(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
17. Januar 2013 (17.01.2013)

WIPO | PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2013/007591 A1

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

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2012/063125

(22) Internationales Anmeldedatum:
5. Juli 2012 (05.07.2012)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2011 106 916.3 8. Juli 2011 (08.07.2011) 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)*: **SCHWEDT, Daniel** [DE/DE]; Johann-Friedrich-Str. 38, 07745 Jena (DE). **WOLLESCHENSKY, Ralf** [DE/DE]; Ricarda-Huch-Weg 26, 07743 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, 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, 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,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) **Title**: CONFOCAL INCIDENT-LIGHT SCANNING MICROSCOPE

(54) **Bezeichnung** : KONFOKALES AUFLICHT-RASTERMIKROSKOP

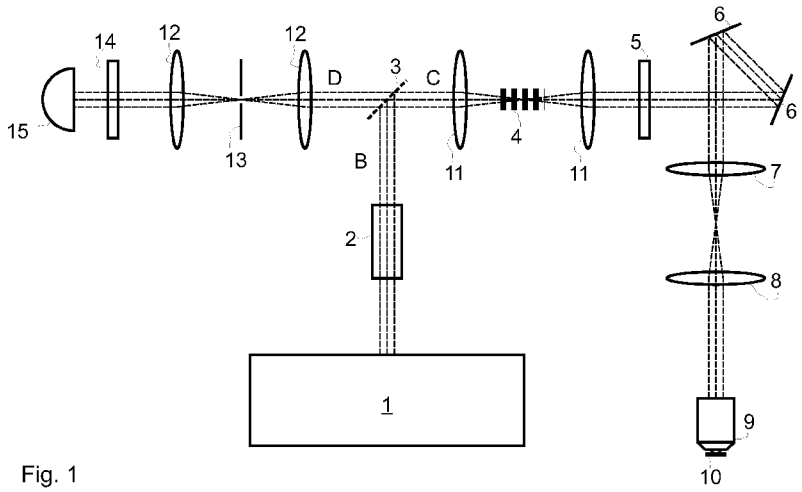


Fig. 1

(57) **Abstract**: Spectral notch filters are typically used in fluorescence microscopy as the main beam splitters for separating excitation light and detection light. The spectrally flexible excitation necessary for free selection of the colorant requires a corresponding spectrally flexible separation of excitation light and detection light. Until now, mutually interchangeable main beam splitters have been used for this purpose. However, the exchange modifies the beam paths, which must be compensated by a complex process. The finite number of alternative beam splitters, in a splitter wheel for example, further limits the spectral flexibility. The invention is intended to enable a spectrally flexible fluorescence excitation and detection with little effort. For this purpose, means (4, 16, 17) for frequency conversion are arranged in the common beam path (C) and a filter (14) for excitation light is arranged in addition to the main beam splitter in the detection beam path (D). The frequency conversion achieves a spectral delimitation between illumination light, which is emitted by the light source, and excitation light, which stimulates the sample to fluoresce. Because the frequency conversion occurs in the common beam path, i.e. only downstream of the main beam splitter, the spectral difference between illumination light and excitation light enables a spatial separation to be achieved at the main beam splitter with little effort, according to spectral bands, between illumination light on the one hand, and excitation light and fluorescent light emitted from the sample (detection light) on the other. Fluorescence microscopy.

(57) **Zusammenfassung**:

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2013/007591 A1

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)*

In der Fluoreszenzmikroskopie werden typischerweise spektrale Kerbfilter als Hauptstrahlteiler zur Trennung von Anregungs- und Detektionslicht. Die zur freien Farbstoffwahl notwendige spektral flexible Anregung erfordert eine entsprechend spektral flexible Trennung von Anregungslicht und Detektionslicht. Bisher werden zu diesem Zweck gegeneinander austauschbare Hauptstrahlteiler bereitgestellt. Der Austausch verändert jedoch die Strahlengänge, was aufwendig kompensiert werden muss. Zudem begrenzt die endliche Anzahl alternativer Strahlteiler, beispielsweise in einem Teilerrad, die spektrale Flexibilität. Die Erfindung soll mit geringerem Aufwand eine spektral flexible Fluoreszenzanregung und -detektion ermöglichen. Zu diesem Zweck sind im gemeinsamen Strahlengang (C) Mittel (4, 16, 17) zur Frequenzkonversion und im Detektionsstrahlengang (D) zusätzlich zum Hauptstrahlteiler ein Filter (14) für Anregungslicht angeordnet. Durch die Frequenzkonversion wird eine spektrale Abgrenzung zwischen Beleuchtungslicht, das die Lichtquelle emittiert, und Anregungslicht, das die Probe zur Fluoreszenz anregt, erreicht. Da die Frequenzkonversion im gemeinsamen Strahlengang, also erst hinter dem Hauptstrahlteiler, erfolgt, ist am Hauptstrahlteiler aufgrund des spektralen Unterschieds zwischen Beleuchtungs- und Anregungslicht mit geringem Aufwand eine räumliche Trennung von Beleuchtungslicht einerseits und Anregungslicht und von der Probe emittiertem Fluoreszenzlicht (Detektionslicht) andererseits nach Spektralbändern möglich. Fluoreszenzmikroskopie.

Konfokales Auflicht-Rastermikroskop

Die Erfindung betrifft ein konfokales Rastermikroskop (engl. „scanning microscope“) zur Fluoreszenzanregung mittels Anregungslicht, aufweisend einen Beleuchtungsstrahlengang, einen Detektionsstrahlengang, einen Hauptstrahlteiler, der einen Teil des Beleuchtungsstrahlengangs und einen Teil des Detektionsstrahlengangs zu einem gemeinsamen Strahlengang koppelt, und eine einstellbare Ablenkeinheit im gemeinsamen Strahlengang.

Im Sinne der Erfindung ist Anregungslicht jeweils dasjenige Licht, welches einen zur Fluoreszenzanregung eines jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffs geeigneten Wellenlängenbereich umfasst. Im Beleuchtungsstrahlengang ist eine Lichtquelle anzuordnen – üblicherweise ein Laser („Laser Scanning Microscope“, LSM) –, die Beleuchtungslicht emittiert, das typischerweise zunächst intensitätsmoduliert und/oder spektral gefiltert und dann als Anregungslicht zur Fluoreszenzanregung durch ein Objektiv auf eine Probe geleitet wird. Die Ablenkeinheit dient dabei zum Abtasten (engl. „scanning“) der Probe entlang eines Rasters, währenddessen mittels eines im Detektionsstrahlengang angeordneten Detektors konfokal Licht von dem jeweils abgetasteten Probenort aufgenommen wird. Konfokal bedeutet hierbei, dass in einer zur probenseitigen Brennebene des Objektivs konjugierten Ebene des Detektionsstrahlengangs eine Blende zur Beschränkung der Lichtaufnahme auf ein kleines Volumen am Probenort angeordnet ist.

Die Probe, insbesondere speziell darin angebrachte Markierfarbstoffe, absorbiert einen Teil des Anregungslichts, woraufhin sie Fluoreszenzlicht emittiert, von dem ein Teil als Detektionslicht in den Detektionsstrahlengang des Mikroskops gelangt und dort in einem optoelektronischen Detektor detektierbar ist. Ein anderer Teil des Anregungslichts wird von der Probe gestreut und gelangt dadurch ebenfalls in den Detektionsstrahlengang des Mikroskops, was den detektierbaren Kontrast vermindert. Ein kleiner Teil des Anregungslichtes wird zudem bereits im Beleuchtungsstrahlengang gestreut oder reflektiert, beispielsweise an optischen Grenzflächen, und kann so störenderweise ebenfalls in den Detektionsstrahlengang gelangen. Die in einem konfokalen Mikroskop angestrebte Bildgüte verlangt nach einer hohen Unterdrückung des Anregungslichts auf dem rückwärtigen Strahlweg

von der Probe zum Detektor von typischerweise mehr als fünf optischen Dichten (OD), gleichzeitig sollte das Detektionslicht möglichst ungehindert zum Detektor passieren.

Im Stand der Technik wird zu diesem Zweck typischerweise ein spektraler Kerbfilter (engl. „notch filter“) als dichroitischer Hauptstrahlteiler eingesetzt. Er sperrt den Detektor gegenüber einem schmalen Spektralband, das die Wellenlängen des verwendeten Anregungslichts umschließt, indem er es ausschließlich von der Lichtquelle in den gemeinsamen Strahlengang und entgegengesetzt reflektiert. Wellenlängen innerhalb des gesperrten Spektralbandes können dadurch nicht in den reinen Detektionsstrahlengang gelangen. Wellenlängen außerhalb des gesperrten Spektralbandes durchdringen den Hauptstrahlteiler nahezu ungehindert und gelangen in den reinen Detektionsstrahlengang. So wird das Anregungslicht aus dem rückwärtigen Strahlweg von der Probe zum Detektor entfernt, während das Detektionslicht durch den Hauptstrahlteiler hindurch zum Detektor gelangt. Selbstverständlich kann der Kerbfilter alternativ so ausgebildet sein, dass er das gesperrte Spektralband passieren lässt, während er den spektralen Rest reflektiert. Dann sind gegenüber der vorgenannten Anordnung entsprechend Lichtquelle und Detektor in ihrer Platzierung zu vertauschen.

Unter diesen Rahmenbedingungen hat die Vielfalt an Farbstoffen zur Fluoreszenzmarkierung von biomedizinischen Proben in den vergangenen Jahrzehnten deutlich zugenommen. Insbesondere die Entwicklung von proteinbasierten Einfärbungen wurde vorangetrieben, da diese besonders gut für Untersuchungen an lebenden Zellkulturen geeignet sind, die zunehmend in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses rücken. Es ist anzunehmen, dass gerade bei lebenden Zellkulturen die chemisch-physikalischen Möglichkeiten zur Einstellung definierter Absorptions- und Emissionscharakteristiken von Farbstoffen begrenzt sind. Es wird daher notwendig sein, die Lichtquelle abhängig von der Farbstoffcharakteristik auszuwählen oder einzustellen anstatt – wie bisher – die Farbstoffwahl basierend auf dem oder den verfügbaren Lasern zu treffen.

Die zur freien Farbstoffwahl notwendige spektral flexible Anregung erfordert in einem konfokalen Auflicht-Rastermikroskop (mit Kopplung von Beleuchtungs- und

Detektionsstrahlengang) eine entsprechend spektral flexible Trennung von Anregungslicht und Detektionslicht. Zur spektral flexiblen Trennung muss das gesperrte Spektralband auf die jeweilige Lichtquelle beziehungsweise – im Falle einer hinsichtlich ihrer spektralen Emissionscharakteristik einstellbaren Lichtquelle, im folgenden als durchstimmbare Lichtquelle bezeichnet – auf die jeweils eingestellte Emissionscharakteristik der Lichtquelle eingestellt werden. Im Stand der Technik wird zu diesem Zweck eine endliche Anzahl von gegeneinander austauschbaren Hauptstrahlteilern bereitgestellt, beispielsweise mittels eines motorbetriebenen Teilerrads wie in DE 198 29 954 A1 beschrieben.

Nachteilig ist, dass der Austausch des Hauptstrahlteilers aufgrund unvermeidbarer unterschiedlicher Einbaulagen die Strahlengänge verändert, was aufwendig kompensiert werden muss. Zudem ist das Bereitstellen mehrerer Hauptstrahlteiler kostenaufwendig. Insbesondere beanspruchen Teilerräder wertvollen Bauraum. Zudem begrenzt die endliche Anzahl alternativer Strahlteiler, beispielsweise in einem Teilerrad, die spektrale Flexibilität der Trennung auf eine entsprechend geringe Zahl von wählbaren Spektralbändern und damit Farbstoffgruppen.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Mikroskop der eingangs genannten Art anzugeben, das mit geringerem Aufwand eine spektral flexible Fluoreszenzanregung und -detektion von Proben ermöglicht.

Die Aufgabe wird gelöst durch ein konfokales Rastermikroskop, welches die in Anspruch 1 angegebenen Merkmale aufweist.

Vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung sind in den Unteransprüchen angegeben.

Erfindungsgemäß ist zur Lösung der Aufgabe vorgesehen, dass im gemeinsamen Strahlengang Mittel zur Frequenzkonversion und im Detektionsstrahlengang zusätzlich zum Hauptstrahlteiler ein Filter für Anregungslicht angeordnet sind. Der Filter für Anregungslicht ist zweckmäßigerweise ausgebildet zum Sperren eines Spektralbands, das in den Mitteln zur Frequenzkonversion aus von einer jeweiligen Lichtquelle emittierbarem Licht durch Frequenzkonversion erzeugbar ist.

Durch die Frequenzkonversion wird eine spektrale Abgrenzung zwischen Beleuchtungslicht, das die Lichtquelle emittiert, und Anregungslicht, das die Probe zur Fluoreszenz anregt, erreicht. Da die Frequenzkonversion im gemeinsamen Strahlengang, also erst hinter dem Hauptstrahlteiler, erfolgt, ist am Hauptstrahlteiler aufgrund des spektralen Unterschieds zwischen Beleuchtungs- und Anregungslicht mit geringem Aufwand eine räumliche Trennung von Beleuchtungslicht einerseits und Anregungslicht und von der Probe emittiertem Fluoreszenzlicht (Detektionslicht) andererseits nach Spektralbändern möglich. Der Hauptstrahlteiler hat nicht (mehr) die Aufgabe, das Anregungslicht vom Detektionslicht zu trennen. Er muss daher nicht mehr als unflexibler, spektral spezifischer Kerbfilter ausgebildet sein, sondern braucht lediglich breitere Bänder, die das Beleuchtungslicht umfassen, oder alle Wellenlängen oberhalb einer geeigneten spektralen Kante vom Detektor fernzuhalten. Eine Kante ist geeignet, wenn sie spektral zwischen dem Anregungslicht und dem Beleuchtungslicht liegt. Ein spektraler Kantenfilter (optischer Langpass- oder Kurzpassfilter) ist die einfachste Möglichkeit zur Trennung von Beleuchtungs- und Anregungslicht.

Das Anregungslichts wird erfindungsgemäß mittels des zusätzlichen optischen Filters für Anregungslicht vom Detektionslicht getrennt. Das ermöglicht eine hohe spektrale Flexibilität mit geringem Aufwand, da ein solcher Filter nicht den hohen Anforderungen an die Einbaulage eines Hauptstrahlteilers unterliegt. Gleichwohl kann er als Strahlteiler ausgebildet sein. Der Filter für Anregungslicht kann als spektraler Kerbfilter ausgebildet sein, dabei kann er optional spektral einstellbar sein, beispielsweise indem die spektrale Lage der durch Veränderung der Ausrichtung des Filtersubstrates veränderbar ist. Insbesondere kann er als dielektrischer Filter ausgebildet sein. Alternativ kann er als akustooptischer, einstellbarer Filter (engl. „acousto-optic tunable filter“, AOTF) ausgebildet sein.

Gleichwirkend mit einem spektral selektiven Hauptstrahlteiler zur Trennung von Beleuchtungs- und Anregungslicht ist die Ausbildung des Hauptstrahlteilers als Neutralteiler in Verbindung mit einem separaten Filter für Beleuchtungslicht im reinen Detektionsstrahlengang, also außerhalb des gemeinsamen Strahlengangs. Ein solcher Filter kann gleichzeitig als Filter für Anregungslicht ausgebildet sein, um das Anregungslicht vom Detektionslicht zu trennen, er kann aber stattdessen auch

zusätzlich zu einem das Anregungslicht vom Detektionslicht trennenden Filter angeordnet sein.

Zweckmäßigerweise wird im Beleuchtungsstrahlengang den Mitteln zur Frequenzkonversion ein Filter für Beleuchtungslicht nachgeschaltet, um einen nicht frequenzkonvertierten Rest des Beleuchtungslichts von der Probe fernzuhalten. Ein solcher Filter kann beispielsweise wie der Hauptstrahlteiler ausgebildet sein. Falls der Hauptstrahlteiler ein Neutralteiler ist, kann ein solcher Filter beispielsweise wie der separate Filter für Beleuchtungslicht, der im reinen Detektionsstrahlengang angeordnet ist, ausgebildet sein.

Eine im Beleuchtungsstrahlengang angeordnete Lichtquelle kann Teil des Mikroskops sein, sie kann aber auch als externes Modul lösbar oder unlösbar mit einem Mikroskop verbunden sein, beispielsweise mittels Lichtwellenleitern. Insbesondere können mehrere Lichtquellen simultan oder alternierend in den Beleuchtungsstrahlengang eingekoppelt werden, solange das von ihnen emittierte Beleuchtungslicht in dem/den durch den Hauptstrahlteiler vom Detektor ferngehaltenen Spektrumsteil(en) liegt.

Vorzugsweise sind die Mittel zur Frequenzkonversion als mindestens ein optisch nichtlineares Medium ausgebildet. Beispielsweise kann ein solches Medium eine Frequenzvervielfachung, insbesondere eine Verdopplung und/oder Verdreifachung, oder eine Summenfrequenzerzeugung oder eine Differenzfrequenzerzeugung bewirken. Dadurch wird ein großer spektraler Abstand zwischen Beleuchtungslicht und Anregungslicht ermöglicht. Vorzugsweise erfolgt dabei eine Konversion von infrarotem, insbesondere nah-infrarotem (NIR) Licht in sichtbares Licht.

Zweckmäßigerweise ist das optisch nichtlineare Medium in einer Brennebene des gemeinsamen Strahlengangs oder zumindest im Bereich einer solchen Brennebene angeordnet, um eine hohe Lichtintensität in dem Medium und damit eine hohe Konversionswahrscheinlichkeit und in der Folge eine hohe Fluoreszenzintensität zu erzielen. Besonders zweckmäßig ist die Anordnung des nichtlinearen Mediums im Zentrum einer 4f-Anordnung. Eine 4f-Anordnung transformiert die Strahleigenschaften der Eintritts- in die Austrittspupille, ohne die

Bildgebungseigenschaften des Mikroskopes zu beeinflussen. Beispielsweise bleiben Fokusebene, Vergrößerung und sphärische Fehler durch die 4f-Anordnung im Idealfall unbeeinflusst.

Zur konfokalen Detektion ist es zweckmäßig, wenn in dem Detektionsstrahlengang, insbesondere im gemeinsamen Strahlengang, eine Blende, insbesondere eine Lochblende oder eine Schlitzblende, konfokal angeordnet ist. Erfindungsgemäß kann die konfokale Blende durch die Mittel zur Frequenzkonversion gebildet sein, wenn diese in einer konfokalen Brennebene angeordnet sind und ihr lichtdurchlässiger Bereich entsprechend kleine Abmessungen aufweist, was bei den verfügbaren nichtlinearen optischen Medien in der Regel erfüllt ist.

Besonders vorteilhaft sind Ausführungsformen mit einer in dem Beleuchtungsstrahlengang angeordneten, durchstimmbaren Lichtquelle zur Emission mindestens eines von mehreren unterschiedlichen ersten Spektralbändern (als Beleuchtungslicht), insbesondere unterschiedlichen infraroten Spektralbändern, wobei der Filter für das Anregungslicht zum Sperren mindestens eines von verschiedenen zweiten Spektralbändern, die durch die Frequenzkonversion aus den ersten Spektralbändern entstehen, einstellbar ist. Damit wird eine hohe spektrale Flexibilität erreicht, ohne dass der wenig aufwendige erfindungsgemäße Hauptstrahlteiler verändert zu werden braucht.

Als durchstimmbare Lichtquelle gilt erfindungsgemäß auch eine permanent breitbandig emittierende Lichtquelle mit einem ihr im Beleuchtungsstrahlengang nachgeschalteten Bandauswahlfilter, beispielsweise einem akustooptischen einstellbaren Filter. Allgemein ist es vorteilhaft, im Beleuchtungsstrahlengang zum Einstellen unterschiedlicher spektraler Bänder des Beleuchtungslichts einen einstellbaren Filter anzuordnen, um eine(s) von mehreren simultan emittierten Spektralbändern oder Spektrallinien als Beleuchtungslicht auszuwählen. Insbesondere kann es sich um einen akustooptischen einstellbaren Filter handeln.

Vorzugsweise ist die durchstimmbare Lichtquelle zur Emission unterschiedlicher infraroter (erster) Spektralbänder ausgebildet, da infrarotes Beleuchtungslicht mit hoher Effizienz von durch Frequenzkonversion sichtbarem Anregungslicht getrennt

werden kann. Entsprechend ist es zweckmäßig, den einstellbaren Filter für Anregungslicht zum Sperren der korrespondierenden infraroten zweiten Spektralbänder auszubilden.

Besonders vorteilhaft sind außerdem Ausführungsformen, in denen der Filter zum Einstellen eines der zu sperrenden zweiten Spektralbänder gegenüber dem Detektionsstrahlengang verkippbar ist. Dadurch braucht der Filter nicht ausgetauscht zu werden, was die Handhabung und Justierung vereinfacht und gegenüber einem Teilerrad mit unterschiedlichen Filtern weniger Bauraum benötigt. Der verkippbare Filter kann insbesondere ein spektraler Kerbfilter sein. Von auf Dünnschichttechnologie basierenden optischen Kerbfiltern ist bekannt, dass diese ihre spektralen Filtereigenschaften bei Verstimmung des Einfallswinkels der zu filternden Strahlung verändern. Hierdurch ist eine Abstimmung der zentralen Filterwellenlänge um etwa 0% - 10% der Definitionswellenlänge möglich. Aufgrund der hohen Schichtgüte, die durch neue Kathodenzerstäubungsverfahren (engl. „sputtering“) erzielbar ist, lässt sich ein solcher Filter beispielsweise für einen regulären Verkippungswinkel von beispielsweise 20° gegen die optische Achse optimieren. Die erfindungsgemäß variabel einstellbare spektrale Bandbreite und maximale Unterdrückung bleibt dann bei einer Winkelabstimmung von +/- 20° nahezu vollständig erhalten.

Zweckmäßigerweise ist der verkippbare Filter mit einer Antriebseinheit zum definierten Verkippen des Filters ausgerüstet, um die Einstellung durch eine Steuereinheit automatisch vornehmen zu können.

Zweckmäßigerweise ist das erfindungsgemäße Mikroskop auf bekannte Weise mit einem Photodetektor im Detektionsstrahlengang und einem Objektiv im gemeinsamen Strahlengang ausgerüstet, wobei der Photodetektor außerhalb des gemeinsamen Strahlengangs angeordnet ist. Entsprechend ist die Lichtquelle, sofern sie betriebsbereit mit dem Beleuchtungsstrahlengang verbunden ist, außerhalb des gemeinsamen Strahlengangs angeordnet.

Besondere spektrale Flexibilität kann erreicht werden, indem die Mittel zur Frequenzkonversion verbunden sind mit einem Antrieb zum Bewegen der Mittel zur

Frequenzkonversion aus dem gemeinsamen Strahlengang heraus und in den gemeinsamen Strahlengang hinein, insbesondere zum alternativen Einfahren eines von mehreren unterschiedlichen Mitteln zur Frequenzkonversion in den gemeinsamen Strahlengang. Dadurch kann der Benutzer die Frequenzkonversion ausschalten beziehungsweise es stehen ihm unterschiedliche Frequenzkonversionsmittel zur Verfügung, die beispielsweise zum Zwecke einer wählbaren Intensitätsmodulation für unterschiedlich effiziente Frequenzkonversion ausgebildet sind und/oder zum Zwecke einer Einstellung verschiedener Wellenlängen für unterschiedliche Konversionsprozesse ausgebildet sein können.

Bevorzugte Mittel zur Frequenzkonversion sind mindestens eines der folgenden Elemente: periodisch gepolter nichtlinearer Kristall, periodisch gepolter nichtlinearer Lichtwellenleiter, nichtlineare photonische Kristallfaser.

Vorzugsweise weist der gemeinsame Strahlengang zusätzlich zur Ablenkeinheit einstellbar ablenkende optische Elemente zur zeitlich sequentiellen Auffächerung des Strahlengangs und zur Wiederzusammenführung und/oder zusätzlich zur Ablenkeinheit diffraktive optische Elemente zur simultanen Auffächerung des Strahlengangs auf, um die Frequenzkonversion in mehreren Ästen unterschiedlich durchführen zu können.

Vorteilhafterweise kann der Hauptstrahlteiler eine zweidimensionale Matrix aus mikro-opto-mechanischen Systemen oder eine zweidimensionale Mikrospiegelmatrix oder ein Spiegel mit mindestens einem Transmissionsfenster sein. Dadurch kann die Transmissionseffizienz des Hauptstrahlteilers beispielsweise in Verbindung mit linienförmiger Beleuchtung und linienförmiger Bildaufnahme verbessert werden.

Als Lichtquelle wird vorzugsweise ein gepulster Infrarot-Laser eingesetzt.

Die Erfindung umfasst auch ein Betriebsverfahren für ein konfokales Rastermikroskop zur Fluoreszenzanregung, wobei mittels einer Lichtquelle in einem ersten Spektralband emittiertes Beleuchtungslicht entlang eines Beleuchtungsstrahlengangs über einen Hauptstrahlteiler in einen mit einem Detektionsstrahlengang gemeinsamen Strahlengang eingekoppelt und in dem

gemeinsamen Strahlengang in Mitteln zur Frequenzkonversion als Anregungslicht in ein anderes Spektralband konvertiert und über eine Ablenkeinheit und ein Objektiv zu einer Probe geleitet wird, von wo Licht über das Objektiv entlang des gemeinsamen Strahlengang aufgenommen und über den Hauptstrahlteiler sowie durch einen Filter für das Anregungslicht zu einem Detektor geleitet und dort optoelektronisch gewandelt wird, insbesondere mit Einstellung einer durchstimmbaren Lichtquelle auf eines von mehreren ersten Spektralbändern und Einstellung des Filters für das Anregungslicht auf korrespondierende zweite Spektralbänder. Das Betriebsverfahren kann dabei gemäß den vorstehenden Ausführungen zur Erfindung variieren. Daneben umfasst die Erfindung Computerprogramme oder Steuereinheiten für ein konfokales Rastermikroskop, (jeweils) eingerichtet zur Durchführung eines solchen Betriebsverfahrens.

In dem Beleuchtungsstrahlengang kann also erfindungsgemäß Beleuchtungslicht emittiert werden, das spektral von dem für die jeweilige Probe erforderlichen Anregungslicht verschieden ist. Das Beleuchtungslicht umfasst dann zweckmäßigerweise (ausschließlich) Wellenlängen, die größer sind als die Wellenlängen des erforderlichen Anregungslichts. Am Hauptstrahlteiler können aus dem gemeinsamen Strahlengang kommendes Beleuchtungslicht und Anregungslicht mit geringem Aufwand getrennt werden. Das gelingt beispielsweise, indem der Hauptstrahlteiler als spektraler Kantenfilter ausgebildet ist, dessen Kante zwischen dem von der Lichtquelle emittierten Beleuchtungslicht-Spektralband und dem entsprechenden frequenzkonvertierten Spektralband liegt. Der Kantenfilter wird zweckmäßigerweise so angeordnet, dass er vom gemeinsamen Strahlengang her nur Wellenlängen unterhalb der spektralen Kante zum Detektor gelangen lässt, während er den Detektor gegenüber Wellenlängen oberhalb der Kante sperrt, indem er sie beispielsweise zur Lichtquelle reflektiert. Alternativ kann der Hauptstrahlteiler als spektrale Breitbandsperre ausgebildet sein. Das Anregungslicht kann mittels eines vom Hauptstrahlteiler verschiedenen Filters vom Detektionslicht getrennt werden. Dieser Filter kann im Detektionsstrahlengang zwischen den Mitteln zur Frequenzkonversion und dem Detektor an einer beliebigen Stelle angeordnet sein. Vorzugsweise kann er spektral auf unterschiedliche Lichtquellen oder unterschiedliche Emissionsbänder einer durchstimmbaren Lichtquelle eingestellt werden.

Aus der Lasertechnik sind verschiedene Quellen breitbandiger nahinfraroter Laserstrahlung bekannt. Beispiele hierfür sind:

- modengekoppelte Ti:Saphir-Systeme mit Pulslängen von wenigen bis einigen zehn Femtosekunden, die breitbandige Spektren zwischen 700 nm und 1000 nm erzeugen,
- Zwei-Kristalllaser, die die Spektralbereiche von Ti:Saphir-chromdotierten Kristallen simultan nutzbar machen,
- hochverstärkte, gepulste Faserlaser, die die Erzeugung neuer Frequenzkomponenten in hoch nichtlinearen Fasern (HLNF) verursachen sowie
- die Erzeugung neuer Frequenzkomponenten über stimulierte Ramanstreuung durch Hochleistungslaser.

Des weiteren sind effiziente Frequenzkonversationsmechanismen über periodisch gepolte nichtlineare Kristalle bekannt. Die periodische Polung bewirkt eine Verbreiterung der Phasenanpassungsbedingungen. Zudem sind Methoden bekannt, diese periodisch gepolten Kristalle als Wellenleiter auszufertigen, wodurch die Konversionseffizienz sehr stark erhöht wird. Des weiteren sind Frequenzkonversionsmechanismen in hoch nichtlinearen photonischen Kristallfasern bekannt, die aufgrund von blauverschobener Nulldispersionswellenlängen ein Abbremsen des NIR-Laserpulses bewirken, welcher seine überschüssige Energie in Form von dispersiven Wellen in sichtbare Spektralbereiche emittiert. Phasenanpassungsbedingungen zwischen Nulldispersion und Laserwellenlänge bewirken, dass Bandbreite der emittierten Bremsstrahlung gering (kleiner als 20 nm) und deutlich von der NIR-Strahlung des Laser separiert (Wellenlänge geringer als die Nulldispersionswellenlänge) ist. Daneben sind Frequenzkonversionstechniken bekannt, die über photonische Kristallfasern sichtbare Kontinuumsspektren erzeugen, die aber bezüglich spektraler Kontraste im Anregungslicht, Langzeitlebensdauern der Lasersysteme aufgrund von Faserdegradation und Intensitätsstabilität Einschränkungen aufweisen. (Quellen: B. Agate et al. in Optics Letters 28, 1963 2003; Haohua Tu et al. in Optics Express 17, 17983 2009; B. R. Rankin et al. in Optics Express 17, 15679 2009; A. L. Glebov et al. in IEEE Photonics Technology Letters 19, 701 2007)

Folgende Merkmale können die Erfindung vorteilhaft erweitern:

- Ein AOTF zur Einstellung der Laserleistung der NIR-Pumplichtquelle
- Eine motorisierte Halterung des verwendeten nichtlinearen Mediums zum Austausch/Anpassung auf geänderte spektrale Einstellungen der Pumplichtquelle
- Ein periodisch gepolter nichtlinearer Kristall zur Frequenzkonversion der NIR-Pumplichtquelle
- Mehrere nacheinander angeordnete periodisch gepolte nichtlineare Kristalle
- Mehrere in parallelen Strahlengängen angeordnete periodisch gepolte nichtlineare Kristalle
- Ein periodisch gepolter nichtlinearer Wellenleiter zur Frequenzkonversion der NIR-Pumplichtquelle
- Ein periodisch gepolter nichtlinearer Wellenleiter mit gechirpter Periode zur gleichzeitigen Frequenzkonversion mehrerer spektraler Anteile der NIR-Pumplichtquelle
- Eine hoch nichtlineare photonische Kristallfaser zur Frequenzkonversion der NIR-Pumplichtquelle
- Eine polarisationserhaltende hoch nichtlineare photonische Kristallfaser zur Frequenzkonversion der NIR-Pumplichtquelle
- Mehrere in parallelen Strahlengängen angeordnete (polarisationserhaltende) hoch nichtlineare photonische Kristallfasern
- Scannende optische Elemente (AOD, Galvoscanner, EO-Prismen, MOEMS) zur zeitlich sequentiellen Winkelauffächerung des Strahlenganges
- Diffraktive optische Elemente (DOE) zur simultanen Winkelauffächerung des Strahlenganges
- Eine zweidimensionale MOEMS-Matrix zur Strahlteilung zwischen Anregungs- und Detektionsstrahlengang innerhalb eines Prismen Spektrometers
- Eine zweidimensionale Mikrospiegelmatrix zur Strahlteilung zwischen Anregungs- und Detektionsstrahlengang innerhalb eines Prismen Spektrometers
- Ein Spiegel mit Transmissionsfenstern zur Strahlteilung zwischen Anregungs- und Detektionsstrahlengang innerhalb eines Prismen Spektrometers
- Eine mit Löchern versehene verspiegelte Platte zur Strahlteilung zwischen Anregungs- und Detektionsstrahlengang innerhalb eines Prismen Spektrometers
- Ein Prisma oder Gitter zur Vereinigung verschiedener spektraler Anteile des Anregungslichtes auf einen gemeinsamen Strahlengang bzw. zur Zerlegung von

Fluoreszenzstrahlung in ihre spektralen Bestandteile zur spektral aufgelösten Detektion

- GRIN-Optiken am Ausgang der photonischen Kristallfasern zur Anpassung der Austrittsapertur
- Eine (programmierbare) Phasenmaske zwischen zwei strahlaufweitenden Teleskopen zur räumlich selektierten Fokussierung der breitbandigen NIR-Laserstrahlung auf die Kerne von photonischen Kristallfasern innerhalb eines Faserbündels
- Ein Ti:Saphir-Laser als NIR-Pumplichtquelle
- Ein fs-Faserlaser als NIR-Pumplichtquelle
- Ein im NIR über stimulierte Ramanstreuung erzeugter Wellenlängenkamm eines ns-Lasers im NIR als NIR-Pumplichtquelle
- Ein Kurzpassfilter zur Einspiegelung der NIR-Pumplichtquelle auf den Fluoreszenzstrahlengang
- Ein Langpassfilter zur Ausspiegelung der Fluoreszenzstrahlenganges vom Strahlweg der NIR-Pumplichtquelle
- Eine Detektionslochblende mit angepasster, kollimierter abbildender Optik

Nachfolgend wird die Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

In den Zeichnungen zeigen:

Fig. 1 schematisch ein LSM, in welchem die Frequenz eines mittels eines Kurzpasses eingespiegelten NIR-Lasers in einem periodisch gepolten nichtlinearen Kristall verdoppelt wird,

Fig. 2 ein LSM, in welchem die Frequenz eines mittels eines Kurzpasses eingespiegelten NIR-Lasers in einem periodisch gepolten nichtlinearen Wellenleiter auf dem Fluoreszenzstrahlengang verdoppelt wird,

Fig. 3 ein LSM, in welchem ein mittels eines Kurzpasses eingespiegelter NIR-Laser in eine hoch nichtlineare photonische Kristallfaser auf dem Fluoreszenzstrahlengang eingekoppelt wird, innerhalb derer das Anregungslicht aufgrund von Energiedissipation entsteht,

Fig. 4 schematisch zwei Anordnungen, welche simultan verschiedene Wellenlängenbänder im sichtbaren Spektralbereich aus einer einzelnen breitbandigen NIR-Laserquelle über Frequenzkonversion in periodisch gepolten, nichtlinearen Kristallen erzeugen,

Fig. 5 eine Anordnung, bei der simultan in parallelen Teilstrahlengängen unterschiedliche Wellenlängenbänder im sichtbaren Spektralbereich aus einer einzelnen breitbandigen NIR-Laserquelle über Frequenzkonversion in periodisch gepolten nichtlinearen Kristallen erzeugt werden,

Fig. 6 eine Anordnung, bei der simultan in parallelen Teilstrahlengängen unterschiedliche Wellenlängenbänder im sichtbaren Spektralbereich aus einer einzelnen breitbandigen NIR-Laserquelle in verschiedenen hoch nichtlinearen photonischen Kristallfasern erzeugt werden,

Fig. 7 eine Anordnung, bei der simultan oder zeitlich sequentiell in winkelaufgefächerten Teilstrahlengängen unterschiedliche Wellenlängenbänder im sichtbaren Spektralbereich aus einer einzelnen breitbandigen NIR-Laserquelle in verschiedenen hoch nichtlinearen photonischen Kristallfasern erzeugt werden,

Fig. 8 eine Anordnung, bei der simultan oder zeitlich sequentiell in winkelaufgefächerten Teilstrahlengängen unterschiedliche Wellenlängenbänder im sichtbaren Spektralbereich aus einer einzelnen breitbandigen NIR-Laserquelle in verschiedenen hoch nichtlinearen photonischen Kristallfasern erzeugt werden,

Fig. 9 eine Modifikation der Anordnung auf Fig. 8, die über Gradientenindex(„GRIN“)-Optiken eine Aperturanpassung der Faserausgänge ermöglicht,

Fig. 10 eine Anordnung zur simultanen und programmierbaren Einkopplung von breitbandiger NIR-Laserstrahlung in ein Bündel aus photonischen Kristallfasern,

und

Fig. 11 eine Modifikation der Anordnung gemäß Fig. 10 als Mittel zur Frequenzkonversion.

In allen Zeichnungen tragen übereinstimmende Teile gleiche Bezugszeichen.

Fig. 1 zeigt ein beispielhaftes LSM mit einem NIR-Laser als Lichtquelle 1 in Beleuchtungsstrahlengang B. Das durch den spektral breitbandigen NIR-Laser 1 erzeugte Licht wird mittels eines AOTF als Filter 2, welcher über eine Filterfunktion von einigen Nanometern Bandbreite verfügt, in gewünschte erste Spektralbereiche vorselektiert, deren Intensität zudem über die Leistung der angelegten akustischen Welle eingestellt wird. Das dadurch auf den Beleuchtungsstrahlweg gelangende Beleuchtungslicht wird mittels eines optischen Kurzpasses als Hauptstrahlteiler 3 auf den gemeinsamen Strahlengang C (Fluoreszenzstrahlengang) eingespiegelt. Ein nachfolgendes 4f-Linsensystem 11 erzeugt eine Strahltaille, in der ein periodisch gepolter nichtlinearer Kristall 4, beispielsweise aus Lithiumniobat, dessen Kristallorientierung und Polungsperiode auf das ausgewählte Laserspektrum aus ersten Spektralbändern zur Frequenzverdopplung in zugehörige zweite Spektralbänder angepasst ist, als Mittel zur Frequenzkonversion angeordnet ist. Eine Optimierung der Phasenanpassung ist über eine Temperierung des Kristalls 4 möglich. Des weiteren können mehrere Kristalle 4 (nicht abgebildet) je nach benötigtem Anregungsspektrum motorisiert gegeneinander austauschbar sein. Residuales NIR-Laserlicht wird mit einem nachgestellten NIR-Blockfilter 5 geblockt. Die Ablenkeinheit weist beispielsweise Galvanometerspiegel 6 auf und rastert auf bekannte Weise die zu untersuchende Probe 10 mit dem Laserfleck, erzeugt durch die nachfolgende Linsenanordnung, bestehend aus einem sogenannten Scan-Objektiv 7, Tubuslinse 8 und Mikroskopobjektiv 9, ab. Von der Probe 10 emittiertes Fluoreszenzlicht durchläuft als Detektionslicht das LSM zunächst in umgekehrter Richtung, so dass hinter den Spiegeln 6 ein ortsfester, kollimierter Strahlengang erzeugt wird. Die Filtereigenschaften des NIR-Blockfilters 5 sind so ausgelegt, dass sichtbares Fluoreszenzlicht ungehindert passieren kann. Auch der periodisch gepolte nichtlineare Kristall 4 besteht aus einem im zu detektierenden sichtbaren Spektralbereich hochtransparenten Medium. Nach dem Passieren des Kurzpassfilter-Hauptstrahlteilers 3 wird das Detektionslicht durch ein weiteres 4f-Linsensystem 12 abgebildet, in dessen Strahltaille die konfokale Lochblende 13 positioniert ist. Von

der Probe 10 zurückgestreutes Anregungslicht (sichtbares, weil frequenzverdoppeltes Licht) wird im reinen Detektionsstrahlengang D über entsprechend eingefügte, bei Bedarf durch Winkelabstimmung optimierte Kerbfilter 14 vor dem Detektor 15 geblockt.

In **Fig. 2** ist ein anderes LSM dargestellt, in dem das durch den spektral breitbandigen NIR-Laser 1 erzeugte Licht mittels eines AOTF 2, welcher über eine Filterfunktion von einigen Nanometern Bandbreite verfügt, in gewünschte erste Spektralbereiche vorselektiert wird, deren Intensität zudem über die Leistung der angelegten akustischen Welle eingestellt wird. Das dadurch auf den Beleuchtungsstrahlengang B gelangende Beleuchtungslicht wird mittels eines Kurzpasses als Hauptstrahlteiler 3 auf den gemeinsamen Strahlengang C eingespiegelt. Ein nachfolgendes 4f-Linsensystem 11 erzeugt eine Strahltaille, in die ein periodisch gepolter nichtlinearer Wellenleiter 16 als Mittel zur Frequenzkonversion in zweite Spektralbereiche positioniert ist. Idealerweise verfügt der periodisch gepolte Wellenleiter 16 über eine sogenannte gechirpte Polung. Die Frequenz der Polungsperiode variiert also und damit verschieben sich die spektralen Bedingungen der optimalen Phasenanpassung entlang des Wellenleiters 16. Da ein Wellenleiter wie ein Raumfilter wirkt, ist diese Anordnung zwischen konfokaler Lochblende 13 und Detektor 15 positioniert. Nachgeschaltet ist ein weiteres 4f-Linsensystem 12, in dessen Strahltaille die konfokale Lochblende 13 positioniert ist. Residuales NIR-Laserlicht wird mit einem nachgestellten NIR-Blockfilter 5 geblockt. Die Ablenkspiegel 6 rastern die zu untersuchende Probe 10 mit dem Laserfleck, erzeugt durch nachfolgende Linsenanordnung, bestehend aus Scan-Objektiv 7, Tubuslinse 8 und Mikroskopobjektiv 9, ab. Von der Probe 10 emittiertes Fluoreszenzlicht durchläuft die Anordnung zunächst in umgekehrter Richtung als Detektionslicht, so dass hinter den Ablenkspiegeln 6 ein ortsfester, kollimierter Strahlengang erzeugt wird. Die Filtereigenschaften des NIR-Blockfilters 5 sind so ausgelegt, dass sichtbares Detektionslicht ungehindert passieren kann. Danach wird die Fluoreszenz in die konfokale Lochblende 13 abgebildet und anschließend wieder kollimiert. Der periodisch gepolte nichtlineare Wellenleiter 16 besteht aus einem im sichtbaren Spektralbereich hochtransparenten Medium. Nach dem Passieren des Kurzpassfilters 3 wird das Detektionslicht im Detektionsstrahlengang D außerhalb des gemeinsamen Strahlengangs C durch entsprechend eingefügte, bei Bedarf

durch Winkelabstimmung optimierte Kerbfilter 14 von an der Probe 10 zurückgestreuter Anregungsstrahlung (sichtbares, weil frequenzverdoppeltes Licht) bereinigt und schließlich mit dem Detektor 15 registriert.

Ein weiteres beispielhaftes LSM zeigt **Fig. 3**. Das durch den spektral breitbandigen NIR-Laser 1 erzeugte Licht wird mittels eines AOTF 2, welcher über eine Filterfunktion von einigen Nanometern Bandbreite verfügt, in gewünschte erste Spektralbereiche vorselektiert, deren Intensität zudem über die Leistung der angelegten akustischen Welle eingestellt wird. Das dadurch auf den Beleuchtungsstrahlweg gelangende Beleuchtungslicht wird mittels eines Kurzpasses 3 auf den gemeinsamen Strahlengang C eingespiegelt. Ein nachfolgendes 4f-Linsensystem 11 erzeugt eine Strahltaille, in die eine hoch nichtlineare photonische Kristallfaser 17 als Mittel zur Frequenzkonversion eingebracht ist. Die Faser 17 kann motorisiert gegen andere Fasern ähnlicher Bauart (nicht abgebildet), jedoch mit variierter Nulldispersionswellenlänge ausgetauscht werden. Die Eingangsapertur der Faser 17 wirkt in diesem Fall gleichzeitig als Anregungs- und Detektionslochblende. Residuales NIR-Laserlicht wird mit einem nachgestellten NIR-Blockfilter 5 geblockt. Die Scannerspiegel 6 rastern, wie aus diversen älteren Patenten bekannt, die zu untersuchende Probe 10 mit dem Laserspot, erzeugt durch nachfolgende Linsenanordnung, bestehend aus Scan-Objektiv 7, Tubuslinse 8 und Mikroskopobjektiv 9 ab. Von der Probe 10 emittiertes Fluoreszenzlicht durchläuft die Anordnung zunächst in umgekehrter Richtung als Detektionslicht, so dass hinter den Spiegeln 6 ein ortsfester, kollimierter Strahlengang erzeugt wird. Die Filtereigenschaften des NIR-Blockfilters 5 sind so ausgelegt, dass sichtbares Detektionslicht ungehindert passieren kann. Die hoch nichtlineare photonische Kristallfaser 17 besteht aus einem im sichtbaren Spektralbereich hochtransparenten Medium. Nach dem Passieren des Kurzpassfilters 3 wird das Detektionslicht durch entsprechend eingefügte, bei Bedarf durch Winkelabstimmung optimierte Kerbfilter 14 von an der Probe 10 zurückgestreuter Anregungsstrahlung (sichtbares, weil frequenzverdoppeltes Licht) bereinigt und schließlich mit dem Detektor 15 registriert.

In **Fig. 4** sind zwei Varianten zur gleichzeitigen Erzeugung verschiedener, separierter Spektralbereiche sichtbaren Anregungslichtes durch Frequenzkonversion in

periodisch gepolten nichtlinearen Kristallen 4 gezeigt, welche hintereinander angeordnet sind. Die Anordnung einer der Varianten als Mittel zur Frequenzkonversion innerhalb des Mikroskopstrahlenganges ist dabei ausgespart worden, da dieser identisch zu Fig. 1 ist. Abbildung 4a erzeugt dazu für jeden nichtlinearen Kristall 4 über ein entsprechend zugeordnetes Linsenpaar 11 eine separate Strahltaille. Das hat den Vorteil, dass der Frequenzkonversionsprozess für jeden adressierten Spektralbereich mit bestmöglicher Effizienz erfolgt. Nachteilig ist jedoch, dass dadurch Farblängsfehler beim Durchlauf durch das Linsensystem aufaddiert werden. Das bedeutet, dass die axiale Überlappung der Punktverwaschungsfunktionen (engl. „point spread function", PSF) verschiedener Spektralanteile in der Probe umso schlechter ausfällt je mehr Frequenzkomponenten gleichzeitig erzeugt werden sollen. Dieser Nachteil wird auf Kosten der Konversionseffizienz dadurch eliminiert, dass nur ein einziges aber langbrennweitiges Linsenpaar 11 verwendet wird, welches eine Strahltaille mit größerer Rayleighlänge erzeugt, so dass darin mehre periodisch gepolte, nichtlineare Kristalle zur Frequenzkonversion hintereinander angeordnet werden können. Diese Art der Anordnung erfordert eine höhere Pulsenergie in den betreffenden fundamentalen Spektralbereichen.

Fig. 5 zeigt eine weitere Möglichkeit, unterschiedliche spektrale Anteile sichtbaren Anregungslichtes aus einer breitbandigen NIR-Laserquelle zu erzeugen. Die Anordnung dieser Mittel zur Frequenzkonversion im Mikroskopstrahlengang erfolgt wieder analog zu Fig. 1. In diesem Fall sind die verschiedenen periodisch gepolten, nichtlinearen Kristalle 4 in parallelen Teilstrahlengängen angeordnet, welche durch Bandpass- oder Kantenfilter 3a, 3b erzeugt werden. In jedem dieser Strahlengänge erzeugt ein Linsenpaar 11 die notwendige Strahltaille.

In **Fig. 6** ist eine weitere Anordnung als Mittel zur Frequenzkonversion von NIR-Beleuchtungslicht in verschiedene Spektralbereiche des sichtbaren Spektrums zum Zwecke der Fluoreszenzanregung gezeigt. Diese folgt dem Strahlaufteilungsprinzip aus Fig. 5. Jedoch koppeln die Linsenpaare 11 in diesem Fall das Laser-Beleuchtungslicht eines ersten Spektralbereichs im NIR in hoch nichtlineare photonische Kristallfasern 17 ein, worin die Laserpulse über Abstrahlung dispersiver Wellen neue spektral schmalbandige Frequenzkomponenten im sichtbaren zweiten

Spektralbereich erzeugen. Zudem sind die Reflexionseigenschaften der Strahlteiler 3a und 3b komplizierter. Im sichtbaren Teil des Spektrums wirken sie wie dichroitische Bandpässe oder Kantenfilter. Im NIR wirken sie jedoch als Neutralstrahlteiler mit angepasstem Teilungsverhältnis (für den dargestellten Fall wäre beispielsweise ein Teilungsverhältnis von T=0.33/R=0.66 für den Strahlteiler 3a und T=R=0.5 für den Strahlteiler 3b ideal). Die „Leiter" der parallelen Strahlengänge ist in anderen Ausführungsformen (nicht abgebildet) nicht auf drei Sprossen begrenzt sondern nur aufgrund der Leistungsdichte der NIR-Pumplichtquelle limitiert.

Fig. 7 zeigt Mittel zur Frequenzkonversion in Form einer Anordnung zur gleichzeitigen oder sequentiellen Erzeugung spektral schmalbandiger sichtbarer Frequenzkomponenten als Anregungslicht aus Beleuchtungslicht einer breitbandigen NIR-Laserlichtquelle. Dazu fächern zwei optische Elemente 18 den Strahlengang in winkelseparierte Strahlwege auf. Das kann entweder gleichzeitig geschehen, wenn diese optischen Elemente 18 diffraktive optische Elemente (DOE) sind oder sequentiell, wenn es sich um einstellbar ablenkende optische Elemente wie akustooptische Deflektoren (AOD), Galvanoscannerspiegel, elektro-optische Prismen oder verspiegelte Mikro-Opto-Elektro-Mechanische Systeme (MOEMS) handelt.

Die in **Fig. 8** in zwei Ansichten –Teilfigur 8A zeigt eine Seitenansicht, Teilfigur 8B die Draufsicht – dargestellte Anordnung ist als Mittel zur Frequenzkonversion in ihrer Gesamtheit im gemeinsamen Strahlengang C hinter der Detektionslochblende 13 der Fig. 1 angeordnet. Die konfokale Abbildung zwischen Lochblende 13 und Probe 10 schließt sich somit auf der rechten Seite der Abbildung an. Auf der linken Seite wird breitbandiges NIR-Beleuchtungslicht eingestrahlt und trifft zunächst auf ein optisches Element 18, welches entweder ein diffraktives optisches Element (DOE) ist und so eine simultane Winkelauffächerung des Strahls erzeugt oder ein einstellbar ablenkendes optisches Element ist (AOD, MOEMS, Galvanoscanner, EO-Prisma), so dass die Winkelauffächerung zeitlich sequentiell geschieht. Jeder so erzeugte Strahl wird durch eine Linse 11 in eine hoch nichtlineare photonische Kristallfaser 17 eingekoppelt, in der die Laserpulse über Abstrahlung dispersiver Wellen neue, spektral schmalbandige und sichtbare Spektralkomponenten erzeugen. Diese werden über eine zweite Linse 11 kollimiert und gemäß ihrer Wellenlänge auf zugeordnete Positionen innerhalb der Dispersionsebene eines

Prismenspektrometers gerichtet und mit einer Linse 19 dahin abgebildet. In dieser Dispersionsebene ist ein mikrostrukturiertes Spiegelelement 20 angeordnet, welches das erzeugte Anregungslicht in Richtung Abbildungsoptik 21 des Prismenspektrometers lenkt. Die Abbildungsoptik 21 kollimiert das Licht aus der Dispersionsebene und lenkt es in Richtung des Prismas 22, welches sämtliche Anregungslichtanteile auf einen Strahlengang vereinigt, welcher zur Fluoreszenzanregung in Richtung Probe weitergeleitet wird. Aus der Probe stammendes Fluoreszenzlicht wird nun am Prisma 22 in seine spektralen Bestandteile zerlegt und über die Abbildungsoptik 21 in die Dispersionsebene abgebildet, dort aber an dem mikrostrukturierten Spiegelelement 20 ein eine andere Richtung abgelenkt. Das Fluoreszenzlicht wird dann über ein Linsenpaar 23 kollimiert und auf einen Zeilendetektor 15a abgebildet. Zudem ist ein Sperrfilter 14 für zurückgestreutes Laserlicht vorgesehen. Das zur Strahlteilung von Fluoreszenz und Laserlicht vorgesehene mikrostrukturierte Spiegelelement 20 kann in dieser Anordnung verschiedene Ausführungsformen annehmen, bei denen die geometrische Anordnung der Anregungs-, Detektions- und Beleuchtungsstrahlengänge jeweils anzupassen ist. Das Spiegelelement 20 kann beispielsweise ein MOEMS, eine verschiebbare oder tauschbare Maske mit Mikrospiegeln zur Reflexion von Laserlicht oder ein verschiebbarer oder tauschbarer Spiegel mit Transmissionsfenstern zur Transmission von Anregungslicht sein. Der letztgenannte Fall ist in der Abbildung dargestellt. Zudem sind die spektralen Eigenschaften des erzeugten Laserlicht im Zusammenspiel mit der spektralen Auflösung des Prismenspektrometers für das Funktionieren der Anordnung von Bedeutung und müssen aufeinander angepasst sein. Eine Fehlanpassung führt zu chromatischen Winkelfehlern auf dem gemeinsamen Beleuchtungsstrahl und entsprechend zu lateralen chromatischen Fehlern bei der Abbildung in der Probe 10.

In **Fig. 9** ist eine Modifikation der Anordnung aus Fig. 8 dargestellt, in der die Faserausgänge der unterschiedlichen Fasern 17 mit GRIN-Optiken 24 so versehen sind, dass die Ausgangsaperturen der Fasern identisch sind. Damit kann die Abbildungsoptik des sich anschließenden Spektrometers so auf die erzeugte Ausgangsapertur der photonischen Kristallfasern angepasst werden, dass sämtliche erzeugten Wellenlängen identische Strahlradien erzeugen. Zudem erfolgt die Strahlteilung von Fluoreszenz und Anregungslicht an einer verspiegelten Platte als

strukturiertes Spiegelelement 20, die in der Dispersionsebene des Prismenspektrometers angeordnet ist. In diese Platte sind an den Positionen, die den erzeugten Wellenlängen entsprechen, Löcher eingebracht, in die die GRIN-Optiken 24 der Faserausgänge eingeklebt sind. Dieser Bereich der Abbildung ist zusätzlich vergrößert dargestellt (durch unterbrochene Umrandung markiert).

In **Fig. 10** ist eine mögliche Anordnung zur simultanen Einkopplung von breitbandiger NIR-Laserstrahlung in verschiedene Fasereingänge gezeigt, welche in einem Bündel angeordnet sind. Dazu wird mit zwei Teleskopen, bestehend beispielsweise aus den Linsen 25 und 26, der Strahl aufgeweitet und wieder zusammengefasst. In dem aufgeweiteten Strahlengang ist eine zweidimensionale, bei Bedarf programmierbare Phasenmaske 27 angeordnet. Die Phasenmanipulation erfolgt hier genau so, dass in der Brennebene der Linse 11 mehrere Fokusse an den Positionen der verschiedenen Faserkerne entstehen. Besonders vorteilhaft ist dann eine programmierbare Phasenmaske 27, da diese das schnelle Schalten zwischen den Lichtwegen ermöglicht, wenn beispielsweise nicht alle zur Verfügung stehenden Fasern genutzt werden sollen. Zudem ist in gewissen Grenzen auch ein Einstellen der in jede individuelle Faser eingestrahlten Lichtintensität möglich. Es kann sich bei der Phasenmaske 27 beispielsweise um einen räumlichen Lichtmodulator (engl. „spatial light modulator“, SLM) handeln, der die Phase nur verzögert, nicht aber die Amplitude verändert. Die Auskopplung und Zusammenfassung des sichtbaren Anregungslichtes erfolgt dann gemäß einer der zuvor vorgestellten Anordnungen. Die Anordnung gemäß Fig. 10 kann beispielsweise anstelle des optischen Elements 18 und der Linsen 11 und der Fasern 17 in der Anordnung gemäß Fig. 8 oder Fig. 9 eingesetzt werden. Die Fasereingänge sind dann (anders als in Fig. 8/9 dargestellt) zu bündeln.

Die Faserausgänge brauchen nicht notwendigerweise zu einem Bündel zusammengefasst zu sein. Das gilt auch für den Einsatz in anderen Anordnungen als denen nach Fig. 8/9. Die Faserausgänge können beispielsweise wie in Fig. 8 über eine Kombination aus Linsen 11/19 zunächst kollimiert werden. (In einer Anordnung nach Fig. 8 würde das austretende Licht mit diesen Linsen an die richtige Position auf dem Spiegelelement 20 fokussiert werden.) Alternativ kann wie in Fig. 9 jeder Faserausgang eine eigene GRIN-Linse (wie in Fig. 9) aufweisen. (In einer Anordnung

nach Fig. 9 würden die Ausgänge entsprechend an den Löcher im Spiegelelement 20 angeordnet.)

Sofern die Phasenmaske 27 programmierbar ist, ist sie zweckmäßigerweise mit einer Steuereinheit (nicht abgebildet) verbunden, welcher zur Umprogrammierung der Phasenmaske 27 eingereichtet ist. Es kann sich beispielsweise um die Steuereinheit handeln, die zur Steuerung der anderen einstellbaren Komponenten eines Mikroskops mit diesen verbunden ist.

Fig. 11 zeigt, wie die in Fig. 10 gezeigte Anordnung auch in einer Anordnung gemäß Fig. 1 als Mittel zur Frequenzkonversion eingesetzt werden kann. Das geschieht analog zu den alternativen Anordnungen nach Fig. 4-7 im gemeinsamen Abschnitt des Mikroskopstrahlengangs (der Übersichtlichkeit halber nicht abgebildet). Zu diesem Zweck ist eine zweite Anordnung gemäß Fig. 10 auf der anderen Seite der photonischen Fasern 17 vorgesehen, die eine umgekehrte Reihenfolge der optischen Elemente aufweist. Dadurch wird der auf der einen Seite der Fasern 17 aufgeteilte Strahl auf der anderen Seite wieder vereinigt. Die Phasenmasken 27 sind dabei aufgrund der Frequenzkonversion zwischen ihnen unterschiedlich beschaltet/programmiert.

Für alle Ausführungsformen gilt, dass eine Feinabstimmung der erzeugten Wellenlängen des Anregungslichts über ein Abstimmen der Fundamentalwellenlänge des Beleuchtungslichts vorgenommen werden kann. Dadurch kann beispielsweise die Anzahl der notwendigen hoch nichtlinearen photonischen Kristallfasern begrenzt werden, um den gesamten sichtbaren Spektralbereich prinzipiell abdeckbar zu machen.

Bezugszeichenliste

1	Lichtquelle
2	AOTF
3	Hauptstrahlteiler
4	Nichtlinearer Kristall
5	NIR-Sperrfilter
6	Einstellbare Ablenkspiegel
7	Scan-Objektiv
8	Tubuslinse
9	Mikroskopobjektiv
10	Probe
11	4f-Linsenanordnung
12	4f-Linsenanordnung
13	Konfokale Blende
14	Kerbfilter für Anregungslicht
15	Detektor
16	Nichtlineare Wellenleiter
17	Photonische Kristallfaser
18	Optisches Element
19	Linse
20	Strukturiertes Spiegelelement
21	Abbildungsoptik des Prismenspektrometers
22	Prisma
23	Linsenpaar
24	GRIN-Optik
25	Linse
26	Linse

B	Beleuchtungsstrahlengang
C	Gemeinsamer Strahlengang
D	Detektionsstrahlengang

Patentansprüche

1. Konfokales Rastermikroskop zur Fluoreszenzanregung mittels Anregungslicht, aufweisend einen Beleuchtungsstrahlengang (B), einen Detektionsstrahlengang (D), einen Hauptstrahlteiler (3, 20), der einen Teil des Beleuchtungsstrahlengangs (B) und einen Teil des Detektionsstrahlengangs (D) zu einem gemeinsamen Strahlengang (C) koppelt, und eine einstellbare Ablenkeinheit (6) im gemeinsamen Strahlengang (C), **dadurch gekennzeichnet**, dass im gemeinsamen Strahlengang (C) Mittel (4, 16, 17) zur Frequenzkonversion und im Detektionsstrahlengang (D) zusätzlich zum Hauptstrahlteiler ein Filter (14) für Anregungslicht angeordnet sind.

2. Mikroskop nach Anspruch 1, wobei der Hauptstrahlteiler ein spektraler Kantenfilter ist.

3. Mikroskop nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Mittel zur Frequenzkonversion als mindestens ein optisch nichtlineares Medium ausgebildet sind, insbesondere zur Konversion von infrarotem Licht in sichtbares Licht.

4. Mikroskop nach dem vorhergehenden Anspruch, wobei das optisch nichtlineare Medium in einer Brennebene des gemeinsamen Strahlengangs oder zumindest im Bereich einer solchen Brennebene angeordnet ist, insbesondere im Zentrum einer 4f-Anordnung.

5. Mikroskop nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei in dem Detektionsstrahlengang, insbesondere im gemeinsamen Strahlengang, eine Blende, insbesondere eine Lochblende oder eine Schlitzblende, konfokal angeordnet ist.

6. Mikroskop nach dem vorhergehenden Anspruch, wobei die konfokale Blende durch die Mittel zur Frequenzkonversion gebildet ist.

7. Mikroskop nach einem der vorhergehenden Ansprüche mit einer in dem Beleuchtungsstrahlengang angeordneten, durchstimmbaren Lichtquelle zur

Emission mindestens eines von mehreren unterschiedlichen ersten Spektralbändern, insbesondere unterschiedlichen infraroten Spektralbändern, wobei der Filter für das Anregungslicht zum Sperren mindestens eines von verschiedenen zweiten Spektralbändern, die durch die Frequenzkonversion aus den ersten Spektralbändern entstehen, einstellbar ist.

8. Mikroskop nach dem vorhergehenden Anspruch, wobei der Filter zum Einstellen eines der zu sperrenden zweiten Spektralbänder gegenüber dem Detektionsstrahlengang verkippbar ist, insbesondere mit einer Antriebseinheit zum definierten Verkippen des Filters.

9. Mikroskop nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Beleuchtungsstrahlengang zum Einstellen unterschiedlicher spektraler Bänder des Beleuchtungslichts einen einstellbaren Filter, insbesondere einen akustooptischen einstellbaren Filter, umfasst.

10. Mikroskop nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Mittel zur Frequenzkonversion verbunden sind mit einem Antrieb zum Bewegen der Mittel zur Frequenzkonversion aus dem gemeinsamen Strahlengang heraus und in den gemeinsamen Strahlengang hinein, insbesondere zum alternativen Einfahren eines von mehreren unterschiedlichen Mitteln zur Frequenzkonversion in den gemeinsamen Strahlengang.

11. Mikroskop nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Mittel zur Frequenzkonversion mindestens eines der folgenden Elemente umfassen: periodisch gepolter nichtlinearer Kristall, periodisch gepolter nichtlinearer Lichtwellenleiter, nichtlineare photonische Kristallfaser.

12. Mikroskop nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der gemeinsame Strahlengang zusätzlich zur Ablenkeinheit einstellbar ablenkende optische Elemente zur zeitlich sequentiellen Auffächerung des Strahlengangs und zur Wiederzusammenführung des Strahlengangs aufweist.

13. Mikroskop nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Hauptstrahlteiler eine zweidimensionale Matrix aus mikro-opto-mechanischen Systemen oder eine zweidimensionale Mikrospiegelmatrix oder ein Spiegel mit mindestens einem Transmissionsfenster ist.

14. Betriebsverfahren für ein konfokales Rastermikroskop zur Fluoreszenzanregung, wobei mittels einer Lichtquelle in einem ersten Spektralband emittiertes Beleuchtungslicht entlang eines Beleuchtungsstrahlengangs über einen Hauptstrahlteiler in einen mit einem Detektionsstrahlengang gemeinsamen Strahlengang eingekoppelt und in dem gemeinsamen Strahlengang in Mitteln zur Frequenzkonversion als Anregungslicht in ein anderes Spektralband konvertiert und über eine Ablenkeinheit und ein Objektiv zu einer Probe geleitet wird, von wo Licht über das Objektiv entlang des gemeinsamen Strahlengang aufgenommen und über den Hauptstrahlteiler sowie durch einen Filter für das Anregungslicht zu einem Detektor geleitet und dort optoelektronisch gewandelt wird, insbesondere mit Einstellung einer durchstimmbaren Lichtquelle auf eines von mehreren ersten Spektralbändern und Einstellung des Filters für das Anregungslicht auf korrespondierende zweite Spektralbänder.

15. Computerprogramm oder Steuereinheit für ein konfokales Rastermikroskop, eingerichtet zur Durchführung eines Verfahrens nach dem vorhergehenden Anspruch.

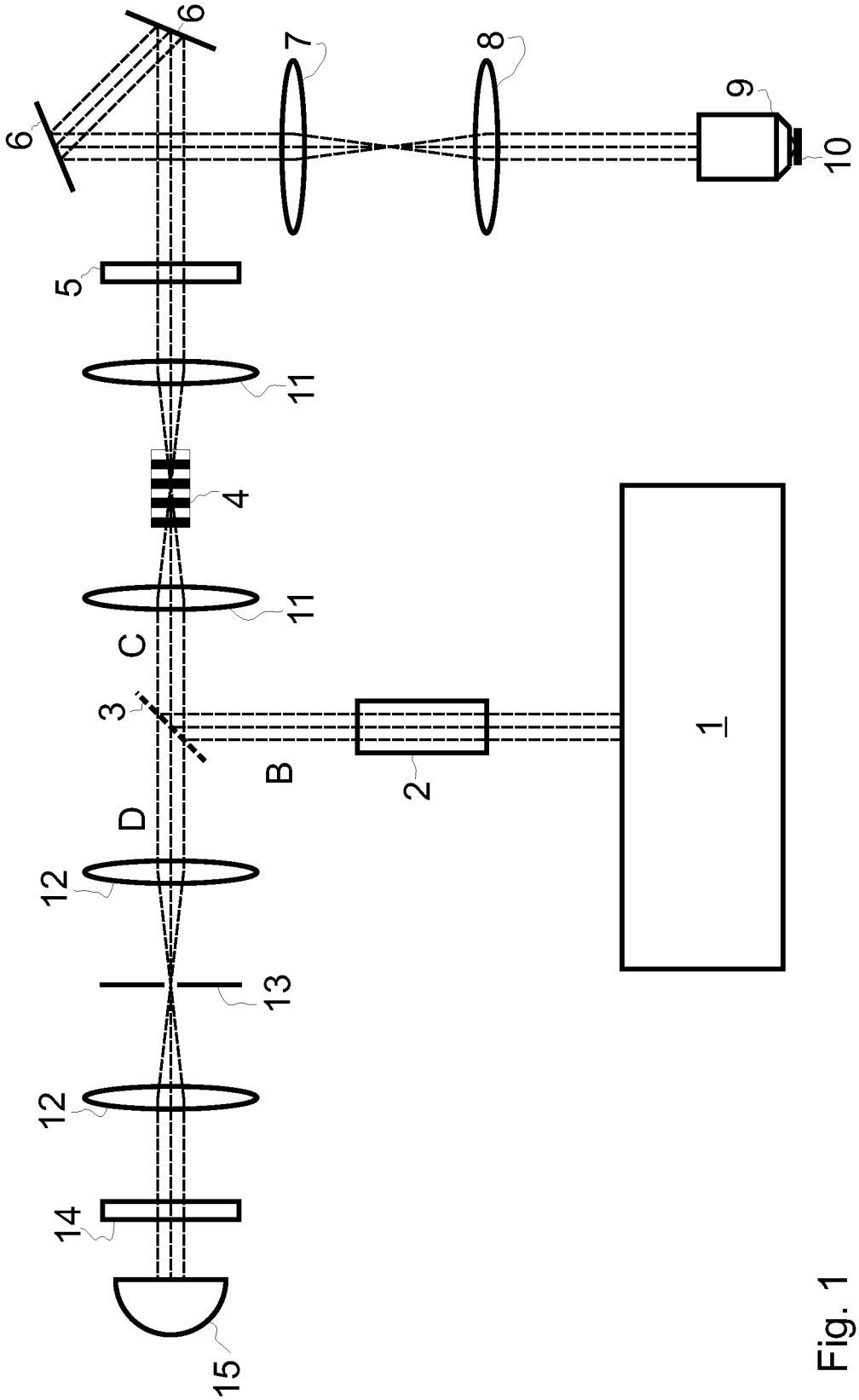


Fig. 1

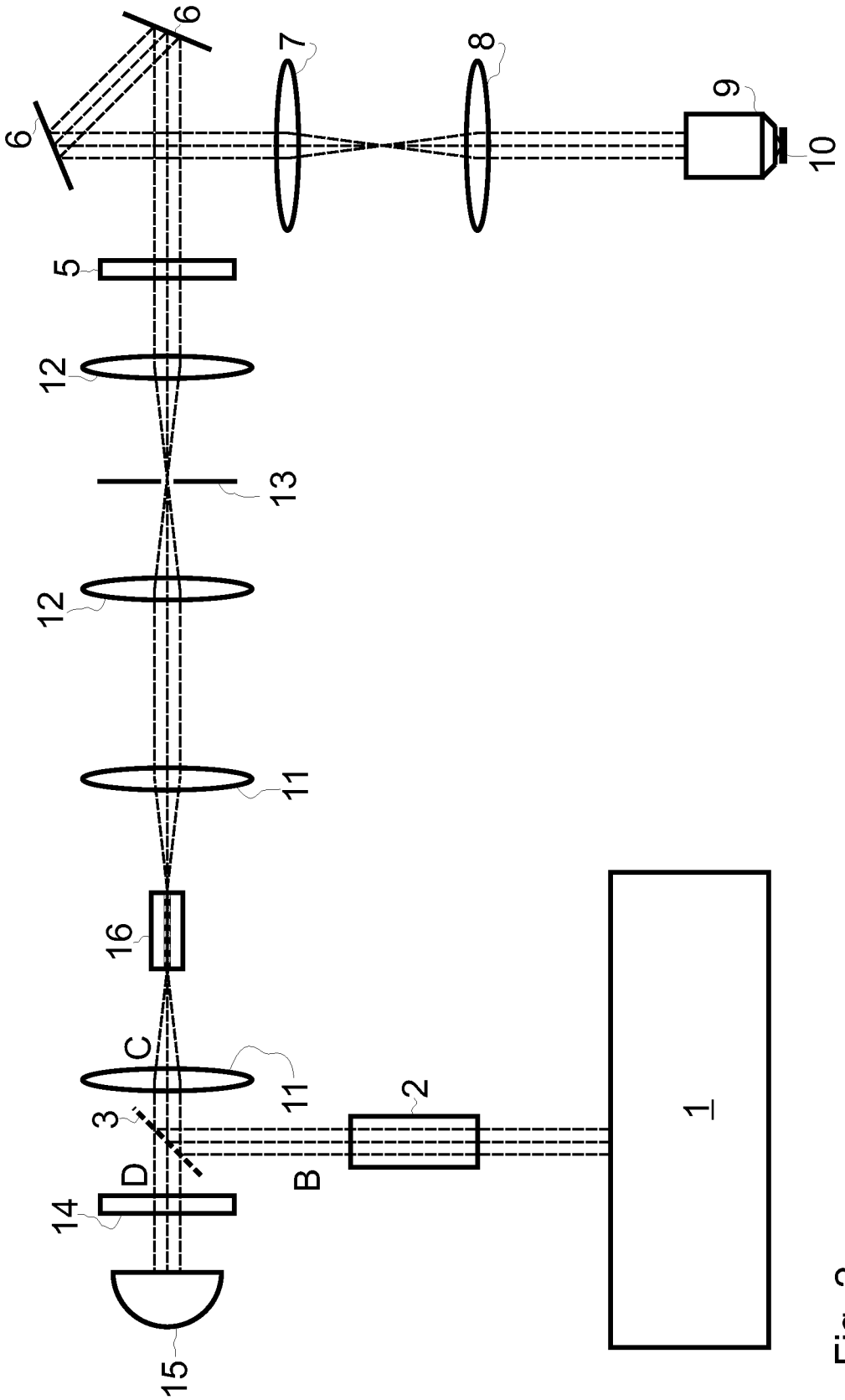


Fig. 2

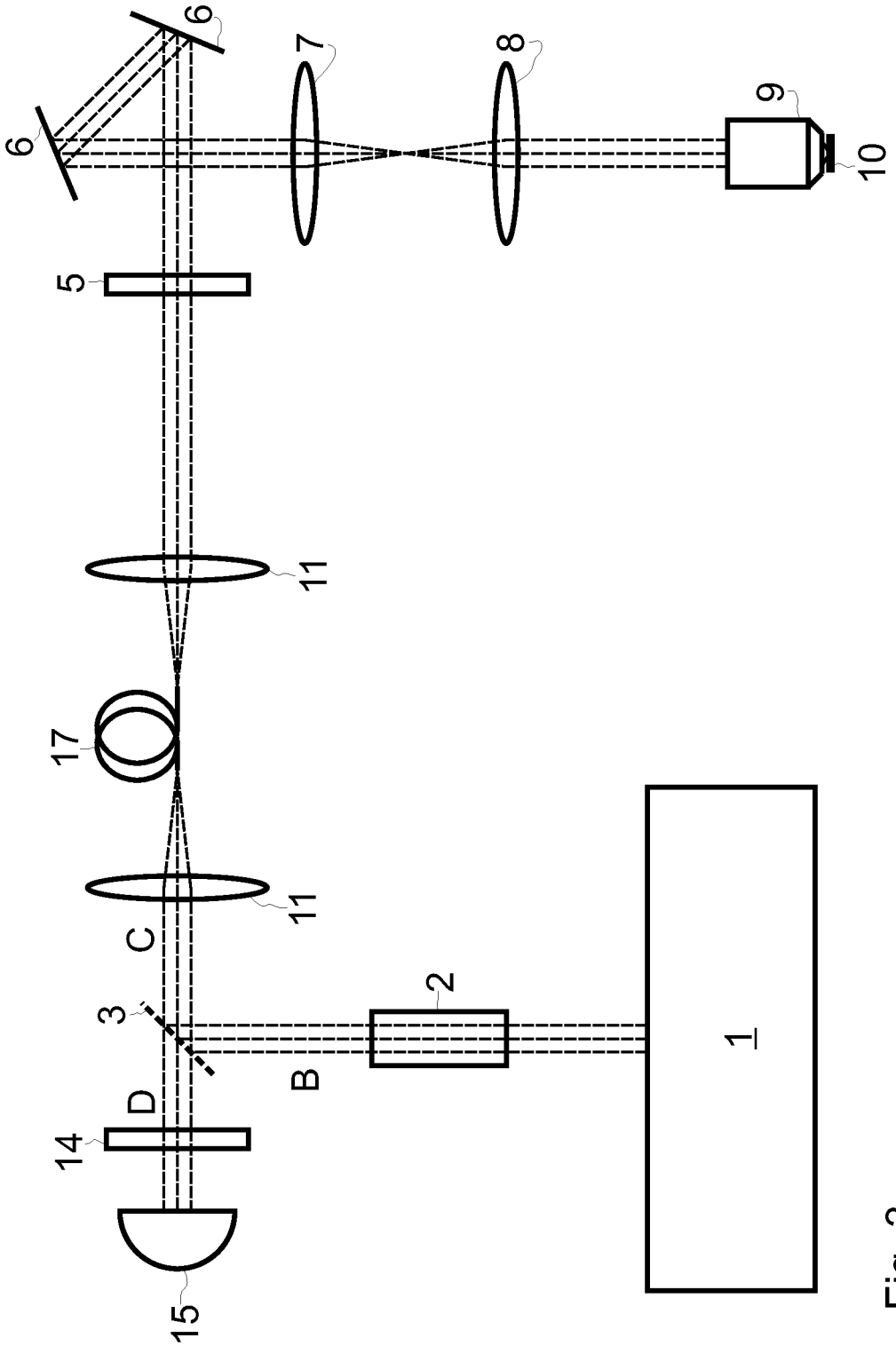


Fig. 3

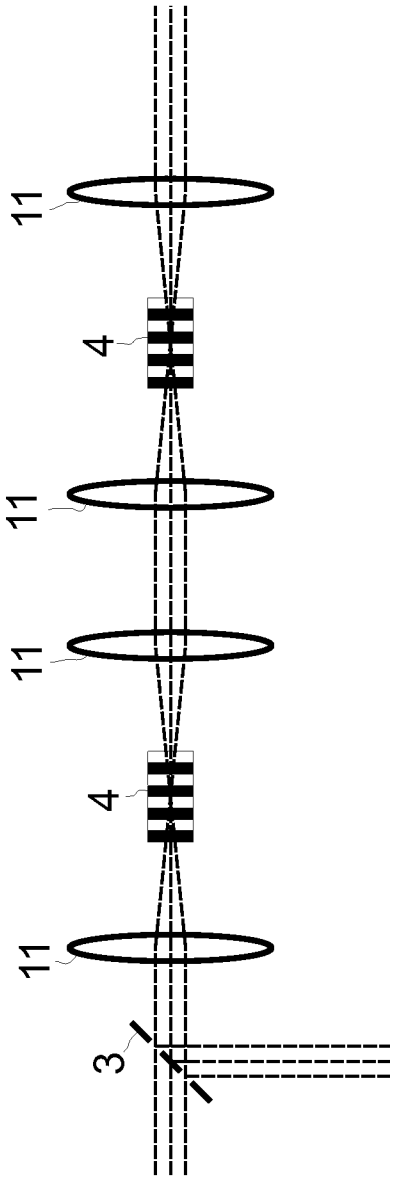


Fig. 4a

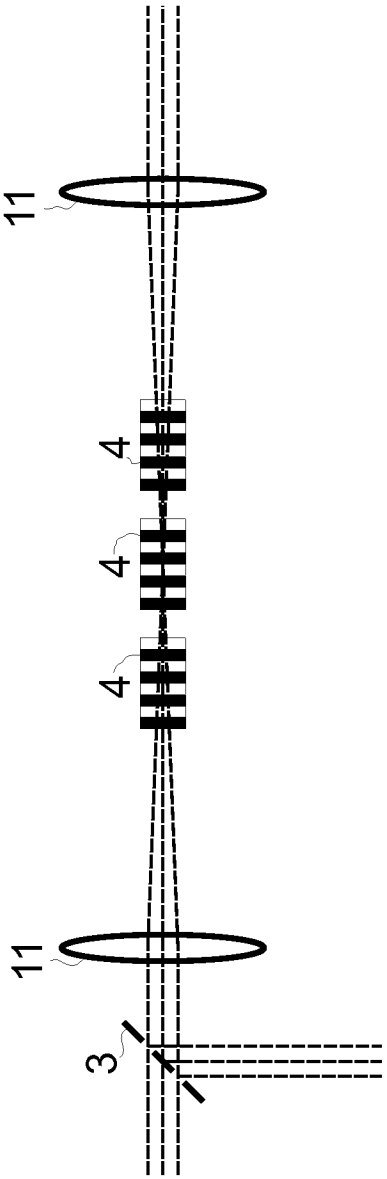


Fig. 4b

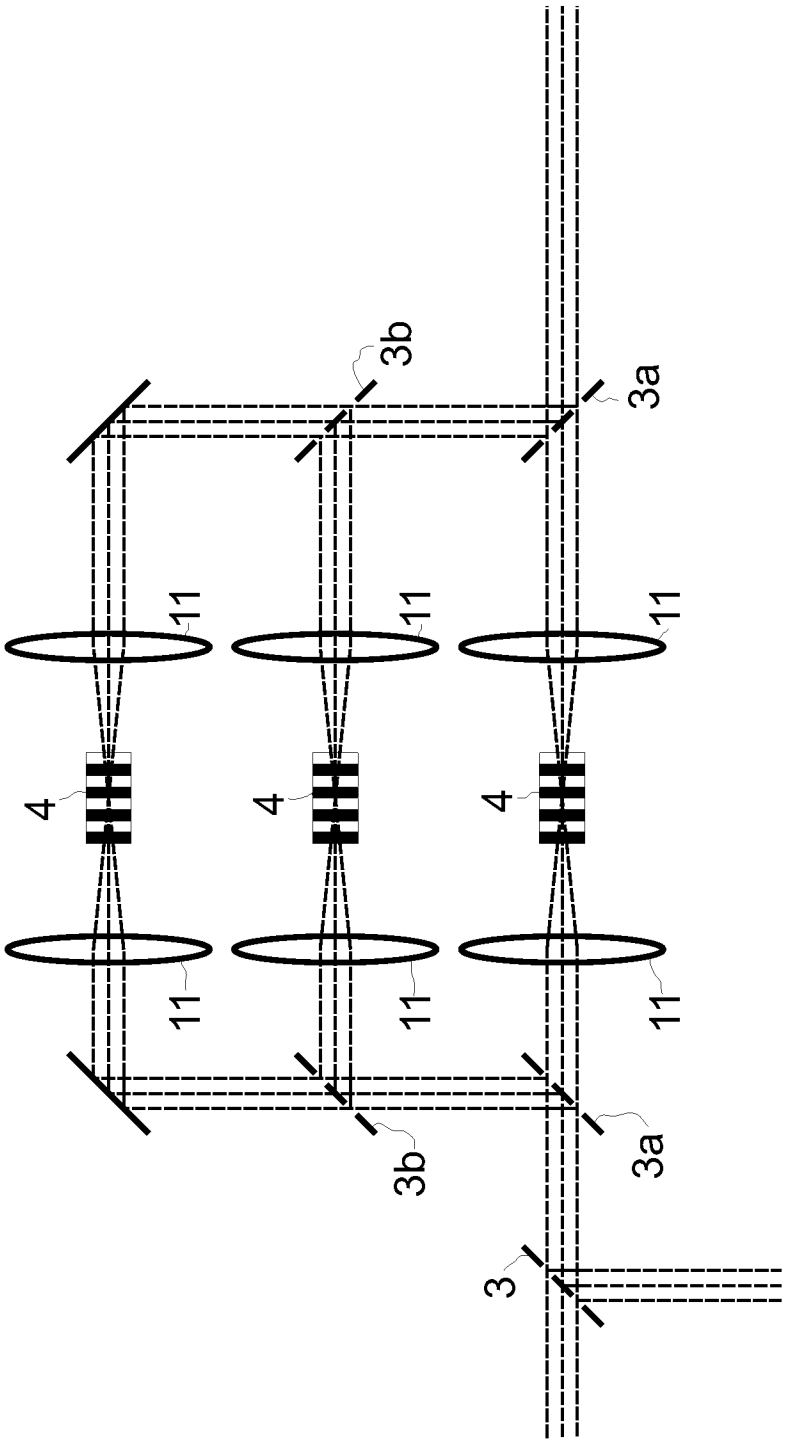


Fig. 5

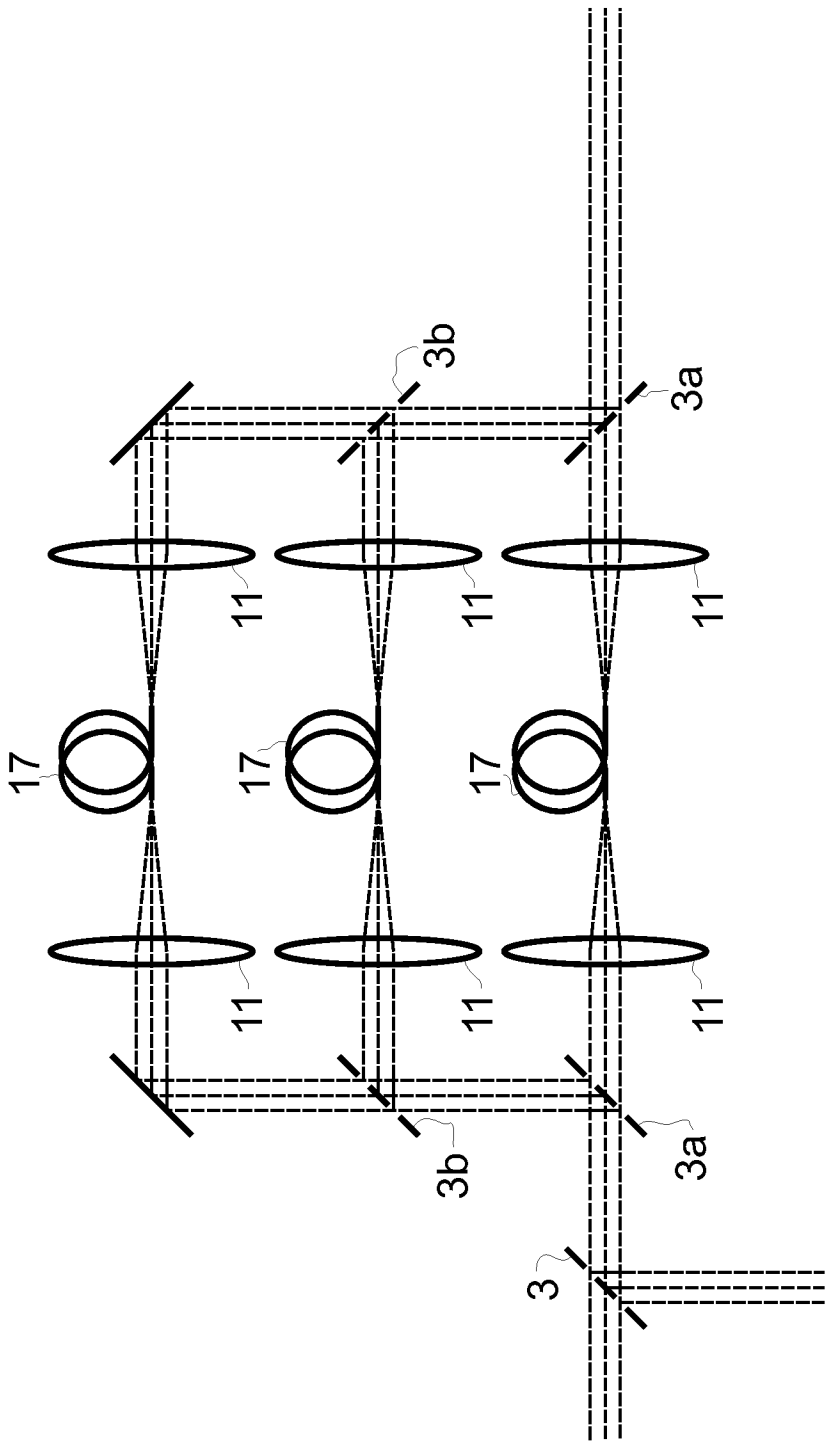


Fig. 6

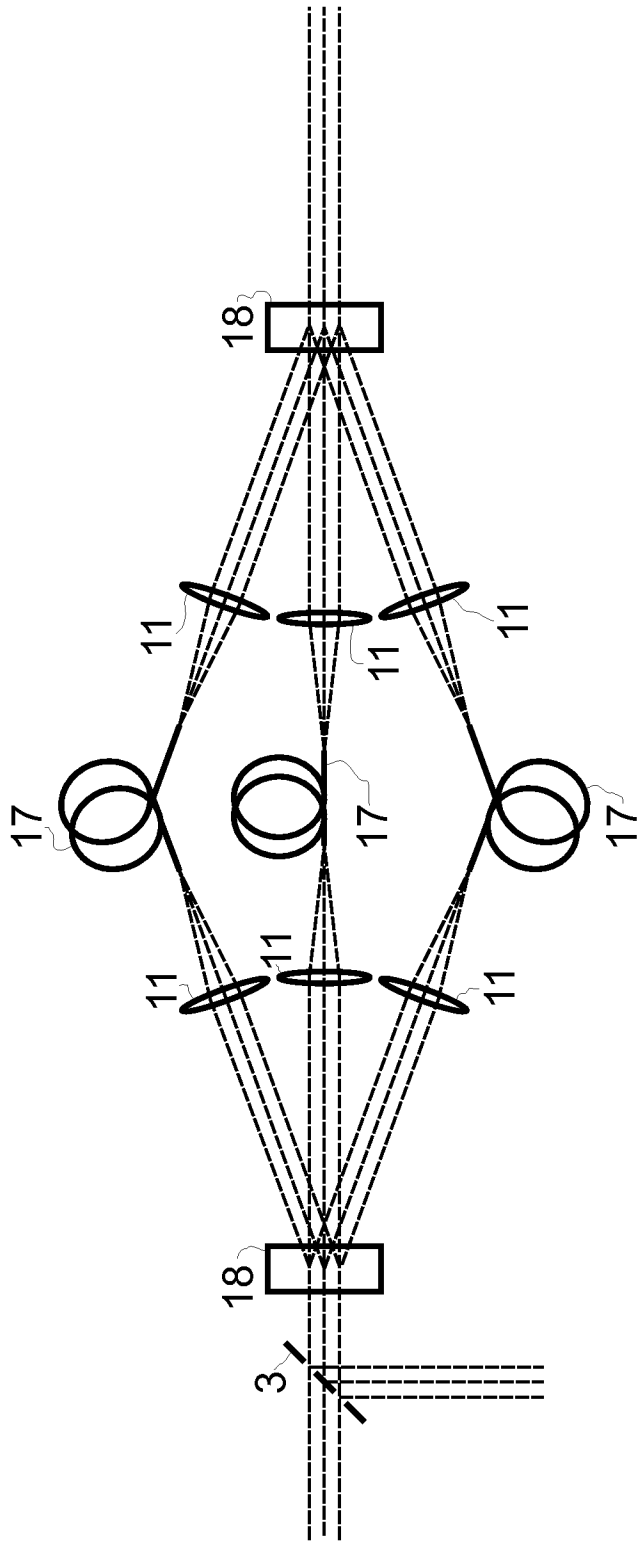


Fig. 7

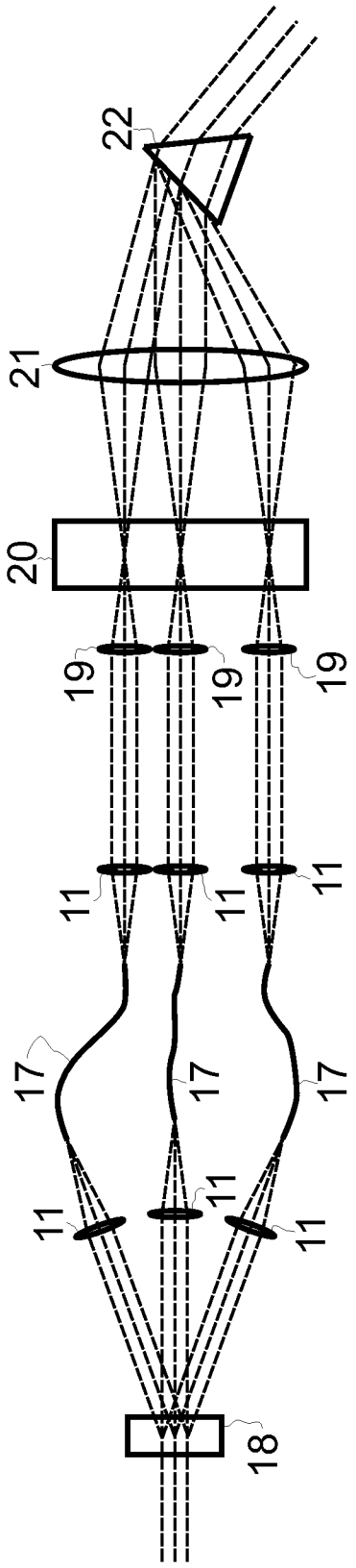

22
21
20
19
19
19
11
11
11
17
17
17
11
11
11
18

Fig. 8A

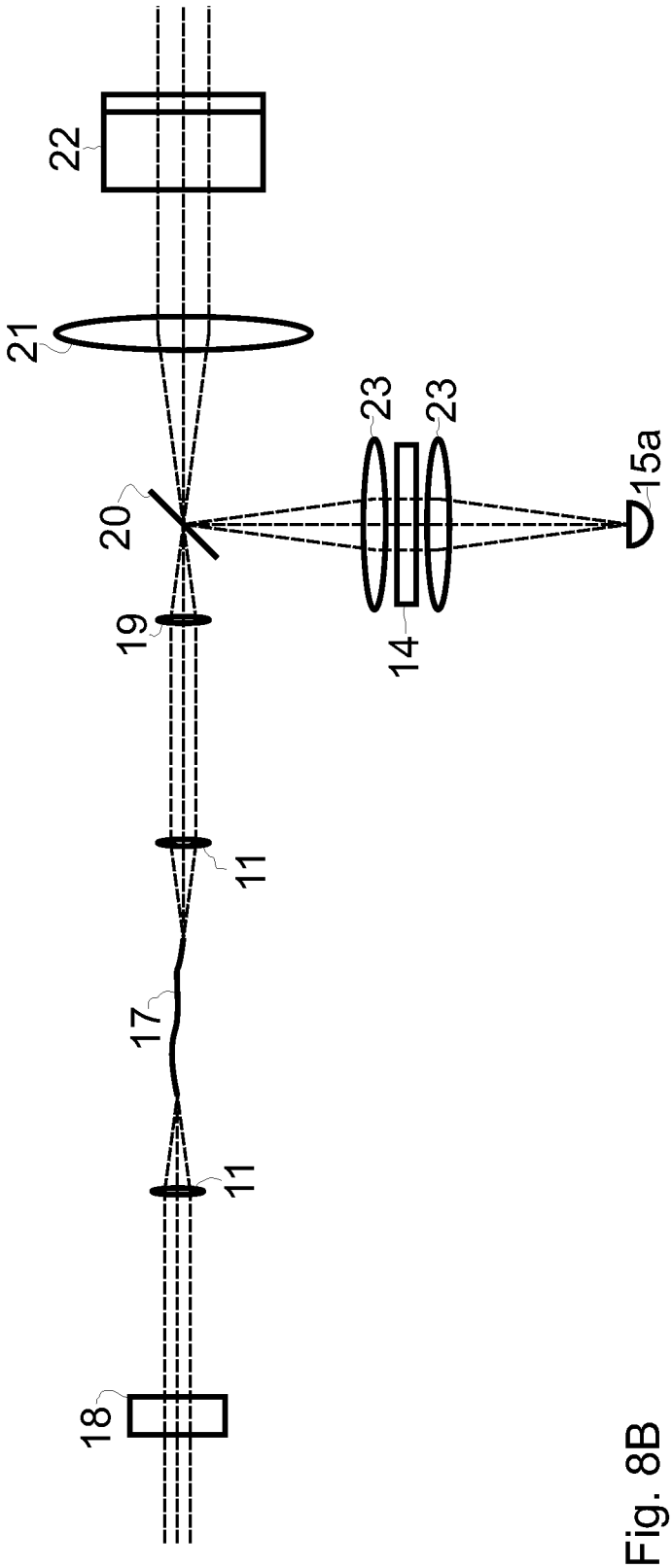

22
21
23
23
15a
20
19
14
11
17
11
18

Fig. 8B

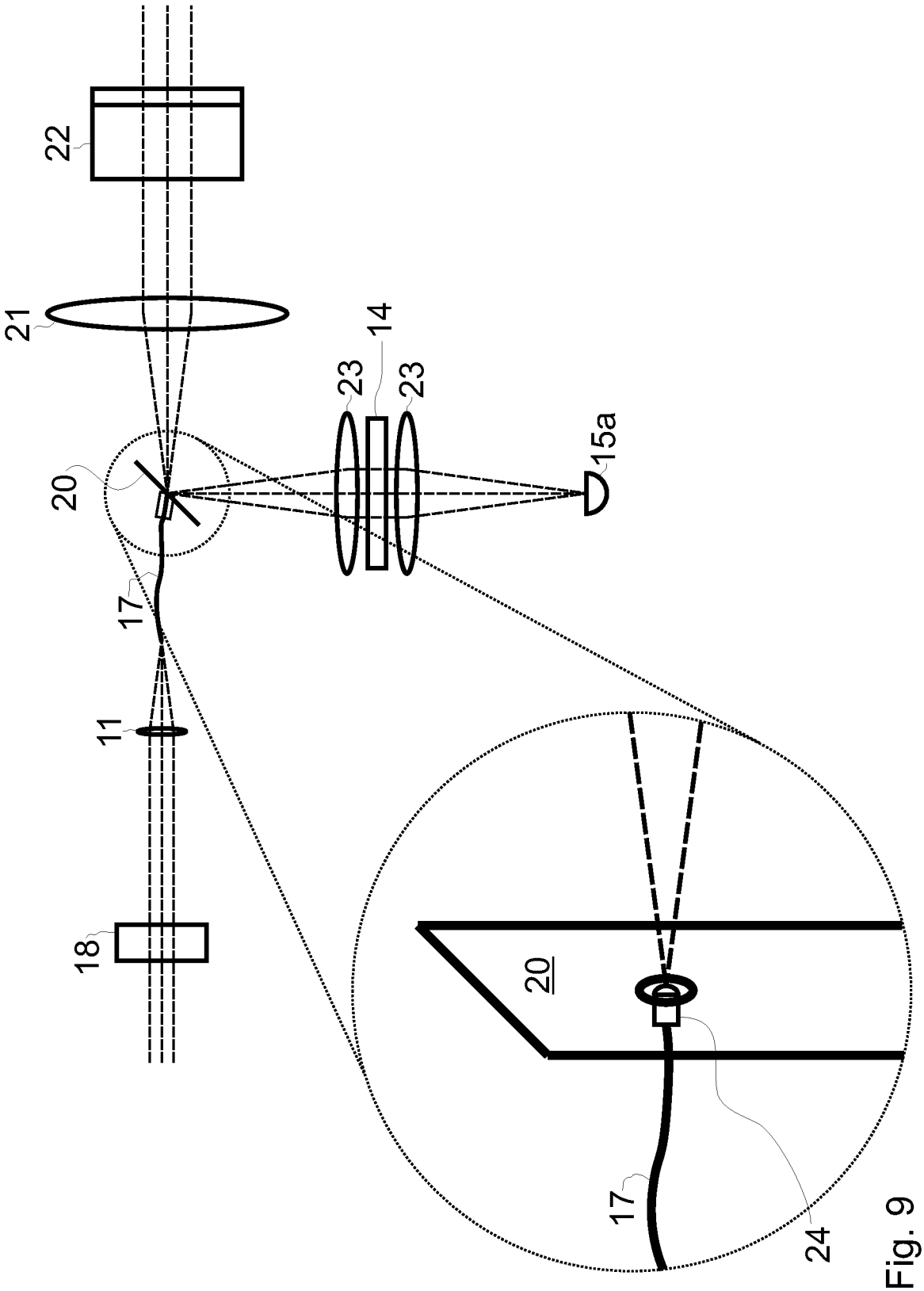


Fig. 9

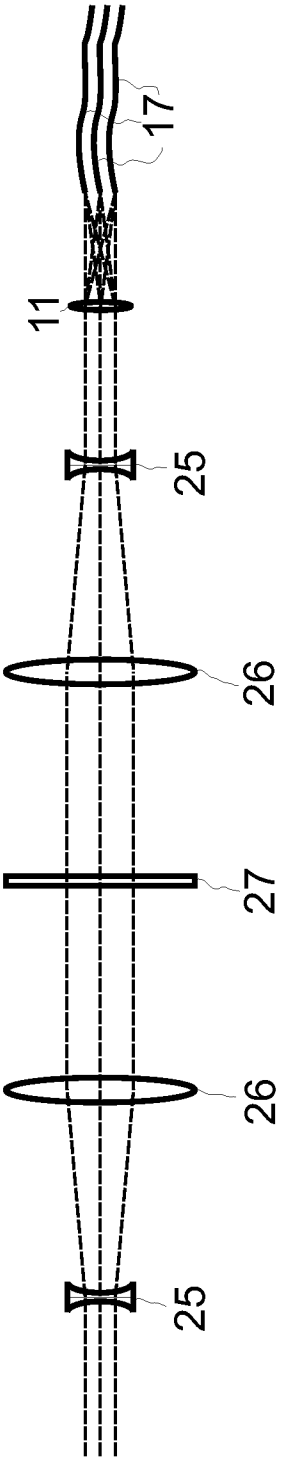


Fig. 10

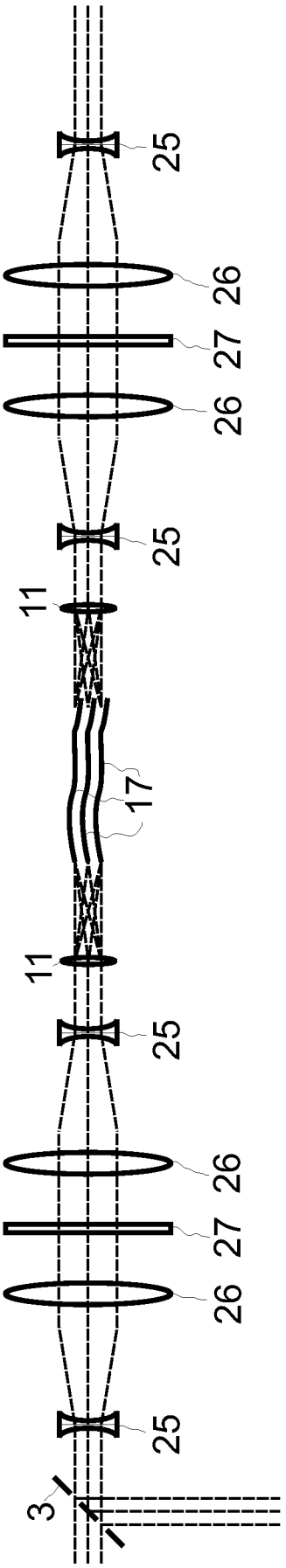


Fig. 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/063125

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

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G02B 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.
X	WO 2008/053190 A1 (SECRETARY TRADE IND BRIT [GB]; ALASTAIR SINCLAIR [GB]) 8 May 2008 (2008-05-08) the whole document -----	1-6, 10-15
A	MYAING M T ET AL: "Enhanced two-photon biosensing with double-clad photonic crystal fibers", OPTICS LETTERS, OSA, OPTICAL SOCIETY OF AMERICA, WASHINGTON, DC, US, vol. 28, no. 14, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 1224-1226, XP003005553, ISSN: 0146-9592, DOI: 10.1364/OL.28.001224 the whole document -----	1-15
	-/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] 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
27 September 2012	08/10/2012

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	Windecker, Robert

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/063125

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 1 959 292 A2 (OLYMPUS CORP [JP]) 20 August 2008 (2008-08-20) abstract; figures paragraph [0015] - paragraph [0026] -----	1-15
A	US 6 282 020 B1 (OGINO KATSUMI [JP]) 28 August 2001 (2001-08-28) figures 1-3 abstract column 5, line 30 - column 7, line 36 -----	1-15

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2012/063125

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008053190 A1	08-05-2008	EP 2087390 A1	12-08-2009
		JP 2010508542 A	18-03-2010
		US 2011199676 A1	18-08-2011
		WO 2008053190 A1	08-05-2008
EP 1959292 A2	20-08-2008	EP 1959292 A2	20-08-2008
		JP 2008225454 A	25-09-2008
		US 2008192339 A1	14-08-2008
US 6282020 B1	28-08-2001	JP 2001117007 A	27-04-2001
		US 6282020 B1	28-08-2001

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2012/063125

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

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
G02B 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.
X	WO 2008/053190 A1 (SECRETARY TRADE IND BRIT [GB]; ALASTAIR SINCLAIR [GB]) 8. Mai 2008 (2008-05-08) das ganze Dokument -----	1-6, 10-15
A	MYAING M T ET AL: "Enhanced two-photon biosensing with double-clad photonic crystal fibers", OPTICS LETTERS, OSA, OPTICAL SOCIETY OF AMERICA, WASHINGTON, DC, US, Bd. 28, Nr. 14, 1. Januar 2003 (2003-01-01), Seiten 1224-1226, XP003005553, ISSN: 0146-9592, DOI: 10.1364/OL.28.001224 das ganze Dokument -----	1-15

-/--

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen [X] 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
27. September 2012	08/10/2012

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	Windecker, Robert

1

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 1 959 292 A2 (OLYMPUS CORP [JP]) 20. August 2008 (2008-08-20) Zusammenfassung; Abbildungen Absatz [0015] - Absatz [0026] -----	1-15
A	US 6 282 020 B1 (OGINO KATSUMI [JP]) 28. August 2001 (2001-08-28) Abbildungen 1-3 Zusammenfassung Spalte 5, Zeile 30 - Spalte 7, Zeile 36 -----	1-15

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2012/063125

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2008053190 A1	08-05-2008	EP 2087390 A1	12-08-2009
		JP 2010508542 A	18-03-2010
		US 2011199676 A1	18-08-2011
		WO 2008053190 A1	08-05-2008
EP 1959292 A2	20-08-2008	EP 1959292 A2	20-08-2008
		JP 2008225454 A	25-09-2008
		US 2008192339 A1	14-08-2008
US 6282020 B1	28-08-2001	JP 2001117007 A	27-04-2001
		US 6282020 B1	28-08-2001