



(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
25.06.2008 Patentblatt 2008/26

(51) Int Cl.:
B03C 5/00 (2006.01)

B03C 5/02 (2006.01)

(21) Anmeldenummer: 06026759.8

(22) Anmeldetag: 22.12.2006

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR
HU IE IS IT LI LT LU LV MC NL PL PT RO SE SI
SK TR**

Benannte Erstreckungsstaaten:

AL BA HR MK RS

(71) Anmelder: **Universität Leipzig
04109 Leipzig (DE)**

(72) Erfinder:

- **Kreysing, Moritz
04318 Leipzig (DE)**

• **Guck, Jochen, Dr.**

04309 Leipzig (DE)

• **Käs, Josef, Prof. Dr.**

04105 Leipzig (DE)

(74) Vertreter: **Schiffer, Axel Martin et al**

Weber & Heim Patentanwälte

Irmgardstrasse 3

81479 München (DE)

(54) **Vorrichtung und Verfahren zum berührungslosen Manipulieren und Ausrichten von Probenteilchen in einem Messvolumen mit Hilfe eines inhomogenen elektrischen Wechselfelds**

(57) Die Erfindung bezieht sich auf eine Vorrichtung zum berührungslosen Manipulieren und Ausrichten von Probenteilchen in einem Messvolumen mit Hilfe eines inhomogenen elektrischen Wechselfelds, mit einer Strahlungsquelle zum Aussenden von elektromagnetischer Strahlung und mit optischen Mitteln zum Leiten der elektromagnetischen Strahlung in das Messvolumen. Die Vorrichtung ist dadurch gekennzeichnet, dass als Teil der optischen Mittel eine Strahlformungseinrichtung zum Erzeugen eines zu einer Strahlachse asymmetrischen Intensitätsprofils vorhanden ist, wobei Probenteil-

chen im Messvolumen in einer durch das asymmetrische Intensitätsprofil erzeugten inhomogenen Feldverteilung des elektrischen Felds einfangbar sind, und dass zum Mitführen von in der inhomogenen Feldverteilung eingefangenem Probenteilchen eine Dreheinrichtung zum Drehen des asymmetrischen Intensitätsprofils um die Strahlachse relativ zum Messvolumen vorhanden ist. Die Vorrichtung betrifft außerdem ein Verfahren zum berührungslosen Manipulieren und Ausrichten von Probenteilchen in einem Messvolumen mit Hilfe eines inhomogenen elektrischen Felds.

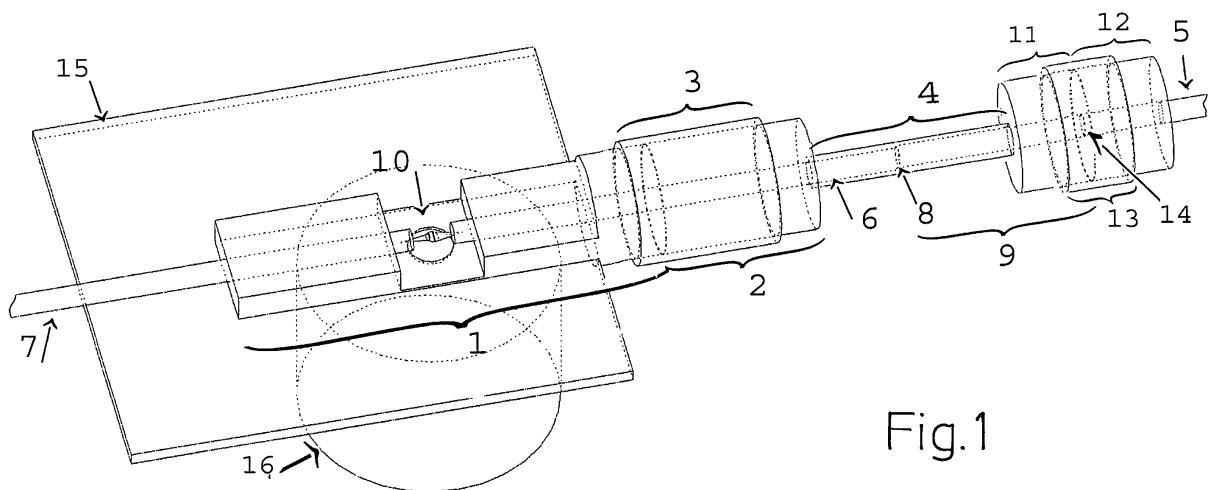


Fig.1

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft in einem ersten Aspekt eine Vorrichtung zum berührungslosen Manipulieren und Ausrichten von Probenteilchen in einem Messvolumen mit Hilfe eines inhomogenen elektrischen Wechselfelds nach dem Oberbegriff des Anspruchs 1.

[0002] In einem zweiten Gesichtspunkt bezieht sich die Erfindung auf ein Verfahren zum berührungslosen Manipulieren und Ausrichten von Probenteilchen in einem Messvolumen mit Hilfe eines inhomogenen elektrischen Wechselfelds nach dem Oberbegriff des Anspruchs 14.

[0003] In weiteren Aspekten bezieht sich die Erfindung auf ein Laser-Scanning-Mikroskop und auf ein Verfahren zum Betrieb eines Laser-Scanning-Mikroskops.

[0004] Eine gattungsgemäße Vorrichtung und ein gattungsgemäßes Verfahren sind beschrieben in: Arthur Ashkin, Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers, 1997; Volume 94; Seiten 4853 - 4860 PNAS. Die Laser-Scanning-Mikroskopie und Anwendungen hiervon in der Biologie sind beschrieben in: James B. Pawley "Handbook of Biological Confocal Microscopy", 1995, Plenum Press, New York. Ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop ist außerdem offenbart in DE 197 02 753 A1.

[0005] Es sind folgende zur Anordnungen und Verfahren zur Ausrichtung und Drehung von Partikeln bekannt.

[0006] i) Eine Möglichkeit zur Positionierung und Ausrichtung dielektrischer Partikel, hier: Partikel, deren Dielektrizitätskonstante von derjenigen des sie umgebenden Mediums abweicht, mit einem Durchmesser von weniger als 1000 μ m ist die Dielektrophorese, welche die Kräfte, die inhomogene elektrische Felder auf elektrisch polarisierbare Materie ausüben, ausnützt. Abhängig davon, ob die zu manipulierenden Partikel dem Feldgradienten folgen oder in entgegengesetzte Richtung wandern, spricht man von positiver bzw. negativer Dielektrophorese.

[0007] Konkret werden bei diesem Verfahren Elektroden in der Nähe der zu manipulierenden Partikel benötigt, von denen elektrische Felder ausgehen. Eine besonders praktikable Anordnung dieser Elektroden wird in so genannten Feldkäfigen realisiert, bei denen wenigstens vier Elektroden ein Volumen umschließen, das sich an der Größe der zu manipulierenden Partikel bemisst. Für die Erzeugung der elektrischen Feldverteilungen um die Elektroden legt man an diese Wechselspannungen definierter Amplitude, Frequenz und Phase an. Als ungeeignet erweisen sich Gleichspannungen, da diese zu ungewünschten Nebeneffekten wie Elektrolyse des Mediums, starker Erwärmung oder Strömungen im Medium führen können, welche jedoch auch bei der Verwendung von Wechselspannungen nicht gänzlich auszuschließen sind.

[0008] Des Weiteren sind die dielektrischen Eigenchaften der Proben im Allgemeinen eine Funktion der Frequenz der sie umgebenden elektrischen Felder. So

unterliegen z.B. viele Materialien, eingebettet in gängige Medien, wie z.B. wässrigen Elektrolytlösungen, unterhalb einer bestimmten Frequenz positiver, oberhalb dieser Frequenz negativer Dielektrophorese. Bei nicht vollständig charakterisierten Partikeln kann es daher nötig sein, die Frequenz über ein "trial and error"-Verfahren anzupassen, um den Betrieb des Feldkäfigs effizient zu gestalten.

[0009] Durch geeignete Geometrien des Feldkäfigs sowie passenden Spannungen an den Elektroden ist es möglich, lokale Extrema der elektrischen Feldstärke zu erzeugen, die dazu genutzt werden können, dielektrische Partikel einzufangen, d.h. stabil bezüglich ihrer räumlichen Position zu halten. Weiterhin ist es möglich, durch ein sich drehendes elektrisches Feld, erzeugt durch der Geometrie des Käfigs angepasste Phasenlagen der an den einzelnen Elektroden anliegenden Spannungen, ein kontinuierliches Drehmoment auf eingefangene Partikel zu übertragen. Dies kann je nach Käfig 10 verschiedene Orientierungen haben, sodass es möglich ist, allein über Phasenanpassungen einen gefangenen dielektrischen Teilchen um mehr als eine Achse zu drehen. Je nach Eigenschaften des konkreten Gesamtsystems können Umdrehungszahlen von über 100 Rotationen pro Sekunde erreicht werden. Charakteristisch für diese Drehung ist, dass zwar ein Gleichgewicht zwischen dem durch das elektrische Feld induzierten und dem durch hydrodynamische Reibung verursachten Drehmoment besteht, sich das Partikel aber bezüglich seiner Orientierung im Allgemeinen in keinem Gleichgewicht befindet. Die Frequenz, mit der sich das gefangene Partikel dreht, ist insbesondere nicht die Frequenz, die vom Feld vorgegeben ist, sondern liegt viele Größenordnungen darunter.

[0010] Die Anpassung der Drehgeschwindigkeit der Partikel an einen gewünschten Wert erfolgt im allgemeinen Fall der Unkenntnis der vollständigen Struktur des jeweiligen Partikels über Rückkopplungsmechanismen nach dem Prinzip "trial and error". So kann z.B. die 20 Drehung von sich in Suspension befindlichen biologischen Zellen durch ein Mikroskop beobachtet und gegebenenfalls durch geeignete Anpassung der elektrischen Wechselfelder beschleunigt oder verlangsamt werden. Resultierend hieraus ist die Drehung von nicht vollständig charakterisierbaren Partikeln, wie z.B. biologische Zellen, um kleine Winkel bestenfalls nur über begleitende Messungen am System möglich. Literatur: Christoph Reichle, Torsten Müller, Thomas Schnelle and Günter Fuhr: "Electrorotation in octopole micro cages", J. Phys. D: Appl. Phys. 32 (1999) 2128-2135; DE 100 59 50 152 C2 , DE 10 2004 023 466 A1 und DE 103 20 869 A1.

[0011] ii) Eine weitere Möglichkeit zum Drehen von mikroskopischen Partikeln stellen sogenannte optische Pinzetten, englisch: "optical tweezers", dar. Als optische Pinzetten bezeichnet man optische Fallen, die Partikel, deren Brechungsindex von dem des sie umgebenden Mediums abweicht, mittels eines fokussierten Laserstrahls halten und positionieren können. Der prinzipielle 30 40 50 55

Aufbau ist folgender: Unter Zuhilfenahme eines teilweise durchlässigen Spiegels wird ein auf einige Millimeter Durchmesser aufgeweiteter paralleler Laserstrahl, typischerweise monochromatisch mit einer Wellenlänge im sichtbaren Spektrum oder nahen Infrarot und einem Gaussförmigen Intensitätsprofil, typische Leistung: 50mW, in den Strahlengang eines lichtoptischen Mikroskops eingekoppelt und durch ein Öl-Immersions-Objektiv hoher numerischer Apertur in den Probenraum, typisch: Flüssigkeitsfilm zwischen zwei Deckgläsern, fokussiert. Da die Feldenergie der elektromagnetischen Welle beim Eintritt in Medien höheren Brechungsexponenten gesenkt wird, erfahren bzgl. des sie umgebenden Mediums optisch dichtere Partikel, die durch Molekularbewegung zufällig oder anderweitig gezielt in den Bereich des endlich ausgedehnten Fokus kommen, eine Kraft in Richtung dessen Zentrums (Gradientenkraft). Des Weiteren greift als Folge der Lichtstreuung an den Partikel eine so genannte Streukraft an den Partikeln an, welche sie in axialer Richtung stabilisiert. Die Streukraft allein schiebt das Probenteilchen vom Laser weg. Eine stabilisierende Wirkung ergibt sich zusammen mit den Gradientenkräften.

[0012] In Bezug auf den Laserstahl gibt es also ein Gleichgewicht für die Lage des Partikels im Fokus, welches dadurch charakterisiert ist, dass sich auf das eingefangene Partikel wirkende Streu- und Gradientenkkräfte gerade kompensieren bzw. Partikel im Falle kleiner Auslenkungen aus der Gleichgewichtslage wieder in diese zurückgetrieben werden.

[0013] Dieses kann z.B. ausgenutzt werden, um Mikropartikel zu fixieren oder sie durch eine Änderung des Eintrittswinkels des Laserstahls in das Objektiv zu bewegen. Im Fall der Manipulation biologischer Zellen ist es nötig, Mikropartikel von etwa der Größe der Zellen selbst, z.B. kleine Latexkugelchen, über geeignete Methoden an die Zellen zu heften, um dann an diesen mit der optischen Pinzette anzugreifen, da die Laserintensität aufgrund der Fokussierung des verwendeten Laserstrahls in dem zum Halten von Mikropartikel nutzbaren Bereich für biologische Zellen zu hoch ist, um deren Integrität zu gewährleisten. Literatur: A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, and Steven Chu: "Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles", OPTICS LETTERS / Vol. 11, No. 5 / Mai 1986; DE 691 13 008 T2.

[0014] Um mit diesem Aufbau Partikel zu drehen, gibt es verschiedene Möglichkeiten.

a) Bei doppelbrechende Proben ändert sich der Polarisationszustand des Laserlichtes derart, dass diese ein Drehmoment erfahren. Dieser Drehmomentübertrag führt zu einer kontinuierlichen Drehung um die Laserachse und kann durch die Änderung der Intensität sowie Polarisierung des einfallenden Laserstahls reguliert werden. Eine Anwendung dieses Prinzips sind lichtgetriebene Zahnräder mit einem Durchmesser von unter 20µm, die

in sogenannten Mikromaschinen Einsatz finden. Literatur: M. E. J. Friese, T. A. Nieminen, N. R. Heckenberg & H. Rubinsztein-Dunlop: "Optical alignment and spinning of laser-trapped microscopic particles", Nature 394, 348-350 (1998), E. Higurashi, R. Sawada, and T. Ito: "Optically induced angular alignment of trapped birefringent micro-objects by linearly polarized light", NTT Opto-electronics Laboratories, 3-9-11, M. E. J. Friese and H. Rubinsztein-Dunlop: "Optically driven micromachine elements", Applied Physics Letters -- January 22, 2001 -- Volume 78, Issue 4, pp. 547-549.

b) Proben, deren Geometrie und Brechungsin dexverteilung dazu führt, dass der bei einer optischen Pinzette verwendete Laserstrahl derart asymmetrisch gestreut wird, dass aufgrund der für Photonen gültigen Impulserhaltung ein Drehmoment auf die Probe übertragen wird, werden aufgrund dessen in Rotation versetzt. Bekannt ist dieser Effekt als Windmühleneffekt und tritt üblicherweise bei speziell gefertigten Mikropartikeln auf, deren Form an die eines Propellers erinnert. Im weitesten Sinn handelt es sich hierbei auch um eine Form der Doppelbrechung des Partikels, da sowohl Spin als auch Bahndrehimpuls des verwendeten Laserstrahls verändert werden kann. Ebenfalls erfolgt die Drehung kontinuierlich. Literatur: E. Higurashi, O. Ohguchi, T. Tamamura, H. Ukita, R. Sawada: "Optically induced rotation of dissymmetrically shaped fluorinated polyimide micro-objects in optical traps", J. Appl. Phys., Vol. 82, No. 6, 15 September 1997.

c) "Optical Spanners": Hierzu wird der oben beschriebene Aufbau der optischen Pinzette dahingehend modifiziert, als dass der in die Mikroskopoptik eingekoppelte Laserstrahl zuvor so polarisiert wird, dass der mittlere Gesamtdrehimpuls der Photonen stark von Null abweicht. Dies geschieht durch räumliche Lichtmodulatoren, die Licht über Modulation der Phasenlage über die Wellenfront mit einem Bahndrehimpuls ausstatten. Durch Streuung und Absorption dieses Laserlichts an gefangenen Partikeln findet ein kontinuierlicher Drehimpulsübertrag auf selbige statt, woraus eine Rotation des gefangenen Partikels um die Laserachse resultiert. Ebenso ist es möglich, Mikropartikel auf Kreisbahnen zu schicken, die sie periodisch durchlaufen, ohne dass es einer Führung der einzelnen Partikel z.B. über Auslenkung des einfallenden Laserstrahls bedürfte. Literatur: M. E. J. Friese, J. Enger, H. Rubinsztein-Dunlop, and N. R. Heckenberg: "Optical angular momentum transfer to trapped absorbing particles", Physical Review A 54, 1593-1596, (1996), J. Leach, M. R. Dennis, J. Courtial and M. J. Padgett: "Vortex knots in light", New J. Phys. 7 (2005) 55.

d) Außerdem gibt es Ansätze, Objekte mit mehreren

optischen Pinzetten gleichzeitig zu halten und durch Variation der relativen Lage der Foki zueinander asymmetrische Partikel um die optische Achse des Mikroskops zu drehen.

[0015] Hierzu können entweder über Strahlteileroptiken mehrere Laserstrahlen in das Mikroskop eingekoppelt werden oder man lenkt den Laserstahl über automatisch gesteuerte Spiegel oder akustisch-optische Defektoren (AOD), die zwischen mindestens zwei Positionen hin und her springen, so um, dass die so entstehenden Teilstrahlen auf mehr als einen Fokuspunkt zusammenlaufen. Eine andere Möglichkeit zu Erzeugung von mehr als einem Fokus ist die Verwendung von holographischen Phasenplatten. Ein solcher Aufbau wird auch als holographische optische Pinzette, englisch: "holographic optical tweezers", bezeichnet.

[0016] Drehungen senkrecht zur optischen Achse des Mikroskops wurden an einem speziell zu diesem Zweck gefertigten, hantelförmigen Mikropartikel bestehend aus zwei teilweise verschmolzenen Glaskugelchen von jeweils etwa 5 μ m Durchmesser in einem "trial and error" Experiment realisiert. Ebenfalls wurde in Laborexperimenten gezeigt, dass es möglich ist, Festkörperlaser durch einbringen einer geeigneten Aperturblende in die Resonatorkammer, englisch: "cavity", so zu modifizieren, dass die von ihnen emittierten Laserstrahlen durch ein Objektiv auf mehr als einen Punkt fokussiert werden. Jeder dieser Foki kann somit als optische Pinzette genutzt werden. Literatur: V. Bingelyte, J. Leach, J. Courtois, and M. J. Padgett: "Optically controlled three-dimensional rotation of microscopic objects", APPLIED PHYSICS LETTERS VOLUME 82, NUMBER 5, 3 FEBRUARY 2003; Amiel Ishaaya, Nir Davidson, and Asher Friesem: "Very high-order pure Laguerre-Gaussian mode selection in a passive Q-switched Nd:YAG laser", Optics Express # Vol. 13, Iss. 13 -- June 2005 pp: 4952-4962; Enrico Santamato, Antonio Sasso, Bruno Piccirillo, and Angela Vella: "Optical angular momentum transfer to transparent isotropic particles using laser beam carrying zero average angular momentum", Optics Express Vol. 10, Iss. 17 -- August 2002 pp: 871-878.

[0017] iii) Fokussierende Glasfasern, d.h. handelsübliche, lichtleitende Glasfasern, deren Ende mit einer kleinen Sammellinse versehen oder geeignet anders modifiziert wird, können dazu eingesetzt werden, mikroskopische Partikel stabil zu halten. Das Prinzip ist hierbei vergleichbar mit dem der optischen Pinzette, mit dem Unterschied, dass der Laserstrahl nicht mehr in die Mikroskopoptik eingekoppelt werden muss, sondern geführt durch die Glasfaser in den Probenraum gelangt. Aufgrund der länglichen Form des durch das präparierte Faserende entstehenden Fokus richten sich mikroskopische Partikel mit ihrer längsten Achse parallel zur Ausbreitungsrichtung des Laserstrahls aus. Überlagert man die Foki mehrerer Glasfasern, ist es möglich, durch geeignetes An- und Ausschalten der Faserlaser gefangene Partikel neu zu orientieren. Sie richten sich innerhalb

kurzer Zeit jeweils parallel zur optischen Achse der jeweils aktiven Glasfaser aus. Dieses Verfahren gestattet, sofern es die Geometrie der am sonstigen Aufbau beteiligten Geräte und die Biegsamkeit und Abmessung der Glasfasern erlauben, Partikel in Schritten von einer Gleichgewichtslage in die nächste zu drehen. Die Anzahl der stabilen Orientierungen entspricht dabei höchstens der doppelten Anzahl der Fasern. Literatur: K. Taguchi, H. Ueno, T. Hiramatsu and M. Ikeda: "Optical trapping of dielectric particle and biological cell using optical fibre", ELECTRONICS LETTERS 27th February 1997 Vol. 33; K. Taguchi, H. Ueno and M. Ikeda: "Rotational manipulation of a yeast cell using optical fibres", ELECTRONICS LETTERS 3rd July 1997 Vol. 33 No. 14; K. Taguchi, M.

15 Tanaka, K. Atsuta and M. Ikeda: "Three Dimensional Optical Trapping Using Plural Optical Fibers", Proc. of CLEO2000, pp.CtuK19, (2000-9); Taylor, R. S.; Hnatovsky, C.: "Particle trapping in 3-D using a single fiber probe with an annular light", Optics Express, vol. 11, Issue 21, p.2775.

[0018] iv) Zweistrahl laserfallen und darauf aufbauende Methoden zur Manipulation von Mikropartikeln: Diese Art der Laserfalle wurde erstmals 1970 von A. Ashkin mit frei propagierenden Laserstahlen realisiert. Die heute verbreitetere, technisch leicht abgewandelte Form bedient sich der Führung der Laserstrahlen durch Glasfasern in den Probenraum. Das Prinzip beider Bauformen ist jedoch das gleiche. Zwei von ihrem Intensitätsprofil her gaußförmige, divergente Laserstrahlen werden so gegeneinander gerichtet, dass ihre optischen Achsen einander decken. Ähnlich wie bei der optischen Pinzette greifen auch hier zwei Arten von Kräften an in Bezug auf das umgebende Medium optisch dichtere Partikeln, die in den Bereich der Laserstrahlen kommen. Gradientenkräfte, die das Partikel in den Bereich maximaler Laserintensität ziehen, d.h. radial zentrieren, und Streukräfte in Ausbreitungsrichtung der Laserstrahlen, die für eine Ausrichtung entlang der optischen Achse sorgen. Dies führt dazu, dass sich das Partikel bei gleicher Beschaffenheit der beiden Laserstrahlen nach relativ kurzer Zeit in einer stabilen Gleichgewichtsposition zentriert zwischen den beiden Laserstrahlen befindet. Erhöht man die Intensität eines der Laserstrahlen, wird diese Gleichgewichtslage des gefangen Partikels auf der optischen

40 Achse etwas in Ausbreitungsrichtung dieses Laserstrahls verschoben. Der Durchmesser der Laserstrahlen sollte, um die Falle effizient zu gestalten, im Bereich der Gleichgewichtsposition für gefangene Partikel die Größe der Partikel nicht wesentlich übersteigen. Der volle Divergenzwinkel der Laserstrahlen liegt typischerweise bei 10 - 20 Grad im Fernfeld. Die für das Einfangen und Halten notwendige Laserleistung hängt von Dichteunterschied des Partikels zu dem des ihn umgebenden Mediums, Größe des Partikels, relativen Brechungssindizes, 45 Temperatur und Geometrie der Falle sowie gegebenenfalls von Divergenz und Breite der Laserstrahlen ab. Sie liegt jedoch bzgl. des Fangens und Halten von biologischen Zellen in wässrigeren Medien zwischen 5 und

300mW kontinuierlicher Leistung pro Laserstrahl, typisch: voller Divergenzwinkel im Fernfeld in Luft 15 Grad, Wellenlänge im nahen Infrarot, z.B. 1060nm.

[0019] Das definierte Drehen von Partikeln ist mit diesem Aufbau nicht möglich. Über ein leichtes Verkippen der Laserstrahlen gegeneinander kann ein gefangenes Partikel jedoch auf eine periodische Bahn innerhalb der Falle gezwungen werden. Die Dynamik dieses Prozesses ist charakterisiert durch das abwechselnde Angreifen von Streu- und Gradientenkräften der beiden Laserstrahlen am Partikel. Dies lässt sich qualitativ wie folgt beschreiben: Das Partikel befindet sich im Zentrum von Laserstrahl1, die auf es wirkende Streukraft drückt es in Richtung Laserstrahl2 bis die von diesem ausgehende Gradientenkraft dominiert, das Partikel neu zentriert und die von Laserstrahl2 ausgehende Streukraft es wieder in Richtung Laserstrahl1 schiebt usw. Dieser Effekt tritt in der Regel ungewollt auf, wenn die Laserstrahlen nicht optimal ausgerichtet sind, findet jedoch keinerlei Anwendungen.

[0020] Des weiteren sind, ähnlich dem Prinzip der Zweistrahllaserfalle, optischen Fallen unter Verwendung von mehr als zwei Laserstrahlen gebaut worden, in denen gefangene Partikel bei nicht optimal ausgerichteten Faserenden auf ähnliche, periodische Bahnen gezwungen werden.

[0021] Weiterhin lassen sich elliptische Partikel durch Variation der relativen Laserintensitäten von einem Laserstrahl in einem anderen Drehen, da sich diese in optischen Fallen stets mit ihrer Haupttasche parallel zur Ausbreitungsrichtung des Laserstrahls ausrichten. Die Anzahl der möglichen Ausrichtungen entspricht hier, wie im Fall der auf fokussierenden Glasfasern basierenden optischen Falle, maximal der doppelten Anzahl der verwendeten Glasfasern.

[0022] Anwendung finden faserbasierte Laserfallen zudem auf dem Gebiet der Viskoelastizitätsmessung an biologischen Zellen, zuerst von J. Guck et. al. in einer faserbasierten divergenten Zweistrahllaserfalle realisiert. Hierbei wird ausgenutzt, dass bei genügend hohen Laserintensitäten, als Folge der relativistischen Energie-Impuls-Beziehung sowie dem allgemeinen Prinzip der Impulserhaltung, Kräfte an der Membran einer Zelle angreifen, die in der Lage sind, diese zu verformen. Eine zu diesem Zweck betriebene Falle wird auch als optischer Strecker, englisch: "optical stretcher", bezeichnet.

[0023] Des Weiteren können Zweistrahllaserfallen dazu eingesetzt werden, sphärische Mikropartikel bis zu einer Größe von wenigen Mikrometer äquidistant aufzurichten. Literatur: A. Ashkin: "Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure", Phys. Rev. Lett. 24, 156-159 (1970); S.D. Collins, R.J. Baskin, and D.G. Howitt, "Microinstrument gradient force optical trap", Applied Optics 38, 6068-6074 (1999); Guck, J., R. Ananthakrishnan, T.J. Moon, C.C. Cunningham and J. Käs: "Optical deformability of soft dielectric materials", Phys. Rev. Lett., 84 (23), 5451-5454 (2000); Guck, J., R. Ananthakrishnan, T.J. Moon, C.C. Cunningham and J. Käs:

"The Optical Stretcher - A Novel, noninvasive tool to manipulate biological materials", Biophys. J., 81, 767-784 (2001); W. Singer, M. Frick, S. Bernet, and M. Ritsch-Marte: "Self-organized array of regularly spaced microbeads in a fiber-optical trap", J. Opt. Soc. Am. B 20, 1568 (2003).

[0024] Alle vorstehend beschriebenen Lösungen haben in Bezug auf das Anwendungsbereich der Erfindung mindestens einen der folgenden Mängel:

[0025] Die Drehung der Partikel resultiert aus einem kontinuierlichen Drehimpulsübertrag. Dieses führt dazu, dass eingefangene, nicht vollständig charakterisierte Partikel nur über ein "trial and error" Verfahren unter Verwendung eines Rückkopplungsmechanismus um definierte Winkel gedreht werden können. Im Fall der dielektrischen Feldkäfige und "Optical Spanners" heißt dies konkret: Die Drehung mikroskopischer Partikel um definierte Winkel ist nur dadurch möglich, dass eine kontinuierlich induzierte Drehung kurz vor Durchlaufen der gewünschten Ausrichtung abgebrochen und das Partikel unter Berücksichtigung des Verhältnis von auftretenden Trägheit- zu Reibungskräften abgebremst wird. Um zu beurteilen, ob die gewünschte Orientierung bereits erreicht ist, bedarf es im Allgemeinen einer Messung, die typischerweise mit einem Lichtmikroskop erfolgt.

[0026] Es ist nicht möglich, die Drehung mikroskopischer Partikel im Grenzfall kleiner Winkelgeschwindigkeiten im Gleichgewicht durchzuführen. Dies bedeutet, dass die Orientierung eines Partikels nach Abschluss einer Drehung im Allgemeinen nicht stabil ist. Es ist daher mit denen unter i), ii)a), ii)b), ii)c), iii) und iv), genannten Methoden nicht möglich, ein Partikel in jeder beliebigen Orientierung bezüglich mindestens einer der möglichen Drehachsen stabil zu halten. Soll eine bestimmte Orientierung gehalten werden, ist es nötig, gegen Drehmomente, die auf asymmetrische Partikel aufgrund von Asymmetrien des Aufbaus wirken, dynamisch, d.h. notwendigerweise unter Verwendung von Rückkoppelmechanismen, gegenzusteuern. Im Falle von Feldkäfigen wird die Rotationssymmetrie des Systems durch die endliche Zahl der verwendeten Elektroden gebrochen. Im Fall der "Optical Spanners" ist es die Polarisationsrichtung des Laserstrahls, der zum Halten des Partikels verwendet wird, die für eine Vorzugsorientierung asymmetrischer Partikel sorgt.

[0027] Drehungen können resultierend aus dem vorherigen Punkt nur über Rückkopplungsmechanismen mit konstanter Winkelgeschwindigkeit ausgeführt werden. Zu bewerten, ob sich z.B. eine biologische Zelle mit konstanter Winkelgeschwindigkeit dreht, ist insbesondere dann problematisch, wenn die Struktur der Zelle noch weitgehend unbekannt ist und erst durch das Drehen aufgeklärt werden soll.

[0028] Die Verwendung optischer Pinzetten zum Drehen mikroskopischer Partikel stellt eine starke Einschränkung der verwendbaren Mikroskopoptiken dar, welche im Allgemeinen gleichzeitig zur Beobachtung der Partikel genutzt werden. Unerlässlich ist hier die Verwen-

dung von Objektiven hoher numerischer Apertur. Daraus resultiert ein sehr kleiner Arbeitsabstand sowie eine nicht immer gewünschte sehr starke Vergrößerung. Des Weiteren sind optische Pinzetten nicht als universell einsetzbare Zusatzmodule für beliebige Mikroskope zu sehen. Die Integration einer optischen Pinzette in ein Mikroskop ist im Allgemeinen sehr aufwendig und bei vielen Mikroskoptypen überhaupt nicht oder nur eingeschränkt möglich. Problematisch für die Kombination mit optischen Pinzetten sind z.B. Konfokalmikroskope, Dekonvolutionsmikroskope, sämtliche Mikroskope, die Objektive mit einer numerischen Apertur kleiner als ~ 1.1 verwenden.

[0029] Optische Pinzetten sind aufgrund der durch die Fokussierung der verwendeten Laserstrahlen bedingten extrem hohen Spitzenintensität zur direkten Manipulation biologischer Proben weitestgehend ungeeignet. Thermische Schäden, sowie Strahlungsschäden an den Proben lassen sich etwa durch die Wahl geeigneter Wellenlängen minimieren, nicht aber gänzlich vermeiden.

[0030] In den meisten Fällen ist die Doppelbrechung mikroskopischer Partikel viel zu gering, als dass diese in einer linear polarisierten Laserfalle ein Drehmoment erfahren könnten, welches sie in Rotation versetzt. Ausnahmen stellen hier speziell gefertigte Mikrozahnräder sowie optisch aktive Kristalle dar.

[0031] Das Drehen mikroskopischer Partikel durch eine optische Pinzette erfolgt in der Regel um die optische Achse der zur Führung des Laserstrahles eingesetzten Mikroskopoptiken, welches üblicherweise auch zur Beobachtung des Partikels verwendet wird. D.h. das Drehen des Partikels unter Beobachtung ergibt keinen zusätzlichen Informationsgewinn. Dieses Verfahren ist damit als Grundlage für tomographische Untersuchungen gänzlich ungeeignet. Es ist theoretisch zwar denkbar, das Partikel von der Seite mit einem zweiten Mikroskop zu beobachten, jedoch aufgrund der der Funktionalität untergeordneten Geometrie handelsüblicher Mikroskope einfach nicht praktikabel. Da z.B. der Abstand des laseremittierenden Objektivs zum Partikel nicht wesentlich größer als $250\mu\text{m}$ sein darf, für optische Pinzetten verwendbare Objektive typischerweise jedoch einen Durchmesser von nicht weniger als 2cm haben, müsste das zur Beobachtung dienende Objektiv einen Arbeitsabstand von mindestens 1 cm besitzen. Diese Konstellation würde allerdings das erzielbare Auflösungsvermögen erheblich herabsetzen, da es im Wesentlichen eine Funktion des maximalen Winkels ist, unter dem von der Probe ausgesandtes Licht in das Objektiv fällt.

[0032] Dielektrische Feldkäfige arbeiten typischerweise nach dem Prinzip negativer Dielektrophorese, d.h. Partikel, die eingefangen werden sollen, müssen sich in einem Medium höher Dielektrizitätskonstante befinden. Da die hierbei notwendigen Feldstärken erheblich sind, typisch $>20\text{ KV/m}$, fließen in der Regel kleine elektrische Ströme zwischen den Elektroden im Probenraum, was unerwünschte Auswirkungen auf die gefangenen Partikel haben kann. Diese können von der Erwärmung bis hin zu strukturellen Veränderungen oder Tod empfindli-

cher Proben, z.B. biologischer Proben, reichen.

[0033] Für die Manipulation biologischer Proben ist daher die Verwendung spezieller, schwach leitender Medien erforderlich, die jedoch mit vielen Zelltypen nicht kompatibel sind bzw. deren Auswirkungen auf die Integrität der Zellen nicht bekannt sind.

[0034] Aufgabe der Erfindung ist, eine Vorrichtung und ein Verfahren zu schaffen, mit welchen das Manipulieren und Ausrichten von Probenteilchen in einem Messvolumen erleichtert wird.

[0035] Diese Aufgabe wird in einem ersten Gesichtspunkt der Erfindung durch die Vorrichtung mit den Merkmalen des Anspruchs 1 gelöst.

[0036] In einem zweiten Aspekt der Erfindung wird die Aufgabe durch das Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 14 gelöst.

[0037] Bevorzugte Ausgestaltungen der erfindungsgemäßen Vorrichtung und vorteilhafte Varianten des erfindungsgemäßen Verfahrens sind Gegenstand der abhängigen Ansprüche.

[0038] Die Vorrichtung der oben bezeichneten Art ist erfindungsgemäß dadurch weitergebildet, dass als Teil der optischen Mittel eine Strahlformungseinrichtung zum Erzeugen eines zu einer Strahlachse asymmetrischen Intensitätsprofils vorhanden ist, wobei Probenteilchen im Messvolumen in einer durch das asymmetrische Intensitätsprofil erzeugten inhomogenen Feldverteilung des elektrischen Felds einfangbar sind, und dass zum Mitführen von in der inhomogenen Feldverteilung eingefangenem Probenteilchen eine Dreheinrichtung zum Drehen des asymmetrischen Intensitätsprofils um die Strahlachse relativ zum Messvolumen vorhanden ist.

[0039] Das Verfahren der oben genannten Art ist erfindungsgemäß dadurch weitergebildet, dass der in das Messvolumen eingeleiteten elektromagnetischen Strahlung ein zu einer Strahlachse asymmetrisches Intensitätsprofil aufgeprägt wird, welches im Messvolumen eine inhomogene Feldverteilung des elektrischen Felds erzeugt, in welcher Probenteilchen eingefangen werden, und dass zum Mitführen von in der inhomogenen Feldverteilung gefangenem Probenteilchen das asymmetrische Intensitätsprofil um die Strahlachse relativ zum Messvolumen gedreht wird.

[0040] Gegenstand der Erfindung ist auch ein Laser-Scanning-Mikroskop, insbesondere ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop, welches eine erfindungsgemäße Vorrichtung zum berührungslosen Manipulieren und Ausrichten von Probenteilchen in einem Messvolumen mit Hilfe eines inhomogenen elektrischen Wechselfelds aufweist.

[0041] Schließlich ist Gegenstand der Erfindung auch ein Verfahren zum Betrieb eines Laser-Scanning-Mikroskops, insbesondere eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops, bei dem die Verfahrensschritte des Anspruchs 14 durchgeführt werden.

[0042] Als erster Kerngedanke der Erfindung kann die Erkenntnis angesehen werden, dass mit Hilfe eines nichtrotationssymmetrischen Strahlprofils in einem

Messvolumen eine inhomogene Feldverteilung des elektrischen Felds erzeugt werden kann, mit welcher eine azimutale Ausrichtung eines Probenteilchens bezogen auf eine Strahlachse bewerkstelligt werden kann.

[0043] Als weiterer Kerngedanke der Erfindung ist so dann anzusehen, dass auf diese Art gefangene oder fest gehaltene Partikel oder Probenteilchen durch einfaches Drehen des nicht rotationssymmetrischen Intensitätsprofils relativ zum Messvolumen im Messvolumen manipuliert, ausgerichtet und gedreht werden können. Durch die Variation der elektromagnetischen Strahlung wird eine Drehung der Feldverteilung um eine beliebige Drehachse bewerkstelligt.

[0044] Die Wirkung der Erfindung ergibt sich aus dem Verhalten von spezifisch polarisierbarer Materie im Feld einer anisotrop, beispielsweise nicht rotationssymmetrisch abgestrahlten elektromagnetischen Strahlung. Hierbei kommen vor allem Laserquellen als Strahlungsquellen in Betracht.

[0045] Die Erfindung gestattet beispielsweise, vereinzelte mikroskopische Partikel mit einem Durchmesser zwischen 0,2 und 5000 μm , die sich bezüglich ihrer Lage bereits in einem stabilen Gleichgewicht befinden oder mit Hilfe der erfindungsgemäßen Vorrichtung in ein Gleichgewicht gebracht werden, berührungslos um definierte Winkel zu drehen. Die Drehung kann dabei insbesondere so durchgeführt werden, dass es möglich ist, ein Partikel in jeder beliebigen Orientierung relativ zu einer Drehachse stabil zu halten.

[0046] Die erfindungsgemäße Vorrichtung stellt in sich eine Einheit dar, die bezüglich ihrer Funktionalität unabhängig von eventuell zur Beobachtung der manipulierten, ausgerichteten und/oder gedrehten Partikel nötigen Instrumente, insbesondere unabhängig von einem hierzu eingesetzten Mikroskop, ist. Gleichwohl ergeben sich insbesondere zahlreiche vorteilhafte und neue Anwendungen im Bereich der Mikroskopie. Beispielsweise kann die berührungslose Drehung der Partikel quer zu einer optischen Achse, insbesondere senkrecht zu einer optischen Achse, eines zur Beobachtung dienenden Instruments erfolgen. Die hierbei möglichen neuen Anwendungen gehen über die oben beschriebenen Lösungen hinaus und dort vorhandene Beschränkungen können zum großen Teil vermieden werden. Die erfindungsgemäße Anordnung kann auch beschrieben werden als eine elektromagnetische Strahlungsfalle, die es ermöglicht, mikroskopische Partikel, die in ihren optischen Eigenschaften, insbesondere Brechungsindex und Absorptionsverhalten, von denjenigen eines sie umgebenden Mediums abweichen in einer beliebigen Orientierung relativ zu mindestens einer Drehachse zu halten. Auch einander im Messvolumen überlagernde asymmetrische Intensitätsprofile mehrerer Strahlungsquellen sind im Prinzip denkbar und können für bestimmte Anwendungen vorteilhaft sein. Der Brechungsindex des zu manipulierenden Partikels muss dabei größer als derjenige des umgebenden Mediums sein.

[0047] Die Erfindung betrifft insbesondere das stabile

berührungslose Ausrichten und Drehen von Partikeln mit einem typischen Durchmesser von 0,2 bis 5000 Mikrometer. Dies ist vor allem für Mikroskopietechniken zur Erzielung hoher isotroper Auflösungen von Bedeutung, wie z.B. der lichtmikroskopischen Computertomographie an einzelnen biologischen Zellen, suspendierten Zellorganellen oder kleinen Zellverbänden.

[0048] Eine weitere Anwendung ist der Einsatz in mikrofluidischen Systemen, um etwa die Viskosität kleinsten Stoffmengen, wie sie z.B. in Mikroreaktoren umgesetzt werden, zu bestimmen oder kleinste Drehmomente zu quantifizieren.

[0049] Die erfindungsgemäße Vorrichtung, die auch als Zellrotator bezeichnet werden kann, kann auch nutzbringend mit dem "optical stretcher" eingesetzt werden. In der Kombination kann vermieden werden, dass mikrofluidischer Fluss Zelldrehungen induziert, während die Zelle verformt oder "gestrechelt" wird.

[0050] Bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung wird mindestens ein elektromagnetischer Strahl verwendet, der durch geeignete Optiken, z.B. optische Wellenleiter, Spiegel oder Mikroprismen, so in den Probenraum geführt wird, dass seine transversale Ausdehnung dort etwa der Partikelgröße entspricht oder in unmittelbarer Nähe des Probenraums mit geeigneter Geometrie erzeugt wird, z.B. von einer Laserdiode. Die Probenteilchen werden also bezüglich mindestens einer Achse orientiert. Auch eine Ausrichtung relativ zu mehreren Achsen ist grundsätzlich möglich. Hierzu können mehrere Strahlungsquellen verwendet werden. Besonderes Merkmal der Führung der eingesetzten elektromagnetischen Strahlung ist es, dass sie anders als bei optischen Pinzetten, völlig entkoppelt von möglicherweise zur Beobachtung der Probe eingesetzten Mikroskopoptiken zu sehen ist.

[0051] Zweck der verwendeten elektromagnetischen Strahlen ist es zunächst, wie bei Laserfallen, das zu manipulierende Partikel in ein stabiles Gleichgewicht bezüglich seiner Lage zu bringen und mögliche andere am Partikel angreifende Kräfte zu kompensieren. Wird hierzu lediglich ein Strahl verwendet, so ist es notwendig, dass dieser konvergent ist oder aber eine entgegen der Ausbreitungsrichtung dieses Strahls gerichtete Kraft, z.B.

[0052] Gravitation, Reibungskräfte bedingt durch den Fluss des Mediums, am Partikel angreift, um auftretende Streukräfte zu kompensieren.

[0053] Kommen mehrere Strahlen zum Einsatz, können diese so gegeneinander gerichtet werden, dass von ihnen am gefangenen Partikel angreifende Streukräfte sich gegenseitig aufheben. Generell ist der Punkt der stabilen Lage des Partikels in der Falle charakterisiert durch das Verschwinden der Summe aller angreifenden Kräfte, sowie dem Auftreten rücktreibender Kräfte für keine Auslenkungen aus der Gleichgewichtslage. Weiterhin resultiert aus der Verwendung mindestens eines elektromagnetischen Strahls mit nichtrotationssymmetrischem Profil ein Potential für die Orientierung eingefangener, im Hinblick auf ihre optischen Eigenschaften nicht voll-

ständig homogene oder asymmetrisch geformte Partikel bezüglich der Drehung um die Ausbreitungsrichtung dieses Strahls. Die Asymmetrie dieses Strahls kann das Intensitätsprofil, seine Polarisation sowie die Modulation der Phase über den Stahlquerschnitt betreffen. Schon kleinste Abweichungen der Partikelform von Rotationskörpern, die bei realen Proben praktisch immer vorhanden sind, reichen hierbei zur Ausbildung eines Potentials für die Winkelausrichtung aus. Resultierend aus diesem Potential ergibt sich eine Vorzugsorientierung des Partikels in der Falle, die beim Einfangen eingenommen und dann stabil gehalten wird. Dreht man nun das Profil des asymmetrischen Strahls und damit das Potential für die Winkelausrichtung eines eingefangenen Partikels, dreht sich dieses mit. Diese Drehung erfolgt im Grenzfall kleiner Winkelgeschwindigkeiten im Gleichgewicht, d.h. im Minimum des Potentials. Realisiert wird die Drehung des für die Orientierung des Partikels verantwortlichen asymmetrischen Stahlprofils, am einfachsten durch die Drehung eines den Strahl asymmetrisch emittierenden Wellenleiters. Andere Möglichkeiten zur Drehung des Strahlprofils, z.B. solche die astigmatische Linsen oder Spiegel verwenden, sind möglich.

[0054] Das Verfahren besteht erfindungsgemäß aus folgenden Schritten, von denen einige, je nach der Beschaffenheit der Probe, als optional zu betrachten sind.

[0055] Zunächst können die zu untersuchenden Partikel für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens in folgender Weise vorbereitet werden.

[0056] Die zu untersuchenden Partikel werden vereinzelt und Partikelaggregate aufgebrochen. Je nach Empfindlichkeit und Beschaffenheit der Probe eignen sich hierfür verschiedene Verfahren, die von der grob mechanischen Einwirkungen auf die Probe, wie z.B. durch Zerkleinerung in einem Mörser, über Ultraschallmethoden bis hin zu Verfahren reichen, bei denen die Probe unter Zugabe geeigneter Chemikalien in flüssigen Medien suspendiert wird. Im Fall biologischer Zellen kann ebenfalls eine enzymatische Behandlung der Probe nötig sein, um interzelluläre Strukturen aufzulösen.

[0057] Falls notwendig, kann die Probe unter Einsatz üblicher Techniken, wie z.B. Sedimentation, Zentrifugation, chemischer Aufbereitung, von Verunreinigungen befreit werden.

[0058] Nach Vorbereitung des Partikels können diese wie folgt behandelt werden.

[0059] Die vereinzelten Partikel werden nun in ihrem Medium in den Wirkungsbereich der die Erfindung betreffenden Strahlungsfalle gebracht. Im Fall flüssiger Medien bieten sich hierzu die Verwendung mikrofluidischer Transportsysteme, Mikropipetten sowie optischer Pinzetten an. In Gasen sowie auch im Vakuum können für diesen Transport z.B. Mikrosonden, elektrische Felder, optische Pinzetten oder Zerstäuber, wobei letztere im Vakuum nur bedingt geeignet sind, verwendet werden. Bei der Wahl des Mediums ist darauf zu achten, dass dieses weder chemisch mit den Partikeln reagiert. Ebenfalls sollte das Medium im Fall die verwendete Strahlung

absorbierender Partikel ein guter Wärmeleiter sein.

[0060] Im für das weitere Verfahren ungünstigen Fall, dass sich mehrere nicht zusammenhängende Partikel in der Falle befinden, kann die Leistung der verwendeten Laserstrahlen solange gesenkt werden, bis alle Teilchen bis auf ein einziges getrieben durch thermische Fluktuationen oder gerichteten Fluss des Mediums den Wirkungsbereich der Falle verlassen haben.

[0061] In Fällen stark unterdämpfter oder überdämpfter Systeme, z.B. große Partikel in verdünnten Gasen oder im Vakuum bzw. kleine Partikel in hochviskosen Medien, ist es nötig abzuwarten, bis sich das eingefangene Partikel in einer stabilen Position in der Falle einfindet. Üblicherweise dauert dieser Vorgang jedoch lediglich einige hundertstel Sekunden

[0062] Bei stark variierender Partikelgrößen kann es zudem vorteilhaft sein, die Geometrie der Falle, sofern diese mit divergenten elektromagnetischen Strahlen arbeitet, der Größe des jeweilig gefangenen Partikels anzupassen.

[0063] Das Drehen des gefangenen Partikels erfolgt über die Drehung mindestens eines asymmetrischen Strahlprofils. Hierbei kann diese Asymmetrie die Verteilung von Intensität, Polarisationszustand und/oder eine Modulation der Phasenlage über den Strahlungsquerschnitt bedeuten. Ebenso kann die hydrodynamische Kopplung an einen in die Nähe des Partikels gebrachten, rotierenden Wellenleiter zur Drehung des Partikels genutzt werden.

[0064] Ist die Messung am Partikel, zwecks welcher die Drehung durchgeführt wurde, abgeschlossen, kann das Partikel unter Verwendung eines an sich bekannter Transportmechanismus entsprechend dem Messergebnis sortiert werden.

[0065] Die erfindungsgemäße Anordnung und das Verfahren sind mit einer Reihe von Vorteilen verbunden.

[0066] Die Drehung mikroskopischer Partikel erfolgt gekoppelt an das sie ausrichtende Potential. Insbesondere heißt dies, dass ein gefangenes Partikel durch die erfindungsgemäße Anordnung ohne Verwendung von Rückkoppelmechanismen um definierte, beliebige Winkel gedreht werden kann. Dies ist vor allem dann wichtig, wenn die räumliche Struktur der zu drehenden Partikel nicht vollständig charakterisiert ist oder gar, wie beim Einsatz der Drehung zu Zwecken der Computertomographie, durch die Drehung aufgeklärt werden soll.

[0067] Eine solche Drehung ist, je nach Ausprägung der. Asymmetrien von elektromagnetischem Strahl und Partikel, der Viskosität des das Partikel umgebenden Mediums sowie der Intensität des Laserstrahls und der relativen mittleren Brechungsindizes sehr schnell durchführbar. Dieses erlaubt andererseits, die Erfindung im Fall besonders empfindlicher Partikel, z.B. biologischer Zellen, die zum Zweck der Computertomographie gedreht werden sollen, für welche Winkelgeschwindigkeiten von 360°/Sekunde ausreichen, mit relativ kleinen Leistungen zu betreiben, z.B. Laserstrahlen mit jeweils 10 - 100 mW. Dies entspricht bei der Verwendung divergen-

ter Laserstrahlen wesentlich geringeren Belastungen für die Zellen als sie bei der Manipulation durch optische Pinzetten auftreten.

[0068] Anders als z.B. bei dielektrischen Feldkäfigen und "optical spanners" kann ein eingefangenes Partikel in jeder durchlaufbaren Orientierung stabil gehalten werden, ohne dass es eines Rückkoppelungsmechanismus bedarf. Durchlaufbar sind alle Winkel zwischen 0° und 360° bezüglich mindestens einer Drehachse. Nützlich ist dies z.B. bei der Langzeitbeobachtung biologischer, nicht adhärenter Zellen, bei denen man darauf angewiesen ist, eine zufällige, z.B. durch brownsche Bewegung bedingte Drehung der Zelle zu unterbinden, um den Blickwinkel auf die Zelle konstant zu halten.

[0069] Ausführungsformen der beschriebenen Erfindung zum Ausrichten und Drehen von Mikropartikeln sind als funktionelle Einheit entkoppelt von etwaig zur Beobachtung eingesetzten Mikroskopoptiken zu sehen. Dies bietet die folgenden Vorteile:

[0070] Die Erfindung ermöglicht die Rotation von mikroskopischen Partikeln senkrecht zur optischen Achse eines Mikroskops. Dies kann z.B. für die lichtmikroskopische Computer-tomographie oder andern Mikroskopieverfahren zur Erzielung hoher isotroper Auflösungen an vereinzelten, suspendierten, biologischen Zellen sowie kleineren Zellverbänden eingesetzt werden.

[0071] Ein zur Beobachtung der eingefangenen Partikel dienendes Mikroskop kann unabhängig von der Erfindung bedient werden. Es ist z.B. möglich, die Fokusebene des Mikroskops in Bezug auf gefangene Partikel zu variieren, was unter anderem für die Konfokal- und Dekonvolutionsmikroskopie von großer Bedeutung ist.

[0072] Zu Beobachtungszwecken eingesetzte Mikroskope bedürfen keiner oder allenfalls geringer Modifikationen.

[0073] Die Erfindung kann beliebig mit optischen Pinzetten kombiniert werden. Darüber hinaus ist auch eine Kombination der Erfindung mit einem Lasermicrobeam, der schneiden und mikroinjizieren kann, möglich. Darüber hinaus kann die Erfindung auch mit einer mikrofluidischen Kammer, die eine Erneuerung eines Zellmediums erlaubt und somit zur Langzeitbeobachtung von Zellen verwendet werden kann, kombiniert werden.

[0074] Anders als bei optischen Pinzetten ist die Verwendung von Objektiven hoher numerischer Apertur optional. Dies ermöglicht z.B. den Einsatz von Objektiven mit größerem Arbeitsabstand.

[0075] Des Weiteren stellt die Erfindung keinerlei besonderen Ansprüche an das die Partikel umgebende Medium. So ist es möglich biologische Zellen in beliebigen Zellmedien, d.h. insbesondere in allen in Medizin und Biologie üblichen Standardmedien einzufangen und drehend zu orientieren. Die einzige Anforderung an die zu verwendenden Medien ist, dass ihr Brechungsindex niedriger ist als derjenige der zu untersuchenden Zelle. Dies ist meistens der Fall.

[0076] Weitere Vorteile ergeben sich aus der Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Anordnung und des

Verfahrens.

[0077] Ein besonderes Merkmal der Erfindung ist, dass sie unter Verwendung von laserstrahlenführenden Glasfasern sehr platzsparend realisiert werden kann. Typischerweise haben diese einen Außendurchmesser von 80 μ m, wahlweise 125 μ m, und sind damit gut in eine Anordnung zu integrieren, welche bequem an die Probenhalterungen konventioneller Lichtmikroskope angepasst werden kann.

[0078] Glasfaserbasierte Ausführungsformen sind denkbar, die gänzlich ohne Freistrahloptiken auskommen. Die Speisung der elektromagnetischen Strahlungsfalle, hier: einer Laserfalle, kann somit äußerst flexibel erfolgen, was es ermöglicht, die Falle in Bezug auf Laserquelle und Mikroskop zu bewegen, ohne dass eine erneute Kalibrierung notwendig würde. Als Laserquellen können diodengepumpte Glasfaserlaser eingesetzt werden.

[0079] Aufgrund der minimalen Größe denkbarer Ausführungsformen der Erfindung ist deren Einsatz zur Vermessung mikrofluidischer Systeme denkbar. Eine konkrete Anwendung ist die Messung der Viskosität kleinster Stoffmengen, wie sie z.B. in chemischen Mikroreaktoren umgesetzt werden, über die Messung der maximalen Winkelgeschwindigkeit, mit welcher ein bekanntes Testobjekt gedreht werden kann.

[0080] Ebenfalls bietet die Erfindung die Möglichkeit, extrem kleine Drehmomente zu quantifizieren, wie sie z.B. bei der Bewegung der Geißel eines Bakteriums auftreten, in dem die bei einer aktiven Drehung des Partikels durch die Erfindung maximal erreichbare Winkelgeschwindigkeit verglichen wird mit dem Verhalten des Partikels in der stationären Falle.

[0081] Grundsätzlich kann ein asymmetrisches Intensitätsprofil durch Phasenmodulatoren beliebiger Art erzielt werden. Die erfindungsgemäße Vorrichtung kommt grundsätzlich ohne die Verwendung von optischen Linsen aus, kann aber auch mit optischen Linsen realisiert oder kombiniert sein.

[0082] Bei bevorzugten Ausgestaltungen der erfindungsgemäßen Vorrichtung weist die Strahlformungseinrichtung optische Komponenten mit einer zu einer optischen Achse asymmetrischen Transmissionscharakteristik auf. Der Begriff der asymmetrischen Transmissionscharakteristik soll hier in seiner breitesten Bedeutung verstanden werden, beispielsweise sollen hierunter auch Situationen verstanden werden, bei denen elektromagnetische Strahlung asymmetrisch in eine Lichtleitfaser eingekoppelt wird. Beispielsweise kann die asymmetrische Transmissionscharakteristik bereitgestellt werden durch einen Übergangsbereich, an dem zwei Lichtleitfaser mit einem radialen Versatz aneinander grenzen.

[0083] Grundsätzlich kann die Einkopplung des Lichts in eine zum Probenraum führende Faser auch auf andere Weise exzentrisch erfolgen. Beispielsweise führt beim Fokussieren eines zunächst parallelen Strahls mit Hilfe einer Sammellinse auf ein sauber geschnittenes Ende einer Glasfaser eine leichte radiale Versetzung des Fo-

kus ebenfalls zur Generierung höherer Moden.

[0084] Bei einer besonders einfach zu realisierenden Variante der erfindungsgemäßen Vorrichtung wird die asymmetrische Transmissionscharakteristik durch einen asymmetrischen Abschluss einer Lichtleitfaser bereitgestellt. Die Glasfaser kann aber auch durch ihren Aufbau ein asymmetrisches, mit der Orientierung der Faser korreliertes Strahlprofil zulassen. Beispielsweise kann die Glasfaser einen elliptischen Kern aufweisen. Das asymmetrische Strahlprofil lässt sich beispielsweise auch durch gezieltes Quetschen der Glasfaser erzeugen.

[0085] Eine Drehung des asymmetrischen Intensitätsprofils kann durch Drehung von Glasfasern bewerkstelligt werden.

[0086] Alternativ können auch astigmatische Linsen oder Spiegel, asymmetrische Blenden und/oder variable Aperturblenden eingesetzt werden, um die gewünschte asymmetrische Transmissionscharakteristik bereitzustellen.

[0087] Ein veränderbares asymmetrisches Intensitätsprofil der Laserstrahlung kann erzielt werden bei Varianten, bei denen die Strahlumformungseinrichtung elektronisch ansteuerbare Linsen oder einen spatial light modulator (SLM) aufweist. Grundsätzlich ist jedes Verfahren, bei dem sich mindestens eine unsymmetrische Lasermode mit einer symmetrischen Lasergrundmode überlagert, zur Generierung eines asymmetrischen Strahlenprofils geeignet.

[0088] Als optische Mittel zum Leiten der elektromagnetischen Strahlung in das Messvolumen können grundsätzlich Waveguides oder auch photonische Kristalle verwendet werden. Bei besonders bevorzugten Varianten der Erfindung umfassen die optischen Mittel zum Leiten der elektromagnetischen Strahlung in das Messvolumen Lichtleitfasern.

[0089] Das erfindungsgemäße Drehen des asymmetrischen Intensitätsprofils kann grundsätzlich in beliebiger Weise erfolgen. Bei einfach zu realisierenden Ausführungsbeispielen wird die Strahlumformungseinrichtung mit Hilfe der Dreheinrichtung mechanisch bezüglich des Messvolumens gedreht. Beispielsweise kann mit einer einfach aufgebauten Dreheinrichtung ein asymmetrischer Abschluss einer in das Messvolumen hineinreichenden Lichtleitfaser gedreht werden.

[0090] Hieraus ergibt sich bereits eine vorteilhafte Weiterbildung des erfindungsgemäßen Verfahrens, bei der eine Drehung der Probenteilchen durch eine hydrodynamische Kopplung an ein sich im Bereich des Messvolumens drehendes optisches Element, insbesondere das Ende einer Lichtleitfaser, mindestens unterstützt wird.

[0091] Entsprechend kann zum Drehen des Intensitätsprofils auch eine bereits asymmetrisch emittierende Strahlungsquelle gegenüber den optischen Mitteln zum Leiten der Strahlung in das Messvolumen mechanisch gedreht werden. Diese Variante kann gewählt werden, wenn die optischen Mittel zum Leiten der Strahlung in das Messvolumen selbst auf das Intensitätsprofil einen

vernachlässigbaren Einfluss haben. Man hat dann den Vorteil, dass ein Eingriff in das Messvolumen praktisch nicht notwendig ist, insbesondere keine sich drehenden Teile dort vorhanden sind.

[0092] Alternativ zum mechanischen Drehen einer anisotrop emittierenden Strahlungsquelle kann auch eine asymmetrisch emittierende Lichtquelle zum Drehen des asymmetrischen Intensitätsprofils gezielt moduliert angesteuert werden. Hierbei sind dann praktisch keine beweglichen Teile notwendig, so dass eine solche Anordnung insbesondere in mechanischer Hinsicht von Vorteil ist. Eine weitere Gruppe von Varianten der erfindungsgemäßen Vorrichtung und des erfindungsgemäßen Verfahrens ist ebenfalls dadurch gekennzeichnet, dass die Drehung des anisotropen Intensitätsprofils nicht auf mechanischem Weg erfolgt. Beispielsweise kann eine Drehung des asymmetrischen Intensitätsprofils durch eine Drehung der Polarisationsebene bewerkstelligt werden. Hierzu kann die Vorrichtung eine aktive Polarisationseinrichtung, insbesondere eine Faraday-Zelle aufweisen. Zusammen mit weiteren Komponenten, beispielsweise doppelbrechenden und/oder nichtlinearen optischen Bauteilen kann durch Drehung der Polarisationsebene auch eine Drehung eines nichtsymmetrischen Intensitätsprofils erreicht werden.

[0093] Umgekehrt wird, wenn beispielsweise die gesamte Lichtquelle gedreht wird und diese bereits polarisiertes Licht aussendet, auch die Polarisationsebene beim Drehen des Intensitätsprofils mitgedreht.

[0094] Hierfür können auch Lichtleitfasern mit nichtrotationssymmetrischem Profil zum Einsatz kommen.

[0095] Bei besonders vorteilhaften Varianten tritt die elektromagnetische Strahlung aus einem Ende einer Lichtleitfaser in das Messvolumen ein, wobei das Ende der Glasfaser entweder plan sein kann, in Form einer Blende ausgebildet sein kann oder eine definierte Asymmetrie aufweisen kann.

[0096] Die elektromagnetische Strahlung kann grundsätzlich aus beliebigen Quellen stammen, wobei zweckmäßigerweise Laser eingesetzt werden.

[0097] Grundsätzlich kann es sich hierbei um gepulste Laser handeln, was beispielsweise von Vorteil sein, wenn nichtlineare optische Komponenten eingesetzt werden. Bei einfachen Varianten werden kontinuierlich betriebene Strahlungsquellen verwendet.

[0098] Die zu manipulierenden Probenteilchen müssen zunächst in irgendeiner Weise in den Wirkungsbereich der elektromagnetischen Strahlung im Messvolumen transportiert werden.

[0099] Dies kann beispielsweise mit Hilfe der oben beschriebenen optischen Pinzetten sowie ergänzend oder alternativ mit Hilfe von dielektrophoretischen Kräften erfolgen.

[0100] Wenn räumlich möglich, werden die Probenteilchen mit Hilfe einer Kapillare an eine geeignete Position im Messvolumen eingeführt. Die Probe muss die Kapillare dabei nicht verlassen. Beispielsweise kann ein mikrofluidisches Transportsystem eingesetzt werden mit

einer Glaskapillare, die einen quadratischen Querschnitt aufweist und durch deren Wände die elektromagnetische Strahlung auf die Probenpartikel strahlt. Allgemein können die Partikel mit einem mikrofluidischen System in den Wirkungsbereich der Strahlung gebracht werden.

[0101] Besonders vorteilhaft ist die erfindungsgemäße Vorrichtung und ist das erfindungsgemäße Verfahren einsetzbar, wenn als Probenteilchen biologische Proben, insbesondere Zellen, Zellorganellen und/oder Gewebestückchen, untersucht werden. Hierbei sind die Probenteilchen bevorzugt in wässrigen Medien suspendiert.

[0102] Ein wesentlicher Vorteil der Erfindung im Vergleich zu Manipulationsmethoden, die im Stand der Technik bekannt sind, besteht darin, dass man weitestgehende Freiheit hat, die Probenteilchen kontinuierlich mit hoher Winkelgeschwindigkeit oder sehr langsam oder in definierten Schritten, insbesondere sprunghaft, zu drehen.

[0103] Eine besonders vorteilhafte Anwendung ergibt sich im Zusammenspiel mit der Mikroskopie, bei der sich die Auflösung in Lateralrichtung von derjenigen in Axialrichtung unterscheidet. Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Vorrichtung und des erfindungsgemäßen Verfahrens können Probenteilchen zum Mikroskopieren gezielt gedreht werden, um eine bestimmte, insbesondere isotrope Auflösung zu erreichen. Dies ist möglich, da die Strahlachse der erfindungsgemäßen Vorrichtung völlig unabhängig gewählt werden kann von der optischen Achse eines Lichtmikroskops. Die Probe kann beispielsweise zum Zweck der Computer-Tomographie in Schritten gedreht und abgebildet werden. Die isotrope Auflösung ergibt sich dabei durch das Verrechnen mehrerer Bilder der Probe unter variierenden Winkeln mit Hilfe eines Computers.

[0104] Darüber hinaus ergeben sich noch weitere vorteilhafte Anwendungen im Bereich der Mikroskopie.

[0105] Beispielsweise können Probenteilchen zum Mikroskopieren mit unterschiedlichen kontrastgebenden Prinzipien, insbesondere Phasenkontrast, Fluoreszenzmikroskopie, Ultraschallmikroskopie, konfokale Mikroskopie, CARS und/oder für lichtmikroskopische Manipulationen, beispielsweise FRAP, un-Caging positioniert und ausgerichtet werden. Auch eine Kombination des erfindungsgemäßen Verfahrens mit Methoden der Zellmikroinjektion und eine Langzeitbeobachtung von Zellbällchen und Zellen ist möglich.

[0106] Besonders vorteilhafte Anwendungen ergeben sich auch im Bereich der Laser-Scanning-Mikroskopie und der tomographischen Methoden.

[0107] Bei weiteren Anwendungen des erfindungsgemäßen Verfahrens, die grundsätzlich unabhängig von einer möglichen Beobachtung des Messvolumens mit Hilfe eines Mikroskops sind, macht man sich die Möglichkeit zunutze, die Probenpartikel prinzipiell mit einer wählbaren Geschwindigkeit in dem umgebenden Medium zu drehen. Grundsätzlich kann die Drehung der Partikel auch beliebig langsam, im Grenzfall kleiner Winkelgeschwindigkeiten im stabilen Gleichgewicht bezüglich La-

ge und/oder Orientierung erfolgen.

[0108] Mit Hilfe geeignet durchzuführender Kalibrierungen können mit dem erfindungsgemäßen Verfahren Kräfte und Drehmomente, die auf die im anisotropen Strahlungsfeld positionierten Teilchen wirken, gemessen werden. Entsprechend sind auch Elastizitätsmessungen möglich.

[0109] Der Durchtritt der Photonen durch die Probenteilchen führt, wenn diese einen von der Umgebung abweichenden Brechungsindex aufweisen, zu einem Impulsübertrag, mithin zu einer Kraft auf das Probenteilchen. Diese Kraft kann beispielsweise bei geeigneter Positionierung der Strahlungsquelle durch die Schwerkraft ausgeglichen werden.

[0110] Bei besonders bevorzugten Varianten ist zum Ausgleich von Kräften, die durch Impuls-übertragung von Photonen der elektromagnetischen Strahlung auf die Probenteilchen ausgeübt werden, mindestens eine weitere Strahlungsquelle vorhanden. Solche weiteren Strahlungsquellen können auch dazu genutzt werden, an den ausgerichteten Probenteilchen Elastizitätsmessungen durchzuführen.

[0111] Die Drehung von einem oder mehreren Probenpartikeln kann aber auch dazu genutzt werden, ein umgebendes Probenmedium in Rotation zu versetzen.

[0112] Auch zur Bearbeitung und zur gezielten externen Manipulation, beispielsweise zur Ausrichtung eines Probenteilchens für die Exposition gegenüber einem Mikrowerkzeug, wie einem optischen Skalpell, einer Mikropipette oder einer patch clamp, kann das erfindungsgemäße Verfahren eingesetzt werden.

[0113] Schließlich kann aus einer maximal möglichen Winkelgeschwindigkeit eines Probenteilchens auch eine Viskosität des umgebenden Mediums, beispielsweise als des wässrigen Mediums, in dem sich das Teilchen bewegt, bestimmt werden. Eine gemessene maximale Winkelgeschwindigkeit bei gegebener Viskosität, beispielsweise von Wasser, kann auch etwas über die Probe, insbesondere die Probenform aussagen. Beispielsweise können Anhaltspunkte gewonnen werden, ob sich ein Zellkern gerade teilt.

[0114] Weitere Vorteile und Merkmale der Erfindung werden mit Bezug auf die beigefügten Figuren beschrieben. Hierin zeigt:

Fig. 1 ein erstes Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen Vorrichtung; und

Fig. 2 ein zweites Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen Vorrichtung.

Ausführungsbeispiel 1

[0115] Als erstes Ausführungsbeispiel wird im Folgenden eine im Sinn der Erfindung modifizierte glasfaserbasierte Zweistrahllaserfalle beschrieben.

[0116] Der Aufbau, schematisch dargestellt in Fig. 1, besteht aus einem Keramikkörper 1, der die Ausrichtung

von laserstrahlführenden Glasfasern 6 und 7 durch eine passgenaue Führung durch Bohrungen gewährleistet, zwei Gleitlagern, bestehend aus den Keramikhülsen 3 und 13 und den geführten Keramikzylindern 2 und 11, die eine verdrillungsfreie Rotation der von rechts in den Probenraum 10 geführte Glasfaser 6 ermöglichen. Die gesamte Anordnung ist montiert auf einem handelsüblichen Lichtmikroskop mit einem angedeuteten Objektiv 16, so dass sich Proben in der Laserfalle 10 durch den Objekträger 15 beobachten lassen.

[0117] Während es sich bei der linken Glasfaser 7 um eine sogenannte "single mode" Faser, d.h. eine Glasfaser, die das durch sie geführte Laserlicht mit einem gaußschen rotationssymmetrischen Intensitätsprofil abstrahlt, handelt, besitzt der von der rechten Glasfaser 6 emittierte Laserstrahl diese Symmetrie nicht. Grund hierfür ist der leicht versetzte Übergang 8 von einer "single mode" Faser 5 zu einer Glasfaser 6, die bei der Wellenlänge des eingesetzten Lasers, aufgrund des relativ zur "single mode" Faser 5 größeren Faserkerns, in höheren Schwingungsmoden angeregt und daher auch als "multi mode" Faser bezeichnet wird. Der im Bereich des Glasfaserübergangs 8 an die Glasfaser 6 gekoppelte Fortsatz der "single mode" Faser 5 ist mit dem Bezugzeichen 9 versehen. Diese Glasfaser 9 ist eine Verlängerung der Glasfaser 5, ist von der Glasfaser 5 jedoch mechanisch beim Übergangspunkt 14 mechanisch entkoppelt. Es handelt sich bei der Glasfaser 9 um die gleiche "single mode" Faser wie bei Glasfaser 5. Das so erzeugte Laserprofil, innerhalb des von rechts in den Probenraum 10 geführten Glasfaserstücks 6, wird zwar immer noch dominiert durch den fundamentalen, d.h. gaußförmigen, Lasermode, besitzt jedoch durch die Überlagerung höherer Moden, die im Allgemeinen nur diskrete Symmetrien aufweisen, keine Rotationssymmetrie mehr. Die Strahlformeinrichtung wird hier also durch den Übergang 8 zwischen der Faser 5 zur Faser 6 bereitgestellt. Die Drehung dieses Intensitätsprofils erfolgt über die verdrillungsfreie Drehung der letzten Zentimeter der rechten Glasfaser 6 vor dem Probenraum 10, beginnend bei Übergangspunkt 14 samt den Keramikzylindern 2 und 11, in deren zentrische Bohrungen die Glasfaser 6 eingeklebt ist, sowie der Schutzzummantelung 4 des Glasfaserübergangs 8, welche gleichzeitig als mechanisch starre Kopplung des Keramikzylinders 2 an den Keramikzylinder 11 dient. Im Bereich des Übergangspunktes 14 berühren sich, ausgerichtet durch ein im wesentlichen aus zwei Keramikzylindern 11 und 12 sowie einer Keramikführung 13 bestehenden Gleitlager, zwei plan geschnittene, polierte Glasfaserenden, so dass einerseits die Drehung der beiden Fasern relativ zueinander ermöglicht wird, andererseits das von der Glasfaser 5 emittierte Laserlicht praktisch verlustfrei in Glasfaser 9 überkoppeln kann. Die Drehung des die Quelle der Asymmetrie des Laserprofils beinhaltenden, von rechts in den Probenraum geführten Glasfaserstücks 6 kann manuell sowie unter Verwendung eines motorisierten Antriebs erfolgen. Die Bauteile 2, 4, 6, 8, 9 und 11 bilden eine starre

Einheit, die in Bezug auf den Rest des Systems drehbar ist.

[0118] Bei den verwendeten Glasfasern handelt es sich um handelsübliche Stufenindexfasern, d.h. Glasfasern, deren Brechungsindex im Bereich des Übergangs vom Faserkern zum diesen Kern umgebenden Fasermantel, engl: fibre cladding, sprunghaft variiert. Die numerische Apertur der Fasern (NA) liegt bei etwa 0,14. Ferner ist die "multi mode" Glasfaser durch zusätzliche Strukturelemente um den Bereich des Faserkerns polarisationserhaltend und ermöglicht so eine besonders stabile Transport des Laserprofils, welches im Bereich des versetzten Splice oder Glasfaserübergangs 8 seine Form erhält. Sowohl "multi mode" Faser als auch "single mode" Fasern haben nach der Entfernung des sie zunächst umgebenden Acrylschutzmantels einen Außen-durchmesser von 125 µm und lassen sich somit durch die Bohrungen der verwendeten Keramiken, die einen Durchmesser von 126 µm aufweisen, optimal führen und ausrichten. Des Weiteren ist der Kerndurchmesser der "multi mode" Faser 6 so gewählt, dass die Ausbreitung nur weniger Schwingungsmoden in der Faser möglich ist. Der in Bezug auf die Wellenausbreitung in der Glasfaser charakteristische so genannte "V Parameter" nimmt für die "multi mode" Faser bei der verwendeten Wellenlänge von 1060 nm, einen Wert zwischen 2.405, Übergang zum "single mode" Bereich, und etwa 4 an. Gespeist werden die Glasfasern von Faserlasermodulen, die je nach zu manipulierender Probe mit einer Ausgangsleistung zwischen einigen Milliwatt und mehreren Watt betrieben werden. Die Dämpfung der Laserstrahlintensität in der Glasfaser ist hierbei aufgrund der geringen Faserlängen zu vernachlässigen. Verluste im Bereich des Glasfaserübergangs 8 können sich hingegen auf 5-10% belaufen.

[0119] Die Funktionsweise dieser Anordnung ist folgende: Die für optische Zweistrahlfallen typischen Gradienten- und Streukräfte greifen an Partikeln, die in den Bereich der von den Glasfasern emittierten Laserstrahlen gelangen, an und zentrieren diese in der Falle. Die Drehung des von Glasfaserstück 6 emittierten asymmetrischen Laserprofils gekoppelt an die Drehung der Faser selbst bewirkt die Drehung des Partikels in der Falle parallel zur optischen Achse der Glasfasern. Die Drehung des Partikels ist damit direkt korreliert mit der Drehung der Glasfaser und lediglich im Fall hochviskoser Medien als leicht verzögert zu betrachten.

Ausführungsbeispiel 2

[0120] Im Folgenden wird eine der Erfindung entsprechende, glasfaserbasierte Einzelstrahlfalle beschrieben, die in Fig. 2 schematisch dargestellt ist. Der Aufbau des Systems ist dem in Ausführungsbeispiel 1 ähnlich. Die wesentlichen Unterschiede bestehen im Einsatz lediglich eines Laserstrahls sowie in der Erzeugung seines Profils.

[0121] Der Aufbau besteht aus einem von einer Keramikführung 21 ausgerichteten "single mode" Glasfaser-

stück 28, dessen verdrillungsfreie Drehung durch zwei Gleitlager, bestehend aus den Keramikhülsen 22 und 24, die mit der Keramikführung 21 bzw. dem Keramikzylinder 25 verklebt sind, sowie dem Keramikzylinder 23, der zusammen mit Glasfaserstück 28 eine starre, in Bezug auf den Rest der Anordnung drehbare Einheit bildet. Die mechanische Entkopplung des Glasfaserstücks 28 von der "single mode" Glasfaser 26 wird durch den Übergangsbereich 27 gewährleistet, in welchem sich die planpolierten Enden der Glasfasern 26 und 28 berühren.

[0122] Der verwendete Laserstrahl wird von Glasfaser 28 nicht wie im Anordnungsbeispiel 1 divergent, sondern durch die Miniaturlinse 32 (Abrundung des Glasfaserendes) fokussierend emittiert und besitzt darüber hinaus einen leichten Astigmatismus. Mit dem Begriff Miniaturlinse 32 ist hier eine Abrundung eines Endes der Glasfaser 28 gemeint, welche beim Übergangsbereich 27 beginnt und bis in den Probenraum führt.

[0123] Die Präparation des Glasfaserendes erfolgt folgendermaßen: Zunächst wird der Kern der Glasfaser 28 im Bereich des Endes mit Flusssäure, die das Mantelglas zersetzt, freigelegt. Das so entstandene, verjüngte Endstück der Glasfaser 28 wird nun in einen so genannten "arc fusion splicer" (einem Gerät, welches normalerweise dazu eingesetzt wird, um Glasfasern zu verbinden) einem zwischen zwei Nadelspitzen entstehenden Lichtbogen für etwa 0,2 Sekunden ausgesetzt. Dabei rundet sich das Faserende aufgrund der Oberflächenspannung des Glases ab und formt somit nach dem Abkühlen die Miniaturlinse 32. Diese Linse 32 weist wegen der Vorzugsrichtung des Lichtbogens einen leichten Astigmatismus auf, der dazu führt, dass der von der Glasfaser 28 abgestrahlte Laserstrahl ein elliptisches Profil besitzt.

[0124] Im Fokus 29 der so modifizierten Glasfaser 28 ist es möglich, mikroskopische Partikel zu fangen und zu orientieren. Eine Drehung gefangener Partikel erfolgt wiederum über die Drehung des an die Glasfaser 28 gekoppelten Laserprofils.

[0125] Üblicherweise wird die Anordnung über die Keramikführung 21 so an einem Objektträger 31 fixiert, dass im Fokus des Laserstrahls 29 gefangene Partikel mittels eines Lichtmikroskops, dessen Objektiv 30 in der Abbildung angedeutet ist, betrachtet werden können.

[0126] Andere Ausführungsformen sind möglich, z.B. solche, bei den Laserstrahlen von Laserdioden in unmittelbarer Nähe zum Probenraum erzeugt und über geeignete Optiken präpariert werden.

Verfahrensbeispiel 1 - Verfahren zur Langzeituntersuchung von Zebrafischembryonen

[0127] Zebrafischembryonen stellen für die Entwicklungsbiologie und Genetik ein interessantes Forschungsgebiet dar, da diese einfach zu handhaben sind und ihre Entwicklung, aufgrund ihrer Transparenz, bis zu einem hohen Stadium lichtmikroskopisch verfolgt werden kann.

[0128] Da die Ausdehnung dieser Embryonen die

Schärfentiefe konventioneller Mikroskope jedoch übersteigt, bedarf es anderer Verfahren, um räumlich hochauflösende Bilder der Proben zu erhalten. Verbreitet sind hier die konfokale Mikroskopie, welche mittels eines Laserstrahls die Probe in Schichten scannt, um diese nachträglich zu einem dreidimensionalen Modell zusammenzufügen, sowie der Einsatz von Dekonvolutionstechniken, bei denen aus einem Stapel lichtmikroskopischer Einzelbilder aus parallelen Fokusebenen ein dreidimensionales Bild errechnet werden kann. Nachteil dieser Verfahren ist, dass es mitunter mehrere Minuten dauert, bis ein Bildstapel aufgenommen ist und von einem Computer dargestellt werden kann. Ein "on-line screening" der Embryoentwicklung ist damit nicht möglich.

[0129] Das im Folgenden angeführte Verfahrensbeispiel beschreibt, wie die in Anordnungsbeispiel 1 beschriebene Anordnung dazu verwendet werden kann, um mit einem konventionellen Lichtmikroskop die dreidimensionale Entwicklung eines Zebrafischembryos zu untersuchen:

Das Verfahren besteht aus den Schritten:

Präparation der Zweistahlfalle: Fixierung der die Glasfasern führenden Keramik auf dem Objektträger eines Mikroskops, Adaption des Abstands der Glasfaserenden auf ca. 2mm, Speisung der Glasfasern durch Faserlaser (Ausgangsleistung etwa 2W pro Faser, Wellenlänge 1064nm)

Entnahme eines oder mehrerer Embryonen aus der Kultur

Gegebenenfalls weitere Vorbehandlung, wie Exposition von Zellgiften, Medikamenten oder anderen Einflüssen gemäß dem Zweck der Untersuchung

Großzügige Benetzung der Glasfaserenden mit dem den Anforderungen des Experiments entsprechenden Medium

Zugabe eines oder mehrerer Embryonen mit einer weiten Pipette

Einfangen eines Embryos in der Falle: In den wenigsten Fällen befindet sich ein Embryo sofort in der Falle. Meistens ist es notwendig, ihn mittels von Mikropipetten ausgehendem Fluss in die Falle zu spülen. Alternativ kann dieser Fluss von einer Sonde verursacht sein, die durch das Medium bewegt wird, den Embryo jedoch nicht berührt.

[0130] Ist der Embryo eingefangen, lässt er sich durch die Rotation des asymmetrischen Profils eines der verwendeten Laserstrahlen kontinuierlich wie in Schritten

um die optische Achse der Falle drehen. Dies ermöglicht durch die Abbildung beliebiger Schnitte parallel zur Drehachse durch die Probe, die Entwicklung des Embryos in drei Dimensionen zu verfolgen. Die Drehung des Strahlprofils erfolgt manuell oder motorisiert mit einer Auflösung von weniger als einem Grad. Die Nutzung von Fluoreszenz- oder anderer Mikroskopietechniken ist optional und möglich.

[0131] Bei langandauernden Untersuchungen (länger als 30 Minuten) kann es sinnvoll sein, das verwendete Medium kontinuierlich unter Verwendung eines mit einer Spritzenpumpe betriebenen mikrofluidischen Systems auszuwechseln oder destilliertes Wasser zuzuführen um einer verdunstungsbedingten Erhöhung der Konzentration der im Medium gelösten Stoffe entgegenzuwirken.

Verfahrensbeispiel 2

[0132] Drehen suspendierter, vereinzelter, biologischer Zellen zum Zweck der Computertomographie unter Verwendung eines in Anordnungsbeispiel 1 integrierten mikrofluidischen Systems zusammen mit einem Phasenkontrastmikroskop.

Das Verfahren besteht aus folgenden Schritten:

[0133] In die in Ausführungsbeispiel 1 beschriebene Anordnung wird ein mikrofluidisches System integriert. Dieses besteht im Wesentlichen aus einer Glaskapillare quadratischen Querschnitts, durch welche die Zellen in den Wirkungsbereich der optischen Falle transportiert werden. Die Regulation des Flusses durch diese Kapillare erfolgt durch eine elektrische Spritzenpumpe.

[0134] Die Präparation der optischen Zweistrahlfalle orientiert sich an den Parametern:

Abstand der Faserenden ca. 250µm

Laserleistung etwa 100 mW je Glasfaser (nicht gepulst)

Wellenlänge der verwendeten Laser im nahen Infrarot (z.B. 1064nm)

[0135] Die gewünschten Zellen werden der Kultur oder einem Organismus entnommen und geeignet präpariert. Adhäsente Zellen werden von ihrem Substrat abgelöst und ggf. unter Zugabe von Enzymen (z.B. Trypsin) und Chemikalien in einem Zellmedium suspendiert.

[0136] Mögliche Verunreinigungen sowie andere Zelltypen werden durch Verfahren wie z.B. der Dichtegradienzentrifugation oder Durchfluszytometrie aus der Probe entfernt.

[0137] Die Zellen werden in ihrem Medium auf eine Konzentration von 10.000 Zellen/ml verdünnt bzw. durch Zentrifugation angereichert.

[0138] Die Zellen werden in ihrem Medium mittels einer Spritze in das mikrofluidische Transportsystem inji-

ziert.

[0139] Die Zellen werden unter Verwendung einer Spritzenpumpe durch das mikrofluidische System in den Wirkungsbereich der Laserfalle transportiert.

[0140] Befindet sich eine Zelle in der Falle, wird der Fluss angehalten.

[0141] Die Zelle wird nun als Folge der Rotation des asymmetrischen Profils eines der verwendeten Laserstrahlen in Schritten von 5° um 360° gedreht und in jeder Orientierung von einer an das zur Beobachtung eingesetzte Phasenkontrastmikroskop angeschlossen Kamera fotografiert.

[0142] Die Bilder werden sofort oder nach Abschluss der Aufnahmeserie von einem Computer eingelesen und digitalisiert..

[0143] Softwarebasiert wird aus den Einzelbildern ein dreidimensionales Modell der Zelle errechnet.

Bezugszeichenliste

- [0144]**
- | | | |
|----|----|--|
| 20 | 1 | keramische Glasfaserführung mit zylindrischem Fortsatz |
| 25 | 2 | Keramikzylinder |
| 30 | 3 | Keramikhülse verklebt mit (1) als Führung für (2) |
| 35 | 4 | Schutz des Übergangsstücks (8), sowie mechanisch starre Kopplung von (2) an (11) |
| 40 | 5 | "single mode" Glasfaser gespeist von Faserlasermodul |
| 45 | 6 | "multi mode" Glasfaser |
| 50 | 7 | "single mode" Glasfaser gespeist von Faserlasermodul |
| 55 | 8 | etwa 2µm versetzter Übergang von Glasfaser (5) zu Glasfaser (6) |
| 60 | 9 | "single mode" Glasfaser |
| 65 | 10 | eigentliche Laserfalle, Probenraum |
| 70 | 11 | Keramikzylinder verklebt mit (9) und (4) |
| 75 | 12 | Keramikzylinder |
| 80 | 13 | Keramikhülse oder -führung verklebt mit (12) |
| 85 | 14 | drehbarer Übergang von (9) zu (5) |
| 90 | 15 | Objektträger (dünne Glasplatte) |
| 95 | 16 | Objekt (als Bestandteil eines Mikroskops, optional) |

Erläuterung: Die Bauteile 2, 4, 6, 8, 9 und 11 bilden eine starre Einheit, die in Bezug auf den Rest des Systems drehbar ist

- 21 Keramische Glasfaserführung mit zylindrischem Fortsatz 5
- 22 Keramikhülse verklebt mit (21) als Führung für (23)
- 23 Keramikzylinder, drehbar, darin eingeklebt Glasfaser: (28); mechanisch starre Kopplung von (22) an (31) 10
- 24 Keramikhülse verklebt mit (25) als Führung für (23) 15
- 25 Keramikzylinder, darin eingeklebt: Glasfaser (26)
- 26 "single mode" Glasfaser gespeist von Faserlasermodul
- 27 drehbarer Übergang von (26) zu (28) 20
- 28 "single mode" Glasfaser mit asymmetrisch abgerundetem Ende, eingeklebt in (23)
- 29 aus der Glasfaser austretender, fokussierter Laserstrahl mit leichtem Astigmatismus (eigentliche Laserfalle, Probenraum) 25
- 30 Objektiv eines Lichtmikroskops (optional)
- 31 Objektträger (dünne Glasplatte)

Erläuterung: Die Bauteile (23) und (28) bilden eine starre, in Bezug auf den Rest des Systems drehbare Einheit

- 32 Miniaturlinse am Ende der Glasfaser (28)

Patentansprüche

- Vorrichtung zum berührungslosen Manipulieren und Ausrichten von Probenteilchen in einem Messvolumen mit Hilfe eines inhomogenen elektrischen Wechselfelds, insbesondere zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 14 bis 33, mit einer Strahlungsquelle zum Aussenden von elektromagnetischer Strahlung und mit optischen Mitteln (6, 5; 26, 28) zum Leiten der elektromagnetischen Strahlung in das Messvolumen (10; 29), **dadurch gekennzeichnet**, dass als Teil der optischen Mittel (6, 5; 26, 28) eine Strahlformungseinrichtung (8; 28) zum Erzeugen eines zu einer Strahlachse asymmetrischen Intensitätsprofils vorhanden ist, wobei Probenteilchen im Messvolumen (10; 29) in einer durch das asymme-

trische Intensitätsprofil erzeugten inhomogenen Feldverteilung des elektrischen Felds einfangbar sind, und

dass zum Mitführen von in der inhomogenen Feldverteilung eingefangenem Probenteilchen eine Dreheinrichtung (2, 4, 11; 23, 28) zum Drehen des asymmetrischen Intensitätsprofils um die Strahlachse relativ zum Messvolumen (10; 29) vorhanden ist.

- Vorrichtung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, **dass** die Strahlformungseinrichtung (8; 28) optische Komponenten mit einer zu einer optischen Achse asymmetrischen Transmissionscharakteristik aufweist.
- Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, **dass** die optischen Mittel zum Leiten der elektromagnetischen Strahlung in das Messvolumen (10; 29) Lichtleitfasern (6, 5; 26, 28) umfassen.
- Vorrichtung nach einem der Ansprüche 2 oder 3, **dadurch gekennzeichnet**, **dass** die asymmetrische Transmissionscharakteristik bereitgestellt wird durch einen Übergangsbereich (14), an dem zwei Lichtleitfasern (5, 9) mit einem radialen Versatz aneinander grenzen.
- Vorrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, **dass** die asymmetrische Transmissionscharakteristik durch einen asymmetrischen Abschluss einer Lichtleitfaser (28) bereitgestellt wird.
- Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, **dass** die Strahlformungseinrichtung mindestens eine Lichtleitfaser mit nichtrotationssymmetrischem Profil aufweist.
- Vorrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, **dass** die asymmetrische Transmissionscharakteristik durch astigmatische Linsen oder Spiegel bereitgestellt wird.
- Vorrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, **dass** die asymmetrische Transmissionscharakteristik durch eine asymmetrische Blende und/oder durch variable Aperturblenden bereitgestellt wird.
- Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, **dass** die Strahlformungseinrichtung elektronisch ansteuerbare Linsen oder einem spatial light modulator (SLM) aufweist.

10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 9,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Strahlformungseinrichtung (8; 28) mit Hilfe
 der Dreheinrichtung (2, 4, 11; 23) bezüglich des
 Messvolumens (29) drehbar ist.
 5
11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 10,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Dreheinrichtung eine aktive Polarisations-
 einrichtung, insbesondere eine Faraday-Zelle, auf-
 weist.
 10
12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
dass die elektromagnetische Strahlung aus einem
 Ende einer Lichtleitfaser (6; 28) in das Messvolumen
 (10; 29) eintritt.
 15
13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 12,
dadurch gekennzeichnet,
dass zum Ausgleich von Kräften, die durch Impuls-
 übertrag von Photonen der elektromagnetischen
 Strahlung auf die Probenteilchen ausgeübt werden,
 mindestens eine weitere Strahlungsquelle vorhan-
 den ist.
 20
14. Verfahren zum berührungslosen Manipulieren und
 Ausrichten von Probenteilchen in einem Messvolu-
 men mit Hilfe eines inhomogenen elektrischen
 Felds, insbesondere unter Einsatz der Vorrichtung
 nach einem der Ansprüche 1 bis 13, bei dem elektro-
 magnetische Strahlung in ein Messvolumen (10;
 29) einer Probe geleitet wird und
 bei dem Probenteilchen im Messvolumen (10; 29)
 sich in einem inhomogenen elektrischen Feld der
 eingeleiteten elektromagnetischen Strahlung aus-
 richten,
dadurch gekennzeichnet,
dass der in das Messvolumen (10; 29) eingeleiteten
 elektromagnetischen Strahlung ein zu einer Strahl-
 achse asymmetrisches Intensitätsprofil aufgeprägt
 wird, welches im Messvolumen (10; 29) eine inho-
 mogene Feldverteilung des elektrischen Felds er-
 zeugt, in welcher Probenteilchen eingefangen wer-
 den und
dass zum Mitführen von in der inhomogenen Feld-
 verteilung gefangenen Probenteilchen das asym-
 metrische Intensitätsprofil um die Strahlachse relativ
 zum Messvolumen (10; 29) gedreht wird.
 35
15. Verfahren nach Anspruch 14,
dadurch gekennzeichnet,
dass als elektromagnetische Strahlung Laserlicht
 verwendet wird.
 40
16. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Strahlungsquelle kontinuierlich betrieben
 wird.
 45
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 16,
dadurch gekennzeichnet,
dass zum Drehen des Intensitätsprofils eine asym-
 metrisch emittierende Strahlungsquelle gegenüber
 den optischen Mitteln zum Leiten der Strahlung in
 das Messvolumen gedreht wird.
 50
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 17,
dadurch gekennzeichnet,
dass eine Drehung des asymmetrischen Intensitäts-
 profils durch eine Drehung der Polarisationsebene
 bewerkstelligt wird.
 55
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 18,
dadurch gekennzeichnet,
dass zum Drehen eines asymmetrischen Intensi-
 tätspfils eine asymmetrisch emittierende Licht-
 quelle gezielt moduliert angesteuert wird.
 60
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 19,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Probenteilchen mit Hilfe von optischen Pin-
 zetten in den Wirkungsbereich der elektromagneti-
 schen Strahlung im Messvolumen transportiert wer-
 den.
 65
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 20,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Probenteilchen mit Hilfe von dielektropho-
 retischen Kräften in den Wirkungsbereich der elektro-
 magnetischen Strahlung im Messvolumen trans-
 portiert werden.
 70
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 21,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Probenteilchen mit Hilfe einer Kapillare in
 das Messvolumen eingeführt werden.
 75
23. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 22,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Probenteilchen kontinuierlich oder in defi-
 nierten Schritten, insbesondere sprunghaft, gedreht
 werden.
 80
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 23,
dadurch gekennzeichnet,
dass als Probenteilchen biologische Proben, insbe-
 sondere Zellen, Zellorganen oder Gewebestück-
 chen, zu Untersuchungszwecken eingefangen und
 gedreht oder ausgerichtet werden.
 85
25. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 24,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Probenteilchen in wässrigen Medien sus-
 pendiert sind.
 90

26. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 25,
dadurch gekennzeichnet,
dass Probenteilchen zum Mikroskopieren gezielt gedreht werden, um eine bestimmte, insbesondere isotrope, Auflösung zu erreichen. 5
27. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 26,
dadurch gekennzeichnet,
dass ein Probenteilchen zur Bearbeitung und/oder zur gezielten externen Manipulation, insbesondere zur Exposition gegenüber einem Mikrowerkzeug, wie einem optischen Skalpell, einer Mikropipette oder einer patch clamp, gezielt manipuliert und ausgerichtet wird. 10
28. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 27,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Probenteilchen zum Mikroskopieren mit unterschiedlichen kontrastgebenden Prinzipien, insbesondere Phasenkontrast, Fluoreszenzmikroskopie, Ultraschallmikroskopie, konfokale Mikroskopie, CARS und/oder für lichtmikroskopische Manipulationen, insbesondere FRAP, un-Caging, gezielt positioniert und ausgerichtet werden. 15
29. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 28,
dadurch gekennzeichnet,
dass ein oder mehrere Partikel gedreht werden, um das umgebende Probenmedium in Rotation zu versetzen. 20
30. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 29,
dadurch gekennzeichnet,
dass auf ein im anisotropen Strahlungsfeld positioniertes Probenteilchen wirkende Kräfte und Drehmomente gemessen werden. 25
31. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 30,
dadurch gekennzeichnet,
dass eine Drehung der Probenteilchen durch eine hydrodynamische Kopplung an ein sich im Bereich des Messvolumens (10; 29) drehendes optisches Element, insbesondere das Ende einer Lichtleitfaser, mindestens unterstützt wird. 30
32. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 31,
dadurch gekennzeichnet,
dass an ausgerichteten Probenteilchen Elastizitätsmessungen durchgeführt werden. 35
33. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 32,
dadurch gekennzeichnet,
dass aus einer maximal möglichen Winkelgeschwindigkeit eines Partikels eine Viskosität des das Partikel umgebenden Mediums bestimmt wird. 40
34. Laser-Scanning-Mikroskop, insbesondere konfokales Laser-Scanning-Mikroskop, insbesondere zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 35, welches eine Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 13 aufweist, insbesondere mit einer solchen Vorrichtung gekoppelt ist. 45
35. Verfahren zum Betrieb eines Laser-Scanning-Mikroskop, insbesondere eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops, insbesondere nach Anspruch 34, bei dem zu untersuchende Probenteilchen in einem Messvolumen unter Einsatz des Verfahrens nach einem der Ansprüche 14 bis 33 gezielt berührungslos manipuliert und ausgerichtet werden und bei dem die zu untersuchenden Probenteilchen in dem Messvolumen mit dem Laser-Scanning-Mikroskop untersucht werden. 50
36. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 36, 55

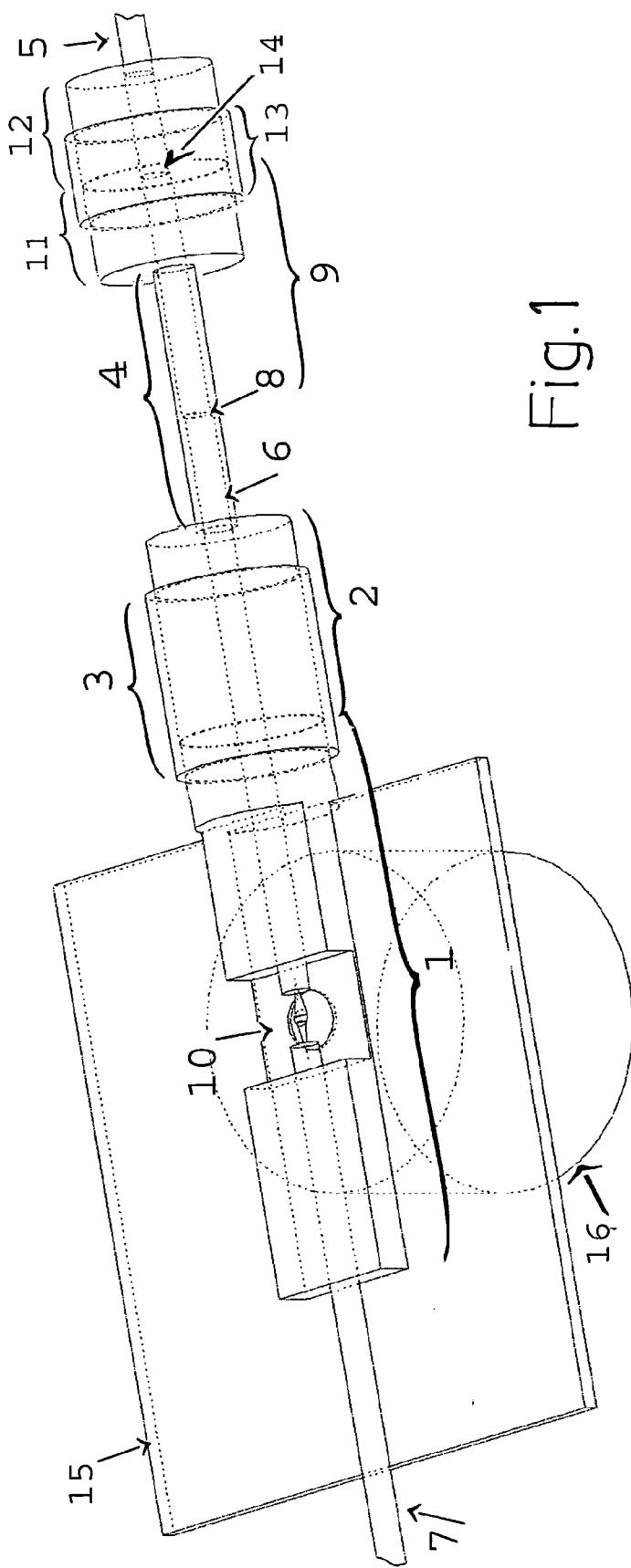


Fig. 1

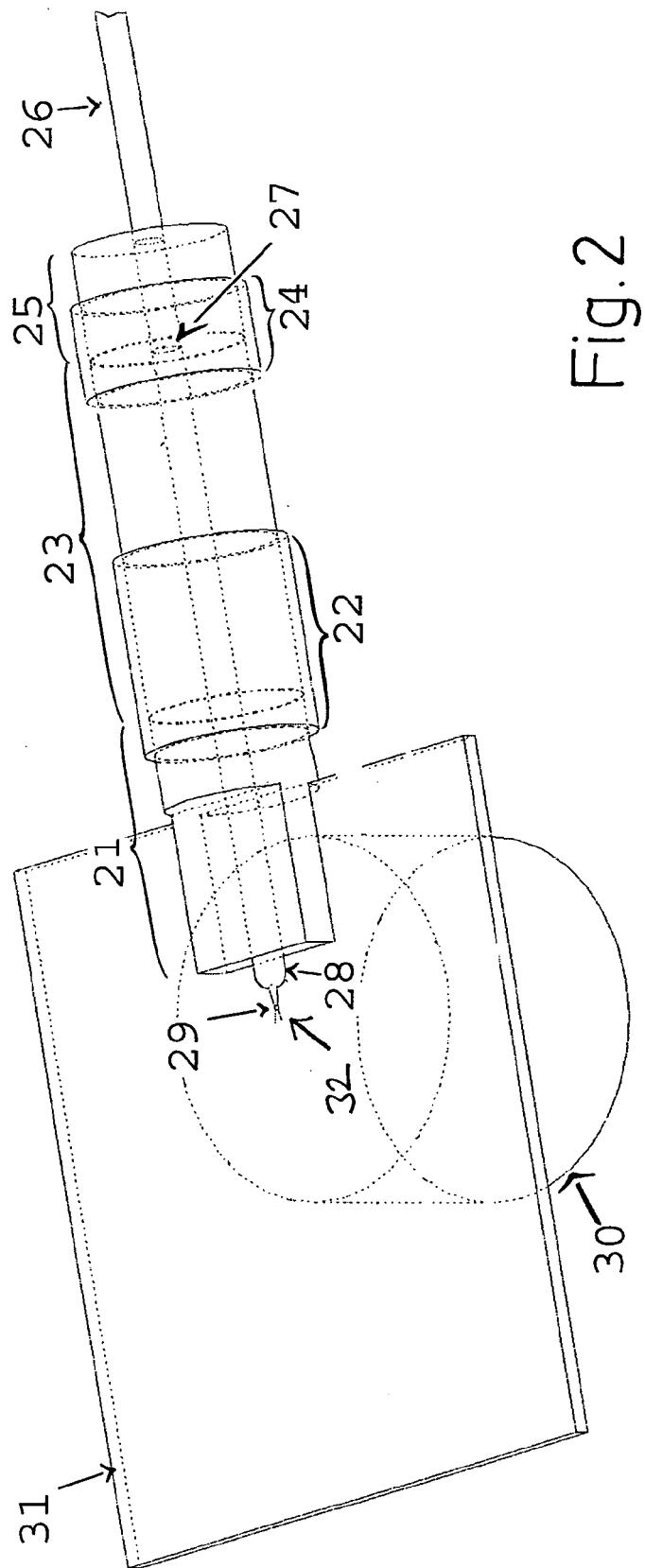


Fig. 2



EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (IPC)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betreff Anspruch	
X	US 2004/011650 A1 (ZENHAUSERN FREDERIC [US] ET AL) 22. Januar 2004 (2004-01-22) * Ansprüche 1,8 *	1-35	INV. B03C5/00 B03C5/02
X	US 2006/196772 A1 (KIM SOOK-YOUNG [KR] ET AL) 7. September 2006 (2006-09-07) * Absatz [0009] *	1,14	
X	WO 2004/098777 A (EVOTEC TECHNOLOGIES GMBH [DE]; SCHNELLE THOMAS [DE]; MUELLER TORSTEN [DE]) 18. November 2004 (2004-11-18) * Abbildung 7 *	1,14	
D,A	WO 02/43870 A (EVOTEC AG [DE]; MUELLER TORSTEN [DE]; SCHNELLE THOMAS [DE]; FUHR GUENT) 6. Juni 2002 (2002-06-06) * Zusammenfassung *	1-35	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (IPC)
			B03C
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
1	Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer
	Den Haag	23. Mai 2007	Demol, Stefan
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur			

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 06 02 6759

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patendokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

23-05-2007

Im Recherchenbericht angeführtes Patendokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 2004011650	A1	22-01-2004	AU CA EP WO	2003268016 A1 2493560 A1 1540321 A2 2004009787 A2		09-02-2004 29-01-2004 15-06-2005 29-01-2004
US 2006196772	A1	07-09-2006	KR	20060091021 A		17-08-2006
WO 2004098777	A	18-11-2004	DE EP US	10320869 A1 1624967 A2 2007020767 A1		16-12-2004 15-02-2006 25-01-2007
WO 0243870	A	06-06-2002	AT DE EP JP US	316423 T 10059152 A1 1337342 A1 2004514556 T 2004063196 A1		15-02-2006 20-06-2002 27-08-2003 20-05-2004 01-04-2004

IN DER BESCHREIBUNG AUFGEFÜHRTE DOKUMENTE

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde ausschließlich zur Information des Lesers aufgenommen und ist nicht Bestandteil des europäischen Patentdokumentes. Sie wurde mit größter Sorgfalt zusammengestellt; das EPA übernimmt jedoch keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

In der Beschreibung aufgeführte Patentdokumente

- DE 19702753 A1 [0004]
- DE 10059152 C2 [0010]
- DE 102004023466 A1 [0010]
- DE 10320869 A1 [0010]
- DE 69113008 T2 [0013]

In der Beschreibung aufgeführte Nicht-Patentliteratur

- **ARTHUR ASHKIN.** Optical trapping and manipulation of neutral particals using lasers. *PNAS*, 1997, vol. 94, 4853-4860 [0004]
- **JAMES B. PAWLEY.** Handbook of Biological Confocal Microscopy. Plenum Press, 1995 [0004]
- **CHRISTOPH REICHLE ; TORSTEN MÜLLER ; THOMAS SCHNELLE ; GÜNTER FUHR.** Electrorotation in octopole micro cages. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 1999, vol. 32, 2128-2135 [0010]
- **A. ASHKIN ; J. M. DZIEDZIC ; J. E. BJORKHOLM ; STEVEN CHU.** Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *OPTICS LETTERS*, Mai 1986, vol. 11 (5 [0013]
- **M. E. J. FRIESE ; T. A. NIEMINEN ; N. R. HECKENBERG ; H. RUBINSZTEIN-DUNLOP.** Optical alignment and spinning of laser-trapped microscopic particles. *Nature*, 1998, vol. 394, 348-350 [0014]
- **E. HIGURASHI ; R. SAWADA ; T. ITO.** Optically induced angular alignment of trapped birefringent micro-objects by linearly polarized light. *NTT Opto-electronics Laboratories* [0014]
- **M. E. J. FRIESE ; H. RUBINSZTEIN-DUNLOP.** Optically driven micromachine elements. *Applied Physics Letters*, 22. Januar 2001, vol. 78 (4), 547-549 [0014]
- **E. HIGURASHI ; O. OHGUCHI ; T. TAMAMURA ; H. UKITA ; R. SAWADA.** Optically induced rotation of dissymmetrically shaped fluorinated polyimide micro-objects in optical traps. *J. Appl. Phys.*, 15. September 1997, vol. 82 (6 [0014]
- **M. E. J. FRIESE ; J. ENGER ; H. RUBINSZTEIN-DUNLOP ; N. R. HECKENBERG.** Optical angular momentum transfer to trapped absorbing particles. *Physical Review*, 1996, vol. 54, 1593-1596 [0014]
- **J LEACH ; M. R. DENNIS ; J. COURTIAL ; M. J. PADGETT.** Vortex knots in light. *New J. Phys*, 2005, vol. 7, 55 [0014]
- **V. BINGELYTE ; J. LEACH ; J. COURTIAL ; M. J. PADGETT.** Optically controlled three-dimensional rotation of microscopic objects. *APPLIED PHYSICS LETTERS*, 03. Februar 2003, vol. 82 (5 [0016]
- **AMIEL ISHAAYA ; NIR DAVIDSON ; ASHER FRIESEM.** Very high-order pure Laguerre-Gaussian mode selection in a passive Q-switched Nd:YAG laser. *Optics Express* #, 13. Juni 2005, vol. 13, 4952-4962 [0016]
- **ENRICO SANTAMATO ; ANTONIO SASSO ; BRUNO PICCIRILLO ; ANGELA VELLA.** Optical angular momentum transfer to transparent isotropic particles using laser beam carrying zero average angular momentum. *Optics Express*, August 2002, vol. 10 (17), 871-878 [0016]
- **K. TAGUCHI ; H. UENO ; T. HIRAMATSU ; M. IKEDA.** Optical trapping of dielectric particle and biological cell using optical fibre. *ELECTRONICS LETTERS*, 27. Februar 1997, vol. 33 [0017]
- **K. TAGUCHI ; H. UENO ; M. IKEDA.** Rotational manipulation of a yeast cell using optical fibres. *ELECTRONICS LETTERS*, Juli 1997, vol. 33 (14 [0017]
- **K. TAGUCHI ; M. TANAKA ; K. ATSUTA ; M. IKEDA.** Three Dimensional Optical Trapping Using Plural Optical Fibers. *Proc. of CLEO2000*, September 2000 [0017]
- **TAYLOR, R. S ; HNATOVSKY, C.** Particle trapping in 3-D using a single fiber probe with an annular light. *Optics Express*, vol. 11 (21), 2775 [0017]
- **A. ASHKIN.** Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure. *Phys. Rev. Lett.*, 1970, vol. 24, 156-159 [0023]
- **S.D. COLLINS ; R.J. BASKIN ; D.G. HOWITT.** Microinstrument gradient force optical trap. *Applied Optics*, 1999, vol. 38, 6068-6074 [0023]
- **GUCK, J. ; R. ANANTHAKRISHNAN ; T.J. MOON ; C.C. CUNNINGHAM ; J. KÄS.** Optical deformability of soft dielectric materials. *Phys. Rev. Lett.*, 2000, vol. 84 (23), 5451-5454 [0023]

- **GUCK, J ; R. ANANTHAKRISHNAN ; T.J. MOON ; C.C. CUNNINGHAM ; J. KÄS.** The Optical Stretcher - A Novel, noninvasive tool to manipulate biological materials. *Biophys. J.*, 2001, vol. 81, 767-784 [**0023**]
- **W. SINGER ; M. FRICK ; S. BERNET ; M. RITSCH-MARTE.** Self-organized array of regularly spaced microbeads in a fiber-optical trap. *J. Opt. Soc. Am.*, 2003, vol. B 20, 1568 [**0023**]