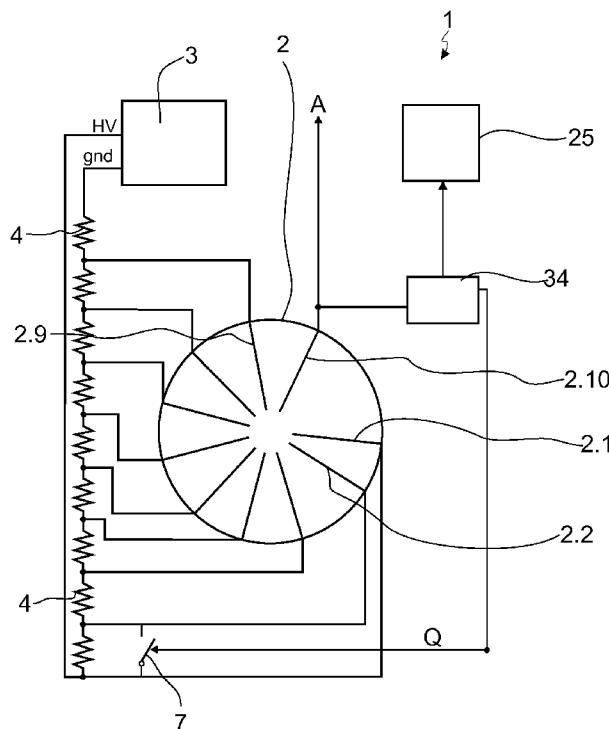


Fig. 2

(57) Abstract: Known overload protection devices shut off the high operating voltage of a photomultiplier (PMT) if the PMT is drastically overamplified. The response time of the high voltage is preferably in the range of milliseconds. During bleaching with a laser scanning microscope, the result is a late deactivation of the PMT, whereby said PMT can be damaged, and an even more strongly delayed reactivation of the PMT, whereby subsequent sample regions cannot be recorded. The aim of the invention is to better protect a PMT from overload during bleaching and to allow a fast reactivation after bleaching has been concluded. Said aim is achieved by providing a switch (7), which in the activated switching state reduces the voltage between the photocathode (2.1) and the first dynode (2.2) compared to the deactivated switching state, and a control unit (34), which is designed to move a target spot, which can be irradiated by means of the light source, over a scanning field by means of a deflection unit, wherein the control unit (34) activates the switch (7) when the target spot enters a predetermined region of the scanning field and deactivates the switch (7) when the spot exits the region.

(57) Zusammenfassung:

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

— *Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv)*

Veröffentlicht:

— *mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)*

Bei starker Übersteuerung eines Photovervielfachers (PMT) schalten bekannte Überlastschütze die Betriebshochspannung des PMT ab. Die Reaktionszeit der Hochspannung liegt dabei im Bereich von Millisekunden. Dadurch kommt es beim Bleichen mit einem Laser-Scanning-Mikroskop zu einer späten Abschaltung des PMT, wodurch dieser beschädigt werden kann, und einer noch stärker verzögerten Wiedereinschaltung des PMT, wodurch nachfolgende Probenbereiche nicht aufgenommen werden können. Die Erfindung soll einen PMT beim Bleichen besser vor Überlastung schützen und eine schnelle Wiedereinschaltung nach dem Ende des Bleichens ermöglichen. Zu diesem Zweck sind ein Schalter (7), der im aktivierten Schaltzustand im Vergleich zum deaktivierten Schaltzustand die Spannung zwischen der Photokathode (2.1) und der ersten Dynode (2.2) reduziert, und eine Steuereinheit (34), die eingerichtet ist zum Bewegen eines mittels der Lichtquelle bestrahlbaren Zielflecks über ein Abtastfeld mittels einer Ablenkeinheit, wobei die Steuereinheit (34) beim Eintritt des Zielflecks in eine vorgegebene Region des Abtastfeldes den Schalter (7) aktiviert und beim Verlassen der Region den Schalter (7) deaktiviert, vorgesehen.

Konfokales Rastermikroskop und Betriebsverfahren für ein solches sowie Verfahren zum Manipulieren einer Probe

Die Erfindung betrifft ein konfokales Rastermikroskop, das eine Lichtquelle, eine einstellbare Strahl-Ablenkeinheit und einen Photovervielfacher (engl. „photo-multiplier tube“; PMT), der eine Photokathode, mehrere Dynoden und eine Anode aufweist, eine elektrische Schaltung zur Beaufschlagung der Dynoden mit einer jeweiligen (inneren) Spannung gegenüber der Photokathode und eine Steuereinheit zur Einstellung der Ablenkeinheit umfasst, sowie ein Steuerverfahren für solche Rastermikroskope. Die erste Dynode ist diejenige, die der Photokathode am nächsten ist. Sie weist die geringste elektrische Potentialdifferenz zur Photokathode auf. Im Sinne der Erfindung werden die Spannungen zwischen den Dynoden und zwischen der ersten Dynode und der Photokathode auch als innere Spannungen und die Betriebshochspannung des PMT auch als äußere Spannung bezeichnet.

In derartigen optischen Rastermikroskopen wird eine Probe mit einem Lichtstrahl abgetastet (engl. „scanned“), wobei der Zielfleck des Lichtstrahls ein vorgegebenes Abtastfeld abrastert, um pixelweise ein Bild aufzunehmen. Jedem Pixel wird die während der sogenannten Pixelverweilzeit von einem PMT durch Lichtaufnahme akkumulierten elektrischen Ladung entsprechende Lichtintensität zugeordnet. Aufgrund der typischen Laser-Lichtquelle werden derartige Mikroskope auch als Laser-Scanning-Mikroskope (LSM) bezeichnet.

Durch die Beaufschlagung der Dynoden eines PMT mit jeweiligen elektrischen Spannungen kommt es bei Lichteinfall in den Photovervielfacher zu einer Lawine von Sekundärelektronen, die mit hoher Genauigkeit gemessen werden können. Dadurch sind Photovervielfacher empfindliche optoelektronische Wandler. Typischerweise sind die Dynoden an eine Spannungsteilerkette angeschlossen, über der eine Hochspannung angelegt wird, so dass die Dynoden eine Potentialkaskade darstellen. Je nach zu erwartender Photonenstromdichte kann eine dem Photovervielfacher nachgeschaltete elektronische Verstärkung reguliert werden, um ein optimal auszuwertendes Signal zu erhalten. Es ist auch möglich, die Verstärkung eines PMT durch Veränderung der Hochspannung zu beeinflussen, diese Art der Einstellung ist jedoch träge.

Bei starkem Lichteinfall auf die Photokathode kommt es innerhalb der evakuierten Vervielfacherröhre zu hohen Elektronenstrahldichten. Dadurch steigt die Wahrscheinlichkeit für eine Stoßionisierung von Restgasmolekülen im Vakuum, die ihrerseits die Photokathode beschädigen können, was als Restgasionisierung (engl. „ion feedback“) bezeichnet wird. Auch die Anode kann bei großen Photoelektronenstromdichten beschädigt werden.

Zu sehr hohen Lichtintensitäten kommt es in konfokalen Mikroskopen insbesondere bei der Durchführung von Verfahren zur Messung dynamischer Probenprozesse auf Molekülebene, bei denen Fluorophore in einer oder mehreren ausgesuchten Regionen der Probe gezielt gebleicht werden. Solche Verfahren sind beispielsweise „Fluorescence Recovery After Photo-bleaching“ (FRAP), „Fluorescence Loss In Photo-bleaching“ (FLIP) und „Fluorescence Localization After Photo-bleaching“ (FLAP). Bei derartigen Verfahren besteht eine große Gefahr, dass ein konfokal detektierender PMT beschädigt wird. Dasselbe gilt für Verfahren, bei denen durch hohe Lichtintensitäten andere Stoffe in einer Probenregion manipuliert werden, beispielsweise das Öffnen von Käfigmolekülen durch hochintensives Licht, die daraufhin chemische Reagenzien oder Fluorophore freigeben (engl. „uncage“).

Steuerschaltkreise für Photovervielfacher sind daher üblicherweise mit Schutzabschaltungen für die Hochspannung ausgerüstet, die auf eine zu große Stromdichte reagieren. Eine solche Schutzabschaltung kann beispielsweise gemäß JP 2004 069752 A2 mittels eines Komparators in Abhängigkeit des Anodensignals erfolgen. Die Reaktionszeit der Hochspannung liegt dabei im Bereich von Millisekunden, da die Hochspannung nach Abschaltung der Spannungsquelle nur langsam zusammenbricht und sich beim Einschalten entsprechend langsam wieder aufbaut. Das ist im Vergleich zur Pixelverweilzeit von typischerweise einigen Mikrosekunden sehr träge. Dadurch kommt es beim Abtasten einer sehr hellen Stelle zu einer späten Abschaltung des PMT, wodurch die Gefahr einer Schädigung fortbesteht. Schließlich kommt es aufgrund der Trägheit zu einer noch stärker verzögerten Wiedereinschaltung des PMT, wodurch nachfolgende Probenbereiche überhaupt nicht aufgenommen werden können.

Fig. 1 soll diese Folgen an einem Beispiel verdeutlichen. Zum besseren Verständnis sind die räumlich-zeitlichen Verhältnisse vereinfacht dargestellt. Eine Probe wird entlang eines Abtastfelds X mit einem Lichtstrahl abgetastet (Bewegungsrichtungen durch Pfeile angedeutet). Währenddessen werden konfokal die lokalen Fluoreszenzintensitäten im momentanen Zielfleck mittels eines PMT (nicht abgebildet) mit eingeschalteter Hochspannung in Pixel P aufgenommen (durch durchgezogenen schwarzen Linienabschnitt angedeutet). In Teilfigur 1A erfolgt die Beleuchtung während Abtastung bidirektional, der Lichtstrahl und die Detektion sind über das gesamte Abtastfeld X hinweg eingeschaltet. In Teilfigur 1B erfolgen die Beleuchtung und Detektion unidirektional, der Lichtstrahl wird am Anfang der Zeile ein- und beim Zeilenrücklauf ausgeschaltet; Pixel werden nur in jeder Zeile nur in einer Richtung aufgenommen.

Beim Eintritt des Zielflecks des Lichtstrahls in eine zu bleichende Region R (Zeitpunkt A) wird in beiden Varianten die in die Probe eingestrahlte Lichtleistung stark erhöht, um dort vorhandene Fluorophore gezielt zu zerstören. Dadurch wird jedoch die vom PMT aufgenommene Lichtintensität so hoch, dass der PMT überlastet wird (durchgezogener weißer Linienabschnitt). Die Schutzabschaltung seiner Betriebshochspannung aufgrund seines starken Anodensignals dauert jedoch einige Zeit (durch die vereinfachte Darstellung hier nur etwa drei Pixel P), in der die Überlastung anhält, wodurch der PMT Empfindlichkeit einbüßt und seine Lebensdauer verkürzt wird. Erst im Zeitpunkt B ist die Hochspannung zusammengebrochen. Der Abtastvorgang wird dann mit abgeschalteter Hochspannung (unterbrochener Abschnitt der Linie) fortgesetzt. Wenn der Zielfleck die zu bleichende Region R verlässt, wird die Lichtleistung wieder auf den ursprünglichen Wert herabgesetzt. Die Schutzschaltung detektiert daraufhin die abfallende Lichtintensität anhand des schwachen Anodensignals, woraufhin die Hochspannung wieder eingeschaltet wird. Aufgrund der Schaltträgheit dauert es einige Zeit (durch die Vereinfachung hier nur etwa fünf Pixel P), bis im Zeitpunkt C die Hochspannung aufgebaut ist (durchgezogener schwarzer Linienabschnitt) und der PMT wieder korrekte Daten liefert. Dadurch werden die in Abtastrichtung hinter der Region R liegenden Pixel bis zum Zeitpunkt C nicht korrekt abgebildet.

Es ist zwar möglich, die Schutzabschaltung der Hochspannung stillzulegen, um auch solche Probenbereiche mit auf hohe Intensität folgender niedriger Intensität aufnehmen zu können. Unter der hohen Belastung leidet jedoch der PMT umso mehr. Am Ende des Abtastfeldes X wird der Lichtstrahl und damit der resultierende Zielfleck wieder zum Anfang des Abtastfeldes X geleitet (strichpunktierte Linie). Während des Rücklaufs zum Anfang des Abtastfeldes X ist der Lichtstrahl ausgeschaltet und der Zielfleck daher unbeleuchtet.

Als Alternative zur Abschaltung der Hochspannung ist es bekannt, einen mechanischen Verschluss (engl. „shutter“) vor einem PMT einzusetzen. Dabei kann die Hochspannung zwar angelegt bleiben. Mechanische Verschlüsse weisen jedoch eine noch längere Schaltzeit auf als eine rein elektrische Schutzabschaltung, so dass die Gefahr für eine Schädigung des PMT größer ist.

Beim Beobachten dynamischer Prozesse ist die Zeit, die zwischen dem Bleich-, Freisetzungs- oder Aktivierungsvorgang und der Bildaufnahme verstreicht, kritisch für den Erfolg des Experiments. Aufgrund der oben beschriebenen Trägheit der Schutzabschaltung wurden andere Wege versucht, bei denen auf eine Schutzabschaltung verzichtet werden kann. Beispielsweise ist es bekannt, zur Bildaufnahme eine zweite Abtasteinheit zu verwenden, so dass ein Rastervorgang zur Belichtung und ein unabhängiger Rastervorgang zur Bildaufnahme möglich ist. Der lichtaufnehmende Rastervorgang wird mittels der zweiten Abtasteinheit erst durchgeführt, wenn der bleichende/freisetzende/photoaktivierende Rastervorgang mittels der ersten Abtasteinheit beendet ist. Die dafür benötigte spezielle Mikroskopanordnung ist jedoch aufwendig. Eine andere Vorgehensweise besteht darin, bei unidirektionaler Bildaufnahme das Bleichen während des Zeilenrücklaufs des Lichtstrahls durchzuführen. Die oben beschriebenen Nachteile für die Lebensdauer des Detektors können hier ebenfalls auftreten, wenn die verstärkt zu belichtende Region nah am Ende der zurücklaufenden Zeile endet. Im übrigen kann die Zeit zwischen Belichtung und Bildaufnahme stets dadurch reduziert werden, dass das Abtastfeld auf die zu beobachtende Region R verkleinert (engl. „cropped“) wird, so dass weniger Pixel belichtet und aufgenommen werden, und/oder indem die Auflösung verringert wird, insbesondere in Verbindung mit einer Veränderung des Abbildungsmaßstabs (engl. „zooming“).

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Rastermikroskop der eingangs genannten Art zu verbessern und ein entsprechendes Steuerverfahren anzugeben, die einen besseren Schutz des PMT vor Überlastung ermöglichen.

Die Aufgabe wird gelöst durch eine konfokales Rastermikroskop, welches die in Anspruch 1 angegebenen Merkmale aufweist, durch ein Steuerverfahren, welches die in Anspruch 12 angegebenen Merkmale aufweist, und durch ein Manipulationsverfahren, welches die in Anspruch 15 angegebenen Merkmale aufweist.

Vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung sind in den Unteransprüchen angegeben.

Erfindungsgemäß weist ein konfokales Rastermikroskop einen Schalter auf, der zwischen einem aktivierten Schaltzustand und einem deaktivierten Schaltzustand umschaltbar ist, wobei er in dem aktivierten Schaltzustand im Vergleich zu dem deaktivierten Schaltzustand die (innere) Spannung zwischen der Photokathode und der ersten Dynode reduziert, und eine Steuereinheit, die eingerichtet ist zum Bewegen (mindestens) eines mittels der Lichtquelle bestrahlbaren Zielflecks über ein Abtastfeld mittels der Ablenkeinheit, wobei die Steuereinheit beim Eintritt des Zielflecks in eine vorgegebene Region des Abtastfeldes den Schalter aktiviert und beim Verlassen der Region den Schalter deaktiviert. Beispielsweise kann der aktivierte Schaltzustand einer geschlossenen Schalterstellung entsprechen und der deaktivierte Schaltzustand einer offenen Schalterstellung oder umgekehrt.

Entscheidend für die Gesamtverstärkung eines PMT ist die Funktion der ersten Beschleunigungsstufe der Dynodenkaskade. Durch Reduzieren der Spannung zwischen der ersten Dynode und der Photokathode mittels des Schalters kann die erste Beschleunigungsstufe mit extrem kurzen Reaktionszeiten von unter einer Mikrosekunde abgeschwächt, ausgeschaltet oder zur Elektronenbremsung umgepolt werden. Das ermöglicht die pixelgenaue Beeinflussung der Sekundärelektronenvervielfachung und damit der Empfindlichkeit des PMT. Werden in der ersten Beschleunigungsstufe wenige oder keine Elektronen beschleunigt, kommen entsprechend wenige oder keine in die nächsten Stufen, so dass das

Anodensignal wesentlich schwächer wird als bei normaler Spannung auf der ersten Beschleunigungsstufe. Dadurch ist der PMT insbesondere vor Restgasionisierung geschützt. Durch die ortsabhängige Aktivierung des Schalters wird die Reaktionszeit, die auf der im Stand der Technik bekannten Auswertung des Anodensignals beruht, vollständig vermieden.

Der Schalter für die Spannung zwischen der ersten Dynode und der Photokathode kann zusätzlich zur Ortsabhängigkeit auch in Abhängigkeit des Anodensignals gesteuert werden, um den PMT auch außerhalb vorgegebener Regionen vor Überlastung zu schützen und den Aufnahmecontrast zu verbessern. Das gelingt beispielsweise mittels Komparatoren, die das Anodensignal mit mindestens einem Schwellwert vergleichen und in Abhängigkeit des Vergleichsergebnisses den Schalter aktivieren oder deaktivieren.

Besonders vorteilhaft sind Ausführungsformen, bei denen der Schalter so ausgebildet ist, dass er durch das Umschalten in den aktivierten Schaltzustand a) die Photokathode mit der ersten Dynode elektrisch kurzschließt oder b) die Spannung zwischen der Photokathode und der ersten Dynode umpolt, insbesondere in Kombination mit einer Verringerung ihres Betrages. Diese Schaltwirkungen können mit geringem Schaltungsaufwand erreicht werden und ermöglichen eine besonders kurze Schaltzeit. Die Umpolung der Spannung zwischen erster Dynode und Photokathode, beispielsweise von +150 V der ersten Dynode gegenüber der Photokathode zu -150 V, wirkt als Elektronenbremse. Dadurch gelangen näherungsweise keine Elektronen mehr zur Anode, das Anodensignal verschwindet. Auch dies stellt eine wirksame Abschaltung der ersten Beschleunigungsstufe dar. Im Sinne der Erfindung muss der Betrag der Spannung zwischen erster Dynode und Photokathode beim „Umpolen“ nicht konstant bleiben, sondern kann verändert werden, beispielsweise gegenüber der Beschleunigungspolung verringert oder vergrößert werden. Das Umpolen ist jedoch aufwendiger als das Kurzschließen.

Vorzugsweise ist die elektrische Schaltung dazu ausgebildet, den Photovervielfacher unabhängig von dem Schaltzustand des Schalters mit einer äußeren Betriebsspannung zu beaufschlagen – mit anderen Worten, die Betriebshochspannung am PMT bleibt auch beim Aktivieren des Schalters

aufrechterhalten. Dadurch steht auch bei reduzierter, ausgeschalteter oder bremsender erster Beschleunigungsstufe ein der einfallenden Lichtintensität proportionales Anodensignal zur Verfügung. Anhanddessen kann ortsunabhängig ein Ende eines sehr hellen Probenbereichs mit kurzer Reaktionszeit identifiziert werden. So kann die Bildaufnahme gleich nach Ende eines sehr hellen Probenbereichs wieder mit voller Empfindlichkeit fortgesetzt werden.

Zum Bleichen ist eine Ausführungsform zweckmäßig, in welcher die Lichtquelle hinsichtlich ihrer Lichtleistung (wahlweise zur Bildaufnahme oder zum Bleichen) einstellbar ist und die Steuereinheit die Lichtquelle beim Eintritt des Zielflecks in die vorgegebene Region auf eine höhere Lichtleistung (zum Bleichen) einstellt und beim Verlassen der Region auf eine niedrigere Lichtleistung (zur Bildaufnahme) einstellt. So können Überlastungsphasen beim Bleichen vollständig vermieden und damit die Genauigkeit des Überlastungsschutzes deutlich verbessert werden.

Besonders vorteilhaft sind Ausführungsformen mit mehreren Photovervielfachern, die jeweils einen erfindungsgemäßen Schalter aufweisen, der zwischen einem aktivierten Schaltzustand und einem deaktivierten Schaltzustand umschaltbar ist, wobei er in dem aktivierten Schaltzustand die (innere) Spannung zwischen der Photokathode und der ersten Dynode des betreffenden Photovervielfachers reduziert, insbesondere, indem er a) die Photokathode mit der ersten Dynode elektrisch kurzschließt oder b) die Spannung zwischen der Photokathode und der ersten Dynode umpolt, insbesondere in Kombination mit einer Verringerung ihres Betrages. Durch die erfindungsgemäß verbesserte Lebenserwartung der Photovervielfacher wird der Wartungsaufwand für das Mikroskop deutlich reduziert.

In einer ersten Ausgestaltung von Ausführungsformen mit mehreren Photovervielfachern umfasst das Rastermikroskop dabei vorzugsweise Optiken zur simultanen Abbildung mehrerer Zielflecken auf mindestens einen jeweiligen Photovervielfacher, wobei die Steuereinheit für jeden Zielfleck unabhängig von den anderen Zielflecken beim Eintritt in die vorgegebene Region die Schalter dieser Photovervielfacher aktiviert und beim Verlassen deaktiviert. Dies ermöglicht ein schnelles Abrastern des Abtastfeldes und entsprechend schnelles Bleichen und/oder eine schnelle Bildaufnahme. Zur Beleuchtung, Abtastung und Detektion mit

mehreren Zielflecken wird auf DE 103 44 060 A1, EP 2187252 A1 und US 6,028,306 verwiesen, deren Offenbarungsgehalt hier soweit als möglich einbezogen wird. Eine solche Ausführungsform umfasst zweckmäßigerweise auch Optiken zur simultanen Beleuchtung der mehreren Zielflecken.

In einer zweiten Ausgestaltung von Ausführungsformen mit mehreren Photovervielfachern umfasst das Rastermikroskop (mindestens) ein optisches Element, das den Zielfleck räumlich-spektral aufspaltet und auf mehrere Photovervielfacher abbildet, wobei die Steuereinheit beim Eintritt in die vorgegebene Region die Schalter aller dieser Photovervielfacher aktiviert und beim Verlassen deaktiviert. Das optische Element kann beispielsweise ein spektral selektiver Strahlteiler oder ein winkeldispersives Element wie ein Prisma oder ein Gitter sein. Zur räumlich-spektralen Aufspaltung mittels Strahlteilern wird auf DE 197 02 753 A1 verwiesen, deren Offenbarungsgehalt hier soweit als möglich einbezogen wird. Zur räumlich-spektralen Aufspaltung mittels winkeldispersiver Elemente wird auf DE 100 33 180 A1 verwiesen, deren Offenbarungsgehalt hier soweit als möglich einbezogen wird. Es ist auch möglich, mehrere solche spektral aufspaltende Elemente hintereinanderschalten, insbesondere mit unterschiedlichen Dispersionsrichtungen, beispielsweise in Art eines Échelle-Spektrometers.

In einer dritten Ausgestaltung von Ausführungsformen mit mehreren Photovervielfachern umfasst das Rastermikroskop eine Optik zum Abbilden verschiedener Raumwinkelsegmente einer Eingangsapertur auf (mindestens) einen jeweiligen Photovervielfacher, wobei die Steuereinheit beim Eintritt in die vorgegebene Region die Schalter aller dieser Photovervielfacher aktiviert und beim Verlassen deaktiviert. Eine solche Optik ist beispielsweise aus EP 1664889 A1 bekannt, deren Offenbarungsgehalt hier soweit als möglich einbezogen wird. Diese Ausführungsform kann mit einer Ausführungsform kombiniert werden, in der mehrere Zielflecken simultan abgebildet werden. Zweckmäßigerweise erfolgt dann in jedem Teilstrahlengang eine entsprechende Abbildung von Raumwinkelsegmenten der betreffenden Eingangsapertur auf eine jeweilige Gruppe von Photovervielfachern.

In Ausführungsformen mit mehreren Photovervielfachern kann zumindest eine Untermenge der Photovervielfacher in einer Photovervielfacherzeile integriert sein. Derartige Zeilen sind kommerziell verfügbar, beispielsweise von Hamamatsu.

Das erfindungsgemäße Steuerverfahren umfasst folgende Schritte:

- Steuern der Lichtquelle zur Emission einer ersten Lichtleistung,
- Anlegen einer ersten elektrischen Spannung zwischen der Photokathode und der ersten Dynode zum Zweck einer Beschleunigung von Elektronen und
- Richten (mindestens) eines Lichtstrahls der Lichtquelle auf (mindestens) einen Zielfleck und Ablenken des Lichtstrahls derart, dass der Zielfleck sich über ein Abtastfeld bewegt (es abrastert),
wobei während der Bewegung des Zielflecks folgende Unterschritte ausgeführt werden:
 - Ermitteln einer Lage des Zielflecks,
 - Identifizieren eines Erreichens einer vorgegebenen zu bleichenden Region des Abtastfelds anhand der Lage des Zielflecks und
 - bei erfolgter Identifikation des Erreichens: Steuern der Lichtquelle zur Emission einer zweiten Lichtleistung (beispielsweise zum Bleichen), die größer ist als die erste Lichtleistung, und Anlegen einer zweiten elektrischen Spannung zwischen der Photokathode und der ersten Dynode anstelle der ersten Spannung, wobei die zweite Spannung niedriger ist als die erste Spannung, insbesondere durch genau einen der beiden Schritte „elektrisches Kurzschließen von Photokathode und erster Dynode“ und „Umpolung der ersten Spannung, insbesondere in Kombination mit Verringerung ihres Betrages“.

Die vorstehenden Schritte können beispielsweise von einem jeweiligen Software-Modul ausgeführt werden. Es ist auch möglich, dass ein Software-Modul mehrere der Schritte ausführt.

Vorzugsweise wird zum Anlegen der ersten Spannung eine äußere Betriebsspannung an den Photovervielfacher angelegt wird, die beim Anlegen der zweiten Spannung (im wesentlichen) angelegt bleibt. Auf ein zeitintensives Abschalten der Betriebshochspannung kann vorteilhafterweise verzichtet werden.

Besonders vorteilhaft sind Ausführungsformen, bei denen während der Bewegung des Zielflecks zusätzlich folgende Unterschritte ausgeführt werden:

- Identifizieren eines Verlassens der vorgegebenen zu bleichenden Region des Abtastfelds anhand der Lage des Zielflecks und daraufhin
- bei erfolgter Identifikation: Steuern der Lichtquelle zur Emission der ersten Lichtleistung und Anlegen der ersten Spannung zwischen der Photokathode und der ersten Dynode, insbesondere durch genau einen der beiden Schritte „Aufheben des Kurzschlusses von Photokathode und erster Dynode“ und „Umpolung der zweiten Spannung, insbesondere mit Erhöhung ihres Betrages“.

Auch diese Schritte können beispielsweise von einem jeweiligen Software-Modul ausgeführt werden. Es ist auch möglich, dass ein Software-Modul mehrere der Schritte ausführt.

Ganz allgemein umfasst die Erfindung ein Verfahren zum Manipulieren einer Probe durch Bestrahlen verschiedener Orte der Probe mit einem Lichtstrahl bei ortsabhängiger Lichtleistung mittels eines konfokalen Rastermikroskops, das einen Photovervielfacher, der eine Photokathode, mehrere Dynoden und eine Anode aufweist, umfasst, wobei eine elektrische Spannung zwischen der Photokathode und der ersten Dynode ortsabhängig angelegt wird, insbesondere bei (im wesentlichen) konstanter äußerer Betriebsspannung des Photovervielfachers.

Vorteilhafterweise können bei der Erfindung mehrere Regionen vorgegeben sein und die Photokathode und die erste Dynode für diese Regionen identisch angesteuert werden. So können simultan ablaufende Prozesse an unterschiedlichen Stellen der Probe beobachtet werden.

Die Lichtleistung der Lichtquelle kann vorzugsweise elektrooptisch, beispielsweise mittels eines elektrooptischen Modulators, oder akustooptisch, beispielsweise mittels eines akustooptischen Modulators, einstellbar sein.

Die Erfindung umfasst auch eine programmierbare Steuereinheit für ein konfokales Rastermikroskop oder Computerprogramm für eine solche Steuereinheit, eingerichtet zur Durchführung eines erfindungsgemäßen Verfahrens.

Vorteilhafterweise weist der Schalter eine Reaktionszeit von maximal 1 μ s auf. Dadurch ist einem LSM auch bei kurzen Pixelverweilzeiten eine pixelweise De- und Reaktivierung des PMT möglich. Besonders vorteilhaft ist, dass auch das Wiederherstellen der normalen Spannung zwischen Photokathode und erster Dynode mittels des Schalters beim Verlassen einer zu bleichenden Region und damit die Datenaufnahme mit ebenfalls mit extrem kurzen Reaktionszeiten von unter einer Mikrosekunde möglich ist. Zwischen zwei Dynoden liegt je nach PMT-Typ nur 1/9 bis 1/11 der Betriebshochspannung an, also typischerweise weniger als 150 V, was durch einen Schalter mit geringem Aufwand getrennt werden kann. Zweckmäßigerweise ist der Schalter gegen eine Hochspannung des Photovervielfachers isoliert.

Das erfindungsgemäße konfokale Rastermikroskop kann vorteilhafterweise in FLIP, FLAP, FRAP, Photoaktivierung und/oder Uncaging verwendet werden.

Die Erfindung stellt eine ortsabhängige, schnelle Schutzabschaltung für PMT dar. Sie ermöglicht einen verbesserten Schutz des PMT, insbesondere in Verbindung mit einer Bestrahlung mit ortsabhängiger Lichtleistung.

Nachfolgend wird die Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

In den Zeichnungen zeigen:

Fig. 1 schematisch das Abtasten einer Probe mit Bleichen einer Probenregion gemäß dem Stand der Technik,

Fig. 2 ein schematisches Schaltbild eines Laser-Scanning-Mikroskopes,

Fig. 3 ein vereinfachtes Schaltbild einer ersten PMT-Betriebsschaltung,

Fig. 4 ein vereinfachtes Schaltbild einer zweiten PMT-Betriebsschaltung und

Fig. 5 schematisch das Abtasten einer Probe mit Bleichen einer Probenregion gemäß der Erfindung.

In allen Zeichnungen tragen übereinstimmende Teile gleiche Bezugszeichen.

Fig. 1 zeigt die Folgen einer trägen Schutzabschaltung der Betriebshochspannung eines PMT in Abhängigkeit des Anodensignals des PMT gemäß dem Stand der Technik.

Fig. 2 zeigt das Schaltbild einer ersten beispielhaften Betriebsschaltung 1 für einen PMT 2. Zum besseren Verständnis sind nur solche Bestandteile dargestellt, die zum Verständnis der Erfindung beitragen. Der PMT 2 umfasst neben einem evakuierten Gehäuse (nicht dargestellt) eine Photokathode 2.1, acht Dynoden 2.2...2.9 und eine Anode 2.10. Die Betriebsschaltung 1 umfasst eine Hochspannungsquelle 3, deren Spannung über einer Reihe von Widerständen 4 angelegt ist, so dass an jedem Widerstand 4 und den damit zwischen benachbarten Dynoden 2.1...2.10 eine jeweilige Teilspannung abfällt. Die resultierende Potentialkaskade vervielfältigt auf bekannte Weise die an der Kathode 2.1 ausgeschlagenen Photoelektronen. Der dadurch an der Anode 2.10 auftretende Strompuls kann beispielsweise mittels einer Strom-Spannungs-Wandlungseinheit (nicht abgebildet) in eine elektrische Spannung als Anodensignal D gewandelt werden.

Die Schaltung 1 weist einen hochspannungsisolierten Schalter 7 auf, dessen einer Pol mit der Photokathode 2.1 und dessen anderer Pol mit der ersten Dynode 2.2 verbunden ist. Der Schalter 7 kann beispielsweise als Optokoppler, Isolationsverstärker oder Relais ausgeführt sein. Er ist zweckmäßigerweise als Schließer ausgebildet und bewirkt in diesem Ausführungsbeispiel im geschlossenen (aktivierten) Schaltzustand einen Kurzschluss zwischen Photokathode 2.1 und erster Dynode 2.2 und deaktiviert damit die erste Beschleunigungsstufe des PMT 2. Der Schalter 7 schließt, solange das von der Steuereinheit 34 ausgegebene Schaltsignal Q beispielsweise mindestens eine vorgegebene negative Höhe aufweist. Öffnet die Steuereinheit 34 den Arbeitskontakt des Schalters 7 wieder, in dem sie beispielsweise ein positiveres Signal Q an ihn ausgibt, so baut sich die Beschleunigungsspannung zwischen Kathode 2.1 und erster Dynode 2.2 in kürzestmöglicher Zeit wieder auf. Die erste Beschleunigungsstufe ist damit

reaktiviert. Während des gesamten Vorgangs der Des- und Reaktivierung des PMT 2 wird die Hochspannung HV der Spannungsquelle 3 aufrechterhalten.

Neben dem Schalter 7 kann die Steuereinheit 34 auch die Lichtquelle 25 hinsichtlich der abgegebenen Lichtleistung steuern. Vorzugsweise aktiviert sie den Schalter 7 immer dann, wenn sie die Lichtquelle 25 von einer niedrigeren auf eine höhere Lichtleistung umschaltet. Vorzugsweise deaktiviert sie den Schalter 7 immer dann, wenn sie die Lichtquelle 25 von einer höheren auf eine niedrigere Lichtleistung umschaltet.

In **Fig. 3** ist ein Laser-Scanning-Mikroskop 10 mit ortsabhängiger, schneller Schutzabschaltung gemäß Fig. 1 schematisch dargestellt. Das LSM 10 ist modular aus einem Beleuchtungsmodul L mit Lasern 23, einem Abtastmodul S (engl. „scanning module“), einem Detektionsmodul D und der Mikroskopeinheit M mit dem Mikroskopobjektiv 31 zusammengesetzt.

Das Licht der Laser 23 kann durch Lichtklappen 24 und Abschwächer 25, beispielsweise akustooptische einstellbare Filter (engl. „acousto-optic tunable filter“; AOTF), von der Steuereinheit 34 beeinflusst werden, bevor es über Lichtleitfasern und Koppeloptiken 20 in das Abtastmodul S eingespeist und vereinigt wird. Über den Hauptstrahlteiler 33 und die X-Y-Abtasteinheit 30 (engl. „scanner“), die zwei Galvanometerspiegel aufweist (nicht dargestellt), gelangt es durch das Mikroskopobjektiv 21 zur Probe 22, wo es einen Zielfleck T beleuchtet. Nachfolgend werden die Abschwächer 25 stellvertretend für die Kombination aus Laser 23, Lichtklappen 24 und Abschwächern 25 als Lichtquelle bezeichnet.

Von der Probe reflektiertes Licht oder emittiertes Fluoreszenzlicht gelangt durch das Mikroskopobjektiv 21 und weiter über die Abtasteinheit 30 durch den Hauptstrahlteiler 33 in das Detektionsmodul D. Der Hauptstrahlteiler 33 kann beispielsweise als dichroitischer Farbteiler ausgebildet sein. Das Detektionsmodul D weist mehrere Detektionskanäle mit jeweils einer Lochblende 31, einem Filter 28 und einem PMT-Detektor 2 auf, die durch Farbteiler 29 separiert sind. Anstelle von Lochblenden 31 können, beispielsweise bei linienförmiger Beleuchtung, auch Schlitzblenden (nicht abgebildet) verwendet werden. Die konfokalen Lochblenden 31

dienen der Diskriminierung von Probenlicht, das nicht aus dem den Zielfleck T umgebenden Fokusvolumen stammt. Die Detektoren 2 detektieren daher ausschließlich Licht aus dem Fokusvolumen. Die Detektoren 2 umfassen eine jeweilige Betriebsschaltung 1, die eine Betriebshochspannung bereitstellt und einen Schalter (der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt) zur Beeinflussung der Spannung zwischen der Photokathode und der ersten Dynode unabhängig von der Betriebshochspannung umfasst, sowie eine jeweilige Auswerteelektronik (hier nicht näher dargestellt). In anderen Ausführungsformen (nicht dargestellt) kann die Auswerteelektronik von den Detektoren 2 abgesetzt sein, insbesondere kann sie außerhalb des Detektionsmoduls D angeordnet sein.

Der Schalter zur Beeinflussung der Spannung zwischen der Photokathode und der ersten Dynode ist beispielsweise so mit der Photokathode und der ersten Dynode verbunden, dass er in einer aktivierten Schaltstellung die Photokathode und die erste Dynode elektrisch kurzschließt, so dass zwischen der ersten Dynode und der Photokathode eine Spannung von 0 V anliegt, und in einer deaktivierten Schaltstellung den Kurzschluss aufhebt, so dass zwischen der ersten Dynode und der Photokathode die reguläre Spannung anliegt, beispielsweise +150 V.

Der konfokal beleuchtete und aufgenommene Zielfleck T in der Probe 22 kann mittels der Abtasteinheit 30 über oder durch die Probe 22 bewegt werden, um pixelweise ein Bild aufzunehmen, indem die Galvanometerspiegel der Abtasteinheit 30 gezielt verdreht werden. Sowohl die Bewegung der Galvanometerspiegel als auch das Schalten der Beleuchtung mittels der Lichtklappen 24 oder der Abschwächer 25 werden beispielsweise unmittelbar von der Steuereinheit 34 gesteuert. Die Datenaufnahme von den Detektoren 2 erfolgt ebenfalls durch die Steuereinheit 34, ebenso die Steuerung des Schalters zur Beeinflussung der Spannung zwischen Photokathode und erster Dynode. Die Auswerteeinheit/Steuereinheit 34 kann beispielsweise ein handelsüblicher elektronischer Rechner (engl. „computer“) sein.

In einer alternativen Ausführungsform (nicht abgebildet) können durch eine Optik im Beleuchtungsstrahlengang, beispielsweise einem Linsenfeld (engl. „lens array“), simultan mehrere Zielflecken T in der Probe 22 beleuchtet werden. Zweckmäßigerweise sind im Detektionsstrahlengang dann mehrere PMT 2 so

angeordnet, dass sie in einem jeweiligen Teilstrahlengang jeweils genau einen der Zielflecken T konfokal detektieren. Zusätzlich oder alternativ kann im Detektionsstrahlengang (bei mehreren Zielflecken beispielsweise in jedem Teilstrahlengang) vor dem Detektor 2 (bei mehreren Zielflecken beispielsweise vor jedem Detektor) eine räumlich-spektrale Aufspaltung erfolgen, beispielsweise durch ein jeweiliges winkeldispersives Element.

In alternativen Ausführungsformen (in Fig. 3 nicht abgebildet) kann der Schalter zur Beeinflussung der Spannung zwischen der Photokathode und der ersten Dynode beispielsweise so mit der Photokathode und der ersten Dynode verbunden sein, dass in einer aktivierten Schaltstellung eine positive Spannung von beispielsweise +150 V zwischen der ersten Dynode und der Photokathode anliegt und in einer deaktivierten Schaltstellung eine negative Spannung von beispielsweise -150 V zwischen der ersten Dynode und der Photokathode anliegt.

Ein Beispiel für eine Betriebsschaltung 1 einer solchen alternativen Ausführung zeigt **Fig. 4**. Sie entspricht weitgehend der Schaltung 1 gemäß Fig. 2, jedoch ist hier der Schalter 7 zur Umpolung der Spannung zwischen erster Dynode 2.2 und Photokathode 2.1 ausgebildet. Zu diesem Zweck schließt der Schalter 7 im aktivierten Schaltzustand die Photokathode 2.1 mit der zweiten Dynode 2.3 elektrisch kurz. Im deaktivierten Schaltzustand besteht die reguläre Zuordnung der Dynoden 2.1...2.10 zu der Spannungsteilerkaskade. Aufgrund der Umpolung wirkt die erste Beschleunigungsstufe im aktivierten Schaltzustand des Schalters 7 als Elektronenbremse und verhindert damit wirksam große Photoelektronenströme.

Fig. 5 zeigt den Ablauf eines beispielhaften Steuerverfahrens für ein LSM 10, beispielsweise gemäß Fig. 2. Die Steuereinheit 34 nimmt in Schritt S1 zunächst mit einer reinen Detektions-Lichtleistung der Lichtquelle 25 auf an sich bekannte Weise ein Übersichtsbild von der Probe 22 auf und stellt es dem Benutzer visuell dar. Anhand des Übersichtsbildes kann der Benutzer ein Abtastfeld X und eine darinliegende, ihn interessierende Region (engl. „region of interest“, ROI), in der die Probe 22 mit höherer Lichtleistung belichtet werden soll als außerhalb dieser Region R, ermitteln. Sofern dem Benutzer das Abtastfeld X und/oder die Region R bereits bekannt ist, kann Schritt S1 entfallen. In Schritt S2 nimmt die Steuereinheit 34

vom Benutzer beispielsweise auf an sich bekannte Weise eine Angabe über die Probenregion R entgegen. Wenn das Abtastfeld X und/oder die Region R der Steuereinheit 34 aus einer anderen Quelle schon als Datensatz vorliegen, kann der betreffende Teilschritt entfallen.

Auf Anweisung des Benutzers stellt die Steuereinheit 34 in Schritt S3 die Lichtquelle 25 auf Detektions-Lichtleistung und deaktiviert den Schalter 7. In Schritt S4 bewegt sie den Zielfleck T mittels der Ablenkeinheit 30 über die Probe 22 und ordnet dabei die vom Detektor 2 pro Pixelverweilzeit akkumulierten Lichtintensitäten digital entsprechenden Pixeln zu. Sie vergleicht währenddessen laufend in Schritt S4a die momentane Lage des Zielflecks T mit der vorgegebenen Region R. Identifiziert sie, dass der Zielfleck T einen Rand der vorgegebenen Region R überschritten hat und dadurch zumindest teilweise in die Region eingetreten ist, aktiviert sie den Schalter 7 und schaltet die Lichtquelle 25 auf Bleich-Lichtleistung um. Ebenso vergleicht sie während Schritt S4 laufend in Schritt S4b die momentane Lage des Zielflecks T mit der vorgegebenen Region R. Identifiziert sie, dass der Zielfleck T einen Rand der vorgegebenen Region R überschritten und dadurch die Region R wieder vollständig verlassen hat, deaktiviert sie den Schalter 7 und schaltet die Lichtquelle 25 auf Detektions-Lichtleistung um. Die Bewegung des Zielflecks T über die Probe 22 in Schritt S4 wird solange fortgesetzt, bis das Erreichen des Endes des Abtastfeldes X identifiziert wird. Dann wird der Zielfleck T in Schritt S5 wieder an den Anfang des Abtastfeldes X bewegt und in Schritt S6 die Probe ausschließlich mit Detektions-Lichtleistung erneut abgetastet und dabei ein Bild aufgenommen. Zur Beobachtung dynamischer Prozesse in der Probe 22 ist es zweckmäßig, die Schritte S5 und S6 mehrmals zu wiederholen.

Fig. 6 zeigt die vorteilhaften Folgen des Einsatzes einer der oben beschriebenen Betriebsschaltungen 1 in einem LSM am Beispiel des Bleichens einer vorgegebenen Probenregion R. Im Gegensatz zum Stand der Technik (Fig. 1) erfolgt durch Aktivieren des Schalters 7 im Zeitpunkt A mit dem Eintritt des Zielflecks in die zu bleichende Region R die Abschaltung des Detektors mit einem Fehler von weniger als einer Pixelverweilzeit. Zusammen mit dem Aktivieren des Schalters 7 wird die Lichtquelle 25 auf Bleich-Lichtleistung umgeschaltet. Die Reaktivierung der Detektion durch Desaktivieren des Schalters 7 und die Zurückschaltung der Lichtquelle 25 auf

die normale Detektions-Lichtheistung erfolgen im Zeitpunkt B mit dem Austritt des Zielflecks aus der Region R. Dadurch können die nachfolgenden Pixel mit einem Fehler von maximal einem Pixel regulär detektiert werden.

Da das Abtastfeld X spalten- und zeilenweise abgerastert und in Pixel aufgenommen wird, erfolgen die Abschaltung und Reaktivierung in Verbindung mit der Umschaltung der Lichtheistung in allen Zeilen, über die sich die Region R erstreckt. Bei mehreren vorgegebenen Regionen R im Abtastfeld X kann es – je nach relativer Lage der Regionen R – pro Zeile mehrfach zu Abfolgen von Abschaltung und Reaktivierung kommen.

Generell hat die Erfindung den Vorteil, dass die Bildaufnahme durch Aktivieren des Schalters 7 pixelgenau beim Eintritt in eine vorgegebenen Region R ausgeschaltet und beim Austritt durch Desaktivieren des Schalters 7 wieder pixelgenau eingeschaltet werden kann, so dass auch in einem bleichenden Abtastdurchgang ein Bild der Probe 22 mit Ausnahme der Region R aufgenommen werden kann. Dadurch kann eine quantitative Auswertung eines Probenbereichs, der außerhalb der Region R liegt, beispielsweise im Rahmen von FLIP, mit hoher Genauigkeit durchgeführt werden. Das gilt auch bei mehreren zu bleichenden Regionen R.

Bezugszeichenliste

- 1 Betriebsschaltung
- 2 PMT
- 2.1 Photokathode
- 2.2...2.9 Dynode
- 2.10 Anode
- 3 Hochspannungsquelle
- 4 Widerstand
- 5 Erster Komparator
- 6 Zweiter Komparator
- 7 Schalter
- 10 Laser-Scanning-Mikroskop
- 20 Kollimationsoptik
- 21 Mikroskopobjektiv
- 22 Probe
- 23 Laser
- 24 Lichtklappe
- 25 Abschwächer
- 26 Faserkoppler
- 27 Tubuslinse
- 28 Filter
- 29 Dichroitischer Strahlteiler
- 30 Abtasteinheit
- 31 Lochblende
- 32 Photovervielfacher
- 33 Hauptstrahlteiler
- 34 Steuereinheit
- 35 Dispersives Element
- A, B, C Zeitpunkte
- D Anodensignal
- X Schaltsignal
- HV/gnd Hochspannung/Masse
- P Pixel

Patentansprüche

1. Konfokales Rastermikroskop (10), das eine Lichtquelle (23, 24, 25), eine einstellbare Strahl-Ablenkeinheit (30) und einen Photovervielfacher (2), der eine Photokathode (2.1), mehrere Dynoden (2.2...2.9) und eine Anode (2.10) aufweist, eine elektrische Schaltung (1) zur Beaufschlagung der Dynoden (2.2...2.9) mit einer jeweiligen Spannung gegenüber der Photokathode (2.1) und eine Steuereinheit (34) zur Einstellung der Ablenkeinheit (30) umfasst,
gekennzeichnet durch
 - einen Schalter (7), der zwischen einem aktivierten Schaltzustand und einem deaktivierten Schaltzustand umschaltbar ist, wobei er in dem aktivierten Schaltzustand im Vergleich zu dem deaktivierten Schaltzustand die Spannung zwischen der Photokathode (2.1) und der ersten Dynode (2.2) reduziert, und
 - eine Steuereinheit (34), die eingerichtet ist zum Bewegen (mindestens) eines mittels der Lichtquelle bestrahlbaren Zielflecks (T) über ein Abtastfeld (S) mittels der Ablenkeinheit (30), wobei die Steuereinheit (34) beim Eintritt des Zielflecks in eine vorgegebene Region (R) des Abtastfeldes (S) den Schalter (7) aktiviert und beim Verlassen der Region (R) den Schalter (7) deaktiviert.
2. Konfokales Rastermikroskop (10) nach Anspruch 1, wobei der Schalter (7) durch das Umschalten in den aktivierten Schaltzustand:
 - a) die Photokathode (2.1) mit der ersten Dynode (2.2) elektrisch kurzschließt oder
 - b) die Spannung zwischen der Photokathode (2.1) und der ersten Dynode (2.2) umpolt, insbesondere in Kombination mit einer Verringerung ihres Betrages.
3. Konfokales Rastermikroskop nach Anspruch 1 oder 2, wobei die elektrische Schaltung (1) dazu ausgebildet ist, den Photovervielfacher (2) unabhängig von dem Schaltzustand des Schalters (7) mit einer äußeren Betriebsspannung zu beaufschlagen.
4. Konfokales Rastermikroskop (10) nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Schalter (7) eine Schaltzeit von maximal 1 μ s aufweist.

5. Konfokales Rastermikroskop (10) nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Lichtquelle (23, 24, 25) hinsichtlich ihrer Lichtleistung einstellbar ist und die Steuereinheit (34) die Lichtquelle (23, 24, 25) beim Eintritt des Zielflecks in die vorgegebene Region (R) auf eine höhere Lichtleistung einstellt und beim Verlassen der Region auf eine niedrigere Lichtleistung einstellt.
6. Konfokales Rastermikroskop (10) nach einem der vorhergehenden Ansprüche, umfassend mehrere Photovervielfacher (2), die jeweils einen Schalter (7) aufweisen, der zwischen einem aktivierten Schaltzustand und einem deaktivierten Schaltzustand umschaltbar ist, wobei er in dem aktivierten Schaltzustand die Spannung zwischen der Photokathode (2.1) und der ersten Dynode (2.2) des betreffenden Photovervielfachers (2) reduziert, insbesondere, indem er a) die Photokathode (2.1) mit der ersten Dynode (2.2) elektrisch kurzschließt oder b) die Spannung zwischen der Photokathode (2.1) und der ersten Dynode (2.2) umpolt, insbesondere in Kombination mit einer Verringerung ihres Betrages.
7. Konfokales Rastermikroskop (10) nach Anspruch 6, umfassend Optiken zur simultanen Abbildung mehrerer Zielflecken (T) auf mindestens einen jeweiligen Photovervielfacher (2), wobei die Steuereinheit (34) für jeden Zielfleck (T) unabhängig von den anderen Zielflecken (T) beim Eintritt in die vorgegebene Region (R) die Schalter (7) dieser Photovervielfacher (2) aktiviert und beim Verlassen deaktiviert.
8. Konfokales Rastermikroskop (10) nach Anspruch 6, umfassend (mindestens) ein optisches Element (35), das den Zielfleck (T) räumlich-spektral aufspaltet und auf mehrere Photovervielfacher (2) abbildet, wobei die Steuereinheit (34) beim Eintritt in die vorgegebene Region (R) die Schalter (7) aller dieser Photovervielfacher (2) aktiviert und beim Verlassen deaktiviert.
9. Konfokales Rastermikroskop (10) nach Anspruch 6, umfassend (mindestens) eine Optik zum Abbilden verschiedener Raumwinkelsegmente einer Eingangsapertur auf (mindestens) einen jeweiligen Photovervielfacher (2), wobei die

Steuereinheit (34) beim Eintritt in die vorgegebene Region (R) die Schalter (7) aller dieser Photovervielfacher (2) aktiviert und beim Verlassen deaktiviert.

10. Konfokales Rastermikroskop (10) nach einem der Ansprüche 6 bis 9, wobei zumindest eine Untermenge der Photovervielfacher (2) in einer Photovervielfacherzeile integriert ist.
11. Verwendung eines konfokalen Rastermikroskops (10) nach einem der vorhergehenden Ansprüche in FLIP, FLAP, FRAP, Photoaktivierung und/oder Uncaging.
12. Steuerverfahren für ein konfokales Rastermikroskop (10) mit einer Lichtquelle (23, 24, 25) und einem Photovervielfacher (2), der eine Photokathode (2.1), mehrere Dynoden (2.2...2.9) und eine Anode (2.10) aufweist, umfassend folgende Schritte:
 - Steuern der Lichtquelle (23, 24, 25) zur Emission einer ersten Lichtleistung,
 - Anlegen einer ersten elektrischen Spannung zwischen der Photokathode (2.1) und der ersten Dynode (2.2) zum Zweck einer Beschleunigung von Elektronen und
 - Richten (mindestens) eines Lichtstrahls der Lichtquelle (23, 24, 25) auf (mindestens) einen Zielfleck (T) und Ablenken des Lichtstrahls derart, dass der Zielfleck (T) sich über ein Abtastfeld (S) bewegt (es abrastert), wobei während der Bewegung des Zielflecks (T) folgende Unterschritte ausgeführt werden:
 - Ermitteln einer Lage des Zielflecks (T),
 - Identifizieren eines Erreichens einer vorgegebenen zu bleichenden Region (R) des Abtastfelds (S) anhand der Lage des Zielflecks (T) und
 - bei erfolgter Identifikation des Erreichens: Steuern der Lichtquelle (23, 24, 25) zur Emission einer zweiten Lichtleistung zum Bleichen, die größer ist als die erste Lichtleistung, und Anlegen einer zweiten elektrischen Spannung zwischen der Photokathode (2.1) und der ersten Dynode (2.2) anstelle der ersten Spannung, wobei die zweite Spannung niedriger ist als die erste Spannung, insbesondere durch genau einen der beiden Schritte „elektrisches Kurzschließen von

Photokathode (2.1) und erster Dynode (2.2)“ und „Umpolung der ersten Spannung, insbesondere in Kombination mit Verringerung ihres Betrages“.

13. Steuerverfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, wobei zum Anlegen der ersten Spannung eine äußere Betriebsspannung an den Photovervielfacher (2) angelegt wird, die beim Anlegen der zweiten Spannung (im wesentlichen) angelegt bleibt.
14. Steuerverfahren nach Anspruch 12 oder 13, wobei während der Bewegung des Zielflecks (T) zusätzlich folgende Unterschritte ausgeführt werden:
 - Identifizieren eines Verlassens der vorgegebenen zu bleichenden Region (R) des Abtastfelds (S) anhand der Lage des Zielflecks (T) und daraufhin
 - bei erfolgter Identifikation: Steuern der Lichtquelle (23, 24, 25) zur Emission der ersten Lichtleistung und Anlegen der ersten Spannung zwischen der Photokathode (2.1) und der ersten Dynode (2.2), insbesondere durch genau einen der beiden Schritte „Aufheben des Kurzschlusses von Photokathode (2.1) und erster Dynode (2.2)“ und „Umpolung der zweiten Spannung, insbesondere mit Erhöhung ihres Betrages“.
15. Verfahren zum Manipulieren einer Probe (22) durch Bestrahlen verschiedener Orte der Probe (22) mit einem Lichtstrahl bei ortsabhängiger Lichtleistung mittels eines konfokalen Rastermikroskops (10), das einen Photovervielfacher (2), der eine Photokathode (2.1), mehrere Dynoden (2.2...2.9) und eine Anode (2.10) aufweist, umfasst, wobei eine elektrische Spannung zwischen der Photokathode (2.1) und der ersten Dynode (2.2) ortsabhängig angelegt wird, insbesondere bei (im wesentlichen) konstanter äußerer Betriebsspannung des Photovervielfachers (2).
16. Gegenstand nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei mehrere Regionen (R) vorgegeben sind und die Photokathode (2.1) und die erste Dynode (2.2) für diese Regionen (R) identisch angesteuert werden.
17. Gegenstand nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Lichtleistung der Lichtquelle (23, 24, 25) elektrooptisch (mittels eines elektrooptischen

Modulators) oder akustooptisch (mittels eines akustooptischen Modulators) einstellbar ist.

18. Programmierbare Steuereinheit (34) für ein konfokales Rastermikroskop (10) oder Computerprogramm für eine solche Steuereinheit (34), eingerichtet zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der vorhergehenden Verfahrensansprüche.

1 / 7

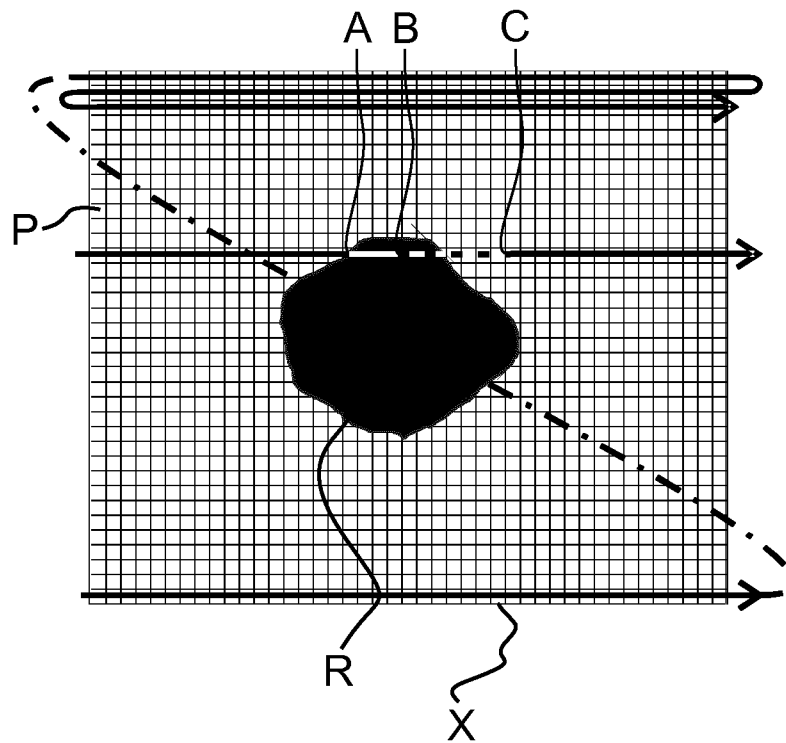


Fig. 1A - Stand der Technik

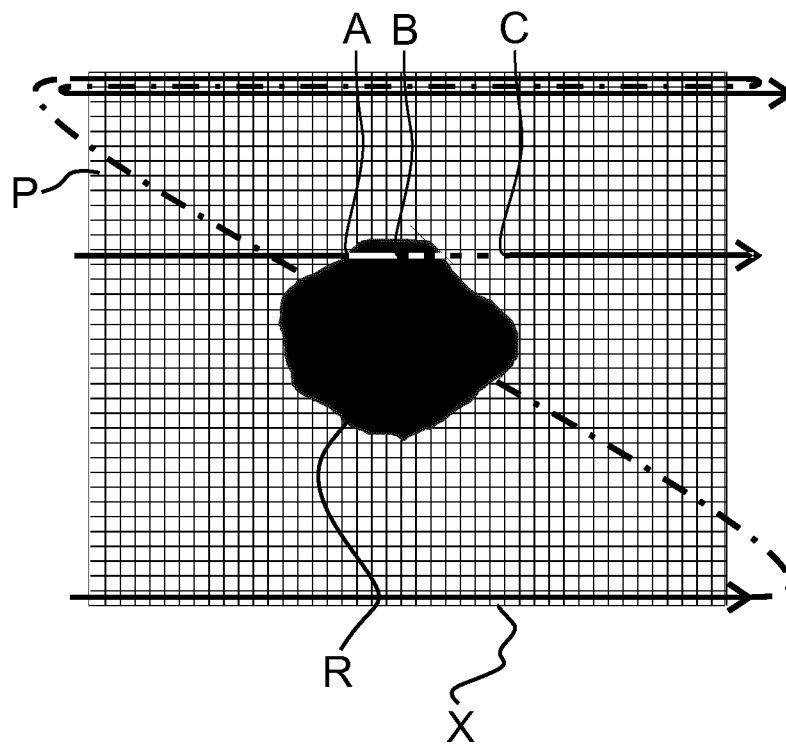


Fig. 1B - Stand der Technik

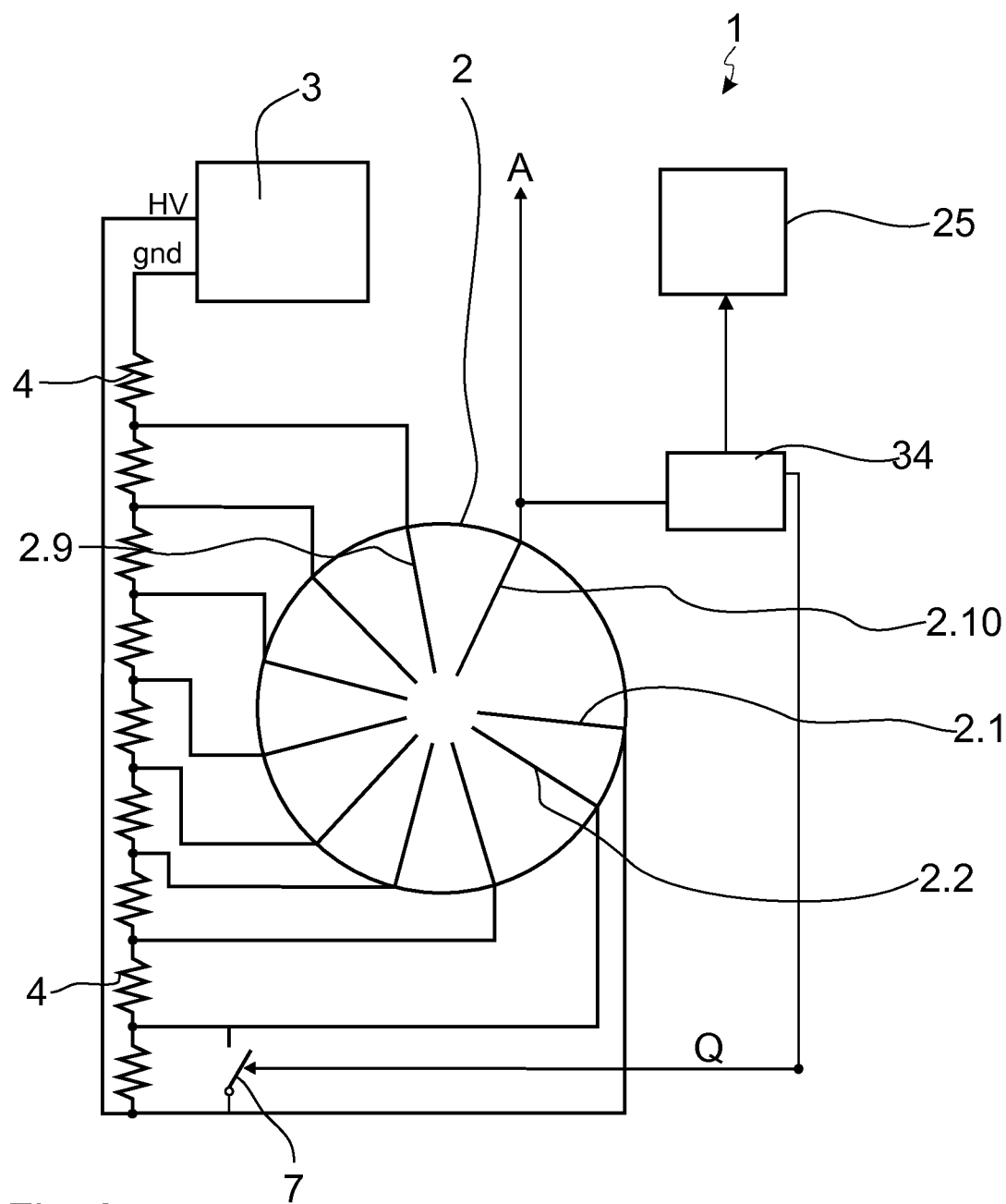


Fig. 2

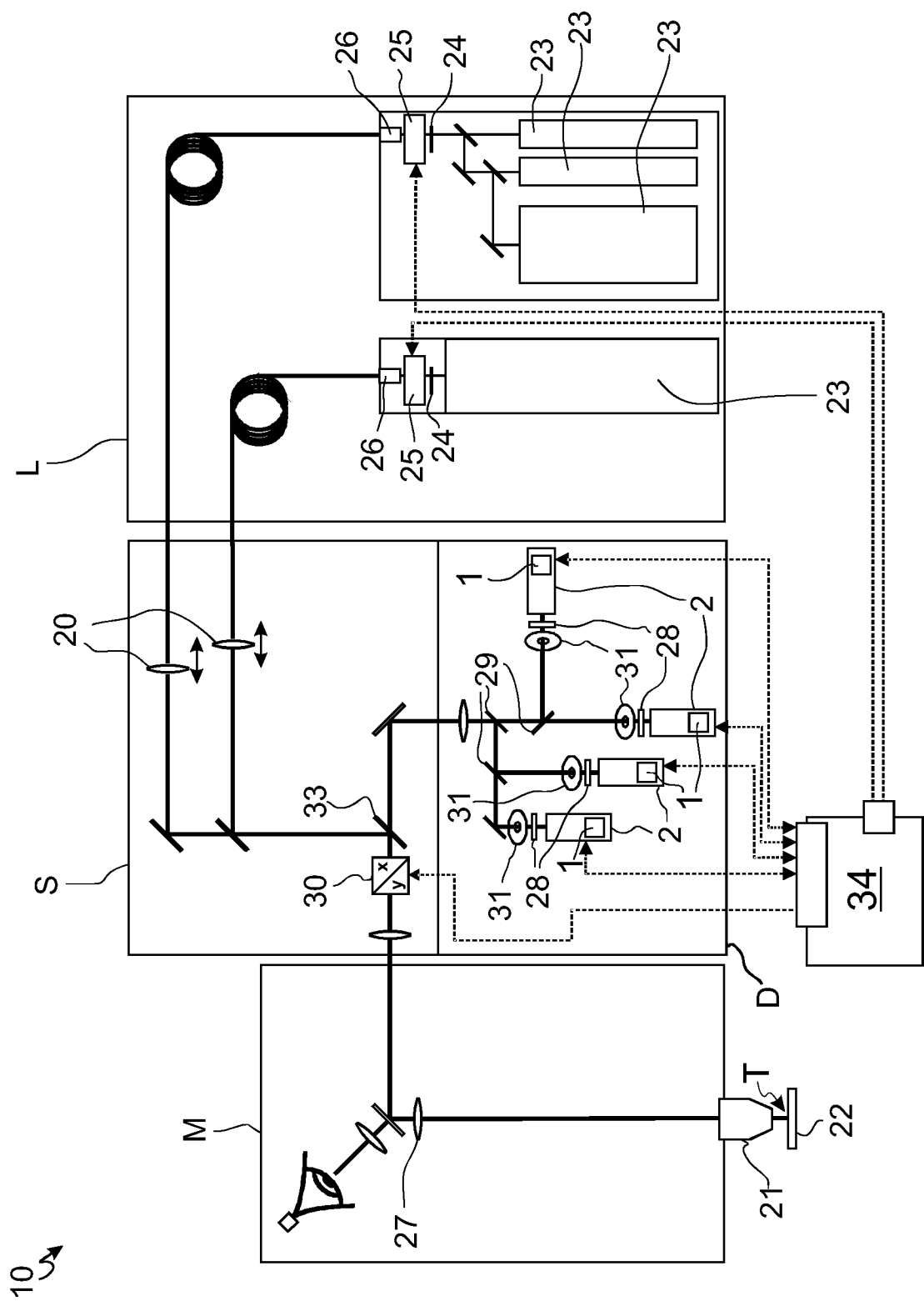


Fig. 3

4 / 7

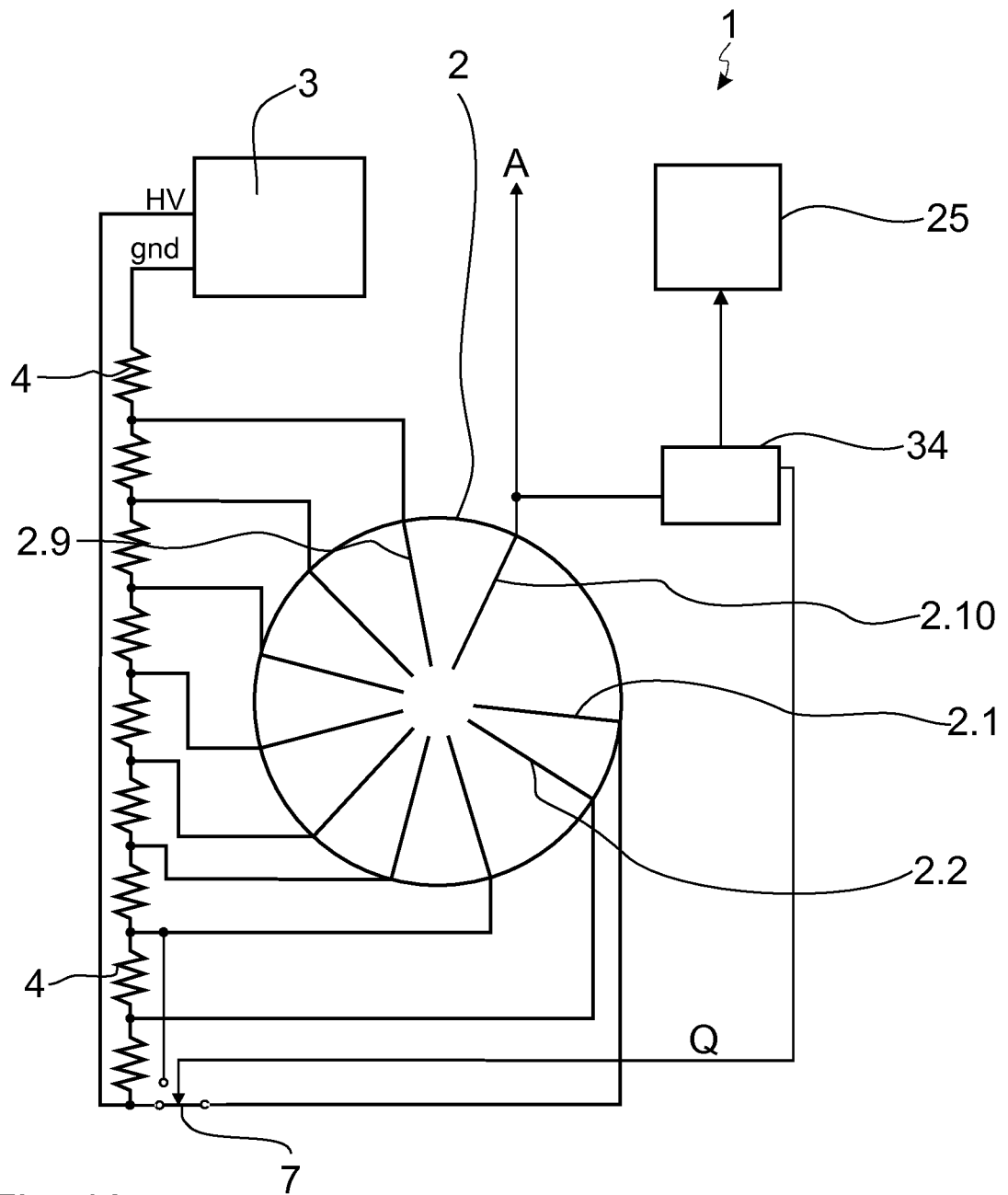


Fig. 4A

5 / 7

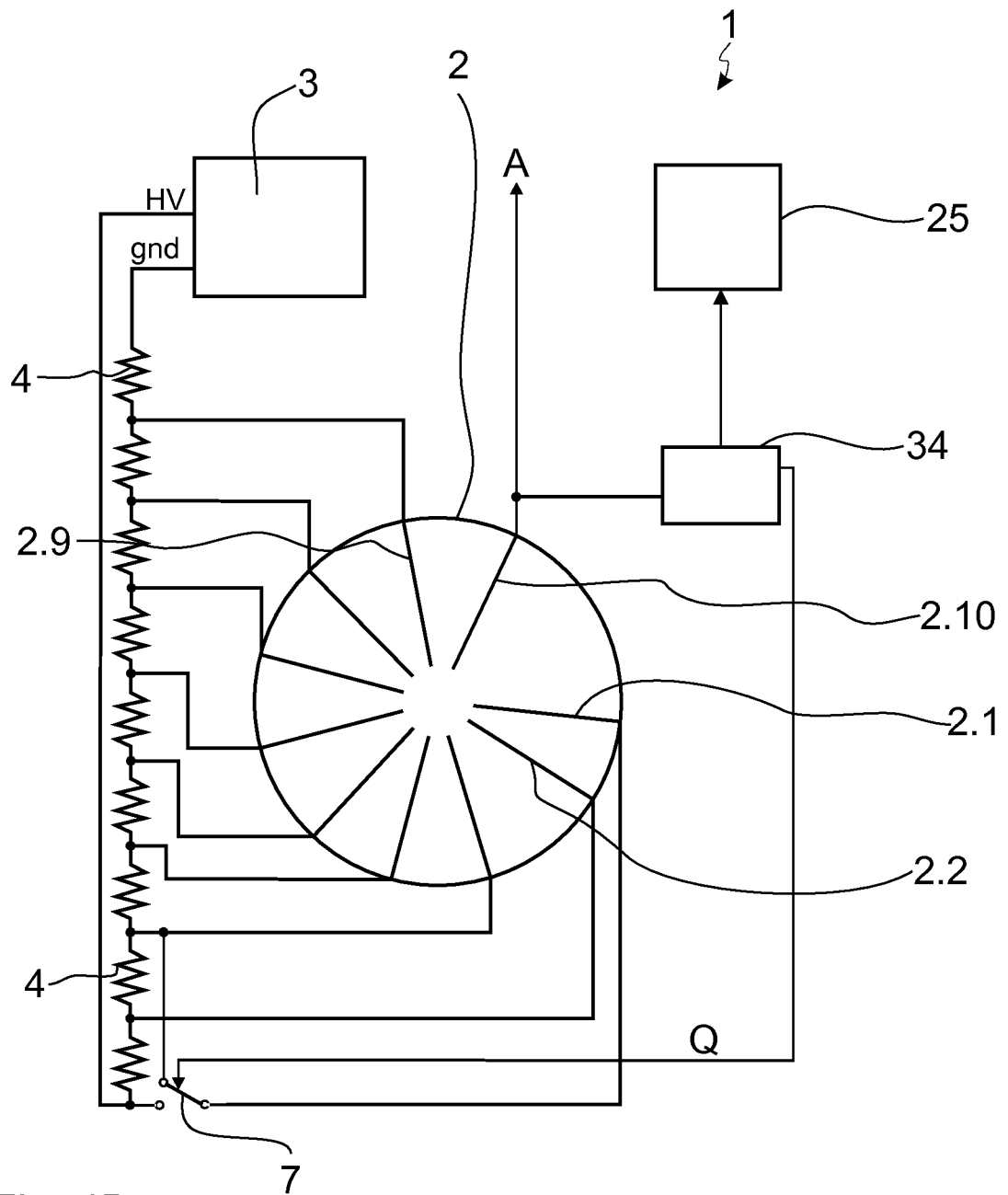


Fig. 4B

6 / 7

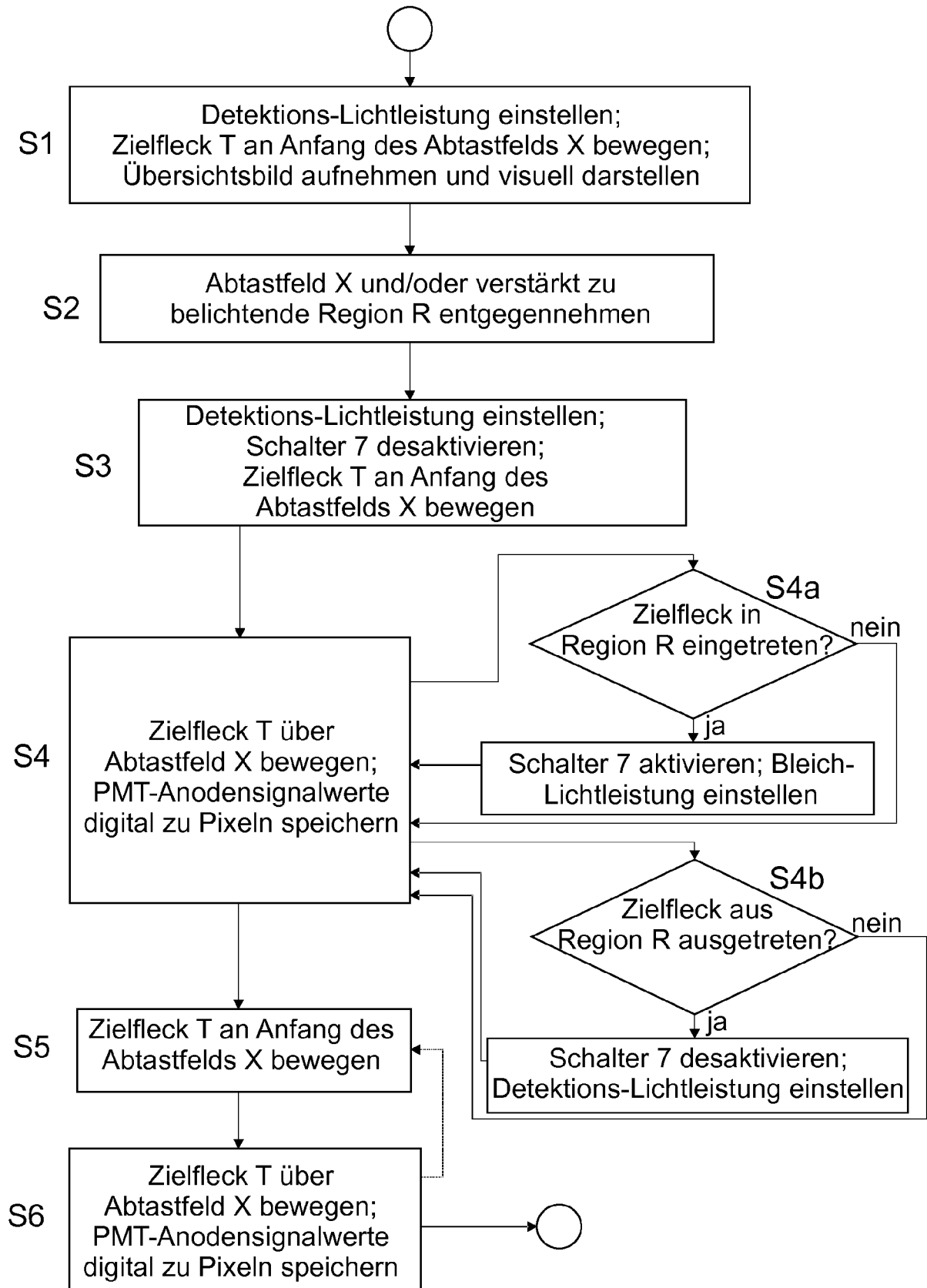


Fig. 5

7 / 7

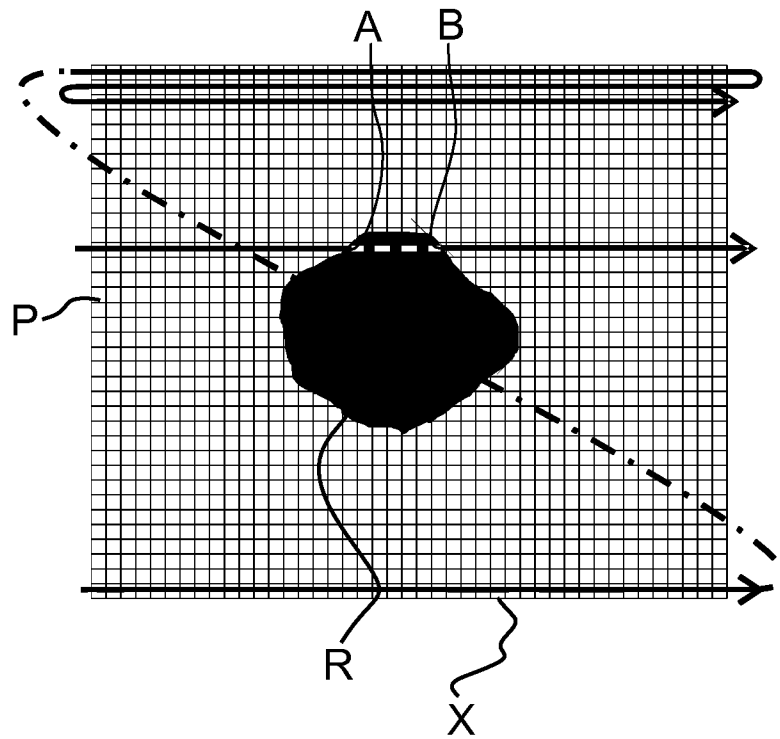


Fig. 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/061463

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G02B21/00 H01J43/30
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 H01J

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.
Y	JP 2004 069752 A (KEYENCE CO LTD) 4 March 2004 (2004-03-04) cited in the application abstract; figures -----	1-4
Y	US 3 821 546 A (MC CLENAHAN J) 28 June 1974 (1974-06-28) the whole document -----	1-18
Y	WO 2009/150416 A2 (RAPISCAN SECURITY PRODUCTS INC [US]; MORTON EDWARD JAMES [GB]) 17 December 2009 (2009-12-17) abstract figure 14 -----	1,2
	-/-	



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

5 September 2012

Date of mailing of the international search report

19/09/2012

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/EP2012/061463

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DE 41 05 376 A1 (JENOPTIK JENA GMBH [DE]) 19 September 1991 (1991-09-19) abstract figures the whole document -----	1
Y	EP 1 617 253 A1 (ZEISS CARL JENA GMBH [DE]) 18 January 2006 (2006-01-18) figures 1,10-14 paragraph [0047] - paragraph [0050] paragraph [0052] - paragraph [0059] -----	1-18
Y	DE 10 2004 034997 A1 (ZEISS CARL JENA GMBH [DE]) 2 February 2006 (2006-02-02) the whole document -----	1-18
X,P	DE 10 2009 060309 A1 (ZEISS CARL MICROIMAGING GMBH [DE]) 22 June 2011 (2011-06-22) abstract; figures claims paragraph [0014] - paragraph [0024] -----	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/061463

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 2004069752 A	04-03-2004	JP 4542302 B2 JP 2004069752 A	15-09-2010 04-03-2004
US 3821546 A	28-06-1974	NONE	
WO 2009150416 A2	17-12-2009	GB 2473373 A US 2011182407 A1 US 2011204243 A1 WO 2009150416 A2	09-03-2011 28-07-2011 25-08-2011 17-12-2009
DE 4105376 A1	19-09-1991	DD 292549 A5 DE 4105376 A1	01-08-1991 19-09-1991
EP 1617253 A1	18-01-2006	DE 102004034961 A1 EP 1617253 A1 GB 2416447 A US 2006011857 A1 US 2009046360 A1	02-02-2006 18-01-2006 25-01-2006 19-01-2006 19-02-2009
DE 102004034997 A1	02-02-2006	DE 102004034997 A1 JP 2006030997 A	02-02-2006 02-02-2006
DE 102009060309 A1	22-06-2011	DE 102009060309 A1 US 2011149388 A1	22-06-2011 23-06-2011

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. G02B21/00 H01J43/30
ADD.

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
G02B H01J

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.
Y	JP 2004 069752 A (KEYENCE CO LTD) 4. März 2004 (2004-03-04) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung; Abbildungen -----	1-4
Y	US 3 821 546 A (MC CLENAHAN J) 28. Juni 1974 (1974-06-28) das ganze Dokument -----	1-18
Y	WO 2009/150416 A2 (RAPISCAN SECURITY PRODUCTS INC [US]; MORTON EDWARD JAMES [GB]) 17. Dezember 2009 (2009-12-17) Zusammenfassung Abbildung 14 ----- -/-	1,2



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

5. September 2012

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

19/09/2012

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.
Y	DE 41 05 376 A1 (JENOPTIK JENA GMBH [DE]) 19. September 1991 (1991-09-19) Zusammenfassung Abbildungen das ganze Dokument -----	1
Y	EP 1 617 253 A1 (ZEISS CARL JENA GMBH [DE]) 18. Januar 2006 (2006-01-18) Abbildungen 1,10-14 Absatz [0047] - Absatz [0050] Absatz [0052] - Absatz [0059] -----	1-18
Y	DE 10 2004 034997 A1 (ZEISS CARL JENA GMBH [DE]) 2. Februar 2006 (2006-02-02) das ganze Dokument -----	1-18
X,P	DE 10 2009 060309 A1 (ZEISS CARL MICROIMAGING GMBH [DE]) 22. Juni 2011 (2011-06-22) Zusammenfassung; Abbildungen Ansprüche Absatz [0014] - Absatz [0024] -----	1-4

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2012/061463

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
JP 2004069752 A	04-03-2004	JP 4542302 B2	15-09-2010
		JP 2004069752 A	04-03-2004
US 3821546 A	28-06-1974	KEINE	
WO 2009150416 A2	17-12-2009	GB 2473373 A	09-03-2011
		US 2011182407 A1	28-07-2011
		US 2011204243 A1	25-08-2011
		WO 2009150416 A2	17-12-2009
DE 4105376 A1	19-09-1991	DD 292549 A5	01-08-1991
		DE 4105376 A1	19-09-1991
EP 1617253 A1	18-01-2006	DE 102004034961 A1	02-02-2006
		EP 1617253 A1	18-01-2006
		GB 2416447 A	25-01-2006
		US 2006011857 A1	19-01-2006
		US 2009046360 A1	19-02-2009
DE 102004034997 A1	02-02-2006	DE 102004034997 A1	02-02-2006
		JP 2006030997 A	02-02-2006
DE 102009060309 A1	22-06-2011	DE 102009060309 A1	22-06-2011
		US 2011149388 A1	23-06-2011