(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
28. Februar 2019 (28.02.2019)

WIPO | PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2019/038404 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
G02B 21/00 (2006.01) *G02B 26/10* (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2018/072816

(22) Internationales Anmeldedatum:
23. August 2018 (23.08.2018)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2017 119 479.7
25. August 2017 (25.08.2017) DE

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

(72) Erfinder: **ANHUT, Tiemo**; Rothirschweg 1, 07749 Jena (DE). **WALD, Matthias**; Hinter dem Spielberge 1, 07751 Jena (DE). **SCHWEDT, Daniel**; Prellerstraße 9, 99423 Weimar (DE). **KAUFHOLD, Tobias**; Fuchsturmweg 15, 07749 Jena (DE). **BÖHME, Beate**; Am Schloßberg 25, 07751 Großpürschütz (DE).

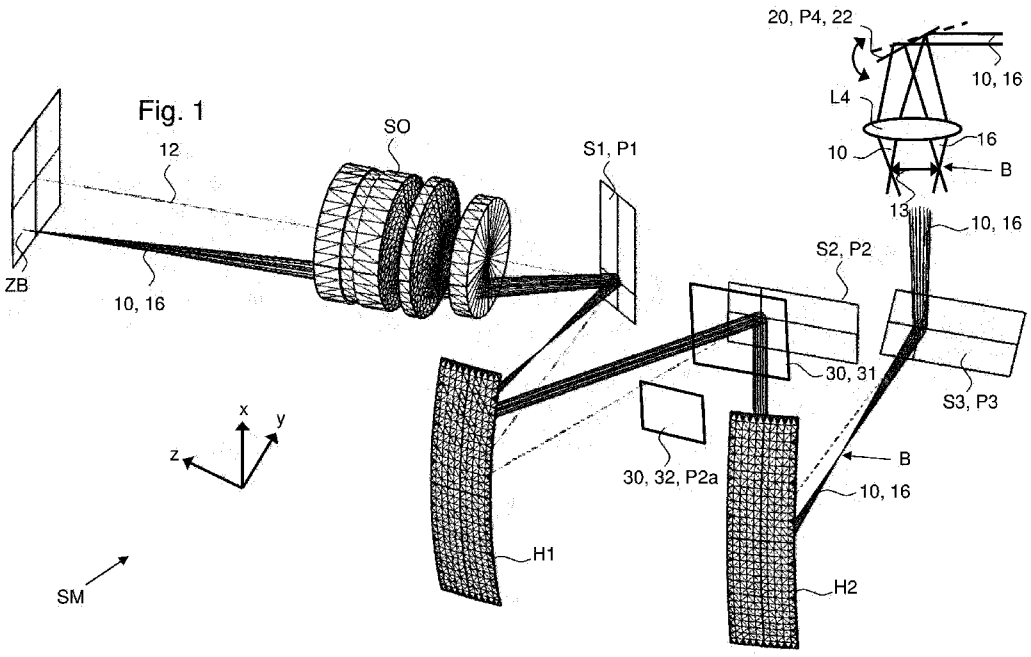
(74) Anwalt: **SCHIFFER, Axel**; Rundfunkplatz 2, 80335 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, 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,

(54) **Title:** OPTICAL ASSEMBLY FOR SCANNING EXCITATION RADIATION AND/OR MANIPULATION RADIATION IN A LASER SCANNING MICROSCOPE, AND LASER SCANNING MICROSCOPE

(54) **Bezeichnung:** OPTISCHE ANORDNUNG ZUM SCANNEN VON ANREGUNGSSTRAHLUNG UND/ODER MANIPULATIONSSTRAHLUNG IN EINEM LASER-SCANNING-MIKROSKOP UND LASER-SCANNING-MIKROSKOP

Fig. 1



(57) **Abstract:** The invention relates to an optical assembly for scanning excitation radiation and/or manipulation radiation in a laser scanning microscope. The optical assembly according to the invention is characterized in that in addition to a first and a second focusing device, a third focusing device is provided in order to generate a third pupil plane which is optically conjugated to a first pupil plane, a third beam deflecting device is arranged on the third pupil plane in order to deflect the excitation radiation and/or manipulation radiation, a first beam deflecting means is provided between the second focusing device and the second pupil plane and the second pupil plane

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2019/038404 A1

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).

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

— *Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv)*

Veröffentlicht:

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

and the third focusing device in order to deflect the excitation radiation and/or manipulation radiation coming from the third focusing device while bypassing the second beam deflecting device in the direction of the second focusing device, a fourth focusing device is provided for generating a fourth pupil plane which is optically conjugated to the third pupil plane, and a variable second beam deflecting means is arranged on the fourth pupil plane in order to switch an optical beam path between a first beam path and a second beam path. The invention additionally relates to a laser scanning microscope.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft eine optische Anordnung zum Scannen von Anregungsstrahlung und/oder Manipulationsstrahlung in einem Laser-Scanning-Mikroskop. Die erfindungsgemäße optische Anordnung ist dadurch gekennzeichnet, dass, zusätzlich zu einer ersten und einer zweiten fokussierenden Einrichtung eine dritte fokussierende Einrichtung vorhanden ist zum Erzeugen einer dritten Pupillenebene, die zu einer ersten Pupillenebene optisch konjugiert ist, dass in der dritten Pupillenebene eine dritte Strahlumlenkeinrichtung angeordnet ist zum Umlenken der Anregungsstrahlung und/oder Manipulationsstrahlung, dass zwischen der zweiten fokussierenden Einrichtung und der zweiten Pupillenebene einerseits und der zweiten Pupillenebene und der dritten fokussierenden Einrichtung andererseits ein erstes Strahlumlenkmittel vorhanden ist zum Umlenken der von der dritten fokussierenden Einrichtung kommenden Anregungsstrahlung und/oder Manipulationsstrahlung unter Umgehung der zweiten Strahlumlenkeinrichtung in Richtung der zweiten fokussierenden Einrichtung, dass eine vierte fokussierende Einrichtung zum Erzeugen einer vierten Pupillenebene vorhanden ist, die zur dritten Pupillenebene optisch konjugiert ist, dass in der vierten Pupillenebene ein variables zweites Strahlumlenkmittel angeordnet ist zum Umschalten eines optischen Strahlengangs zwischen einem ersten Strahlweg und einem zweiten Strahlweg. Die Erfindung betrifft außerdem ein Laser-Scanning-Mikroskop.

Optische Anordnung zum Scannen von Anregungsstrahlung und/oder Manipulationsstrahlung in einem Laser-Scanning-Mikroskop und Laser-Scanning-Mikroskop

Die vorliegende Erfindung betrifft in einem ersten Gesichtspunkt eine optische Anordnung zum Scannen von Anregungsstrahlung und/oder Manipulationsstrahlung in einem Laser-Scanning-Mikroskop nach dem Oberbegriff des Anspruchs 1. In einem weiteren Gesichtspunkt bezieht sich die Erfindung auf ein Laser-Scanning-Mikroskop nach dem Oberbegriff des Anspruchs 22.

Eine gattungsgemäße optische Anordnung zum Scannen von Anregungsstrahlung und/oder Manipulationsstrahlung in einem Laser-Scanning-Mikroskop ist beispielsweise beschrieben in DE 10 2014 017 001 A1 und weist folgende Komponenten auf: eine Scanoptik als erste fokussierende Einrichtung zum Bereitstellen einer ersten Pupillenebene, eine erste Strahlumlenkeinrichtung, die durch einen in der ersten Pupillenebene angeordneten ersten Scanner gebildet ist, zum Scannen der Anregungsstrahlung und/oder Manipulationsstrahlung in einer ersten Koordinatenrichtung, eine zweite fokussierende Einrichtung zum Erzeugen einer zweiten Pupillenebene, die zu der ersten Pupillenebene optisch konjugiert ist, und eine zweite Strahlumlenkeinrichtung zum Umlenken der Anregungsstrahlung und/oder Manipulationsstrahlung, die in der zweiten Pupillenebene angeordnet ist.

Ein gattungsgemäßes Laser-Scanning-Mikroskop geht ebenfalls aus DE 10 2014 017 001 A1 hervor und weist folgende Komponenten auf: mindestens eine Laserlichtquelle zum Aussenden von Laserstrahlung zum Anregen und/oder Manipulieren einer Probe, mindestens einen Hauptfarbteiler zum Trennen von Anregungsstrahlung und/oder Manipulationsstrahlung einerseits und wellenlängenverschobenem Detektionslicht, welches von einer Probe ausgeht, andererseits, mindestens ein Mikroskopobjektiv zum Leiten von Anregungsstrahlung und/oder Manipulationsstrahlung auf eine Probe und zum Leiten von Detektionslicht, welches von der Probe ausgeht,

zurück in Richtung des Hauptfarbteilers, und mit einem Detektionsmodul zum Nachweisen des Detektionslichts,

Die Laser-Scanning-Mikroskopie hat sich als unverzichtbares Werkzeug der biomedizinischen Forschung etabliert. Neben der reinen Bildgebung gewinnt die optische Manipulation von Proben immer mehr an Bedeutung.

Ein allgemeines technisches Problem besteht dabei darin, mit möglichst geringem Aufwand, in einem möglichst kompakten Bauraum und mit möglichst geringen Transmissionsverlusten, mehrere optische Pupillen zu erzeugen, welche jeweils aufeinander abgebildet werden. Die Anzahl der nutzbaren Pupillen soll dabei größer oder gleich drei sein. Zwischen mindestens zwei der zur Verfügung gestellten Pupillen soll geschaltet werden können.

Bekannte Lösungen basieren einerseits auf der Nutzung verschiedener Ports am Stativ. Dies ist nachteilig, da hierdurch das Mikroskopstativ kompliziert und teuer wird. Weiterhin ist es dann unter Umständen nicht möglich, weitere Verfahren, wie zum Beispiel die hochauflösende Mikroskopie am gleichen Stativ zu betreiben. Zudem sind häufig aufwändige Justagen durchzuführen, um die jeweiligen Bildfelder miteinander zur Deckung zu bringen.

Bekannte Lösungen für die Manipulation durch nur ein Scanobjektiv sind in der Regel mechanisch und somit oft relativ langsam. Es ist in der Regel kaum möglich, größere Massen, wie sie z.B. Spiegel darstellen, schneller als 10 ms zu schalten. Relativ kurze Schaltzeiten lassen sich dagegen mit galvanometrischen Scannern erzielen. Allerdings muss hierbei versucht werden, das Massenträgheitsmoment gering zu halten.

In US-7,715,078 ist eine Umschaltung zwischen mehreren Scannern gezeigt. Hier werden, neben den für das eigentliche Scannen benötigten Scannern, mindestens zwei weitere Scanner gebraucht, die die Strahlwege schalten. Zudem zeigen die Ausführungen in dieser Anmeldung eine weitere Abbildung über eine refraktive Optik, die als einfache Linsen dargestellt sind. Allerdings besteht hier keine Möglichkeit, in einer vierten Pupille einen z-scannenden Spiegel unterzubringen. Dieser wird aber

insbesondere für eine dreidimensionale optische Manipulation benötigt. Die optischen Elemente weisen dabei den Komplexitätsgrad eines Scanobjektivs auf, das aufwändig und weniger lichteffizient ist.

EP 2 042 905 B1 zeigt eine Kombination von zwei Scannerpaaren. Hier kann jeweils das eine Scannerpaar oder das andere Scannerpaar ausgewählt werden. Allerdings können nicht einzelne Achsen sehr schnell hinzugeschaltet werden, weil die zu bewegenden Massen vergleichsweise groß sind.

In DE 100 50 529 B4 ist die Kombination von mehreren Strahlablenkungseinheiten gezeigt, die jeweils aus zwei Strahlablenkungsmodulen bestehen. In den Ausführungsbeispielen sind auch Abbildungsoptiken zwischen den Strahlablenkung Einrichtungen beschrieben. Es bestehen jedoch keine Möglichkeiten zur Umschaltung zwischen verschiedenen Scanmodi. Ebenso sind keine Mittel zur Wellenfrontbeeinflussung beschrieben.

Als eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung kann angesehen werden, eine optische Anordnung zu schaffen, mit der weitere Pupillenebenen bereitgestellt werden, wobei nur geringer zusätzlicher Bauraum beansprucht werden soll. Außerdem soll zwischen den Pupillenebenen möglichst schnell hin und her geschaltet werden können. Schließlich soll ein Laser-Scanning-Mikroskop mit zusätzlichen Pupillenebenen geschaffen werden, bei dem möglichst schnell zwischen den verschiedenen Pupillenebenen hin und her geschaltet werden kann.

Diese Aufgabe wird durch die optische Anordnung mit den Merkmalen des Anspruchs 1 gelöst. Im Hinblick auf das Mikroskop wird die Aufgabe durch das Laser-Scanning-Mikroskop mit den Merkmalen des Anspruchs 22 gelöst.

Vorteilhafte Varianten der erfindungsgemäßen optischen Anordnung und des erfindungsgemäßen Laser-Scanning-Mikroskops sind Gegenstand der abhängigen Ansprüche und werden außerdem im Folgenden, insbesondere im Zusammenhang mit den Figuren, beschrieben.

Die optische Anordnung zum Scannen von Anregungsstrahlung und/oder Manipulationsstrahlung in einem Laser-Scanning-Mikroskop der oben angegebenen Art ist

erfindungsgemäß dadurch weitergebildet, dass eine dritte fokussierende Einrichtung zum Erzeugen einer dritten Pupillenebene vorhanden ist, die zu der ersten Pupillenebene optisch konjugiert ist, dass in der dritten Pupillenebene eine dritte Strahlumlenkeinrichtung zum Umlenken der Anregungsstrahlung und/oder Manipulationsstrahlung angeordnet ist, dass zwischen der zweiten fokussierenden Einrichtung und der zweiten Pupillenebene einerseits und der zweiten Pupillenebene und der dritten fokussierenden Einrichtung andererseits ein erstes Strahlumlenkmittel vorhanden ist zum Umlenken der von der dritten fokussierenden Einrichtung kommenden Anregungsstrahlung und/oder Manipulationsstrahlung unter Umgehung der zweiten Strahlumlenkeinrichtung in Richtung der zweiten fokussierenden Einrichtung, dass eine vierte fokussierende Einrichtung zum Erzeugen einer vierten Pupillenebene vorhanden ist, die zur dritten Pupillenebene optisch konjugiert ist, und dass in der vierten Pupillenebene ein variables zweites Strahlumlenkmittel angeordnet ist zum Umschalten eines optischen Strahlengangs zwischen einem ersten Strahlweg und einem zweiten Strahlweg.

Das Laser-Scanning-Mikroskop der oben angegebenen Art ist erfindungsgemäß dadurch weitergebildet, dass eine erfindungsgemäße optische Anordnung zum Scannen von Anregungsstrahlung und/oder Manipulationsstrahlung vorhanden ist.

Besonders bevorzugt kann der erste Strahlweg mindestens von dem variablen zweiten Strahlumlenkmittel über die dritte Strahlumlenkeinrichtung und die zweite Strahlumlenkeinrichtung zu dem ersten Scanner verlaufen. Der zweite Strahlweg kann besonders bevorzugt mindestens von dem variablen zweiten Strahlumlenkmittel über die dritte Strahlumlenkeinrichtung unter Umgehung der zweiten Strahlumlenkeinrichtung über das erste Strahlumlenkmittel zu dem ersten Scanner verlaufen.

Als optische Anordnung wird im Rahmen der vorliegenden Beschreibung eine Anordnung bezeichnet, die insbesondere strahlformende Komponenten, wie Linsen und Hohlspiegel, und strahlumlenkende Komponenten, wie Spiegel, die insbesondere beweglich sein können, aufweist.

Unter dem Begriff des Scannens wird das gesteuerte Führen eines Strahls der Anregungsstrahlung oder der Manipulationsstrahlung über eine Probe verstanden. Dieses

Scannen kann in einem regelmäßigen Muster, beispielsweise zeilenweise, aber insbesondere auch entlang einer vorzugebenden Trajektorie erfolgen.

Unter Anregungsstrahlung wird für die Zwecke dieser Beschreibung elektromagnetische Strahlung, insbesondere sichtbares Licht, aber auch Infrarot- und Ultraviolettstrahlung verstanden, die allgemein zur Bildgebung dient. In aller Regel wird diese Anregungsstrahlung von Lasern bereitgestellt. Dabei können unterschiedliche Kontrastverfahren zum Einsatz kommen. Besonders bevorzugt handelt es sich um Strahlung zur Anregung einer Fluoreszenz aus Farbstoffen, mit denen eine zu untersuchende Probe präpariert ist. Zur Messung dieses Fluoreszenzlichts dient ein Laser-Scanning-Fluoreszenz-Mikroskop. Grundsätzlich kann es sich aber auch um Beleuchtungslicht für die Lichtmikroskopie handeln.

Als Manipulationsstrahlung wird elektromagnetische Strahlung, insbesondere im sichtbaren Bereich, aber auch im Infrarot- und Ultraviolettbereich, bezeichnet, mit der eine gezielte Veränderung einer zu untersuchenden Probe, insbesondere in einem gezielt ausgewählten Raumbereich oder einer gezielt ausgewählten und vorzugebenden Trajektorie, bewerkstelligt werden kann.

Die Begriffe Anregungsstrahlung und Anregungslicht einerseits und Manipulationsstrahlung und Manipulationslicht andererseits werden in dieser Beschreibung synonym verwendet.

Unter dem Begriff des Detektionslichts wird Licht verstanden, das von der Probe aufgrund der Anregung emittiert wird und das mittels der gesamten optischen Anordnung detektiert werden soll. Detektionslicht kann insbesondere Fluoreszenzlicht sein.

Als Pupillenebene wird für die Zwecke dieser Beschreibung eine optische Ebene verstanden, die in einem Betriebszustand der optischen Anordnung in einem Laser-Scanning-Mikroskop optisch konjugiert ist zu einer hinteren Objektivpupille des jeweils im Einsatz befindlichen Mikroskopobjektivs. Beispielsweise sind in einem Betriebszustand der erfindungsgemäßen Anordnung zum Scannen die erste, die zweite, die dritte und die vierte Pupillenebene optisch konjugiert zur hinteren Pupille des Mikroskopobjektivs. Weil die Position der hinteren Objektivpupille variiert, sind die

Pupillenebenen in der Regel nur für ein Objektiv exakt optisch konjugiert zur hinteren Objektivpupille. Für die anderen Objektive sind die Pupillenebenen näherungsweise optisch konjugiert zur hinteren Objektivpupille.

Für die Verwirklichung der Erfindung kommt es im Hinblick auf die relative Lage der einzelnen Pupillenebene zueinander grundsätzlich nur darauf an, dass diese Pupillenebenen jeweils ineinander abgebildet werden und demgemäß zueinander optisch konjugiert sind. Die Reihenfolge der Pupillenebenen im Strahlengang ist deshalb grundsätzlich beliebig. Vorteilhafte Varianten der erfindungsgemäßen optischen Anordnung sind dadurch gekennzeichnet, dass, bezogen auf die Anregungsstrahlung und die Manipulationsstrahlung, die zweite Pupillenebene strahlaufwärts von der ersten Pupillenebene, die dritte Pupillenebene strahlaufwärts von der zweiten Pupillenebene, und die vierte Pupillenebene strahlaufwärts von der dritten Pupillenebene liegt.

Grundsätzlich können mit der erfindungsgemäßen Anordnung beliebig viele Pupillen erzeugt werden. Wichtige Anwendungen profitieren aber bereits von vier aufeinander abgebildeten Pupillen bei überschaubarem Justageaufwand und geringen optischen Verlusten.

Die Scanoptik, also die erste fokussierende Einrichtung, besteht in der Regel aus einer Anordnung von Linsen, durch die eine zur hinteren Objektivpupille äquivalente erste Pupillenebene generiert wird.

Wenn im Rahmen der vorliegenden Beschreibung von Koordinatenrichtungen die Rede ist, ist dabei insbesondere an kartesische Koordinaten gedacht. Beispielsweise kann die erste Koordinatenrichtung die y-Richtung und die zweite Koordinatenrichtung kann die x-Richtung sein. Häufig wird ein Koordinatensystem so gewählt, dass die optische Achse eines Systems mit der z-Achse zusammenfällt.

Als erste, zweite, dritte und vierte fokussierende Einrichtung zum Generieren einer Pupillenebene können prinzipiell beliebige fokussierende Komponenten, insbesondere auch Linsen oder Linsengruppen, zum Einsatz kommen. Besonders bevorzugt werden als zweite und/oder dritte fokussierende Einrichtung Hohlspiegel, insbeson-

dere torische oder sphärische Hohlspiegel, verwendet. Die vierte fokussierende Einrichtung kann vorteilhaft eine Linse oder eine Linsengruppe sein.

Dabei kann es insbesondere von Vorteil sein, wenn der optische Weg über den ersten Hohlspiegel so ausgelegt wird, dass eine Vergrößerung ($|V| > 1$) oder eine Verkleinerung ($|V| < 1$) erzielt wird. Das ist insbesondere dann von Vorteil, wenn verschiedene Scanner miteinander kombiniert werden sollen. Beispielsweise ist bekannt, dass resonante MEMS-Scanner nur bestimmte Durchmesser erreichen können, wenn Resonanzfrequenz und dynamische Spiegeldeformation gegeben sind. Andererseits gibt es eine optimale Größe für quasistatische Galvanometerscanner, die nicht mit der Größe des resonanten MEMS-Scanners zusammenfällt. Für eine optimale optische Vereinigung beider Scannersysteme kann eine Anpassung der Pupillendurchmesser über eine Vergrößerungsstufe sehr sinnvoll sein. In gewissen Grenzen können hier Abweichungen von einer 1:1 Abbildung zugelassen werden, womit optional verschieden große Scanner in den jeweiligen Positionen stehen können.

Für die zweite und die dritte Strahlumlenkeinrichtung kommt es darauf an, dass die Strahlung definiert umgelenkt wird. Besonders bevorzugte Varianten zeichnen sich dadurch aus, dass die zweite Strahlumlenkeinrichtung in der zweiten Pupillenebene ein zweiter Scanner ist zum Scannen der Anregungsstrahlung und/oder der Manipulationsstrahlung in einer von der ersten Koordinatenrichtung verschiedenen zweiten Koordinatenrichtung und/oder dass die dritte Strahlumlenkeinrichtung in der dritten Pupillenebene ein dritter Scanner ist zum Scannen der Anregungsstrahlung und/oder der Manipulationsstrahlung in einer von der ersten Koordinatenrichtung verschiedenen zweiten Koordinatenrichtung.

Die erfindungsgemäße optische Anordnung zeichnet sich durch eine große Flexibilität aus. Beispielsweise können die zweite Strahlumlenkeinrichtung in der zweiten Pupillenebene und/oder die dritte Strahlumlenkeinrichtung in der dritten Pupillenebene auch ein feststehender Spiegel, ein Spiegel, dessen Oberfläche aktiv gekrümmt werden kann, oder ein anderes wellenfrontveränderndes Element sein. Mit einem Spiegel, dessen Oberfläche aktiv gekrümmt werden kann, kann durch Variation der Fokussierung ein Scannen in z-Richtung durchgeführt werden. Solch ein Spiegel ist

in der Regel zunächst flach und kann dann, beispielsweise zu einem Hohlspiegel, deformiert werden.

Beispielsweise kann mit einem wellenfrontveränderndem Element die Fokussierung entlang der optischen Achse, beispielsweise in z-Richtung, verändert werden und in diesem Sinn kann ein z-Scan durchgeführt werden. Darüber hinaus können mit einem solchen Element Aberrationen aufgrund von Brechungsindexfehlanpassungen bei erhöhter Eindringtiefe in der Probe kompensiert werden.

Als Scanner, beispielsweise erster, zweiter und dritter Scanner, werden im Rahmen der vorliegenden Beschreibung Einrichtungen verstanden, mit denen ein Strahl mindestens in einer Koordinatenrichtung in seiner Richtung verändert werden kann. Besonders bevorzugt kommen als Scanner schwenkbare Spiegel zum Einsatz.

Grundsätzlich kommt es für die verwendeten Scanner nur darauf an, dass eine Strahlablenkung in der jeweiligen Koordinatenrichtung mit der gewünschten Geschwindigkeit und Genauigkeit durchgeführt wird. Besonders bevorzugt ist der zweite Scanner ein Resonanzscanner und der dritte Scanner ein quasistatischer Scanner. Besonders vorteilhaft wirkt sich dabei aus, dass der zweite Scanner, also der schnelle Resonanzscanner, im Fall des zweiten Strahlwegs umgangen wird, mit anderen Worten also nicht mehr wirksam ist. Das bedeutet, dass der schnelle zweite Scanner sehr rasch weggeschaltet werden kann. Grundsätzlich sind der zweite und der dritte Scanner austauschbar, d.h. es kann auch zweckmäßig sein, wenn dritte Scanner ein Resonanzscanner und der zweite Scanner ein quasistatischer Scanner ist. Beide Varianten können in bestimmten Situationen vorteilhaft sein. Beide Varianten ermöglichen, dass sehr rasch zwischen einem bildgebenden Modus, bei dem der schnelle Scanner zum Einsatz kommt, und einem Anregungsmodus, der mithilfe des langsamen quasistatischen Scanners durchgeführt wird, hin und her geschaltet werden kann.

Als quasistatischer Scanner wird ein Scanner bezeichnet, der nicht resonant sondern, vergleichsweise langsam, quasistatisch, betrieben wird. Insbesondere kann einem quasistatischen Scanner eine Ansteuerkurve aufgeprägt werden. Diese kann beispielsweise linearisiert sein, so dass jedem Pixel die gleiche Aufenthaltsdauer zu-

gewiesen werden kann. Resonante Scanner erlauben nur Sinus-artige Bewegungen, die aber deutlich hochfrequenter sein können. Ein resonanter Scanner oder Resonanzscanner wird, in der Regel vergleichsweise viel schneller als ein quasistatischer Scanner, in einer mechanischen Resonanz betrieben. Sowohl der quasistatische als auch der resonant betriebene Scanner können verwirklicht sein durch einen galvanometrischen Scanner oder einen MEMS-Scanner.

Prinzipiell können für die Strahlablenkungseinrichtungen, insbesondere die Scanner, auch akustooptische Einrichtungen, insbesondere akustooptische Scanner, zum Einsatz kommen.

Da es für einen bildgebenden Modus im allgemeinen ausreicht, wenn für eine Koordinatenrichtung ein schneller Scanner zur Verfügung steht, kann bei einer weiteren vorteilhaften Variante der erste Scanner ebenfalls ein vergleichsweise langsamer Scanner und insbesondere ein quasistatischer Scanner sein.

Es ist aber auch möglich, in jeder der Pupillen einen resonanten Scanner zu platzieren, wobei die Schwingungsachsen so gebildet sind, dass die gerasterten Linien in der Probe vorteilhaft, aber nicht zwingend, einen Winkel von 90° bilden. Somit kann zwar das Bildfeld nicht kontinuierlich gedreht werden. Aber es ist in gewissen Grenzen eine Anpassung an eine Probengeometrie möglich. Allerdings erfordert dieser Modus, dass die Optiken, insbesondere die Hohlspiegel, ein genügend großes Feld übertragen.

Schließlich erlaubt die erfindungsgemäße optische Anordnung auch, den durch den resonanten Scanner gerasterten Bereich mit dem quasistatischen Galvoscanner in der Probenebene zu verschieben (sogenanntes "panning"). Somit ist es möglich, verschiedene interessierende Bereiche ("regions of interest", ROI) abbildende zu erfassen und zwischen diesen verschiedenen "regions of interest" zu springen.

In der ersten Pupillenebene, die der Scanoptik räumlich am Nächsten liegt, kann grundsätzlich auch ein zweidimensionaler Scanner, z.B. ein zweidimensionaler MEMS-Scanner mit einem einzigen Schwenkpunkt, angeordnet werden.

Bei dem ersten Strahlumlenkmittel kommt es grundsätzlich darauf an, dass dieses so im Strahlengang positioniert ist, dass die von der dritten fokussierenden Einrichtung, insbesondere dem zweiten Hohlspiegel, kommende Strahlung unter Umgehung der zweiten Strahlumlenkeinrichtung, insbesondere des zweiten Scanners, in Richtung der zweiten fokussierenden Einrichtung, insbesondere dem ersten Hohlspiegel, weitergeleitet wird. Dieses kann bei einer einfachen Variante durch einen fest positionierten Spiegel oder mehrere fest positionierte Spiegel geeigneter Größe erreicht werden.

Grundsätzlich ist aber auch möglich, dass die elektromagnetische Strahlung in Abhängigkeit eines variierbaren Parameters, insbesondere Wellenlänge und/oder Polarisation, reflektiert oder transmittiert wird. Unter diesem Gesichtspunkt kann das erste Strahlumlenkmittel auch ein dielektrischer und/oder dichroitischer Spiegel sein.

Mit dem Begriff eines variablen zweiten Strahlumlenkmittels wird eine Komponente bezeichnet, die irgendeine Art von Verstellung oder Einstellung zulässt und abhängig von dieser Verstellung oder Einstellung einfallendes Licht oder einfallende Strahlung unterschiedlich umlenkt. Insbesondere ist dabei an variabel einstellbare Spiegel gedacht.

Mit dem Umschalten eines optischen Strahlengangs zwischen einem ersten Strahlweg und einem zweiten Strahlweg ist gemeint, dass je nach Schaltzustand das Licht oder die Strahlung entweder den ersten Strahlweg oder den zweiten Strahlweg durchläuft. Der erste und der zweite Strahlweg sind dabei verschieden, das heißt, es gibt Teile des ersten Strahlwegs, die nicht Teil des zweiten Strahlwegs sind und umgekehrt.

Mit dem Merkmal, dass die zweite Strahlumlenkeinrichtung, insbesondere also der zweite Scanner, beim zweiten Strahlweg umgangen wird, soll zum Ausdruck gebracht werden, dass Anregungs- und/oder Manipulationsstrahlung, welche den zweiten Strahlweg nimmt, mit der zweiten Strahlumlenkeinrichtung, beispielsweise mit dem zweiten Scanner, nicht in Kontakt kommt. Eine mögliche Bewegung dieses zweiten Scanners hat demnach keinen Einfluss auf die Anregungs- und/oder Manipulationsstrahlung.

Die vorliegende Erfindung eignet sich besonders für die konfokale Laser-Scanning-Fluoreszenz-Mikroskopie. Ein Mikroskopobjektiv dient dabei sowohl zum Leiten und Fokussieren von Anregungsstrahlung und/oder Manipulationsstrahlung auf eine Probe oder in einen Bereich einer Probe als auch zum Leiten und Kollimieren von Detektionslicht, welches von dem mit Anregungsstrahlung und/oder Manipulationsstrahlung beleuchteten Bereich der Probe stammt, zurück in Richtung des Hauptfarbteilers.

Mit dem Begriff des Detektionsmoduls wird im Rahmen der vorliegenden Beschreibung diejenige Komponente bezeichnet, mit welcher das von einer beleuchteten Probe abgestrahltes Detektionslicht letzten Endes nachgewiesen wird. Ein solches Detektionsmodul weist insbesondere mindestens einen Strahlungsdetektor auf und kann, je nach Einsatzzweck, insbesondere Farbfilter und konfokale Blenden aufweisen.

Als ein Kerngedanke der vorliegenden Erfindung kann angesehen werden, mit geeigneten fokussierenden Mitteln, insbesondere einem Hohlspiegel, eine weitere Pupillenebene zu schaffen, in der insbesondere ein weiterer, nämlich ein dritter, Scanner angeordnet werden kann. Ein weiterer grundlegender Gedanke einer Variante der Erfindung besteht sodann darin, mithilfe eines variablen Strahlumlenkmittels den Strahl der Anregungsstrahlung und/oder Manipulationsstrahlung entweder über einen ersten Strahlweg, der die zweite Strahlumlenkeinrichtung, insbesondere den zweiten Scanner, und die dritte Strahlumlenkeinrichtung, insbesondere den dritten Scanner, enthält, oder über einen zweiten Strahlweg zu leiten, der die dritte Strahlumlenkeinrichtung, enthält, die zweite Strahlumlenkeinrichtung aber umgeht. Besondere Vorteile können nun erzielt werden, wenn der genannte erste Scanner für die bestimmte Koordinatenrichtung und der zweite Scanner für diese Koordinatenrichtung qualitativ unterschiedlich sind, wenn insbesondere der zweite Scanner ein Resonanzscanner ist und der dritte Scanner ein quasistatischer Scanner ist. Mithilfe des variablen Strahlumlenkmittels kann so der schnelle Scanner entweder, nämlich bei dem ersten Strahlweg, zugeschaltet oder, nämlich bei dem zweiten Strahlweg, weggeschaltet werden. Weil solch ein Schalten des Strahlwegs prinzipiell äußerst schnell (in der Größenordnung von 1 ms und darunter) verwirklicht werden kann, kann auch zwi-

schen den beiden Strahlwegen und damit zwischen einem bildgebenden Modus und einem Manipulationsmodus äußerst rasch geschaltet werden.

Die erfindungsgemäße Anordnung ist überaus mächtig und kann zur Lösung verschiedener Probleme eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäße optische Anordnung ist insbesondere geeignet für den Einsatz in einem konfokalen Laser-Scanning-Fluoreszenz-Mikroskop. Das erfindungsgemäße Laser-Scanning-Mikroskop kann also besonders bevorzugt ein, insbesondere konfokales, Laser-Scanning-Fluoreszenz-Mikroskop sein.

Die erfindungsgemäße optische Anordnung und das erfindungsgemäße Laser-Scanning-Mikroskop können bevorzugt für eine Manipulation biologischer Proben, insbesondere in drei Dimensionen, genutzt werden. Allerdings sind auch Anwendungen in der Materialmikroskopie denkbar.

Die erfindungsgemäße Anordnung ist auch für die optische Manipulation, die Laser-Scanning-Mikroskopie, die Lichtblattmikroskopie sowie für andere Verfahren einsetzbar, bei welcher eine Probe mittels eines Laserstrahls gerastert wird.

Ein wesentlicher Vorteil der vorliegenden Erfindung besteht darin, dass es möglich wird, in einem Laser-Scanning-Mikroskop einerseits eine Bildgebung oder eine optische Manipulation mit quasistatischen galvanischen Scannern, die auch als Galvoscanner bezeichnet werden, und andererseits eine schnelle Bildgebung mittels resonanter Scanner durchzuführen.

Insbesondere ermöglicht die Erfindung, dass sehr schnell zwischen einem Manipulationsmodus und einer Bildgebung geschaltet werden kann. Insbesondere soll dieses möglich sein, ohne zusätzlich bewegte Teile zu Strahlwegumschaltung in den Strahlengang schalten zu müssen, weil das häufig zu Instabilitäten und weiteren technischen Problemen führt. Sehr schnell heißt hierbei, dass die Umschaltung im Bereich weniger Millisekunden (ms) erfolgen kann. Weiterhin ist auch eine dreidimensionale optische Manipulation, beispielsweise ein gezieltes räumliches Ausbleichen (Stichworte: FRAP; uncageing) oder ein optogenetisches Schalten von Ionenkanälen usw. und ein anschließendes Umschalten auf eine gegebenenfalls sehr schnelle Bildge-

bung möglich. Für eine dreidimensionale optische Manipulation wird eine Möglichkeit für die Beeinflussung der drei räumlichen Freiheitsgrade benötigt, insbesondere werden drei optische Elemente benötigt. Für das Scannen in der Ebene sind quasistatische Galvoscanner besonders vorteilhaft, da diese definiert räumliche Bereiche in einer gegebenen Zeit belichten und damit die notwendigen Lichtenergiemengen, die auch als Lichtdosen bezeichnet werden, deponieren können. Die dritte Dimension kann zum Beispiel über einen dynamischen wellenfrontkrümmenden und damit eine axiale Fokuslage ändernden Spiegel adressiert werden. Solche Komponenten werden auch als defokussierende oder z-scannende Spiegel bezeichnet. Diese Elemente können sich aufgrund ihrer geometrischen Dimension sehr gut mit optischen Spiegelscannern ergänzen. Die Bewegung eines Fokalvolumens in Richtung der z-Koordinate erfolgt also durch Beeinflussung der Wellenfront bei gegebener Strahlrichtung (z-Richtung) im grundlegenden Unterschied zu lateralen Scanbewegungen, bei denen die Strahlrichtung über auslenkbare Spiegel verstellt wird. Bei dieser Verstellung können mit bestimmten Spiegeln gleichzeitig optische Aberrationen korrigiert werden. Tut man dies, um Einflüsse der Probe auf die optische Qualität der Bildgebung zu kompensieren, so kann man auch von einer adaptiven Korrektur sprechen.

Auch unter der Randbedingung, dass Bildgebung und Manipulation durch dieselbe Scanlinse erfolgen soll, lässt sich die vorliegende Erfindung vorteilhaft einsetzen. Dabei wird am Mikroskopstativ nur ein Port belegt.

Besondere Herausforderungen ergeben sich für die oben beschriebenen Aufgaben, wenn die Wellenlängen für die Manipulation und die Bildgebung identisch sein sollen. Für den Fall, der auch praktische Relevanz hat, dass beide Wellenlängen unterschiedlich sind, können Farbteiler verwendet werden. Die vorliegende Erfindung zeichnet sich dadurch aus, dass sie grundsätzlich mit einer Vielzahl von Wellenlängenkombinationen verwirklicht werden kann. Dabei sind zwischen den Scannern weitere bewegliche Elemente, die ein- oder ausgeschaltet werden müssen, oder in den Strahlengang eingebracht werden müssen, nicht unbedingt notwendig.

Die erfindungsgemäße Anordnung kann insbesondere auch für die Lasermaterialbearbeitung eingesetzt werden, bei welcher eine Probe mit einem Laserstrahl gerastert wird. Insbesondere ist dabei eine schnelle Umschaltung zwischen verschiedenen

Modi und insbesondere zwischen optische Manipulation und Bildgebung über Laser-Scanning-Mikroskopie möglich. Dabei können grundsätzlich beliebige Kombinationen der Wellenlänge der Manipulationsstrahlung einerseits und der Anregungsstrahlung andererseits zum Einsatz kommen.

xy/z-scannende Systeme sind neben der optischen Manipulation auch sehr gut dazu geeignet, beliebige Trajektorien und Ebenen in einer dreidimensionalen Probe bildgebend abzuscannen. Das ist insbesondere dann vorteilhaft, wenn man definierte Strukturen innerhalb eines Volumens, insbesondere mit Mehrphotonenanregung, schnell abbilden möchte. Beispielsweise kann ein Neuron, welches einem irregulären Verlauf in einem dreidimensionalen Volumen folgt, abgebildet werden. Wenn dieses Neuron sehr schnell abgebildet oder die Signaltransduktion, z.B. Ca(2+)-Wellen, entlang dieses Neurons optisch vermessen werden soll, ist die erfindungsgemäße optische Anordnung in der Lage, dieses im Volumen verlaufende Gebilde zu verfolgen.

Die vorliegende Erfindung kann auch nutzbringend bei der sogenannten Lichtblattmikroskopie zum Einsatz kommen. Dabei handelt es sich um eine alte Technologie, die von Zsigmondy und Siedentopf 1902/1903 bei Carl Zeiss für die Kolloidforschung entwickelt wurde. Nachdem die Methode lange Zeit nahezu in Vergessenheit geraten war, erlebte sie durch neue Arbeiten von E. Stelzer eine Renaissance. Dies wurde insbesondere durch den großen Fortschritt in der Verarbeitung digitaler Daten stimuliert.

In der Lichtblattmikroskopie besteht, zumindest in der Ausführungsform, die nicht auf einer Beleuchtung mit einer Zylinderlinse beruht, ebenfalls die Aufgabe, eine Probe mit einem Laserstrahl abzuscannen. Auch hier sind mehrere Pupillen besonders vorteilhaft, weil neben dem Scannen des Strahls in zwei Dimensionen noch dynamische Strahlformungen durchgeführt werden sollen, siehe zum Beispiel Dean et al.: Deconvolution-free subcellular imaging with axially swept light sheet microscopy, Biophysic. J., Vol. 108, 2807-2815 (2015)). Die erfindungsgemäße optische Anordnung und das erfindungsgemäße Laser-Scanning-Mikroskop können auch hier sehr vorteilhaft eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäße optische Anordnung kann außerdem sowohl für eine lineare Fluoreszenzanregung als auch für eine nichtlineare Fluoreszenzanregung, beispielsweise zur Mehrphotonenmikroskopie, genutzt werden. Es sind alle gängigen und bekannten Verfahren mit der Anordnung möglich (2-, 3- oder Mehrphotonenfluoreszenz; CARS, SRS usw.). Die Zweiphotonenmikroskopie ist heute eine Standardmethode zur Untersuchung lebender Proben. Insbesondere im sogenannten Neuro-Imaging spielen dreidimensionale Manipulationen der Probe eine wesentliche Rolle beim Verständnis neurobiologischer Vorgänge im Hirn lebender Tiere.

Die Erfindung wird grundsätzlich verwirklicht, wenn zwischen einem ersten Strahlweg und einem zweiten Strahlweg umgeschaltet werden kann und der erste Strahlweg von dem variablen zweiten Strahlumlenkmittel über die dritte Strahlumlenkeinrichtung und die zweite Strahlumlenkeinrichtung zu dem ersten Scanner verläuft und der zweite Strahlweg mindestens von dem variablen zweiten Strahlumlenkmittel über die dritte Strahlumlenkeinrichtung unter Umgehung der zweiten Strahlumlenkeinrichtung über das erste Strahlumlenkmittel zu dem ersten Scanner verläuft. Konkrete Varianten der erfindungsgemäßen optischen Anordnung sind dadurch gekennzeichnet, dass der erste Strahlweg mindestens von dem variablen zweiten Strahlumlenkmittel über die vierte fokussierende Einrichtung, die dritte Strahlumlenkeinrichtung, die dritte fokussierende Einrichtung, die zweite Strahlumlenkeinrichtung und die zweite fokussierende Einrichtung zu dem ersten Scanner verläuft und dass der zweite Strahlweg mindestens von dem variablen zweiten Strahlumlenkmittel über die vierte fokussierende Einrichtung, die dritte Strahlumlenkeinrichtung, die dritte fokussierende Einrichtung unter Umgehung der zweiten Strahlumlenkeinrichtung über das erste Strahlumlenkmittel und die zweite fokussierende Einrichtung zu dem ersten Scanner verläuft.

Für das variable zweite Strahlumlenkmittel, das zum Umschalten zwischen dem ersten Strahlweg und dem zweiten Strahlweg dient, kommt es prinzipiell nur darauf an, dass das gewünschte Umschalten hinreichend rasch möglich ist. Bei besonders bevorzugten Varianten weist das variable Strahlumlenkmittel einen variabel positionierbaren Spiegel auf. Besonders zweckmäßig werden dabei sehr leichte Spiegel verwendet, um die zu bewegenden Massen und damit die auftretenden und notwendi-

gen Kräfte klein zu halten. Die variable Positionierbarkeit des Spiegels erlaubt grundsätzlich vielfältige technische Ausgestaltungen.

Bei vergleichsweise unaufwändige Varianten, die sich außerdem durch mechanisch günstige Eigenschaften auszeichnen, ist der Spiegel ein Drehspiegel mit einer, insbesondere galvanometrischen, Dreheinrichtung. Dieser Drehspiegel reflektiert in einer ersten Drehposition, in welcher der erste Strahlweg ausgewählt ist, einfallende Strahlung anders als in einer von der ersten Drehposition verschiedenen zweiten Drehposition, in welcher der zweite Strahlweg ausgewählt ist. Besonders vorteilhaft ist die Dreheinrichtung eine galvanometrische Dreheinrichtung. Diese können mit vergleichsweise geringen Massenträgheitsmomenten verwirklicht werden.

Für den Spiegel an sich kommt es grundsätzlich nur darauf an, dass die Anregungs- und/oder Manipulationsstrahlung hinreichend effektiv reflektiert wird. Wenn für unterschiedliche Wellenlängen unterschiedliche Eigenschaften erzielt werden sollen, kann es von Vorteil sein, wenn das erste Strahlumlenkmittel und/oder das variable zweite Strahlumlenkmittel einen dielektrischen Spiegel aufweist.

Eine besonders bevorzugte Ausführungsvariante der erfindungsgemäßen optischen Anordnung zeichnet sich dadurch aus, dass das variable zweite Strahlumlenkmittel einen wellenlängenabhängigen und polarisationsabhängigen dielektrischen und/oder dichroitischen Spiegel aufweist, wobei dieser Spiegel Anregungsstrahlung und/oder Manipulationsstrahlung mit einer ersten Wellenläge und einem ersten Polarisationszustand transmittiert, Anregungsstrahlung und/oder Manipulationsstrahlung mit der ersten Wellenläge und einem zweiten Polarisationszustand, der von dem ersten Polarisationszustand verschieden ist, reflektiert und von einer Probe ausgesandtes Fluoreszenzlicht mit einer rotverschobenen Wellenlänge unabhängig von dessen Polarisationszustand transmittiert oder reflektiert.

Beispielsweise kann dabei der erste Polarisationszustand bezogen auf den dielektrischen und/oder dichroitischen Spiegel s-Polarisation und der zweite Polarisationszustand bezogen auf den dielektrischen und/oder dichroitischen Spiegel p-Polarisation sein. Auch die umgekehrte Zuordnung ist möglich. Dabei wäre der erste Polarisati-

onszustand bezogen auf den Spiegel p-Polarisation und der zweite Polarisationszustand bezogen auf den Spiegel s-Polarisation.

Die Anordnung eines solchen dielektrischen und/oder dichroitischen Spiegel im Strahlengang ermöglicht in vorteilhafter Weise das Umschalten zwischen dem ersten Strahlweg und dem zweiten Strahlweg der Anregungsstrahlung und/oder der Manipulationsstrahlung durch Umschalten zwischen s- und p-Polarisation. Hierzu können bei dem erfindungsgemäßen Laser-Scanning-Mikroskop geeignete Umschaltmittel zum Umschalten der Polarisation, beispielsweise eine Lambda-Halbe-Platte und/oder ein elektrooptischer Manipulator, vorhanden sein.

Für das erste Strahlumlenkmittel kommt es im Grundsatz darauf an, dass, wie anspruchsgemäß gefordert, von der dritten fokussierenden Einrichtung, insbesondere von dem zweiten Hohlspiegel, kommende Anregungsstrahlung oder Manipulationsstrahlung in Richtung der zweiten fokussierenden Einrichtung, insbesondere zu dem ersten Hohlspiegel, umgeleitet wird. Besonders vorteilhafte Varianten der erfindungsgemäßen optischen Anordnung sind dadurch gekennzeichnet, dass das erste Strahlumlenkmittel mindestens einen fest positionierten Spiegel, insbesondere genau zwei fest positionierte Spiegel aufweist.

Grundsätzlich kommt es beim Umschalten der Strahlwege nur darauf an, dass die zweite Strahlumlenkeinrichtung, insbesondere der zweite Scanner, umgangen wird. Dies kann platzsparend und in geringem Bauraum verwirklicht werden bei Ausführungsvarianten, bei denen in dem zweiten Strahlweg eine alternative zweite Pupillenebene gebildet ist, die zu der ersten Pupillenebene optisch konjugiert und in der eine weitere strahlumlenkende und/oder strahlformende Komponente, die Teil des ersten Strahlumlenkmittels ist, angeordnet ist.

Diese weitere strahlumlenkende und/oder strahlformende Komponente kann beispielsweise ein, insbesondere feststehender, Spiegel sein.

Die weitere Pupillenebene, nämlich die alternative zweite Pupillenebene, ermöglicht aber auch Eingriffe in die Wellenfront der Anregungsstrahlung und/oder der Manipulationsstrahlung. Unter diesen Gesichtspunkt kann es von Vorteil sein, wenn die wei-

tere strahlumlenkende Komponente ein Spiegel, dessen Oberfläche aktiv gekrümmt werden kann, oder ein segmentierter Spiegel oder eine sonstige Einrichtung zum Manipulieren der Wellenfront, beispielsweise ein räumlicher Lichtmodulator, ist.

Beispielsweise kann die Wellenfront mit Elementen der in J. Biomed. Opt. 21(12), 121507, Oct 12, 2016, siehe dort insbesondere Abbildung 2, beschriebenen Art so manipuliert werden, dass eine Umfokussierung in der Probe mit hoher Geschwindigkeit erreicht wird.

Wellenfrontverändernde Elemente dieser Art werden in der Regel über vergleichsweise aufwändige Relayoptiken in den Strahlengang eingebracht. Insbesondere für Systeme, in denen auch konfokal gemessen werden soll, führen diese Relayoptiken zu einem erheblichen und oftmals nicht akzeptablen Lichtverlust und sind darüber hinaus teuer und schwer zu justieren. Abgesehen davon ist eine schnelle Umschaltung des Strahlwegs zwischen Manipulation und Bildgebung in der oben beschriebenen Art mit Relayoptiken kaum möglich.

Auch in dieser Hinsicht bringt die erfindungsgemäße optische Anordnung erhebliche Verbesserungen. Ein weiterer Modus, der insbesondere dreidimensionale Manipulationen, wie sie zum Beispiel in der Optogenetik eingesetzt werden, unterstützt, kann durch die erfindungsgemäße Anordnung zur Verfügung gestellt werden, indem man insbesondere in der alternativen zweiten Pupillenebene ein schnelles wellenfrontformendes Element einbringt. Solche Elemente werden zum Beispiel von der Firma Revibro Optics (Bozeman, MT 59717) angeboten. Natürlich sind hier auch alternative Bauteile möglich, die eine gewünschte Funktion zur Verfügung stellen, hierfür aber eine optische Pupillenebene benötigen. Mit dem schnell verstellbaren z-scan-Element, das auch als adaptiv defokussierendes Element bezeichnet werden kann, kann in Kombination mit den quasistatischen Scannern eine optische Manipulation oder eine Bildgebung in einem dreidimensionalen Volumen erfolgen.

Bei einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsvariante der erfindungsgemäßen optischen Anordnung ist eine Steuereinheit vorhanden zum aufeinander abgestimmten Ansteuern des ersten Scanners, der zweiten Strahlumlenkeinrichtung, der dritten Strahlumlenkeinrichtung und/oder des variablen zweiten Strahlumlenkmit-

tels. Bei dieser Steuereinheit kann es sich besonders bevorzugt um einen PC, grundsätzlich aber auch um andere, insbesondere programmierbare, Komponenten wie Mikrocontroller handeln.

Besonders vorteilhaft kann die Steuereinheit dazu eingerichtet sein, den ersten Scanner, die zweite Strahlumlenkeinrichtung, die dritte Strahlumlenkeinrichtung und/oder das variable zweite Strahlumlenkmittel dergestalt aufeinander abgestimmt anzusteuern, dass unabhängig davon, ob der erste oder der zweite Strahlweg durchlaufen wird, dieselben Probenorte mit Anregungsstrahlung oder Manipulationsstrahlung beaufschlagt werden. Insbesondere ist eine Ausführungsvariante bevorzugt, bei der in Abhängigkeit einer Stellung des variablen zweiten Strahlumlenkmittels der erste Scanner so nachgeführt wird, dass unabhängig davon, ob der erste Strahlweg oder der zweite Strahlweg durchlaufen wird, derselbe Ort auf der Probe mit Anregungslicht oder Manipulationslicht beaufschlagt wird.

Darüber hinaus kann die Steuereinheit dazu dienen, weitere Komponenten der erfindungsgemäßen optischen Anordnung anzusteuern, beispielsweise eine Einrichtung zum Umschalten oder Drehen der Polarisation und/oder eine Einrichtung zum Manipulieren der Wellenfront, wie einen segmentierten Spiegel oder einen Spiegel, dessen Oberfläche aktiv gekrümmt werden kann.

Bei besonders vorteilhaften Ausgestaltungen des erfindungsgemäßen Laser-Scanning-Mikroskops ist eine Einrichtung zur Multipunktbeleuchtung mit einer Mehrzahl von Beleuchtungskanälen vorhanden.

Beispielsweise kann die Einrichtung zur Multipunktbeleuchtung zur Steuerung der einzelnen Beleuchtungskanäle einen mehrkanaligen AOTF aufweisen. Damit können die einzelnen Beleuchtungskanäle grundsätzlich beliebig im Hinblick auf Wellenlänge und Intensität der Strahlung eingestellt werden.

Bei einer besonders bevorzugten Variante wird einer der Beleuchtungskanäle zur Anregung und/oder zur Manipulation einer Probe verwendet und die weiteren Beleuchtungskanäle werden zur Bildgebung verwendet.

Hierzu sind Varianten des erfindungsgemäßen Laser-Scanning-Mikroskops besonders bevorzugt, bei denen für mindestens einen der Beleuchtungskanäle eine Einrichtung zur Manipulation, insbesondere Umschalten und/oder Drehen, der Polarisation, insbesondere ein Lambda-Halbe-Plättchen und/oder ein elektrooptischer Manipulator, vorhanden ist. Mit dieser Einrichtung zur Manipulation, also zum Umschalten, der Polarisation kann der Strahlengang für mindestens einen Beleuchtungskanal zwischen dem ersten Strahlweg und dem zweiten Strahlweg hin und her geschaltet werden.

Ein besonderer Vorteil der vorliegenden Erfindung ist außerdem, dass sie grundsätzlich bei verschiedenen Mikroskoptechniken zum Einsatz kommen kann.

Beispielsweise kann das erfindungsgemäße Laser-Scanning-Mikroskop zur Kontrastgebung auf Grundlage mindestens eines nichtlinearen Kontrastprinzips eingerichtet sein. Insbesondere kann es sich bei dem nichtlinearen Kontrastprinzip um eine Mehr-photonenfluoreszenz, beispielsweise 2- oder 3-Photonen-Fluoreszenz, um CARS (ko-härente Anti-Stokes Raman Streuung) oder um SRS (stimulierte Raman Streuung) handeln. Besonders bevorzugt ist das erfindungsgemäße Mikroskop ein Zwei-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskop.

Besonders bevorzugt kann das erfindungsgemäße Mikroskop auch ein konfokales Mikroskop, insbesondere ein konfokales Laser-Scanning-Fluoreszenz-Mikroskop, sein. Als konfokal wird ein Mikroskop bezeichnet, wenn in einer zur Bildebene konjugierten Ebene ein Pinhole vorhanden ist.

Wegen der Konzentration des Anregungsvolumens durch die Nichtlinearität der Mehr-Photonen-Fluoreszenz ist bei einem Mehr-Photonen-Scanning-Mikroskop oder Mehr-Photonen-Fluoreszenz-Scanning-Mikroskop eine solche konfokale Blende nicht unbedingt notwendig.

Weitere Vorteile und Merkmale der Erfindung werden im Folgenden unter Bezug auf die schematischen Figuren erläutert. Hierin zeigen:

Figur 1: ein erstes Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen optischen Anordnung;

Figur 2: ein Detail des Ausführungsbeispiels aus Figur 1;

Figur 3: das Detail aus Figur 2 in einer alternativen Betriebsstellung und

Figur 4: eine schematische Darstellung eines erfindungsgemäßen Laser-Scanning-Mikroskops.

Gleiche und gleichwirkende Komponenten sind in allen Figuren in der Regel mit denselben Bezugszeichen gekennzeichnet.

Beispielhaft wird im Folgenden der Fall betrachtet, dass mittels quasistatischer Scanner eine räumlich gezielte Manipulation in einer Probe vorgenommen wird. Danach soll sehr schnell auf eine Bildgebung umgeschaltet werden. Hier wird zugrunde gelegt, dass man Bilder einer bestimmten Größe mit einer sogenannten Videorate aufnehmen möchte. Bei Laser-Scanning-Mikroskopen ist dies zum Beispiel mit sogenannten Resonanzscannern möglich. Für das nachfolgende Beispiel aus Figur 1 wird weiterhin angenommen, dass sowohl die optische Manipulation als auch die Anregung der Fluoreszenz für die Bildgebung mit einer Laserlinie bei 488 nm realisiert wird, da dies ein häufig auftretender Anwendungsfall ist.

Das Problem wird durch eine erfindungsgemäße optische Anordnung SM zum Scannen von Anregungsstrahlung und/oder Manipulationsstrahlung in einem Laser-Scanning-Mikroskop, insbesondere einem Laser-Scanning-Fluoreszenz-Mikroskop, gelöst, wie sie in Figur 1 dargestellt ist. Hierbei sind drei Scanner S1, S2 und S3 in einer Reihe hintereinander angeordnet, wobei durch eine Abbildung aller Scanner aufeinander erreicht wird, dass alle Scanner in einer optischen Pupille stehen. Dies ist ein wesentlicher Punkt, da hierdurch garantiert wird, dass die Pupille stationär bleibt und ein Bildfeld homogen, d.h. mit einem sehr geringen sogenannten Randlichtabfall, aufgenommen wird.

Die optische Anordnung SM weist als wesentliche Komponente zunächst als erste fokussierende Einrichtung eine Scanoptik SO zum Bereitstellen einer ersten Pupillenebene P1 auf. Diese erste Pupillenebene P1 ist in einem Betriebszustand, also in einem Zustand, in dem die optische Anordnung SM mit einem Laser-Scanning-Mikroskop zusammenwirkt oder in dieses Mikroskop eingebaut ist, zu einer hinteren

Objektivpupille P des Mikroskopobjektivs (MO) optisch konjugiert (siehe Figur 4). In dieser ersten Pupillenebene P1 ist ein erster Scanner S1 als erste Strahlumlenkeinrichtung angeordnet, der zum Scannen von Anregungsstrahlung und/oder Manipulationsstrahlung 10 in einer ersten Koordinatenrichtung y dient. Bei dem Scanner S1 kann es sich beispielsweise um einen quasistatischen, insbesondere um einen galvanometrischen, Scanner handeln. Der schematisch gezeigte Scannerspiegel S1 wird im Betrieb dabei um eine in Figur 1 vertikal, das heißt parallel zur x-Achse liegende Achse hin und her geschwenkt.

Sodann ist eine zweite fokussierende Einrichtung vorhanden, bei der es sich im gezeigten Beispiel um einen ersten Hohlspiegel H1 handelt. Dieser erste Hohlspiegel H1 dient zum Bereitstellen einer zweiten Pupillenebene P2, die zu der ersten Pupillenebene P1 optisch konjugiert ist. In der zweiten Pupillenebene P2 ist als zweite Strahlumlenkeinrichtung ein zweiter Scanner S2 angeordnet, der zum Scannen der Anregungsstrahlung und/oder Manipulationsstrahlung in einer von der ersten Koordinatenrichtung y verschiedenen zweiten Koordinatenrichtung x dient. Das in Figur 1 schematisch dargestellte xyz-Koordinatensystem ist ein kartesisches Koordinatensystem, d.h. die erste Koordinatenrichtung y ist senkrecht zu der zweiten Koordinatenrichtung x. Die Richtung der optischen Achse 12 verläuft im Bereich zwischen einer Zwischenbildebene ZB und der Scanoptik SO parallel zur z-Achse. Der zweite Scanner S2 kann beispielsweise einen Resonanz-Scanner sein. Der in Figur 1 schematisch gezeigte Scannerspiegel S2 wird im Betrieb um eine parallel zur z-Richtung orientierte Achse hin und her geschwenkt. Diese Orientierung der Rotationsachse ist aber keinesfalls unbedingt notwendig. Die Orientierung hängt generell davon ab, unter welchem Winkel der erste Scanner S1 betrieben wird.

Besonders bevorzugt liegen die Drehachsen der Scanner S2 und S3 in einer Ebene, welche die optische Achse des Scanobjektivs enthält und deren Flächennormale parallel zur Drehachse des Scanners S1 ist. Hierbei kann die Achse des Scanners S2 zum Beispiel parallel zur optischen Achse des Scanobjektivs sein. Abweichungen von diesen Geometrien sind aber grundsätzlich möglich und stellen ebenso Ausführungsvarianten der hier beschriebenen Erfindung dar.

Weiterhin ist eine dritte fokussierende Einrichtung vorhanden, bei der es sich im gezeigten Beispiel um einen zweiten Hohlspiegel H2 handelt. Der zweite Hohlspiegel H2 dient zum Erzeugen einer dritten Pupillenebene P3, die zu der ersten Pupillenebene P1 und der zweiten Pupillenebene P2 optisch konjugiert ist. In dieser dritten Pupillenebene P3 ist als dritte Strahlumlenkeinrichtung ein dritter Scanner S3 angeordnet, der zum Scannen der Anregungsstrahlung und/oder Manipulationsstrahlung 10 ebenfalls in der zweiten Koordinatenrichtung x dient. Der dritte Scanner S3 kann, wie der erste Scanner S1, ein quasistatischer, insbesondere ein galvanometrischer, Scanner sein. Erfindungsgemäß ist zwischen der zweiten fokussierenden Einrichtung, also dem ersten Hohlspiegel H1, und der zweiten Pupillenebene P2 einerseits und der zweiten Pupillenebene P2 und der dritten fokussierenden Einrichtung, also dem zweiten Hohlspiegel H2, andererseits ein erstes Strahlumlenkmittel 30 vorhanden zum Umlenken der von dem zweiten Hohlspiegel H2 kommenden Anregungsstrahlung 16 und/oder Manipulationsstrahlung 10 unter Umgehung der zweiten Strahlumlenkeinrichtung S2 in Richtung des ersten Hohlspiegels H1.

Außerdem ist erfindungsgemäß eine vierte fokussierende Einrichtung vorhanden, die in dem in Figur 1 dargestellten Ausführungsbeispiel schematisch als Linse L4 gezeigt ist. Prinzipiell kann es sich dabei auch um einen weiteren Hohlspiegel, um eine Linsengruppe oder um eine Kombination dieser Komponenten handeln. Die vierte fokussierende Einrichtung L4 dient zum Erzeugen einer vierten Pupillenebene P4, die zur dritten Pupillenebene P3 und damit auch zu den vorhergehenden Pupillenebenen P1 und P2 optisch konjugiert ist. In der vierten Pupillenebene P4 ist sodann ein variables zweites Strahlumlenkmittel 20 angeordnet zum Umschalten eines optischen Strahlengangs zwischen einem ersten Strahlweg und einem zweiten Strahlweg. Bei dem in Figur 1 dargestellten Ausführungsbeispiel ist das variable zweite Strahlumlenkmittel 20 ein Drehspiegel 22, der eine nicht dargestellte Dreheinrichtung aufweist. Die Dreheinrichtung kann z.B. durch einen galvanometrischen Scanner verwirklicht sein. Dies ist vorteilhaft, da das Massenträgheitsmoment relativ klein gehalten werden kann.

Mithilfe des Drehspiegels 22 kann die Richtung der einkommenden Anregungsstrahlung 16 oder Manipulationsstrahlung 10, wie in Figur 1 schematisch gezeigt, mindes-

tens zwischen zwei unterschiedlichen Richtungen verstellt werden. Durch dieses Verstellen der Richtung, mit der auf den Drehspiegel 22 einfallende Anregungsstrahlung 16 oder Manipulationsstrahlung 10 weitergeleitet wird, wird letzten Endes ein Umschalten zwischen einem ersten Strahlweg und einem zweiten Strahlweg erreicht. Im Einzelnen wird ein kollimiertes Strahlenbündel, welches auf den Drehspiegel 22 einfällt, abhängig von der Drehposition des Drehspiegels 22 in unterschiedlichen Richtungen auf die Linse L4 geleitet. Die Linse L4 fokussiert diese unterschiedlichen Strahlenbündel, wie schematisch in Figur 1 angedeutet, in voneinander beanstandete (in Figur 1 veranschaulicht durch den Doppelpfeil 13) Punkte B. Die Position der Punkte B im Strahlengang strahlabwärts von der dritten Strahlumlenkeinrichtung S3 ist in Figur 1 durch einen Pfeil angedeutet. Der erste Strahlweg verläuft dabei erfindungsgemäß mindestens von dem variablen zweiten Strahlumlenkmittel, also dem Drehspiegel 22, über den dritten Scanner S3 und den zweiten Scanner S2 zu dem ersten Scanner S1. Der zweite Strahlweg verläuft erfindungsgemäß mindestens von dem Drehspiegel 22 über den dritten Scanner S3 unter Umgehung der zweiten Strahlumlenkeinrichtung, also des zweiten Scanners S2 über das erste Strahlumlenkmittel 30 zu dem ersten Scanner S1. Bei dem zweiten Scanner S2 handelt es sich im gezeigten Ausführungsbeispiel um einen Resonanzscanner, also um eine sich sehr rasch bewegende Komponente.

Wesentlich ist, dass der Strahlweg über den zweiten Scanner S2 und damit die Wirkung dieses zweiten Scanners S2 durch Betätigung des variablen Strahlumlenkmittels 20 deaktiviert oder abgeschaltet wird. Es wird also geschaltet zwischen den zweidimensionalen Scans mit und ohne resonanten Scanner. Um zu erreichen, dass in beiden Strahlwegen derselbe Bildpunkt adressiert werden kann, kann auch der erste Scanner S1, insbesondere automatisiert durch eine Steuereinheit, eine Schaltung des Ablenkwinkels vornehmen. Der erste Scanner S1 gewährleistet so neben der Rasterung der Probe zum Bildaufbau auch eine Umschaltung des Strahlwegs.

Der Aufbau eines erfindungsgemäßen Laser-Scanning-Mikroskops wird mit Bezug auf Figur 4 erläutert. Das dort schematisch dargestellte Laser-Scanning-Mikroskop 100 weist als wesentliche Komponenten ein Lasermodul LM, einen Hauptfarbteiler HFT, eine erfindungsgemäße optische Anordnung SM zum Scannen von

Anregungs- und Manipulationslicht 10, ein Mikroskopobjektiv MO und ein Detektionsmodul DM auf. Das Lasermodul LM dient als Strahlungsquelle für Anregungslicht 16 und Manipulationslicht 10. In dem in Figur 4 schematisch dargestellten Beispiel trifft das von dem Lasermodul LM ausgesandte Anregungslicht 16 oder Manipulationslicht 10 auf ein Multipunkt-Modul 40, welches den einkommenden Lichtstrahl in eine Mehrzahl von Strahlenbündeln auftrennt, die schließlich in unterschiedliche Fokalvolumina auf oder in einer Probe S fokussiert werden. Die spektrale Zusammensetzung und die Intensität kann für die einzelnen Teilstrahlen, beispielsweise mit einem mehrkanaligen AOTF, separat eingestellt werden. Das Lasermodul LM, das Multipunkt-Modul 40, die erfindungsgemäße optische Anordnung zum Scannen SM, ein nicht gezeigter Objektivrevolver und das Detektionsmodul DM sind über Verbindungsleitungen 71 bis 75 mit einer Steuer- und Auswerteeinheit PC verbunden, bei der es sich um einen handelsüblichen Rechner handeln kann.

Nach Durchlaufen des Multipunkt-Moduls 40 gelangt das Anregungslicht 16 oder Manipulationslicht 10 über den Hauptfarbteiler HFT zu der erfindungsgemäßen optischen Anordnung SM zum Scannen des Anregungslichts 16 und/oder Manipulationslichts 10. Die Scanoptik SO der optischen Anordnung SM fokussiert das Anregungslicht 16 oder Manipulationslicht 10 in eine Zwischenebene ZB. Über weitere Komponenten, beispielsweise Linsen und/oder Spiegel, die in Figur 4 nicht dargestellt sind, gelangt das Anregungslicht 16 oder das Manipulationslicht 10 über eine hintere Objektivpupille P in das Mikroskopobjektiv MO, welches das Licht in mehrere Fokalvolumina auf oder in der Probe S, die sich in einer Probenebene SP befindet, fokussiert. Die Anzahl der separaten Fokalvolumina entspricht der Anzahl der in dem Multipunkt-Modul 40 generierten separaten Strahlbündel. Wenn man das Multipunkt-Modul 40 weglassen würde, würde das Anregungs- oder Manipulationslicht in einen Fokalpunkt fokussiert. Mit der erfindungsgemäßen optischen Anordnung SM zum Scannen werden die Fokalvolumina des Anregungs- oder Manipulationslichts 10 in der Zwischenbildebene ZB und damit in der zur Zwischenbildebene ZB optisch konjugierten Probenebene SP gescannt.

Das in Fig. 4 schematisch dargestellte Mikroskop kann insbesondere ein konfokales Mikroskop sein. Grundsätzlich kann es sich aber auch um ein Mikroskop handeln,

welches mindestens ein nichtlineares Kontrastprinzip nutzt. Bei einem nichtlinearen Betrieb kann das Detektionslicht so wie in Fig. 4 gezeichnet detektiert werden, es kann grundsätzlich aber auch vor dem Scanmodul SM gemessen werden.

Im Einzelnen werden der erste und der zweite Strahlweg mit Bezug auf Figur 2 erläutert. Ohne Beschränkung der Allgemeinheit ist bei dem in Figur 2 gezeigten Beispiel der zweite Strahlweg derjenige Strahlweg, auf welchem Manipulationsstrahlung 10 in Richtung der Probe S geleitet wird, und der erste Strahlweg ist entsprechend derjenige Strahlweg, auf welchem Anregungsstrahlung 16 auf die Probe S geleitet wird.

Zunächst wird nun im Zusammenhang mit den Figuren 1 und 2 der zweite Strahlweg, also der Strahlverlauf für Manipulationsstrahlung oder Manipulationslicht 10, erläutert, mit welchem in einer Probe S eine definierte Manipulation, zum Beispiel ein definiertes Ausbleichen entlang einer bestimmten Trajektorie bewerkstelligt wird. Ist dieses Ausbleichen durchgeführt, kann, wie im Folgenden erläutert wird, die erfindungsgemäße optische Anordnung SM rasch umgeschaltet und die Probe in einem bildgebenden Modus mithilfe von Anregungsstrahlung 16 beobachtet werden.

Die Manipulationsstrahlung 10 gelangt, von dem Lasermodul LM kommend, zunächst über den Drehspiegel 22, also über das zweite variable Strahlumlenkmittel 20 in der vierten Pupillenebene P4, auf den dritten Scanner S3 in der dritten Pupillenebene P3. In dem in den Figuren 1 und 2 schematisch dargestellten Ausführungsbeispiel ist der dritte Scanner S3 ein quasistatischer, insbesondere galvanometrischer, Scanner, der die Manipulationsstrahlung 10 vergleichsweise langsam in x-Richtung scannt. Die Manipulationsstrahlung 10 nimmt bei dem gezeigten Beispiel der erfindungsgemäßen optischen Anordnung zum Scannen SM den zweiten Strahlweg, das heißt die Manipulationsstrahlung 10 kommt mit dem zweiten Scanner S2 in der zweiten Pupillenebene P2 nicht in Kontakt. Vielmehr gelangt die vom dritten Scanner S3 kommende Manipulationsstrahlung 10 über den zweiten Hohlspiegel H2 auf einen fest angeordneten Spiegel 31, der Teil des ersten Strahlumlenkmittels 30 ist. Von diesem fest angeordneten Spiegel 31 wird die Manipulationsstrahlung 10 ein erstes Mal reflektiert und trifft dann auf eine weitere strahlumlenkende Komponente 32. Diese weitere strahlumlenkende Komponente 32 ist in dem in Figur 2 gezeigten Beispiel ein weiterer fest angeordneter Spiegel 32, der zusammen mit dem fest ange-

ordneten Spiegel 31 das erste Strahlumlenkmittel 30 bildet. Besonders zweckmäßig ist in dem zweiten Strahlweg eine alternative zweite Pupillenebene P2a gebildet, die insbesondere zur ersten Pupillenebene P1 und zur dritten Pupillenebene P3 optisch konjugiert ist, und die weitere strahlumlenkende Komponente 32 ist in dieser alternativen zweiten Pupillenebene P2a angeordnet. Nach Reflexion an dem weiteren fest angeordneten Spiegel 32 trifft die Manipulationsstrahlung 10 ein zweites Mal auf den fest angeordneten Spiegel 31 und wird von diesem dann in Richtung des ersten Hohlspiegels H1 reflektiert. Von dem ersten Hohlspiegel H1 gelangt die Manipulationsstrahlung 10 schließlich über den ersten Scanner S1 in der ersten Pupillenebene P1, die Scanoptik SO und das Mikroskopobjektiv MO auf die Probe S. Der erste Scanner S1 ist ebenfalls ein quasistatischer, insbesondere galvanometrischer, Scanner, der das Manipulationslicht 10 vergleichsweise langsam in y-Richtung scannt. Der Auftreffpunkt des Fokalvolumens oder die Auftreffpunkte der Fokalvolumina der Manipulationsstrahlung 10 können demgemäß durch Einstellen des ersten Scanners S1 in der ersten Pupillenebene P1 und des dritten Scanners S3 in der dritten Pupillenebene P3 zielgerichtet eingestellt werden.

Grundsätzlich kann in der alternativen zweiten Pupillenebene P2a anstelle des feststehenden Spiegels 31 auch ein optisches Element zur schnellen Umfokussierung, wie es z.B. kommerziell von der Firma Revibro Optics (Bozeman, MT 59717) angeboten wird, oder Spiegel, dessen Oberfläche aktiv gekrümmt werden kann, angeordnet sein. Mit solchen variablen Komponenten kann die Fokussierung in z-Richtung variiert werden. So können im Prinzip auch dreidimensionale Trajektorien oder frei gewählte Volumina in der Probe S durch die Manipulationsstrahlung 10 manipuliert werden. Wahlweise kann also eine 2-dimensionale oder 3-dimensionale Manipulation der Probe durchgeführt werden.

Nach Abschluss der Manipulation kann es erwünscht sein, die optische Anordnung SM möglichst rasch in einen Bildgebungsmodus umzuschalten. Zu diesem Zweck wird der Drehspiegel 22 in der vierten Pupillenebene P4 dergestalt verdreht, dass die aus der Richtung des Lasermoduls LM kommende Anregungsstrahlung 16 in einer anderen Richtung auf die Linse L4 trifft und damit an einem anderen Ort aus der Linse L4 austritt. Diese Vorstellung des Drehspiegels 22 führt dazu, dass die Anre-

gungsstrahlung 16 nicht denselben Weg wie die Manipulationsstrahlung 10 durch die Komponenten der erfindungsgemäßen optischen Anordnung SM, also nicht den zweiten Strahlweg, sondern den ersten Strahlweg nimmt. Die durch den Drehspiegel 22 bewirkte Richtungsänderung und die Größe und die Raumposition des fest angeordneten Spiegels 31 sind dabei so aufeinander abgestimmt, dass bei dem in den Figuren 1 und 2 gezeigten Ausführungsbeispiel die Anregungsstrahlung 16 auf dem ersten Strahlweg nicht mit dem ersten Strahlumlenkmittel 30, 31, 32 in Kontakt kommt.

Im Einzelnen: Die Anregungsstrahlung 16 gelangt, von dem Lasermodul LM kommend, zunächst über den Drehspiegel 22, also über das zweite variable Strahlumlenkmittel 20 in der vierten Pupillenebene P4, auf den dritten Scanner S3 in der dritten Pupillenebene P3. Der dritte Scanner S3 ist ein quasistatischer, insbesondere galvanometrischer, Scanner, der die Anregungsstrahlung 16 vergleichsweise langsam in x-Richtung scannt. Die vom dritten Scanner S3 kommende Anregungsstrahlung 16 gelangt über den zweiten Hohlspiegel H2 auf den zweiten Scanner S2 in der zweiten Pupillenebene P2. Bei diesem zweiten Scanner S2 handelt es sich um einen Resonanzscanner, der im Vergleich zum dritten Scanner S3 viel schneller ist und die Anregungsstrahlung 16 ebenfalls in x-Richtung scannt. Weil der dritte Scanner S3 ein quasistatischer Scanner ist, kann er prinzipiell sehr rasch zum Stillstand gebracht werden oder das Scannen des Anregungslichts 16 in x-Richtung erfolgt kombiniert sowohl durch den dritten Scanner S3 als auch durch den zweiten Scanner S2. Beispielsweise kann, insbesondere bei begrenztem Hub des zweiten Scanners S2, mit den quasistatischen Scannern S1 und S3 der Ort eines bestimmten Sichtfelds eingestellt werden und das rasche Scannen erfolgt dann mit dem zweiten Scanner S2. Bei diesem Modus kann das Scanfeld durch Betätigen des dritten Scanners S3 in x-Richtung verschoben werden. Prinzipiell kann der dritte Scanner S3 aber stillstehen. Von dem zweiten Scanner S2 wird die Anregungsstrahlung 16 in Richtung des ersten Hohlspiegels H1 reflektiert und trifft, vom Hohlspiegel H1 kommend, schließlich auf den ersten Scanner S1 in der ersten Pupillenebene P1. Vom ersten Scanner S1 gelangt das Anregungslicht 16 schließlich über die Scanoptik SO und das Mikroskopobjektiv MO auf die Probe S. Die alternative zweite Pupillenebene P2a spielt für den ersten Strahlweg demgemäß keine Rolle. Im Fall des ersten Strahlwegs kann der

Auftreffpunkt des Fokalvolumens oder können die Auftreffpunkte der Fokalvolumina der Anregungsstrahlung 16 durch Einstellen des ersten Scanners S1 in der ersten Pupillenebene P1, des zweiten Scanners S2 in der zweiten Pupillenebene und des dritten Scanners S3 in der dritten Pupillenebene P3 zielgerichtet eingestellt werden.

Die zweite Pupillenebene P2 und die alternative zweite Pupillenebene P2a können mit verschiedenen optisch aktiven oder passiven Elementen bestückt sein. Im einfachsten Fall ist das jeweils ein Spiegel, sobald in der je anderen Pupille ein aktives Element steht, welches umgangen werden soll. Zum Beispiel kann in P2, wie beschrieben, ein resonanter Scanner stehen. Wenn dieser nicht gebraucht wird, sollte auch kein Licht über diesen geführt werden, um Störungen des Strahls durch Restbewegungen zu vermeiden. Zudem hat ein resonanter Scanner ein gewisses Einschwingverhalten. Will man eine sehr schnelle Schaltung zwischen einem Manipulationsmodus und einem schnellen Bildgebungsmodus mittels eines resonanten Scanners realisieren, so muss der Scanner durchgehend schwingen und man schaltet sich im entsprechenden Moment optisch auf diese Bewegung auf.

Figur 3 zeigt eine Situation, bei der der erste Scanner S1 beim Umschalten vom ersten auf den zweiten Strahlweg dergestalt nachgeführt wird, dass der erste Strahlweg und der zweite Strahlweg strahlabwärts von dem ersten Scanner S1 wieder zusammenfallen. Das bedeutet, dass unabhängig davon, ob der erste oder der zweite Strahlweg gewählt wird, die Anregungsstrahlung 16 einerseits und die Manipulationsstrahlung 10 andererseits auf denselben Ort auf einer Probe S geleitet werden.

Dieses Nachführen des ersten Scanners S1 oder alternativ oder ergänzend auch des zweiten Scanners S2 und/oder des dritten Scanners S3 in Abhängigkeit einer Positionierung der Umschalteinrichtung 20, im gezeigten Beispiel also des Drehspiegels 22, kann beispielsweise mithilfe einer geeignet programmierten Steuereinheit durchgeführt werden.

Es gibt wichtige Anwendungen der schnellen Bildgebung mit resonanten Scannern, die es erfordern, dass das Scanfeld des resonanten Scanners lateral über die Probe bewegt werden soll (sogenanntes "panning"). Die erfindungsgemäße optische Anordnung leistet dies, weil der schnelle zweite Scanner S2 und der quasistatische drit-

te Scanner S3 gleichzeitig verwendet werden können. Mit der Anordnung aus DE 10 2014 017 001 A1 ist das so nicht möglich.

Am zweiten Hohlspiegel H2 ist der Winkel zwischen ein- und ausfallendem Strahl bevorzugt gleich dem entsprechenden Winkel am ersten Hohlspiegel H1 und die Drehachsen des zweiten Scanners S2 und des dritten Scanners S3 liegen bevorzugt parallel zueinander. Dadurch wird erreicht, dass, unabhängig davon, ob mit dem zweiten Scanner S2 oder dem dritten Scanner S3 oder beiden gescannt wird, keine unsymmetrischen Scanverzeichnungen bei der Abtastung in der Probenebene auftreten (siehe dazu DE 10 2014 017 001 A1).

Bei gleicher Wellenlänge der Manipulationsstrahlung und der Anregungsstrahlung kann als variables Strahlumlenkmittel 30 ein größenmäßig geeignet dimensionierter Spiegel, wie in Figur 2 gezeigt, im Strahlengang vorhanden sein. Dieses Element muss nicht zwingend konfiguriert werden. Es kann grundsätzlich auch bei normaler Bildgebung im Strahlengang verbleiben. Somit muss hier keine komplizierte mechanische Verstellung vorgesehen sein. Die Umschaltung erfolgt durch Erzeugen eines Winkels zwischen dem auf den ersten Scanner S1 einfallenden Strahl und der Drehachse des Spiegels, der dann verschieden ist von 90°. Daraufhin verlassen die Strahlengänge der beiden Betriebsmodi (Modulationsmodus: Betrieb mit Modulationsstrahlung; Anregungsmodus oder Bildgebungsmodus: Betrieb mit Anregungsstrahlung) den dritten Scanner S3 in Richtung des Hauptfarbteilers und eines konfokalen Pinholes unter verschiedenen Winkeln. Um eine Fehlablage am Pinhole zu vermeiden, kann zeitgleich eine weitere Winkelschaltung in einer descannten Pupillenebene (insbesondere vierte Pupillenebene P4) mit einem weiteren in der Abbildung nicht gezeigten galvanometrischer Spiegel (insbesondere zweite variable Strahlumlenkeinrichtung 20) vorgenommen werden. Diese Anordnung ist sowohl für die einzelpunktscannende Laser-Scanning-Mikroskopie als auch für Multipunktverfahren geeignet, welche erfordern, dass alle Scanner in gut definierten optischen Pupillen angeordnet werden können.

Nach Anregung der Probe S durch das Anregungslicht 10 sendet die Probe S in grundsätzlich bekannter Art Detektionslicht 14 aus, welches im Wesentlichen denselben optischen Strahlengang zurück bis zum Hauptfarbteiler HFT läuft. Der Dreh-

spiegel 22 muss hierzu in der zum ersten Strahlweg gehörenden Position bleiben. Bei dem Detektionslicht 14 handelt es sich typischerweise um Fluoreszenzlicht, dessen Wellenlänge im Vergleich zur Wellenlänge des Anregungslichts 10 aufgrund von Stokes-Verschiebung rotverschoben ist. Diese Rotverschiebung ermöglicht das Abtrennen des Detektionslichts 14 in dem Hauptfarbteiler HFT und das Detektionslicht 14 gelangt, gegebenenfalls über weitere nicht dargestellte Komponenten wie Spiegel oder Filter, zum Detektionsmodul DM und wird dort quantitativ nachgewiesen. Die Messdaten des Detektionsmoduls DM werden der Steuer- und Auswerteeinheit PC zugeführt.

Ein wesentlicher Vorteil der erfindungsgemäßen optischen Anordnung ist, dass sehr schnell zwischen einem sogenannten Manipulationsmodus unter Verwendung von Manipulationsstrahlung 10 und einem schnellen Bildgebungsmodus, bei dem Anregungsstrahlung 16 verwendet wird, geschaltet werden kann. Das kann auf verschiedene Art und Weise erfolgen.

Die erfindungsgemäße optische Anordnung, wie sie in den Figuren 1 und 2 dargestellt ist, kann in verschiedener Hinsicht gewinnbringend erweitert werden.

In der Pupille P2 steht jetzt zum Beispiel ein resonanter Scanner. Die alternative Pupillenebene P2a kann zum Beispiel mit einem festen Spiegel belegt sein. Wird der Strahlweg derart gewählt, dass P2a adressiert wird, kann eine Manipulation oder Bildgebung mittels der quasistatischen Scanner erfolgen, wobei der resonante Scanner umgangen wird. Alternativ ist es auch vorteilhaft, in P2a optisch aktive Elemente zu platzieren. Zum Beispiel kann dort ein wellenfrontmodulierendes Element platziert werden, welches sehr schnell einen Defokus einstellen kann.

Sehr vorteilhaft wird der Schaltmechanismus der erfindungsgemäßen optischen Anordnung mit einer aktiven Multipunktbeleuchtung kombiniert, wie sie zum Beispiel in DE 10 2016 102 286.1 beschrieben ist. Hier kann zum Beispiel einer der Mehrfachstrahlen eine um 90° gedrehte Polarisation aufweisen. Dies ist dann der Manipulationsstrahl, der im Allgemeinen auch eine höhere Intensität aufweist. Alle verbleibenden Strahlen werden zur Bildgebung genutzt. Eine Schaltung mittels des Akustooptischen Filters (AOTF) führt jetzt zu der gewünschten Umschaltung der Beleuch-

tungsstrahlwege für die Manipulation über die Pupille P4 oder die Detektion über den Scanner S2 in der Pupille P2.

Bezugszeichenliste

x	zweite Koordinatenrichtung
y	erste Koordinatenrichtung
z	Richtung der optischen Achse
B	Fokalpunkt
DM	Detektionsmodul
HFT	Hauptfarbteiler
H1	zweite fokussierende Einrichtung, erster Hohlspiegel
H2	dritte fokussierende Einrichtung, zweiter Hohlspiegel
L4	vierte fokussierende Einrichtung, Linse oder Linsengruppe
LM	Lasermodul/Lichtquelle
MO	Mikroskopobjektiv
P	Pupillenebene des Mikroskopobjektivs MO
PC	Steuer- und Auswerteeinheit
P1	erste Pupillenebene
P2	zweite Pupillenebene
P2a	alternative zweite Pupillenebene
P3	dritte Pupillenebene
P4	vierte Pupillenebene
S	Probe
SM	Scanmodul, erfindungsgemäße optische Anordnung
SO	Scanoptik, erste fokussierende Einrichtung
SP	Probenebene
S1	erster Scanner, erste Strahlumlenkeinrichtung
S2	zweiter Scanner, zweite Strahlumlenkeinrichtung
S3	dritter Scanner, dritte Strahlumlenkeinrichtung
ZB	Zwischenbildebene
10	Manipulationsstrahlung, Manipulationslicht

12 optische Achse
13 Doppelpfeil
14 Detektionslicht
16 Anregungsstrahlung, Anregungslicht
20 zweites (variables) Strahlumlenkmittel
22 Drehspiegel
30 erstes Strahlumlenkmittel
31 feststehender Spiegel
32 weitere strahlumlenkende und/oder strahlformende Komponente
40 Multipunkt-Modul
71-75 Leitungen von Mikroskopkomponenten zu PC
100 Laser-Scanning-Mikroskop

Patentansprüche

1. Optische Anordnung zum Scannen von Anregungsstrahlung und/oder Manipulationsstrahlung in einem Laser-Scanning-Mikroskop, insbesondere einem Laser-Scanning-Fluoreszenz-Mikroskop,
mit einer Scanoptik (SO) als erster fokussierender Einrichtung zum Bereitstellen einer ersten Pupillenebene (P1),
mit einer ersten Strahlumlenkeinrichtung, die durch einen in der ersten Pupillenebene (P1) angeordneten ersten Scanner (S1) gebildet ist, zum Scannen der Anregungsstrahlung (16) und/oder Manipulationsstrahlung (10) in einer ersten Koordinatenrichtung (y),
mit einer zweiten fokussierenden Einrichtung (H1) zum Erzeugen einer zweiten Pupillenebene (P2), die zu der ersten Pupillenebene (P1) optisch konjugiert ist,
mit einer zweiten Strahlumlenkeinrichtung (S2) zum Umlenken der Anregungsstrahlung (16) und/oder Manipulationsstrahlung (10), die in der zweiten Pupillenebene (P2) angeordnet ist,
dadurch gekennzeichnet,
dass eine dritte fokussierende Einrichtung (H2) vorhanden ist zum Erzeugen einer dritten Pupillenebene (P3), die zu der ersten Pupillenebene (P1) optisch konjugiert ist,
dass in der dritten Pupillenebene (P3) eine dritte Strahlumlenkeinrichtung (S3) angeordnet ist zum Umlenken der Anregungsstrahlung (16) und/oder Manipulationsstrahlung (10),
dass zwischen der zweiten fokussierenden Einrichtung (H1) und der zweiten Pupillenebene (P2) einerseits und der zweiten Pupillenebene (P2) und der dritten fokussierenden Einrichtung (H2) andererseits ein erstes Strahlumlenkmittel (30) vorhanden ist zum Umlenken der von der dritten fokussierenden Einrichtung (H2) kommenden Anregungsstrahlung (16) und/oder Manipulati-

onsstrahlung (10) unter Umgehung der zweiten Strahlumlenkeinrichtung (S2) in Richtung der zweiten fokussierenden Einrichtung (H1),
dass eine vierte fokussierende Einrichtung (L4) zum Erzeugen einer vierten Pupillenebene (P4) vorhanden ist, die zur dritten Pupillenebene (P3) optisch konjugiert ist, und
dass in der vierten Pupillenebene (P4) ein variables zweites Strahlumlenkmittel (20) angeordnet ist zum Umschalten eines optischen Strahlengangs zwischen einem ersten Strahlweg und einem zweiten Strahlweg.

2. Optische Anordnung nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
dass der erste Strahlweg mindestens von dem variablen zweiten Strahlumlenkmittel (20) über die dritte Strahlumlenkeinrichtung (S3) und die zweite Strahlumlenkeinrichtung (S2) zu dem ersten Scanner (S1) verläuft und/oder
dass der zweite Strahlweg mindestens von dem variablen zweiten Strahlumlenkmittel (20) über die dritte Strahlumlenkeinrichtung (S3) unter Umgehung der zweiten Strahlumlenkeinrichtung (S2) über das erste Strahlumlenkmittel (30) zu dem ersten Scanner (S1) verläuft.

3. Optische Anordnung nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
dass der erste Strahlweg mindestens von dem variablen zweiten Strahlumlenkmittel (20) über die vierte fokussierende Einrichtung (L4), die dritte Strahlumlenkeinrichtung (S3), die dritte fokussierende Einrichtung (H2), die zweite Strahlumlenkeinrichtung (S2), die zweite fokussierende Einrichtung (H1) zu dem ersten Scanner (S1) verläuft und
dass der zweite Strahlweg mindestens von dem variablen zweiten Strahlumlenkmittel (20) über die vierte fokussierende Einrichtung (L4), die dritte Strahlumlenkeinrichtung (S3), die dritte fokussierende Einrichtung (H2) unter Umgehung der zweiten Strahlumlenkeinrichtung (S2) über das erste Strahlumlenkmittel (30) und die zweite fokussierende Einrichtung (H1) zu dem ersten Scanner (S1) verläuft.

4. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
dass, bezogen auf die Anregungsstrahlung (16) und die Manipulationsstrahlung (10), die zweite Pupillenebene (P2) strahlaufwärts von der ersten Pupillenebene (P1), die dritte Pupillenebene (P3) strahlaufwärts von der zweiten Pupillenebene (P2), und die vierte Pupillenebene (P4) strahlaufwärts von der dritten Pupillenebene (P3) liegt.

5. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
dass die zweite fokussierende Einrichtung (H1) und/oder die dritte fokussierende Einrichtung (H2) ein Hohlspiegel, insbesondere ein torischer oder sphärischer Hohlspiegel, ist.

6. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet,
dass die vierte fokussierende Einrichtung eine Linse (L4) oder eine Linsengruppe ist.

7. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
dadurch gekennzeichnet,
dass die zweite Strahlumlenkeinrichtung in der zweiten Pupillenebene (P2) ein zweiter Scanner (S2) ist zum Scannen der Anregungsstrahlung (16) und/oder der Manipulationsstrahlung (10) in einer von der ersten Koordinatenrichtung (y) verschiedenen zweiten Koordinatenrichtung (x) und/oder
dass die dritte Strahlumlenkeinrichtung in der dritten Pupillenebene (P3) ein dritter Scanner (S3) ist zum Scannen der Anregungsstrahlung (16) und/oder der Manipulationsstrahlung (10) in einer von der ersten Koordinatenrichtung (y) verschiedenen zweiten Koordinatenrichtung (x).

8. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 7,
dadurch gekennzeichnet,
dass die zweite Strahlumlenkeinrichtung in der zweiten Pupillenebene (P2) und/oder die dritte Strahlumlenkeinrichtung in der dritten Pupillenebene (P3) ein feststehender Spiegel, ein Spiegel, dessen Oberfläche aktiv gekrümmt werden kann, oder ein sonstiges wellenfrontveränderndes Element ist.

9. Optische Anordnung nach Anspruch 7 oder 8,
dadurch gekennzeichnet,
dass der zweite Scanner (S2) ein Resonanzscanner ist und der dritte Scanner (S3) ein quasistatischer Scanner ist oder
dass der dritte Scanner (S3) ein Resonanzscanner ist und der zweite Scanner (S2) ein quasistatischer Scanner ist.

10. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 9,
dadurch gekennzeichnet,
dass der erste Scanner (S1) ein quasistatischer Scanner ist.

11. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 10,
dadurch gekennzeichnet,
dass das erste Strahlumlenkmittel (30) mindestens einen fest positionierten Spiegel, insbesondere genau zwei fest positionierte Spiegel (31, 32) aufweist.

12. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
dass das zweite variable Strahlumlenkmittel (20) einen variabel positionierbaren Spiegel (21, 22) aufweist.

13. Optische Anordnung nach Anspruch 12,
dadurch gekennzeichnet,
dass der variabel positionierbare Spiegel ein Drehspiegel (22) mit einer Dreheinrichtung ist.

14. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 13,
dadurch gekennzeichnet,
dass das erste Strahlumlenkmittel (30) und/oder das variable zweite Strahlumlenkmittel (20) einen dielektrischen und/oder dichroitischen Spiegel (23) aufweist.

15. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 14,
dadurch gekennzeichnet,
dass das variable zweite Strahlumlenkmittel (20) einen wellenlängenabhängigen und polarisationsabhängigen dielektrischen und/oder dichroitischen Spiegel (24) aufweist, wobei dieser Spiegel (24)

- Anregungsstrahlung (16) und/oder Manipulationsstrahlung (10) mit einer ersten Wellenläge (61) und einem ersten Polarisationszustand (p) transmittiert,
- Anregungsstrahlung (16) und/oder Manipulationsstrahlung (10) mit der ersten Wellenläge (61) und einem zweiten Polarisationszustand (s), der von dem ersten Polarisationszustand verschieden ist, reflektiert und
- von einer Probe (S) ausgesandtes Fluoreszenzlicht (14) mit einer rotverschobenen Wellenlänge (62) unabhängig von dessen Polarisationszustand transmittiert oder reflektiert.

16. Optische Anordnung nach Anspruch 15,
dadurch gekennzeichnet,
dass der erste Polarisationszustand bezogen auf den dielektrischen und/oder dichroitischen Spiegel s-Polarisation ist und dass der zweite Polarisationszustand bezogen auf den dielektrischen und/oder dichroitischen Spiegel p-Polarisation ist.

17. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 16,
dadurch gekennzeichnet,
dass in dem zweiten Strahlweg eine alternative zweite Pupillenebene (P2a) gebildet ist, die zu der ersten Pupillenebene (P1) optisch konjugiert ist und in der eine weitere strahlumlenkende und/oder strahlformende Komponente (32), die Teil des ersten Strahlumlenkmittels (30) ist, angeordnet ist.

18. Optische Anordnung nach Anspruch 17,
dadurch gekennzeichnet,
dass die weitere strahlumlenkende und/oder strahlformende Komponente (32) ein, insbesondere feststehender, Spiegel (31) ist.

19. Optische Anordnung nach Anspruch 18,
dadurch gekennzeichnet,
dass die weitere strahlumlenkende Komponente (32) ein Spiegel, dessen Oberfläche aktiv gekrümmt werden kann, ein segmentierter Spiegel oder eine sonstige Einrichtung zum Manipulieren der Wellenfront, beispielsweise ein räumlicher Lichtmodulator, ist.

20. Optische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 19,
dadurch gekennzeichnet,
dass eine Steuereinheit vorhanden ist zum aufeinander abgestimmten Ansteuern des ersten Scanners (S1), der zweiten Strahlumlenkeinrichtung (S2), der dritten Strahlumlenkeinrichtung (S3) und/oder des variablen zweiten Strahlumlenkmittels (20).

21. Optische Anordnung nach Anspruch 20,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Steuereinheit dazu eingerichtet ist, den ersten Scanner (S1), die zweite Strahlumlenkeinrichtung (S2), die dritte Strahlumlenkeinrichtung (S3) und/oder das variable zweite Strahlumlenkmittel (20) dergestalt aufeinander

abgestimmt anzusteuern, dass unabhängig davon, ob der erste oder der zweite Strahlweg durchlaufen wird, dieselben Probenorte mit Anregungsstrahlung oder Manipulationsstrahlung beaufschlagt werden.

22. Laser-Scanning-Mikroskop
mit mindestens einer Laserlichtquelle (LM) zum Aussenden von Laserstrahlung (10, 16) zum Anregen und/oder Manipulieren einer Probe (P),
mit mindestens einem Hauptfarbteiler zum Trennen von Anregungsstrahlung (16) und/oder Manipulationsstrahlung (10) einerseits und wellenlängenverschobenem Detektionslicht (14), welches von einer Probe (S) ausgeht, andererseits,
mit mindestens einem Mikroskopobjektiv (MO) zum Leiten und Fokussieren von Anregungsstrahlung (16) und/oder Manipulationsstrahlung (10) auf eine Probe (S) und zum Leiten und Kollimieren von Detektionslicht (14), welches von der Probe (S) ausgeht, zurück in Richtung des Hauptfarbteilers (HFT), und
mit einem Detektionsmodul (DM) zum Nachweisen des Detektionslichts (14), dadurch gekennzeichnet,
dass eine optische Anordnung zum Scannen von Anregungsstrahlung (16) und/oder Manipulationsstrahlung nach einem der Ansprüche 1 bis 21 vorhanden ist.

23. Laser-Scanning-Mikroskop nach Anspruch 22,
dadurch gekennzeichnet,
dass eine Einrichtung zur Multipunktbeleuchtung (40) mit einer Mehrzahl von Beleuchtungskanälen vorhanden ist.

24. Laser-Scanning-Mikroskop nach Anspruch 23,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Einrichtung zur Multipunktbeleuchtung (40) zur Steuerung der einzelnen Beleuchtungskanäle einen mehrkanaligen AOTF aufweist.

25. Laser-Scanning-Mikroskop nach Anspruch 23 oder 24,
dadurch gekennzeichnet,
dass für mindestens einen der Beleuchtungskanäle eine Einrichtung zur Manipulation, insbesondere zum Drehen, der Polarisation, insbesondere ein Lambda-Halbe-Plättchen, vorhanden ist.

26. Laser-Scanning-Mikroskop nach einem der Ansprüche 22 bis 25,
welches eingerichtet ist zur Kontrastgebung auf Grundlage mindestens eines nichtlinearen Kontrastprinzips, insbesondere Mehrphotonenfluoreszenz, beispielsweise Zwei- oder Drei-Photonen-Fluoreszenz, CARS oder SRS, und welches insbesondere ein Zwei-Photonen-Laser-Scan-Mikroskop ist.

27. Laser-Scanning-Mikroskop nach einem der Ansprüche 22 bis 26,
welches ein konfokales Mikroskop, insbesondere ein konfokales Laser-Scanning-Fluoreszenz-Mikroskop, ist.

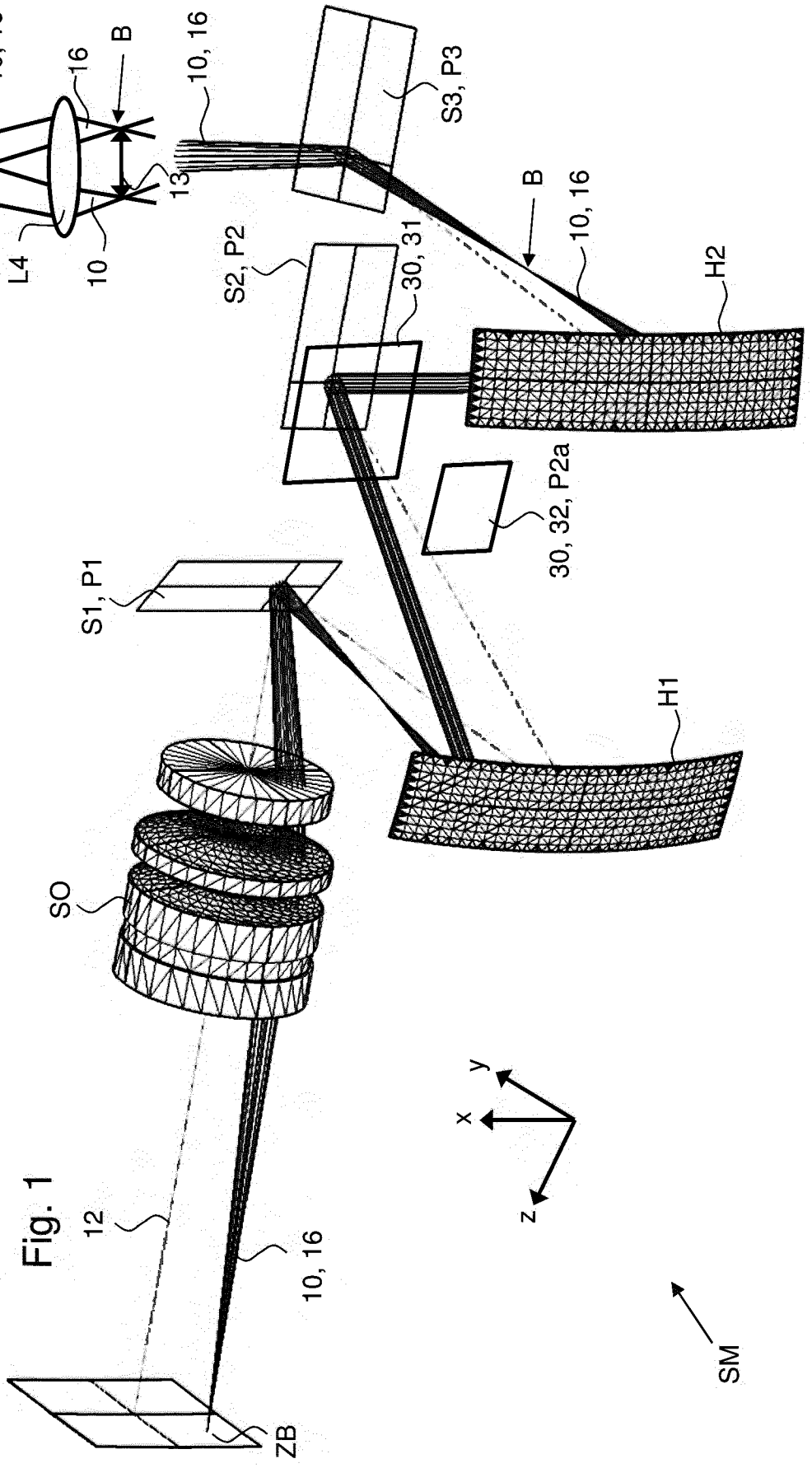

10, 16
16
B
10, 16
S3, P3
13
20, P4, 22
L4
10
S2, P2
30, 31
B
10, 16
H2
30, 32, P2a
S1, P1
H1
SO
y
x
z
12
10, 16
ZB
SM

Fig. 1

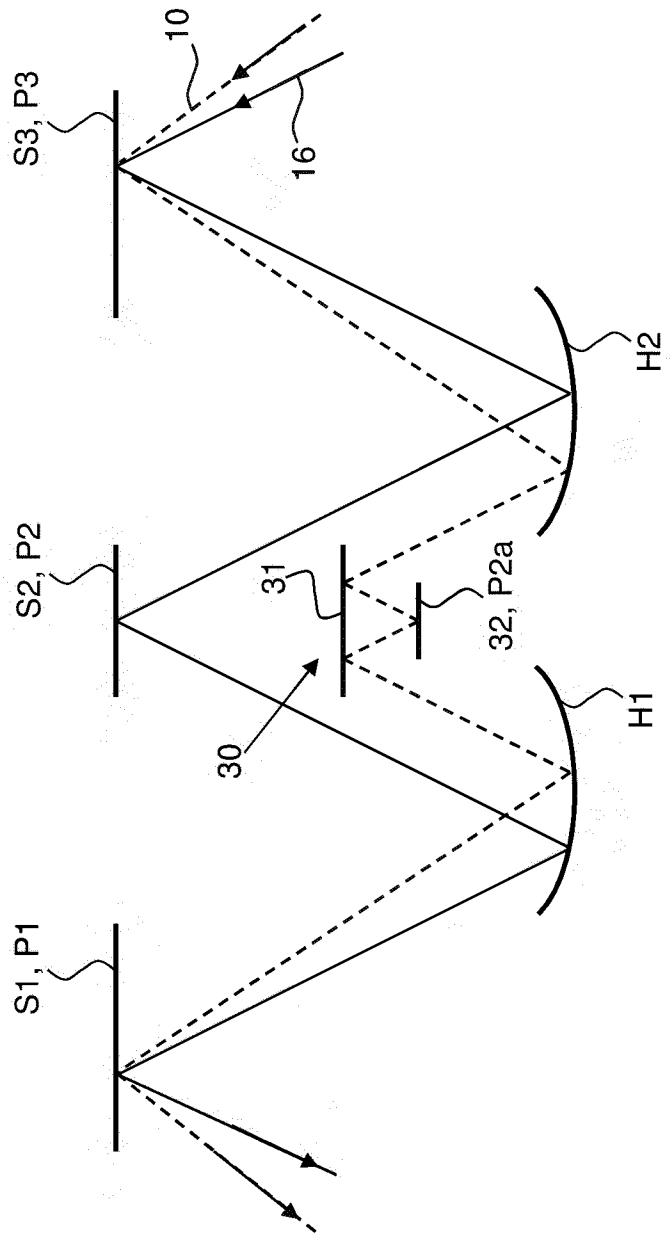


Fig. 2

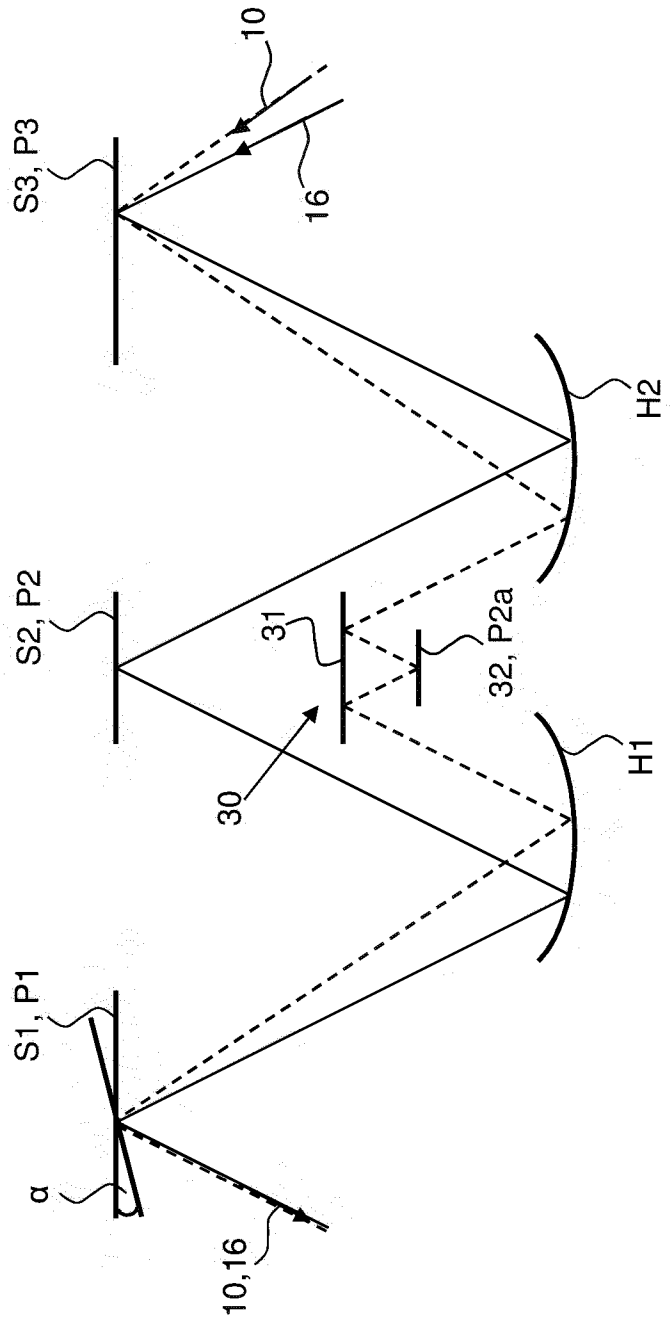


Fig. 3

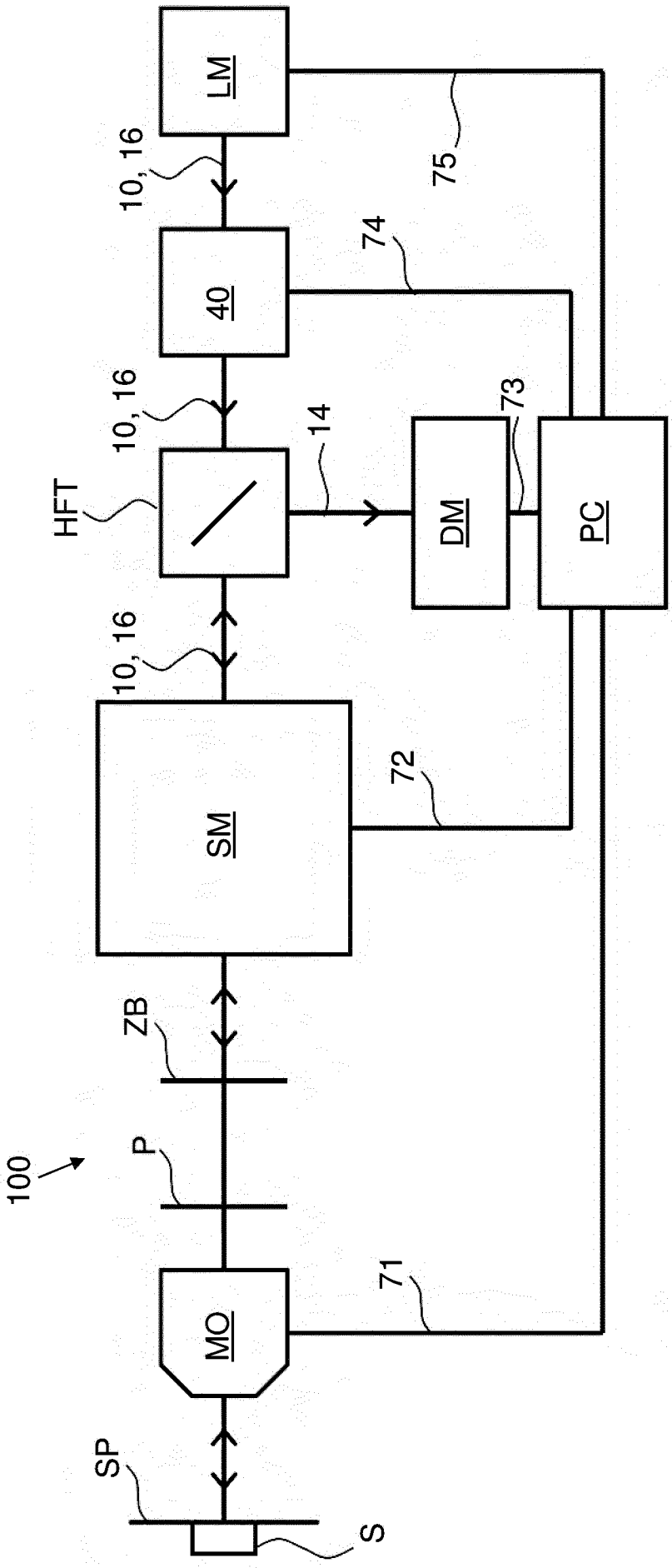


Fig. 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2018/072816

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G02B 21/00(2006.01)i; ***G02B 26/10***(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

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	DE 102014017002 A1 (ZEISS CARL AG [DE]; ZEISS CARL MICROSCOPY GMBH [DE]) 12 May 2016 (2016-05-12) the whole document	1,2,4-27
A	DE 102014017001 A1 (ZEISS CARL AG [DE]; ZEISS CARL MICROSCOPY GMBH [DE]) 12 May 2016 (2016-05-12) cited in the application the whole document	1-27
A	WO 2005054924 A1 (LEICA MICROSYSTEMS [DE]; BOEHM INGO [DE]; ULRICH HEINRICH [DE]; KNEBEL) 16 June 2005 (2005-06-16) abstract; figures 1, 2	1-27
A	EP 1970744 A1 (NIKON CORP [JP]) 17 September 2008 (2008-09-17) abstract; figure 1	1-27
A	EP 2042905 A1 (NIKON CORP [JP]) 01 April 2009 (2009-04-01) cited in the application abstract; figures	1-27

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
28 November 2018	**10 December 2018**

Name and mailing address of the ISA/EP	Authorized officer
European Patent Office **p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk** **Netherlands** Telephone No. **(+31-70)340-2040** Facsimile No. **(+31-70)340-3016**	**Windecker, Robert** Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/EP2018/072816

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
DE 102014017002 A1	12 May 2016	DE 102014017002 A1	12 May 2016
		US 2016131881 A1	12 May 2016
DE 102014017001 A1	12 May 2016	CN 107003506 A	01 August 2017
		DE 102014017001 A1	12 May 2016
		EP 3218757 A1	20 September 2017
		JP 2017535816 A	30 November 2017
		US 2017315339 A1	02 November 2017
		WO 2016075195 A1	19 May 2016
WO 2005054924 A1	16 June 2005	DE 10356826 A1	07 July 2005
		JP 4820759 B2	24 November 2011
		JP 2007513374 A	24 May 2007
		US 2007152556 A1	05 July 2007
		WO 2005054924 A1	16 June 2005
EP 1970744 A1	17 September 2008	EP 1970744 A1	17 September 2008
		JP 4915348 B2	11 April 2012
		JP WO2007077710 A1	11 June 2009
		US 2008316561 A1	25 December 2008
		WO 2007077710 A1	12 July 2007
EP 2042905 A1	01 April 2009	EP 2042905 A1	01 April 2009
		EP 3073308 A1	28 September 2016
		EP 3073309 A1	28 September 2016
		JP 4992898 B2	08 August 2012
		JP WO2008004336 A1	03 December 2009
		US 2009147256 A1	11 June 2009
		WO 2008004336 A1	10 January 2008

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2018/072816

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. G02B21/00 G02B26/10
ADD.

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
G02B

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

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 10 2014 017002 A1 (ZEISS CARL AG [DE]; ZEISS CARL MICROSCOPY GMBH [DE]) 12. Mai 2016 (2016-05-12) das ganze Dokument ----- DE 10 2014 017001 A1 (ZEISS CARL AG [DE]; ZEISS CARL MICROSCOPY GMBH [DE]) 12. Mai 2016 (2016-05-12) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1,2,4-27
A	----- WO 2005/054924 A1 (LEICA MICROSYSTEMS [DE]; BOEHM INGO [DE]; ULRICH HEINRICH [DE]; KNEBEL) 16. Juni 2005 (2005-06-16) Zusammenfassung; Abbildungen 1, 2 ----- -/--	1-27

[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
28. November 2018	10/12/2018

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

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2018/072816

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 1 970 744 A1 (NIKON CORP [JP]) 17. September 2008 (2008-09-17) Zusammenfassung; Abbildung 1 -----	1-27
A	EP 2 042 905 A1 (NIKON CORP [JP]) 1. April 2009 (2009-04-01) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung; Abbildungen -----	1-27

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2018/072816

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 102014017002 A1	12-05-2016	DE 102014017002 A1	12-05-2016
		US 2016131881 A1	12-05-2016
DE 102014017001 A1	12-05-2016	CN 107003506 A	01-08-2017
		DE 102014017001 A1	12-05-2016
		EP 3218757 A1	20-09-2017
		JP 2017535816 A	30-11-2017
		US 2017315339 A1	02-11-2017
		WO 2016075195 A1	19-05-2016
WO 2005054924 A1	16-06-2005	DE 10356826 A1	07-07-2005
		JP 4820759 B2	24-11-2011
		JP 2007513374 A	24-05-2007
		US 2007152556 A1	05-07-2007
		WO 2005054924 A1	16-06-2005
EP 1970744 A1	17-09-2008	EP 1970744 A1	17-09-2008
		JP 4915348 B2	11-04-2012
		JP WO2007077710 A1	11-06-2009
		US 2008316561 A1	25-12-2008
		WO 2007077710 A1	12-07-2007
EP 2042905 A1	01-04-2009	EP 2042905 A1	01-04-2009
		EP 3073308 A1	28-09-2016
		EP 3073309 A1	28-09-2016
		JP 4992898 B2	08-08-2012
		JP WO2008004336 A1	03-12-2009
		US 2009147256 A1	11-06-2009
		WO 2008004336 A1	10-01-2008