

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : G02B 21/00	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/37985 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. Juni 2000 (29.06.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/10262 (22) Internationales Anmeldedatum: 22. Dezember 1999 (22.12.99) (30) Prioritätsdaten: 198 59 314.7 22. Dezember 1998 (22.12.98) DE 199 36 573.3 3. August 1999 (03.08.99) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): CARL ZEISS JENA GMBH [DE/DE]; Tatzendpromenade 1a, D-07745 Jena (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WOLLESCHEFSKY, Ralf [DE/DE]; An der Promenade 3, D-99510 Schöten (DE). (74) Gemeinsamer Vertreter: CARL ZEISS JENA GMBH; Tatzendpromenade 1a, D-07745 Jena (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(54) Title: ARRANGEMENT FOR SEPARATING EXCITATION LIGHT AND EMISSION LIGHT IN A MICROSCOPE (54) Bezeichnung: ANORDNUNG ZUR SEPARIERUNG VON ANREGUNGS- UND EMISSIONSLICHT IN EINEM MIKROSKOP (57) Abstract <p>The invention relates to an arrangement of a light diffracting element for separating excitation light and emission light in a microscope beam path, preferably in a confocal microscope, and especially in a laser scanning microscope. According to the invention, the light diffracting element is passed through by both the excitation light as well as by the emission light, and at least one wavelength of the excitation is affected by diffracting, whereas other wavelengths emitted by the sample are passed through without being affected, thus being spatially separated from the excitation light.</p> (57) Zusammenfassung <p>Anordnung eines lichtbeugenden Elementes zur Separierung von Anregungs- und Emissionslicht in einem mikroskopischen Strahlengang, vorzugsweise in einem konfokalen Mikroskop, und insbesondere in einem Laser-Scanning-Mikroskop, wobei das lichtbeugende Element sowohl vom Anregungslicht als auch vom Emissionslicht durchlaufen wird und mindestens eine Wellenlänge der Anregung durch Beugung beeinflusst, während andere von der Probe emittierte Wellenlängen das Element unbeeinflusst durchlaufen und dadurch räumlich vom Anregungslicht getrennt werden.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

5

10 **Titel:**

Anordnung zur Separierung von Anregungs- und Emissionslicht in einem
Mikroskop

15 In Fig. 1-3 werden beispielhaft erfindungsgemäße Anordnungen erläutert.
In Fig.1 wird über einen Spiegel SP und einen Strahlteiler ST das Licht
(Anregungslicht) zweier Laser L1,L2 mit unterschiedlichen Wellenlängen in
einen gemeinsamen Strahlengang eingekoppelt,, der an der Seite S1 eines
verspiegelten Prismas in Richtung eines AOTF (Acousto-OpticalTunable Filter)
20 reflektiert wird.

Das Anregungslicht wird in den AOTF eingeführt, wobei in der ersten Ordnung
gebeugtes Licht für über die Ansteuerfrequenz des AOTF eingestellte
Wellenlänge genau in Richtung eines Pinholes PH mit vor - und
nachgeordneter Pinholeoptik PHO zur Einstellung des Strahlprofils abgelenkt
25 wird, während andere mögliche Wellenlängen ungebeugt in nullter Ordnung
den AOTF durchqueren
und nicht auf das Pinhole gelangen.

Das Pinhole PH dient hier gleichzeitig als Anregungs- und Detektionspinhole.
Über Scaneinheiten SC1, SC2 und eine Scanoptik SCO wird das
30 Anregungslicht
in Richtung eines Mikroskopischen Strahlengangs MI in Richtung einer Probe
abgebildet.

Das von der Probe emittierte Licht, bestehend aus Anteilen des
Anregungslichtes
35 und wellenlängenverschobenen Flureszenzanteilen, durchläuft den Lichtweg in
umgekehrter Richtung bis zum AOTF. Hier gelangen die Wellenlängenanteile
des Anregungslichtes wiederum über die Beugung erster Ordnung auf die
Spiegelseite S1 des Prismas PS, während die Fluoreszenzanteile den AOTF

5 ungebeugt in nullter Ordnung durchqueren und dadurch einen Winkel zum reflektierten Anregungslicht einnehmen.

Zwischen den rückkehrenden Strahlen nullter und erster Ordnung ist nun genau die Spitze zwischen den Prismenflächen S1 und S2 angeordnet, wodurch das Fluoreszenzlicht auf die Seite S2 trifft und von dieser in Richtung einer
10 Detektionseinheit, hier beispielhaft bestehend aus einem Linienfilter LF, einem Farbteiler NFT und zwei Detektoren für unterschiedliche Wellenlängen , reflektiert wird.

Durch die niedrige Bandbreite des AOTF von ca. 2 nm Bandbreite für das
15 Anregungslicht wirkt er als extremer Kantenfilter mit deutlichen Vorteilen etwa gegen dichroitische Filter mit Bandbreiten größer 10 nm.

Das ist von besonderer Bedeutung, weil der Abstand von Anregungswellenlänge und Fluoreszenzwellenlängen kleiner als 10 nm sein kann und durch die erfindungsgemäße Anordnung eine wellenlängenabhängige
20 Trennung dennoch möglich ist.

Durch Frequenzänderung kann der AOTF von der Wellenlänge des Lasers L1 auf die Wellenlänge des Lasers L2 umgeschaltet werden und wiederum das Anregungslicht vom Fluoreszenzlicht getrennt werden.

25 Statt des Prismas mit den Seiten S1, S2 können auch zwei unabhängige, den Seiten S1,S2 entsprechende, aber nicht zusammenhängende Spiegel verwendet werden.

Ein Vorteil ist, daß diese auch drehbar ausgebildet sein können, um eine genaue Einstellung auf den AOTF bzw. die Detektion DE zu ermöglichen.

30 In Fig. 2 ist eine ähnliche Anordnung mit nur einem Scanner SC dargestellt. Hier ist statt des Prismas ein Spiegel S vorgesehen, der das Anregungslicht in Richtung des AOTF analog zu Fig. 1 umlenkt, wobei hier das in nullter Ordnung zurückkehrende Fluoreszenzlicht durch den AOTF hindurchgehende Licht neben dem Spiegel S verläuft und auf diese Weise in Richtung einer hier nicht
35 dargestellten Detektion gelangt.

Grundsätzlich sind auch Anordnungen denkbar , bei der der AOTF allein als Separationseinheit von Anregungslicht und Fluoreszenzlicht dienen kann,

5 indem das Laserlicht in Richtung der ersten Ordnung ohne ein vorgeschaltetes Element in den AOTF gelangt und das Detektionslicht unter einem Winkel zum Anregungslicht den AOTF verläßt und direkt in eine Detektioneinheit gelangt, was lediglich Auswirkungen auf die Baulänge hat, da der Winkel mit
10 beispielsweise vier Grad recht klein ausfällt und Überlagerungen der Wellenlängenanteile vermieden werden sollen.

Weiterhin kann auch nur für das Fluoreszenzlicht ein separierender Spiegel vorgesehen sein.

In Fig. 3 ist eine weitere vorteilhafte Ausführung in Form eines unverspiegelten Prismas vorgesehen, das durch Brechung das Licht eines Anregungslasers in
15 erster

Ordnung in den AOTF hineinführt und die nullte Ordnung (das Fluoreszenzlicht) in Richtung der Detektion DE ablenkt.

Durch den Winkel zwischen erster und nullter Ordnung und unterschiedlicher Wellenlängen ist vorteilhaft eine deutliche Separierung der Wellenlängenanteile
20 möglich.

Die Erfindung ist besonders vorteilhaft in einem Laser- Scanning - Mikroskop mit einem AOTF anwendbar.

Andere vorteilhafte Anwendungen eines anderen lichtbeugenden Elementes zur Strahlungstrennung durch verschiedene Beugungsordnungen sind jedoch in
25 einem mikroskopischen Strahlengang denkbar und vorteilhaft in den Umfang der Erfindung eingeschlossen.

So kann dieses vorteilhaft zur Regelung der Anregungsintensität eingesetzt werden.

30 In Fig. 4 sind vorteilhaft mehrere derartige Elemente , hier AOTF und AOM im Laserstrahlengang zur Einkopplung der Laserstrahlung vorgesehen.

Hier können mehrere Laserlinien L1-L3 wie UV/VIS oder IR simultan mit voneinander unabhängig einstellbarer Anregungsleistung oder einzeln eingekoppelt werden.

35

5 **Patentansprüche**

1.

Anordnung eines lichtbeugenden Elementes zur Separierung von Anregungs- und Emissionlicht in einem mikroskopischen Strahlengang, vorzugsweise in einem konfokalen Mikroskop, und insbesondere in einem Laser- Scanning -
10 Mikroskop.

2.

Anordnung nach Anspruch 1, wobei das lichtbeugende Element sowohl vom Anregungslicht als auch vom Emissionslicht durchlaufen wird.

2a.

15 Anordnung nach Anspruch 2, wobei das von der Probe emittierte Licht aus Anteilen des Anregungslichtes und wellenlängenverschobenen Flureszenzanteilen besteht.

3.

Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche,

20 wobei das lichtbeugende Element mindestens eine Wellenlänge der Anregung durch Beugung beeinflusst, während andere von der Probe emittierte Wellenlängen das Element unbeeinflusst durchlaufen und dadurch räumlich vom Anregungslicht getrennt werden.

3a

25 Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche , wobei das lichtbeugende Element durch Frequenzänderung von einer ersten Wellenlänge eines ersten Lasers auf eine zweite Wellenlänge eines zweiten Lasers umgeschaltet wird.

4.

30 Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei im Anregungsstrahlengang vor dem Element und/ oder im Detektionsstrahlengang nach dem Element zur verbesserten Trennung der Lichtanteile mindestens ein die Lichtrichtung beeinflussendes optisches Element vorgesehen ist.

35

5.

Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, mit einem AOTF als lichtbeugendes Element.

5

6.

Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche,
mit einem Reflexionselement als optisches Element

7.

10 Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche,
mit einem lichtbrechenden Element als optisches Element

8.

15 Anordnung eines lichtbeugenden Elementes zur Separierung von Anregungs-
und Emissionlicht in einem mikroskopischen Strahlengang, vorzugsweise in
einem

konfokalen Mikroskop, und insbesondere in einem Laser- Scanning -
Mikroskop,

insbesondere nach einem der Ansprüche 1-7,

20 wobei dieses auch zur Regelung der Anregungsintensität eingesetzt wird.

9..

Anordnung mehrerer lichtbeugenden Elemente in einem mikroskopischen
Strahlengang, vorzugsweise in einem konfokalen Mikroskop, und insbesondere

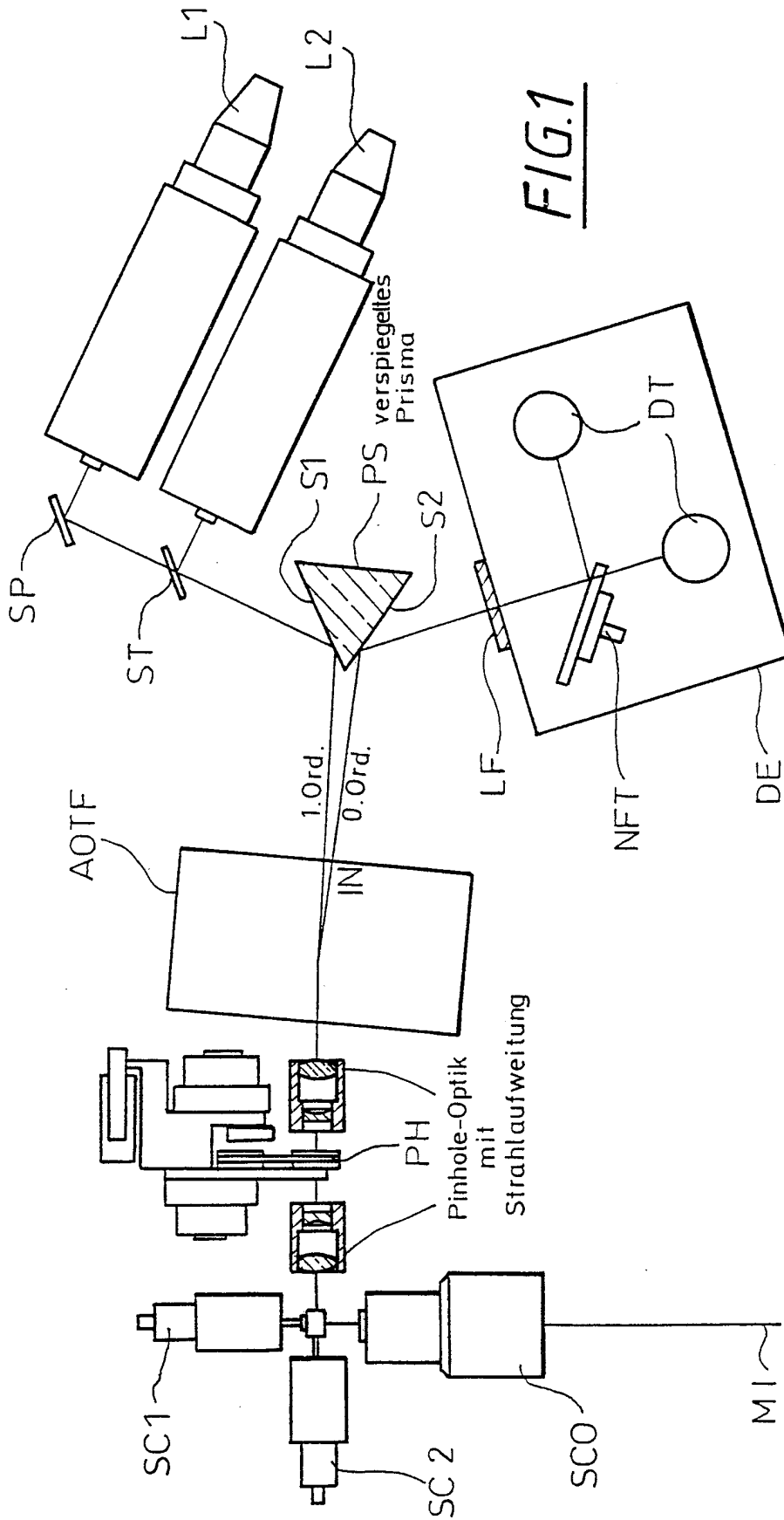
25 in einem Laser- Scanning – Mikroskop, insbesondere nach einem der
Ansprüche 1-8,

wobei diese simultan oder einzeln zur Einkopplung unterschiedlicher
Wellenlängen eingesetzt werden.

30 10. Anordnung nach Anspruch 9 mit mehreren lichtbeugenden Elementen,
wobei in Richtung der Detektion zuerst AOTF und dann AOM eingesetzt
werden.

11.

35 Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei AOTF und oder
AOM als lichtbeugende Elemente eingesetzt werden.



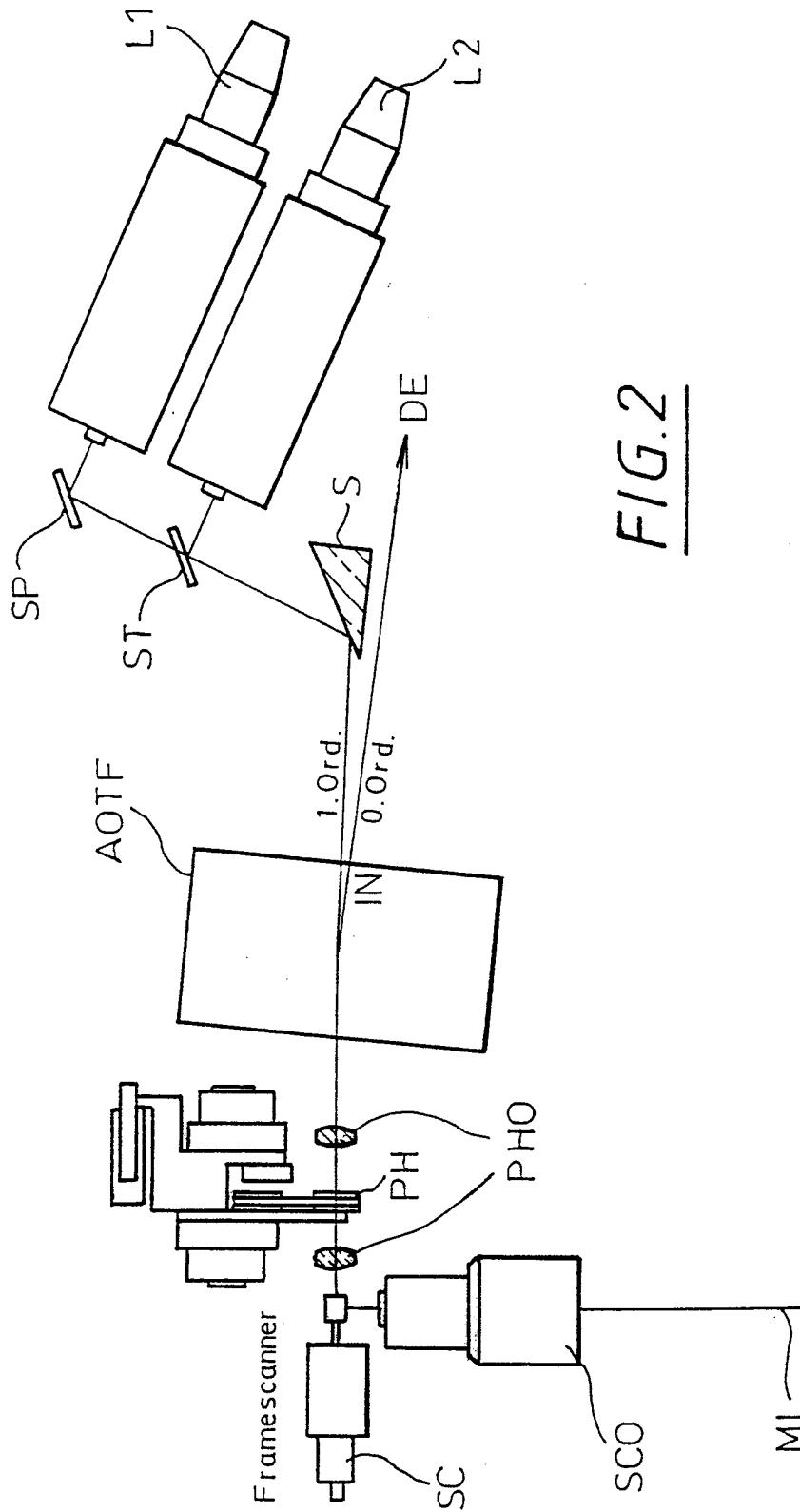


FIG. 2

3/4

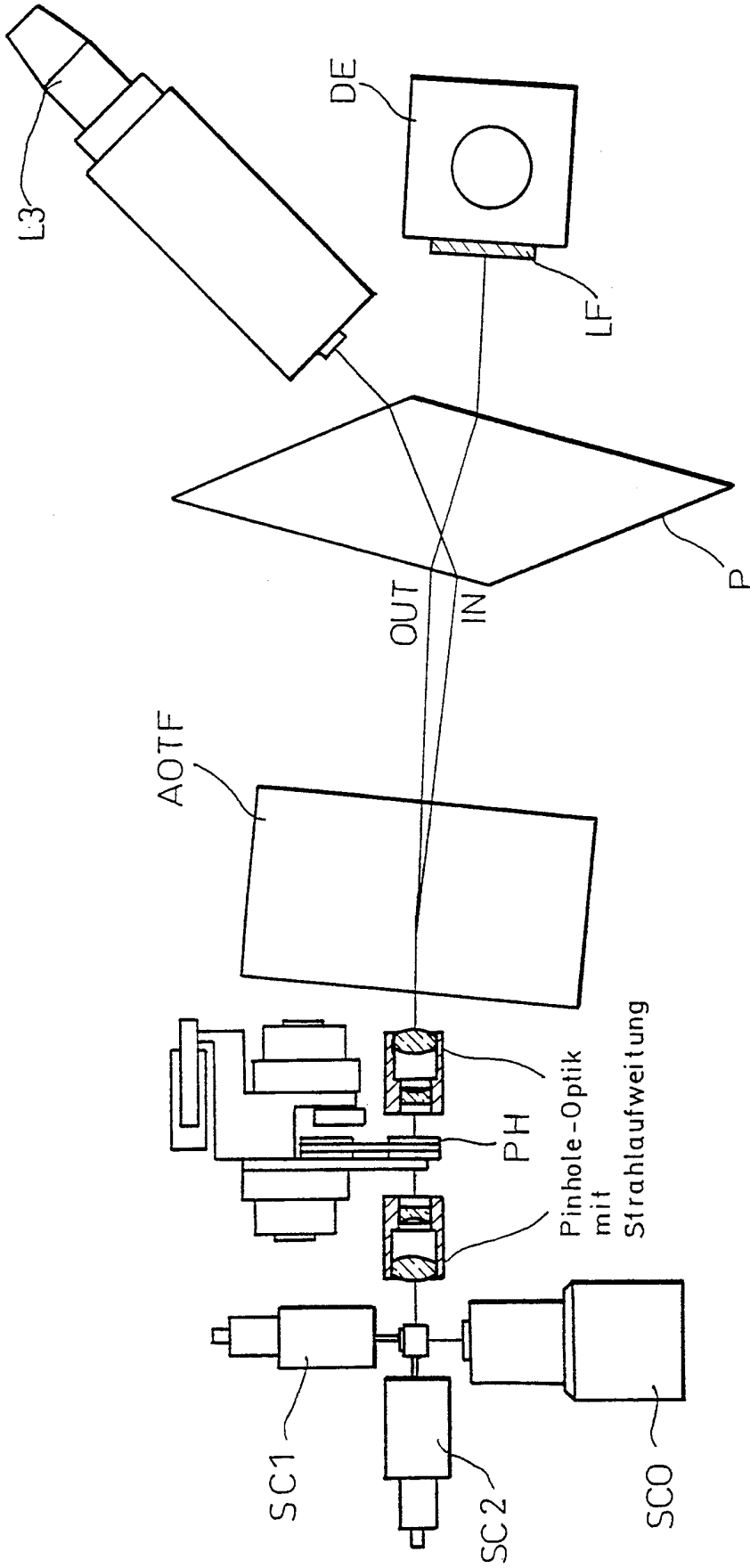
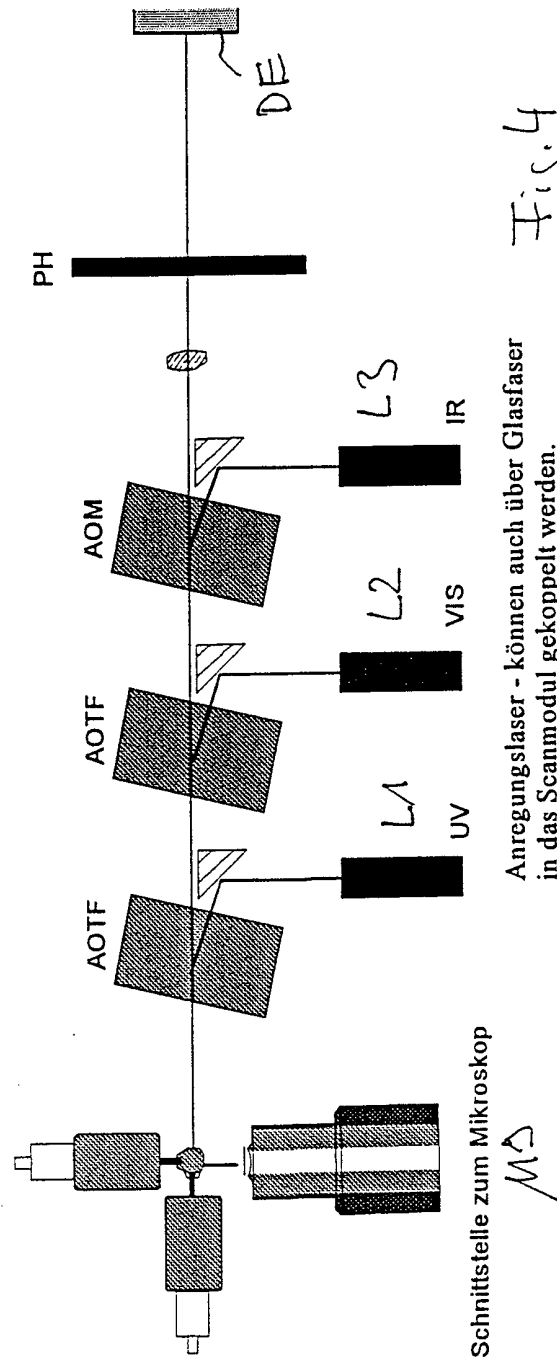


FIG. 3



Anregungslaser - können auch über Glasfaser in das Scanmodul gekoppelt werden.