

【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 2 区分

【発行日】平成25年8月8日 (2013.8.8)

【公表番号】特表2012-530947(P2012-530947A)

【公表日】平成24年12月6日 (2012.12.6)

【年通号数】公開・登録公報2012-051

【出願番号】特願2012-516561(P2012-516561)

【国際特許分類】

G 0 2 B 21/36 (2006.01)

G 0 2 B 21/00 (2006.01)

G 0 1 N 21/64 (2006.01)

【F I】

G 0 2 B 21/36

G 0 2 B 21/00

G 0 1 N 21/64 E

【手続補正書】

【提出日】平成25年6月19日 (2013.6.19)

【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】

試料 ( 2 2 ) の蛍光事象の強度分布を含む顕微鏡画像 ( 2 ) の評価方法であって、前記強度分布は、回折に起因する広がりであって顕微鏡 ( 1 ) の点伝達関数の広がりに対応する広がりをそれぞれ有しており、かつ少なくとも概ね重ならず配置されており、当該方法は、

- a ) 少なくとも 1 つのカウンタを、顕微鏡画像 ( 2 ) の所定の評価すべき領域 ( R , R 1 , R 2 ) ごとに初期化する工程と、
  - b ) 顕微鏡画像 ( 2 ) の評価すべき領域 ( R , R 1 , R 2 ) 内において少なくとも 1 つの蛍光事象を同定する工程と、
  - c ) 該当する領域 ( R , R 1 , R 2 ) に対応するカウンタを、当該領域 ( R , R 1 , R 2 ) 内で同定された蛍光事象ごとにカウントアップする工程と
- を含み、

試料 ( 2 2 ) を少なくとも 1 種の変換可能な蛍光体により、前記工程 b ) の前にマーキングし、変換された励起可能な蛍光体が回折に起因して分解不能な体積の逆数より小さい密度を有するように、変換可能な蛍光体の部分集合をまず励起可能な状態に変換し、引き続き光源 ( 1 1 , 2 3 ) により試料 ( 2 2 ) を少なくとも部分的に励起光によって照射することにより、顕微鏡 ( 1 ) によって顕微鏡画像を記録し、このとき該試料 ( 2 2 ) から放射される蛍光光線が顕微鏡対物レンズ ( 2 1 ) により、かつ光受信器 ( 1 2 , 2 8 ) により回折広がりして結像される、方法。

【請求項 2】

少なくとも 1 つのカウンタが、該当する領域 ( R , R 1 , R 2 ) の分子、蛍光体または事象の数または濃度として出力されるか、または少なくとも 2 つのカウンタに基づいて擬似カラー画像が出力される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

少なくとも 2 つのカウンタが使用され、当該カウンタ間の比率が形成され、化学量論的

関係として出力される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

蛍光事象が異なる蛍光体種から由来し、評価すべき領域 ( R , R 1 , R 2 ) ごとに、前記工程 a ) で、評価すべき所定の各蛍光体種に対して、それぞれのカウンタを初期化し、  
前記工程 b ) で、前記蛍光事象が評価すべき蛍光体種に対応することを追加で同定し、  
前記工程 c ) で、前記該当する領域 ( R , R 1 , R 2 ) および該当する蛍光体種に対応するカウンタをカウントアップする、請求項 1 乃至 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

第 1 のカウンタが第 1 の領域 ( R 1 ) に対して、第 2 のカウンタが第 1 の領域とは異なる第 2 の領域 ( R 2 ) に対して使用される、請求項 1 乃至 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

試料 ( 2 2 ) を少なくとも 1 種の変換可能な蛍光体により、前記工程 b ) の前にマーキングすることは、前記工程 a ) の前に行われる、請求項 1 乃至 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

追加で、相関分光測定、またはフェルスターによる共振エネルギー変換測定を前記試料 ( 2 2 ) で実行する、請求項 1 乃至 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

励起可能な状態への変換のために、レーザ走査顕微鏡が使用される、請求項 1 乃至 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

試料 ( 2 2 ) の蛍光事象の強度分布を含む顕微鏡画像を時間的順序で評価するための請求項 1 乃至 8 のいずれか 1 項に記載の方法であって、

前記強度分布は、回折に起因して顕微鏡 ( 1 ) の点伝達関数の広がりに対応するそれぞれの広がりを有しており、かつそれぞれ顕微鏡画像内に少なくとも概ね重ならず配置されており、前記工程 b ) と c ) が顕微鏡画像ごとに繰り返される、方法。

【請求項 10】

それぞれ所定数の顕微鏡画像が評価された後に、カウンタの状態が記録され、カウンタが初期化される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記工程 B ) のために、蛍光事象の強度分布の重心の位置を、補償計算によりサブ回折限界の精度で求めるか、または所定の強度閾値を上回る少なくとも画素について同定する、請求項 1 乃至 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

蛍光体種の蛍光が 2 色で切り替わることができる場合、前記工程 c ) では、顕微鏡画像の時間的順序で同じ場所で、2 つの蛍光色が交番する連続顕微鏡画像が同定される場合だけカウントアップが実行される、請求項 1 乃至 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

請求項 1 乃至 12 のいずれか 1 項に記載の方法を実施するように構成された制御ユニット ( 3 4 ) またはコンピュータプログラム。

【請求項 14】

試料 ( 2 2 ) 中の少なくとも 1 種の蛍光色素を励起するための光源 ( 1 1 , 2 3 ) を備える照明光路と、顕微鏡対物レンズ ( 2 1 ) およびこれに後置された光受信器 ( 1 2 , 2 8 ) を備える検出光線路と、該光源 ( 1 1 , 2 3 ) および該光受信器 ( 1 2 , 2 8 ) と接続された、請求項 13 に記載された制御ユニット ( 3 4 ) とを有する顕微鏡 ( 1 ) 。

【請求項 15】

前記制御ユニット ( 3 4 ) と接続されており、かつ蛍光色素を光切換するための光源 ( 1 1 ) を備える、請求項 14 に記載の顕微鏡。

【請求項 16】

前記顕微鏡は、レーザ走査顕微鏡である、請求項 14 に記載の顕微鏡。