(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
21. November 2013 (21.11.2013)

WIPO | PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2013/170940 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
G02B 21/00 (2006.01) *G02B 26/06* (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2013/001350

(22) Internationales Anmeldedatum:
7. Mai 2013 (07.05.2013)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2012 010 207.0 15. Mai 2012 (15.05.2012) DE

(71) Anmelder: **CARL ZEISS MICROSCOPY GMBH** [DE/DE]; Carl-Zeiss-Promenade 10, 07745 Jena (DE).

(72) Erfinder: **ANHUT, Tiemo**; Von-Hase-Weg 10, 07743 Jena (DE). **KALKBRENNER, Thomas**; An der Leutra 6, 07743 Jena (DE). **NETZ, Ralf**; Ammerbacher Straße 107c, 07745 Jena (DE).

(74) Anwalt: **HAMPE, Holger**; c/o Carl Zeiss AG, Standort Jena, 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, BN, 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, KP, 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, PA, 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, 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:

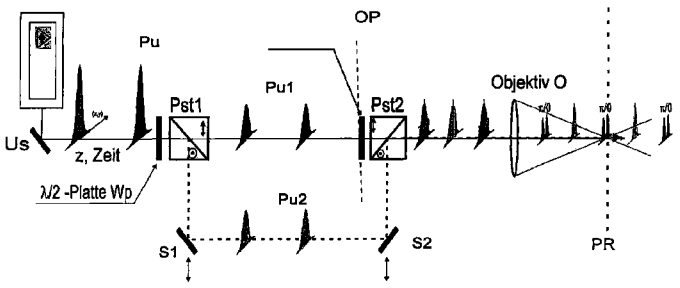
— *mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)*

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) **Title**: MICROSCOPE AND MICROSCOPY METHOD

(54) **Bezeichnung** : MIKROSKOP UND MIKROSKOPIEVERFAHREN

Abb. 4



(57) **Abstract**: The invention relates to a microscope, preferably a laser scanning microscope, comprising at least one illumination beam which, in a partial area along the cross-section thereof, is phase-modulated with a modulation frequency, and comprising a microscope objective for focusing the illumination beam onto a sample, and further comprising a detection beam path and at least one demodulation means, wherein a pulsed illumination beam is present and in the illumination beam path upstream of the microscope objective, a first polarization beam splitter is provided, which generates at least first and second partial beam paths that have differing, preferably adjustable, optical paths. A combination element, preferably a second pole splitter, for rejoining the partial beams is provided. In one partial beam path, a phase element is provided, which has at least two areas having differing phase interferences.

(57) **Zusammenfassung**:

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2013/170940 A1

— *vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eingehen (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe h)*

Mikroskop, vorzugsweise Laser-Scanning-Mikroskop, mit mindestens einem Beleuchtungsstrahl, der in einem Teilbereich entlang seines Querschnitts mit einer Modulationsfrequenz phasenmoduliert wird und einem Mikroskopobjektiv zur Fokussierung des Beleuchtungsstrahls in eine Probe sowie einem Detektionsstrahlengang und mindestens einem Mittel zur Demodulation, wobei ein gepulster Beleuchtungsstrahl vorliegt und im Beleuchtungsstrahlengang vor dem Mikroskopobjektiv ein erster Polarisationsstrahlenteiler vorgesehen ist der mindestens einen ersten und zweiten Teilstrahlengang erzeugt, die, vorzugsweise einstellbar, unterschiedliche Lichtwege aufweisen und ein Vereinigungselement, vorzugsweise ein zweiter Polteiler, zur Wiedervereinigung der Teilstrahlen vorgesehen ist wobei in einem Teilstrahlengang ein Phasenelement vorgesehen ist das mindestens zwei Bereiche mit unterschiedlicher Phasenbeeinflussung aufweist.

Titel: Mikroskop und Mikroskopieverfahren

Stand der Technik:

Literatur / Patente:

[1] Chen *et al.*, Opt. Express **16**, 18764 (2008)

[2] Wong *et al.*, Appl. Opt. **48**, 3237 (2009)

[3] WO2009/008838

[4] A. Leray and J. Mertz, Opt. Express **14**, 10565 (2006)

[5] DE102011013613, DE102010013829

[6] EP500717 B2 Zweiphotonenmikroskopie

[7] Sueda *et al.*, Opt. Express 12, 3548 (2004)

[8] Chong *et al.*, Biomedical Optics Expres Vol.1 No. 3

[9] Israel Rocha-Mendoza, Wolfgang Langbein, Peter Watson, and Paola Borri, "Differential coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy with linearly chirped femtosecond laser pulses," Opt. Lett. **34**, 2258-2260 (2009)

Die zeitliche Fokusmodulationstechnik (FMM) ist eine Methode in der Fluoreszenzmikroskopie die das schnelle Schalten zwischen verschiedenen Fokusfeldern ermöglicht. Dies ist insbesondere dann wichtig, wenn man nur das Licht im Fokus eines Objektivs beeinflussen möchte. Hier wurde bereits in der Literatur eine Methode demonstriert, mit welcher eine dreidimensionale Abbildung von optisch dicken Proben bei gleichzeitiger Diskriminierung von Hintergrundlicht möglich wird [1-4].

Die Grundlage ist hierbei, dass eine Eigenschaft (z.B. die Fluoreszenz), welche im Wesentlichen im Fokus generiert wird, zeitlich derart beeinflusst wird, dass diese Eigenschaft (Fluoreszenz) außerhalb des Fokus nicht moduliert wird.

Bislang beruht diese Methode auf dem schnellen Schalten der optischen Phase in der Pupille eines Objektivs. Gezeigt wurde bislang vor allem, dass man die Phase in zwei Halbpupillen schaltet.

Ähnlich der geschilderten Halbpupillenschaltung kann vorteilhaft auch die Schaltung zwischen den optischen Phasen anderer Teilstrahlen in der Pupille genutzt werden.

Zudem ist es vorteilhaft möglich, nicht nur die Phasen, sondern generell die Feldmodenschaltung zu nutzen, um eine zeitliche Modulation der Emission aus dem

Fokalvolumen zu generieren, wobei die Strahlung außerhalb des Fokalvolumens zeitlich nicht moduliert wird.

Abbildung 1 zeigt das zeitliche Schalten zwischen zwei Fokuszuständen, die eine Modulation der Fluoreszenz lediglich im Fokus bewirken.
Die Abbildung zeigt ein Beispiel für zwei Fokuszustände im Querschnitt zwischen denen geschaltet werden kann. Man erkennt deutlich, dass einer der Zustände eine Nullstelle auf der optischen Achse besitzt. Außerhalb des Fokus verschwindet die Nullstelle.

Neben der reinen Phasenschaltung in der Pupille wird zudem die Schaltung der Polarisation in Kombination mit einer Phasenplatte als eine weitere Möglichkeit vorgeschlagen [5], um die aus dem Fokalvolumen kommende Strahlung zu modulieren.
Abbildung 2 zeigt eine Ausführungsform der genannten Art von Fokusmodulation auf der Basis eines elektro-optischen Polarisationsdrehers und Abbildung 3 mögliche dazugehörige Varianten der Phasenplatte, die zu einer Fokusmodulation führen. Hierzu wird auf die ältere Anmeldung DE102011013613 sowie auf DE102010013829 verwiesen.

Alle infrage kommenden Fokusmodulationstechniken profitieren von Modulationsfrequenzen von mehreren MHz. Damit sind sie grundsätzlich für einen vorteilhaften Einsatz in Laser-Scanning Mikroskopen (LSM) zur Erhöhung der Eindringtiefe ohne Einbußen in der Scangeschwindigkeit geeignet. Eine weitere Erhöhung der Geschwindigkeit ergibt sich durch eine Parallelisierung mittels Multispotmikroskopie. Allerdings ist eine langsamere Modulation immer auch möglich und kann entsprechend eingestellt werden.

Wegen der vorteilhaften hohen Modulationsfrequenzen kommen im Wesentlichen schnell schaltende opto-elektronische Elemente wie zum Beispiel AOMs und EOMs in Frage. Diese Bauelemente sind in der Lage, die Polarisation zeitlich sehr schnell schalten zu können, wodurch polarisationsabhängige Phasenhübe in verschiedenen räumlichen Bereichen, vorzugsweise in einer Objektivpupille, eingeführt werden (Abb. 2).

Es ist also möglich, durch eine Schaltung des Polarisationszustandes eine Umschaltung der Phasen zu erzielen. Mit diesen Lösungen kann eine Eigenschaft geschaltet werden, die sich am Ende im Wesentlichen auf das Feld im Fokus auswirkt und in dessen Resultat das Fokusfeld moduliert wird, während die wesentlichen außerfokalen Anteile nicht signifikant moduliert werden.

Abb. 2 zeigt einen derartigen schnellen optischen Modenschalter, basierend auf einem im Beleuchtungsstrahlengang angeordneten elektrooptischen Modulator EOM und passiven Phasenelementen PP. Das Element PP ist in Wirkverbindung mit dem EOM, der durch entsprechende Ansteuerung eine schnelle Drehung der Polarisationsrichtung des einfallenden Lichtstrahls L, meist eines linear polarisierten Laserstrahls, bewirkt. Nach Durchgang durch PP verläuft der Lichtstrahl, wie auch in den im Weiteren dargestellten Anordnungen, in Richtung des Mikroskops M, über eine nicht dargestellte Scaneinheit zur Probe weiter, wie es auch aus dem Stand der Technik bekannt ist. Durch die halbseitige Phasenänderung durch die Platte PP erfährt der Lichtstrahl die FMM-typische Feldmodulation.

Die in Abb. 3 gezeigten Phasenplatten sind nur beispielhaft. Prinzipiell sind hier verschiedene Geometrien denkbar. Die beispielhaft gezeigten passiven Phasenelemente bestehen hier jeweils aus einer Kombination eines doppelbrechenden Kristalls, dargestellt ist eine Phasenplatte PP in Form einer geteilten λ/2-Platte, und einer bezüglich der Phase polarisationsrichtungsunabhängigen Komponente beispielweise als Glas ausgebildet (Abb. 3). Dabei ist die Phasenplatte so ausgerichtet, dass die schnelle Richtung des Kristalls vorteilhaft parallel bzw. senkrecht oder in einem weiteren optimierten Winkel zur eingestrahlten Laserpolarisation ausgerichtet wird.

In Abb. 3 sind verschiedene Modifikationen der Phasenplatte PP dargestellt, eine halbseitige Teilung in eine λ/2 Hälfte und eine Glashälfte in PP_1, eine Viertelteilung in gegenüberliegende λ/2 Viertel und Glasviertel in PP_2, einen außenliegenden λ/2 Ring und einen inneren Glaskern in PP_3 und umgekehrt einen außenliegenden Glasring und einen innenliegenden λ/2 Kern in PP_4.

Glas ist hier nur beispielhaft aufgeführt. Auch amorphes Quarz (Suprasil) oder andere nicht doppelbrechende Materialien können zum Einsatz kommen.

In Fig 3, PP_1 beispielhaft als Pfeil dargestellt ist die Orientierung der außerordentlichen Achse des jeweiligen λ/2 Teils. Durchtritt ein parallel zu dieser

Pfeilrichtung polarisierter Lichtstrahl dieses Element, wird im λ/2 Teil eine Phasenverschiebung um eine halbe Wellenlänge relativ zum Glasteil erzeugt. Ist dessen Polarisation hingegen senkrecht zur Pfeilrichtung orientiert, wird keine relative Phasenverzögerung erzeugt.

Es ist hinzuzufügen, dass z.B. auch nematische Kristalle, welche aber langsamer reagieren, oder Aufbauten, die über eine Wegaufteilung eine unterschiedliche Polarisation erzeugen und dieser Weg z.B. über einen AOM/AOTF schnell wechselt, zur gewünschten Veränderung der Polarisation verwendet werden können.
Generell kann der Polarisationszustand zeitlich beispielsweise entweder sinusförmig oder rechteckförmig oder in einer anderen vorteilhaften Wellenform variiert werden. Hierdurch wird der Übergang zwischen den räumlichen Feldverteilungen im Fokus des Mikroskops zeitlich verschieden beeinflusst.

Die Vorteile der FMM lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Erhöhung der Eindringtiefe durch Reduzierung des außerfokalem Streulichts
- Optisches Schneiden – Reduzierung des Fluoreszenzvolumens
- Erhöhung der optischen Auflösung

Es ist nun insbesondere anhand der Abbildungen 2 und 3 zu erkennen, dass ein größerer technischer Aufwand zur Umsetzung der Fokusmodulation betrieben werden muss. Das Anliegen der Erfindung ist es daher, einen einfacheren, kostengünstigen Lösungsvorschlag zur Fokusmodulation zu realisieren.

Lösung

Erfindungsgemäß ist nun erkannt worden dass überraschend die intrinsische Laser-Modulationsfrequenz der gepulsten Lichtquelle zur Erzeugung der Fokusmodulation ausgenutzt werden kann und zwar kostengünstig und ohne großen technischen Aufwand.
Verwendet man eine gepulste Beleuchtungsquelle, so bringt vorteilhaft die Lichtquelle die Modulationsfrequenz schon selbst mit und man kann vorteilhaft auf die oben dargestellten schnellen Schalter verzichten.

Der technische Aufwand kann also deutlich verringert werden, wenn man erfindungsgemäss nur passive Elemente zur Phasenmodulation einsetzt.
Ähnliche Verfahren sind zwar bereits für andere optische Zwecke beschrieben worden. In [9] ist beispielsweise eine passive Anordnung für die Modulation in der CARS-Mikrospektroskopie angegeben. Allerdings wird hier nicht die optische Phase moduliert, sondern es wird ein zeitlich variierender zeitlicher Abstand zwischen je zwei Laserpulsen eingeführt, welcher durch Veränderung zu verschiedenen Beiträgen im resultierenden CARS-Signal sorgt.
Es ist jetzt erfindungsgemäß erkannt worden, dass mit passiven Elementen allein eine Modulation der optischen Phase möglich ist, wobei die Modulation im MHz-Bereich liegen kann, wenn der Laser eine entsprechend hohe Repetitionsrate aufweist.

Die Erfindung wird nachstehend anhand der schematischen Zeichnungen näher beschrieben.

Abbildung 4 zeigt eine vorteilhafte Ausführung der Fokusmodulation unter Ausnutzung der intrinsischen Lasermodulationsfrequenz bzw. Repetitionsrate.
In Abb. 4 wird ein gepulster Laser L, hier über einen Umlenkspiegel Us in den optischen Beleuchtungsstrahlengang eines Mikroskops umgelenkt, das hier nur schematisch anhand des Mikroskopobjektives O und der Probenebene PR dargestellt ist.
Im von der Probe kommenden Strahlengang mit Probenlicht sind hier nicht dargestellte Mittel (z.B. Hauptstrahlteiler) in Detektionsrichtung nach dem Objektiv vorgesehen, um das Probenlicht in Richtung einer nicht dargestellten Detektion umzulenken.
Weiterhin nicht dargestellt sind beleuchtungsseitig dem Objektiv vorgeordnete Scanmittel um einen durch O fokussierten Beleuchtungsstrahl, eine Strahlverteilung oder eine Beleuchtungslinie in ein – oder zwei Richtungen über die Probe zu führen, die vom Probenlicht in Richtung der Detektion rückwärts vor der Ausblendung in Richtung der Detektion zur descannten Detektion wieder durchlaufen werden.
Dem Laser L der kurze Pulse Pu aussendet ist eine $\lambda/2$-Platte Wp nachgeordnet. Das Beleuchtungslicht L gelangt auf einen ersten Polarisationsstrahlteiler Pst1 und wird in zwei gepulste Komponenten Pu1 und Pu2 aufgespalten. Die eine

transmittierte Komponente Pu1 gelangt über eine vorzugsweise in der Objektivpupille oder einer zu ihr konjugierten Ebenen angeordnete Phasenplatte PP der Pulskette Pu1 und einen zweiten Polteiler Pst2 in Richtung der Probe über das Objektiv O.
Die zweite Pulskette Pu2 wird an S1 reflektiert und gelangt über Umlenkspiegel S2 und S2 zeitlich verzögert gegenüber Pu1 zum zweiten Polteiler Pst2 und wird an diesem ebenfalls in Richtung der Probe über das Objektiv O umgelenkt.

Abbildung 4 zeigt somit das Prinzip der vorliegenden Erfindung:

1. Die lineare Polarisation der Lichtimpulse aus dem Laser wird mittels λ/2- oder λ/4-Platte so polarisiert, dass der Polarisationsstrahlteiler Pst1 den ankommenden Impulszug in zwei seitens der Energie gleiche Teilstrahlen bzw. zwei Impulszüge aufteilt. Diese beiden Teilstrahlen unterscheiden sich nur in der Polarisation.
2. Einer dieser Impulszüge durchläuft jedoch zusätzlich die Phasenplatte PP in der Pupille (Abb. 3), um ein räumlich moduliertes Beleuchtungsmuster im Objektivfokus (mit Nullstelle auf der Achse) erzeugen zu können.
3. Außerdem werden die beiden Impulszüge zeitlich gegeneinander verschoben, z.B. um die Hälfte der Repetitionszeit, und wenn möglich sollte die halbe Repetitionszeit die Fluoreszenzlebensdauer nicht unterschreiten, d.h. Repetitionsraten < 100 MHz sind empfehlenswert.

Die zeitliche Verzögerung erfolgt durch unterschiedliche Lichtwege in den Teilstrahlengängen, die durch Verschiebung der Spiegel S1, S2 senkrecht zur optischen Achse vorzugsweise auch einstellbar sein kann.
Nach dem Polteiler PST2 erfolgt in zeitlicher Abfolge, wie dargestellt, ein Wechsel zwischen den Impulsen PU2 und den durch PP beeinflussten Pulszügen mit teilweise verzögerter Phasenlage nach dem FMM Prinzip.
Im Objektivfokus (in der Probe) treffen diese Pulszüge im Wechsel auf.
Durch das in Abb. 4 skizzierte Prinzip kommt es zur zeitlichen Modulation des Fluoreszenzsignals im Fokus des Objektivs, die Mod.-Frequenz ist durch die Repetitionsrate des Lasers gegeben. Das zeitlich modulierte Fokus-Signal kann mittels phasensensitiver Lock-In-Technik oder BOX - CAR - Integration der Differenzsignale der beiden Extrempunkte rekonstruiert werden.
Als Phasenplatten PP können die in Abb. 3 beschriebenen Ausführungen Verwendung finden.

Als gepulster Laser kann auch ein CW Laser dienen der durch entsprechende schelle Schaltmittel an- uns ausgeschaltet wird.
Es ist zu ergänzen, dass auf Basis des Aufbaus in Abb. 4 ein ähnlich kostengünstiger Aufbau unter Verwendung von CW-Laserquellen L und zweier AOM 1, 2 geschaffen werden kann. Ein Beispiel zu diesem Prinzip ist in Abb. 5 angegeben: Nach der Strahlteilung durch einen Polarisationsstrahlteiler Pst1 durchläuft das Licht jeweils (transmittiert und reflektiert) einen akusto-optischen Modulator (AOM1 bzw. AOM2) sowie jeweils Strahlanpassungsoptiken Bo1,2 wobei die jeweils vorteilhaft genutzte erste Beugungsordnung in Richtung der Probe PR gelangt und die beiden AOMs das Licht mit einer Frequenz > 10 MHz jeweils an- und ausschalten und so verschaltet sind, dass die Amplituden um □/2 phasenverschoben zueinander sind.
Im Gegensatz zur Literatur [8] dienen hier die AOM zum gepulsten Ein- bzw. Ausschalten des Laserstrahls in den beiden Lichtwegen.
Auf diese Weise entsteht hinter dem Strahlteiler Pst 2 wiederum, zeitlich versetzt, die Pulsabfolge wie in Fig. 4.
Die Amplitudenmodulation in den beiden Lichtwegen kann im zeitlichen Verlauf beispielsweise sinus- oder rechteckförmig gestaltet sein.

Es ist darauf hinzuweisen, dass die in den Abbildungen 4 und 5 dargestellte Methode sowohl in der linearen als auch in der nicht-linearen Mikroskopie funktioniert, d.h. auf Ein-Photon-Prozesse als auch auf Mehr-Photonen-Prozesse (Second Harmonic Generation – SHG, Third Harmonic Generation – THG, Two-Photon-Absorption – TPA [6], Coherent Anti-Stokes-Raman Scattering – CARS) anwendbar ist, wobei die Methode in Abb. 4 (gepulste Laserlichtquelle) im Fall von Mehr-Photonen-Wechselwirkung aufgrund der höheren Peak-Intensität im Objektivfokus einfacher zu verwertbaren Signalen führt.

Mit weiteren Verfahren kann diese Methode vorteilhaft kombiniert werden:

- Punktscannenden Hochauflösungsverfahren: stimulated emission depletion (STED) microscopy, reversible saturable optical (fluorescence) transitions (RESOLFT) microscopy, saturated patterned excitation microscopy (SPEM) und structured illumination microscopy (SIM)
- FLIM – Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy

Patentansprüche

1.

Mikroskop, vorzugsweise Laser-Scanning-Mikroskop mit mindestens einem Beleuchtungsstrahl, der in einem Teilbereich entlang seines Querschnitts mit einer Modulationsfrequenz phasenmoduliert wird und einem Mikroskopobjektiv zur Fokussierung des Beleuchtungsstrahls in eine Probe sowie einem Detektionsstrahlengang und mindestens einem Mittel zur Demodulation,
wobei ein gepulster Beleuchtungsstrahl vorliegt und im Beleuchtungsstrahlengang vor dem Mikroskopobjektiv ein erster Polarisationsstrahlenteiler vorgesehen ist der mindestens einen ersten und zweiten Teilstrahlengang erzeugt ,die, vorzugsweise einstellbar, unterschiedliche Lichtwege aufweisen und ein Vereinigungselement, vorzugsweise ein zweiter Polteiler, zur Wiedervereinigung der Teilstrahlen vorgesehen ist wobei in einem Teilstrahlengang ein Phasenelement vorgesehen ist das mindestens zwei Bereiche mit unterschiedlicher Phasenbeeinflussung aufweist.

2.

Mikroskop nach Anspruch 1, wobei der Beleuchtungsstrahl durch einen gepulsten Laser gebildet ist.

3.

Mikroskop nach Anspruch 1, wobei der Beleuchtungsstrahl durch einen hochfrequent an- und ausgeschalteten CW Laser gebildet ist.

4.

Mikroskop nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Phasenelement eine Phasenplatte ist.

5.

Mikroskop nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Phasenplatte einen Bereich oder Bereiche mit im Wesentlichen nicht beeinflusster Phase und einen Bereich oder Bereiche mit beeinflusster Phase aufweist.

6.
Mikroskop nach Anspruch 5, wobei der Bereich oder die Bereiche mit beeinflusster Phase mindestens eine lambda / halbe Platte ist.

7.
Mikroskop nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei zur Demodulation elektronische Mittel wie eine lock-in Verstärkung vorgesehen sind

oder eine Änderung der Betriebsweise der Detektoren zur Demodulation erfolgt.

8.
Mikroskop nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Phasenplatte in Lichtrichtung vor dem ersten Polteiler zur Polarisationsänderung zur Änderung der Lichtaufteilung zwischen den Teilstrahlen drehbar ausgebildet ist.

9.
Mikroskop nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Phasenplatte ein räumlicher Lichtmodulator (SLM, Spatial Light Modulator) ist.

10.
Mikroskopieverfahren, wobei mindestens ein Beleuchtungsstrahl in einem Teilbereich entlang seines Querschnitts mit einer Modulationsfrequenz phasenmoduliert wird und über Mikroskopobjektiv zur Fokussierung des Beleuchtungsstrahls in eine Probe fokussiert wird
Und über Detektionsstrahlengang und mindestens einem Mittel zur Demodulation eine Detektion erfolgt,
wobei ein gepulster Beleuchtungsstrahl zur Beleuchtung dient und im Beleuchtungsstrahlengang vor dem Mikroskopobjektiv ein erster Polarisationsstrahlenteiler vorgesehen ist der mindestens einen ersten und zweiten Teilstrahlengang erzeugt ,die, vorzugsweise einstellbar, unterschiedliche Lichtwege aufweisen und die über ein Vereinigungselement, vorzugsweise einen zweiter Polteiler, vereinigt werden, wobei in einem Teilstrahlengang ein Phasenelement in mindestens zwei Bereichen die Phase unterschiedlich beeinflusst.

11.
Verfahren nach Anspruch 10, wobei der Beleuchtungsstrahl durch einen gepulsten Laser gebildet ist.

12.
Verfahren nach Anspruch 10, wobei der Beleuchtungsstrahl durch einen hochfrequent an- und ausgeschalteten CW Laser gebildet ist.

13.
Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche,
wobei als Phasenelement eine Phasenplatte eingesetzt wird.

14.
Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Phasenplatte einen Bereich oder Bereiche mit im Wesentlichen nicht beeinflusster Phase und einen Bereich oder Bereiche mit beeinflusster Phase aufweist.
15.
Verfahren nach Anspruch 14, wobei der Bereich oder die Bereiche mit beeinflusster Phase mindestens eine lambda / halbe Platte ist.

16.
Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Demodulation durch elektronische Mittel wie eine lock-in Verstärkung erfolgt
oder eine Änderung der Betriebsweise der Detektoren zur Demodulation erfolgt.

17.
Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Phasenplatte in Lichtrichtung vor dem ersten Polteiler zur Polarisationsänderung zur Änderung der Lichtaufteilung zwischen den Teilstrahlen gedreht wird.

18.
Mikroskop nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Phasenplatte ein räumlicher Lichtmodulator (SLM, Spatial Light Modulator) ist.

19.

Mikroskop mit mindestens einem Beleuchtungsstrahl, der in einem Teilbereich entlang seines Querschnitts mit einer Modulationsfrequenz phasenmoduliert wird und einem Mikroskopobjektiv zur Fokussierung des Beleuchtungsstrahls in eine Probe sowie einem Detektionsstrahlengang und mindestens einem Mittel zur Demodulation, wobei der Beleuchtungsstrahl durch einen kontinuierlich ausstrahlenden CW- Laser gebildet wird

und im Beleuchtungsstrahlengang vor dem Mikroskopobjektiv ein Polarisationsstrahlenteiler vorgesehen ist der einen ersten und zweiten Teilstrahlengang erzeugt und ein Vereinigungselement zur Wiedervereinigung der Teilstrahlen vorgesehen ist wobei in einem Teilstrahlengang ein Phasenelement vorgesehen ist das mindestens zwei Bereiche mit unterschiedlicher Phasenbeeinflussung aufweist

und in beiden Teilstrahlengängen akustooptische Elemente (AOM) zur wechselseitigen An- und Abschaltung der Teilstrahlen vorgesehen sind.

20.

Mikroskopieverfahren wobei mindestens ein Beleuchtungsstrahl in einem Teilbereich entlang seines Querschnitts mit einer Modulationsfrequenz phasenmoduliert wird und über Mikroskopobjektiv zur Fokussierung des Beleuchtungsstrahls in eine Probe fokussiert wird

und über einen Detektionsstrahlengang und mindestens einem Mittel zur Demodulation eine Detektion erfolgt,

wobei der Beleuchtungsstrahl durch einen kontinuierlich ausstrahlenden CW- Laser gebildet wird

und im Beleuchtungsstrahlengang vor dem Mikroskopobjektiv durch einen ein Polarisationsstrahlenteiler ein erster und zweiter Teilstrahlengang erzeugt wird und ein Vereinigungselement eine Wiedervereinigung der Teilstrahlen vornimmt,

wobei in einem Teilstrahlengang ein Phasenelement in mindestens zwei Bereichen die Phase unterschiedlich beeinflusst und in beiden Teilstrahlengängen akustooptische Elemente (AOM) eine wechselseitige An- und Abschaltung der Teilstrahlen erzeugen.

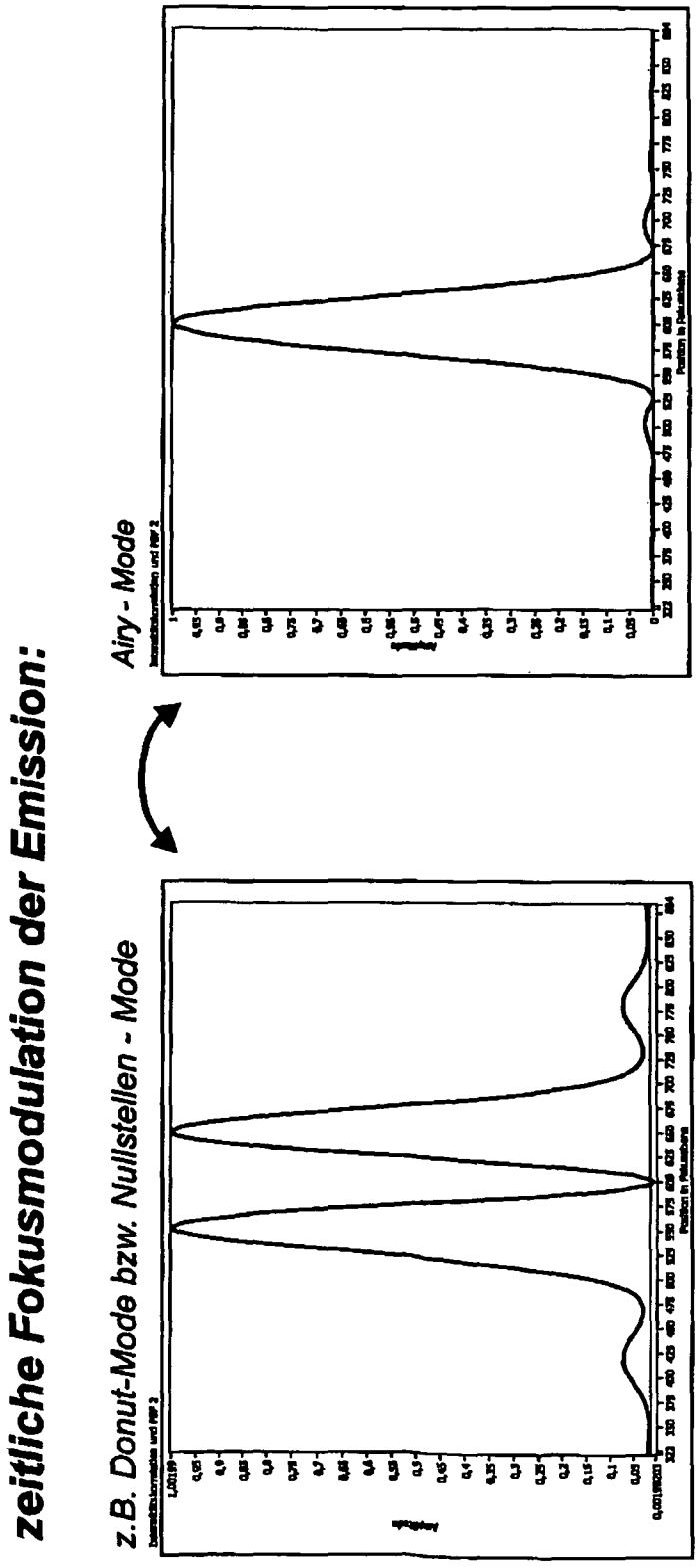

zeitliche Fokusmodulation der Emission:
z.B. Donut-Mode bzw. Nullstellen - Mode
Airy - Mode

Abb. 1

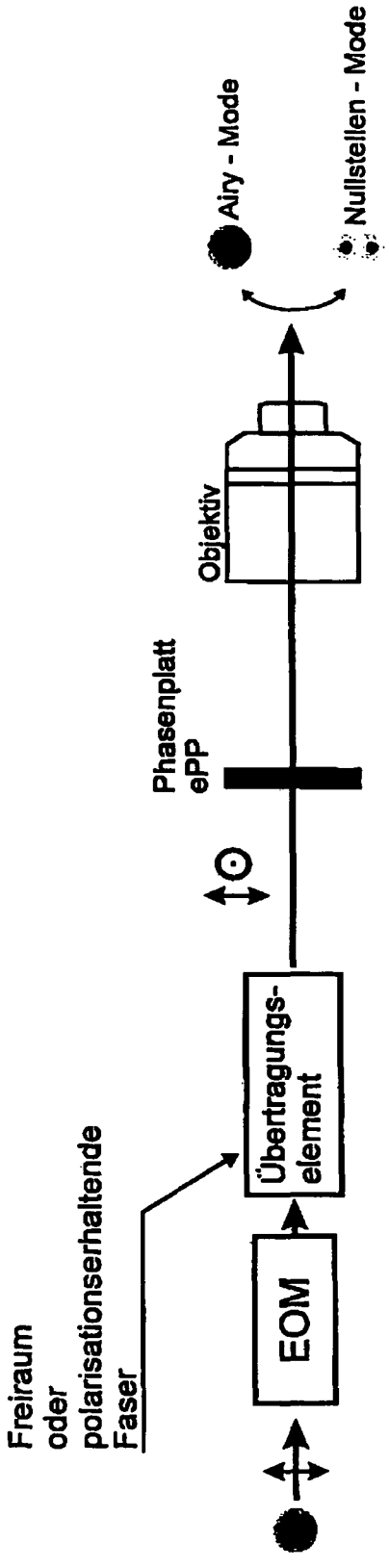

Freiraum
oder
polarisationserhaltende
Faser
EOM
Übertragungs-
element
Phasenplatt
ePP
Objektiv
Airy - Mode
Nullstellen - Mode

Abb. 2

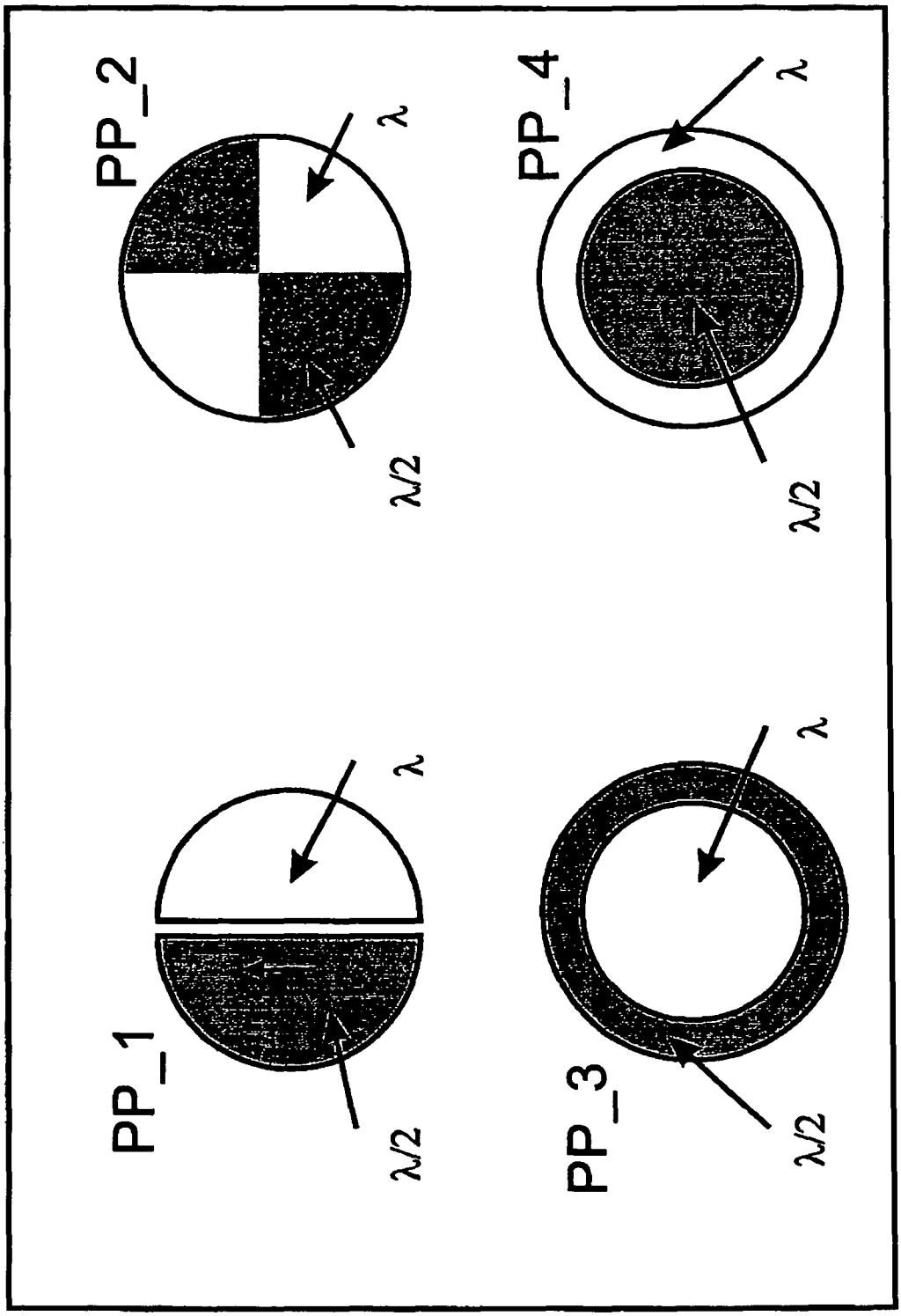


Abb.3

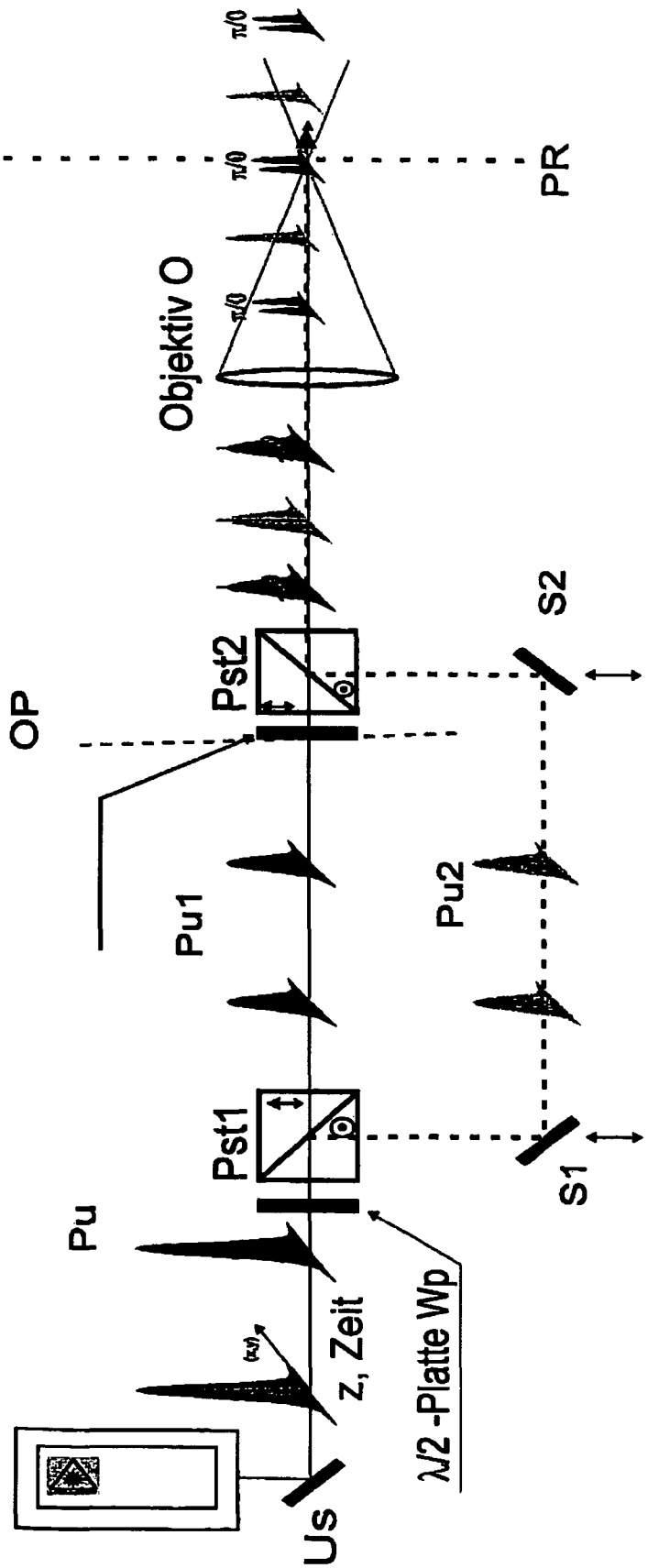

π/0
π/0
π/0
PR
Objektiv O
S2
Pst2
OP
Pu1
Pu2
Pst1
S1
Pu
z, Zeit
λ/2 -Platte Wp
Us

Abb. 4

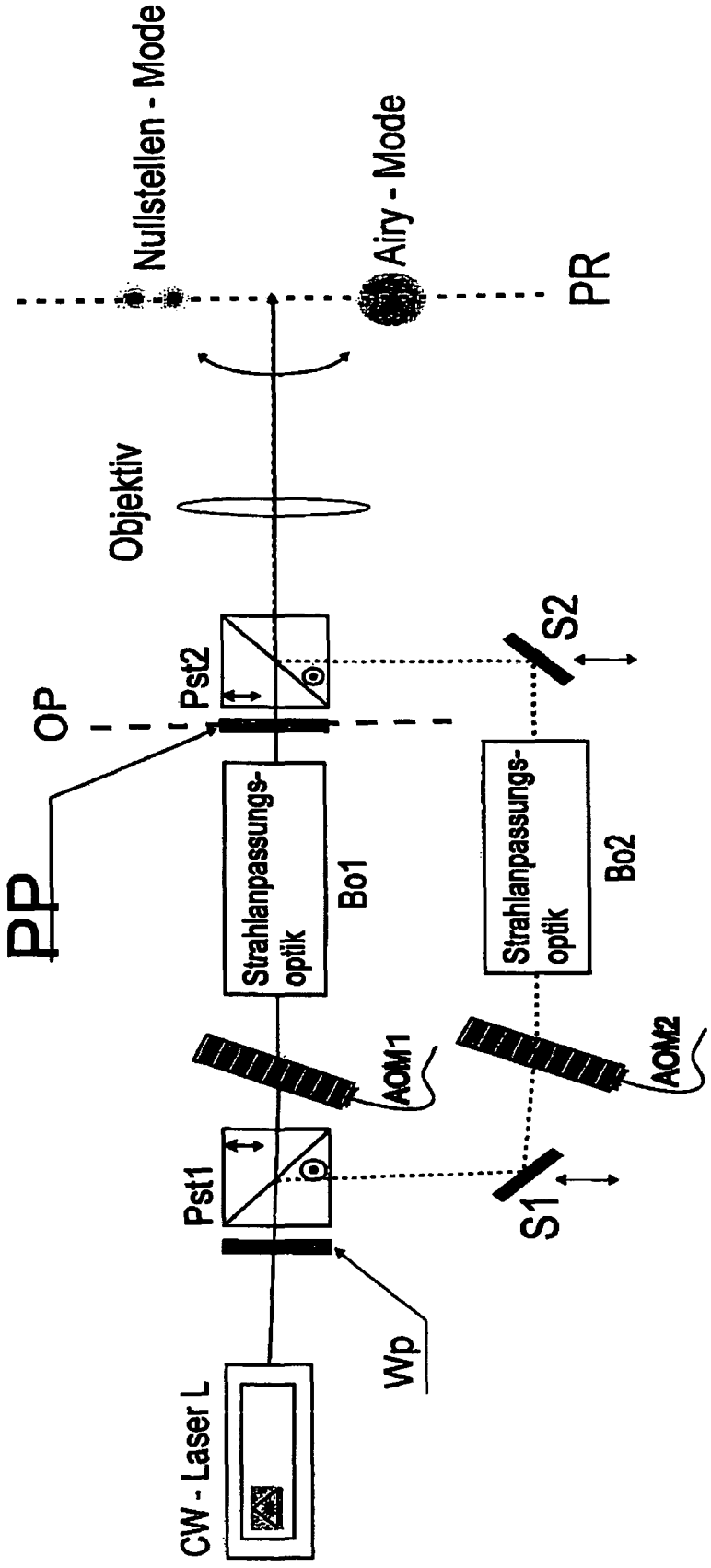

Nullstellen - Mode
Airy - Mode
PR
Objektiv
OP
Pst2
S2
PP
Strahlanpassungs-optik
Bo1
Strahlanpassungs-optik
Bo2
AOM1
AOM2
Pst1
S1
Wp
CW - Laser L

Abb. 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2013/001350

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G02B21/00 G02B26/06
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G02B

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, INSPEC, 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 2011 028208 A (YOKOGAWA ELECTRIC CORP) 10 February 2011 (2011-02-10) paragraph [0020] - paragraph [0024]; figures 2-3 paragraph [0052]	1-20
Y	DE 10 2011 013613 A1 (ZEISS CARL MICROIMAGING GMBH [DE]) 5 April 2012 (2012-04-05) cited in the application paragraph [0012] - paragraph [0047]; figures 1a,1b,1c,2a	1-20
A	WO 2012/041502 A1 (ZEISS CARL MICROIMAGING GMBH [DE]; ANHUT TIEMO [DE]; KALKBRENNER THOMA) 5 April 2012 (2012-04-05) abstract; figure 1	1,10,19, 20

☐ 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	Date of mailing of the international search report
3 September 2013	09/09/2013

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

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2013/001350

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 2011028208 A	10-02-2011	NONE	
DE 102011013613 A1	05-04-2012	DE 102011013613 A1	05-04-2012
		EP 2437096 A2	04-04-2012
		JP 2012078802 A	19-04-2012
		US 2012268812 A1	25-10-2012
WO 2012041502 A1	05-04-2012	DE 102010047353 A1	05-04-2012
		EP 2622401 A1	07-08-2013
		US 2013182306 A1	18-07-2013
		WO 2012041502 A1	05-04-2012

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2013/001350

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. G02B21/00 G02B26/06
ADD.

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
G02B

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

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, INSPEC, 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 2011 028208 A (YOKOGAWA ELECTRIC CORP) 10. Februar 2011 (2011-02-10) Absatz [0020] - Absatz [0024]; Abbildungen 2-3 Absatz [0052]	1-20
Y	DE 10 2011 013613 A1 (ZEISS CARL MICROIMAGING GMBH [DE]) 5. April 2012 (2012-04-05) in der Anmeldung erwähnt Absatz [0012] - Absatz [0047]; Abbildungen 1a,1b,1c,2a	1-20
A	WO 2012/041502 A1 (ZEISS CARL MICROIMAGING GMBH [DE]; ANHUT TIEMO [DE]; KALKBRENNER THOMA) 5. April 2012 (2012-04-05) Zusammenfassung; Abbildung 1	1,10,19, 20

☐ 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	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
3. September 2013	09/09/2013

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

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2013/001350

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
JP 2011028208 A	10-02-2011	KEINE	
DE 102011013613 A1	05-04-2012	DE 102011013613 A1	05-04-2012
		EP 2437096 A2	04-04-2012
		JP 2012078802 A	19-04-2012
		US 2012268812 A1	25-10-2012
WO 2012041502 A1	05-04-2012	DE 102010047353 A1	05-04-2012
		EP 2622401 A1	07-08-2013
		US 2013182306 A1	18-07-2013
		WO 2012041502 A1	05-04-2012