

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載  
 【部門区分】第 6 部門第 1 区分  
 【発行日】平成26年12月25日 (2014.12.25)

【公表番号】特表2014-501915(P2014-501915A)  
 【公表日】平成26年1月23日 (2014.1.23)  
 【年通号数】公開・登録公報2014-004  
 【出願番号】特願2013-539209(P2013-539209)  
 【国際特許分類】

G 0 1 N 21/64 (2006.01)

G 0 2 B 21/00 (2006.01)

【F I】

G 0 1 N 21/64 E

G 0 1 N 21/64 F

G 0 2 B 21/00

【手続補正書】

【提出日】平成26年11月7日 (2014.11.7)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

マーキング分子 (1) でマーキングされるサンプル (7) の高分解能ルミネッセンス顕微鏡検査の方法であって、前記マーキング分子 (1) は、活性化されると励起されて固有の発光放射を放出するように、活性化されることが可能であり、

a) 前記サンプル (7) 中に存在する前記マーキング分子 (1) の部分集合の活性化および励起を繰り返して発光放射を放出させる工程であって、前記サンプル中において、発光マーキング分子 (1) の少なくともいくつかは、直接隣接する発光マーキング分子 (1) から、少なくとも所定の光学分解能に由来する長さ以上の距離にある、前記放出させる工程と、

b) 発光マーキング分子 (1) を有する前記サンプル (7) の撮像を深さ方向に沿って前記所定の光学分解能で繰り返す工程と、

c) 工程 b) の撮像操作から個別の画像を生成する工程であって、前記個別の画像内の前記発光マーキング分子 (1) の幾何学的位置が、前記所定の光学分解能を越える空間分解能で決定される、前記生成する工程と

を含む方法において、前記深さ方向に沿った高分解能のために、

d) 工程 a) における活性化および励起のうちの少なくとも一方が、少なくとも 2 つの領域中に導入される放射により行われ、

- 前記領域 (30、31) が、それぞれ前記深さ方向に略垂直な面 (39、40) に沿って延在し、

- 前記領域 (30、31) が、前記深さ方向に所定の広がりを持ち、

- 前記領域 (30、31) は、前記深さ方向に見たときに前記領域が互いに前後して部分的にだけ重なるように配置され、

e) 前記個別の画像から前記発光マーキング分子 (1) に関する深さ情報を得るために、前記サンプル (7) の個別の画像が、前記少なくとも 2 つの領域 (30、31) の各々の活性化および励起のうちの少なくとも一方について、工程 b) において記録されることを特徴とする方法。

**【請求項 2】**

工程 e) において、少なくとも 2 つの個別の画像の両方に現われる発光マーキング分子 (1) が、フィルタで除去されることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記少なくとも 2 つの画像において、フィルタ除去されたマーキング分子 (1) の発光強度が比較されることにより、深さが特定されることを特徴とする、請求項 2 に記載の方法。

**【請求項 4】**

工程 d) において、前記放射は、少なくとも 1 つの光シート (30、31) の形態で導入され、前記少なくとも 1 つの光シート (30、31) は、前記深さ方向に関して横断的に導入され、厚さが前記広がり規定する、請求項 1 乃至 3 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記光シートの厚さは回折限界である、請求項 4 に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記光シート (30、31) は、前記深さ方向に関して横断的に、前記サンプルに対して少なくとも 2 つの位置に移動されることを特徴とする、請求項 4 に記載の方法。

**【請求項 7】**

交互にスイッチオン及びオフされるか、または差動的に変調される 2 つの離間した光シート (30、31) が使用されることを特徴とする、請求項 4 に記載の方法。

**【請求項 8】**

工程 d) において、前記深さ方向に沿った放射は、少なくとも一对の回折限界焦点 (41、42) の形態で導入され、前記 少なくとも一对の回折限界焦点 (41、42) のうちの第 1 の焦点 (41) は、2 つの面のうちの第 1 の面 (39) 内に合焦されており、前記 少なくとも一对の回折限界焦点 (41、42) のうちの第 2 の焦点は、前記 2 つの面のうちの第 2 の面 (40) 内に合焦されており、前記 少なくとも一对の回折限界焦点 (41、42) は、前記 2 つの領域を形成するために、それぞれの面 (39、40) に沿って移動され、合焦のための被写界深度は、前記領域の広がり規定することを特徴とする、請求項 1 乃至 3 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 9】**

マーキング分子 (1) でマーキングされるサンプル (7) の高分解能ルミネッセンス顕微鏡検査のための顕微鏡であって、前記マーキング分子 (1) は、活性化されると励起されて固有の発光放射を放出するように活性化されることが可能であり、

a) 前記サンプル (7) 中に存在する前記マーキング分子 (1) の部分集合の活性化および励起を繰り返して発光放射を放出させるように形成された照明ビーム経路 (22) であって、前記サンプル (7) 中において、発光マーキング分子 (1) の少なくともいくつかは、直接隣接する発光マーキング分子 (1) から、少なくとも所定の光学分解能に由来する長さ以上の距離にある、前記照明ビーム経路 (22) と、

b) 発光マーキング分子 (1) を有する前記サンプル (7) の撮像を深さ方向に沿って前記所定の光学分解能で繰り返すように構成された撮像装置 (21) と、

c) 撮像操作から個別の画像を生成し、前記個別の画像内の前記発光マーキング分子 (1) の幾何学的位置を、前記所定の光学分解能を越える空間分解能で決定する制御および評価装置 (18) と

を備える顕微鏡において、前記深さ方向に沿った高分解能のために、

d) 前記照明ビーム経路 (22) が、少なくとも 2 つの領域 (30、31) 内に、活性化および励起のうちの少なくとも一方のための放射を導入し、

- 前記領域 (30、31) が、それぞれ前記深さ方向に略垂直な面 (39、40) に沿って延在し、

- 前記領域 (30、31) が、前記深さ方向に所定の広がり有し、

- 前記領域 (30、31) は、前記深さ方向に見たときに前記領域が互いに前後して部

分的にだけ重なるように配置され、

e) 前記撮像装置(21)は、前記少なくとも2つの領域(30、31)の各々の活性化および励起のうちの少なくとも一方について、前記サンプルの個別の画像を記録し、前記制御および評価装置は、前記個別の画像から前記発光マーキング分子(1)に関する深さ情報を得ることを特徴とする顕微鏡。

【請求項10】

前記照明ビーム経路(22)は、少なくとも1つの光シート(30、31)の形態で活性化および励起のうちの少なくとも一方のための放射を導入し、前記少なくとも1つの光シート(30、31)は、前記深さ方向に関して横断的に位置し、厚さが前記広がりを規定し、好ましくは前記光シート(30、31)の厚さは回折限界であることを特徴とする、請求項9に記載の顕微鏡。

【請求項11】

前記光シート(30、31)の厚さは回折限界である、請求項10に記載の顕微鏡。

【請求項12】

前記照明ビーム経路(22)は、前記深さ方向に関して横断的に、前記光シート(30、31)を少なくとも2つの位置に移動させる装置(24)を有することを特徴とする、請求項10に記載の顕微鏡。

【請求項13】

前記照明ビーム経路(22)は、交互にスイッチオン及びオフされるか、または差動的に変調される2つの離間した光シートを有することを特徴とする、請求項10に記載の顕微鏡。

【請求項14】

前記照明ビーム経路(22)は、少なくとも一对の回折限界焦点(41、42)の形態で前記深さ方向に沿って前記活性化および励起のうちの少なくとも一方のための放射を導入し、前記少なくとも一对の回折限界焦点(41、42)のうちの第1の焦点(41)を、2つの面のうちの第1の面(39)内に合焦し、前記少なくとも一对の回折限界焦点(41、42)のうちの第2の焦点(42)を、前記2つの面のうちの第2の面(40)内に合焦し、前記2つの領域を形成するために、それぞれの面(39、40)に沿って前記少なくとも一对の回折限界焦点(41、42)を移動させ、合焦のための被写界深度は、前記領域の広がりを規定することを特徴とする、請求項10乃至13のいずれか一項に記載の顕微鏡。

【請求項15】

前記照明ビーム経路(22)は、回転ディスク(33)上に配置されたミニレンズアレイ(35、36)を含むことを特徴とする、請求項14に記載の顕微鏡。

【請求項16】

前記制御および評価装置(18)は、顕微鏡(6)を駆動して請求項1から8に記載の方法を実行するように形成されていることを特徴とする、請求項9乃至15のいずれか一項に記載の顕微鏡。