



(10) **DE 10 2013 227 108 A1** 2015.03.05

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2013 227 108.5**

(22) Anmeldetag: **23.12.2013**

(43) Offenlegungstag: **05.03.2015**

(51) Int Cl.: **G02B 21/06 (2006.01)**

G02B 21/00 (2006.01)

(66) Innere Priorität:

10 2013 217 499.3 03.09.2013

(71) Anmelder:

**Leica Microsystems CMS GmbH, 35578 Wetzlar,
DE**

(74) Vertreter:

**GH-Patent Patentanwaltskanzlei, 65307 Bad
Schwalbach, DE**

(72) Erfinder:

**Krishnamachari, Vishnu Vardhan, Dr., 68199
Mannheim, DE**

(56) Ermittelte Stand der Technik:

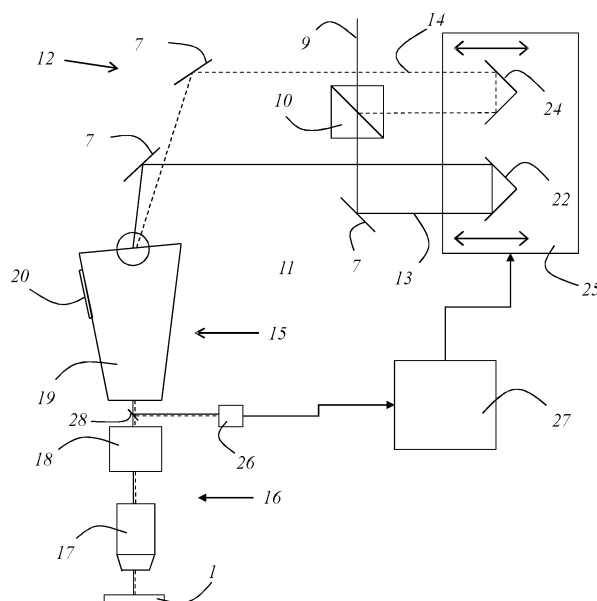
DE	100 16 377	A1
DE	103 56 826	A1
DE	198 29 981	A1

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Vorrichtung und Verfahren zum Untersuchen einer Probe**

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Untersuchen einer Probe, wobei die Probe mit Beleuchtungslicht beaufschlagt wird und von der Probe ausgehendes Detektionslicht zu einem Detektor gelenkt wird und wobei das Beleuchtungslicht durch ein akustooptisches Bauteil gelenkt wird, mit dem das Beaufschlagen der Probe mit Beleuchtungslicht zeitweise unterbrochen werden kann. Das Verfahren zeichnet sich dadurch aus, dass die Probe mit einem ersten Beleuchtungslichtbündel, das eine erste Linearpolarisationsrichtung aufweist, und mit einem zweiten Beleuchtungslichtbündel, dessen Linearpolarisationsrichtung fortlaufend zwischen der ersten Linearpolarisationsrichtung und einer zweiten, von der ersten Linearpolarisationsrichtung verschiedenen, Linearpolarisationsrichtung umgeschaltet wird, beleuchtet wird, wobei das Beleuchtungslicht der ersten Linearpolarisationsrichtung entlang einem ersten Lichtweg verläuft und Beleuchtungslicht der zweiten Linearpolarisationsrichtung entlang einem zweiten Lichtweg verläuft, und wobei das akustooptische Bauteil die Lichtwege vereinigt.



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Untersuchen einer Probe, wobei die Probe mit Beleuchtungslicht beaufschlagt wird und von der Probe ausgehendes Detektionslicht zu einem Detektor gelenkt wird und wobei das Beleuchtungslicht durch ein akustooptisches Bauteil gelenkt wird, mit dem das Beaufschlagen der Probe mit Beleuchtungslicht zeitweise unterbrochen werden kann.

[0002] Die Erfindung betrifft außerdem eine Vorrichtung, insbesondere ein Scanmikroskop oder konfokales Scanmikroskop, zur Durchführung eines solchen Verfahrens, sowie eine Vorrichtung, insbesondere ein Scanmikroskop oder konfokales Scanmikroskop, zum Untersuchen einer Probe, wobei die Probe mit Beleuchtungslicht beaufschlagt wird und von der Probe ausgehendes Detektionslicht zu einem Detektor gelenkt wird und wobei das Beleuchtungslicht durch ein akustooptisches Bauteil gelenkt wird, mit dem das Beaufschlagen der Probe mit Beleuchtungslicht zeitweise unterbrochen werden kann.

[0003] Die Erfindung betrifft darüber hinaus ein Modul zum Herstellen einer erfindungsgemäßen Vorrichtung.

[0004] In einem Mikroskop, insbesondere in einem Scanmikroskop oder einem konfokalen Scanmikroskop, werden Proben häufig mit einem Beleuchtungslichtbündel beleuchtet, das durch Vereinigung mehrerer Beleuchtungslichtbündel erzeugt wurde, um das von der beleuchteten Probe emittierte Reflexions- oder Fluoreszenzlicht zu beobachten.

[0005] Beispielsweise in der Scanmikroskopie wird der Fokus eines solchen Beleuchtungslichtbündel mit Hilfe einer steuerbaren Strahlableitvorrichtung, im Allgemeinen durch Verkippen zweier Spiegel, in einer Objektebene bewegt, wobei die Ablenkachsen meist senkrecht aufeinander stehen, so dass ein Spiegel in x-, der andere in y-Richtung ablenkt. Die Verkipfung der Spiegel wird beispielsweise mit Hilfe von Galvanometer-Stellelementen bewerkstelligt. Die Leistung des vom Objekt kommenden Lichtes wird in Abhängigkeit von der Position des Abtaststrahles gemessen. Üblicherweise werden die Stellelemente mit Sensoren zur Ermittlung der aktuellen Spiegelstellung ausgerüstet.

[0006] Speziell in der konfokalen Scanmikroskopie wird ein Objekt mit dem Fokus eines Beleuchtungslichtbündels in drei Dimensionen abgetastet. Ein konfokales Scanmikroskop umfasst im Allgemeinen eine Lichtquelle, eine Fokussieroptik, mit der das Licht der Quelle auf eine Lochblende – die sog. Anregungsblende – fokussiert wird, einen Strahlteiler, eine Strahlableitvorrichtung zur Strahlsteuerung, eine Mikroskopoptik, eine Detektionsblende und die De-

tektoren zum Nachweis des Detektions- bzw. Fluoreszenzlichtes. Das Beleuchtungslicht wird beispielsweise über einen Strahlteiler eingekoppelt.

[0007] Das vom Objekt kommende Fluoreszenzlicht gelangt über die Strahlableitvorrichtung zurück zum Strahlteiler, passiert diesen, um anschließend auf die Detektionsblende fokussiert zu werden, hinter der sich die Detektoren befinden. Detektionslicht, das nicht direkt aus der Fokusregion stammt, nimmt einen anderen Lichtweg und passiert die Detektionsblende nicht, so dass man eine Punktinformation erhält. Durch sequentielles Abtasten des Objekts kann ein dreidimensionales Bild erzeugt werden.

[0008] Das Gebiet der kohärenten Raman-Mikroskopie (CRM; coherent raman microscopy) hat seit einiger Zeit eine große Bedeutung und Nutzen bei der bildgebenden Untersuchung von biologischen und pharmakologischen Proben und im Bereich der Nahrungsmittelwissenschaften gewonnen. Der Vorteil der kohärenten Raman-Mikroskopie gegenüber der herkömmlichen Raman-Mikroskopie ist insbesondere die höhere Geschwindigkeit der Bildgebung.

[0009] Kohärente Anti-Stokes-Raman-Streuung (CARS, coherent anti-stokes Raman Scattering), kohärente Stokes-Raman-Streuung (CSRS; coherent Stokes Raman scattering), ramaninduzierte Kerr-Effekt-Streuung (Rikes; Ramaninduced Kerr-Effect scattering) und stimulierte Raman-Streuung (SRS; stimulated Raman scattering) stellen verschiedene CRM Techniken dar. Unter diesen hat die stimulierte Raman-Streuung (SRS) den besonderen Vorteil, dass die nicht resonanten Hintergrundsignale vollständig ausgeblendet werden können und ein höheres Signal-zu-Rausch-Verhältnis ermöglicht ist.

[0010] Die Technik der stimulierten Raman-Streuung (SRS) beruht darauf, zwei gepulste optische Felder (mit Frequenzen im Bereich von 40–100MHz) unterschiedlicher Wellenlängen über ein konfokales Mikroskopsystem auf eine zu untersuchende Probe zu leiten. Durch geeignete Strahlführung und Fokussierung wird hierbei sichergestellt, daß die beiden optischen Felder räumlich und zeitlich in der Probe überlappen.

[0011] Eines der beiden optischen Felder wird mit einer Frequenz Ω , typischerweise im kHz- bis MHz-Bereich, entweder intensitätsmoduliert oder frequenzmoduliert oder polarisationsmoduliert, bevor es in der Probe mit dem anderen optischen Feld interagiert. Nach Durchlaufen der Probe oder einer Reflektion an der Probe wird das zweite optische Feld, das ursprünglich nicht moduliert war, detektiert und die Modulationsamplitude von dessen mit der Frequenz Ω , gemessen. Die Modulationsamplitude stellt das SRS-Signal dar. Beispielsweise kann das optische Feld der höheren Wellenlänge ein sog. "Stokes"-Beleuch-

tungslichtbündel sein, während das optische Feld des niedrigeren Wellenlänge als sog. "Pump"-Beleuchtungslichtbündel bezeichnet werden kann.

[0012] Es ist beispielsweise möglich, das Stokes Beleuchtungslichtbündel zu modulieren und das Pump-Beleuchtungslichtbündel nach einer Probenwechselwirkung zu detektieren. In diesem Fall wird das resultierende Signal als stimulierter Raman Verlust (SRL, stimulated raman loss) bezeichnet. Im anderen Fall, nämlich wenn ursprünglich das Pump-Beleuchtungslichtbündel moduliert wird, dann wird das Stokes-Beleuchtungslichtbündel nach einer Probenwechselwirkung detektiert und das resultierende Signal wird als stimulierte Raman-Verstärkung (SRG; stimulated raman gain) bezeichnet. Sowohl SRL und SRG sind gängige SRS-Verfahren, wobei der Informationsgehalt der Signale bei beiden Verfahren fast identisch ist. Unter den verschiedenen Modulationsverfahren zum Erzeugen von SRS-Bildern ist die Intensitätsmodulation die einfachste und robusteste Technik.

[0013] Allerdings gibt es bei den SRS-Verfahren, bei denen eines der optischen Felder intensitätsmoduliert wird, in der Praxis das Problem, dass ausschließlich sehr dünne Proben verwendet werden können. Der Grund hierfür ist, dass die im Fokalvolumen sehr starken optischen Felder den Brechungsindex der Probe beeinflussen. Dieser Effekt ist als Kerr-Effekt bekannt. Durch eine Modulation eines der oben genannten optischen Felder kommt es folglich auch zu einer Modulation des Brechungsindex der Probe, die unterschiedliche Sekundäreffekte, wie Selbstphasenmodulation und die Ausbildung einer sich zeitlich ändernden Kerr-Linse, nach sich zieht.

[0014] Dies führt zu einer zeitlichen Modulation der Divergenz des von der Probe ausgehenden, zu detektierenden optischen Feldes. Wenn die numerische Apertur der Sammeloptik kleiner ist, als die numerische Apertur der Fokussieroptik, die das Beleuchtungslicht fokussiert, wird ein zeitlich schwankender Anteil des von der Probe ausgehenden Detektionslichtes von der Sammeloptik nicht erfasst. Die Modulation der Divergenz des Detektionslichtbündels wird folglich vom Detektor als Intensitätsmodulation wahrgenommen, die – sogar bei derselben Modulationsfrequenz – das SRS-Signal, das man eigentlich detektieren möchte, überlagert. Dies führt zu einem störenden Signalhintergrund.

[0015] Um diesen Effekt zu überwinden, werden Sammeloptiken großer numerischer Apertur eingesetzt. Dies schränkt jedoch die Probendicke, die bei hochauflösender SRS-Bildgebung verwendet werden können, sehr ein. Es müssen hierzu dünne Probenscheiben mit einer Dicke von einigen zehn Mikrometern hergestellt werden. Die Folgen dieser Phänomene sind lange Probenvorbereitungszeiten und Ein-

schränkungen für die Verwendung der bildgebenden Verfahren für hochauflösendes Live-Cell-Imaging.

[0016] Diese Nachteile gibt es weder beim frequenzmodulierten SRS (FM-SRS), noch beim polarisationsmodulierten SRS (PM-SRS). Allerdings ist die Umsetzung eines robusten FM-SRS technisch sehr aufwändig.

[0017] Aber auch beim polarisationsmodulierten SRS gibt es das in der Praxis sehr störende Problem, dass die Umsetzung dieser Technologie mit einem, insbesondere konfokalen, Scanmikroskop, dessen Beleuchtungslicht mit Hilfe eines oder mehrerer AOTF hinsichtlich der Lichtleistung eingestellt oder dessen Beleuchtung mit Hilfe eines oder mehrerer AOTF zweizeitweise abgeschaltet wird, nicht möglich ist, weil der AOTF eines solchen Scanmikroskops, wie es beispielsweise aus DE 198 29 981 A1 bekannt ist, nur auf Beleuchtungslicht jeweils einer Wellenlänge und einer bestimmten Polarisierung wirkt.

[0018] Es ist daher die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren anzugeben, das es ermöglicht, eine kohärente Raman-Mikroskopie mit einem Scanmikroskop umzusetzen, mit dem ein zeitweises Unterbrechen der Beleuchtung und/oder ein Einstellen der Lichtleistung der Beleuchtung möglich ist.

[0019] Die Aufgabe wird durch ein Verfahren gelöst, das dadurch gekennzeichnet ist, dass die Probe mit einem ersten Beleuchtungslichtbündel, das eine erste Linearpolarisationsrichtung aufweist, und mit einem zweiten Beleuchtungslichtbündel, dessen Linearpolarisationsrichtung fortlaufend zwischen der ersten Linearpolarisationsrichtung und einer zweiten, von der ersten Linearpolarisationsrichtung verschiedenen, Linearpolarisationsrichtung umgeschaltet wird, beleuchtet wird, wobei das Beleuchtungslicht der ersten Linearpolarisationsrichtung entlang einem ersten Lichtweg verläuft und Beleuchtungslicht der zweiten Linearpolarisationsrichtung entlang einem zweiten Lichtweg verläuft, und wobei das akustooptische Bauteil die Lichtwege vereinigt, so dass das Beleuchtungslicht der ersten Linearpolarisationsrichtung kollinear vereinigt mit dem Beleuchtungslicht der zweiten Linearpolarisationsrichtung auf einen gemeinsamen Beleuchtungsstrahlengang zur Beleuchtung der Probe gelangt.

[0020] Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung eine Vorrichtung, insbesondere ein Scanmikroskop oder konfokales Scanmikroskop, anzugeben, das sowohl ein zeitweises Unterbrechen der Beleuchtung und/oder ein Einstellen der Lichtleistung der Beleuchtung ermöglicht, als auch die Durchführung einer Probenuntersuchung auf der Basis kohärenter Raman-Spektroskopie erlaubt.

[0021] Die weitere Aufgabe wird durch eine Vorrichtung, insbesondere ein Scanmikroskop oder konfokales Scanmikroskop, gelöst, die dadurch gekennzeichnet ist, dass das Beleuchtungslicht ein erstes Beleuchtungslichtbündel mit einer ersten Linearpolarisationsrichtung aufweist, und ein zweites Beleuchtungslichtbündel, dessen Linearpolarisationsrichtung eine Umschaltvorrichtung, insbesondere ein akustooptischer- oder elektrooptischer Modulator, fortlaufend zwischen der ersten Linearpolarisationsrichtung und einer zweiten, von der ersten Linearpolarisationsrichtung verschiedenen, Linearpolarisationsrichtung umgeschaltet, aufweist, wobei das Beleuchtungslicht der ersten Linearpolarisationsrichtung entlang einem ersten Lichtweg verläuft und Beleuchtungslicht der zweiten Linearpolarisationsrichtung entlang einem zweiten Lichtweg verläuft, und wobei das akustooptische Bauteil die Lichtwege vereinigt, so dass das Beleuchtungslicht der ersten Linearpolarisationsrichtung kollinear vereinigt mit dem Beleuchtungslicht der zweiten Linearpolarisationsrichtung auf einen gemeinsamen Beleuchtungsstrahlengang zur Beleuchtung der Probe gelangt.

[0022] Es ist eine zusätzliche Aufgabe der vorliegenden Erfindung eine Möglichkeit anzugeben, die es erlaubt, schnell und effizient eine Vorrichtung zur Durchführung einer Probenuntersuchung auf der Basis kohärenter Raman-Spektroskopie, das auch ein zweites Unterbrechen der Beleuchtung erlaubt, herzustellen oder eine bestehende Vorrichtung hierzu nachrüsten zu können.

[0023] Diese Aufgabe wird durch ein Modul gelöst, das dadurch gekennzeichnet ist, dass das Modul einen Polarisationsstrahlteiler, der den Beginn eines ersten und eines zweiten Lichtweges definiert, und ein akustooptisches Bauteil, das den ersten und den zweiten Lichtweg vereinigt, aufweist.

[0024] Die Erfindung hat den Vorteil, dass das erste und/oder das zweite Beleuchtungslichtbündel beispielsweise schnell unterbrochen oder wieder freigegeben werden kann. Auch die Möglichkeit eines schnellen Umschaltens zu anderen Wellenlängen oder zu anderen Wellenlängenkombinationen ist in vorteilhafter Weise möglich. Hierbei kann insbesondere ausgenutzt werden, dass das akustooptische Bauteil zumeist innerhalb von wenigen Mikrosekunden geschaltet werden kann.

[0025] Erfindungsgemäß ist es auch möglich, dass mit dem akustooptischen Bauteil die Lichtleistung des ersten und/oder des zweiten Beleuchtungslichtbündels eingestellt und/oder geregelt wird.

[0026] Die Erfindung hat den ganz besonderen Vorteil, dass das Beaufschlagen einer Probe mit dem ersten Beleuchtungslichtbündel und/oder mit dem zweiten Beleuchtungslichtbündel mit Hilfe des akus-

tooptischen Bauteils zeitweise unterbrochen werden kann. Insbesondere kann auf diese Weise eine unnötige Belastung der Probe und damit beispielsweise ein vorschnelles Ausbleichen der Probe wirksam vermieden werden. Beispielsweise kann vorgesehen sein, dass das akustooptische Bauteil, insbesondere automatisch gesteuert, den Lichtweg zu der Probe nur freigibt, wenn eine Detektion des Beleuchtungslichtes erfolgt oder wenn es im Vorfeld einer Untersuchung, beispielsweise für ein Voransichtsbild, erforderlich ist.

[0027] Insbesondere kann vorteilhaft vorgesehen sein, dass das Beaufschlagen einer Probe mit dem ersten Beleuchtungslichtbündel und/oder mit dem zweiten Beleuchtungslichtbündel durch das akustooptische Bauteil, insbesondere automatisch, unterbrochen wird, wenn das erste Beleuchtungslichtbündel und/oder das zweite Beleuchtungslichtbündel einen Bereich der Probe beleuchten würden, der außerhalb eines zu untersuchenden Bereichs liegt. Alternativ oder zusätzlich kann auch vorgesehen sein, dass das Beaufschlagen einer Probe mit dem ersten Beleuchtungslichtbündel und/oder mit dem zweiten Beleuchtungslichtbündel durch das akustooptische Bauteil, insbesondere automatisch, in den Umkehrbereichen eines mäanderförmigen Scans und/oder auf den Rücklaufbahnen eines, insbesondere mäanderförmigen, Scans unterbrochen wird.

[0028] Insbesondere kann vorgesehen sein, dass in dem akustooptischen Bauteil wenigstens eine mechanische Welle propagiert, an der wenigstens eines der Beleuchtungslichtbündel gebeugt und dadurch auf den Beleuchtungsstrahlengang zur Beleuchtung der Probe gelenkt wird.

[0029] Die Erfindung hat darüber hinaus den ganz besonderen Vorteil, dass eine Untersuchung einer Probe auch unter Verwendung von Sammeloptiken, die keine große numerische Apertur aufweisen, ermöglicht ist, weil die eingangs beschriebenen Probleme, insbesondere ein zeitliches Schwanken der Divergenz des Detektionslichtes, bei der erfindungsgemäßen Lösung nicht auftritt. Daher ist es in besonders vorteilhafter Weise auch möglich, Proben zu untersuchen, die eine wesentlich größere Dicke aufweisen, als die Proben, die bislang untersucht werden konnten.

[0030] Bei einer besonders vorteilhaften Ausführung propagiert in dem akustooptischen Bauteil eine erste mechanische Welle, deren Frequenz derart gewählt wird, dass an ihr das erste Beleuchtungslichtbündel gebeugt und dadurch auf den Beleuchtungsstrahlengang zur Beleuchtung der Probe gelenkt wird. Alternativ oder zusätzlich kann vorgesehen sein, dass in dem akustooptischen Bauteil eine zweite mechanische Welle propagiert, deren Frequenz derart gewählt wird, dass an ihr das zweite Beleuchtungslicht-

bündel gebeugt und dadurch auf den Beleuchtungsstrahlengang zur Beleuchtung der Probe gelenkt wird, wenn dieses die erste Linearpolarisationsrichtung aufweist. Es ist alternativ oder zusätzlich vorteilhaft auch möglich, dass eine dritte mechanische Welle propagiert, deren Frequenz derart gewählt wird, dass an ihr das zweite Beleuchtungslichtbündel gebeugt und dadurch auf den Beleuchtungsstrahlengang zur Beleuchtung der Probe gelenkt wird, wenn dieses die zweite Linearpolarisationsrichtung aufweist.

[0031] Insbesondere kann vorteilhaft vorgesehen sein, dass das akustooptische Bauteil wenigstens einen AOTF (acousto optical tunable filter) aufweist, in dem die mechanische Welle oder die mechanischen Wellen propagieren.

[0032] Die Funktionsweise eines solchen akustooptischen Bauteils beruht im Wesentlichen auf der Wechselwirkung der eingekoppelten Beleuchtungslichtbündel mit einer mechanischen Welle oder mehreren mechanischen Wellen. Akustooptische Bauteile bestehen in der Regel aus einem sogenannten akustooptischen Kristall, an dem ein elektrischer Wandler (in der Literatur oft als Transducer bezeichnet) angebracht ist. Vorzugsweise umfasst der Wandler ein piezoelektrisches Material, sowie eine darüber liegende und eine darunter liegende Elektrode. Durch elektrisches Beschalten der Elektroden mit Radiofrequenzen, die typischer Weise im Bereich zwischen 30 MHz und 800 MHz liegen, wird das piezoelektrische Material zum Schwingen gebracht, so dass eine akustische Welle, d.h. eine Schallwelle, entstehen kann, die nach ihrer Entstehung den Kristall durchläuft. Meist wird die akustische Welle nach dem Durchlaufen eines optischen Wechselwirkungsgebiets an der gegenüberliegenden Kristallseite absorbiert oder wegreflektiert.

[0033] Akustooptische Kristalle zeichnen sich dadurch aus, dass die entstehende Schallwelle die optischen Eigenschaften des Kristalls verändert, wobei durch den Schall eine Art optisches Gitter oder eine vergleichbare optisch aktive Struktur, beispielsweise ein Hologramm, induziert wird. Durch den Kristall tretendes Licht erfährt an dem optischen Gitter eine Beugung. Entsprechend wird das Licht in verschiedenen Beugungsordnungen in Beugungsrichtungen gelenkt. Es gibt akustooptische Bauteile, die das gesamte einfallende Licht mehr oder weniger unabhängig von der Wellenlänge beeinflussen. Dazu sei lediglich beispielhaft auf Bauteile wie AOM, AOD und Frequenzschieber verwiesen. Außerdem gibt es auch bereits Bauteile, die beispielsweise abhängig von den eingestrahelten Radiofrequenzen selektiv auf einzelne Wellenlängen wirken (AOTFs). Häufig bestehen die akustooptischen Elemente aus doppelbrechenden Kristallen, wie beispielsweise Tellurdioxid, wobei insbesondere die Lage der Kristallachse relativ zur

Einfallsrichtung des Lichts und seiner Polarisation die optische Wirkung des jeweiligen Elements bestimmt.

[0034] Insbesondere, wenn in dem akustooptischen Strahlvereiniger beispielsweise ein AOTF verwendet wird, muss die mechanische Welle eine ganz bestimmte Frequenz aufweisen, damit genau für das Licht der gewünschten Beleuchtungslichtwellenlänge und der gewünschten Polarisation die Bragg-Bedingung erfüllt ist. Licht, für das die Bragg-Bedingung nicht erfüllt ist, wird bei diesen akustooptischen Bauteilen durch die mechanische Welle nicht abgelenkt.

[0035] Es kann insbesondere vorgesehen sein, dass die erste Linearpolarisationsrichtung die Linearpolarisationsrichtung des ordentlichen Lichtes bezogen auf eine Doppelbrechungseigenschaft des Kristalles ist und/oder dass die zweite Linearpolarisationsrichtung die Linearpolarisationsrichtung des außerordentlichen Lichtes bezogen auf eine Doppelbrechungseigenschaft des Kristalles ist; oder umgekehrt. Insbesondere kann – alternativ oder zusätzlich – vorgesehen sein, dass die erste Linearpolarisationsrichtung oder die zweite Linearpolarisationsrichtung in der Ebene angeordnet ist, die von der Ausbreitungsrichtung der mechanischen Welle und der Ausbreitungsrichtung der einfallenden Beleuchtungslichtbündel aufgespannt ist.

[0036] Bei einer besonderen Ausführung der Erfindung wird zunächst ein Primärbeleuchtungslichtbündel, das das erste Beleuchtungslichtbündel und/oder das zweite Beleuchtungslichtbündel kollinear vereinigt beinhaltet, erzeugt. Ein solches Primärbeleuchtungslichtbündel kann beispielsweise durch Vereinigen des ersten Beleuchtungslichtbündels mit dem zweiten Beleuchtungslichtbündel erzeugt sein, wobei das zweite Beleuchtungslichtbündel vor der Vereinigung einen räumlich vom ersten Beleuchtungslichtbündel separaten Lichtweg durchlaufen hat, in dem ein Element zum Umschalten der Linearpolarisationsrichtung, beispielsweise ein elektrooptischer oder akustooptischer Modulator, angeordnet ist.

[0037] Das Primärbeleuchtungslichtbündel wird dann in Abhängigkeit von der Linearpolarisation, insbesondere mit einem Polarisationsstrahlteiler, räumlich aufgespalten und die Anteile unterschiedlicher Linearpolarisation getrennt voneinander auf den ersten und zweiten Lichtweg gelenkt. Diese Vorgehensweise hat den Vorteil, dass das Beleuchtungslicht der ersten Linearpolarisationsrichtung in einen ersten Eingang des akustooptischen Bauteils eingekoppelt werden kann, während das Beleuchtungslicht der zweiten Linearpolarisationsrichtung in einen zweiten, vom ersten Eingang verschiedenen, insbesondere räumlich getrennten, Eingang des akustooptischen Bauteils eingekoppelt werden kann.

[0038] Insbesondere können die Anteile unterschiedlicher Linearpolarisation derart eingekoppelt werden, dass jeweils mindestens eine mechanische Welle auf einen der Anteile wirkt, wodurch die Anteile durch Beugung auf einen gemeinsamen Beleuchtungsstrahlengang umgelenkt werden, auf dem die Anteile kollinear vereinigt verlaufen.

[0039] Zur Aufnahme von zweidimensionalen oder dreidimensionalen Bilddaten kann vorgesehen sein, dass zumindest ein Teilbereich der Probe mit dem ersten Beleuchtungslichtbündel und dem zweiten Beleuchtungslichtbündel gescannt wird und/oder dass die Foki des ersten Beleuchtungslichtbündel und des zweiten Beleuchtungslichtbündels gemeinsam mit Hilfe einer Strahlableinrichtung über oder durch die Probe bewegt werden und dabei das von der Probe ausgehende Detektionslicht detektiert wird. Durch ein gemeinsames Ablenken der kollinear vereinigten Beleuchtungslichtbündel ist sichergestellt, dass die Foki der Beleuchtungslichtbündel in der Probe räumlich überlappen.

[0040] Bei einer ganz besonders vorteilhaften Ausführung ist wenigstens eines der Beleuchtungslichtbündel, also entweder das erste Beleuchtungslichtbündel und/oder das zweite Beleuchtungslichtbündel. Gepulst. Insbesondere kann vorgesehen sein, dass das erste Beleuchtungslichtbündel und das zweite Beleuchtungslichtbündel mit derselben Pulsfolgefrequenz gepulst sind. Dies ist insbesondere erforderlich, wenn die ersten Beleuchtungslichtpulse und die zweiten Beleuchtungslichtpulse in der Probe zeitlich überlappen sollen.

[0041] Vorzugsweise liegt die Pulsfolgefrequenz des ersten Beleuchtungslichtbündels und/oder die Pulsfolgefrequenz des zweiten Beleuchtungslichtbündels im Bereich von 40 MHz bis 100 MHz, insbesondere bei 80 MHz.

[0042] Die erfindungsgemäße Vorrichtung kann beispielsweise zumindest eine Lichtquelle aufweisen, die ein Primärbeleuchtungslichtbündel, das das erste Beleuchtungslichtbündel und/oder das zweite Beleuchtungslichtbündel beinhaltet, erzeugt. Das erste Beleuchtungslichtbündel und/oder das zweite Beleuchtungslichtbündel können beispielsweise mit Hilfe eines modengekoppelten Pulslasers erzeugt werden. Einem solchen Pulslaser kann ein Element zur Beeinflussung der Wellenlänge – zumindest für eines der Beleuchtungslichtbündel – nachgeschaltet sein. Es ist auch möglich, dass erste Beleuchtungslichtbündel und/oder das zweite Beleuchtungslichtbündel einer sogenannten photonischen Faser oder einer sogenannten tapered Fiber entstammen, die Teil einer Weißlichtquelle ist.

[0043] Insbesondere um eine zeitliche Überlagerung der Pulse in der Probe zu gewährleisten ist bei einer

ganz besonders vorteilhaften Ausführung vorgesehen, dass das Beleuchtungslicht der ersten Linearpolarisationsrichtung, das entlang dem ersten Lichtweg verläuft, einen Zug erster Beleuchtungslichtpulse aufweist und dass das Beleuchtungslicht der zweiten Linearpolarisationsrichtung, das entlang dem zweiten Lichtweg verläuft, einen Zug zweiter Beleuchtungslichtpulse aufweist, wobei die Phase des Zugs von ersten Beleuchtungslichtpulsen relativ zu dem Zug von zweiten Beleuchtungslichtpulsen, insbesondere zu Null, eingestellt und/oder geregelt wird. Die Phase kann beispielsweise durch Verändern der Länge des ersten und/oder des zweiten Lichtweges eingestellt oder geregelt werden.

[0044] Beispielsweise kann ein Phaseneinstellmittel zum Einstellen der Phase des Zugs von ersten Beleuchtungslichtpulsen relativ zu dem Zug von zweiten Beleuchtungslichtpulsen vorhanden sein. Insbesondere kann, als Teil eines solchen Phaseneinstellmittels, im ersten Lichtweg ein erstes Mittel zum Einstellen der Länge des ersten Lichtweges angeordnet sein. Alternativ oder zusätzlich kann auch im zweiten Lichtweg wenigstens ein zweites Mittel zum Einstellen der Länge des zweiten Lichtweges angeordnet sein.

[0045] Eine ganz besonders vorteilhafte Ausführung der erfindungsgemäßen Vorrichtung weist einen Regelkreis zum Regeln der Phase auf einen vorbestimmten oder vorbestimmbaren Wert auf. Insbesondere kann, vorgesehen sein, dass ein Regelkreis zum Regeln der Phase vorhanden ist, der die Phase – insbesondere bezogen auf einen gemeinsamen Fokalebereich in der Probe – auf Null regelt.

[0046] Bei einer einfachen Ausführung des Verfahrens wird an Hand des Detektionssignales, das aus dem von der Probe ausgehenden Detektionslicht gewonnen wird, festgestellt, ob eine ausreichende zeitliche Überlagerung der Beleuchtungslichtpulse erreicht ist. Alternativ oder zusätzlich kann das Maß der zeitlichen Überlagerung auch mit einem geeigneten Sensor, beispielsweise mit einem Zwei-Photonen-Absorptions-Detektor, ermittelt werden. Hierbei kann insbesondere vorgesehen sein, dass ein Teil des auf dem gemeinsamen Beleuchtungsstrahlengang propagierenden Beleuchtungslicht räumlich abgespalten und zu dem Sensor geführt wird. Auf diese Weise kann parasitär, also auch während einer Probenuntersuchung, die zeitliche Koinzidenz der Beleuchtungslichtpulse überprüft und überwacht werden.

[0047] Sowohl der Sensor, als auch das Phaseneinstellmittel können vorteilhaft Bestandteile des oben erwähnten Regelkreises sein. Insbesondere kann auch vorgesehen sein, dass eine Regelungselektronik, die Signale von dem Sensor empfängt und

Stellsignale an das Phaseneinstellmittel ausgibt, Bestandteil des Regelkreises ist.

[0048] Insbesondere zum Durchführen einer Probenuntersuchung mittels kohärenter Raman-Spektroskopie und/oder zum Erzeugen einer Raman-Abbildung, insbesondere einer SRS-Abbildung, wenigstens eines Teils einer mikroskopischen Probe, kann beispielsweise das erste Beleuchtungslichtbündel als Stokes-Beleuchtungslichtbündel und das zweite Beleuchtungslichtbündel als Pump-Beleuchtungslichtbündel fungieren. Alternativ ist es auch möglich, dass das zweite Beleuchtungslichtbündel als Stokes-Beleuchtungslichtbündel und das erste Beleuchtungslichtbündel als Pump-Beleuchtungslichtbündel fungiert.

[0049] Eine besonders zuverlässige und genaue Probenuntersuchung ist hierbei insbesondere dann möglich, wenn die Linearpolarisation des zweiten Beleuchtungslichtbündels mit einer Frequenz im Bereich von 10 bis 30 MHz, insbesondere im Bereich von 10 MHz bis 20 MHz, insbesondere von 20 MHz umgeschaltet wird. Insbesondere kann es von Vorteil sein, wenn die Linearpolarisation des zweiten Beleuchtungslichtbündels mit einer Frequenz umgeschaltet wird, die kleiner ist, als eine Pulsfrequenz des ersten und/oder des zweiten Beleuchtungslichtbündels.

[0050] Wie bereits erwähnt kann vorteilhaft ein Modul die, ggf. auch nachträgliche, Herstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung auf einfache Weise ermöglichen. Das Modul ist vorzugsweise derart ausgebildet, dass es im Strahlengang eines Mikroskops, insbesondere eines konfokalen Scanmikroskops, angeordnet werden kann, wobei das Modul Justiermittel zum Justieren des Moduls relativ zu den übrigen Komponenten des Mikroskops aufweisen kann. Vorzugsweise sind die optischen Bauteile des Moduls vorjustiert, so dass lediglich das Modul insgesamt relativ zum Strahlengang eines Mikroskops justiert werden muss.

[0051] Bei einer besonderen Ausführung weist das Modul einen Polarisationsstrahlteiler auf, der den Beginn eines ersten und eines zweiten Lichtweges definiert. Ein Primärbeleuchtungslichtbündel kann, wie weiter oben bereits beschrieben ist, mit dem Polarisationsstrahlteiler in Abhängigkeit von der Linearpolarisation räumlich aufgespalten und die Anteile unterschiedlicher Linearpolarisation getrennt voneinander auf den ersten und zweiten Lichtweg gelenkt werden. Darüber hinaus ist ein akustooptisches Bauteil vorgesehen, das den ersten und den zweiten Lichtweg wieder vereinigt, so dass ein räumliches Überlappen der Beleuchtungslichtbündel und deren Anteile in der Probe ermöglicht ist.

[0052] Bei einer ganz besonders vorteilhaften Ausführung beinhaltet das Modul im ersten Lichtweg ein erstes Mittel zum Einstellen der Länge des ersten Lichtweges und/oder im zweiten Lichtweg wenigstens ein zweites Mittel zum Einstellen der Länge des zweiten Lichtweges. Mit Hilfe wenigstens eines dieser Mittel kann die Phase eines entlang des ersten Lichtweges propagierenden Pulszuges relativ zu einem entlang des zweiten Lichtweges propagierenden Pulszuges eingestellt werden.

[0053] Das Modul kann insbesondere auch eine, insbesondere elektronische, Regelungsvorrichtung, zum Regeln der Phase eines auf dem ersten Lichtweg propagierenden Pulszuges relativ zu einem auf dem zweiten Lichtweg propagierenden propagierenden Pulszuges, aufweisen.

[0054] Das Modul kann vorteilhaft auch einen Sensor, beispielsweise einen Zwei-Photonen-Absorptions-Detektor, aufweisen, mit dem das Maß der zeitlichen Überlagerung von ersten Beleuchtungslichtpulsen, die entlang dem ersten Lichtweg propagieren und zweiten Beleuchtungslichtpulsen, die entlang dem zweiten Lichtweg propagieren, ermittelt werden.

[0055] In der Zeichnung ist der Erfindungsgegenstand schematisch dargestellt und wird anhand der Figuren nachfolgend beschrieben, wobei gleich wirkende Elemente mit denselben Bezugszeichen versehen sind. Dabei zeigen:

[0056] Fig. 1 schematisch ein Ausführungsbeispiel einer als Scanmikroskop ausgebildeten, erfindungsgemäßen Vorrichtung und

[0057] Fig. 2 schematisch ein Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen Vorrichtung mit einem Regelkreislauf.

[0058] Fig. 1 zeigt schematisch ein Ausführungsbeispiel einer als Scanmikroskop ausgebildeten, erfindungsgemäßen Vorrichtung zum Untersuchen einer Probe **1**. Der besseren Übersichtlichkeit halber ist jedoch lediglich die Beleuchtung der Probe, nicht jedoch das von der Probe ausgehende Detektionslicht und dessen Detektion dargestellt.

[0059] Das Scanmikroskop weist eine erste Lichtquelle **2** auf, die ein erstes, gepulstes Beleuchtungslichtbündel **3** mit einer ersten Linearpolarisationsrichtung erzeugt. Das Scanmikroskop weist außerdem eine zweite Lichtquelle **4** auf, die ein zweites, gepulstes Beleuchtungslichtbündel **5** erzeugt, dessen Linearpolarisationsrichtung eine Umschaltvorrichtung **6**, insbesondere ein akustooptischer – oder elektrooptischer Modulator, fortlaufend zwischen der ersten Linearpolarisationsrichtung und einer zweiten, von der ersten Linearpolarisationsrichtung verschiedenen, Linearpolarisationsrichtung umgeschaltet.

[0060] Das zweite Beleuchtungslichtbündel **5** wird nach einer Umlenkung mit einem Umlenkspiegel **7** mit Hilfe eines Strahlvereinigers **8** mit dem ersten Beleuchtungslichtbündel **3** zu einem Primärbeleuchtungslichtbündel **9** vereinigt.

[0061] Das Primärbeleuchtungslichtbündel **9** wird anschließend in Abhängigkeit von der Linearpolarisation mit einem Polarisationsstrahlteiler **10** räumlich aufgespalten und die Anteile **13**, **14** unterschiedlicher Linearpolarisation getrennt voneinander auf einen ersten Lichtweg **11** und zweiten Lichtweg **12** gelenkt. Der erste Anteil **13** mit der ersten Linearpolarisationsrichtung propagiert entlang dem ersten Lichtweg **11**, während der zweite Anteil **14** mit der zweiten Linearpolarisationsrichtung entlang dem zweiten Lichtweg **12** propagiert.

[0062] Das Scanmikroskop weist ein akustooptisches Bauteil **15** auf, das die Lichtwege **11**, **12** vereinigt, so dass der erste Anteil **13** der ersten Linearpolarisationsrichtung kollinear vereinigt mit dem zweiten Anteil **14** der zweiten Linearpolarisationsrichtung auf einen gemeinsamen Beleuchtungsstrahlengang **16** zur Beleuchtung der Probe **1** gelangt. In dem Beleuchtungsstrahlengang **16** befinden sich ein Objektiv **17**, das das Beleuchtungslicht auf bzw. in die Probe **1** fokussiert, und eine Strahlableitrichtung **18** zum Führen des Fokus des Beleuchtungslichtes über oder durch die Probe **1**.

[0063] Das akustooptische Bauteil **15** ist als AOTF (acousto optical tunable filter) ausgeführt und weist einen optischen Kristall **19** auf, an dem ein Piezo-Schallerzeuger **20** angeordnet ist. Der Piezo-Schallerzeuger **20** wird mit drei unterschiedlichen, elektrischen HF-Frequenzen beaufschlagt und erzeugt drei, hinsichtlich ihrer Frequenz unterschiedliche, mechanische Wellen, nämlich eine erste, eine zweite und eine dritte mechanische Welle, die gleichzeitig durch den Kristall **19** propagieren, was in der Figur nicht dargestellt ist.

[0064] Die Frequenz der ersten mechanische Welle ist derart gewählt, dass an ihr das erste Beleuchtungslichtbündel **3** gebeugt und dadurch auf den Beleuchtungsstrahlengang zur Beleuchtung der Probe **1** gelenkt wird. Die Frequenz der zweiten mechanische Welle ist derart gewählt, dass an ihr das zweite Beleuchtungslichtbündel **5** gebeugt und dadurch auf den Beleuchtungsstrahlengang zur Beleuchtung der Probe **1** gelenkt wird, wenn dieses die erste Linearpolarisationsrichtung aufweist. Die Frequenz der dritten mechanische Welle ist derart gewählt, dass an ihr das zweite Beleuchtungslichtbündel **5** gebeugt und dadurch auf den Beleuchtungsstrahlengang zur Beleuchtung der Probe **1** gelenkt wird, wenn dieses die zweite Linearpolarisationsrichtung aufweist.

[0065] Neben einigen Umlenkspiegeln **7**, die lediglich der Strahlführung dienen, ist im ersten Lichtweg **11** ein erstes Mittel **21** zum Einstellen der Länge des ersten Lichtweges **11** angeordnet. Das erste Mittel **21** zum Einstellen der Länge des ersten Lichtweges **11** weist einen ersten, gewinkelten Doppelspiegel **22** auf, der auf einem (nicht dargestellten) Verschieblich verschiebbar gelagert ist. Durch Verschieben des ersten Doppelspiegels **22** kann die Länge des ersten Lichtweges **11** verändert werden. Auch im im zweiten Lichtweg **12** ist, abgesehen von einem Umlenkspiegel **7**, der lediglich der Strahlführung dient, ein zweites Mittel **23** zum Einstellen der Länge des zweiten Lichtweges **12** angeordnet. Das zweite Mittel **23** zum Einstellen der Länge des zweiten Lichtweges **12** weist einen zweiten, gewinkelten Doppelspiegel **24** auf, der auf einem (nicht dargestellten) Verschieblich verschiebbar gelagert ist. Durch Verschieben des zweiten Doppelspiegels **24** kann die Länge des zweiten Lichtweges **12** verändert werden.

[0066] Die Mittel **21**, **23** sind Bestandteil eines Phaseneinstellmittels **25** zum Einstellen der Phase des Zugs von ersten Beleuchtungslichtpulsen des entlang dem ersten Lichtweg **11** propagierenden ersten Anteils **13** relativ zu dem Zug von zweiten Beleuchtungslichtpulsen des entlang dem zweiten Lichtweg **12** propagierenden zweiten Anteils **14**.

[0067] Fig. 2 zeigt schematisch ein Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen Vorrichtung mit einem Regelkreislauf zum Regeln der Phase des Zugs von ersten Beleuchtungslichtpulsen des entlang dem ersten Lichtweg **11** propagierenden ersten Anteils **13** relativ zu dem Zug von zweiten Beleuchtungslichtpulsen des entlang dem zweiten Lichtweg **12** propagierenden zweiten Anteils **14**.

[0068] Der Regelkreis weist einen einen Sensor **26** auf, der das Maß der zeitlichen Überlagerung ersten und der zweiten Beleuchtungslichtpulse ermittelt und vorzugsweise als Zwei-Photonen-Absorptions-Detektor ausgebildet ist. Mit Hilfe eines Strahlteilers **28** wird aus dem von dem akustooptischen Bauteil **15** vereinigten Beleuchtungslicht ein Teil abgespalten und dem Sensor **26** zugeleitet. Der Sensor übermittelt elektrische Signale als Istwert der gemessenen Phase an eine Regelungselektronik **27**, die unter Berücksichtigung der Sensorsignale einen Stellwert an das Phaseneinstellmittel **25** derart ausgibt, dass im Ergebnis die gewünschte Phase, vorzugsweise eine Phase von Null, eingeregelt wird.

[0069] Die Erfindung wurde in Bezug auf eine besondere Ausführungsform beschrieben, wobei für gleiche oder gleichwirkende Bauteile zumeist dieselben Bezugszeichen verwendet sind. Es ist jedoch selbstverständlich, dass Änderungen und Abwandlungen durchgeführt werden können, ohne dabei den

Schutzbereich der nachstehenden Ansprüche zu ver-
lassen.

Bezugszeichenliste

- 1 Probe
- 2 erste Lichtquelle
- 3 erstes, gepulstes Beleuchtungslichtbündel
- 4 zweite Lichtquelle
- 5 zweites, gepulstes Beleuchtungslichtbündel
- 6 Umschaltvorrichtung
- 7 Umlenkspiegel
- 8 Strahlvereiniger
- 9 Primärbeleuchtungslichtbündel
- 10 Polarisationsstrahlteiler
- 11 erster Lichtweg
- 12 zweiter Lichtweg
- 13 erster Anteil
- 14 zweiter Anteil
- 15 akustooptisches Bauteil
- 16 Beleuchtungsstrahlengang
- 17 Objektiv
- 18 Strahlablenkreinrichtung
- 19 optischer Kristall
- 20 Piezo-Schallerzeuger
- 21 erstes Mittel zum Einstellen der Länge des
ersten Lichtweges
- 22 erster Doppelspiegel
- 23 zweites Mittel zum Einstellen der Länge des
zweiten Lichtweges
- 24 zweiter Doppelspiegel
- 25 Phaseneinstellmittel
- 26 Sensor
- 27 Regelungselektronik
- 28 Strahlteiler

ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

Zitierte Patentliteratur

- DE 19829981 A1 [0017]

Patentansprüche

1. Verfahren zum Untersuchen einer Probe, wobei die Probe mit Beleuchtungslicht beaufschlagt wird und von der Probe ausgehendes Detektionslicht zu einem Detektor gelenkt wird und wobei das Beleuchtungslicht durch ein akustooptisches Bauteil gelenkt wird, mit dem das Beaufschlagen der Probe mit Beleuchtungslicht zeitweise unterbrochen werden kann, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Probe mit einem ersten Beleuchtungslichtbündel, das eine erste Linearpolarisationsrichtung aufweist, und mit einem zweiten Beleuchtungslichtbündel, dessen Linearpolarisationsrichtung fortlaufend zwischen der ersten Linearpolarisationsrichtung und einer zweiten, von der ersten Linearpolarisationsrichtung verschiedenen, Linearpolarisationsrichtung umgeschaltet wird, beleuchtet wird, wobei das Beleuchtungslicht der ersten Linearpolarisationsrichtung entlang einem ersten Lichtweg verläuft und das Beleuchtungslicht der zweiten Linearpolarisationsrichtung entlang einem zweiten Lichtweg verläuft, und wobei das akustooptische Bauteil den ersten Lichtweg und den zweiten Lichtweg vereinigt, so dass das Beleuchtungslicht der ersten Linearpolarisationsrichtung kollinear vereinigt mit dem Beleuchtungslicht der zweiten Linearpolarisationsrichtung auf einen gemeinsamen Beleuchtungsstrahlengang zur Beleuchtung der Probe gelangt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass in dem akustooptischen Bauteil wenigstens eine mechanische Welle propagiert, an der wenigstens eines der Beleuchtungslichtbündel gebeugt und dadurch auf den Beleuchtungsstrahlengang zur Beleuchtung der Probe gelenkt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass in dem akustooptischen Bauteil

- eine erste mechanische Welle propagiert, deren Frequenz derart gewählt wird, dass an ihr das erste Beleuchtungslichtbündel gebeugt und dadurch auf den Beleuchtungsstrahlengang zur Beleuchtung der Probe gelenkt wird, und/oder dass
- eine zweite mechanische Welle propagiert, deren Frequenz derart gewählt wird, dass an ihr das zweite Beleuchtungslichtbündel gebeugt und dadurch auf den Beleuchtungsstrahlengang zur Beleuchtung der Probe gelenkt wird, wenn dieses die erste Linearpolarisationsrichtung aufweist, und/oder dass
- eine dritte mechanische Welle propagiert, deren Frequenz derart gewählt wird, dass an ihr das zweite Beleuchtungslichtbündel gebeugt und dadurch auf den Beleuchtungsstrahlengang zur Beleuchtung der Probe gelenkt wird, wenn dieses die zweite Linearpolarisationsrichtung aufweist.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass das akustooptische Bauteil wenigstens einen AOTF (acousto opti-

cal tunable filter) aufweist, in dem die mechanische Welle oder die mechanischen Wellen propagieren.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein Primärbeleuchtungslichtbündel, das das erste Beleuchtungslichtbündel und/oder das zweite Beleuchtungslichtbündel kollinear vereinigt beinhaltet, in Abhängigkeit von der Linearpolarisation, insbesondere mit einem Polarisationsstrahlteiler, räumlich aufgespalten wird und die Anteile unterschiedlicher Linearpolarisation getrennt voneinander auf den ersten und zweiten Lichtweg gelenkt werden.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass

- zumindest ein Teilbereich der Probe mit dem ersten Beleuchtungslichtbündel und dem zweiten Beleuchtungslichtbündel gescannt wird und/oder dass
- die Foki des ersten Beleuchtungslichtbündel und des zweiten Beleuchtungslichtbündels mit Hilfe einer Strahlableitvorrichtung über oder durch die Probe bewegt werden und dabei das von der Probe ausgehende Detektionslicht detektiert wird.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass

- das Beaufschlagen einer Probe mit dem ersten Beleuchtungslichtbündel und/oder mit dem zweiten Beleuchtungslichtbündel mit dem akustooptischen Bauteil zeitweise unterbrochen wird und/oder dass
- das Beaufschlagen einer Probe mit dem ersten Beleuchtungslichtbündel und/oder mit dem zweiten Beleuchtungslichtbündel mit dem akustooptischen Bauteil, insbesondere automatisch, unterbrochen wird, wenn das erste Beleuchtungslichtbündel und/oder das zweite Beleuchtungslichtbündel einen Bereich der Probe beleuchten würden, der außerhalb eines zu untersuchenden Bereichs liegt, oder dass
- das Beaufschlagen einer Probe mit dem ersten Beleuchtungslichtbündel und/oder mit dem zweiten Beleuchtungslichtbündel mit dem akustooptischen Bauteil, insbesondere automatisch, in den Umkehrbereichen eines mäanderförmigen Scans und/oder auf den Rücklaufbahnen unterbrochen wird.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass mit dem akustooptischen Bauteil die Lichtleistung des ersten und/oder des zweiten Beleuchtungslichtbündels eingestellt und/oder geregelt wird.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass

- das erste Beleuchtungslichtbündel und/oder dass das zweite Beleuchtungslichtbündel gepulst sind, und/oder dass
- das erste Beleuchtungslichtbündel und das zweite Beleuchtungslichtbündel mit derselben Pulsfolgefrequenz gepulst sind, und/oder dass

c. die Pulsfolgefrequenz des ersten Beleuchtungslichtbündels und/oder die Pulsfolgefrequenz des zweiten Beleuchtungslichtbündels im Bereich von 40 MHz bis 100 MHz, insbesondere bei 80 MHz, liegt.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Beleuchtungslicht der ersten Linearpolarisationsrichtung, das entlang dem ersten Lichtweg verläuft, einen Zug erster Beleuchtungslichtpulse aufweist und dass das Beleuchtungslicht der zweiten Linearpolarisationsrichtung, das entlang dem zweiten Lichtweg verläuft, einen Zug zweiter Beleuchtungslichtpulse aufweist, wobei

a. die Phase des Zugs von ersten Beleuchtungslichtpulsen relativ zu dem Zug von zweiten Beleuchtungslichtpulsen eingestellt und/oder geregelt wird, oder wobei

b. die Phase des Zugs von ersten Beleuchtungslichtpulsen relativ zu dem Zug von zweiten Beleuchtungslichtpulsen zu Null eingestellt und/oder geregelt wird.

11. Verfahren nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass

a. die Phase durch Verändern der Länge des ersten und/oder des zweiten Lichtweges eingestellt oder geregelt wird, und/oder dass

b. im ersten Lichtweg ein erstes Mittel zum Einstellen der Länge des ersten Lichtweges angeordnet ist und/oder dass im zweiten Lichtweg wenigstens ein zweites Mittel zum Einstellen der Länge des zweiten Lichtweges angeordnet ist, wobei das erste Mittel und/oder das zweite Mittel Teil eines Regelkreises zum Regeln der Phase ist.

12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, **dadurch gekennzeichnet**, dass

a. die Phase mit Hilfe eines Sensors, insbesondere mit Hilfe eines Zwei-Photonen-Absorptions-Detektors, der, insbesondere parasitär, zumindest einen Teil des vereinigten Beleuchtungslichtes empfängt, erfasst wird und/oder dass

b. die Phase mit Hilfe eines Sensors erfasst wird, der Teil eines Regelkreises zum Regeln der Phase ist.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass

a. die Linearpolarisation des zweiten Beleuchtungslichtbündels mit einer Frequenz im Bereich von 10 bis 30 MHz, insbesondere im Bereich von 10 MHz bis 20 MHz, insbesondere von 20 MHz umgeschaltet wird und/oder dass

b. die Linearpolarisation des zweiten Beleuchtungslichtbündels mit einer Frequenz umgeschaltet wird, die kleiner ist, als eine Pulsfolgefrequenz des ersten und/oder des zweiten Beleuchtungslichtbündels.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, **dadurch gekennzeichnet**, dass

a. das erste Beleuchtungslichtbündel als Stokes-Beleuchtungslichtbündel und das zweite Beleuchtungslichtbündel als Pump-Beleuchtungslichtbündel zum Durchführen einer Probenuntersuchung mittels kohärenter Raman-Spektroskopie und/oder zum Erzeugen einer Raman-Abbildung, insbesondere einer SRS-Abbildung, wenigstens eines Teils einer mikroskopischen Probe verwendet wird, oder dass

b. das zweite Beleuchtungslichtbündel als Stokes-Beleuchtungslichtbündel und das erste Beleuchtungslichtbündel als Pump-Beleuchtungslichtbündel zum Durchführen einer Probenuntersuchung mittels kohärenter Raman-Spektroskopie und/oder zum Erzeugen einer Raman-Abbildung, insbesondere einer SRS-Abbildung, wenigstens eines Teils einer mikroskopischen Probe verwendet wird.

15. Vorrichtung, insbesondere Scanmikroskop, zum Durchführen eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 14.

16. Vorrichtung, insbesondere Scanmikroskop oder konfokales Scanmikroskop, zum Untersuchen einer Probe, wobei die Probe mit Beleuchtungslicht beaufschlagt wird und von der Probe ausgehendes Detektionslicht zu einem Detektor gelenkt wird und wobei das Beleuchtungslicht durch ein akustooptisches Bauteil gelenkt wird, mit dem das Beaufschlagen der Probe mit Beleuchtungslicht zeitweise unterbrochen werden kann, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Beleuchtungslicht ein erstes Beleuchtungslichtbündel mit einer ersten Linearpolarisationsrichtung aufweist, und ein zweites Beleuchtungslichtbündel, dessen Linearpolarisationsrichtung eine Umschaltvorrichtung, insbesondere ein akustooptischer – oder elektrooptischer Modulator, fortlaufend zwischen der ersten Linearpolarisationsrichtung und einer zweiten, von der ersten Linearpolarisationsrichtung verschiedenen, Linearpolarisationsrichtung umgeschaltet, aufweist, wobei das Beleuchtungslicht der ersten Linearpolarisationsrichtung entlang einem ersten Lichtweg verläuft und das Beleuchtungslicht der zweiten Linearpolarisationsrichtung entlang einem zweiten Lichtweg verläuft, und wobei das akustooptische Bauteil die Lichtwege vereinigt, so dass das Beleuchtungslicht der ersten Linearpolarisationsrichtung kollinear vereinigt mit dem Beleuchtungslicht der zweiten Linearpolarisationsrichtung auf einen gemeinsamen Beleuchtungsstrahlengang zur Beleuchtung der Probe gelangt.

17. Vorrichtung nach Anspruch 16, **dadurch gekennzeichnet**, dass in dem akustooptischen Bauteil wenigstens eine mechanische Welle propagiert, an der wenigstens eines der Beleuchtungslichtbündel gebeugt und dadurch auf den Beleuchtungsstrahlengang zur Beleuchtung der Probe gelenkt wird.

18. Vorrichtung nach Anspruch 16 oder 17, **dadurch gekennzeichnet**, dass in dem akustooptischen Bauteil

- a. eine erste mechanische Welle propagiert, deren Frequenz derart gewählt ist, dass an ihr das erste Beleuchtungslichtbündel gebeugt und dadurch auf den Beleuchtungsstrahlengang zur Beleuchtung der Probe gelenkt wird, und/oder dass
- b. eine zweite mechanische Welle propagiert, deren Frequenz derart gewählt ist, dass an ihr das zweite Beleuchtungslichtbündel gebeugt und dadurch auf den Beleuchtungsstrahlengang zur Beleuchtung der Probe gelenkt wird, wenn dieses die erste Linearpolarisationsrichtung aufweist, und/oder dass
- c. eine dritte mechanische Welle propagiert, deren Frequenz derart gewählt ist, dass an ihr das zweite Beleuchtungslichtbündel gebeugt und dadurch auf den Beleuchtungsstrahlengang zur Beleuchtung der Probe gelenkt wird, wenn dieses die zweite Linearpolarisationsrichtung aufweist.

19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 16 bis 18, **dadurch gekennzeichnet**, dass das akustooptische Bauteil wenigstens einen AOTF (acousto optical tunable filter) aufweist, in dem die mechanische Welle oder die mechanischen Wellen propagieren.

20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 16 bis 19, **dadurch gekennzeichnet**, dass zumindest eine Lichtquelle vorhanden ist, die ein Primärbeleuchtungslichtbündel, das das erste Beleuchtungslichtbündel und/oder das zweite Beleuchtungslichtbündel beinhaltet, erzeugt und dass ein Polarisationsstrahlteiler das Primärbeleuchtungslichtbündel in Abhängigkeit von der Linearpolarisation räumlich aufgespalten und die Anteile unterschiedlicher Linearpolarisation getrennt voneinander auf den ersten und zweiten Lichtweg lenkt.

21. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 16 bis 20, **dadurch gekennzeichnet**, dass

- a. eine Strahlableitvorrichtung vorhanden ist, die das erste Beleuchtungslichtbündel und/oder das zweite Beleuchtungslichtbündel zum Scannen einer Probe ablenkt und/oder dass
- b. eine Strahlableitvorrichtung die Foki des ersten Beleuchtungslichtbündel und des zweiten Beleuchtungslichtbündels über oder durch die Probe bewegt und dabei das von der Probe ausgehende Detektionslicht detektiert wird.

22. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 16 bis 21, **dadurch gekennzeichnet**, dass

- a. das akustooptische Bauteil das erste Beleuchtungslichtbündel und/oder das zweite Beleuchtungslichtbündel, insbesondere automatisch, unterbricht, wenn eine Probe nicht mit Beleuchtungslicht beaufschlagt werden soll, und/oder dass
- b. das akustooptische Bauteil das erste Beleuchtungslichtbündel und/oder das zweite Beleuchtungs-

lichtbündel, insbesondere automatisch, unterbricht, wenn das erste Beleuchtungslichtbündel und/oder das zweite Beleuchtungslichtbündel einen Bereich der Probe beleuchten würden, der außerhalb eines, insbesondere zuvor festgelegten, zu untersuchenden Bereichs liegt, und/oder dass

- c. das akustooptische Bauteil das Beaufschlagen einer Probe mit dem ersten Beleuchtungslichtbündel und/oder mit dem zweiten Beleuchtungslichtbündel, insbesondere automatisch, in den Umkehrbereichen eines mäanderförmigen Scans und/oder auf den Rücklaufbahnen unterbrochen wird.

23. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 16 bis 22, **dadurch gekennzeichnet**, dass mit dem akustooptischen Bauteil die Lichtleistung des ersten und/oder des zweiten Beleuchtungslichtbündels einstellbar und/oder regelbar ist.

24. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 16 bis 23, **dadurch gekennzeichnet**, dass

- a. das erste Beleuchtungslichtbündel und/oder das zweite Beleuchtungslichtbündel gepulst sind, und/oder dass
- b. das erste Beleuchtungslichtbündel und das zweite Beleuchtungslichtbündel mit derselben Pulsfrequenz gepulst sind, und/oder dass
- c. die Pulsfrequenz des ersten Beleuchtungslichtbündels und/oder die Pulsfrequenz des zweiten Beleuchtungslichtbündels im Bereich von 40 MHz bis 100 MHz, insbesondere bei 80 MHz, liegt.

25. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 16 bis 24, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Beleuchtungslicht der ersten Linearpolarisationsrichtung, das entlang dem ersten Lichtweg verläuft, einen Zug erster Beleuchtungslichtpulse aufweist und dass das Beleuchtungslicht der zweiten Linearpolarisationsrichtung, das entlang dem zweiten Lichtweg verläuft, einen Zug zweiter Beleuchtungslichtpulse aufweist, wobei

- a. die Phase des Zugs von ersten Beleuchtungslichtpulsen relativ zu dem Zug von zweiten Beleuchtungslichtpulsen mit einem Phaseneinstellmittel einstellbar und/oder regelbar ist, oder wobei
- b. die Phase des Zugs von ersten Beleuchtungslichtpulsen relativ zu dem Zug von zweiten Beleuchtungslichtpulsen zu Null eingestellt und/oder geregelt ist.

26. Vorrichtung nach Anspruch 25, **dadurch gekennzeichnet**, dass als Teil des Phaseneinstellmittels, im ersten Lichtweg ein erstes Mittel zum Einstellen der Länge des ersten Lichtweges angeordnet ist und/oder im zweiten Lichtweg wenigstens ein zweites Mittel zum Einstellen der Länge des zweiten Lichtweges angeordnet ist.

27. Vorrichtung nach Anspruch 25 oder 26, **dadurch gekennzeichnet**, dass

- a. ein Regelkreis zum Regeln der Phase auf einen vorbestimmten oder vorbestimmbaren Wert vorhanden ist und/oder dass
- b. ein Regelkreis zum Regeln der Phase vorhanden ist, der die Phase auf Null regelt.

28. Verfahren nach Anspruch 27, **dadurch gekennzeichnet**, dass

- a. ein Sensor, insbesondere ein Zwei-Photonen-Absorptions-Detektor, der, insbesondere parasitär, zumindest einen Teil des vereinigten Beleuchtungslichtes empfängt, Bestandteil des Regelkreises ist und/oder dass
- b. das Phaseneinstellmittel Bestandteil des Regelkreises ist und/oder dass
- c. eine Regelungselektronik, die Signale von dem Sensor empfängt und Stellsignale an das Phaseneinstellmittel ausgibt, Bestandteil des Regelkreises ist.

29. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 16 bis 28, **dadurch gekennzeichnet**, dass

- a. die Linearpolarisation des zweiten Beleuchtungslichtbündels mit einer Frequenz im Bereich von 10 bis 30 MHz, insbesondere im Bereich von 10 MHz bis 20 MHz, insbesondere von 20 MHz umgeschaltet wird und/oder dass
- b. die Linearpolarisation des zweiten Beleuchtungslichtbündels mit einer Frequenz umgeschaltet wird, die kleiner ist, als eine Pulsfolgefrequenz des ersten und/oder des zweiten Beleuchtungslichtbündels.

30. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 16 bis 29, **dadurch gekennzeichnet**, dass

- a. das erste Beleuchtungslichtbündel als Stokes-Beleuchtungslichtbündel und das zweite Beleuchtungslichtbündel als Pump-Beleuchtungslichtbündel zum Durchführen einer Probenuntersuchung mittels kohärenter Raman-Spektroskopie und/oder zum Erzeugen einer Raman-Abbildung wenigstens eines Teils einer mikroskopischen Probe fungiert, oder dass
- b. das zweite Beleuchtungslichtbündel als Stokes-Beleuchtungslichtbündel und das erste Beleuchtungslichtbündel als Pump-Beleuchtungslichtbündel zum Durchführen einer Probenuntersuchung mittels kohärenter Raman-Spektroskopie und/oder zum Erzeugen einer Raman-Abbildung wenigstens eines Teils einer mikroskopischen Probe fungiert.

31. Modul zur Herstellung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 16 bis 30, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Modul einen Polarisationsstrahlteiler, der den Beginn eines ersten und eines zweiten Lichtweges definiert, und ein akustooptisches Bauteil, das den ersten und den zweiten Lichtweg vereinigt, aufweist.

32. Modul nach Anspruch 31, **dadurch gekennzeichnet**, dass

- a. im ersten Lichtweg ein erstes Mittel zum Einstellen der Länge des ersten Lichtweges angeordnet ist und/

oder im zweiten Lichtweg wenigstens ein zweites Mittel zum Einstellen der Länge des zweiten Lichtweges angeordnet ist und/oder dass

- b. eine Regelungsvorrichtung zum Regeln der Phase eines auf dem ersten Lichtweg propagierenden Pulszuges relativ zu einem auf dem zweiten Lichtweg propagierenden propagierenden Pulszuges vorhanden ist.

33. Modul nach Anspruch 31 oder 32, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Modul einen Sensor, insbesondere Zwei-Photonen-Absorptions-Detektor, zum Ermitteln des Maßes der zeitlichen Überlagerung von ersten Beleuchtungslichtpulsen, die entlang dem ersten Lichtweg propagieren und zweiten Beleuchtungslichtpulsen, die entlang dem zweiten Lichtweg propagieren, aufweist.

Es folgen 2 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

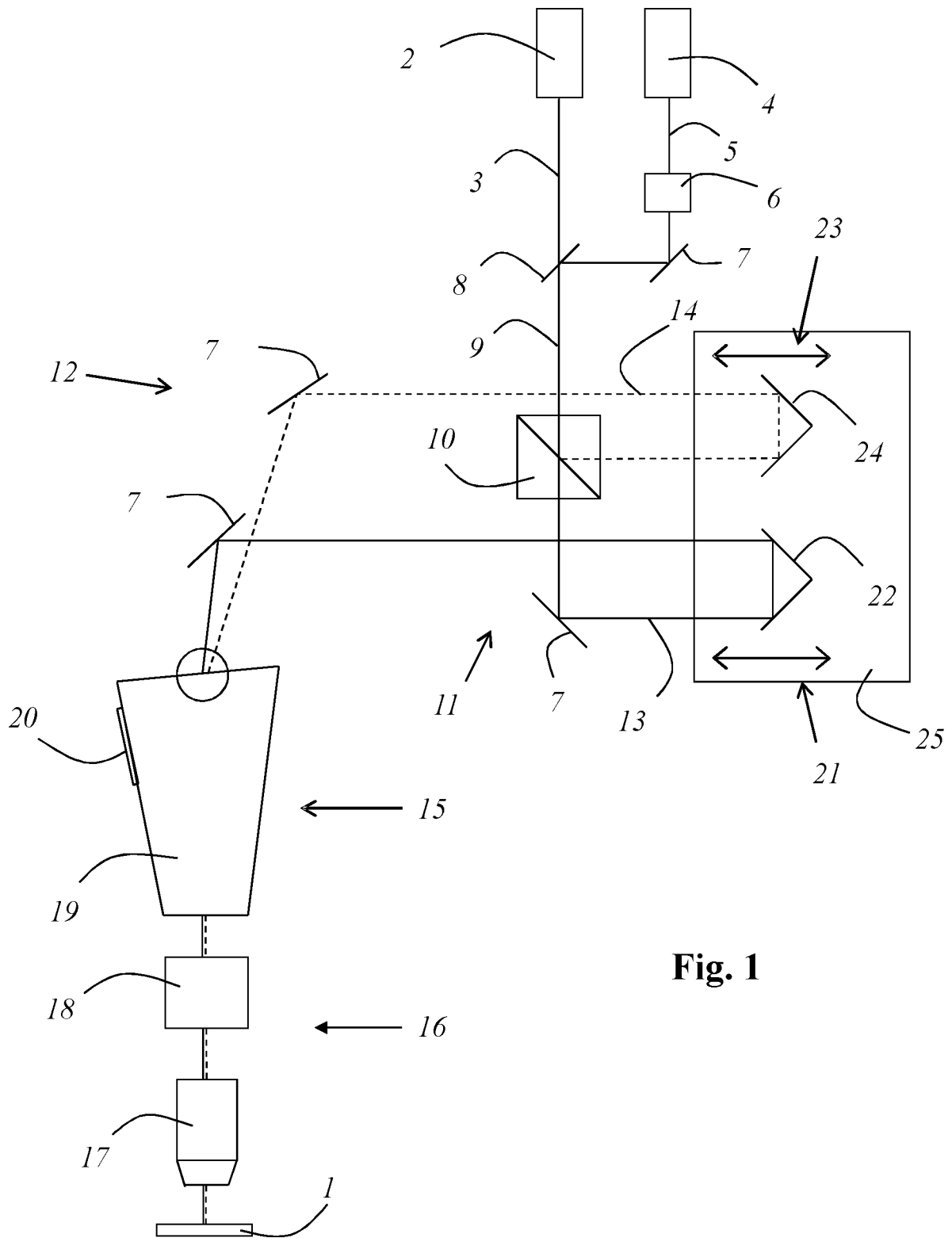


Fig. 1

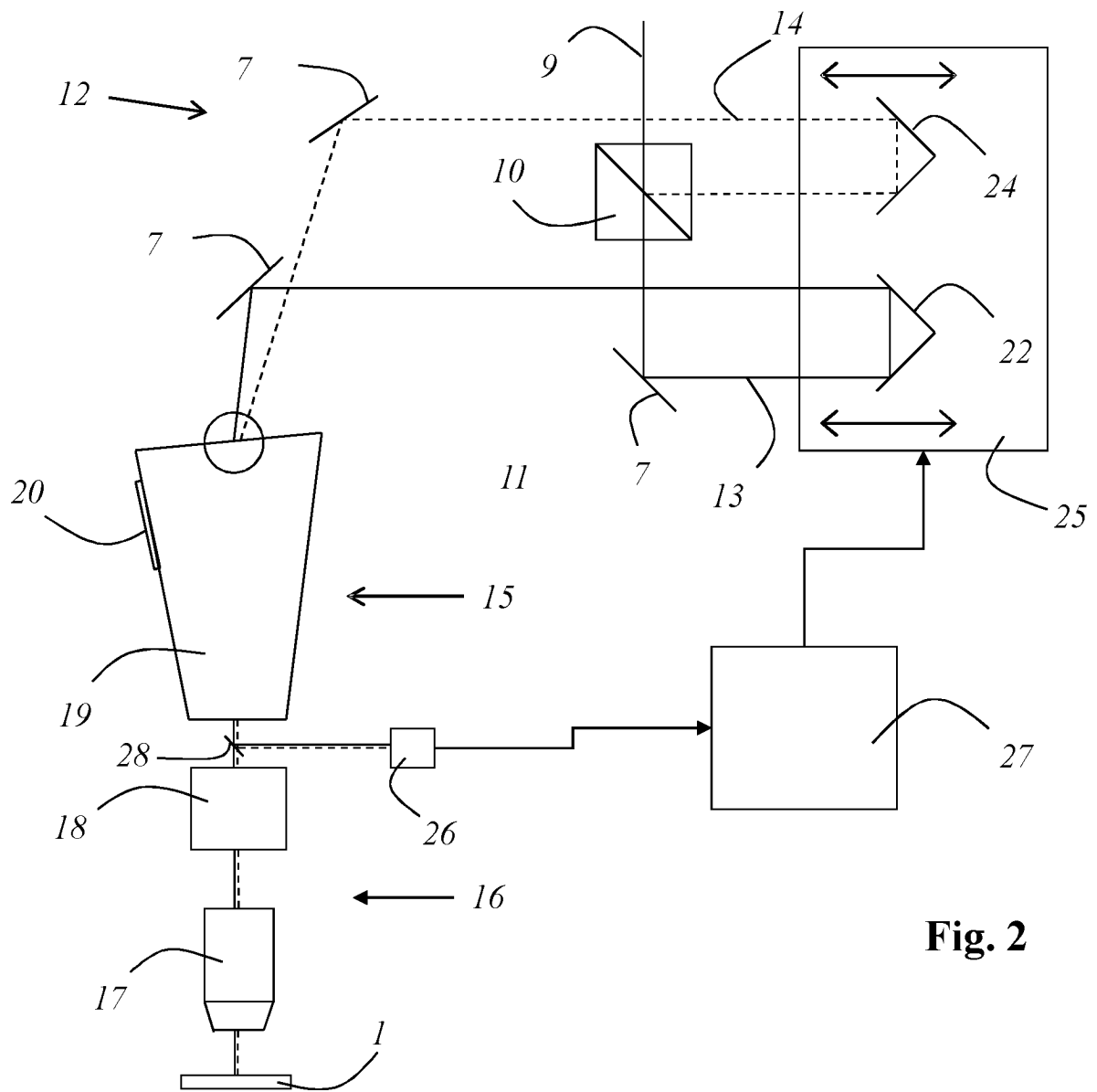


Fig. 2