



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2008 049 878 A1** 2010.04.01

(12)

## Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2008 049 878.5**

(22) Anmeldetag: **30.09.2008**

(43) Offenlegungstag: **01.04.2010**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **G02B 21/00** (2006.01)  
**G01N 21/64** (2006.01)

(71) Anmelder:  
**Carl Zeiss Microimaging GmbH, 07745 Jena, DE**

(72) Erfinder:  
**Kempe, Michael, Dr., 07751 Jena, DE; Krampert, Gerhard, Dr., 07743 Jena, DE; Kleppe, Ingo, Dr., 07743 Jena, DE; Wolleschensky, Ralf, 07743 Jena, DE**

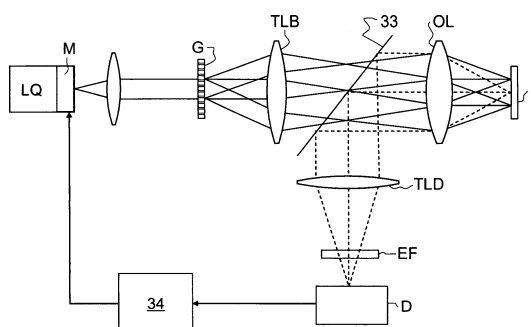
Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Verbesserte Verfahren und Vorrichtungen für die Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung**

(57) Zusammenfassung: Bei der Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung erfordert die mehrfache Aufnahme von Einzelbildern mit verschiedenen Phasenlagen der Strukturierung eine hohe Stabilität der optischen Anordnung und der Probe während der gesamten Messung. Auch muss die Strukturierung mit hoher Homogenität in die Probe abgebildet werden. Bei nichtlinearer Fluoreszenzanregung werden die Probe und deren Farbstoffe durch Bleichen belastet. Daneben hängt die Nichtlinearität außer von den Beleuchtungsbedingungen auch von den lokalen Umgebungsbedingungen in der Probe ab. Das kann zu lokal unterschiedlichen Nichtlinearitäten führen. Diese Effekte verschlechtern die Auflösung. Die Erfindung soll möglichst hohe Auflösungen ermöglichen.

Es wird die Einzelbildaufnahme optimiert, um im Ergebnisbild eine bestmögliche Auflösung auch bei problematischen Proben zu erreichen. Eine solche Optimierung kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen, beispielsweise durch Ermitteln einer optimalen Einstellung für mindestens einen Beleuchtungs- oder Aufnahmeparameter oder durch gepulste Beleuchtung derart, dass eine Anregung aus einem Triplettzustand des Fluoreszenzfarbstoffs in einen höheren Triplettzustand verringert wird, oder durch Beleuchtung der Probe mit Unterdrückungslicht zum Entvölkern eines Triplettzustands des Fluoreszenzfarbstoffs, was Bleichen vermeidet.

Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie.



## Beschreibung

**[0001]** Die Erfindung betrifft Verfahren und Vorrichtungen zur hochauflösenden Abbildung einer mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Probe mittels eines Mikroskops, wobei die Probe in mehreren Phasen sequentiell mit strukturiertem, gepulstem Anregungslicht beleuchtet und das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht pro Phase in ein jeweiliges strukturiertes Einzelbild aufgenommen wird, so dass aus den Einzelbildern ein Ergebnisbild mit erhöhter Auflösung rekonstruierbar ist.

**[0002]** Das Auflösungsvermögen von Mikroskopen ist aufgrund der Beugung des von der Probe aufgenommenen Lichts im Mikroskopobjektiv von dessen Apertur und von der Wellenlänge des Lichts abhängig. Da der verwendbare Wellenlängenbereich des sichtbaren Lichts endlich ist, ist das Auflösungsvermögen eines Mikroskops grundsätzlich begrenzt (Abbe 1873). Bezogen auf die abzubildenden Ortsfrequenzen der Probe bedeutet das, dass der Träger (engl. „support“) der optischen Übertragungsfunktion (engl. „optical transfer function“; OTF) des Mikroskops im Frequenzraum auf einen endlichen Bereich um den Koordinatenursprung begrenzt ist. In der Folge kann das Mikroskop nur solche Ortsfrequenzen abbilden, die in dem zentralen Intervall liegen, in dem der Träger nicht verschwindet.

**[0003]** Durch eine strukturierte Beleuchtung der Probe (engt. „structured illumination microscopy“; SIM) kann das Auflösungsvermögen lateral und axial etwa um einen Faktor zwei verbessert werden, wenn die Anregungsintensität der Beleuchtung und die Emissionsintensität der Probe linear zusammenhängen. Die SIM ist beispielsweise in US 5,671,085 offenbart. Sie beruht auf der Erzeugung einer räumlichen Lichtstruktur auf der zu untersuchenden Probe, beispielsweise durch sinusförmige Interferenz des Beleuchtungslichts hinter einem optischen Gitter. Aufgrund der Faltung der Anregungsstruktur mit der Punktbildfunktion des Mikroskopobjektivs im Ortsraum wird im Frequenzraum ein Bereich von Ortsfrequenzen der Probenstruktur, die außerhalb des Trägers der OTF liegen, in das zentrale Trägerintervall verschoben, wo sie die dortigen ursprünglichen Ortsfrequenzintensitäten überlagern. Die Lichtstruktur wird sequentiell in mehreren unterschiedlichen Phasenlagen erzeugt und in jeder Phasenlage jeweils ein Einzelbild aufgenommen. Aus den Einzelbildern, die die Überlagerungen der verschobenen und der ursprünglichen Ortsfrequenzen enthalten, kann mittels eines entsprechenden Gleichungssystems ein konsistentes Ergebnisbild rekonstruiert werden, das sowohl die ursprünglichen Ortsfrequenzen des Trägerintervalls als auch die ursprünglichen höheren, durch die strukturierte Beleuchtung zwischenzeitlich in das Trägerintervall verschobenen Ortsfrequenzen enthält. Dadurch hat das Ergebnisbild eine höhere Auf-

lösung als eine konventionelle Einfachaufnahme mit gleichförmiger Beleuchtung. Jedoch erfordert die mehrfache Aufnahme mit verschiedener Phasenlage und Orientierung der Strukturierung eine hohe Stabilität der optischen Anordnung und der Probe während der gesamten Messung. Zudem reduziert die notwendige Mehrfachaufnahme die effektive Bildwiederholfrequenz. Auch muss die Strukturierung mit hoher Homogenität (Frequenz- und Phasenkonstanz der Strukturierung) in die Probe abgebildet werden.

**[0004]** Eine erhebliche Verbesserung des Auflösungsvermögens kann erzielt werden, indem eine Anregung der Probe (mittels Beleuchtung oder auf andere Weise) derart erfolgt, dass ein nichtlinearer Zusammenhang zwischen der Anregungsintensität und der von der Probe emittierten Lichtintensität entsteht (engl. „saturated pattern excitation microscopy“; SPEM). Die SPEM ist beispielsweise in DE 199 08 883 A1 offenbart, deren Offenbarungsgehalt hier in vollem Umfang einbezogen wird. Im Fall der Fluoreszenzmikroskopie gelingt eine nichtlineare Anregung beispielsweise durch eine hohe Beleuchtungsintensität, die im Bereich der Beleuchtungsstruktur zu einer teilweisen Sättigung der Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs führt. Dadurch werden noch höhere Ortsfrequenzen von Objektstrukturen in das Intervall des Trägers der OTF verschoben als bei der SIM. Durch Berücksichtigung der nichtlinearen Wechselwirkung in dem zu lösenden Gleichungssystem können auch diese höheren Frequenzen rekonstruiert werden. Allerdings sind bei SPEM kleinere Phasenschritte und damit noch mehr Einzelbilder als bei SIM erforderlich. Die nichtlineare Probenwechselwirkung belastet die Probe und deren Farbstoffe durch Bleichen. Daneben hängt die Nichtlinearität außer von den Beleuchtungsbedingungen auch von den lokalen Umgebungsbedingungen in der Probe ab. Das kann dazu führen, dass an verschiedenen Stellen in der Probe deutlich unterschiedliche Nichtlinearitäten erreicht werden, was die Rekonstruktion des Ergebnisbilds erschwert. Unter Umständen können die Umgebungsbedingungen in der Probe so nachteilig für eine nichtlineare Wechselwirkung sein, dass die Anwendung der SPEM unmöglich ist.

**[0005]** Grundsätzlich ist bei SIM und SPEM die durch die Rekonstruktion erzielbare Auflösung durch das Signal-Rausch-Verhältnis (engl. „signal-to-noise ratio“; SNR) bei der Aufnahme der Einzelbilder begrenzt.

**[0006]** Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Verfahren und Vorrichtungen der eingangs genannten Art so zu verbessern, dass möglichst hohe Auflösungen erzielt werden können.

**[0007]** Die Aufgabe wird gelöst durch Verfahren beziehungsweise Vorrichtungen, welche die in den unabhängigen Ansprüchen angegebenen Merkmale

aufweisen.

**[0008]** Vorteilhafte Ausgestaltungen sind in den abhängigen Ansprüchen angegeben.

**[0009]** Kern der Erfindung ist die Optimierung der in den Einzelbildern enthaltenen Rohdaten, um im Ergebnisbild eine bestmögliche Auflösung auch bei problematischen Proben zu erreichen. Eine solche Optimierung kann erfindungsgemäß auf unterschiedlichen Wegen erfolgen.

**[0010]** Erfindungsgemäß wurde erkannt, dass die Auflösung bei SIM und SPEM unter anderem durch folgende Faktoren beeinträchtigt wird: Sowohl durch das optische System (beispielsweise in Form von Aberrationen) als auch durch die optischen Probeneigenschaften, vor allem von dickeren Proben, wird die Phase des Beleuchtungslichts und des Fluoreszenzlichts lokal verzerrt. Außerdem sinkt der Modulationskontrast der Strukturierung mit zunehmender Eindringtiefe in die Probe aufgrund von Streuung und Aberrationen durch lokale und globale Brechungsindex-Variationen, was als Fehlanpassung bezeichnet wird. Dieser Effekt hängt auch von der verwendeten Frequenz der Strukturierung ab. Niederfrequenter Modulationen lassen sich tiefer in die Probe abbilden, führen aber auf der anderen Seite auch zu einer geringeren Auflösung im Ergebnisbild. So ist je nach untersuchter Probe eine andere Kombination von Strukturierungsparametern (wie der relative Winkel und die relative Intensität der die Strukturierung durch Interferenz hervorrufenden Strahlanteile) erforderlich, um ein optimales Ergebnisbild zu erhalten. Bei bereits angeregten Farbstoffmolekülen besteht bei weiterer Anregung in einen höheren Energiezustand eine hohe Wahrscheinlichkeit für irreversibles Bleichen, was eine Verringerung des Signal-Rausch-Verhältnisses und damit eine verminderte Auflösung der Rekonstruktion zur Folge hat. Daneben ergibt sich sowohl bei zu geringer (Unterbelichtung) als auch bei zu großer (Überbelichtung) elektrischer oder elektronischer Verstärkung des aufgenommenen Fluoreszenzlichts ein geringer Bildkontrast, der die Rekonstruktion erschwert oder verhindert.

**[0011]** Erfindungsgemäß wird daher eine optimale Einstellung für mindestens einen Parameter der Beleuchtung und/oder mindestens einen Parameter der Aufnahme ermittelt, insbesondere für mindestens eine der Größen „Wellenlänge der Beleuchtung“, „Pulsabfolge der Beleuchtung“, „Wellenlängenbereich der Aufnahme“, „Belichtungszeit der Aufnahme“ und „Verstärkung der Aufnahme“. Eine Einstellung ist im Sinne der Erfindung ein- oder mehrdimensionaler Wert. Eine Einstellung ist optimal im Sinne der Erfindung, wenn eine vorgebbare Zielgröße bei dieser Einstellung ein Maximum oder zumindest einen vorgebbaren Schwellwert erreicht. Zielgrößen können unter anderem die Aufnahmezeit, das Sig-

nal-Rausch-Verhältnis oder der Dynamikumfang des detektierten Fluoreszenzsignals sein. Durch die erfindungsgemäße Optimierung kann die Fluoreszenzausbeute und damit das Signal-Rausch-Verhältnis mit geringem Aufwand verbessert und ein Bleichen der Probe vermindert werden. In der Folge wird die von dem Signal-Rausch-Verhältnis abhängige Auflösung verbessert. Daneben kann die Optimierung auch der Systemsicherheit dienen, da eine Beschädigung der bei der Aufnahme verwendeten Kameras durch Überbelichtung verhindert werden kann, indem deren Spezifikationen als Randbedingungen in die Optimierung einfließen. Unter dem Parameter „Pulsabfolge“ werden dabei die Pulsdauer und/oder die Pulswiederholfrequenz verstanden. Als Parameter „Verstärkung der Aufnahme“ kann beispielsweise ein einstellbarer Elektronenmultiplikationsfaktor (engl. „electron multiplication gain“; EM-Gain) optimiert werden.

**[0012]** Die optimale Einstellung kann vollautomatisch sowohl ermittelt als auch bei einer späteren Aufnahme von Einzelbildern verwendet werden. Alternativ kann sie in Art einer Halbautomatik auf Anforderung eines Benutzers ermittelt und als Vorgabe für eine freie Einstellung des Parameters durch einen Benutzer verwendet werden. Es ist auch denkbar, dass die optimierte Einstellung dem Benutzer lediglich zur Bestätigung vorgelegt wird, wobei er alternativ beispielsweise die Messung abbrechen kann. Selbstverständlich können in einem Optimierungsdurchgang für mehrere Parameter optimale Einstellungen ermittelt werden.

**[0013]** Die bei der Optimierung relevanten Größen lassen sich unterteilen in a priori bekannte oder bestimmbare Informationen und in solche Parameter, die erst in Art einer Rückkopplung anhand von aufgenommenen Bildern gewonnen werden können. A priori bekannt oder zumindest bestimmbar sind beispielsweise Farbstoffeigenschaften (Bleichrate, Schaltzyklen für eine SPEM-Anregung und Anregungs- und Emissionsspektren sämtlicher Bänder), Eigenschaften des Einbettmediums der Probe (Brechungsindex, Autofluoreszenzspektren) sowie die gewünschte Eindringtiefe. Dementsprechend wird die optimale Einstellung des zu optimierenden Parameters oder auch mehrerer zu optimierender Parameter vorzugsweise durch eine Rückkopplung anhand der Einzelbilder, anhand von zusätzlichen Zwischenbildern oder anhand eines Signals eines Punktdetektors, auf den ein Bruchteil des Fluoreszenzlichts ausgekoppelt wird, und durch Variation des Parameters ermittelt. So kann beispielsweise die Pulswiederholfrequenz anstelle einer groben Berechnung aus einer a priori bekannten Brechungsindex-Fehlanpassung der Probe mit höherer Genauigkeit durch Auswertung von Einzelbildern optimiert werden, indem mehrere Einzelbilder mit unterschiedlicher Pulswiederholfrequenz aufgenommen und analysiert

werden. Als Zwischenbilder werden im Sinne der Erfindung alle Bilder bezeichnet, die nicht bei einer späteren Rekonstruktion verwendet werden. Insbesondere können die Einzelbilder durch Integration aus mehreren Zwischenbildern zusammengesetzt sein, wenn deren Bildwiederholfrequenz entsprechend hoch ist. Sollen mehrere Parameter optimiert werden, muss die Variation entsprechend mehrdimensional durchgeführt werden.

**[0014]** In besonders bevorzugten Ausführungsformen erfolgt die Variation des Parameters bei im wesentlichen konstanter mittlerer Leistung des Anregungslichts, da eine Signalerhöhung, also ein verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis, dann nur durch verringertes Bleichen entstehen kann. Als konstante mittlere Leistung des Anregungslichts wird vorzugsweise eine solche verwendet, die auch bei der Aufnahme der zur Rekonstruktion zu verwendenden Einzelbilder eingesetzt wird.

**[0015]** Alternativ zur Variation und experimentellen Rückkopplung kann zum Ermitteln der optimalen Einstellung des Parameters, vorzugsweise unter Verwendung der bekannten a-priori-Informationen, eine Simulation von Beleuchtung, Antwort der Probe und Aufnahme durchgeführt werden. Zweckmäßigerweise wird auch hierbei eine Variation des zu optimierenden Parameters durchgeführt, um die optimale Einstellung zu ermitteln. Dadurch wird die Probe nicht belastet, da Bleichen vollständig vermieden wird. Dennoch kann die optimale Einstellung des zu optimierenden Parameters mit hoher Genauigkeit optimiert werden. Die Simulation ist insbesondere bei mehreren zu optimierenden Parametern vorteilhaft zur Probenschonung.

**[0016]** Vorzugsweise wird eine Einstellung als optimal ermittelt, wenn sich (insbesondere bei einer Variation) in einem Zwischenbild, in einem Einzelbild oder in dem Ergebnisbild bei dieser Einstellung ein maximales oder zumindest ein vorgegebenes Signal-Rausch-Verhältnis ergibt. Dadurch kann die Auflösung des Ergebnisbilds automatisch maximiert beziehungsweise vom Benutzer beeinflusst werden. Aufgrund der Abhängigkeit des Auflösungsvermögens der SIM- und SPEM-Verfahren ist ein möglichst großes Signal-Rausch-Verhältnis in den Einzelbildern essentiell für eine möglichst artefaktfreie Rekonstruktion.

**[0017]** Zweckmäßig sind darüber hinaus Ausführungsformen, in denen beim Ermitteln der optimalen Einstellung eine vorgegebene Gewichtung weiterer Optimierungsziele neben einer Gewichtung für das Signal-Rausch-Verhältnis berücksichtigt wird. Der Benutzer kann so Prioritäten für die Optimierung festlegen. Beispielsweise kann die Optimierung primär auf eine kurze Aufnahmezeit und nur sekundär auf ein maximales Signal-Rausch-Verhältnis durchge-

führt werden. Ein weiteres mögliches Optimierungsziel, das primär oder in einer niedrigeren Rangfolge verfolgt werden kann, ist eine möglichst volle Aussteuerung des Dynamikbereichs der aufnehmenden Kamera.

**[0018]** In einer ersten alternativen Ausprägung der Rückkopplung erfolgt die Aufnahme des Fluoreszenzlichts für die Optimierung alternativ oder zusätzlich zur Aufnahme der Einzelbilder in Zwischenbilder, vorteilhafterweise mit einer Bildwiederholfrequenz, die etwa der Bildwiederholfrequenz bei der Aufnahme der Einzelbilder entspricht, so dass das Fluoreszenzlicht über eine Vielzahl von Pulsabfolgezyklen integriert wird.

**[0019]** In einer zweiten alternativen Ausprägung der Rückkopplung erfolgt die Aufnahme des Fluoreszenzlichts in Zwischenbilder vorteilhafterweise mit einer signifikant höheren Bildwiederholfrequenz als bei der Aufnahme der Einzelbilder. Die hohe Bildwiederholfrequenz ermöglicht eine feinere Analyse des Anregungs- und Emissionsverhaltens der Probe. Durch Aufsummierung von Zwischenbildern können Zwischenbilder oder auch Einzelbilder mit längeren Belichtungszeiten berechnet werden. Dabei können Zwischenbilder mit unterschiedlichen Belichtungszeiten zweckmäßigerweise mittels eines Rechners normiert werden.

**[0020]** Es ist vorteilhaft, in Verbindung mit der hochfrequenten Aufnahme von Zwischenbildern mittels eines lokal variablen Bildgebers die Pulsabfolge lokal, insbesondere pixelweise, zu variieren. Als Bildgeber können beispielsweise räumliche Lichtmodulatoren (engl. „spatial light modulator“; SLM) wie Mikrospiegelfelder (engl. „digital micro-mirror device“; DMD), Flüssigkristallanzeigen (engl. „light crystal display“; LCD) oder LCoS (engl. „liquid crystal on silicon“) verwendet werden. Ein Bildgeber ist zweckmäßigerweise in einer Zwischenbildebene des Beleuchtungsstrahlengangs angeordnet. Neben einer globalen Variation der Pulsabfolge im gesamten Beleuchtungsfeld kann mit der lokalen Variation nicht nur im Rahmen der rückgekoppelten Optimierung die Pulsabfolge an unterschiedliche lokale Gegebenheiten auf der Probe (beispielsweise mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gefärbte Regionen) angepasst, sondern auch die Dynamik der Einzelbilder erweitert werden. Die Dynamik kann global oder lokal bis zu einer vollen Aussteuerung der aufnehmenden Kamera oder sogar darüber hinaus erweitert werden. Die Dynamikerweiterung gelingt insbesondere durch Rückkopplung mit Mittelwerten ganzer Zwischenbilder oder mit Regionen oder Pixeln von Zwischenbildern oder mit auch Einzelbildern. Beispielsweise kann bei der Aufnahme von Zwischenbildern, die zu einem Einzelbild aufsummiert werden, die Beleuchtung und/oder die Bildaufnahme (Belichtung) in einer Region oder in einem Pixel beendet werden, wenn ein

ausreichendes Signal-Rausch-Verhältnis bei minimalem Bleichen oder aber ein vorgegebener Intensitätsschwellwert erreicht ist, während die Beleuchtung/Bildaufnahme auf dem Rest der Probe fortgesetzt wird. Die sich auf diese Weise ergebenden Beleuchtungs- und Belichtungsvariationen werden zweckmäßigerweise mit den aufgenommenen Bild- daten gespeichert. Einzelbilder, bei denen während ihrer Aufnahme die Pulsabfolge variiert wurde, werden in ihrem Dynamikumfang vor der Rekonstruktion des Ergebnisbilds erweitert, indem sie anhand der gespeicherten Variationsinformation entsprechend der Variation der Pulsabfolge hinsichtlich ihrer Intensität korrigiert werden. Die gespeicherte Information über die erweiterte Dynamik kann unter Berücksichtigung der Dynamik des jeweiligen Visualisierungsmediums auch für eine optimale Wiedergabe genutzt werden. Eine globale oder lokale Erweiterung der Dynamik, insbesondere mittels eines lokal variablen Bildgebers kann auch unabhängig von der Optimierung durchgeführt werden.

**[0021]** Auf einen zusätzlichen Bildgeber kann vorteilhafterweise verzichtet werden, indem mittels desselben Bildgebers sowohl die Variation der Pulsabfolge als auch die Strukturierung des Anregungslichts erzeugt wird.

**[0022]** Es ist vorteilhaft, während der Aufnahme ein Messabbruchkriterium zu prüfen, während der Messung anzuzeigen und die Aufnahme bei Erfüllung des Messabbruchkriteriums zu beenden oder zumindest zu vereinfachen, da die erfindungsgemäßen Verfahren relative lange dauern. Als Vereinfachung kann beispielsweise während einer SPEM-Messung auf eine reine SIM-Messung umgeschaltet werden, wenn anhand einer Rückkopplung mit Zwischen- oder Einzelbildern ermittelt wird, dass bei der Anregung kein ausreichender Grad an Nichtlinearität erzielt wird.

**[0023]** Vorteilhafterweise wird als Messabbruchkriterium geprüft wird, ob ein Modulationskontrast kleiner ist als ein vorgegebener Kontrastschwellwert oder ob eine Bewegungsweite der Probe größer als ein Bewegungsschwellwert ist. Der Modulationskontrast kann beispielsweise fortlaufend in allen Zwischen- oder Einzelbildern bestimmt werden. Eine Bewegung der Probe kann beispielsweise durch Drift entstehen. Eine Bewegungswarnung kann beispielsweise aus Korrelationen der Zwischen- oder Einzelbilder zueinander gewonnen werden, wobei die Modulationsfrequenz der strukturierten Beleuchtung vorher aus den Bildern herausgefiltert werden muss, um die gewollte Änderung der Phasenlage zu erhalten. Eine andere Möglichkeit zur Identifikation und Analyse von Probenbewegungen ist die zeitgleiche Aufnahme von Bildern mit differentiellm Interferenzkontrast (engl. „differential interference contrast“; DIC) im Durchlicht. Dies ist insbesondere bei Untersuchungen an lebenden Zellen vorteilhaft.

**[0024]** Die erfindungsgemäßen Optimierungen müssen nicht an regulären Proben durchgeführt werden, sondern können auch besonders vorteilhaft an Testpräparaten durchgeführt werden, anhand derer die optimale(n) Einstellung(en) als a-priori-Information für die Bildaufnahme an regulären Proben gewonnen werden können. Für die strukturierte Beleuchtung besonders vorteilhafte Testpräparate sind homogene, optisch dünne (weniger als 100 nm dicke) Multifarb-Farbstofffilme ohne Brechungsindex-Fehlanpassung zur Immersionsflüssigkeit des Objektivs, also ohne Interferenzen, und Testproben mit Multifarbperlen einer Größe zwischen 200 nm und 500 nm. Insbesondere die Optimierung des Modulationskontrastes und der Phasenkonstanz der Strukturierung ist mit den Farbstofffilmen besonders gut möglich, während die Perlentestproben für eine Kalibrierung der Kolokalisation in mehreren Farbkana- len vorteilhaft sind.

**[0025]** Erfindungsgemäß wurde weiter erkannt, dass die Empfindlichkeit von Farbstoffmolekülen im angeregten Zustand verringert werden kann, indem die Beleuchtung raumzeitlich mit einer derartigen Pulsabfolge erfolgt, dass eine Anregung aus einem (insbesondere untersten) Triplettzustand des Fluoreszenzfarbstoffs in einen höheren Triplettzustand verringert wird. Dadurch wird eine Anregung von noch angeregten Molekülen minimiert und so ein Bleichen verhindert. Eine solche Bildaufnahmetechnik ist in DE 10 2006 011 176 A1 für die Mikroskopie mit stimulierter Emission und Unterdrückung (engl. „stimulated emission depletion“; STED) veröffentlicht. Falls die notwendigen hohen Spitzenintensitäten für SPEM durch gepulste Laser erreicht werden, wird erfindungsgemäß für die Benutzung der T-REX Technik bei SPEM die Pulswiederholfrequenz des Lasers so weit verringert, dass bis zum jeweils nächsten Laserpuls die überwiegende Anzahl der angeregten Farbstoffmoleküle bereits wieder in den Singulett-Grundzustand relaxiert ist. Falls die notwendigen Spitzenintensitäten durch eine strukturierte Linienbeleuchtung (engl. „structured line illumination microscopy“; SLIM) gemäß DE 10 2007 047 468 A1, deren Offenbarungsgehalt hier in vollem Umfang einbezogen wird, erreicht werden, muss diese Linie durch Abtastung (engl. „scanning“) so schnell über die Probe bewegt werden, dass die Verweilzeit der Linie auf einem Ort so gering wird, dass ein Farbstoffmolekül pro Durchgang der Linie im Mittel nur einmal angeregt wird. Falls die Geschwindigkeit der Abtastbewegung dazu nicht ausreicht, kann das schnelle Abtasten durch ein zusätzliches fortlaufendes An- und Ausschalten des Lasers während des Abtastens (engl. „blanking“) als Teil der Pulsabfolge ergänzt werden, um die Weiteranregung von bereits angeregten Farbstoffmolekülen zu verhindern.

**[0026]** Vorzugsweise wird eine Pulsabfolge verwendet, die zwischen den Pulsen des Anregungslichts

eine Anregungspause von einer oder mehreren Mikrosekunden aufweist. Die optimale Pulsabfolge und, im Falle einer abtastenden Linienbeleuchtung, gegebenenfalls die optimale Abtastgeschwindigkeit können insbesondere mit den oben beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren automatisch oder halbautomatisch ermittelt werden.

**[0027]** Erfindungsgemäß wurde weiter erkannt, dass Bleichen außer durch gepulste Anregung auch durch zusätzliches Beleuchten der Probe mit Unterdrückungslicht zum Entvölkern eines (insbesondere untersten) Tripletzustands des Fluoreszenzfarbstoffs vermieden werden kann. Durch aktives Entvölkern von Tripletzuständen mittels einer geeigneten Laserbeleuchtung bei einer zweiten Wellenlänge (Eggeling et al. in ChemPhysChem 2008, 9, 612–624; Mondal in Appl. Phys. Lett. 92, 013902, 2008). Dazu wird beispielsweise eine zweite Lichtquelle in den Strahlengang eingekoppelt. Dies kann simultan zur Anregung erfolgen, wenn das Unterdrückungslicht detektionsseitig von der Fluoreszenz abgetrennt wird.

**[0028]** Zweckmäßigerweise wird das Unterdrückungslicht in gleicher Weise strukturiert wie das Anregungslicht, was die Probe schont.

**[0029]** Vorteilhafterweise wird Unterdrückungslicht mit einer Energiedichte von einem oder mehreren MW/cm<sup>2</sup> verwendet. Bisher durchgeführte Experimente und Simulationen deuten darauf hin, dass für eine wirksame Unterdrückung derart hohe Intensitätswerte für die Entvölkerungsstrahlung erforderlich sind. Solche Intensitäten werden vorzugsweise mit linienförmiger Beleuchtung erzielt.

**[0030]** Erfindungsgemäß wurde weiter erkannt, dass die Genauigkeit der Rekonstruktion des Ergebnisbilds und damit die erreichbare Auflösung verbessert werden kann, indem Zwischenbilder aufgenommen werden, anhand derer ein Umfang eines durch die Beleuchtung bewirkten Bleichens des Fluoreszenzfarbstoffs ermittelt wird, und indem vor der Rekonstruktion des Ergebnisbilds die Einzelbilder rechnerisch entsprechend des ermittelten Umfangs korrigiert werden. Die Berücksichtigung des Bleichverhaltens ermöglicht auch bei schwierigen Proben eine Rekonstruktion mit erhöhter Auflösung. Zwar ist Bleichen bei strukturierter Beleuchtung ein durch die Probe und die Beleuchtung räumlich moduliertes Problem. Gerade dies kann erfindungsgemäß aber zu speziellen Korrekturen genutzt werden. In dem Gleichungssystem, dass die Überlagerung von der Ortsfrequenzen der Probe mit der Modulationsfrequenz der strukturierten Beleuchtung beschreibt, kann das Bleichen als weitere Unbekannte berücksichtigt werden. Um das Gleichungssystem lösen zu können, sind kleinere und dementsprechend mehr Phasenschritte notwendig.

**[0031]** Vorzugsweise werden die Zwischenbilder vor der Aufnahme der Einzelbilder oder jeweils ein Zwischenbild zwischen zwei Einzelbildern aufgenommen, wobei die Probe strukturiert oder gleichförmig beleuchtet wird. Werden bei äquidistanten Phasenschritten (von beispielsweise 60° bei fünf Phasenbildern für eine Gitterrichtung) zwischen zwei Einzelaufnahmen alle Zwischenbilder aufsummiert, sollte im Idealfall ein strukturierungsfreies Summenbild resultieren. Jede Reststrukturierung bei der Strukturierungsfrequenz stammt bei korrekten Phasenschritten (was an einer bleichresistenten Testprobe verifiziert werden kann) von Bleichen und kann für alle folgenden Bilder vor der Rekonstruktion in den Einzelbildern korrigiert werden. Alternativ kann auch in regelmäßigen Abständen während der Aufnahme der Einzelbilder jeweils ein Bild ohne Strukturierung aufgenommen und das gleiche Korrekturverfahren angewandt werden. Beispielsweise kann zwischen zwei Aufnahmen mit veränderter Phasenlage (Position) des Gitters eine Aufnahme ohne Gitter aufgenommen werden. Da in guter Näherung bei nicht zu dicken Proben das Bleichen unabhängig von der Fokusposition ist, kann dieses Verfahren auch bei Aufnahme eines z-Stapels zur Anwendung kommen, wo typischerweise zwischen zwei Gitterbewegungen der gesamte axiale Abtastbereich abgefahren wird. Zur Prüfung der Bleichkorrektur können alle korrigierten Einzelbilder aufsummiert werden. Die Korrektur war erfolgreich, wenn im Summenbild eine konstante Intensität vorliegt.

**[0032]** Vorzugsweise werden für jede Gitterstellung und Fokusposition die Zwischenbilder mit einer höheren Bildwiederholfrequenz aufgenommen werden als die Einzelbilder und das Bleichen aus einem Abfall einer Intensität des Fluoreszenzlichts pixelweise ermittelt. Dies kann in direkter Kombination mit der erfindungsgemäßen lokalen oder globalen Parameteroptimierung geschehen. In der Rekonstruktion werden in diesem Fall die über alle zu einer Gitter- und Fokusstellung gehörenden, gemittelten Bilder nach Korrektur des Bleicheffektes (unter Berücksichtigung aller vorhergehenden Aufnahmeschritte) miteinander verrechnet. Es ist auch möglich, den Bleicheffekt nach der Bestimmung unmittelbar bei den nachfolgenden Aufnahmen (Zwischenbilder und/oder Einzelbilder) zu korrigieren.

**[0033]** Vorzugsweise erfolgt die rechnerische Korrektur des Bleichens im Fourierraum mit der entsprechenden Amplitude.

**[0034]** Erfindungsgemäß wurde weiter erkannt, dass auch durch Ermitteln eines Umfangs einer optischen Aberration der Einzelbilder anhand mindestens eines Referenzbilds und rechnerisches Korrigieren der Einzelbilder entsprechend des ermittelten Umfangs vor der Rekonstruktion des Ergebnisbilds die Genauigkeit der Rekonstruktion und damit die er-

reichbare Auflösung verbessert werden kann. Auch hier können gerade die aus der Strukturierung resultierenden Bildeigenschaften vorteilhaft zur Korrektur genutzt werden.

**[0035]** Vorzugsweise wird der Umfang der Aberration anhand einer Verzeichnung des Strukturierungsmusters, insbesondere einer Deformation und/oder einer räumlichen Phasenänderung, ermittelt. Aus der Verzeichnung des Strukturierungsmusters kann auf feldabhängige Aberrationen geschlossen werden, die nach Auswertung der Gitterstruktur zur Korrektur des gesamten Bildes genutzt werden können.

**[0036]** Vorteilhafterweise wird für eine Aufnahme des Referenzbilds ein Referenzanregungslicht mit einer moderaten Strukturierungsortsfrequenz verwendet, vorzugsweise einer geringeren Strukturierungsortsfrequenz als bei der Aufnahme der Einzelbilder. Dadurch wird unter der Annahme, dass die Nichtlinearität bei SPEM bei niedrigen und hohen Modulationsfrequenzen gleich ist, die Problematik einer geringen Modulationstiefe bei hohen Ortsfrequenzen vermieden.

**[0037]** Vorzugsweise erfolgt die Strukturierung des Anregungslichts mittels dreier Beugungsordnungen, wobei das Referenzbild ermittelt wird, indem Ortsfrequenzen knapp oberhalb einer Ortsfrequenz einer Interferenz aller drei Beugungsordnungen gefiltert werden. Bei Verwendung von 0. und  $\pm 1$ . Beugungsordnung in der Beleuchtung zur Erzeugung der Strukturierung entsteht im Bild neben einer Strukturierung bei der hohen Raumfrequenz (Interferenz der  $\pm 1$ . Ordnungen) auch eine Strukturierung bei der halben Raumfrequenz (Interferenz von 0. und  $\pm 1$ . Ordnung). Nach Filterung aller Raumfrequenzen knapp oberhalb der geringeren Strukturierungsfrequenz hat steht somit ein geeignetes Bild zur Korrektur der Aberrationen zur Verfügung.

**[0038]** Zweckmäßigerweise erfolgt die Fluoreszenzanregung für SPEM derart, dass sich eine nichtlineare Beziehung zwischen Anregungsintensität und Fluoreszenzintensität ergibt. Insbesondere kann ein photoschaltbarer Fluoreszenzfarbstoff wie Dronpa zum Erreichen einer Nichtlinearität verwendet und ein pH-Wert und/oder eine Sauerstoffkonzentration und/oder eine Probenfixierung hinsichtlich eines Schaltkontrastes des Fluoreszenzlichts optimiert werden. Für SPEM ist der Schaltkontrast die maßgebliche Größe für die erreichbare Auflösung. Erfindungsgemäß wurde erkannt, dass der pH-Wert, die Sauerstoffkonzentration und die Art und Weise der Probenfixierung wiederum entscheidend für den Schaltkontrast sind. Aus dem Rekonstruktionsalgorithmus für die strukturierte Beleuchtung kann die Amplitude der durch die Nichtlinearität erzeugten höheren Ordnungen der Modulation ermittelt werden. Diese ist ein Maß dafür wie optimal diese Parameter

(pH-Wert, Fixierung) gewählt wurden. Durch eine Probenpräparationsreihe können nun diese Parameter im Hinblick auf einen maximalen Schaltkontrast optimiert werden.

**[0039]** Trotz dieser Optimierung können die Bedingungen für die nichtlineare Wechselwirkung an verschiedenen Stellen der Probe unterschiedlich sein. In einer ersten alternativen Ausgestaltung wird die Beleuchtung für die Aufnahme der Einzelbilder daher erfindungsgemäß lokal, insbesondere pixelweise, variiert. Durch eine solche räumliche (beziehungsweise für verschiedene Einzelbilder zeitliche) Anpassung kann zeitlich durchgehend und räumlich an allen Stellen die optimale Nichtlinearität erreicht wird, da die Nichtlinearität außer von den Umgebungsbedingungen auch von den Beleuchtungsbedingungen, nämlich insbesondere der Anregungsintensität und der Intensität des Aktivierungslasers, abhängt.

**[0040]** In einer zweiten alternativen Ausgestaltung erfolgt die Strukturierung mit einer derart niedrigen Modulationsfrequenz, dass auch noch Vielfache dieser Frequenz in einen Übertragungsbereich eines Mikroskopobjektivs des Mikroskops fallen. Es wird dann eine Amplitude von Oberwellen in der Probe ermittelt und in einem Kriterium für eine optimale Einstellung eines Parameters, insbesondere für mindestens eine der Größen „Wellenlänge der Beleuchtung“, „Pulsabfolge der Beleuchtung“, „Wellenlängenbereich der Aufnahme“, „Belichtungszeit der Aufnahme“ und „Verstärkung der Aufnahme“, verwendet. Dieses Vorgehen kann als Modulationszoom bezeichnet werden. Da durch die nichtlineare Probenwechselwirkung Oberwellen (Harmonische) der Modulationsfrequenz in der Probe erzeugt werden und vom Objektiv auch übertragen werden können, kann die Amplitude dieser Oberwellen im Bild vorteilhaft als Maß für optimale SPEM-Bedingungen verwendet werden. Das Ermitteln der Oberwellenamplitude mittels Modulationszoom erfordert deutlich weniger Zwischenbilder als die Informationsgewinnung mittels des Rekonstruktionsalgorithmus und reduziert damit die Probenbelastung.

**[0041]** Die Ermittlung der Oberwellenamplitude mittels des Rekonstruktionsalgorithmus hat dagegen den Vorteil, dass am Mikroskop keine Veränderung der Modulationsfrequenz hin zu sehr kleinen Frequenzen implementiert sein muß, sondern dass lediglich fixe Modulationsfrequenzen benötigt werden. Die Optimierung der Beleuchtungsparameter muss dabei nicht global über das ganze Bild erfolgen, sondern kann auch lokal durchgeführt werden. Für den Fall der räumlich optimalen Aktivierung (Photoschalter) beziehungsweise Anregung muss dazu die Auswertung mit dem SPEM-Algorithmus in mehreren interessierenden Probenregionen (engl. „region of interest“; ROI) erfolgen und in diesen müssen die Beleuchtungsintensitäten entsprechend angepasst wer-

den oder für die Modulationszoomtechnik die Auswertung der Amplituden der Oberwellen in mehreren ROI durchgeführt werden.

**[0042]** Erfindungsgemäß wurde weiter erkannt, dass in der SPEM das Signal-Rausch-Verhältnis und damit die erreichbare Auflösung erhöht werden können, indem in der Probe enthaltene Radikale, die chemisch mit dem angeregten Fluoreszenzfarbstoff reagieren können, chemisch der Umgebung des Fluoreszenzfarbstoffs und/oder der Probe entzogen werden. Dies ermöglicht es, die Umgebungsabhängigkeit des nichtlinearen Effektes und dessen Variabilität so zu beeinflussen, dass SPEM in inhomogenen Proben möglich ist. Die hohen örtlichen beziehungsweise zeitlichen Spitzenintensitäten bei SPEM führen zu einem verstärkten Bleichen der Farbstoffe. Dieses Bleichen wird hauptsächlich durch chemische Reaktionen aus den angeregten Zuständen (Singulett- und Triplettzustände) verursacht. Da alle Farbstoffmoleküle in diesen angeregten Zuständen besonders empfindlich für zerstörerische chemische Reaktionen mit ihrer Umgebung sind, kann das Bleichen reduziert und damit das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert werden, indem besonders reaktive Umgebungsmoleküle (Radikale) durch chemische Verfahren aus ihrer Umgebung entfernt werden.

**[0043]** Vorteilhafterweise werden die Radikale, beispielsweise Sauerstoffradikale, zum Entziehen enzymatisch abreagiert und dadurch der Probe entzogen. Auch für andere Radikale sind in der chemischen Fachliteratur entsprechende Reaktionen beschrieben. Eine Kombination von solchen Radikalentzugsreaktionen zur Probenpräparation wurde unter dem Namen ROXS [Sauer et al., Photonics West 2008, Talk 6862–20] beschrieben.

**[0044]** Besonders bevorzugt sind Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Verfahren, in denen die Probe mit einer strukturierten Linienbeleuchtung angeregt wird. Dies ermöglicht die Verwendung hoher Anregungsleistungen.

**[0045]** Dabei wird eine Intensität der Linienbeleuchtung vorteilhafterweise so angepasst, dass ein Dynamikbereich einer aufnehmenden Kamera voll ausgenutzt wird, wobei die Intensität zeilenweise gespeichert wird. Ein hoher Dynamikumfang bedeutet ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis und damit eine hohe erreichbare Auflösung.

**[0046]** Vorzugsweise wird das Fluoreszenzlicht konfokal detektiert, insbesondere mittels eines Laser-Scanning-Mikroskops. Dadurch wird außerfokales Licht wirksam diskriminiert und somit das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert. Durch die Kombination von konfokaler Detektion mit strukturierter Linienbeleuchtung wird für die Rückkopplung möglicherweise störender Untergrund bereits bei der Bild-

aufnahme reduziert.

**[0047]** Alle erfindungsgemäßen Verfahren können miteinander kombiniert werden.

**[0048]** Nachfolgend wird die Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

**[0049]** In den Zeichnungen zeigen:

**[0050]** [Fig. 1](#) eine schematische Darstellung eines Weitfeldmikroskops,

**[0051]** [Fig. 2](#) eine schematische Darstellung eines Strahlengangs eines weiteren Weitfeldmikroskops,

**[0052]** [Fig. 3](#) eine schematische Darstellung eines Laser-Scanning-Mikroskops,

**[0053]** [Fig. 4](#) ein Pseudo-Flussdiagramm des grundlegenden, auf Rückkopplung und Nachregelung basierenden Optimierungsverfahrens,

**[0054]** [Fig. 5](#) ein Pseudo-Flussdiagramm eines beispielhaften Optimierungsverfahrens,

**[0055]** [Fig. 6](#) eine schematische Darstellung eines weiteren Weitfeldmikroskops mit zeitlich und räumlich modulierter Anregung und Rückkopplung zur Optimierung und

**[0056]** [Fig. 7](#) eine schematische Darstellung eines weiteren Weitfeldmikroskops mit faseroptischem Strukturierungsmodul und lokaler Beleuchtungsvariation.

**[0057]** In allen Zeichnungen tragen übereinstimmende Teile gleiche Bezugszeichen.

**[0058]** [Fig. 1](#) zeigt den Strahlengang einer exemplarischen Anordnung für die Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie, worin die erfindungsgemäß verbesserten SIM- und SPEM-Verfahren verwendet werden können, in einer schematischen Darstellung. Die Probe **2** ist auf einem positionierbaren Probenhalter **3** vor dem Mikroskopobjektiv **5** angebracht. Eine Maske mit Phasenstrukturen gemäß DE 10 2007 047 466 A1, deren Offenbarungsgehalt hier in vollem Umfang einbezogen wird, ist als Strukturierungsmodul **7** in der Nähe der Pupille **9** des Mikroskopobjektives OL oder einer dazu konjugierten Ebene angeordnet, um auf beziehungsweise in der Probe **2** eine strukturierte Lichtverteilung zu erzeugen. Die Maske des Strukturierungsmoduls **7** kann mit einem Aktuator **17** bewegt werden, wobei es sich um einen Schrittmotor zur Rotation der Maske oder auch einen Linearantrieb handeln kann. Ein Schrittmotor kann dabei eine runde Maske direkt oder aber indirekt, über ein Getriebe oder eine andere mechanische Einheit antreiben. Ein Bildgeber **19**, beispielsweise ein LCD, steht als zeitli-



cher und räumlicher optischer Modulator in einer durch die Tubuslinse TLB erzeugten Zwischenbildebene ZB, welche konjugiert zur Probenebene ist. Die Lichtquelle LQ beleuchtet das Element **19** und kann zum Beispiel ein Laser, eine LED, eine Quecksilber-Hochdrucklampe oder eine konventionelle Glühlampe sein. Zusätzlich kann eine optionale Kollimationsoptik **27** vorgesehen werden. Die Lichtquelle LQ kann monochromatisch sein oder mehrere Wellenlängen simultan oder auch zeitsequentiell emittieren. Bei einer bevorzugten Implementierung der Erfindung befindet sich die Phasenmaske des Strukturierungsmoduls **7** in oder in der Nähe der Pupille **9** des Objektivs. Konstruktionsbedingt ist die Pupille zwar bei vielen Mikroskopobjektiven nicht direkt zugänglich. In diesem Fall kann jedoch eine Zwischenabbildung mit einer Relais-Optik (engl. „relay optics“) in eine frei zugängliche Zwischenbildebene erfolgen, in deren Nähe die Phasenmaske des Strukturierungsmoduls **7** angeordnet werden kann. In Abhängigkeit davon, wie weit sich die Phasenmaske **7** von der Pupillenebene entfernt befindet, wird sich der Durchmesser der einzelnen Beugungsordnungen mit dem Abstand zur Pupillenebene vergrößern. Mittels des Bildgebers **19** kann das von der Lichtquelle LQ emittierte Licht einerseits zeitlich in eine Pulsabfolge zur Fluoreszenzanregung und andererseits quer zur optischen Achse zweidimensional pixelweise untergliedert werden. Des Weiteren ist hinter einer Tubuslinse TLD ein ortsauflösendes Detektorfeld **32**, beispielsweise ein CCD, als Kamera zur Bildaufnahme vorgesehen. Bei der hier beschriebenen Anordnung für die Fluoreszenzdetektion sind ein Hauptfarbteiler **33** zur Trennung von Fluoreszenzlicht und Anregungslicht sowie ein Emissionsfilter EF vorgesehen.

**[0059]** **Fig. 2** zeigt die Strahlengänge in einem Weitfeldmikroskop, bei dem die Beleuchtungsstruktur als Abwandlung der Anordnung nach **Fig. 1** mittels eines Strukturierungsmoduls erzeugt wird, das ein starres Gitter G umfasst, das in mehrere unterschiedliche Phasenlagen verschiebbar oder verdrehbar ist. Die Lichtquelle LQ ist zur Fluoreszenzanregung gepulst oder mit einem schnellen optischen Modulator M ausgerüstet, wobei die Pulsabfolge in beiden Fällen von der Steuereinheit **34** gesteuert wird. Der gezeichnete Strahlverlauf ist beispielhaft und kann durch andere Strahlengänge ersetzt werden, um eine Weitfeldbeleuchtung und -detektion, wie sie dem Fachmann geläufig ist, oder einen konfokalen Strahlengang eines Scanning-Mikroskopes oder eines Mikroskopes mit parallel konfokaler Beleuchtung- und Detektion wie bei der Verwendung von Nipkowscheiben, darzustellen.

**[0060]** **Fig. 3** zeigt eine exemplarische Anordnung, worin die erfindungsgemäß verbesserten SIM- und SPEM-Verfahren ebenfalls verwendet werden können, für die abtastende Fluoreszenzmikroskopie mittels eines Laser-Scanning-Mikroskops (LSM) in

schematischer Darstellung. Das LSM wird mittels einer Steuereinheit **34** gesteuert wird. Das LSM ist modular aus einem Beleuchtungsmodul L mit Lasern als Lichtquellen LQ, einem Abtastmodul S (engl. „scanning module“), einem Detektionsmodul D und der Mikroskopeinheit MI mit dem Mikroskopobjektiv OL zusammengesetzt. Das Licht der Laserlichtquellen LQ kann durch Lichtklappen **24** und Abschwächer **25** von der Steuereinheit **34** zum Zweck einer gepulsten Beleuchtung beeinflusst werden, bevor es über Lichtleitfasern und Koppeloptiken **20** in die Abtasteinheit S eingespeist und hinter einer Zylinderoptik **35** und einem Strukturierungsmodul **7** vereinigt wird. Das Strukturierungsmodul **7** kann beispielsweise verschiebbar oder verdrehbar als Gitter oder Phasenmaske für eine Aufnahme in mehreren Phasenstufen (Phasenschritten) ausgebildet sein. Die Zylinderoptik dient der Strahlformung für eine linienförmige Beleuchtung. Über den Hauptstrahlteiler **33** und die X-Y-Abtasteinheit **30**, die zwei Galvanometerspiegel aufweist (nicht dargestellt), gelangt das Beleuchtungslicht durch das Mikroskopobjektiv OL zur Probe **22**, wo es ein linienförmiges Fokusvolumen (nicht abgebildet) beleuchtet. Von der Probe emittiertes Fluoreszenzlicht gelangt durch das Mikroskopobjektiv **21** über die Abtasteinheit **30** durch den Hauptstrahlteiler **30** in das Detektionsmodul D. Zur Fluoreszenzdetektion kann der Hauptstrahlteiler **30** beispielsweise als dichroitischer Farbteiler ausgebildet sein. Das Detektionsmodul D weist mehrere Detektionskanäle mit jeweils einer Schlitzblende **31**, einem Filter **28** und einem zeilenförmigen (linearen) Detektorfeld **32** (engl. „detector array“) mit mehreren Detektionselementen auf. Die Detektionskanäle sind durch Farbteiler **29** separiert. Die konfokalen Schlitzblenden **31** dienen der Diskriminierung von Probenlicht, das nicht aus dem Fokusvolumen stammt. Die Detektorfelder **32** detektieren daher ausschließlich Licht aus dem Fokusvolumen. Das konfokal beleuchtete und aufgenommene Fokusvolumen der Probe **22** kann mittels der Abtasteinheit **30** über die Probe **22** bewegt werden, um mittels der Detektoren **32** als Kamera pixelweise ein Bild aufzunehmen, indem die Galvanometerspiegel der Abtasteinheit **30** gezielt verdreht werden. Sowohl die Bewegung der Galvanometerspiegel als auch das Schalten der Beleuchtung mittels der Lichtklappen **24** oder der Abschwächer **25** werden unmittelbar von der Steuereinheit **34** gesteuert. Die Datenaufnahme von den Detektorfeldern **32** erfolgt ebenfalls über die Peripherieschnittstelle **4**.

**[0061]** Um die Fluoreszenzausbeute sowie das Signal-Rausch-Verhältnis zu erhöhen und Bleichen zu vermeiden, ist es zweckmäßig, eine kurze, gepulste Anregung im Bereich von einigen Nanosekunden zu verwenden, wobei zwischen den Anregungspulsen eine Pause von einigen Mikrosekunden besteht. Dadurch kann eine Verringerung der Anregung aus dem untersten Tripletzustand in höhere Tripletzustände erzielt werden. Die Kamera zur Bildaufnahme inte-

griert dabei mit üblichen Belichtungszeiten, also über viele Pulsabfolgezyklen. Die durch die niedrige Puls-wiederholfrequenz und die kurze Pulsdauer verringerte mittlere Anregungsleistung wird zumindest partiell durch eine erhöhte Fluoreszenzausbeute kompensiert. Als Lichtquellen kommen gepulste Laser (modengekoppelte oder gütegeschaltete Laser), gegebenenfalls mit einem schnellen optischen Modulator (engl. „pulse picker“) zur Reduktion der Puls-wiederholfrequenz, beispielsweise einem akustooptischen Modulator (AOM) oder schnelle, direkt über den Treiberstrom modulierte Laserdioden oder Leuchtdioden (LED) in Frage.

**[0062]** Da in der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie mittels SIM oder SPEM die Erhöhung der Fluoreszenzausbeute und die Bleichreduktion stark farbstoff- und probenabhängig ist, wird eine feedbackgesteuerte Optimierung der Fluoreszenzausbeute durch Variation der Pulssequenz (Pulsdauer und/oder Puls-wiederholrate) bei konstanter mittlerer Leistung (dadurch kann Signalerhöhung nur durch Bleichreduktion entstehen) durchgeführt. [Fig. 4](#) stellt die Rückkopplung aus dem detektierten Fluoreszenzsignal zur Nachregelung der Lichtquelle LQ, der Strukturierungseinheit **7** und der Filter dar. [Fig. 5](#) zeigt eine beispielhafte Optimierung für eine Mikroskopmessung mit zwei Detektoren, einer externen Messeinheit und einer Anregungslichtquelle unter Berücksichtigung von a priori bekannten Informationen, beispielsweise über den Fluoreszenzfarbstoff, in Form eines Pseudo-Flussdiagramms.

**[0063]** Eine probenabhängige Optimierung der Bildgüte ist auch auf Basis anderer Beleuchtungs- oder Bildaufnahmeparameter möglich. Eine Möglichkeit besteht in der Optimierung der Anregung durch Auswerten des Fluoreszenzsignals, bis ein vorgegebenes Signal-Rausch-Verhältnis erreicht ist. Besonders vorteilhaft ist dabei die lokale Variation der Anregungszeit oder der Anregungsintensität in Form der Pulsabfolge mittels eines Bildgebers (DMD, LCD-Modulator, LCoS-Modulator – welche vorteilhaft zugleich der Strukturierung dienen können) unter Auswertung des Kamerabildes, welches mit hoher Bildwiederholrate eingelesen wird, was in [Fig. 6](#) schematisch abgebildet ist. Für eine Position und Orientierung der Strukturierung wird dabei über alle so aufgenommenen Einzelbilder gemittelt. Möglich und technisch besonders einfach ist aber auch die globale, das ganze Bild bei einer jeweiligen Stellung des Strukturierungsmoduls betreffende Variation der Anregungszeit oder der Anregungsintensität mittels direkter Modulation des Lasers unter Auswertung wie oben oder durch Auswertung eines mittleren Signals eines mit der Kamera kalibrierten Punktdetektors, der einen durch einen Strahlteiler ausgekoppelten Bruchteil des Fluoreszenzlichtes detektiert. In beiden Fällen wird vor der Rekonstruktion des Ergebnisbilds durch Verrechnung der strukturierten Bilder auf Basis der bekann-

ten lokalen oder globalen Variation der Anregungszeit oder der Anregungsintensität eine Intensitätskorrektur vorgenommen.

**[0064]** Dabei ergeben sich zugleich eine Dynamikerweiterung und, unter Berücksichtigung der Dynamik des Visualisierungsmediums, die Möglichkeit der Nutzung dieser Informationen für eine optimale Darstellung der Bilddaten. Bei dieser Optimierung ist zur Diskriminierung von außerfokalem Licht (welches unter Umständen das detektierte Fluoreszenzsignal dominieren kann) eine strukturierte linienförmige Beleuchtung mit konfokaler Detektion zu bevorzugen.

**[0065]** Von der durch die Steuereinheit **34** ausgeführten Steuersoftware werden die Belichtungszeit und/oder die Anregungspulsabfolge ausgehend von einer Benutzerauswahl so verändert, dass in jedem Einzelbild der Dynamikbereiches der Kamera voll angesteuert wird. Dabei kann die Wichtung zwischen Kameraverstärkung, Pulsabfolge und Belichtungszeit durch a-priori-Information über die Bleichrate des Farbstoffes erfolgen oder beispielsweise durch Messen dieser Bleichrate an Stellen in der Probe, die vom Benutzer als uninteressant für die Bildaufnahme markiert wurden (beispielsweise eine benachbarte Zelle). Zusätzlich kann bei vorhandener Aufnahmezeit der Dynamikbereich der Aufnahme noch über den Dynamikbereich der Kamera hinaus erweitert werden durch Aufnahme von allen Einzelbildern des strukturierten Beleuchtungsbildstapels mit mehreren Belichtungsparametern (Integrationszeit, Pulsabfolge und Kameraverstärkung) und Verrechnen dieser Bilder zu einem Bildstapel mit erweiterten Dynamikbereich. Insbesondere kann der Dynamikbereich nicht nur durch Anpassen der Pulsabfolge global im Bild sondern auch lediglich lokal optimal erweitert werden. Eine bevorzugte Ausgestaltung davon ist bei strukturierter Linienbeleuchtung die Anpassung der Linienintensität, so dass die Kamera in jeder Zeile angesteuert ist und die Aufzeichnung der benutzten Linienintensität pro Zeile.

**[0066]** Eine weitere Anordnung zur lokalen Optimierung der Beleuchtungs- und Aufnahmeparameter sowie zur Dynamikerweiterung ist in [Fig. 7](#) schematisch dargestellt. Sie enthält einen SLM, beispielsweise ein DMD, in einem Zwischenbild ZB, der die strukturierte Beleuchtung lokal nachregelt, um maximalen Dynamikbereich der Aufnahme zu erreichen. Die Strukturierung kann in diesem Fall durch ein Strukturierungsmodul SM\_P in der Pupillenebene erzeugt werden, das die Fouriertransformierte der gewünschten strukturierten Beleuchtung in der Probe **2** bereitstellt. Eine Ausgestaltung des Strukturierungsmoduls SM\_P mit Lichtleitfasern ist in Teilfigur [Fig. 7B](#) dargestellt und in DE 10 2007 047 466 A1 beschrieben. Die für die Dynamikerweiterung relevante Information ist in der benutzten lokalen Laserintensität und der detektierten Fluoreszenz enthalten. Aus diesen beiden

Informationen kann nun ein Bildstapel für den strukturierten Beleuchtungsalgorithmus mit erweitertem Dynamikbereich berechnet und so die Verrechnungsartefakte vermindert werden, da die Artefaktamplitude wesentlich vom SNR in den Einzelbildern abhängt.

**[0067]** Da bei SPEM die Nichtlinearität außer von den Umgebungsbedingungen auch von den Beleuchtungsbedingungen, nämlich insbesondere der Anregungsintensität und der Intensität des Aktivierungslasers, abhängt, werden vorzugsweise auch diese räumlich (beziehungsweise zeitlich für verschiedene Einzelbilder) so angepasst, dass immer und an allen Stellen die optimale Nichtlinearität erreicht wird. Ein möglicher Aufbau hierfür verwendet einen SLM in der Zwischenbildebene, um diese lokale Anpassung zu erreichen.

**[0068]** Auch die Modulationsfrequenz (also die Ortsfrequenz) der Beleuchtungsstruktur kann erfindungsgemäß optimiert werden. Die Modulationsfrequenz kann beispielsweise so groß wie möglich gewählt werden, so dass noch ein ausreichendes Verhältnis von Modulationsamplitude zu Untergrund erreicht wird. Diese Evaluierung kann im Orts- oder im Ortsfrequenzraum erfolgen. Insbesondere kann die Modulationsfrequenz als Funktion der Eindringtiefe in die Probe verändert werden, um bei Proben mit Brechungsindex-Fehlanpassung der Abnahme des Modulationskontrastes mit zunehmender Tiefe durch reduzierte Modulationsfrequenz zu begegnen.

**[0069]** Alternativ kann die Modulationsfrequenz der Beleuchtungsstruktur so gering gewählt werden, dass mindestens ein Vielfaches dieser Frequenz noch vom Objektiv übertragen wird. Die Beleuchtungs- und Aufnahmeparameter wie Pulsabfolge, Belichtungszeit und Kameraverstärkung werden so lange variiert, bis die Amplitude der Vielfachen der Modulationsfrequenz bei minimalen Bleichen der Probe maximal sind. Bei diesen Beleuchtungs- und Aufnahmeparametern und einer Struktur-Modulationsfrequenz knapp unterhalb der Grenzfrequenz des Mikroskopobjektivs wird ein vollständiger Bildstapel für SPEM aufgenommen und daraus ein Ergebnisbild mit erhöhter Auflösung rekonstruiert.

**[0070]** Neben der Modulationsamplitude, die aus einem Einzelbild gewonnen werden kann, kann auch die Artefaktamplitude als Feedbackparameter für die Wahl der Modulationsfrequenz genommen werden. Die Artefaktamplitude wird dabei aus einem vollständigen SIM-Bildstapel und dem Verrechnungsalgorithmus berechnet und durch Verkleinern der Modulationsfrequenz soweit minimiert, bis sie die typische Wahrnehmungsschwelle unterschreitet. Die Artefaktamplitude berechnet sich dabei aus den Restmodulationsamplituden durch unvollständige Separierung verschiedenen Ordnungen und Einbrüchen im

Frequenzspektrum aufgrund unzureichenden Modulationskontrastes. Sie ist ein quantitatives Maß für die Artefakte im rekonstruierten Ergebnisbild.

#### Bezugszeichenliste

<b>2</b>	Probe
<b>3</b>	Probenhalter
<b>5</b>	Mikroskopobjektiv
<b>7</b>	Strukturierungsmodul
<b>9</b>	Pupille
<b>17</b>	Aktuator
<b>19</b>	Bildgeber
<b>20</b>	Kollimationsoptik
<b>21</b>	Mikroskopobjektiv
<b>22</b>	Probe
<b>23</b>	Laser
<b>24</b>	Lichtklappe
<b>25</b>	Abschwächer
<b>26</b>	Faserkoppler
<b>27</b>	Tubuslinse
<b>28</b>	Filter
<b>29</b>	Dichroitischer Strahlteiler
<b>30</b>	Scannerspiegel
<b>31</b>	Lochblende
<b>32</b>	Detektorfeld
<b>33</b>	Hauptstrahlteiler
<b>34</b>	Steuereinheit
<b>D</b>	Detektionsmodul
<b>MI</b>	Mikroskop
<b>L</b>	Beleuchtungsmodul
<b>S</b>	Abtastmodul
<b>LQ</b>	Lichtquelle
<b>OL</b>	Mikroskopobjektiv
<b>G</b>	Gitter
<b>M</b>	Modulator
<b>TLB</b>	Tubuslinse Beleuchtung
<b>TLD</b>	Tubuslinse Detektion
<b>ZB</b>	Zwischenbildebene
<b>EF</b>	Emissionsfilter
<b>DMD</b>	Digitales Mikrospeigelfeld
<b>SLM</b>	Räumlicher Lichtmodulator
<b>SM_P</b>	Faserbasiertes Strukturierungsmodul in Pupillenebene

## ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

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

### Zitierte Patentliteratur

- US 5671085 [0003]
- DE 19908883 A1 [0004]
- DE 102006011176 A1 [0025]
- DE 102007047468 A1 [0025]
- DE 102007047466 A1 [0058, 0066]

### Zitierte Nicht-Patentliteratur

- Eggeling et al. in ChemPhysChem 2008, 9, 612–624 [0027]
- Mondal in Appl. Phys. Lett. 92, 013902, 2008 [0027]
- Sauer et al., Photonics West 2008, Talk 6862–20 [0043]

### Patentansprüche

1. Verfahren zur hochauflösenden Abbildung einer mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Probe mittels eines Mikroskops, wobei die Probe in mehreren Phasen sequentiell mit strukturiertem, gepulstem Anregungslicht beleuchtet und das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht pro Phase in ein jeweiliges strukturiertes Einzelbild aufgenommen wird, so dass aus den Einzelbildern ein Ergebnisbild mit erhöhter Auflösung rekonstruierbar ist, **dadurch gekennzeichnet**, dass für mindestens einen Parameter der Beleuchtung und/oder mindestens einen Parameter der Aufnahme, insbesondere für mindestens eine der Größen „Wellenlänge der Beleuchtung“, „Pulsabfolge der Beleuchtung“, „Wellenlängenbereich der Aufnahme“, „Belichtungszeit der Aufnahme“ und „Verstärkung der Aufnahme“, eine optimale Einstellung ermittelt wird.

2. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, wobei die optimale Einstellung des Parameters durch eine Rückkopplung anhand der Einzelbilder, anhand von zusätzlichen Zwischenbildern oder anhand eines Signals eines Punktdetektors, auf den ein Bruchteil des Fluoreszenzlichts ausgekoppelt wird, und durch Variation des Parameters ermittelt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Variation des Parameters bei im wesentlichen konstanter mittlerer Leistung des Anregungslichts erfolgt.

4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei zum Ermitteln der optimalen Einstellung des Parameters eine Simulation von Beleuchtung und Aufnahme durchgeführt wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei eine Einstellung als optimal ermittelt wird, wenn sich in einem Zwischenbild, in einem Einzelbild oder in dem Ergebnisbild bei dieser Einstellung ein maximales oder zumindest ein vorgegebenes Signal-Rausch-Verhältnis ergibt.

6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei beim Ermitteln der optimalen Einstellung eine vorgegebene Gewichtung weiterer Optimierungsziele neben einer Gewichtung für das Signal-Rausch-Verhältnis berücksichtigt wird.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 6, wobei die Aufnahme des Fluoreszenzlichts in Zwischenbilder mit einer Bildwiederholfrequenz erfolgt, die etwa der Bildwiederholfrequenz bei der Aufnahme der Einzelbilder entspricht.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 6, wobei die Aufnahme des Fluoreszenzlichts in Zwischenbilder mit einer signifikant höheren Bildwieder-

holfrequenz erfolgt als bei der Aufnahme der Einzelbilder.

9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei anhand der Zwischenbilder mittels eines Bildgebers die Pulsabfolge lokal, insbesondere pixelweise, variiert wird.

10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei mittels desselben Bildgebers die Strukturierung des Anregungslichts erzeugt wird.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Einzelbilder vor der Rekonstruktion des Ergebnisbilds entsprechend der Variation der Pulsabfolge hinsichtlich ihrer Intensität korrigiert werden.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei während der Aufnahme ein Messabbruchkriterium geprüft und die Aufnahme bei Erfüllung des Messabbruchkriteriums beendet oder vereinfacht wird.

13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei als Messabbruchkriterium geprüft wird, ob ein Modulationskontrast kleiner ist als ein vorgegebener Kontrastschwelligwert oder ob eine Bewegungsweite der Probe größer als ein Bewegungsschwelligwert ist.

14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zur Bestimmung einer optimalen Einstellung eines Parameters ein Testpräparat in Form eines homogenen, weniger als 100 nm dicker Multifarb-Farbstofffilms ohne Brechungsindex-Fehleranpassung zur Immersionsflüssigkeit eines Objektivs des Mikroskops oder in Form einer Testprobe mit Multifarbperlen einer Größe zwischen 200 nm und 500 nm verwendet wird.

15. Verfahren zur hochauflösenden Abbildung einer mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Probe mittels eines Mikroskops, wobei die Probe in mehreren Phasen sequentiell mit strukturiertem, gepulstem Anregungslicht beleuchtet und das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht pro Phase in ein jeweiliges strukturiertes Einzelbild aufgenommen wird, so dass aus den Einzelbildern ein Ergebnisbild mit erhöhter Auflösung rekonstruierbar ist, dadurch gekennzeichnet, dass die Beleuchtung mit einer derartigen Pulsabfolge erfolgt, dass eine Anregung aus einem (insbesondere untersten) Tripletzustand des Fluoreszenzfarbstoffs in einen höheren Tripletzustand verringert wird.

16. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, wobei die Pulsabfolge zwischen den Pulsen des Anregungslichts eine Anregungspause von einer oder mehreren Mikrosekunden aufweist.

17. Verfahren zur hochauflösenden Abbildung ei-

ner mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Probe mittels eines Mikroskops, wobei die Probe in mehreren Phasen sequentiell mit strukturiertem, gepulstem Anregungslicht beleuchtet und das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht pro Phase in ein jeweiliges strukturiertes Einzelbild aufgenommen wird, so dass aus den Einzelbildern ein Ergebnisbild mit erhöhter Auflösung rekonstruierbar ist, insbesondere nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe zusätzlich mit Unterdrückungslicht zum Entvölkern eines (insbesondere untersten) Triplettzustands des Fluoreszenzfarbstoffs beleuchtet wird.

18. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, wobei das Unterdrückungslicht in gleicher Weise strukturiert wird wie das Anregungslicht.

19. Verfahren nach Anspruch 17 oder 18, wobei Unterdrückungslicht mit einer Energiedichte von einem oder mehreren MW/cm<sup>2</sup> verwendet wird.

20. Verfahren zur hochauflösenden Abbildung einer mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Probe mittels eines Mikroskops, wobei die Probe in mehreren Phasen sequentiell mit strukturiertem, gepulstem Anregungslicht beleuchtet und das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht pro Phase in ein jeweiliges strukturiertes Einzelbild aufgenommen wird, so dass aus den Einzelbildern ein Ergebnisbild mit erhöhter Auflösung rekonstruierbar ist, insbesondere nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Zwischenbilder aufgenommen werden, anhand derer ein Umfang eines durch die Beleuchtung bewirkten Bleichens des Fluoreszenzfarbstoffs ermittelt wird, und dass vor der Rekonstruktion des Ergebnisbilds die Einzelbilder rechnerisch entsprechend des ermittelten Umfangs korrigiert werden.

21. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, wobei die Zwischenbilder vor der Aufnahme der Einzelbilder oder jeweils ein Zwischenbild zwischen zwei Einzelbildern aufgenommen werden, wobei die Probe strukturiert oder gleichförmig beleuchtet wird.

22. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, wobei die Zwischenbilder mit einer höheren Bildwiederholungsfrequenz aufgenommen werden als die Einzelbilder und wobei das Bleichen aus einem Abfall einer Intensität des Fluoreszenzlichts pixelweise ermittelt wird.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 22, wobei die rechnerische Korrektur des Bleichens im Fourierraum erfolgt.

24. Verfahren zur hochauflösenden Abbildung einer mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Probe

mittels eines Mikroskops, wobei die Probe in mehreren Phasen sequentiell mit strukturiertem, gepulstem Anregungslicht beleuchtet und das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht pro Phase in ein jeweiliges strukturiertes Einzelbild aufgenommen wird, so dass aus den Einzelbildern ein Ergebnisbild mit erhöhter Auflösung rekonstruierbar ist, insbesondere nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass anhand mindestens eines Referenzbilds ein Umfang einer optischen Aberration der Einzelbilder ermittelt und vor der Rekonstruktion des Ergebnisbilds die Einzelbilder rechnerisch entsprechend des ermittelten Umfangs korrigiert werden.

25. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, wobei der Umfang der Aberration anhand einer Verzeichnung des Strukturierungsmusters, insbesondere einer Deformation und/oder einer räumlichen Phasenänderung, ermittelt wird.

26. Verfahren nach Anspruch 24 oder 25, wobei für eine Aufnahme des Referenzbilds ein Referenzanregungslicht mit einer geringeren Strukturierungsfrequenz verwendet wird als für die Aufnahme der Einzelbilder.

27. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 26, wobei die Strukturierung des Anregungslichts mittels dreier Beugungsordnungen erfolgt und wobei das Referenzbild ermittelt wird, indem Ortsfrequenzen knapp oberhalb einer Ortsfrequenz einer Interferenz aller drei Beugungsordnungen gefiltert werden.

28. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Fluoreszenzanregung derart erfolgt, dass sich eine nichtlineare Beziehung zwischen Anregungsintensität und Fluoreszenzintensität ergibt.

29. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, wobei ein photoschaltbarer Fluoreszenzfarbstoff verwendet wird und ein pH-Wert und/oder eine Probenfixierung hinsichtlich eines Schaltkontrastes des Fluoreszenzlichts optimiert werden.

30. Verfahren nach dem Anspruch 29, wobei die Beleuchtung für die Aufnahme der Einzelbilder lokal, insbesondere pixelweise, variiert wird.  
→ Optimierung der Nichtlinearität

31. Verfahren nach Anspruch 29, wobei die Strukturierung mit einer derart niedrigen Modulationsfrequenz erfolgt, dass auch noch Vielfache dieser Frequenz in einen Übertragungsbereich eines Mikroskopobjektivs des Mikroskops fallen, eine Amplitude von Oberwellen in der Probe ermittelt und in einem Kriterium für eine optimale Einstellung eines Parameters, insbesondere für mindestens eine der Größen „Wellenlänge der Beleuchtung“, „Pulsabfolge der Be-

leuchtung", „Wellenlängenbereich der Aufnahme", „Belichtungszeit der Aufnahme" und „Verstärkung der Aufnahme", verwendet werden.

32. Verfahren zur hochauflösenden Abbildung einer mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Probe mittels eines Mikroskops, wobei die Probe in mehreren Phasen sequentiell mit strukturiertem, gepulstem Anregungslicht derart beleuchtet wird, dass eine nichtlineare Beziehung zwischen Anregungsintensität und Fluoreszenzintensität entsteht, und das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht pro Phase in ein jeweiliges strukturiertes Einzelbild aufgenommen wird, so dass aus den Einzelbildern unter Berücksichtigung der nichtlinearen Beziehung ein Ergebnisbild mit erhöhter Auflösung rekonstruierbar ist, insbesondere nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass in der Probe enthaltene Radikale, die chemisch mit dem angeregten Fluoreszenzfarbstoff reagieren können, chemisch der Umgebung des Fluoreszenzfarbstoffs und/oder der Probe entzogen werden.

33. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, wobei die Radikale zum Entziehen enzymatisch abreagiert werden.

34. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Probe mit einer strukturierten Linienbeleuchtung angeregt wird.

35. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, wobei eine Intensität der Linienbeleuchtung so angepasst wird, dass ein Dynamikbereich einer aufnehmenden Kamera voll angesteuert wird, wobei die Intensität zeilenweise gespeichert wird.

36. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Fluoreszenzlicht konfokal detektiert wird.

37. Computerprogramm, eingerichtet zur Durchführung eines der vorhergehenden Verfahrensansprüche.

38. Steuereinheit, eingerichtet zur Durchführung eines der vorhergehenden Verfahrensansprüche.

39. Mikroskop, insbesondere Laser-Scanning-Mikroskop, mit einer Steuereinheit nach dem vorhergehenden Anspruch.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

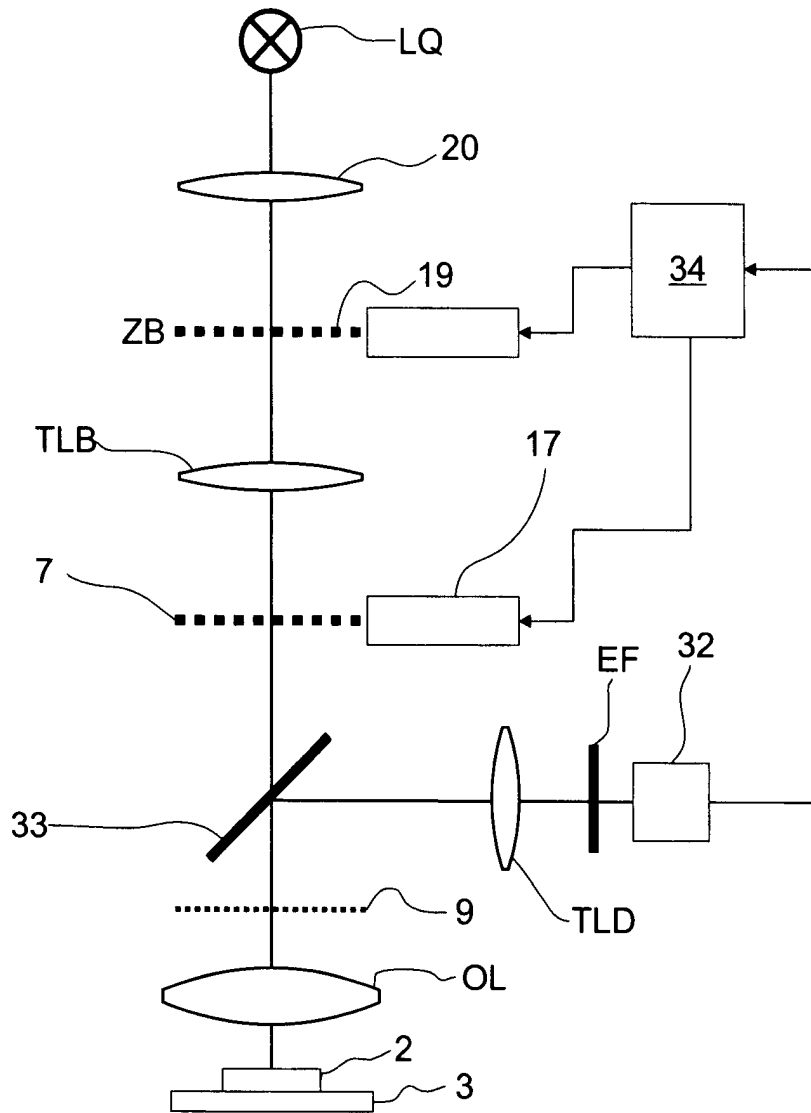


Fig. 1



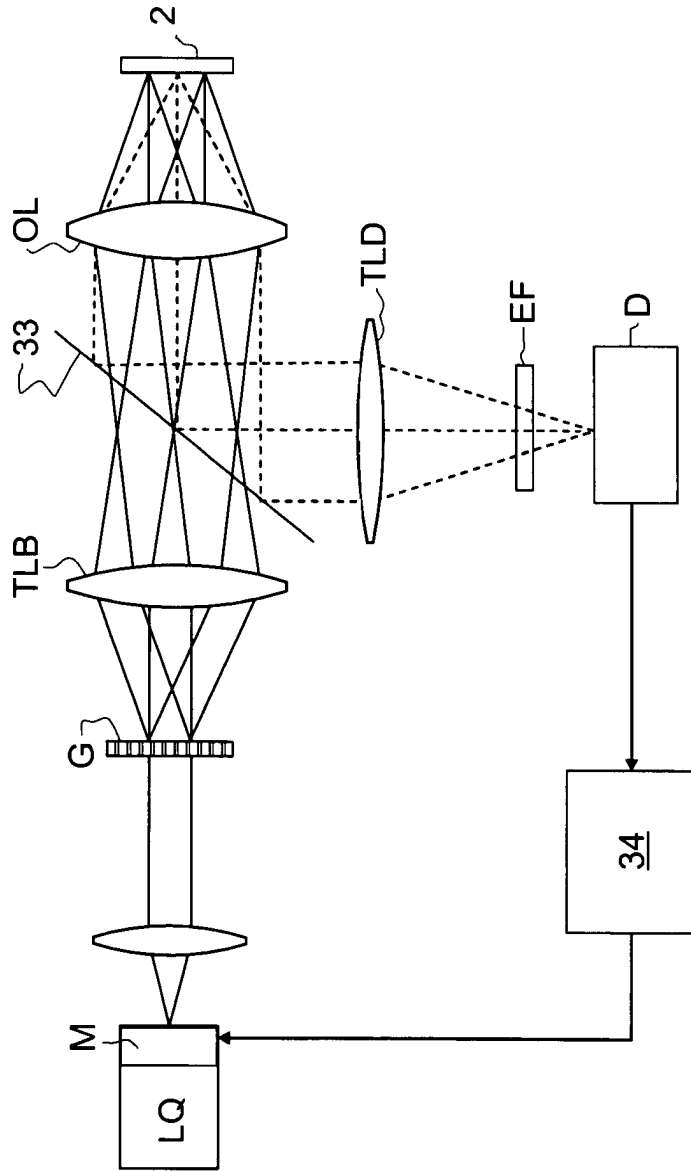


Fig. 2

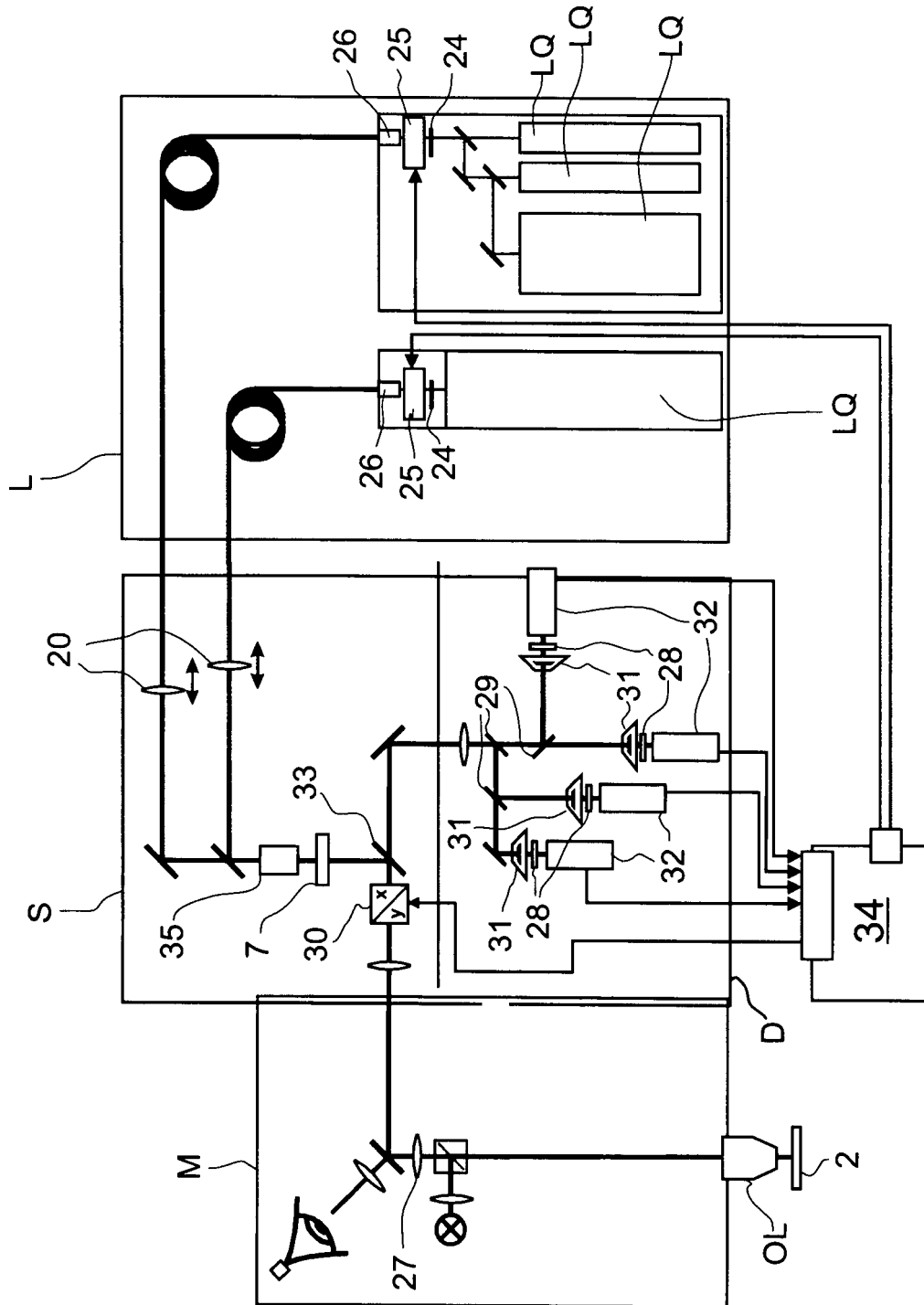


Fig. 3

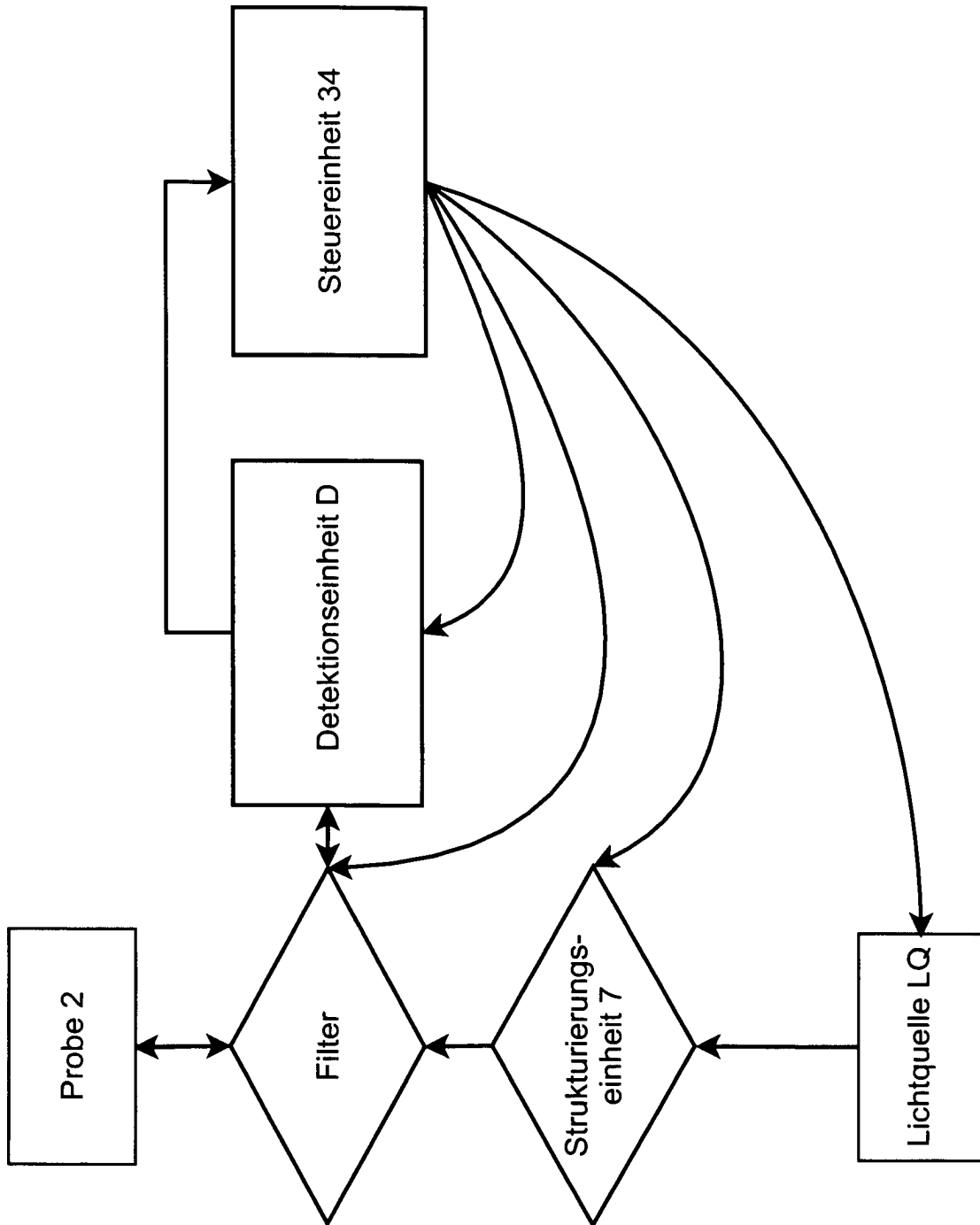


Fig. 4

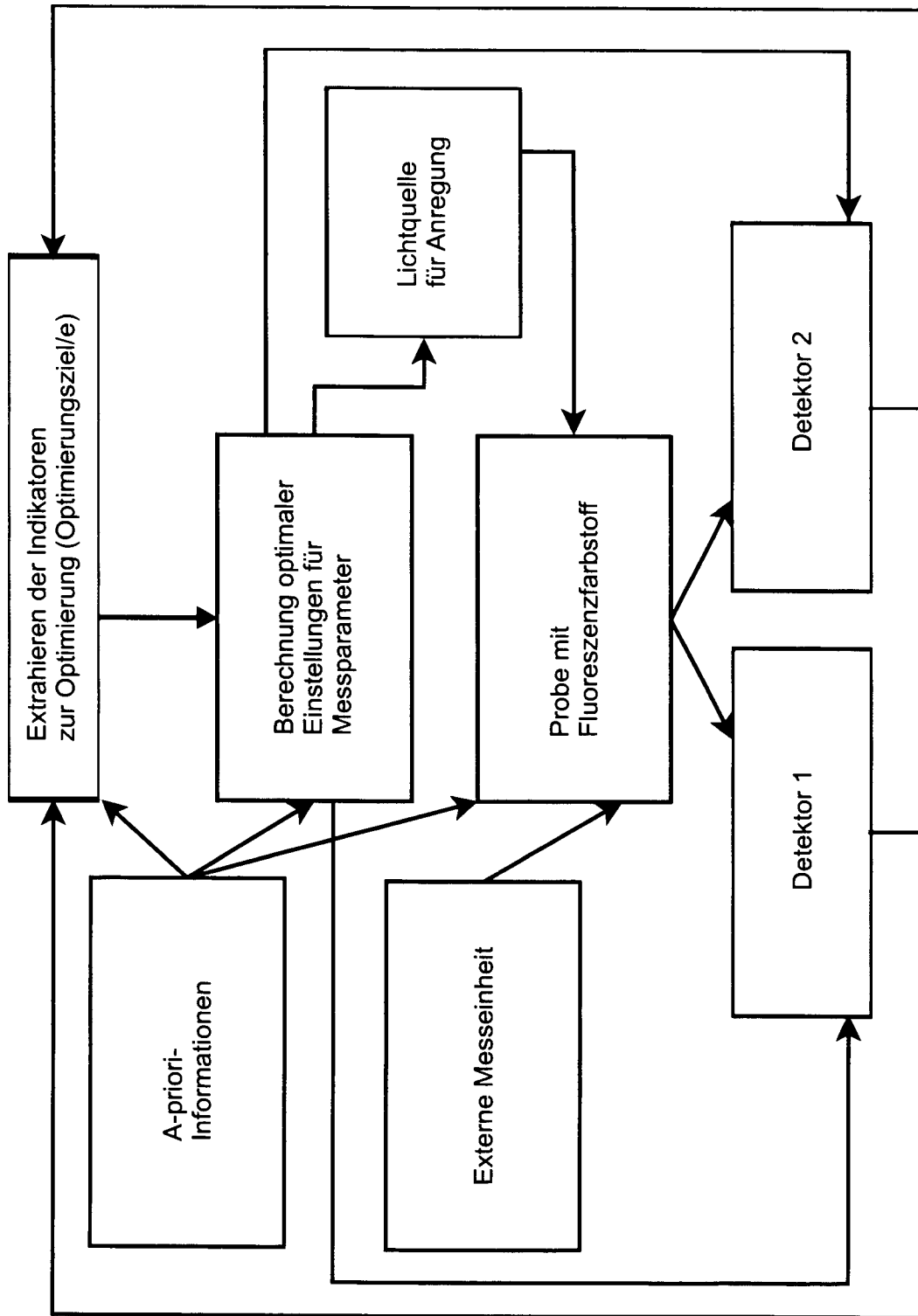


Fig. 5

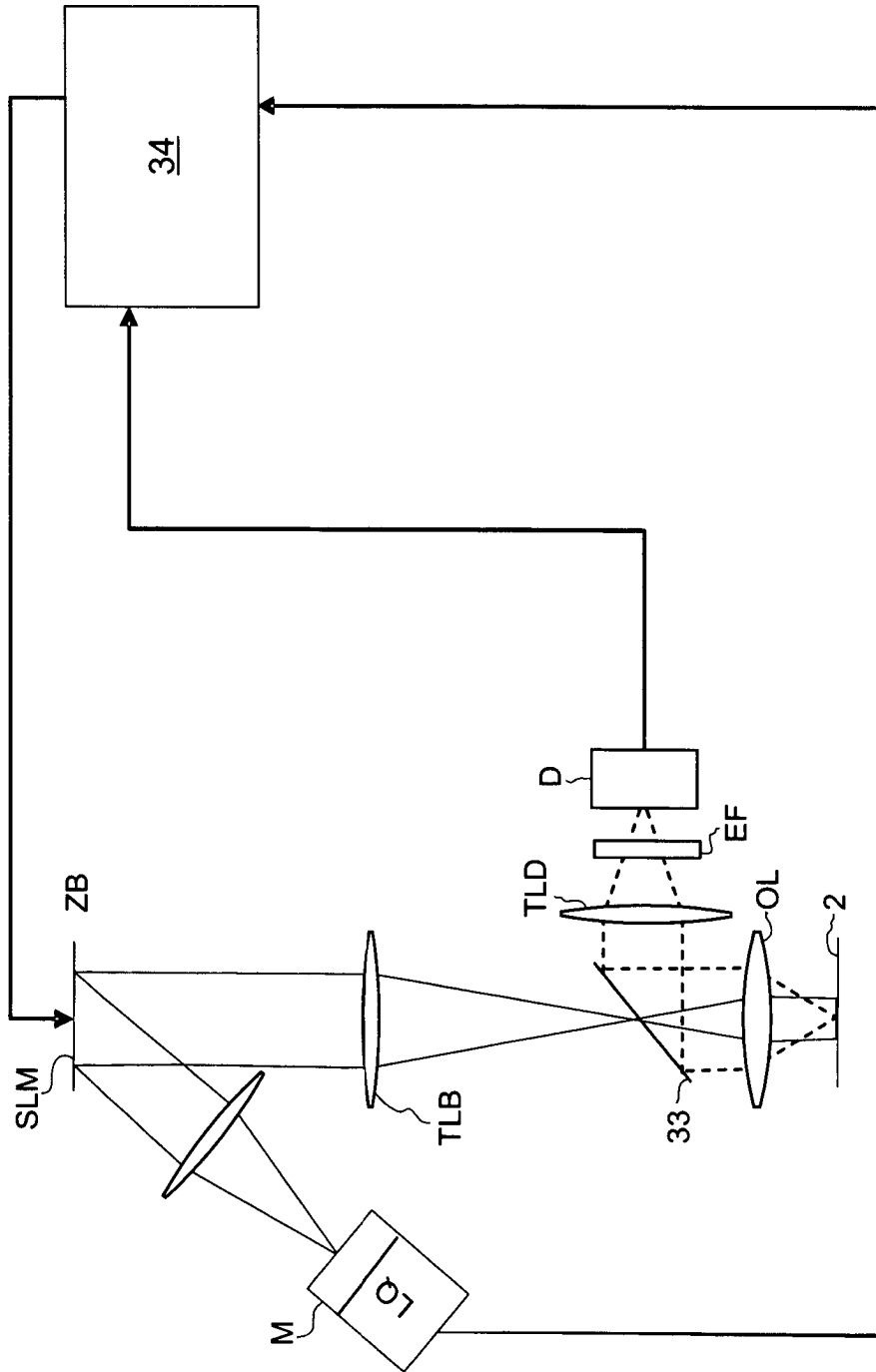


Fig. 6

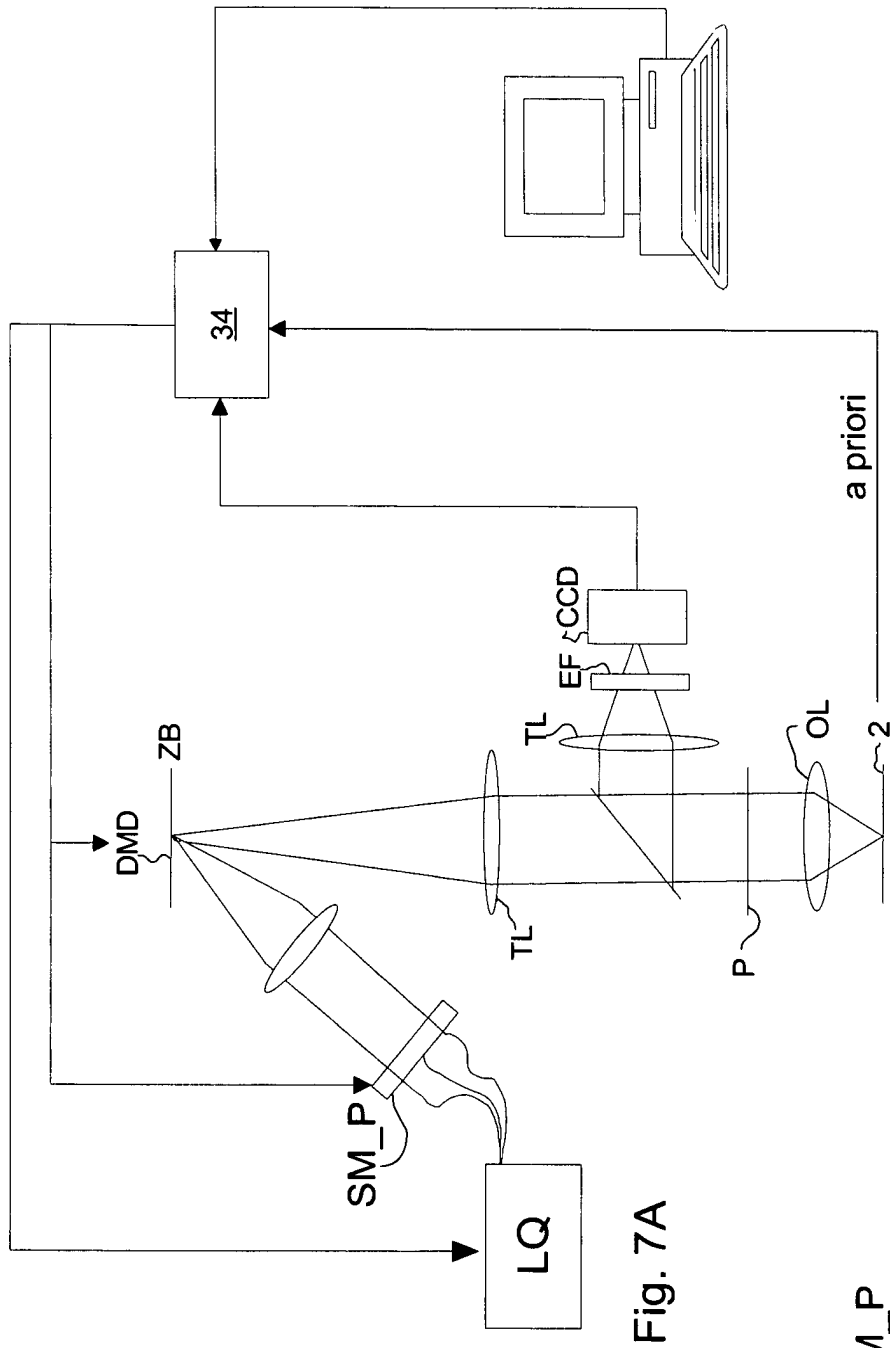


Fig. 7A

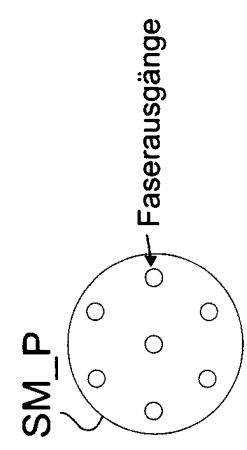


Fig. 7B