

(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
26. März 2020 (26.03.2020)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2020/058074 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

G02B 21/00 (2006.01) G02B 21/36 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01) G02B 27/58 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2019/074338

(22) Internationales Anmeldedatum:
12. September 2019 (12.09.2019)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2018 215 831.2
18. September 2018 (18.09.2018) DE

(71) Anmelder: FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG
E.V. [DE/DE]; Hansastraße 27c, 80686 München

(DE). FRIEDRICH-SCHILLER-UNIVERSITÄT JE-
NA; Fürstengraben 1, 07743 Jena (DE).

(72) Erfinder: GRÄFE, Markus; c/o Fraunhofer-Institut für
Angewandte Optik und Feinmechanik IOF, Albert-Ein-
stein-Str. 7, 07745 Jena (DE). GILABERTE BASSET,
Marta; c/o Fraunhofer-Institut für Angewandte Optik und
Feinmechanik IOF, Albert-Einstein-Str. 7, 07745 Jena
(DE). EILENBERGER, Falk; c/o Fraunhofer-Institut für
Angewandte Optik und Feinmechanik IOF, Albert-Ein-
stein-Str. 7, 07745 Jena (DE). SETZPFAND, Frank; Rein-
hold-Härzer-Str. 7, 07745 Jena (DE).

(74) Anwalt: PFENNING, MEINIG & PARTNER MBB; An
der Frauenkirche 20, 01067 Dresden (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,

(54) Title: OPTICAL ARRANGEMENT FOR FLUORESCENCE MICROSCOPY APPLICATIONS

(54) Bezeichnung: OPTISCHE ANORDNUNG FÜR FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE ANWENDUNGEN

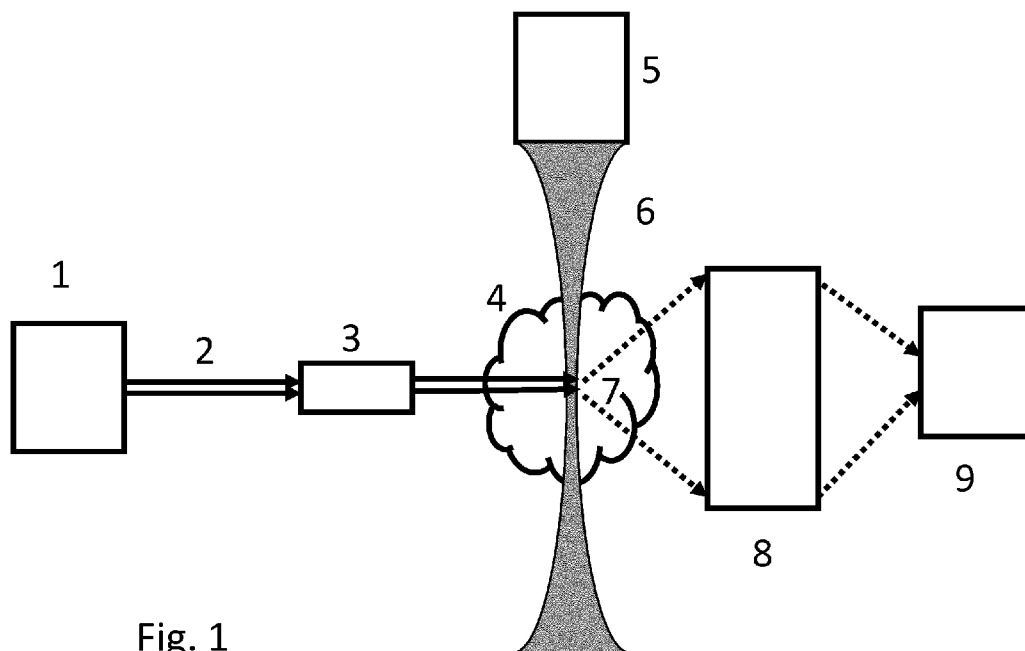


Fig. 1

(57) Abstract: The invention relates to an optical arrangement for fluorescence microscopy applications, in which electromagnetic radiation (6) from a radiation source (5) is directed onto a biological sample (4) in the form of a light layer. One or more fluorophore(s) is contained in the sample (4). The radiation (6) photoactivates the fluorophore(s) by exciting said fluorophore(s) from a state in which they cannot be excited to fluoresce into a state in which they can be excited to fluoresce by illuminating with electromagnetic radiation of a particular wavelength, and subsequently photodeactivating them. One or more multiphoton beams (2) from a source of nonclassical light (1) is directed onto a first optical system (3) and, from there, said beam(s) is intended to be directed onto a sample (4) in the region of the light layer, such that fluorescent radiation from the one fluorophore or the fluorophores, in a state in which the fluorophores can

BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

be excited to fluorescence, can be excited within the light layer by the plurality of multiphoton states occurring simultaneously on/in the sample (4). The fluorescence radiation (7) obtained occurs by means of a second optical system (8) on a detection system (9) which measures in a spatially resolving manner.

(57) Zusammenfassung: Bei der optischen Anordnung für fluoreszenzmikroskopische Anwendungen ist von einer Strahlungsquelle (5) elektromagnetische Strahlung (6) auf eine biologische Probe (4) in Form eines Lichtblatts gerichtet. In der Probe (4) ist ein oder mehrere Fluorophor(e) enthalten. Die Strahlung (6) photoaktiviert das/die Fluorophor(e), in dem diese von einem nicht zur Fluoreszenz anregbaren Zustand in einen zur Fluoreszenz anregbaren Zustand durch Beleuchtung mit elektromagnetischer Strahlung einer bestimmten Wellenlänge und anschließend photodeaktiviert werden. Von einer Quelle nichtklassischen Lichtes (1) wird ein oder mehrere Multiphotonenstrahlen (2) auf ein erstes optisches System (3) gerichtet und diese(n) von dort auf eine Probe (4) im Bereich des Lichtblatts zu richten, so dass mit den mehreren gleichzeitig auf/in der Probe (4) auftreffenden Mehrphotonenzuständen Fluoreszenzstrahlung des einen Fluorophors oder der Fluorophore im zur Fluoreszenz anregbaren Zustand innerhalb des Lichtblatts angeregt wird. Erhaltene Fluoreszenzstrahlung (7) trifft mittels eines zweiten optischen Systems (8) auf ein ortsauflösend messendes Detektionssystem (9) auf.

OPTISCHE ANORDNUNG FÜR FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE
ANWENDUNGEN

5 Die Erfindung betrifft eine Optische Anordnung für fluoreszenzmikroskopische
Anwendungen mittels nichtklassischem Licht. Das Anwendungsgebiet liegt im
Bereich der Fluoreszenzmikroskopie und Multiphotonenabsorptionsanalyse.
Dies ist zum Beispiel für die mikroskopische Untersuchung von bio-
chemischen Proben in den Lebenswissenschaften und der Medizin von großer
Bedeutung, aber auch für chemisch-materialanalytische Untersuchungen von
10 Stoffen.

Dabei erfolgt die Anregung und Detektion von Fluoreszenzlicht mittels Multi-,
insbesondere Zweiphotonenabsorption von Multiphotonen-Zuständen bzw.
Photonenpaaren für Anwendungen, die analog zur Fluoreszenzmikroskopie
15 durchgeführt werden können.

Es existieren bereits verschiedene Lösungsansätze, die aber alle mit prinzipiellen Nachteilen behaftet sind. Diese bereits bekannten Lösungen lassen sich prinzipiell in drei Kategorien einteilen:

- 5 a. Zweiphotonenfluoreszenzmikroskopie mit klassischem Licht, wie sie in US 5,503,613 B und US 6,020,591 B offenbart sind. Dabei wird die Zweiphotonenabsorption mittels Dauerstrichlaser mit sehr hoher Intensität oder mit gepulsten Lasern mit Pulsen im Pico- oder Femtosekundenbereich realisiert. Die Zweiphotonenabsorptionswahrscheinlichkeit und somit auch die Fluoreszenzintensität hängen dabei quadratisch von der momentanen Anregungsintensität ab. Die anregende Laserstrahlung wird zur Verbesserung der Absorptionswahrscheinlichkeit fokussiert. In der klassischen Zweiphotonenfluoreszenzmikroskopie wird der Fokus axial entlang der optischen Achse des Systems ausgebildet. Nur im Fokus können Fluoreszenzmoleküle per Zweiphotonenabsorption angeregt werden und somit Fluoreszenz zeigen. Es wird jedoch der gesamte Probenbereich entlang der optischen Achse mit einer hohen Strahlungs-dosis und entsprechend hoher Energie beaufschlagt. Dies führt sowohl zum Ausbleichen der Fluoreszenz, als auch zu Phototoxizität, besonders bei biologischen Proben.
- 10 b. Eine alternative Lösung ist der Zweiphotonen-Lichtblattmodus. Hierbei ist der Fokus der Anregungsstrahlung als Ebene – Lichtblatt genannt – senkrecht zur Beobachtungsrichtung ausgebildet. Dazu wird durch ein geeignetes optisches System die zu untersuchende Probe lateral durchleuchtet. Das Lichtblatt kann durch einen Linienfokus, eine Linienabbildung oder einen lateral scannenden Laserstrahl gebildet werden. Nur in diesem Lichtblatt können Fluoreszenzmoleküle per Zweiphotonenabsorption angeregt werden und somit Fluoreszenz zeigen. Nachteil der Methode ist die Notwendigkeit der Beleuchtung mit sehr intensitätsstarken Dauerstrichlasern oder Lasersystemen für ultrakurze Laserpulse. In beiden Fällen wird die Probe mit Laserstrahlung hoher Intensität oder gar von Laserpulsen durchstrahlt und einer hohen Bestrahlungsdosis mit hoher Energie ausgesetzt. Dies führt sowohl zum Ausbleichen der Fluoreszenz, als auch zu Phototoxizität, besonders bei biologischen Proben. Auch hier hängt die Zweiphotonenabsorptionswahrscheinlichkeit und somit auch die Fluoreszenzintensität quadratisch von der momentanen Anre-
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35

gungsintensität ab.

c. Möglichkeiten zur Photonenpaarfluoreszenzmikroskopie sind auch aus US 5,796,477 B bekannt. Dabei wird die Zweiphotonenabsorption nicht durch intensitätsstarke oder gepulste Laser angeregt, sondern durch Photonenpaare aus zwei korrelierten (in Raum, Zeit, Impuls und/oder Energie) Photonen. Diese können insbesondere durch spontane Differenzfrequenzkonvertierung in einem nichtlinearen Kristall außerhalb der Probe generiert werden. Die beiden Photonen können bei ihrer Bewegung von der Photonenpaarquelle zur jeweiligen Probe voneinander räumlich getrennt werden. Haben sie eine unterschiedliche Wellenlänge kann dies mit einem dichroitischen Spiegel erreicht werden. Weisen sie entgegengesetzte Polarisierung auf, können sie durch einen Polarisationsstrahlteiler räumlich getrennt werden. Es ist aber ebenso möglich, dass beide Photonen einen Kristall mit nichtlinearen optischen Eigenschaften räumlich separiert verlassen und damit bereits räumlich getrennt sind. Anschließend werden die beiden Photonenstrahlen überkreuzend in die Probe fokussiert. Im Überlappbereich der im Fokus aufeinander treffenden Photonen kann dann die Zweiphotonenabsorption stattfinden. In diesem Szenario sind die Zweiphotonenabsorption und damit die Fluoreszenzintensität linear proportional zur momentanen Anregungsintensität. Ein weiterer Vorteil ist, dass das fokale Volumen gegenüber dem in a. beschriebenen Verfahren kleiner sein kann. Nachteilig an diesem Verfahren ist der komplexe experimentelle Aufbau, da sichergestellt sein muss, dass beide Photonen eines Paares exakt zur gleichen Zeit im Strahlüberlappvolumen ankommen und innerhalb der Probe aufeinandertreffen. Dies kann durch die sehr kurze Kohärenzzeit und möglicherweise unterschiedlicher aber korrelierter Wellenlänge der beiden Photonen erschwert sein. Daher ist eine sehr genaue Justage, die zu Lasten der Flexibilität und Praktikabilität geht, erforderlich.

Es ist daher Aufgabe der Erfindung, Möglichkeiten für die Fluoreszenzmikroskopie anzugeben, mit denen der lokale Energieeintrag bei der Fluoreszenzanregung reduziert werden kann und bei denen ein einfacher optischer Aufbau mit reduziertem Justageaufwand einsetzbar ist.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe mit einer optischen Anordnung, die die Merkmale des Anspruchs 1 aufweist, gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen und

Weiterbildungen der Erfindung können mit in untergeordneten Ansprüchen bezeichneten Merkmalen realisiert werden.

Bei der erfindungsgemäßen Anordnung ist von einer Strahlungsquelle elektromagnetische Strahlung auf eine biologische Probe zur Ausbildung eines ein- oder zweidimensionalen Lichtblatts gerichtet. In der Probe ist mindestens ein Fluorophor enthalten. Dabei ist die elektromagnetische Strahlung mit mindestens zwei Wellenlängen so ausgewählt, dass sie das/die Fluorophor(e) photoaktiviert oder photodeaktiviert, abhängig von der Wellenlänge der elektromagnetischen Strahlung. Bei einer Photoaktivierung wird/werden das/die Fluorophor(e) von einem nicht zur Fluoreszenz anregbaren Zustand (dark state) in einen zur Fluoreszenz anregbaren Zustand (bright state) durch Beleuchtung mit elektromagnetischer Strahlung einer bestimmten Wellenlänge und anschließend photodeaktiviert, in dem das/die Fluorophor(e) von einem zur Fluoreszenz anregbaren Zustand (bright state) in einen nicht zur Fluoreszenz anregbaren Zustand (dark state) durch Beleuchtung mit elektromagnetischer Strahlung einer anderen bestimmten Wellenlänge innerhalb des Lichtblatts gebracht.

Von einer Quelle nichtklassischen Lichtes ist/sind ein oder mehrere Multiphotonenstrahl(en), aber mindestens ein oder zwei Photonenpaarstrahl(en), auf ein erstes optisches System bestehend aus einer Anordnung aus mindestens einer optischen Linse oder einem Photonen reflektierenden Element oder einem polarisierenden optischen Element, oder einem optischen Filter oder einer Kombination dieser gerichtet. Vom ersten optischen System ist/sind der/die Multiphotonenstrahl(en) auf eine Probe im Bereich des Lichtblatts gerichtet, so dass mit den mehreren gleichzeitig auf/in der Probe auftreffenden Mehrphotonenzuständen Fluoreszenzstrahlung des Fluorophors oder der Fluorophore mittels Mehrphotonenabsorption angeregt wird.

Fluoreszenz wird also erst dann angeregt, wenn fluoreszenzaktivierende elektromagnetische Strahlung und ein Multiphotonenstrahl gleichzeitig auf eine Position einer Probe auftreffen.

Durch Anregung erhaltene Fluoreszenzstrahlung trifft mittels eines zweiten

optischen Systems auf ein Detektionssystem auf, das zur orts aufgelösten Erfassung von Fluoreszenzstrahlung ausgebildet ist.

Das hier vorgeschlagene Verfahren beruht auf der Nutzung einer vorzugsweise kollinearen Quelle von der insbesondere Photonenpaare oder aber auch Mehrphotonenzustände gleichzeitig auf eine Probe emittiert werden und dabei das Prinzip der Lichtblattmikroskopie anwendbar ist sowie einer zusätzlichen Ausbildung eines Lichtblatts mit elektromagnetischer Strahlung im Bereich der Probe. Dabei kann ein Lichtblatt eindimensional als Linie oder auch zweidimensional als eine bestrahlte Fläche ausgebildet werden. Hierbei verhindert die Photoaktivierung und –deaktivierung der Fluorophore, dass Fluoreszenz außerhalb des Lichtblattbereiches der Multiphotonenstrahlen angeregt wird.

Eine Quelle nicht klassischen Lichts emittiert Multiphotonenstrahlen, aber mindestens ein oder zwei Photonenpaarstrahlen von insbesondere Photonenpaaren oder aber auch Mehrphotonenzuständen, bevorzugt in kollinearer Geometrie in den Bereich des ausgebildeten Lichtblatts. Dies kann durch spontane Differenzfrequenzkonvertierung/spontane parametrische Fluoreszenz in einem nichtlinearen, auch periodisch gepolten optischen Kristall oder einer Wellenleiterstruktur in einem nichtlinearen Kristall geschehen. Der/die Multiphotonenstrahl(en) gelangt/gelangen durch ein erstes optisches System auf eine Probe, so dass Fluoreszenz der Fluorophore angeregt werden kann, die mit dem Detektionssystem orts ausgelöst erfasst und dann ausgewertet werden kann.

Das Lichtblatt oder die lichtblattartige Form kann dabei als zeitlich konstanter Linienfokus aber auch als in der Lichtblattebene gescannter Lichtstrahl ausgebildet sein oder durch die zeitliche Abfolge kleiner Teillichtblätter zusammensetzen. Ein dazu geeignetes erstes optisches System kann eine optische Linse oder ein die elektromagnetische Strahlung reflektierendes optisches Element sein. Die Ausbildung eines Lichtblatts kann beispielsweise durch eine Bewegung mindestens eines optischen Elements oder eines optischen Elements, das die Strahlquerschnittsfläche der elektromagnetischen Strahlung vergrößert

Bert, auf das die von der Strahlungsquelle emittierte elektromagnetische Strahlung gerichtet ist, erfolgen.

5 Von der Strahlungsquelle sollte Strahlung mit einer Wellenlänge, die für das jeweils eingesetzte Fluorophor zur Photoaktivierung und –deaktivierung spezifisch ist, emittiert werden. Die Strahlungsquelle kann insbesondere eine oder mehrere Laserstrahlquellen sein. Außerdem kann die lichtblattformende Quelle auch eine optische Linse oder eine Photonen reflektierendes Element oder eine Polarisationsoptik oder ein optischer Filter oder eine beliebige An-

10 ordnung mehrerer dieser optischen Elemente enthalten.

Als Fluorophor kann man beispielsweise autofluoreszierende Moleküle oder molekulare Fluoreszenzmarker, wie z.B. Green Fluorescence Protein (GFP) oder DAPI einsetzen.

15 Ein erstes optisches System kann eine optische Linse oder eine Photonen reflektierendes Element oder eine Polarisationsoptik oder ein optischer Filter oder eine beliebige Anordnung mehrerer dieser optischen Elemente sein.

20 Nur im vom Lichtblatt oder der lichtblattartigen Form durchleuchteten Bereich der Probe mit der photoaktivierenden Wellenlänge ist eine gleichzeitige Absorption mehrerer Photonen, insbesondere von Photonenpaaren und damit Fluoreszenzanregung möglich. Ein Teil der Fluoreszenzstrahlung wird unter optionaler Verwendung eines zweiten optischen Systems auf ein Detektionssystem treffen und dort detektiert werden. Das zweite optische System

25 kann eine optische Linse oder ein Fluoreszenzstrahlung reflektierendes Element oder eine Polarisationsoptik oder ein optischer Filter oder eine beliebige Anordnung mehrerer dieser optischen Elemente sein. Ein Detektorsystem sollte eine orts aufgelöste Messung der Fluoreszenzstrahlung, die innerhalb des Lichtblatts angeregt worden ist, ermöglichen. Das Detektorsystem kann

30 eine Kamera mit genügender Empfindlichkeit sein. Beispiele dafür sind eine CCD, EMCCD, ICCD, CMOS-Kamera, SPAD-Array. Es kann ein optischer Filter oder ein zweites optisches System enthalten. Das zweite optische System sowie das Detektionssystem können auch als Einheit ausgeführt sein.

35 Bei einer weiteren erfindungsgemäßen Variante können auch mehrere Photonenstrahlen genutzt werden, so dass in mehreren Lichtblättern oder in Be-

reichen mit lichtblattartiger Form an der Probe gleichzeitig Fluoreszenz angeregt werden kann. Die Anregung der Fluoreszenz kann explizit auch über Multiphotonenabsorption von Mehrphotonenzuständen, insbesondere von Photonenpaaren, die gleichzeitig auf eine Probe auftreffen, geschehen. Derartige Multiphotonenzustände können z.B. durch sogenannte N00N states realisiert werden, wobei dann eine N-Photonenabsorption stattfindet.

Eine Quelle nichtklassischen Lichtes kann beispielsweise ein von einem Laser gepumpter nichtlinearer Kristall oder ein von einem Laser gepumpter nichtlinearer Kristall oder Wellenleiterstruktur in einem nichtlinearen Kristall, oder mindestens zwei identische kohärent gepumpte Quantenpunkte sein.

Eine abgewandelte Variante besteht darin, dass der Photonenpaarstrahl in zwei Teilstrahlen aufgespalten wird, was z.B. durch einen dichroitischen Spiegel oder einen Polarisationsstrahlteiler erreicht werden kann. Die Teilstrahlen werden getrennt und dann durch jeweils ein erstes optisches System, das insbesondere als eine Anordnung aus Linsen und oder Spiegeln ist, sich kreuzend in/auf die Probe gerichtet. Außerdem können auch mehrere Photonenpaarstrahlen genutzt werden, so dass an mehreren Positionen gleichzeitig Fluoreszenz angeregt werden kann. Es ist auch möglich, diese Photonenpaarstrahlen zu kombinieren, um einen einzigen Photonenpaarstrahl zu erhalten und punktweise Fluoreszenz anzuregen. Bei einer weiteren Ausbildungsform kann im Gegensatz zur punktwisen Bildgebung, wie sie bisher beschrieben worden ist, ein zweidimensionaler Bereich, in dem an jedem Punkt Photonenpaare entstehen können, auf die Probe im vom Lichtblatt oder einem lichtblattartigen Bereich durchleuchteten Bereich abzubilden und somit in diesem Bereich Zweiphotonenabsorption und damit Fluoreszenz zu generieren. Dies kann z.B. durch die Abbildung der Oberfläche eines nichtlinearen Kristalls, in welchem die Photonenpaare erzeugt werden, auf die Probe geschehen.

Die erfindungsgemäße Lösung hat gegenüber dem Stand der Technik für Fluoreszenzmikroskopie mittels Multiphotonenabsorption einige Vorteile. Da die Fluoreszenzintensität linear mit der momentanen Beleuchtungsintensität skaliert, kann die Bestrahlungsdosis der Probe bei gleichbleibender Signalausbeute reduziert werden oder Signalstärke und Bildkontrast der mit dem Detektionssystem erfassten Fluoreszenzstrahlung bei gleichbleibender Bestrahlungsdosis gesteigert werden. Das Verfahren ist damit maximal schonend, ohne

unnötige Lichtbelastung der Probe und erlaubt somit Langzeitstudien von photosensitiven Proben, da sowohl Fluoreszenzbleaching als auch Phototoxizität minimiert werden können. Im Gegensatz zur Photonenpaarfluoreszenzmikroskopie ist der Aufbau deutlich vereinfacht und robuster gestaltet, so dass eine Kostenreduktion und Verbesserung der axialen Auflösung erreicht werden kann. Der kollineare Aufbau ist kompatibel und mit bestehenden Lichtblatt- und Fluoreszenz-Mikroskopsystemen implementierbar. Außerdem kann Photonenpaarstrahlung mit Photonen einer bestimmten Mittenwellenlänge zu fokalen Volumina fokussiert werden, welche sonst nur mit Laserlicht der halben Wellenlänge erreichbar sind. Damit kann die Auflösung der erfassbaren Fluoreszenzstrahlung innerhalb des jeweiligen Lichtblatts, in dem die Photoaktivierung erfolgt, erhöht werden. Insgesamt sind eine erhöhte Effizienz, erhöhte Ortsauflösung und erhöhte Eindringtiefe möglich. Ebenso ist der lineare Zusammenhang zwischen Fluoreszenzintensität und Photonenstrahlintensität von Vorteil für die Datenauswertung, da ein linearer Zusammenhang zwischen Messgröße (Fluoreszenzsignal) und Anregungsgröße (Strahlungsdosis) vorliegt.

Nachfolgend soll die Erfindung anhand eines Beispiels näher erläutert werden.

Dabei zeigt:

Figur 1 in schematischer Form ein Beispiel einer erfindungsgemäßen Anordnung.

In Figur 1 ist gezeigt, wie ein Photonenpaarstrahl 2 von einer kollinearen Quelle 1 nicht klassischen Lichts auf ein erstes optisches System 3 gerichtet ist. Das erste optische System 3 kann, wie in den Ansprüchen definiert ausgebildet sein.

Der mit dem ersten optischen System 3 beeinflusste Photonenpaarstrahl 2 wird so auf/in die Probe 4 gerichtet, dass er im Bereich eines Lichtblatts auf die Probe 4 auftrifft oder in die Probe 4 eintritt. Die Ausbildung eines Lichtblatts erfolgt mittels einer Strahlungsquelle 5, von der elektromagnetische Strahlung 6 auf die Probe 4 gerichtet ist. Die biologische Probe ist eine Fluoreszenzprobe, die mindestens ein Fluorophor enthält. Die elektromagnetische

Strahlung 6 weist eine Wellenlänge zur Photoktivierung des Fluorophors oder der Fluorophore auf und kann nach der Fluoreszenzaufnahme eine zweite Wellenlänge aussenden, um die Fluoreszenz zu photodeaktivieren. Eine Fluoreszenzanregung des Fluorophors tritt auf, wenn mehrere Photonen von Quelle 1 gleichzeitig auf die Probe 4 auftreffen bzw. in die Probe 4 eindringen. Allein mit der Ausbildung eines Lichtblatts werden die Fluorophore innerhalb des Lichtblatts photoaktiviert bzw. nach Fluoreszenzbildaufnahme photodeaktiviert.

Die Veränderung der Position an der Photonen die Probe 4 erreichen, kann durch eine Bewegung eines die Photonen reflektierenden Elements, insbesondere mittels einer Schwenkbewegung um eine Rotationsachse eines reflektierenden Elements erreicht werden.

Mit auf die Probe 4 auftreffenden oder in die Probe 4 eintretenden Photonenpaaren wird eine Anregung von Fluoreszenzstrahlung 7 innerhalb des Lichtblatts erreicht.

Die generierte Fluoreszenzstrahlung 7 trifft auf ein zweites optisches System 8 auf, das ebenfalls so ausgebildet ist, wie in den Ansprüchen definiert. Mit dem Detektorsystem 9 erfolgt eine orts aufgelöste Erfassung von Fluoreszenzstrahlung, die fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet werden kann.

Patentansprüche

5

1. Optische Anordnung für fluoreszenzmikroskopische Anwendungen, bei der von einer Strahlungsquelle (5) elektromagnetische Strahlung (6) auf eine biologische Probe (4) in Form eines Lichtblatts gerichtet ist und in der Probe (4) ein oder mehrere Fluorophor(e) enthalten ist/sind, wobei die elektromagnetische Strahlung (6) das/die Fluorophor(e) photoaktiviert, in dem diese von einem nicht zur Fluoreszenz anregbaren Zustand in einen zur Fluoreszenz anregbaren Zustand durch Beleuchtung mit elektromagnetischer Strahlung einer bestimmten Wellenlänge und anschließend photodeaktiviert werden von einem zur Fluoreszenz anregbaren Zustand in einen nicht zur Fluoreszenz anregbaren Zustand durch Beleuchtung mit elektromagnetischer Strahlung einer anderen bestimmten Wellenlänge gebracht werden und

10

15

20

25

von einer Quelle nichtklassischen Lichtes (1) ein oder mehrere Multiphotonenstrahlen, aber mindestens ein oder zwei Photonenpaarstrahlen (2), auf ein erstes optisches System (3) bestehend aus einer Anordnung aus mindestens einer optischen Linse oder einem Photonen reflektierenden Element oder einem polarisierenden optischen Element, oder einem optischen Filter oder einer Kombination dieser gerichtet ist und

30

von dort auf eine Probe (4) im Bereich des Lichtblatts zu richten, so dass mit den mehreren gleichzeitig auf/in der Probe (4) auftreffenden Mehrphotonenzuständen Fluoreszenzstrahlung des einen Fluorophors oder der Fluorophore im zur Fluoreszenz anregbaren Zustand mittels Mehrphotonenabsorption innerhalb des Lichtblatts angeregt wird und

35

durch Anregung erhaltene Fluoreszenzstrahlung (7) mittels eines zweiten optischen Systems (8) auf ein Detektionssystem (9) auftrifft, das

zur orts aufgelösten Erfassung von Fluoreszenzstrahlung ausgebildet ist.

2. Anordnung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Quelle nichtklassischen Lichtes (1) ein von einem Laser gepumpter nichtlinearer Kristall oder Wellenleiterstruktur in einem nichtlinearen Kristall, oder mindestens zwei identische kohärent gepumpte Quantenpunkte sind.
3. Anordnung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass ein oder mehrere Multiphotonenstrahlen, aber mindestens ein oder mehrere Photonenpaarstrahlen (2) bevorzugt in kollinear Geometrie, auf das erste optische System (3) gerichtet sind.
4. Anordnung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mit zwei Photonen in Form eines Photonenpaares Fluoreszenzstrahlung anregbar ist.
5. Anordnung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Strahlungsquelle (5) mindestens zwei verschiedener Wellenlängen, mindestens eine zur Photoaktivierung und mindestens eine zur Photodeaktivierung, des jeweiligen Fluorophors oder der jeweiligen Fluorophore emittiert.
6. Anordnung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Strahlungsquelle (5) ein optisches System bestehend aus einer Anordnung aus mindestens einer optischen Linse oder einem Photonen reflektierenden Element oder einem polarisierenden optischen Element, oder einem optischen Filter oder einer Kombination dieser besteht.
7. Anordnung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Ausbildung eines Lichtblatts durch eine Bewegung mindestens eines optischen Elements oder eines optischen Elements, das die Strahlquerschnittsfläche der elektromagnetischen Strahlung (6) vergrößert, auf das die von der Strahlungsquelle (5) emittierte elektromagnetische Strahlung (6) gerichtet ist, erfolgt.

- 5 8. Anordnung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mit dem ersten optischen System (3) die Position des Auftreffens des mindestens einen Multiphotonenstrahls auf/in die Probe (4) linienförmig zu verändern, so dass ein entsprechender linienförmiger Bereich mindestens einer Linie mindestens einmal bestrahlt wird.
- 10 9. Anordnung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass ein von der Quelle (1) emittierter Multiphotonenstrahl (2) in mehrere Teilstrahlen aufgeteilt und die Teilstrahlen zur Anregung von Fluoreszenz im Bereich des Lichtblatts mittels mindestens eines ersten optischen Systems (3) auf/in die Probe (4) gerichtet sind.
- 15 10. Anordnung nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass mehrere Teilstrahlen sich auf/in der Probe (4) kreuzend auf die Probe (4) gerichtet sind.
- 20 11. Anordnung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mit mehreren Photonenpaarstrahlen an mehreren Positionen gleichzeitig Fluoreszenz anregbar oder mit mehreren miteinander kombinierten Photonenpaarstrahlen einen einzigen Photonenpaarstrahl zu erhalten und damit punktweise Fluoreszenz anregbar ist.
12. Anordnung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zur orts aufgelösten Abbildung der Probe (4) eine ein- oder zwei- oder dreidimensionale Bewegung der Probe (4) erfolgt.
- 25 13. Anordnung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass ein erstes optisches System (3) und/oder ein zweites optisches System (8) mit einem nichtlinearen optischen Kristall, einer optischen Linse, einem Photonen reflektierenden Element, einer Polarisationsoptik, einem optischen Filter oder eine Anordnung mehrerer dieser optischen Elemente ist.

14. Anordnung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Detektorsystem (9) eine CCD-, eine EMCCD-, eine ICCD- oder eine CMOS-Kamera oder ein SPAD-Array ist.

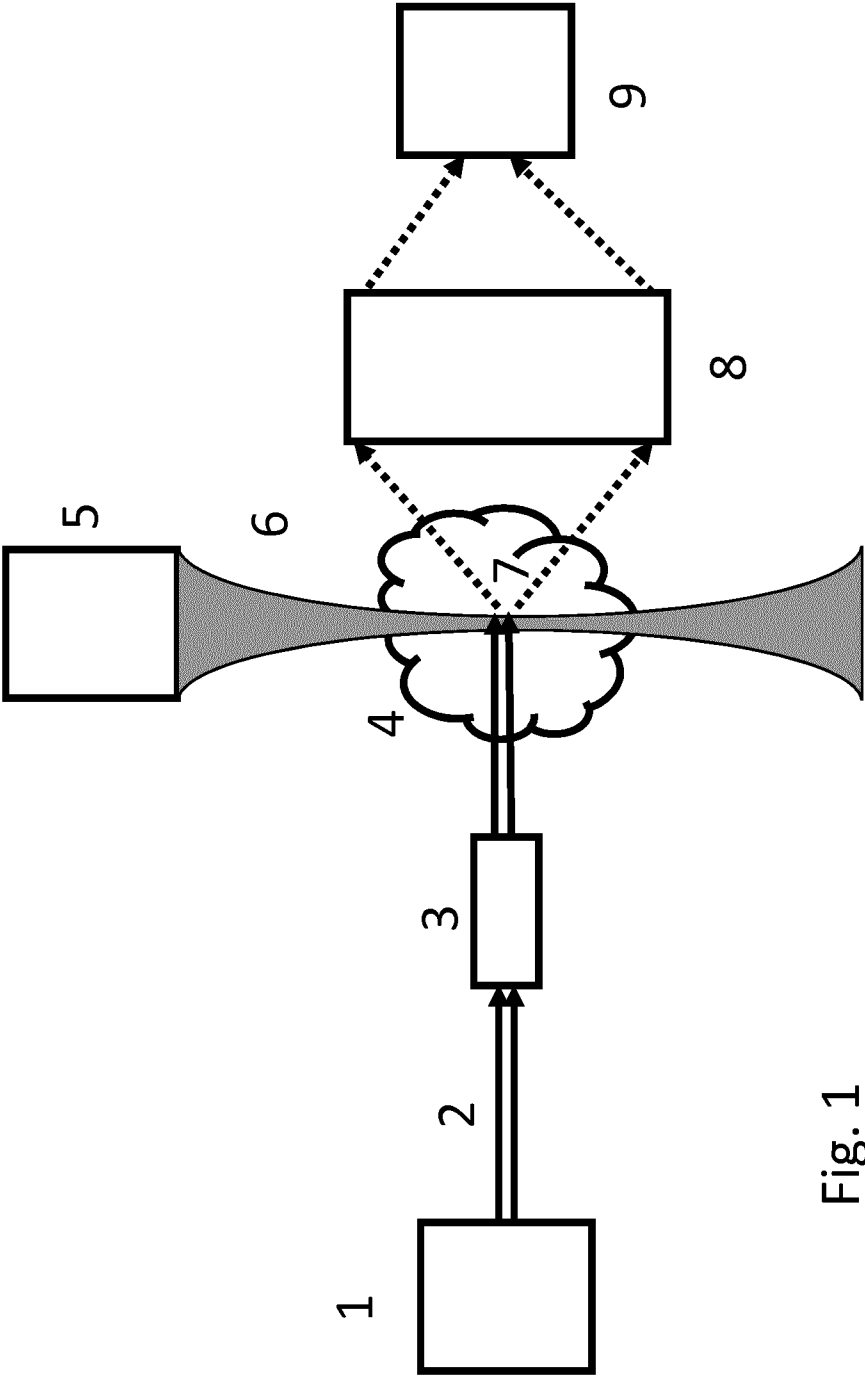


Fig. 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2019/074338

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G02B 21/00(2006.01)i; G01N 21/64(2006.01)i; G02B 21/36(2006.01)i; G02B 27/58(2006.01)i 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; G01N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where 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	US 5796477 A (TEICH MALVIN CARL [US] ET AL) 18 August 1998 (1998-08-18) cited in the application abstract column 2, line 65 - column 3, line 15 column 6, line 10 - column 7, line 21 figure 6	1-14
Y	DE 102008009216 A1 (ZEISS CARL MICROIMAGING GMBH [DE]) 20 August 2009 (2009-08-20) abstract paragraph [0022] - paragraph [0026] paragraph [0032] paragraph [0039] - paragraph [0043] claim 17 figures 3, 5, 7	1-14
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 11 December 2019		Date of mailing of the international search report 19 December 2019
Name and mailing address of the ISA/EP European Patent Office p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk Netherlands Telephone No. (+31-70)340-2040 Facsimile No. (+31-70)340-3016		Authorized officer Schenke, Cordt Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2019/074338**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2014147211 A1 (ETH ZÜRICH [CH]; CALIFORNIA INST OF TECHN [US]) 25 September 2014 (2014-09-25) abstract page 17, line 29 - page 21, line 13 figures 3-5	1-4,6,7,9,10,12,13
A	WO 2015022146 A1 (ZEISS CARL MICROSCOPY GMBH [DE]) 19 February 2015 (2015-02-19) abstract page 6, line 1 - page 9, line 25 figure 3	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/EP2019/074338

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
US	5796477	A	18 August 1998	NONE	
DE	102008009216	A1	20 August 2009	DE 102008009216 A1	20 August 2009
				EP 2245494 A1	03 November 2010
				JP 5826494 B2	02 December 2015
				JP 6039760 B2	07 December 2016
				JP 2011511966 A	14 April 2011
				JP 2015215629 A	03 December 2015
				US 2011036996 A1	17 February 2011
				WO 2009100830 A1	20 August 2009
WO	2014147211	A1	25 September 2014	EP 2976621 A1	27 January 2016
				US 2016054553 A1	25 February 2016
				WO 2014147211 A1	25 September 2014
WO	2015022146	A1	19 February 2015	CN 105452931 A	30 March 2016
				DE 102013216124 A1	19 February 2015
				EP 3033647 A1	22 June 2016
				JP 2016534395 A	04 November 2016
				US 2016195704 A1	07 July 2016
				WO 2015022146 A1	19 February 2015

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. G02B21/00 G01N21/64 G02B21/36 G02B27/58 ADD.		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) G02B G01N		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) 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	US 5 796 477 A (TEICH MALVIN CARL [US] ET AL) 18. August 1998 (1998-08-18) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Spalte 2, Zeile 65 - Spalte 3, Zeile 15 Spalte 6, Zeile 10 - Spalte 7, Zeile 21 Abbildung 6	1-14
Y	DE 10 2008 009216 A1 (ZEISS CARL MICROIMAGING GMBH [DE]) 20. August 2009 (2009-08-20) Zusammenfassung Absatz [0022] - Absatz [0026] Absatz [0032] Absatz [0039] - Absatz [0043] Anspruch 17 Abbildungen 3, 5, 7 ----- -/--	1-14
☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
11. Dezember 2019		19/12/2019
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 Schenke, Cordt

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 2014/147211 A1 (ETH ZÜRICH [CH]; CALIFORNIA INST OF TECHN [US]) 25. September 2014 (2014-09-25) Zusammenfassung Seite 17, Zeile 29 - Seite 21, Zeile 13 Abbildungen 3-5 -----	1-4,6,7, 9,10,12, 13
A	WO 2015/022146 A1 (ZEISS CARL MICROSCOPY GMBH [DE]) 19. Februar 2015 (2015-02-19) Zusammenfassung Seite 6, Zeile 1 - Seite 9, Zeile 25 Abbildung 3 -----	1-14

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2019/074338

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5796477 A	18-08-1998	KEINE	
DE 102008009216 A1	20-08-2009	DE 102008009216 A1	20-08-2009
		EP 2245494 A1	03-11-2010
		JP 5826494 B2	02-12-2015
		JP 6039760 B2	07-12-2016
		JP 2011511966 A	14-04-2011
		JP 2015215629 A	03-12-2015
		US 2011036996 A1	17-02-2011
		WO 2009100830 A1	20-08-2009
WO 2014147211 A1	25-09-2014	EP 2976621 A1	27-01-2016
		US 2016054553 A1	25-02-2016
		WO 2014147211 A1	25-09-2014
WO 2015022146 A1	19-02-2015	CN 105452931 A	30-03-2016
		DE 102013216124 A1	19-02-2015
		EP 3033647 A1	22-06-2016
		JP 2016534395 A	04-11-2016
		US 2016195704 A1	07-07-2016
		WO 2015022146 A1	19-02-2015