

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum

Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
12. Oktober 2017 (12.10.2017)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2017/174100 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation:
G02B 21/16 (2006.01) *G02B 27/58* (2006.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2016/000581
- (22) Internationales Anmeldedatum:
8. April 2016 (08.04.2016)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (71) Anmelder: UNIVERSITÄT HEIDELBERG [DE/DE];
Grabengasse 1, 69117 Heidelberg (DE).
- (72) Erfinder: BRENNER, Karl-Heinz; Ida-Dehmel-Ring 78,
68309 Mannheim (DE).
- (74) Anwälte: SCHIUMA, Daniele et al.; Müller-Boré &
Partner, Patentanwälte PartG mbB, Friedenheimer Brücke
21, 80639 München (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,

DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG,
KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH,
CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE,
IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,
RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

(54) Title: PARALLELIZATION OF THE STED MICROSCOPY METHOD

(54) Bezeichnung : PARALLELISIERUNG DES STED-MIKROSKOPIEVERFAHRENS

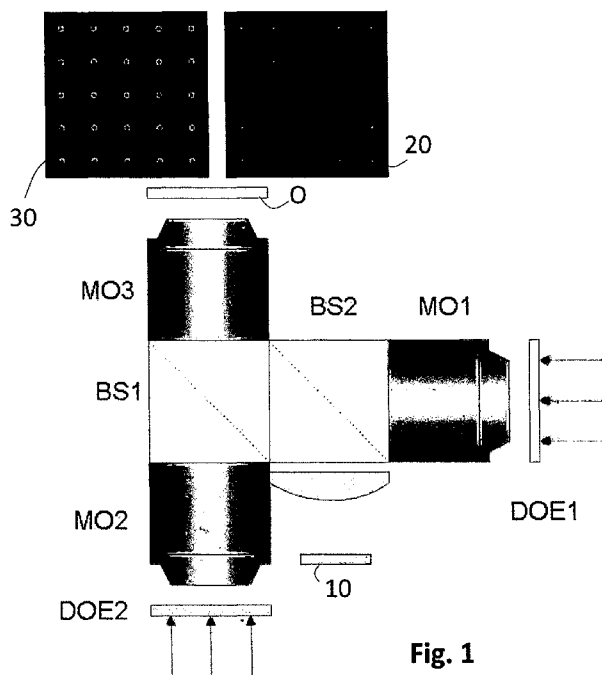


Fig. 1

(57) Abstract: The invention relates to a STED microscope and to a STED microscopy method. The STED microscope comprises: a light source for producing an excitation beam and a depletion beam; a first diffractive optical element (DOE1) and a second diffractive optical element (DOE2) each having a periodic arrangement of diffractive sub-elements, wherein the first diffractive optical element (DOE1) is designed to diffract an excitation beam in such a way that an array of punctiform excitation regions (20) is produced; and the second diffractive optical element (DOE2) is designed to diffract a depletion beam in such a way that an array of doughnut-shaped depletion regions (30) is produced.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein STED-Mikroskop und ein STED Mikroskopieverfahren. Das STED Mikroskop umfasst: eine Lichtquelle zum Erzeugen eines Anregungsstrahls und eines Ausschaltstrahls; ein erstes diffraktives optisches Element (DOE1) und ein zweites diffraktives optisches Element (DOE2) mit jeweils einer periodischen Anordnung von diffraktiven Sub-Elementen, wobei das erste diffraktive optische Element (DOE1) ausgelegt ist, einen Anregungsstrahl derart zu beugen, dass ein Array von punktförmigen Anregungsbereichen (20) erzeugt wird; und das zweite diffraktive optische Element (DOE2) ausgelegt ist, einen Ausschaltstrahl derart zu beugen, dass ein Array von Donut-förmigen Ausschaltbereichen (30) erzeugt wird.



WO 2017/174100 A1

"Parallelisierung des STED-Mikroskopieverfahrens"

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein STED-Mikroskop und ein STED-Verfahren.

- 5 Mikroskopische Stimulated Emission & Depletion (STED) Verfahren ermöglichen es, die klassischen Grenzen der optischen Auflösung zu überwinden und haben in der Mikroskopie einen Durchbruch bewirkt. Bei dem STED Verfahren werden Fluoreszenzmoleküle durch Licht bestimmter Wellenlängen in einen angeregten Zustand überführt, aus dem die Moleküle spontan mittels Fluoreszenz wieder in den Grundzustand zurückkehren. Durch Depletion mittels stimulierter Emission wird der Bereich, aus dem Fluoreszenz emittiert wird, wesentlich
- 10 kleiner gemacht als der vom Anregungslicht beleuchtete beugungsbegrenzte Bereich. Dazu wird das Objekt nicht nur mit dem fokussierten Anregungsstrahl beleuchtet, sondern gleichzeitig mit einem zweiten Strahl, dem „Ausschaltestrahl“, mit einer ringförmigen bzw. Donut-förmigen Lichtverteilung. Der Anregungsstrahl und der Ausschaltestrahl überlappen so, dass sich die maximale Intensität des Anregungsstrahls in der Mitte des Ausschaltestrahls (d.h.
- 15 da wo der Ausschaltestrahl dunkel ist) befindet. Dadurch werden die Fluoreszenzmoleküle im Außenbereich des Anregungsfokus gezielt „ausgeschaltet“. Die Fluoreszenzmoleküle im zentralen Bereich bleiben hingegen unbeeinflusst. Details des STED Verfahrens sind in der Literatur ausführlich beschrieben und werden als bekannt vorausgesetzt.
- 20 Konventionelle STED Verfahren verwenden ein Mikroskopobjektiv und eine scannende (d.h. serielle oder Punkt-für-Punkt) Abtastung des Objekts, um ein vollständiges Bild zu erhalten. Für große Bildfelder entstehen hierdurch lange Scanzeiten, welche diverse Probleme mit sich bringen, wie z.B. Zeitaufwand, Veränderung der Probe, etc. Des Weiteren wird zum Erzeugen des Donut-förmigen Depletion-Bereichs bzw. Ausschaltebereichs üblicherweise eine
- 25 Phasenplatte mit einer Spiralphase verwendet. Die Spiralphasenplatte bewirkt, dass in einer Zwischenebene eine ringförmige bzw. Donut-Verteilung entsteht, welche auf das zu untersuchende Objekt mittels geeigneter Abbildungssysteme abgebildet wird. Mit einer Spiralphasenplatte kann jedoch die Topologie des erzeugten ringförmigen bzw. Donut-förmigen

Bereichs nicht flexibel gewählt werden.

Vor diesem Hintergrund ist es eine technische Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine schnellere, robustere und flexiblere STED-Mikroskopie zu ermöglichen.

5

Diese Aufgabe wird durch ein STED-Mikroskop und ein entsprechendes Verfahren für die STED-Mikroskopie mit den Merkmalen der jeweiligen unabhängigen Ansprüche gelöst. Bevorzugte Ausführungsformen sind Gegenstand der abhängigen Ansprüche.

10 Ein erster Aspekt der Erfindung betrifft ein STED-Mikroskop mit diffraktiven Elementen. Das Mikroskop umfasst eine Lichtquelle bzw. Beleuchtungsvorrichtung, die ausgelegt ist, einen Anregungsstrahl und einen Ausschaltstrahl zu erzeugen. Die Wellenlänge des Anregungsstrahls kann geeignet gewählt werden, um die Fluoreszenzfarbstoffe in der zu untersuchenden Probe anzuregen. Die Wellenlänge des Ausschaltstrahls (STED-Strahl) kann
15 geeignet gewählt werden, um ein Abregen bzw. Ausschalten von angeregten Fluoreszenzfarbstoffen mittels stimulierter Emission zu erzielen. Die Lichtquelle kann z.B. gepulste oder cw-Laser, sowie gegebenenfalls weitere optische Komponente, wie Strahlteiler, Kollimatoren, Linsen, etc., umfassen.

20 Ferner umfasst das Mikroskop zwei diffraktive optische Elemente, die jeweils ein Array bzw. eine periodische Anordnung von diffraktiven Sub-Elementen aufweisen. Das erste diffraktive optische Element ist ausgelegt, den Anregungsstrahl derart zu beugen, dass ein Array bzw. eine periodische Anordnung von punktförmigen Anregungsbereichen erzeugt wird. Das zweite diffraktive optische Element ist ausgelegt, den Ausschaltstrahl (STED-Strahl oder Depletion-
25 Strahl) derart zu beugen, dass ein Array bzw. eine periodische Anordnung von ringförmigen bzw. Donut-förmigen Ausschaltbereichen (Depletion-Bereichen) erzeugt wird. Das Array kann z.B. ein eindimensionales oder zwei-dimensionales Array sein.

Anders ausgedrückt wird mittels des ersten diffraktiven optischen Elements ein Array von
30 fokussierten Lichtpunkten bzw. Beleuchtungsspots (Anregungsbereichen bzw. Anregungsfokussen oder Anregungsfoki) erzeugt. Mittels des zweiten diffraktiven optischen Elements wird ein Array, z.B. ein eindimensionales oder zwei-dimensionales Array, von ringförmigen bzw. Donut-förmigen Beleuchtungsspots (Ausschaltbereichen bzw. Depletion-

Bereichen) für die STED Mikroskopie erzeugt. Vorzugsweise fallen die Zentren der punktförmigen Anregungsbereiche zusammen mit den Zentren der ringförmigen bzw. Donutförmigen Ausschaltbereiche.

5 Das erste und/oder das zweite diffraktive optische Element können transmissive Elemente sein. Dies ermöglicht einen besonders kompakten Bau des STED Mikroskops. Die einzelnen Anregungsbereiche (Anregungsfokusse bzw. Anregungsfoki) bzw. Ausschaltbereiche (Depletion-Bereiche) werden von den jeweiligen Sub-Elementen des ersten bzw. des zweiten diffraktiven optischen Elements erzeugt. Jedes diffraktive Sub-Element weist ein Muster auf,
10 welches ausgelegt ist, die entsprechende punkt- oder Donut-förmige Intensitätsverteilung im jeweiligen Anregungs- oder Ausschaltbereich mittels Diffraction zu erzeugen. Das Muster kann z.B. durch Lithographie oder andere geeignete Methoden erzeugt werden.

Ferner kann das STED-Mikroskop eine Detektionseinheit zum Detektieren des von einer zu
15 untersuchenden Probe ausgesandten Fluoreszenzlichts umfassen. Die Detektionseinheit kann einen zwei-dimensionalen Detektor umfassen, z.B. eine CCD Kamera.

Ein Vorteil des vorgeschlagenen STED-Mikroskops ist die „Parallelisierung“ des STED
20 Verfahrens, da das Objekt gleichzeitig von mehreren Anregungs- und Ausschaltstrahlen beleuchtet wird, wodurch mehrere Anregungs- und Ausschaltbereiche entstehen. Bei herkömmlichen STED Verfahren, die auf eine serielle Abtastung des Objekts basieren, ist die Beleuchtungszeit (Verweilzeit) pro Punkt sehr kurz. Mit dem vorgeschlagenen STED Mikroskop ist eine wesentlich höhere Verweilzeit (z.B. um etwa 10000 Mal) und damit auch eine Bestrahlung mit wesentlich mehr Licht (z.B. 10000 Mal) möglich.

25 Zudem kann der Arbeitsabstand (d.h. die Brennweite f_0) des STED Mikroskops größer als der von herkömmlichen STED-Mikroskopen sein. Der Arbeitsabstand kann z.B. bei einer numerischen Apertur $NA = 0,75$ in Luft oder $NA = 1,14$ mit Immersion (Brechungsindex $n = 1,33$) bis zu 2000 μm betragen, im Vergleich zu einem Arbeitsabstand von 130 μm bei einem
30 herkömmlichen STED-Objektiv. Vorzugsweise ist der Arbeitsabstand gleich oder größer als 1000 μm .

Ein weiterer Vorteil ist es, dass mittels diffraktiver optischer Elemente eine Vielfalt von

Intensitätsverläufe erzeugt werden können, wobei die einzelnen Parameter der Intensitätsverteilung (wie z.B. Ringradius und Ringbreite) unabhängig voneinander eingestellt werden können. Dadurch kann das STED-Mikroskop besser und flexibler an die jeweilige Messsituation angepasst werden.

5

Die komplexe Amplitude eines diffraktiven optischen Sub-Elements kann mit der Formel (1) beschrieben werden:

$$u(\vec{r}) = A(\vec{r}) \exp(i\varphi(\vec{r})) \quad (1)$$

10

Die Fourier-Transformation der komplexen Amplitude im k-Raum liefert das Spektrum des diffraktiven optischen Sub-Elements.

Das Spektrum im k-Raum $\tilde{u}_{opt}(\vec{k}_{\perp}, 0)$ eines optimalen ersten diffraktiven optischen Sub-Elements, das ausgelegt ist, eine punktförmige Lichtverteilung zu erzeugen, ist vorzugsweise durch die Formel (2) gegeben:

15

$$\tilde{u}_{opt}(\vec{k}_{\perp}, 0) = e^{-iz\sqrt{\left(\frac{\omega}{c}\right)^2 - k_{\perp}^2}} e^{-i\vec{k}_{\perp}\vec{r}_{0,\perp}} \quad (2)$$

20

Das Spektrum $\tilde{u}_{opt}(\vec{k}_{\perp}, 0)$ eines optimalen zweiten diffraktiven optischen Elements, das ausgelegt ist, eine ringförmige bzw. Donut-förmige Lichtverteilung zu erzeugen, ist vorzugsweise durch die Formel (3) gegeben:

$$\tilde{u}_{opt}(\vec{k}_{\perp}, 0) = 2\pi R_0 J_0\left(\frac{R_0}{2\pi}\sqrt{k_{\perp}^2}\right) \cdot e^{-iz\sqrt{\left(\frac{\omega}{c}\right)^2 - k_{\perp}^2}} e^{-i\vec{k}_{\perp}\vec{r}_{0,\perp}} \quad (3)$$

25

In den Formeln (2) und (3) bezeichnen:

$\vec{k}_{\perp} = (k_x, k_y)$ bzw. $\begin{pmatrix} k_x \\ k_y \end{pmatrix}$ einen Wellenvektor im k-Raum, welcher die Komponenten k_x und k_y

des Wellenvektors zusammenfassend beschreibt;

z eine Ausbreitungsdistanz der Welle bzw. des Lichtstrahls (in die Lichtausbreitungsrichtung);

$\omega = 2\pi/f$, wobei f die Lichtfrequenz ist;

c die Lichtgeschwindigkeit;

- 5 $\vec{r}_{0,\perp} = (x, y)$ einen Vektor, welcher die Verschiebung bezüglich des Ursprungs des Anregungsbereichs (Anregungsfokus) oder des Donut-förmigen Ausschaltbereichs in der $x - y$ Ebene beschreibt, wobei die $x - y$ die Ebene senkrecht zur Lichtausbreitungsrichtung z ist;
- J_0 eine Besselfunktion nullter Ordnung;
- R_0 den Ringradius des erzeugten Donut-förmigen Ausschaltbereichs.

10

Die Amplitude und die Phase der Sub-Elemente des ersten und des zweiten diffraktiven optischen Elements können jeweils mittels Fourier-Transformation der Formel (2) bzw. der Formel (3) erhalten werden. Die Fourier-Transformation der Formel (2) bzw. Formel (3) liefert folglich ein „ideales“ diffraktives Sub-Element für das erste bzw. zweite diffraktive optische

15 Element. Ein solches „ideales“ diffraktives Sub-Element weist eine kontinuierliche Amplitude und eine kontinuierliche Phase auf.

20

Um die Herstellbarkeit zu vereinfachen werden binäre bzw. binarisierte diffraktive Sub-Elemente vorgeschlagen, bei denen die Amplitude normalisiert (z.B. Amplitude = 1) und die Phase binarisiert wird. Die komplexe Amplitude eines binarisierten Phasenelements kann somit durch die Formel (4) beschrieben werden:

$$u_B(\vec{r}) = 1 \cdot \exp(i\varphi_B(\vec{r})), \text{ wobei} \quad (4)$$

$$\varphi_B(\vec{r}) \in \{0, \pi\}$$

25

Es hat sich herausgestellt, dass die durch die Formel (2) und (3) definierten diffraktiven optischen Elemente bzw. Sub-Elemente besonders geeignet sind, optimale punktförmige bzw. Donut-förmige Lichtverteilungen zu erzeugen. So weist ein durch Formel (2) definiertes diffraktives optisches Element bzw. Sub-Element einen wesentlich schärferen Fokus auf

30 (sowohl in x - als auch in y -Richtung) als ein vergleichbares refraktives optisches Element (z.B. eine Mikrolinse aus Glas oder Kunststoff). Dies ermöglicht eine höhere Präzision und eine

bessere Auflösung des Scanvorgangs.

Jeder ringförmige bzw. Donut-förmige Bereich (Ausschaltbereich), der mittels eines diffraktiven optischen Elements nach der Formel (3) erzeugt wird, weist eine Ringbreite und
5 einen Ringradius auf, welche durch die periodisch angeordneten Sub-Elemente des ersten diffraktiven optischen Elements vorgegeben sind. Ein besonderer Vorteil des vorgeschlagenen diffraktiven optischen Elements ist, dass der Ringradius nahezu beliebig und unabhängig von der Ringbreite gewählt werden kann. Bei einer herkömmlichen Spiralphasenplatte dagegen ist lediglich eine Stufenhöhe von π möglich, so dass der Ringradius nicht gewählt bzw. variiert
10 werden kann. Des Weiteren ist es durch Modifikation der Besselfunktion möglich, den Intensitätsverlauf quantitativ und flexibel einzustellen, was mit einer herkömmlichen Spiralphasenplatte nicht möglich ist.

Die Anzahl der Sub-Elemente des ersten und/oder des zweiten diffraktiven optischen Elements
15 kann variieren und kann z.B. bis zu mehrere Tausend oder Zehntausend betragen. Vorzugsweise ist die Anzahl der Sub-Elemente größer als der durch die numerische Apertur festgelegte Überlapp. Bei einer Periode von 25 μm und einem Elementendurchmesser von 1 cm kann die Anzahl der Sub-Elemente beispielsweise $400 \times 400 = 160\,000$ sein.

20 Das Array von Sub-Elemente des ersten diffraktiven optischen Elements und/oder des zweiten diffraktiven optischen Elements kann eine Periode kleiner als 100 μm aufweisen, beispielsweise eine Periode zwischen 10 und 100 μm . Bei einer zwei-dimensionalen Anordnung können die Perioden in zwei orthogonalen Richtungen (z.B. in x- und y-Richtung) gleich oder unterschiedlich sein. Vorzugsweise sind die Perioden der Arrays des ersten und des zweiten
25 diffraktiven optischen Elements gleich.

Aufgrund der relativ kleinen Periode (z.B. von 1 μm bis 100 μm) ist ein schnelleres Scannen bei einer vorgegebenen Auflösung möglich. Bei einer herkömmlichen Spiralphasenplatte müsste die Periode viel größer (z.B. ca. 5 mm) sein, um ähnlich gute Ergebnisse bzw. eine ähnlich gute
30 Qualität der Donut-förmigen Ausschaltbereiche zu erzielen. Eine Periode, welche kleiner als 100 μm ist, würde somit bei herkömmlichen Phasenplatten wegen beugungsbedingter Strukturverbreiterung nicht funktionieren. Somit ist es möglich, die Baugröße des STED-

Mikroskops zu verringern.

- Die diffraktiven optischen Elemente können durch Lithographie, insbesondere Elektronenstrahlolithographie hergestellt werden. Das erste und/oder das zweite diffraktive optische Element kann/können jeweils eine Glasplatte aufweisen, wobei zumindest eine der Oberflächen der Glasplatte Erhöhungen und/oder Vertiefungen aufweist, die die diffraktiven Muster der Sub-Elemente bilden. Ein Vorteil der lithographischen Verfahren ist die hohe Genauigkeit mit der die diffraktiven Muster erzeugt werden können.
- 10 Die Glasplatte kann z.B. mit einem Photolack beschichtet werden, welcher auf Basis der herzustellenden bzw. vorgegebenen diffraktiven Sub-Elemente oder diffraktiven Strukturen belichtet wird. Anschließend wird der Photolack entwickelt, so dass sich abhängig vom verwendeten Photolack die belichteten oder die nicht belichteten Stellen des Photolacks lösen. Prinzipiell können die im Photolack vorhandenen Strukturen bereits verwendet werden.
- 15 Vorzugsweise werden jedoch die Strukturen in die Glasplatte geätzt und anschließend der Photolack entfernt. Die Herstellung kann durch Replikationstechnik erfolgen, bei der durch ein Abformen eines Masters Kopien hergestellt werden können. Andere Methoden zur Herstellung von diffraktiven optischen Elementen sind ebenfalls möglich.
- 20 Es ist ferner möglich, räumliche Lichtmodulatoren (wie z.B. LCD Modulatoren) als diffraktive optische Elemente einzusetzen. Die räumlichen Lichtmodulatoren können elektronisch steuerbar sein. Insbesondere können die diffraktiven Muster der einzelnen diffraktiven Sub-Elemente dynamisch veränderbar sein, um z.B. den Radius der Anregungsbereiche und/oder den Ringradius und/oder die Ringbreite der Ausschaltbereiche zu verändern. Ebenfalls ist es
- 25 möglich, die Anordnung der Anregungs- und Ausschaltbereiche (z.B. die Periode der beiden Arrays) und/oder deren Position dynamisch zu verändern. Ein Vorteil von elektronisch steuerbaren Lichtmodulatoren ist, dass die erzeugten Anregungs- und/oder Ausschaltbereiche schnell und flexibel und ohne die Verwendung zusätzlicher mechanischer und/oder optischer Teile geändert und an die jeweilige Messsituation angepasst werden
- 30 können. Wegen der herstellungsbedingten Mindestgröße der Modulatorpixel kann eine Verkleinerungsoptik eingesetzt werden.

Das STED-Mikroskop kann ferner umfassen:

ein erstes Abbildungssystem zum Abbilden des mittels des ersten diffraktiven optischen Elements erzeugten Arrays von Anregungsbereichen auf eine zu untersuchende Probe; und

ein zweites Abbildungssystem zum Abbilden des mittels des zweiten diffraktiven optischen Elements erzeugten Arrays von Ausschaltbereichen auf die zu untersuchende
5 Probe.

Das erste und das zweite Abbildungssystem können zumindest eine Linse bzw. ein Objektiv umfassen. Es ist möglich, dass die beiden Abbildungssysteme gemeinsame Komponente (z.B. ein gemeinsames Objektiv) aufweisen. Das erste und das zweite Abbildungssystem können
10 weitere Komponenten, wie z.B. Strahlteiler, spektrale und/oder räumliche Filter, Blenden, etc., umfassen. Vorzugsweise sind alle Objektive für eine Abbildung ins Unendliche optimiert ("infinity corrected").

Eine beispielhafte Beleuchtungsvorrichtung umfasst ein erstes Abbildungssystem mit einem
15 ersten Objektiv, ein zweites Abbildungssystem mit einem zweiten Objektiv und ein drittes Objektiv, welches Bestandteil sowohl des ersten als auch des zweiten Abbildungssystems ist. Durch zumindest einen Strahlteiler können der Anregungsstrahl und der Ausschaltstrahl (Depletion-Strahl) überlagert und dem dritten Objektiv zugeführt werden. Vorzugsweise ist der
20 zumindest eine Strahlteiler nicht-polarisierend und weist ein Teilungsverhältnis von 50:50 auf.

Das erste und das zweite diffraktive optische Element und die Objektive können derart angeordnet und ausgelegt werden, dass ein Punkt in der Objektebene des ersten
Abbildungssystem vom ersten Objektiv in eine (perfekte) Planwelle gewandelt wird. Das dritte
Objektiv wandelt diese Planwelle wieder in einen beugungsbegrenzten Punkt. Die Kombination
25 des ersten und des dritten Objektiv bewirkt somit eine optische Abbildung. Ebenso bewirkt die Kombination des zweiten und des dritten Objektivs eine optische Abbildung.

Das erste diffraktive optische Element erzeugt somit ein Array von Fokussen (Anregungsfokussen bzw. Anregungsfoki) in der Objektebene des ersten Abbildungssystems,
30 so dass ein entsprechendes Bild auf der Probe entsteht. Das zweite diffraktive optische Element erzeugt ein Array von Donut-Ringen bzw. Donut-förmigen Ausschaltbereichen in der Objektebene des zweiten Abbildungssystems. Das Bild entsteht ebenfalls auf der Probe und überlagert sich dort mit dem Array von Fokussen bzw. Foki (Anregungsfokussen bzw.

Anregungsfoki).

Vorzugsweise ist/sind das erste und/oder zweite Abbildungssystem derart justierbar bzw. justiert, dass das Array von Anregungsbereichen mit dem Array von Ausschaltbereichen auf der Probe im Wesentlichen überlappt, insbesondere so, dass jeder Anregungsbereich mit einem
5 zugehörigen Ausschaltbereich überlappt bzw. überlagert ist. Die Ausrichtung bzw. das Justieren der Anregungsbereiche und der Donut-förmigen Ausschaltbereiche zueinander kann z.B. durch Verschieben des ersten und/oder des zweiten diffraktiven optischen Elements erfolgen. Dies kann z.B. durch eine mechanische Anordnung (umfassend z.B. ein Stellelement)
10 oder durch einen piezoelektrischen Aktuator realisiert werden. Das STED-Mikroskop kann dementsprechend Justiermittel umfassen, die ausgelegt sind, das erste und/oder das zweite diffraktive optische Element in zumindest eine Richtung in einer Ebene, die senkrecht zur Lichtausbreitungsrichtung ist, zu verschieben. Die Justiermittel können ferner ausgelegt sein, das erste und/oder das zweite diffraktive optische Element ebenfalls entlang der
15 Lichtausbreitungsrichtung zu verschieben. Aufgrund des geringeren Gewichts von diffraktiven optischen Elementen ist die Realisierung einer mechanischen Translation bzw. Verschiebung mit hoher Genauigkeit vergleichsweise einfach. Werden elektronisch steuerbare räumliche Lichtmodulatoren verwendet, kann die Ausrichtung bzw. das Justieren elektronisch erfolgen, z.B. durch ein Verschieben des durch den Lichtmodulator erzeugten Diffraktionsmusters.

20 Ferner kann das STED Mikroskop einen Scanner bzw. Scanmittel umfassen, der bzw. das ausgelegt ist, die Arrays von Anregungs- und Ausschaltbereichen zu bewegen, um die Probe mit den Arrays von Anregungs- und Ausschaltbereichen abzutasten. Somit können auch größere Objekte mikroskopisch untersucht werden, wobei bei jedem Schritt die Probe parallel
25 von mehreren Anregungs- und Ausschaltbereichen beleuchtet wird. Der Scan kann mechanisch (z.B. durch eine mechanische Bewegung des ersten und des zweiten optischen Elements), durch zusätzliche optische Elemente oder elektronisch erfolgen. Es ist ebenfalls möglich, die Probe zu verschieben.

30 Das STED-Mikroskop kann ferner ein Wechselrad umfassen, welches eine Mehrzahl von unterschiedlichen diffraktiven optischen Elementen umfasst, und welches es ermöglicht, das zweite diffraktive optische Element durch ein anderes diffraktives optisches Element zu ersetzen. Durch Austausch des zweiten diffraktiven optischen Elements können z.B.

Ausschaltebereiche mit unterschiedlichen Ringbreiten und/oder Radien erzeugt werden. Ebenfalls ist es möglich, unterschiedliche Depletion-Intensitäten zu realisieren.

5 Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung wird ein Verfahren für die STED Mikroskopie bereitgestellt. Das Verfahren umfasst die Schritte:

Bereitstellen eines STED Mikroskops nach einem der oben beschriebenen Aspekte;

Beleuchten des ersten diffraktiven optischen Elements mit einem Anregungsstrahl und Erzeugen eines Arrays von punktförmigen Anregungsbereichen auf einer zu untersuchenden Probe bzw. auf einem zu untersuchenden Objekt;

10 Beleuchten des zweiten diffraktiven optischen Elements mit einem Ausschaltestrahl und Erzeugen eines Arrays von Donut-förmigen Ausschaltbereichen auf der zu untersuchenden Probe bzw. auf dem zu untersuchenden Objekt, wobei das Array von Anregungsbereichen und das Array von Ausschaltbereichen im Wesentlichen überlappen;

15 Detektieren zumindest eines Teils des Fluoreszenzlichts, das von der zu untersuchenden Probe bzw. dem zu untersuchenden Objekt ausgesendet wird.

Das Verfahren kann ferner eine Ausrichtung bzw. ein Justieren des ersten und zweiten diffraktiven optischen Elements umfassen, um eine Überlappung des Arrays von Anregungsbereichen und des Arrays von Ausschaltbereichen zu erzielen. Insbesondere erfolgt die Ausrichtung bzw. das Justieren so, dass jeder Anregungsbereich mit einem zugehörigen Ausschaltbereich überlappt bzw. überlagert ist und dass die maximale Intensität des jeweiligen Anregungsbereichs im Wesentlichen mit dem Zentrum des jeweiligen Ausschaltbereichs zusammenfällt. Wie oben beschrieben kann die Ausrichtung bzw. das Justieren des ersten und des zweiten optischen Elements mechanisch oder elektronisch erfolgen.

Die Erfindung wird im Folgenden unter Bezugnahme auf die beigefügten Zeichnungen näher erläutert und beschrieben. Es zeigen:

30 **Fig. 1** den prinzipiellen Aufbau eines STED-Mikroskops;

Fig. 2A die Amplitude und **Fig. 2B** die Phase eines beispielhaften „idealen“ diffraktiven optischen Sub-Elements, das ausgelegt ist, eine punktförmige Lichtverteilung zu erzeugen;

Fig. 2C die Phase eines beispielhaften binären diffraktiven optischen Sub-Elements, das ausgelegt ist, eine punktförmige Lichtverteilung zu erzeugen;

Fig. 3A eine Grauwertdarstellung der Phase eines beispielhaften diffraktiven optischen Sub-Elements, das ausgelegt ist, eine punktförmige Lichtverteilung zu erzeugen;

5 **Fig. 3B** die Phase eines beispielhaften binären diffraktiven optischen Sub-Elements, das ausgelegt ist, eine punktförmige Lichtverteilung zu erzeugen;

Fig. 3C die Intensität des Beugungsbilds eines beispielhaften diffraktiven optischen Sub-Elements, das ausgelegt ist, eine ringförmige bzw. Donut-förmige Lichtverteilung zu erzeugen;

10 **Fig. 3D** die Intensität des Beugungsbilds eines beispielhaften binären diffraktiven optischen Sub-Elements, das ausgelegt ist, eine ringförmige bzw. Donut-förmige Lichtverteilung zu erzeugen;

Fig. 4A die Phase eines beispielhaften binären diffraktiven optischen Elements, das ausgelegt ist, eine periodische Anordnung bzw. ein Array von Donut-förmigen Lichtspots zu erzeugen;

15 **Fig. 4B** ein Array von Donut-förmigen Lichtspots (Anregungsbereichen), das durch das in Fig. 4A gezeigte diffraktive optische Element erzeugt wird.

20 **Fig. 1** zeigt den prinzipiellen Aufbau eines STED-Mikroskops. Das STED Mikroskop umfasst eine Lichtquelle bzw. Beleuchtungsvorrichtung (nicht gezeigt), die einen Anregungsstrahl und die einen Ausschaltstrahl (Depletion-Strahl) erzeugt. Die Lichtquelle bzw. die Beleuchtungsvorrichtung kann z.B. zwei gepulste oder cw-Laser umfassen.

25 Der Anregungsstrahl wird durch das erste diffraktive optische Element DOE1 gebeugt, so dass eine Mehrzahl von Anregungsstrahlen erzeugt wird. Jeder der erzeugten Ausschaltstrahlen wird mittels eines ersten Abbildungssystems in einem punktförmigen Spot (Anregungsbereich bzw. Anregungsfokus) für die STED-Mikroskopie abgebildet. Der Ausschaltstrahl wird durch das zweite diffraktive optische Element DOE2 gebeugt, so dass eine Mehrzahl von Ausschaltstrahlen erzeugt wird. Jeder der erzeugten Ausschaltstrahlen wird mittels eines zweiten Abbildungssystems in einem ringförmigen bzw. Donut-förmigen Ausschaltbereich (Depletion-Bereich) für die STED-Mikroskopie abgebildet.

30 Das erste Abbildungssystem umfasst ein erstes Objektiv MO1 und ein drittes Objektiv MO3, das zweite Abbildungssystem umfasst ein zweites Objektiv MO2 und das dritte Objektiv MO3.

Die Kombination aus dem ersten Objektiv MO1 und dem dritten Objektiv MO3 bewirkt eine optische Abbildung. Das erste diffraktive optische Element DOE1 erzeugt ein Array von Fokussen bzw. Foki (Abbildungsfokussen bzw. Anregungsfoki) in der Objektebene des ersten Abbildungssystems MO1-MO3, wobei das Bild dieses Arrays auf dem untersuchten Objekt O entsteht. Das zweite diffraktive optische Element erzeugt ein Array von Donut-förmigen Spots (Donut-Ringen) in der Objektebene des zweiten Abbildungssystems MO2-MO3, wobei das Bild dieses Arrays ebenfalls auf dem Objekt entsteht und sich dort mit dem Array von Fokussen bzw. Foki überlagert. Das Alignment bzw. die Ausrichtung zwischen Fokus und Donut kann durch laterales Verschieben von DOE1 und DOE2 relativ zu einander erfolgen. Die laterale Verschiebung kann in mechanischer Form (z.B. durch ein Stellelement) oder in piezoelektrischer Form realisiert werden. Das Objekt wird somit durch ein Array 20 von punktförmigen Lichtflecken bzw. Anregungsfokussen (Anregungsbereichen) und ein Array 30 von ringförmigen bzw. Donut-förmige Lichtflecken (Ausschaltebereichen) beleuchtet

Der Strahlteiler BS1 führt die durch die Beugung an dem ersten diffraktiven optischen Element DOE1 erzeugten und durch das erste Objektiv MO1 propagierten Anregungsstrahlen sowie die durch die Beugung an dem zweiten diffraktiven optischen Element erzeugten und durch das zweite Objektiv MO2 propagierten Anregungsstrahlen. Der dichroische Strahlteiler BS2 trennt das vom Objekt O emittierte Fluoreszenzlicht vom Anregungslicht zusammen. Das Fluoreszenzlicht wird von einer Kamera 10, wie z.B. einer CCD-Kamera registriert. Die Objektive MO1 bis MO3 sind vorzugsweise für eine Abbildung ins Unendliche optimiert (bzw. "infinity corrected").

Das erste diffraktive optische Element und das zweite diffraktive optische Element umfassen jeweils ein Array von diffraktiven optischen Sub-Elementen. Die Arrays können eindimensionale oder zweidimensionale Arrays sein. Die einzelnen Sub-Elemente können wie folgt erhalten werden:

Die Lichtausbreitung einer Lichtverteilung von $z = 0$ in Richtung $z > 0$ kann durch die Formel (5) beschreiben werden:

$$u(\vec{r}_\perp, z) = \iint \tilde{u}(\vec{k}_\perp, 0) e^{iz\sqrt{\left(\frac{\omega}{c}\right)^2 - k_\perp^2}} e^{i\vec{k}_\perp \vec{r}_\perp} \frac{d^2 k_\perp}{(2\pi)^2}, \quad (5)$$

wobei:

$\tilde{u}(\vec{k}_\perp, 0)$: die Lichtverteilung (Winkelspektrum) bei $z = 0$ (d.h. in der Pupille) beschreibt.

5

Die Formel (5) ist bei einem periodischen Muster bzw. einem periodischen Wellenfeld im Rahmen der skalaren Optik (ohne Vektorcharakter) exakt.

Die Bedingung für einen Fokus ist, dass die Lichtamplitude in einem Punkt (x, y) maximal ist, d.h. $u(\vec{r}_{0,\perp}, z)$ muss maximiert werden. Dies wird erreicht, wenn alle Beiträge unter dem Integral positiv sind. Folglich ist das optimale Objekt- bzw. Elementenspektrum \tilde{u}_{opt} bei $\vec{r}_{0,\perp}$ das komplex konjugierte der Terme im Integral:

10

$$\tilde{u}_{opt}(\vec{k}_\perp, 0) = e^{-iz\sqrt{\left(\frac{\omega}{c}\right)^2 - k_\perp^2}} e^{-i\vec{k}_\perp \vec{r}_{0,\perp}} \quad (6)$$

15

Eine Fourier-Transformation des durch Formel (6) gegebenen Objekt- bzw. Elementenspektrums liefert das einzelne diffraktive Sub-Element des ersten diffraktiven optischen Elements bzw. dessen Amplitude und Phase. Dabei gilt für die Koordinaten im Pupillenraum $\begin{pmatrix} s_x \\ s_y \end{pmatrix}$ und im Frequenzraum $\begin{pmatrix} \nu \\ \mu \end{pmatrix}$:

20

$$\begin{pmatrix} s_x \\ s_y \end{pmatrix} = \frac{1}{k} \begin{pmatrix} k_x \\ k_y \end{pmatrix} \text{ und } \begin{pmatrix} \nu \\ \mu \end{pmatrix} = \frac{1}{\lambda} \begin{pmatrix} s_x \\ s_y \end{pmatrix} \quad (7)$$

wobei λ die Lichtwellenlänge ist.

25 Ein diffraktives Sub-Element, das durch eine Fourier-Transformation des Objektspektrums nach Formel (6) erhalten wird, weist eine Amplitude und eine Phase in kontinuierlicher Form auf und ist geeignet, eine punktförmige Lichtverteilung im Fokusraum bzw. ein Fokuss zu erzeugen.

Diese punktförmige Lichtverteilung kann mittels eines geeigneten Abbildungssystems auf dem zu untersuchenden Objekt abgebildet werden. **Fig. 2A** zeigt die Amplitude und **Fig. 2B** die Phase eines solchen beispielhaften „idealen“ diffraktiven optischen Sub-Elements, das mittels einer Fourier-Transformation der Formel (6) erhalten wird und ausgelegt ist, eine punktförmige Lichtverteilung zu erzeugen.

Da die Herstellung eines diffraktiven Elements mit kontinuierlicher Amplitude und/oder Phase schwierig ist, wird ein binäres diffraktives optisches Element vorgeschlagen. Um ein binäres diffraktives optisches Element zu erhalten, kann die Amplitude des Fourier-Transformierten normiert werden (z.B. auf 1 gesetzt werden). Ferner kann die Phase des Fourier-Transformierten binarisiert werden. **Fig. 2C** zeigt die Phase eines beispielhaften binären diffraktiven optischen Elements.

Fig. 3A-3D illustrieren den Einfluss der Normierungs- und Binarisierungsoperationen auf den Fokus bzw. auf die Lichtverteilung in der Fokusebene. **Fig. 3A** zeigt die Phase eines beispielhaften „idealen“ diffraktiven optischen Elements (d.h. ohne Binarisierung) und **Fig. 3B** die Phase ($+\pi/2$, $-\pi/2$) eines binären diffraktiven optischen Elements. **Fig. 3C** zeigt die Intensität des Beugungsbilds des in **Fig. 3A** gezeigten diffraktiven optischen Elements. **Fig. 3D** zeigt dasselbe für das in **Fig. 3B** gezeigte binarisierte diffraktive optische Element. Wie aus dem Vergleich von **Fig. 3C** und **3D** ersichtlich ist, beeinträchtigt die Binarisierung die Form des Fokus nicht wesentlich, sondern nur die Peakamplitude und den Hintergrund. Das in **Fig. 3A-3D** gezeigte Beispiel wurde speziell so gewählt, dass der Unterschied zwischen einem „idealen“ und einem binarisierten diffraktiven optischen Element deutlich wird. In einer praktischen Situation ist dieser Unterschied so klein, dass er nicht oder nur kaum wahrnehmbar ist.

Das mittels einer Fourier-Transformation der Formel (6) erhaltene diffraktive optische Element bzw. Sub-Element (binär oder kontinuierlich) weist bei gleichen Parametern (Durchmesser und Brennweite) einen wesentlich schärferen Fokus auf (sowohl in x- als auch in y-Richtung) als ein refraktives optisches Element (z.B. eine Mikrolinse aus Glas oder Kunststoff). Dies ermöglicht eine höhere Präzision und eine bessere Auflösung des Scanvorgangs.

Die einzelnen Sub-Elemente des zweiten diffraktiven optischen Elements können ähnlich zu den Sub-Elementen des ersten diffraktiven optischen Elements erhalten werden, wobei als Pupillenfunktion nicht die Konstante 1 (wie beim ersten diffraktiven optischen Element), sondern das Fouriertransformierte der gewünschten Verteilung verwendet wird. Für eine ringförmige bzw. Donut-förmige Verteilung ist dies die Besselverteilung J_0 . Die Bedingung für einen Donut-förmigen Spot ist somit:

$$\tilde{u}_{opt}(\vec{k}_\perp, 0) = 2\pi R_0 J_0\left(\frac{R_0}{2\pi}\sqrt{k_\perp^2}\right) \cdot e^{-iz\sqrt{\left(\frac{\omega}{c}\right)^2 - k_\perp^2}} e^{-i\vec{k}_\perp \vec{r}_{0,\perp}} \quad (8)$$

- 10 Formel (8) ergibt das optimale Objekt- bzw. Elementspektrum \tilde{u}_{opt} eines Donut-förmigen Spots bzw. einer Donut-förmigen Lichtverteilung bei $\vec{r}_{0,\perp}$. Die Fourier-Transformation des durch Formel (8) gegebenen Objektspektrums liefert das einzelne diffraktive Sub-Element des zweiten diffraktiven optischen Elements. Ein solches „ideales“ diffraktives Sub-Element weist eine Amplitude und eine Phase in kontinuierlicher Form auf und ist geeignet, eine Donut-förmige Lichtverteilung im Fokusraum zu erzeugen. Durch eine Binarisierung (umfassend eine Normalisierung der Amplitude und Binarisierung der Phase) kann ein entsprechendes binäres diffraktives optisches Sub-Element erhalten werden. Die periodische Anordnung mehrerer Sub-Elemente (ideal oder binär) bildet das zweite diffraktive optische Element.
- 15
- 20 **Fig. 4A** zeigt die Phase eines beispielhaften binären diffraktiven optischen Elements, das ausgelegt ist, eine periodische Anordnung bzw. ein Array von Donut-förmigen Lichtspots zu erzeugen. Das gezeigte diffraktive optische Element umfasst ein Array von 3 x 3 binären diffraktiven Sub-Elementen (Phasenelementen) mit den folgenden Parametern: Periode $P = 64 \mu\text{m}$, Ringradius $R_0 = 2 \mu\text{m}$ und $f_0 = 5 \text{ mm}$, wobei f_0 die nötige Ausbreitungsdistanz für die Entstehung des Fokus bzw. der Donut-Verteilung ist. Das diffraktive Muster eines jeden Sub-Elements wurde nach einer Binarisierung der Fouriertransformierten der Formel (8) erhalten.
- 25 **Fig. 4B** zeigt das erzeugte Array von Donut-förmigen Lichtspots (Anregungsbereichen). Sowohl der Ringradius R_0 als auch die Ringposition entspricht der Designvorgabe. Die in Fig. 4B gezeigte x-y Verteilung entspricht der mit einer Spiralphasenplatte erzeugten Donut-förmigen Verteilung, mit dem Unterschied, dass sowohl der Ringradius als auch die Ringbreite einstellbar
- 30

sind. Es könnten nach Bedarf auch andere Verläufe der Depletion-Intensität gewählt werden, was mit einer Spiralphasenplatte nicht möglich ist.

5 Weitere Kombinationen von Merkmalen und/oder andere Geometrien und/oder Anordnungen des STED-Mikroskops sind selbstverständlich auch möglich. Ferner sind die in der Beschreibung genannten Vorteile von Merkmalen oder Kombinationen von Merkmalen beispielhaft und können alternativ oder kumulativ zur Wirkung kommen.

Bezugszeichenliste

MO1-MO3 Objektive

DOE1, DOE2 diffraktive optische Elemente;

BS1, BS2 Strahlteiler;

O Objekt bzw. Probe

5 10 Detektionseinheit (z.B. CCD Kamera)

20 Array von punktförmigen Anregungsbereichen (Anregungsfokussen bzw. Anregungsfoki);

30 Array von ringförmigen bzw. Donut-förmigen Ausschaltbereichen

Ansprüche

1. STED-Mikroskop umfassend

eine Lichtquelle, die ausgelegt ist, einen Anregungsstrahl und einen Ausschaltstrahl zu erzeugen;

ein erstes diffraktives optisches Element (DOE1) und ein zweites diffraktives optisches Element (DOE2) mit jeweils einer periodischen Anordnung von diffraktiven Sub-Elementen, wobei

das erste diffraktive optische Element (DOE1) ausgelegt ist, einen Anregungsstrahl derart zu beugen, dass ein Array von punktförmigen Anregungsbereichen (20) erzeugt wird; und

5 das zweite diffraktive optische Element (DOE2) ausgelegt ist, einen Ausschaltstrahl derart zu beugen, dass ein Array von Donut-förmigen Ausschaltbereichen (30) erzeugt wird.

2. STED-Mikroskop nach Anspruch 1,

wobei die diffraktiven Sub-Elemente des ersten diffraktiven optischen Elements (DOE1) jeweils auf einer, vorzugsweise binarisierten und/oder normalisierten, Fourier-Transformation der Funktion $\tilde{u}_{opt}(\vec{k}_{\perp}, 0)$ basieren, wobei

$$\tilde{u}_{opt}(\vec{k}_{\perp}, 0) = e^{-iz\sqrt{\left(\frac{\omega}{c}\right)^2 - k_{\perp}^2}} e^{-i\vec{k}_{\perp}\vec{r}_{0,\perp}} ; \text{ und/oder}$$

wobei die diffraktiven Sub-Elemente des zweiten diffraktiven optischen Elements (DOE2) jeweils auf einer, vorzugsweise binarisierten und/oder normalisierten, Fourier-Transformation der Funktion $\tilde{u}_{opt}(\vec{k}_{\perp}, 0)$ basieren, wobei

$$\tilde{u}_{opt}(\vec{k}_{\perp}, 0) = 2\pi R_0 J_0\left(\frac{R_0}{2\pi}\sqrt{k_{\perp}^2}\right) \cdot e^{-iz\sqrt{\left(\frac{\omega}{c}\right)^2 - k_{\perp}^2}} e^{-i\vec{k}_{\perp}\vec{r}_{0,\perp}} ;$$

und wobei:

$\vec{k}_{\perp} = (k_x, k_y)$ einen Wellenvektor im k-Raum mit den Komponenten k_x und k_y bezeichnet;

z die Ausbreitungsrichtung der Welle bzw. des Lichtstrahls bezeichnet;

$\omega = 2\pi/f$, wobei f die Lichtfrequenz ist;

c die Lichtgeschwindigkeit ist;

$\vec{r}_{L,0} = (x, y)$ einen Vektor, welcher den Ort des Anregungsbereichs oder des Ausschaltbereichs in der $x - y$ Ebene beschreibt, bezeichnet;

J_0 eine Besselfunktion nullter Ordnung ist;

R_0 den Ringradius des erzeugten Donut-förmigen Ausschaltbereichs bezeichnet.

3. STED-Mikroskop nach Anspruch 1 oder 2,

wobei die periodische Anordnung der Sub-Elemente des ersten diffraktiven optischen Elements (DOE1) eine Periode, die kleiner als $100 \mu\text{m}$ ist, aufweist, und/oder

wobei die periodische Anordnung der Sub-Elemente des zweiten diffraktiven optischen Elements (DOE2) eine Periode, die kleiner als $100 \mu\text{m}$ ist, aufweist.

4. STED-Mikroskop nach einem der vorangehenden Ansprüche, ferner umfassend

ein erstes Abbildungssystem (MO1, MO3) zum Abbilden des mittels des ersten diffraktiven optischen Elements erzeugten Arrays (20) von Anregungsbereichen auf eine zu untersuchende Probe (O); und

ein zweites Abbildungssystem (MO1, MO3) zum Abbilden des mittels des zweiten diffraktiven optischen Elements (DOE2) erzeugten Arrays (30) von Ausschaltbereichen auf die zu untersuchende Probe (O).

5. STED-Mikroskop nach Anspruch 4, wobei das erste Abbildungssystem (MO1, MO3) und/oder zweite Abbildungssystem (MO2, MO3) derart justierbar ist/sind, dass das Array von Anregungsbereichen (20) mit dem Array von Ausschaltbereichen (30) im Wesentlichen überlappt.

6. STED-Mikroskop nach einem der vorangehenden Ansprüche, ferner umfassend ein Wechselrad mit einer Mehrzahl von diffraktiven optischen Elementen, welches ausgelegt ist, das zweite diffraktive optische Element (DOE2) durch ein anderes diffraktives optisches Element zu ersetzen.

7. Verfahren für die STED-Mikroskopie, umfassend die Schritte:

Bereitstellen eines STED Mikroskops nach einem der vorangegangenen Ansprüche;
Beleuchten des ersten diffraktiven optischen Elements (DOE1) mit einem Anregungsstrahl und Erzeugen eines Arrays von punktförmigen Anregungsbereichen auf einer zu untersuchenden Probe (O);

Beleuchten des zweiten diffraktiven optischen Elements (DOE2) mit einem Ausschaltestrahl und Erzeugen eines Arrays von Donut-förmigen Ausschaltbereichen auf der zu untersuchenden Probe (O), welches im Wesentlichen mit dem Array von Anregungsbereichen überlappt;

Detektieren zumindest eines Teils des Fluoreszenzlichts, das von der zu untersuchenden probe (O) ausgesendet wird.

8. Verfahren nach Anspruch 7, ferner umfassend den Schritt:

Ausrichtung des ersten diffraktiven optischen Elements (DOE1) und zweiten diffraktiven optischen Elements (DOE2), um eine Überlappung des Arrays von Anregungsbereichen und des Arrays von Ausschaltbereichen zu erzielen, wobei die Ausrichtung ein laterales Verschieben des ersten und/oder des zweiten diffraktiven optischen Elements umfasst.

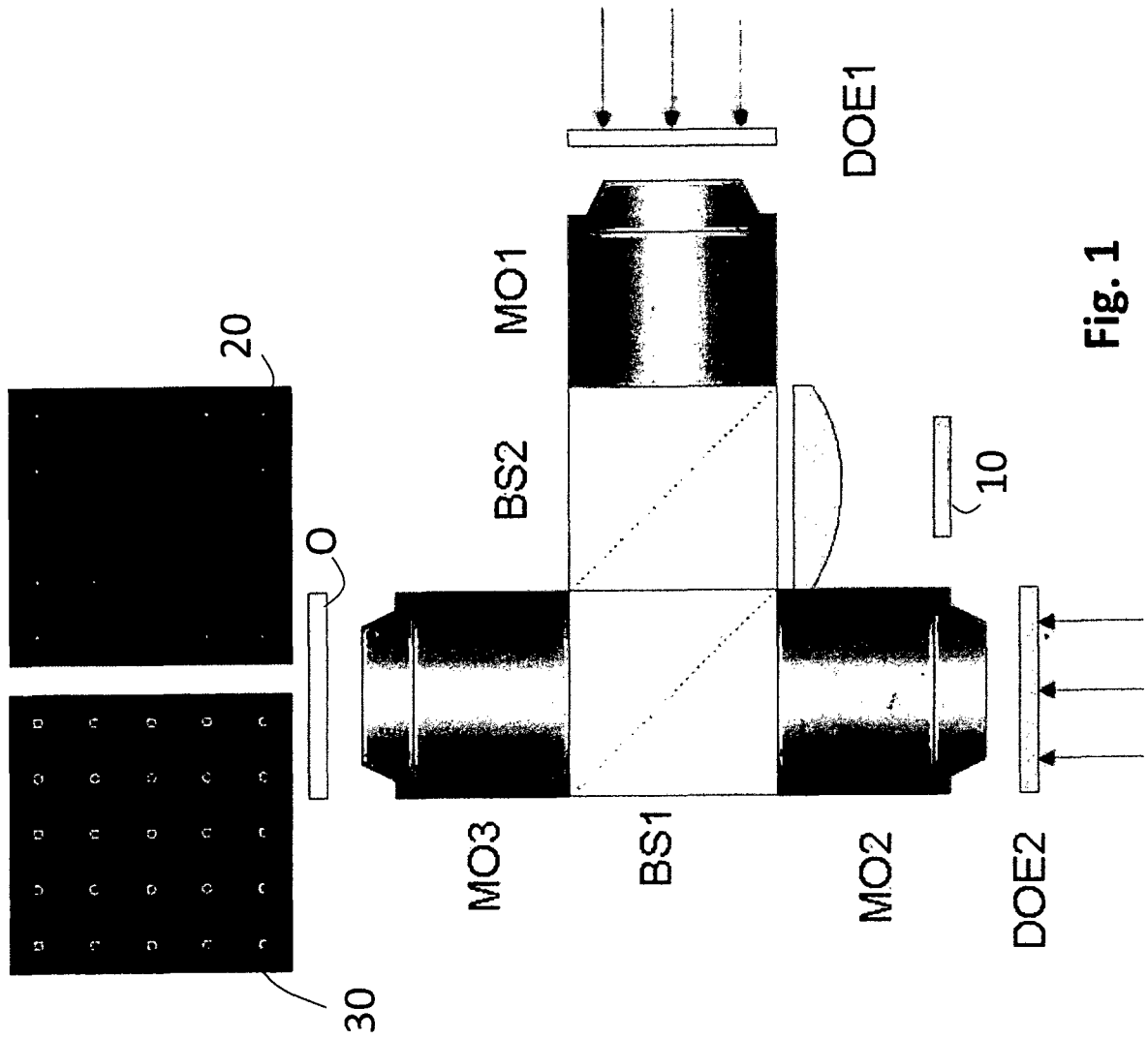


Fig. 1

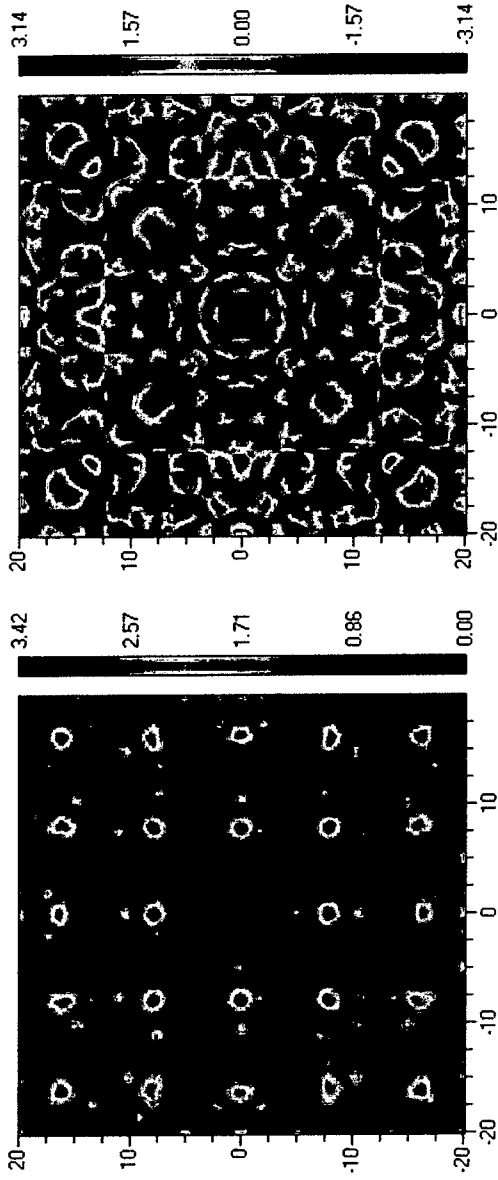


Fig. 2A

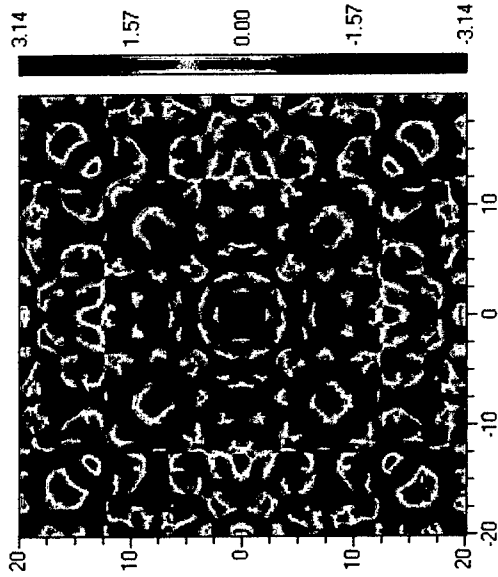


Fig. 2B

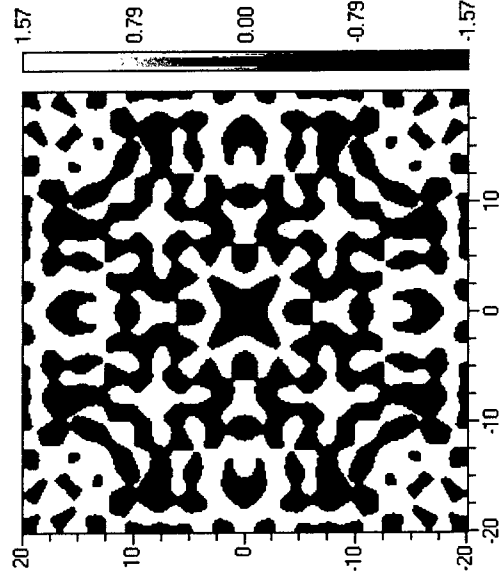


Fig. 2C

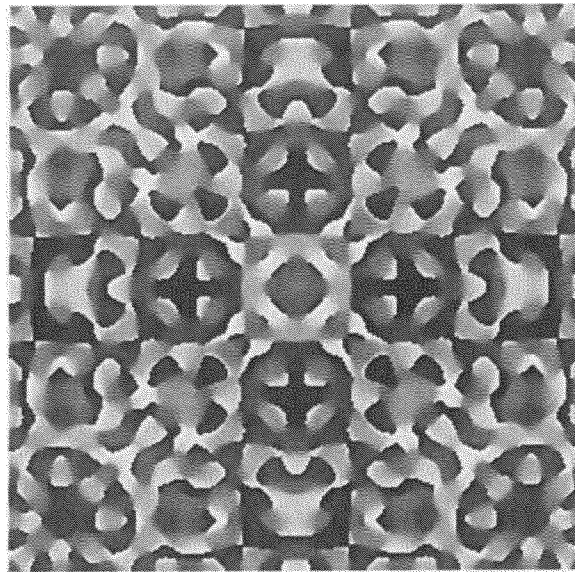


Fig. 3A

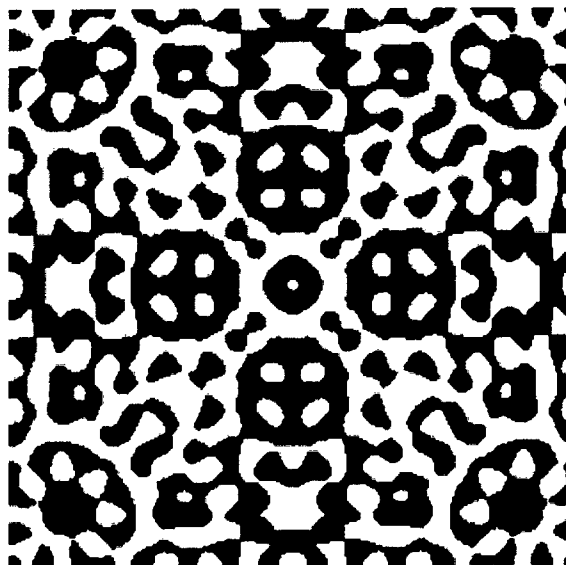


Fig. 3B

Intensität des Beugungsbilds ohne Binarisierung

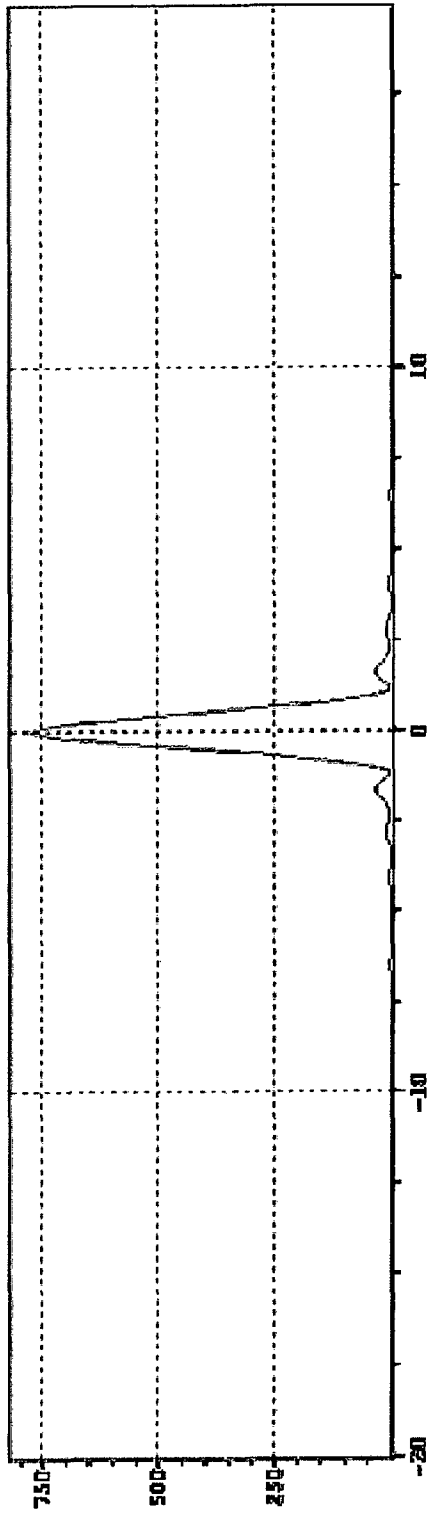


Fig. 3C

Intensität des Beugungsbilds mit Binarisierung

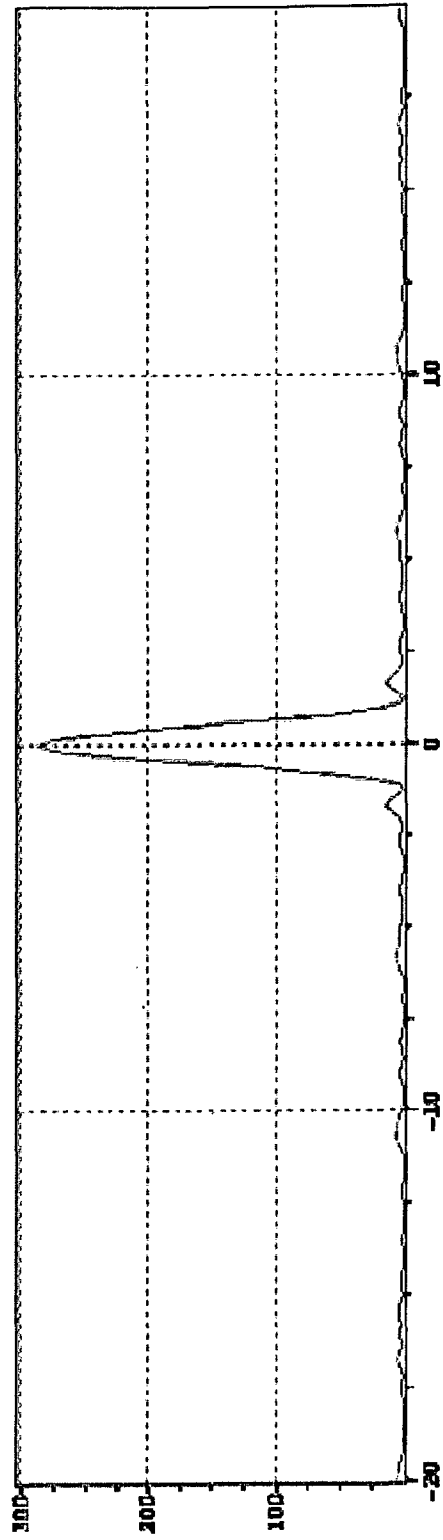


Fig. 3D

05 / 05

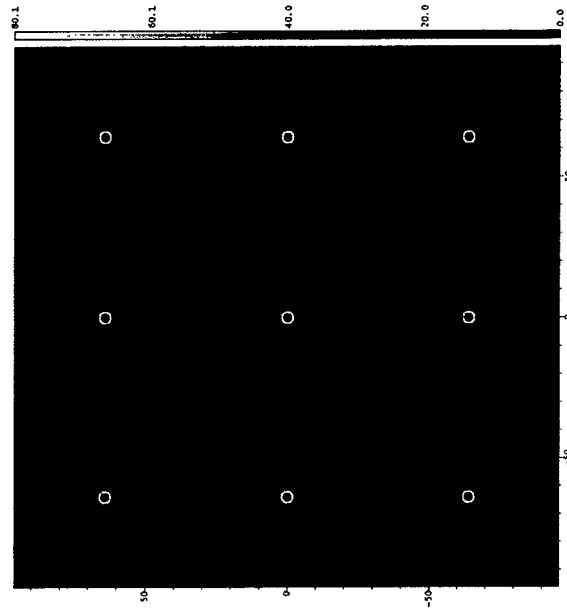


Fig. 4B

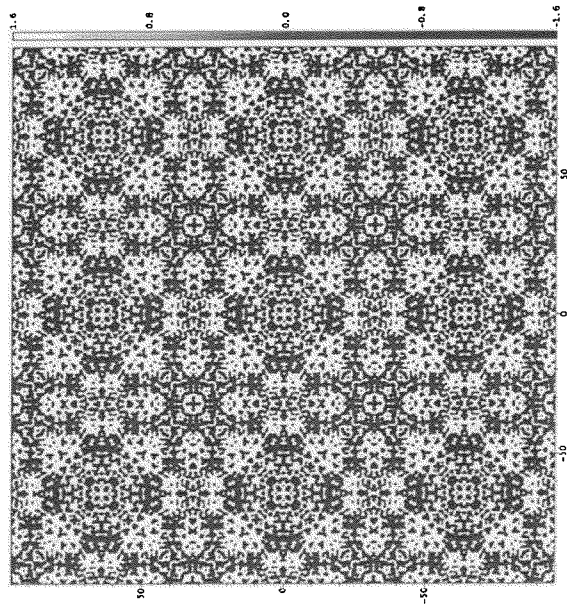


Fig. 4A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/000581

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G02B21/16 G02B27/58
ADD.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G02B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2007/023686 A1 (WOLLESCHENSKY RALF [DE] ET AL) 1 February 2007 (2007-02-01) paragraphs [0013], [0031] - [0033], [0068] - [0071], [0074]; figures 3,8b -----	1-8
A	WO 2014/005193 A1 (HARRIS MARTIN RUSSELL [AU]) 9 January 2014 (2014-01-09) page 17, line 19 - page 19, line 23; figures 7,11 page 12, line 9 - page 13, line 15 -----	1-8
A	US 2006/176542 A1 (MURO MIKIO [JP] ET AL) 10 August 2006 (2006-08-10) paragraphs [0165], [0214] - [0224] -----	1-8
A	US 2016/091799 A1 (RACHET BASTIEN [CH] ET AL) 31 March 2016 (2016-03-31) paragraph [0074] -----	1-8
	-/--	

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 November 2016

Date of mailing of the international search report

07/12/2016

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Verdrager, Véronique

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/000581

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 20 2013 102039 U1 (PICOQUANT GMBH [DE]) 15 May 2014 (2014-05-15) paragraph [0023] -----	1-8
A	US 2012/257197 A1 (FELDKHUN DANIEL [US] ET AL) 11 October 2012 (2012-10-11) paragraph [0116] -----	1-8
A	US 2014/307299 A1 (MATSUMOTO NAOYA [JP] ET AL) 16 October 2014 (2014-10-16) paragraphs [0056], [0074], [0102] -----	1-8
A	WO 2012/045318 A1 (UNIV HEIDELBERG [DE]; BRENNER KARL-HEINZ [DE]) 12 April 2012 (2012-04-12) page 1, line 35 - page 2, line 6; figure 3 page 6, lines 14-23 -----	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/EP2016/000581

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2007023686	A1	01-02-2007	NONE

WO 2014005193	A1	09-01-2014	NONE

US 2006176542	A1	10-08-2006	EP 1662296 A1 31-05-2006
		JP 2005084266 A	31-03-2005
		US 2006176542 A1	10-08-2006
		WO 2005024497 A1	17-03-2005

US 2016091799	A1	31-03-2016	EP 2389606 A2 30-11-2011
		US 2011300490 A1	08-12-2011
		US 2016091799 A1	31-03-2016
		WO 2010084478 A2	29-07-2010

DE 202013102039	U1	15-05-2014	NONE

US 2012257197	A1	11-10-2012	US 2012257197 A1 11-10-2012
		WO 2012050901 A2	19-04-2012

US 2014307299	A1	16-10-2014	CN 103907048 A 02-07-2014
		DE 112012004479 T5	14-08-2014
		JP 5802109 B2	28-10-2015
		JP 2013092687 A	16-05-2013
		KR 20140084054 A	04-07-2014
		US 2014307299 A1	16-10-2014
		WO 2013061961 A1	02-05-2013

WO 2012045318	A1	12-04-2012	NONE

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. G02B21/16 G02B27/58 ADD.		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) G02B		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 2007/023686 A1 (WOLLESCHENSKY RALF [DE] ET AL) 1. Februar 2007 (2007-02-01) Absätze [0013], [0031] - [0033], [0068] - [0071], [0074]; Abbildungen 3,8b -----	1-8
A	WO 2014/005193 A1 (HARRIS MARTIN RUSSELL [AU]) 9. Januar 2014 (2014-01-09) Seite 17, Zeile 19 - Seite 19, Zeile 23; Abbildungen 7,11 Seite 12, Zeile 9 - Seite 13, Zeile 15 -----	1-8
A	US 2006/176542 A1 (MURO MIKIO [JP] ET AL) 10. August 2006 (2006-08-10) Absätze [0165], [0214] - [0224] -----	1-8
A	US 2016/091799 A1 (RACHET BASTIEN [CH] ET AL) 31. März 2016 (2016-03-31) Absatz [0074] -----	1-8
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
29. November 2016		07/12/2016
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Verdrager, Véronique

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 20 2013 102039 U1 (PICOQUANT GMBH [DE]) 15. Mai 2014 (2014-05-15) Absatz [0023] -----	1-8
A	US 2012/257197 A1 (FELDKHUN DANIEL [US] ET AL) 11. Oktober 2012 (2012-10-11) Absatz [0116] -----	1-8
A	US 2014/307299 A1 (MATSUMOTO NAOYA [JP] ET AL) 16. Oktober 2014 (2014-10-16) Absätze [0056], [0074], [0102] -----	1-8
A	WO 2012/045318 A1 (UNIV HEIDELBERG [DE]; BRENNER KARL-HEINZ [DE]) 12. April 2012 (2012-04-12) Seite 1, Zeile 35 - Seite 2, Zeile 6; Abbildung 3 Seite 6, Zeilen 14-23 -----	1-8

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2016/000581

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2007023686	A1	01-02-2007	KEINE
WO 2014005193	A1	09-01-2014	KEINE
US 2006176542	A1	10-08-2006	EP 1662296 A1 31-05-2006 JP 2005084266 A 31-03-2005 US 2006176542 A1 10-08-2006 WO 2005024497 A1 17-03-2005
US 2016091799	A1	31-03-2016	EP 2389606 A2 30-11-2011 US 2011300490 A1 08-12-2011 US 2016091799 A1 31-03-2016 WO 2010084478 A2 29-07-2010
DE 202013102039	U1	15-05-2014	KEINE
US 2012257197	A1	11-10-2012	US 2012257197 A1 11-10-2012 WO 2012050901 A2 19-04-2012
US 2014307299	A1	16-10-2014	CN 103907048 A 02-07-2014 DE 112012004479 T5 14-08-2014 JP 5802109 B2 28-10-2015 JP 2013092687 A 16-05-2013 KR 20140084054 A 04-07-2014 US 2014307299 A1 16-10-2014 WO 2013061961 A1 02-05-2013
WO 2012045318	A1	12-04-2012	KEINE