

(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
31. Januar 2008 (31.01.2008)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2008/012056 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

G01J 3/14 (2006.01) G02B 21/00 (2006.01)
G01J 3/36 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2007/006547

(22) Internationales Anmeldedatum:
24. Juli 2007 (24.07.2007)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2006 034 907.5 28. Juli 2006 (28.07.2006) DE(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): CARL ZEISS MICROIMAGING GMBH
[DE/DE]; Carl-Zeiss-Promenade 10, 07745 Jena (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PACHOLIK, Jörg
[DE/DE]; Am Wiesenbach 18, 07751 Jena (DE). HUHSE,
Dieter [DE/DE]; Stindestrasse 27, 12167 Berlin (DE).

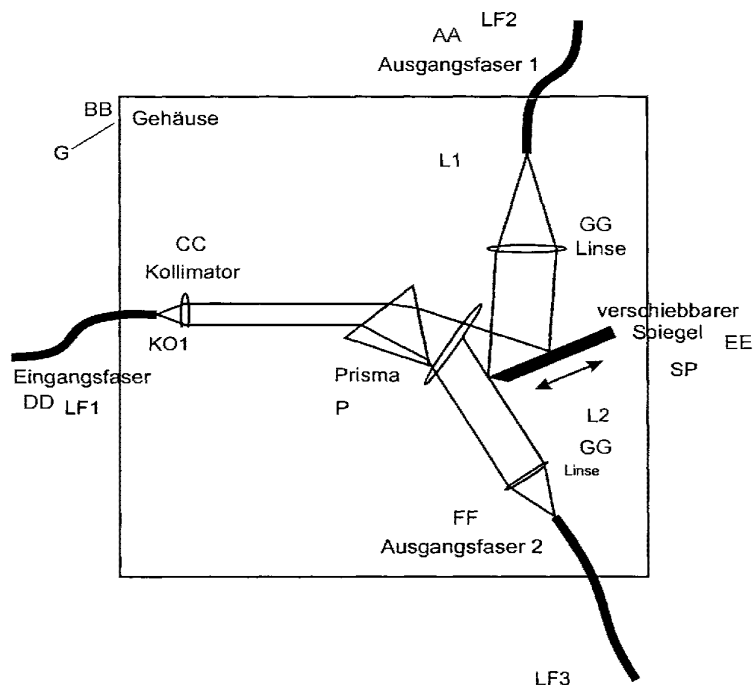
(74) Anwalt: HAMPE, Holger; Carl Zeiss Jena GmbH, Carl-Zeiss-Promenade 10, 07745 Jena (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: LASER SCANNING MICROSCOPE

(54) Bezeichnung: LASER-SCANNING-MIKROSKOP



AA output fibre 1	EE displaceable mirror
BB housing	FF output fibre 2
CC collimator	GG lens
DD input fibre	

(57) Abstract: The invention relates to a laser scanning microscope comprising an illumination beam path for illuminating a sample and a detection beam path for detecting the sample light, a dispersive element (P) being provided in the detection beam path, for splitting the sample light according to the wavelength, and different wavelength ranges being detected by means of at least first and second detectors. At least one wavelength range of the split sample light is deflected in the direction of the detection by means of a displaceable reflecting element (SP). First and second optical wave guides (LF2, LF3) are provided for transmitting the sample light to the first and second detectors. The dispersive element (P) for forming a pre-adjusted beam path is arranged with the reflecting element in a housing (G) to which the optical wave guides (LF1, LF2, LF3) are coupled.

(57) Zusammenfassung: Laser-Scanning-Mikroskop mit einem Beleuchtungsstrahlengang zur Beleuchtung einer Probe und einem Detektionsstrahlengang zur Detektion des Probenlichtes, wobei im Detektionsstrahlengang ein dispersives Element (P) zur wellenlängenabhängigen Aufspaltung des Probenlichtes vorgesehen ist und über mindestens erste und zweite Detektoren unterschiedliche Wellenlängen-

bereiche detektiert werden, wobei mindestens ein Wellenlängenbereich des aufgespaltenen Probenlichtes über ein verstellbares reflektierendes Element

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

 WO 2008/012056 A1



PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- (84) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF,

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— *Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv)*

Veröffentlicht:

— *mit internationalem Recherchenbericht*

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(SP) in Richtung der Detektion umgelenkt wird, und erste und zweite Lichtleitfasern (LF2, LF3) zur Übertragung des Probenlichts zu den ersten und zweiten Detektoren vorgesehen sind und das dispersive Element (P) zur Bildung eines vorjustierten Strahlenganges

Titel: Laser-Scanning-Mikroskop**Stand der Technik**

In einem Laser-Scanning-System werden Laser unterschiedlicher Leistungsklassen verwendet. Weiterhin ist ein Laser-Scanning-System durch eine grosse Anzahl von variablen Modulen gekennzeichnet, die als Detektor oder zur Beleuchtung dienen. In Fig. 1 ist schematisch ein Strahlengang eines Laser-Scanning-Mikroskopes dargestellt.

Ein LSM gliedert sich im wesentlichen wie in Fig. 1 dargestellt in 4 Module: Lichtquelle, Scanmodul, Detektionseinheit und Mikroskop. Diese Module werden im folgenden näher beschrieben. Es wird zusätzlich auf DE19702753A1 verwiesen.

Zur spezifischen Anregung der verschiedenen Farbstoffe in einem Präparat werden in einem LSM Laser mit verschiedenen Wellenlängen eingesetzt. Die Wahl der Anregungswellenlänge richtet sich nach den Absorptionseigenschaften der zu untersuchenden Farbstoffe. Der Anregungsstrahlung wird im Lichtquellenmodul erzeugt. Zum Einsatz kommen hierbei verschiedene Laser (Argon, Argon Krypton, TiSa-Laser). Weiterhin erfolgt im Lichtquellenmodul die Selektion der Wellenlängen und die Einstellung der Intensität der benötigten Anregungswellenlänge, z.B. durch den Einsatz eines akusto-optischen Kristalls. Anschließend gelangt die Laserstrahlung über eine Faser oder eine geeignete Spiegelanordnung in das Scanmodul.

Die in der Lichtquelle erzeugte Laserstrahlung wird mit Hilfe des Objektivs beugungsbegrenzt über die Scanner, die Scanoptik und die Tubuslinse in das Präparat fokussiert. Der Fokus rastert punktförmig die Probe in x-y-Richtung ab. Die Pixelverweilzeiten beim Scannen über die Probe liegen meist im Bereich von weniger als einer Mikrosekunde bis zu einigen 100 Mikrosekunden.

Bei einer konfokalen Detektion (descanned Detection) des Fluoreszenzlichtes, gelangt das Licht das aus der Fokusebene (Specimen) und aus den darüber- und darunterliegenden Ebenen emittiert wird, über die Scanner auf einen dichroitischen Strahlteiler (MD). Dieser trennt das Fluoreszenzlicht vom Anregungslicht. Anschließend wird das Fluoreszenzlicht auf eine Blende (konfokale Blende / Pinhole) fokussiert, die sich genau in einer zur Fokusebene konjugierten Ebene befindet. Dadurch werden Fluoreszenzlichtanteile außerhalb des Fokus unterdrückt. Durch

Variieren der Blendengröße kann die optische Auflösung des Mikroskops eingestellt werden. Hinter der Blende befindet sich ein weiterer dichroitischer Blockfilter (EF) der nochmals die Anregungsstrahlung unterdrückt. Nach Passieren des Blockfilters wird das Fluoreszenzlicht mittels eines Punktdetektors (PMT) gemessen.

Bei Verwendung einer Mehrphotonen-Absorption erfolgt die Anregung der Farbstofffluoreszenz in einem kleinen Volumen an dem die Anregungsintensität besonders hoch ist. Dieser Bereich ist nur unwesentlich größer als der detektierte Bereich bei Verwendung einer konfokalen Anordnung. Der Einsatz einer konfokalen Blende kann somit entfallen und die Detektion kann direkt nach dem Objektiv erfolgen (non descante Detektion).

In einer weiteren Anordnung zur Detektion einer durch Mehrphotonenabsorption angeregten Farbstofffluoreszenz erfolgt weiterhin eine descante Detektion, jedoch wird diesmal die Pupille des Objektivs in die Detektionseinheit abgebildet (nichtkonfokal descante Detektion).

Von einem dreidimensional ausgeleuchteten Bild wird durch beide Detektionsanordnungen in Verbindung mit der entsprechenden Einphotonen bzw. Mehrphotonen-Absorption nur die Ebene (optischer Schnitt) wiedergegeben, die sich in der Fokusebene des Objektivs befindet. Durch die Aufzeichnung mehrerer optische Schnitte in der x-y Ebene in verschiedenen Tiefen z der Probe kann anschließend rechnergestützt ein dreidimensionales Bild der Probe generiert werden. Das LSM ist somit zur Untersuchung von dicken Präparaten geeignet. Die Anregungswellenlängen werden durch den verwendeten Farbstoff mit seinen spezifischen Absorptionseigenschaften bestimmt. Auf die Emissionseigenschaften des Farbstoffes abgestimmte dichroitische Filter stellen sicher, dass nur das vom jeweiligen Farbstoff ausgesendete Fluoreszenzlicht vom Punktdetektor gemessen wird.

In biomedizinischen Applikationen werden zur Zeit mehrere verschiedene Zellregionen mit verschiedenen Farbstoffe gleichzeitig markiert (Multifluoreszenz). Die einzelnen Farbstoffe können mit den Stand der Technik entweder aufgrund verschiedener Absorptionseigenschaften oder Emissionseigenschaften (Spektren) getrennt nachgewiesen werden. Dazu erfolgt eine zusätzliche Aufspaltung des

Fluoreszenzlichts von mehreren Farbstoffen mit den Nebenstrahlteilern (DBS) und eine getrennte Detektion der einzelnen Farbstoffemissionen in getrennten Punktdetektoren (PMT x).

Das LSM LIVE der Carl Zeiss MicroImaging GmbH realisiert einen sehr schnellen Linienscanner mit einer Bilderzeugung um 120 Bildern pro Sekunde

(<http://www.zeiss.de/c12567be00459794/Contents-Frame/fd9fa0090eee01a641256a550036267b>).

In DE19702753A1 wird beschrieben, dass, beispielsweise hinter einem Pinhole in der Detektion, eine Lichtleitfaser zur Übertragung eines Teils der Detektionsstrahlung zu einem weiteren Detektor erfolgen kann.

Es sind unterschiedliche Lösungen bekannt, das Detektionslicht spektral aufzufächern und einzelne Spektralkomponenten zu detektieren. (DE 199 02 625A1, DE 10033180A1)

Erfindung:

In Fig. 2 ist die Erfindung schematisch dargestellt.

In einem Gehäuse sind, vorteilhaft fest zueinander justiert, ein Kollimator KO1 zur Kollimierung von Licht aus einer Lichtleitfaser LF1 in Richtung eines Prismas P sowie Linsen L1, L2 zur Abbildung des durch das Prisma spektral aufgespaltenen Lichtes auf Eingänge von Lichtleitfasern LF2, LF3 vorgesehen. Zumindest in einem Teil des von P kommenden spektral aufgespaltenen Lichtes ist ein verschiebbarer Spiegel SP angeordnet, der mehr oder weniger und verschieblich in die Spektralverteilung hineinragt und einen wählbaren Teil des Detektionslichtes in Richtung LF2 reflektiert.

LF2 und LF3 können hierbei in Richtung von externen Detektoren gerichtet sein.

Durch die kompakte Anordnung im Gehäuse G und die mögliche flexible An- und Auskopplung von Licht an den vorjustierten Lichtleitern LF1, LF2, LF3 kann die eingehenden Strahlung sowie die Wahl externer Detektoren an LF2, LF3 sehr flexibel und außerdem schnell und quasi justierfrei erfolgen.

Explore Litigation Insights

Docket Alarm provides insights to develop a more informed litigation strategy and the peace of mind of knowing you're on top of things.

Real-Time Litigation Alerts



Keep your litigation team up-to-date with **real-time alerts** and advanced team management tools built for the enterprise, all while greatly reducing PACER spend.

Our comprehensive service means we can handle Federal, State, and Administrative courts across the country.

Advanced Docket Research



With over 230 million records, Docket Alarm's cloud-native docket research platform finds what other services can't. Coverage includes Federal, State, plus PTAB, TTAB, ITC and NLRB decisions, all in one place.

Identify arguments that have been successful in the past with full text, pinpoint searching. Link to case law cited within any court document via Fastcase.

Analytics At Your Fingertips



Learn what happened the last time a particular judge, opposing counsel or company faced cases similar to yours.

Advanced out-of-the-box PTAB and TTAB analytics are always at your fingertips.

API

Docket Alarm offers a powerful API (application programming interface) to developers that want to integrate case filings into their apps.

LAW FIRMS

Build custom dashboards for your attorneys and clients with live data direct from the court.

Automate many repetitive legal tasks like conflict checks, document management, and marketing.

FINANCIAL INSTITUTIONS

Litigation and bankruptcy checks for companies and debtors.

E-DISCOVERY AND LEGAL VENDORS

Sync your system to PACER to automate legal marketing.