(19) Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2010 049 627 A1** 2011.05.05

(12) # Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2010 049 627.8**
(22) Anmeldetag: **28.10.2010**
(43) Offenlegungstag: **05.05.2011**

(51) Int Cl.: ***G02B 21/00*** (2006.01)
G01N 21/63 (2006.01)

(66) Innere Priorität:
10 2009 051 291.8 28.10.2009

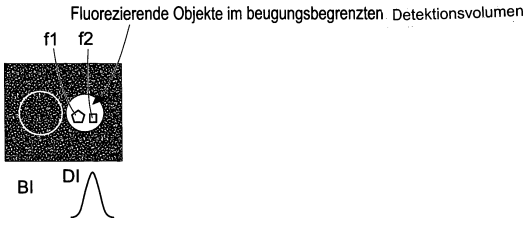
(71) Anmelder:
Carl Zeiss MicroImaging GmbH, 07745 Jena, DE

(72) Erfinder:
Kleppe, Ingo, Dr., 07743 Jena, DE; Netz, Ralf, Dr., 07749 Jena, DE; Novikau, Yauheni, 07743 Jena, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Mikroskopisches Verfahren und Mikroskop mit gesteigerter Auflösung**

(57) Zusammenfassung: Verfahren zur Steigerung der Auflösung eines Mikroskops bei der Detektion einer beleuchteten Probe und Mikroskop zur Durchführung des Verfahrens, wobei in einer ersten Position ein Beleuchtungsmuster auf der Probe erzeugt wird, dessen Auflösung vorzugsweise etwa in der Größenordnung der erreichbaren optischen Auflösung des Mikroskopes oder darüber liegt,
wobei zwischen der Detektion und dem Beleuchtungsmuster mindestens einmal mit einer Schrittweite unterhalb der Auflösungsgrenze des Mikroskops eine Relativverschiebung, vorteilhaft senkrecht zur Beleuchtungsrichtung, von einer ersten in mindestens eine zweite Position des Beleuchtungsmusters auf der Probe erzeugt wird und sowohl in der ersten als auch in der zweiten Position eine Detektion und Abspeicherung der Detektionssignale erfolgt.



Beschreibung

Stand der Technik:

[0001] Ein klassisches Anwendungsgebiet der Lichtmikroskopie zur Untersuchung von biologischen Präparaten ist die Lumineszenzmikroskopie. Hierbei werden bestimmte Farbstoffe (sogenannte Phosphore oder Fluorophore) zur spezifischen Markierung von Proben, z. B. von Zellteilen, verwendet. Die Probe wird, wie erwähnt, mit Anregungsstrahlung darstellender Beleuchtungsstrahlung beleuchtet und die dadurch angeregte Lumineszenzstrahlung mit geeigneten Detektoren erfasst. Üblicherweise ist dazu im Mikroskop ein dichroitischer Strahlteiler in Kombination mit Blockfiltern vorgesehen, die die Lumineszenzstrahlung von der Anregungsstrahlung abspalten und eine getrennte Beobachtung ermöglichen. Durch dieses Vorgehen ist die Darstellung einzelner, verschieden gefärbter Zellteile im Mikroskop möglich. Natürlich können auch mehrere Teile eines Präparates gleichzeitig mit verschiedenen, sich spezifisch an unterschiedliche Strukturen des Präparates anlagernden Farbstoffen eingefärbt werden. Dieses Verfahren bezeichnet man als Mehrfachlumineszenz. Auch kann man Proben vermessen, die per se, also ohne Farbstoffzugabe lumineszieren.

[0002] Lumineszenz wird hier, wie allgemein üblich, als Oberbegriff für Phosphoreszenz und Fluoreszenz verstanden, erfasst also beide Prozesse. Soweit hier von Fluoreszenz gesprochen wird, ist das Aars pro toto und nicht einschränken zu verstehen.

[0003] Zur Probenuntersuchung ist es auch bekannt, Laser-Scanning-Mikroskope (auch LSM abgekürzt) zu verwenden, die aus einem dreidimensional ausgeleuchteten Bild mittels einer konfokalen Detektionsanordnung (dann spricht man von einem konfokalen LSM) oder einer nichtlinearen Probenwechselwirkung (sogenannte Multiphotonenmikroskopie) nur diejenige Ebene abbilden, die sich in der Fokusebene des Objektives befindet. Es wird ein optischer Schnitt gewonnen, und die Aufzeichnung mehrerer optischer Schnitte in verschiedenen Tiefen der Probe erlaubt es anschließend, mit Hilfe eines geeigneten Datenverarbeitungsgerätes ein dreidimensionales Bild der Probe zu generieren, das aus den verschiedenen optischen Schnitten zusammengesetzt ist. Die Laser-Scanning-Mikroskopie ist somit zur Untersuchung von dicken Präparaten geeignet.

[0004] Natürlich wird auch eine Kombination von Lumineszenzmikroskopie und Laser-Scanning-Mikroskopie verwendet, bei der eine lumineszierende Probe in verschiedenen Tiefenebenen mit Hilfe eines LSM abgebildet wird.

[0005] US 5,043,570 beschreibt einen Versuch, die Auflösung durch „oversampling” zu erhöhen.

[0006] Dies führt nicht zu einer deutlich verbesserten Auflösung unterhalb der Beugungsgrenze des Mikroskopes.

[0007] Prinzipiell ist die optische Auflösung eines Lichtmikroskopes, auch die eines LSM, durch die physikalischen Gesetze beugungsbegrenzt. Zur optimalen Auflösung innerhalb dieser Grenzen sind spezielle Beleuchtungskonfigurationen bekannt, wie beispielsweise 4Pi-Anordnung oder Anordnungen mit Stehwellenfeldern. Damit kann die Auflösung, insbesondere in axialer Richtung gegenüber einem klassischen LSM deutlich verbessert werden. Mit Hilfe nicht-linearer Entvölkerungsprozesse kann weiter die Auflösung auf einen Faktor von bis zu 10 gegenüber einem beugungsbegrenzten konfokalen LSM angehoben werden. Ein solches Verfahren ist beispielsweise in der US 5866911 beschrieben. Für die Entvölkerungsprozesse sind verschiedene Ansätze bekannt, beispielsweise wie in der DE 44 16 558 C2, US 6633432 oder DE 103 25 460 A1 beschrieben.

[0008] Ein weiteres hochauflösendes Mikroskopieverfahren wird in US 5867604 angesprochen, in der ein Objekt mit einer periodischen Struktur abgetastet wird.

[0009] Ein weiteres ähnliches Verfahren zur Auflösungssteigerung wird in der EP 1157297 B1 angesprochen. Dort sollen mittels strukturierter Beleuchtung nichtlineare Prozesse ausgenützt werden. Als Nichtlinearität erwähnt die Druckschrift dabei die Sättigung der Fluoreszenz. Das geschilderte Verfahren nimmt in Anspruch, durch eine strukturierte Beleuchtung eine Verschiebung des Objektraumspektrums relativ zur Übertragungsfunktion des optischen Systems zu realisieren. Konkret bedeutet die Verschiebung des Spektrums, dass Objektraumfrequenzen V0 bei einer Raumfrequenz V0–Vm, wobei Vm die Frequenz der strukturierten Beleuchtung ist, übertragen werden. Bei gegebener durch das System maximal übertragbarer Raumfrequenz ermöglicht dies den Transfer von um die Verschiebefrequenz Vm über der maximalen Frequenz der Übertragungsfunktion liegender Raumfrequenzen des Objektes. Dieser Ansatz erfordert einen Rekonstruktionsalgorithmus zur Bilderzeugung und die Verwertung mehrerer Aufnahmen für ein Bild. Auch ist bei diesem Verfahren als

nachteilig anzusehen, dass die Probe in Bereichen außerhalb des detektierten Fokus unnötig mit Strahlung belastet wird, da die notwendige strukturierte Beleuchtung das gesamte Probenvolumen durchsetzt. Im Übrigen kann dieses Verfahren derzeit bei dicken Proben nicht verwendet werden, da außerfokal angeregte Fluoreszenz als Untergrundsignal mit auf den Detektor gelangt und somit den Dynamikbereich der nachgewiesenen Strahlung drastisch reduziert.

[0010] Ein Verfahren, das unabhängig von der Laserscanningmikroskopie eine Auflösung jenseits der Beugungsgrenze erreicht, ist aus der WO 2006127692 und der DE 10 2006 021 317 bekannt. Dieses mit PALM abgekürzte Verfahren (Photo Activated Light Microscopy) verwendet eine Markierungssubstanz, welche mittels eines optischen Aktivierungssignals aktiviert werden kann. Nur im aktivierten Zustand kann die Markierungssubstanz mit Anregungsstrahlung zur Abgabe von bestimmter Fluoreszenzstrahlung angeregt werden. Nicht aktivierte Moleküle der Markierungssubstanz senden auch nach Einstrahlung von Anregungsstrahlung keine oder zumindest keine merkliche Fluoreszenzstrahlung ab. Die Aktivierungsstrahlung schaltet die Markierungssubstanz also in einen Zustand, in dem sie zur Fluoreszenz anregbar ist. Auch andere Aktivierung, z. B. thermischer Art, sind möglich. Man spricht deshalb allgemein von einem Umschaltsignal. Im PALM-Verfahren wird nun das Umschaltsignal so aufgebracht, dass zumindest ein gewisser Anteil der aktivierten Markierungsmoleküle von benachbarten aktivierten Molekülen so beabstandet sind, dass sie gemessen an der optischen Auflösung der Mikroskopie getrennt oder nachträglich trennbar sind. Die aktivierten Moleküle werden also zumindest weitgehend isoliert. Nach Aufnahme der Lumineszenzstrahlung wird für diese isolierten Moleküle wird dann das Zentrum deren auflösungsbegrenzt bedingten Strahlungsverteilung ermittelt und daraus rechnerisch die Lage der Moleküle mit höherer Genauigkeit bestimmt, als es die optische Abbildung eigentlich zulässt. Diese gesteigerte Auflösung durch rechnerische Schwerpunktbestimmung der Beugungsverteilung wird in der englischen Fachliteratur auch als „superresolution” bezeichnet. Sie erfordert, dass in der Probe zumindest einige der aktivierten Markierungsmoleküle mit der optischen Auflösung mit der die Lumineszenzstrahlung detektiert wird, unterscheidbar, also isoliert sind. Dann kann für solche Moleküle die Ortsangabe mit gesteigerter Auflösung erreicht werden.

[0011] Zum Isolieren einzelner Markierungsmoleküle nutzt das PALM-Verfahren die Tatsache, dass die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Markierungsmolekül nach Empfang des Umschaltsignals gegebener Intensität, z. B. eines Photons der Aktivierungsstrahlung aktiviert wird, für alle Moleküle gleich ist. Über die Intensität des Umschaltsignals und damit die Zahl der Photonen, die auf eine Flächeneinheit der Probe fällt, kann also dafür gesorgt werden, dass die Wahrscheinlichkeit, in einem gegebenen Flächenbereich der Probe vorhandene Markierungsmoleküle zu aktivieren, so gering ist, dass es ausreichend Bereiche gibt, in denen innerhalb der optischen Auflösung nur unterscheidbare Markierungsmoleküle Fluoreszenzstrahlung emittieren. Durch passende Wahl der Intensität, z. B. der Photonendichte, des Umschaltsignals, wird erreicht, dass möglichst nur bezogen auf die optische Auflösung isoliert liegende Markierungsmoleküle aktiviert werden und nachfolgend Fluoreszenzstrahlung aussenden. Für diese isolierten Moleküle wird dann rechnerisch der Schwerpunkt der beugungsbedingten Intensitätsverteilung und damit die Lage des Markierungsmoleküls mit gesteigerter Auflösung ermittelt. Zur Abbildung der gesamten Probe wird die Isolierung der Markierungsmoleküle der Teilmenge durch Einbringen der Aktivierungsstrahlung, nachfolgende Anregung und Fluoreszenzstrahlungsabbildung so lange wiederholt, bis möglichst alle Markierungsmoleküle einmal in einer Teilmenge enthalten und innerhalb des Auflösung der Abbildung isoliert waren.

[0012] Das PALM-Verfahren hat dabei den Vorteil, dass weder für die Aktivierung, noch die für Anregung eine hohe Ortsauflösung benötigt wird. Statt dessen kann sowohl die Aktivierung als auch die Anregung in Weitfeldbeleuchtung erfolgen.

[0013] Im Ergebnis werden die Markierungsmoleküle durch geeignete Wahl der Intensität der Aktivierungsstrahlung statistisch in Teilmengen aktiviert. Deshalb muß für die Generierung eines Gesamtbildes einer Probe, in dem die Positionen aller Markierungsmoleküle rechnerisch mit z. B. jenseits der Beugungsgrenze liegender Auflösung bestimmt werden können, eine Vielzahl von Einzelbildern ausgewertet werden. Es können bis zu 10.000 Einzelbilder sein. Dies hat zur Folge, dass große Datenmengen verarbeitet werden, und die Messung entsprechend lange dauert. Schon die Aufnahme eines Gesamtbildes erfordert mehrere Minuten, was im Wesentlichen durch die Ausleserate der verwendeten Kamera festgelegt ist. Die Positionsbestimmung der Moleküle in den Einzelbildern erfolgt durch aufwendige rechnerische Prozeduren, wie sie beispielsweise in Egner et al., Biophysical Journal, S. 3285-3290, Band 93, November 2007, beschrieben ist. Die Bearbeitung aller Einzelbilder und das Zusammensetzen zu einem hochaufgelösten Gesamtbild, also ein Bild, in dem die Orte der Markierungsmoleküle mit einer jenseits der Beugungsgrenze liegenden Auflösung angegeben sind, dauert typischerweise 1–2 Stunden.

[0014] Weitere Artikel zu hochaufgelösten Verfahren sind: Hell, S. W. (2007): ”Far-Field Optical Nanoscopy”. Science 316, 1153–1158. und zur SAX(Saturated exitation)Microscopy: Fujita et al., Phys. Rev. Lett. (2007), Yamanaka et al., J. Biomed. Opt. (2008))

[0015] Die hochauflösenden Verfahren nach dem Stand der Technik weisen verschiedene Nachteile auf:
Für das STED-Verfahren ist es die Verfügbarkeit von Farbstoffen und die erforderliche hohe Laserintensität.
Bei RESOLFT/GSD ist eine hohe Zahl von Schaltzyklen erforderlich
PAL-M/STORM hat eine langsame Bilderzeugungsgeschwindigkeit.
Bei SAX werden die Farbstoffe stark ausgebleicht.

Erfindung:

[0016] Die Erfindung beschreibt ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Erzielung einer mikroskopischen Auflösung unterhalb der Beugungsgrenze des Mikroskops gemäß den unabhängigen Ansprüchen. Bevorzugte Weiterbildungen sind Gegenstand der abhängigen Ansprüche.

[0017] Die Erfindung beschreibt eine Methode, hochauflösende Bilder zu erzeugen auch für komplexere Proben als einer aus Einzelmolekülen bestehenden Probe.

[0018] Hierbei wird erfindungsgemäß die räumliche Veränderung von Grauverteilungen ausgenutzt.

[0019] Das Verfahren besteht aus folgenden wesentlichen Schritten:

a. Mit einer Genauigkeit, die über der erreichbaren optischen Auflösung liegt, wird die Beleuchtung (ein Beleuchtungsmuster) zur Detektion verschoben.

b. Während der Verschiebung werden mehrere Bilder mit der höchsten erreichbaren optischen Auflösung aufgenommen, die jeweils einer bestimmten Verschiebelage des Beleuchtungsmusters entsprechen.

c. Aus den detektierten Signalen, beispielsweise aus einem Fluoreszenzsignal, der einzelnen Aufnahmen wird ein hochauflösendes Bild berechnet.

d. Durch Verwendung nichtlinearer Anregung und der entsprechenden Fluoreszenzmarker kann die Auflösung weiter verbessert werden.

[0020] Der Kerngedanke der Erfindung ist anhand eines Beleuchtungsspots eines Laser-Scanning-Mikroskopes in **Fig. 1a**–d) dargestellt.

[0021] Zu sehen ist wie das Scanfeld eines Laser-Scanning-Mikroskopes (LSM) siehe auch **Fig. 2**, durch Verschiebung mit geeigneten Mitteln (Tischverschiebung, zweiter Scanner) über die Probe bewegt wird. L1 ist der Lichtspot des LSM, der in einem definierten Scanraster über die Probe bewegt wird.

[0022] Dabei werden den einzelnen Stellungen beispielsweise eines Punktlichtstrahls jeweils Detektionswerte zugeordnet, um ein Bild der Probe zu erzeugen. Wegen der Beugungsbegrenzung der optischen Abbildung weisen die einzelnen Scanpunkte einen Mindestabstand auf (beispielsweise 20 nm).

[0023] Es sind beispielhaft zwei fluoreszierende Objekte f1, f2 in einem beispielhaften. Probenbereich Pr in der Probe dargestellt.

[0024] In **Fig. 1a** erfolgt keine Detektion von f1, f2 weil sich der gescannte Bereich von L außerhalb des Probenbereichs Pr befindet in dem f1, f2 angeordnet sind.

[0025] In **Fig. 1b** ist durch Verschiebung des Scanfeldes (des Beleuchtungsrasters das durch das LSM erzeugt wird) gegen die um einen Betrag unterhalb der Auflösungsgrenze, beispielsweise 10–20 nm das Objekt f1 im Detektionsbereiches des Laserspots L und liefert ein Detektionssignal.

[0026] In **Fig. 1c** stammt durch die weitere Verschiebung von L1 das Detektionssignal von f2.

[0027] In **Fig. 1d** werden die Objekte f1, f2 wiederum nicht von L erfasst.

[0028] In **Fig.** 1 sind auch die Verteilungen der jeweiligen Beleuchtungsintensität Bi und Detektionsintensität Di dargestellt.

[0029] Auf das Berechnungsverfahren zur Trennung/Rekonstruktion des Signals der einzelnen Objekte durch Entfaltung der Signale wird weiter unten eingegangen.

[0030] Das der Beleuchtungsspot beispielsweise in einem LSM mit größerer Genauigkeit eingestellt werden kann als die beugungsbegrenzte Auflösung des Mikroskopes, kann durch Verschiebung des Beleuchtungsrasters relativ zur Detektion die Auflösung erhöht werden.

[0031] In Fig. 2 ist eine mögliche Ausführungsform der Erfindung dargestellt.

[0032] Sie besteht aus einem Laser-Scanning-Mikroskop. dessen Grundprinzip verschiedentlich, beispielsweise in DE 197 02 753, ausführlich beschrieben ist.

[0033] In diesem Fall wird jedoch gemäß der vorliegenden Erfindung das Beleuchtungslicht BL über einen ersten Scanner SC1, Linse L und Umlenkspiegel SP1 und einen teildurchlässigen Spiegel SP2 in Richtung eines zweiten Scanners SC2 (des X/Y Scanners des LSM) geleitet und von diesem über eine Scanoptik SCO, Tubuslinse TL und Objektiv O auf eine Probe P fokussiert.

[0034] Das Probenlicht gelangt auf dem Rückweg über SC2, SP2, Filter F und eine Pinholeoptik PO und ein Pinhole PH auf einen Detektor DE zur konfokalen Detektion.

[0035] Vorteilhaft wird ein schneller Scanner SC2 (LSM) mit einem langsamen Scanner SC1 kombiniert.

[0036] Der Scanner SC1 verschiebt das Beleuchtungsraster des LSDM gegen die Detektion wie anhand von **Fig.** 1 bereits dargestellt.

[0037] Bei jedem Schritt des Scanners SC1 erfolgt eine Abrasterung der Probe mit SC. 2. Hierdurch wird eine gaußförmige Beleuchtungsfunktion (**Fig.** 1) langsam über die Probe – relativ zur Detektion – verschoben.

[0038] Die Verschiebung und jeweilige Bildaufnahme erfolg beispielsweise in 10 nm Schritten.

[0039] Die Zahl der Einzelpositionen richtet sich nach der zu erreichenden Auflösung.

[0040] Statt des Scannners SC1 zur Verschiebung des Scanfeldes könnte auch die Probe mit einem hochgenauen Probentisch langsam verschoben werden.

[0041] Besonders vorteilhaft ist ebenfalls die Verwendung von mehreren konfokalen Detektoren gleichzeitig, wobei einer immer mit der Anregung läuft (standard confocal) und weitere Detektoren unabhängig davon konfokal in die Probe schauen. Der Vorteil besteht zum einen in der Nutzung allen Fluoreszenzlichtes, zum anderen in der Verbesserung des SNR was ebenfalls mit in die Auswertung einfließen kann, da für die selbe Beleuchtung mehrere Messpunkte detektiert werden.

[0042] In Fig. 3 ist eine Weitfeldausführung der Erfindung mit einem Gitter zur Beleuchtungsmodulierung dargestellt. Statt eines Gitters kann eine analog optisch Wirkendes Lichtmuster oder Interferenzmuster eingesetzt werden.

[0043] Die Probe P wird über ein Liniengitter G und das Objektiv O im Weitfeld (mit einer nicht dargestellten Lichtquelle) beleuchtet.

[0044] Zur Trennung von Beleuchtungs- und Detektionslicht ist ein Strahlteiler ST vorgesehen.

[0045] Das Probenlicht wird über Filter F, auswechselbare Tubuslinsen TL über einen CCD Empfänger DE ortsauflösend detektiert.

[0046] Über das Liniengitter G werden Beleuchtungslinien auf der Probe erzeugt.

[0047] Durch Verschieben des Gitters zur Probe wird quasi ein stehendes Scanfeld, repräsentiert durch die Beleuchtungslinien, hochgenau, beispielsweise mittels eines das Gitter verschiebenden Piezoantriebes PZ, verschoben Die Größenordnung der Verschiebung liegt hierbei unterhalb des Abstandes der einzelnen Beleuchtungslinien auf der Probe.

[0048] Die modulierte Beleuchtungsstrahlung die durch die bekannte Gittermodulation festgelegt wird, wird durch die Gitterverschiebung in zu **Fig.** 1 analoge Beziehung zur Detektionsmodulation gebracht und ein hochauflösendes Bild kann errechnet werden.

[0049] Fig. 4 zeigt eine nicht-descannte Ausblendung der Detektion bei der Laserlicht scannend über die Probe bewegt wird, über einen dichroitischen Spiegel Fd in Richtung einer Detektoranordnung, hier vorzugsweise mit zwei Detektoren CCD1 und CCD 2 in Transmission und Reflektion eines dichroitischen Spiegels Fd1 die beispielsweise unterschiedliche Wellenlängen detektieren können.

[0050] Es ist auch vorteilhaft eine Anordnung von CCD1 und CCD2 in unterschiedlichen Z-Ebenen zur Erhöhung der z-Auflösung (Richtung der optischen Achse) denkbar.

[0051] Durch Verschiebung des Scanfeldes und der entsprechenden Signale auf den Detektoren CCD1 und CCD2 um geringe Beträge wie schon oben erwähnt kann die Auflösung erfindungsgemäß erhöht werden.

[0052] Die Verschiebung kann durch geringfügige Verschiebung der Detektion beispielsweise entlang einer X Richtung senkrecht zur optischen Achse z erfolgen, aber auch beispielhaft durch Verschiebung der Probe oder durch einen zweiten Scanner wie anhand von Fig. 2 beschrieben.

[0053] Fig. 5 zeigt eine zu Fig. 2 ähnliche Anordnung bei der eine descannte Abbildung auf einen Flächendetektor wie einen CCD Emfänger oder ein PMT- oder APD oder CMOS Array erfolgt. Das Pinhole des Scanningmikroskopes kann hier durch Auslesen nur bestimmter Detektorpixel ersetzt werden.

[0054] Jede Detektoruntereinheit detektiert quasi konfokal.

[0055] Die in obigen anderen Ausführungen erforderliche Verschiebung zur Detektion wird hier durch eine „Verschiebung" im Sinne des Wechsels zwischen vorzugsweise benachbarten Detektorelementen (Pixeln) simuliert.

[0056] Dabei können durch geeignete Schaltung der Detektorpixel Verschiebungen bezüglich der Detektion eingestellt werden, die den in den oben geschilderten Ausführungen entsprechen, ohne dass eine direkte mechanische Bewegung erzeugt werden muss.

[0057] Durch Pixelversatz entsteht vorteilhaft die Wirkung einer Verschiebung eines Detektionsfeldes zu einem Beleuchtungsfeld.

[0058] Dies ist sinngemäß auch bei einer non-descannten Detektion wie in Fig. 4 möglich, beispielsweise vorteilhaft anstelle einer weiteren Bewegung, beispielsweise der Probe.

[0059] Vorraussetzung zur Auflösungserhöhung ist natürlich (unter Berücksichtigung des Abbildungsmaßstabes der Abbildungsoptik des Mikroskopes) dass die effektive Pixelgröße am Ort des Detektors nur ein Bruchteil der Halbwertsbreite der PSF beträgt, beispielsweise ein Viertel.

[0060] Die oben anhand von Fig. 5 beschriebene Ausführung 5 hat zusammengefasst folgende wesentliche Vorteile:

1. Da der beugungsbegrenzte Punkt „Modulation/Strukturierung" lateral in alle Raumrichtungen aufweist kann man den Scanmodus des LSM beibehalten (in x- und y-Richtung) und dennoch annähernd isotrope Auflösungssteigerung erreichen. Beim Scannen der Beleuchtung nimmt durch die Punktförmige Strukturierung die Beleuchtung in allen Raumrichtungen zu und wieder ab. Dies ist vorteilhaft wenn das Verfahren mit strukturierter Beleuchtung verglichen wird, bei der mindestens 3 Raumrichtungen erforderlich sind. Damit ergibt sich auch ein Geschwindigkeitsvorteil für andere Anordnungen die den Punktscanner verwenden.
2. Der jeweilige Beugungsbegrenzte Punkt beinhaltet schon die höchste mögliche Raumfrequenz und stärkstmögliche Modulation
3. Der Array-Detektor ist so angeordnet dass jede Detektoruntereinheit (Pixel) konfokal detektiert. Damit ergibt sich neben der konfokalen Hintergrundsunterdrückung eine laterale Auflösungssteigerung die über das konfokale LSM hinaus geht.
4. Der Arraydetektor parallelisiert das sonst nötige zusätzliche Scannen der Anregung über den Detektionsspot!

Erhöhung der vertikalen (Z)-Auflösung:

[0061] Eine erfindungsgemäße Hochauflösung kann in analoger Weise auch in vertikaler (z) Richtung erzielt werden, indem bei der Abtastung der Probe in bekannter Weise in Z-Stapeln durch eine zusätzliche Verschiebung in Z-Richtung ein Abstand zwischen der Fokalebene und der Beleuchtungsebene geschaffen und jeweils detektiert wird. Beispielsweise kann in Fig. 2 in Z Richtung verschiebbare Linse, dargestellt anhand der Tubuslinse TL schematisch mit Pfeilen in z-Richtung, vorgesehen sein, um den Fokus, der, beispielsweise durch ein Piezoobjektiv in Z-Richtung verstellt wird, um Z-Stapel aufzunehmen, in Zwischenstellungen zwischen den einzelnen Z-Stellungen bei der Bildaufnahme zu bringen.

[0062] Bei einem Linienscanner kann analog zu Fig. 2 und Fig. 3 durch Verschiebung der Probe oder des Scanfeldes ebenfalls eine Implementierung der Erfindung erfolgen.

[0063] Besondere Vorteile bietet der Linien Scanner durch die deutlich schnellere Bildaufnahme bei Erhaltung der Konfokalität.

[0064] Weitere Anwendungen um Muster schnell über die Probe zu bewegen, wobei jeweils eine Bewegung des abgerasterten Detektionsbildes über die Probe gemäß der Erfindung erfolgt, sind im Rahmen der Erfindung enthalten, wie die Verwendung von Spatial Lightmodulators/DMDs in der Beleuchtung.

[0065] Die Verallgemeinerung des Prinzips führt zu der folgenden Methode für die Rekonstruktion von Probeninformationen die eine Ausdehnung kleiner als die Beugungsgrenze haben.

Grundbetrachtungen:

[0066] Die Intensität an jedem Bildpunkt kann in der folgenden Form angegeben werden:

$$D(x_0) \propto \int_{-\infty}^{\infty} H(x - x_0) \cdot I(x) \cdot c(x) dx$$

[0067] Dabei handelt es sich bei c(x) um die Konzentration der Fluorophore, H ist die „Point-Spread-Funktion" der Detektion, I(x) ist die Beleuchtungsintensität am Ort x, die für den Fall eines „Scanning"-Mikroskops die „Point-Spread-Funktion der Beleuchtung darstellt.

[0068] Für den Fall eines pixelierten Kamera-Detektors geht das Integral in eine Riemann-Summe über.

[0069] Wird nun der Anregungs-Spot oder das Anregungs-Muster mit hoher Genauigkeit entlang der x-Richtung über die Probe bewegt, so erhält man folgendes Gleichungssystem:

$$\begin{aligned} D_{1,j} &= \sum_j I_{1,j} \bullet c_j \bullet H_{1,j} \\ D_{2,j} &= \sum_j I_{2,j} \bullet c_j \bullet H_{2,j} \\ &\vdots \\ D_{n,j} &= \sum_j I_{n,j} \bullet c_j \bullet H_{n,j} \end{aligned}$$

mit n als Index für die verschiedenen Beleuchtungseinstellungen und j als Index für den Detektor(Kamera)pixel.

[0070] Da das Beleuchtungsmuster/als auch die "Point-Spread-Funktion" H i. a. gut bekannt sind, ist die Lösung des hochgradig überbestimmten Gleichungssystems z. B. durch Pseudo-Matrix-Inversion („Penrose Moore Inverse") – analog zum „Zeiss-Unmixing"-Algorithmus – relativ einfach möglich.

[0071] Das Signal-Rausch-Verhältnis der überabgetasteten Region limitiert die mögliche Auflösung.

[0072] Das "Laser-Scanning"-Mikroskop ist in dieser Hinsicht ideal, da die Spots intrinsisch das Beugungslimit erreichen. Die Zahl der notwendigen Iterationen wird klein sein. Generally the number of iterations compared to the modulation depth can be optimized with the signal to noise for each measurement to achieve best resolution enhancement.

[0073] Es ist zu bemerken, dass die Auflösungssteigerung sich nur in „Scan"-Richtung ergibt. Analog zur Strukturierten Beleuchtungsmethode ermöglicht das Scannen der Probe in mindestens drei Richtungen, Bildinformationen in höherer Auflösung aus den Messdaten rekonstruieren zu können.

Mathematischer Formalismus:

[0074] Das eindimensionale Bild ist durch das folgende Integral gegeben:

$$D(x,p)=\int_{x'} O(x')E(x'-p)H(x-x')dx'$$

wobei O(x) das Objekt repräsentiert, E(x) ist das Anregungsprofil (p ist die Phase, oder der Offset des Anregungsprofils in verschiedenen „Scans"), und H(x) ist die „Point Spread Function" (PSF) der Detektion.

Darstellung des Messsignals im Fourierraum

[0075] D(x, p) kann hinsichtlich der x-Koordinate oder hinsichtlich der p-Koordinate fouriertransformiert werden.

Strukturierte Beleuchtung.

[0076] Wenn D(x, p) hinsichtlich x fouriertransformiert wird, dann erhält man:

$D^f(\omega, p) = FT_x\{O(x')E(x' - p)\}H^f(\omega)$

[0077] Ein Produkt A im Ortsraum wird zu einer Faltung im Fourierraum:

$$D^f(\omega,p)=\left\{\int_{\omega} O^f(\omega')E^f(\omega-\omega',p)d\omega'\right\}H^f(\omega)$$

oder

$D^f(\omega, p) = \{O^f(\omega) \otimes E^f(\omega, p)\}H^f(\omega)$

[0078] Die diskrete Darstellung von $E^f(\square, p)$ sieht im Fourierraum folgendermaßen aus:

$$E^f(\omega,p)=\sum_n e_n(p)\delta(\omega-\omega_n)$$

[0079] Damit erhalten wir schlussendlich:

$$D^f(\omega,p)=\sum_n e_n(p)O^f(\omega-\omega_n)H^f(\omega)$$

(1)

[0080] Wenn das Anregungsprofil einen einfach-expontiellen Verlauf hat, gilt:

$E^f(\omega, p) = A\delta(\omega) + B(\omega_g p)\delta(\omega + \omega_g) + B(-\omega_g p)6(\omega - \omega_g)$

und dann wird aus Gleichung (1)

$D^f(\omega, p) = \{AO^f(\omega) + B(-\omega_g p)O^f(\omega - \omega_g) + B(\omega_g p)O^f(\omega + \omega_g)\}H^f(\omega)$ (2)

[0081] Gleichung (2) verkörpert math. das klassische Konzept zur strukturierten Beleuchtung, wo $E^f(\omega, p)$ die Detektionsbänder definiert und die Detektions OTF $H^T(\omega)$ die Gewichtung der Bänder festlegt.

Scannende Beleuchtung

[0082] Wenn D(x, p) hinsichtlich p fouriertransformiert wird, dann folgt:

$D^f(x, \omega) = FT_{x'}\{O(x')H(x - x')\}E^f(\omega)$

[0083] Ein Produkt A im Ortsraum wird zu einer Faltung im Fourierraum:

$$D^f(x,\omega) = \left\{\int_\omega O^f(\omega')H^f(x,\omega-\omega')d\omega'\right\}E^f(\omega)$$

oder

$D^f(x, \omega) = \{O^f(\omega) \otimes H^f(x, \omega)\}E^f(\omega)$

$H^f(x, \square)$ kann im Fourierraum als diskrete Reihe von Frequenzkomponenten dargestellt werden:

$$H^f(x,\omega) = \sum_n h_n(x)\delta(\omega-\omega_n)$$

[0084] Die Formel des detektierten Bildes lautet dann:

$$D^f(x,\omega) = \sum_n h_n(x)O^f(\omega-\omega_n)E^f(\omega)$$

(3)

[0085] Im Vergleich zu Gleichung (1) sind Anregung und Detektion in Gleichung (3) ausgetauscht.

[0086] Für einfach exponentielle Anregung

$E^f(\omega) = A\delta(\omega) + B\delta(\omega + \omega_g) + B\delta(\omega - \omega_g)$

tragen 3 Frequenzen zum Signal bei. Da jedoch die Detektions-OTF $H^f(x, \square)$ aus einem (quasi) kontinuierlichen Spektrum von Frequenzen besteht, tragen alle Frequenzen zum Signal bei, die sich aus der Summe von $\square_g$ und der höchsten sich vom Rauschen unterscheidenden Frequenzkomponente in $H^f(x, \square)$ ergeben.

Ortsraum (Kamera):

[0087] Das an einem CCD-Pixel detektierte Signal lautet:

$$D(x_k,p) = \int_{x_k-\Delta x}^{x_k+\Delta x} D(x,p)dx = \int_{x'} O(x')E(x'-p)dx' \int_{x_k-\Delta x}^{x_k+\Delta x} H(x-x')dx = \int_{x'} O(x')E(x'-p)\hat{H}(x_k,x')dx'$$

[0088] Wir betrachten zwei Pixel detektiert am Ort x_k and $x_k + \square x$:

$$D(x_k,p) = \int_{x'} O(x')E(x'-p)\hat{H}(x_k,x')dx'$$

$$D(x_k+\Delta x,p) = \int_{x'} O(x')E(x'-p)\hat{H}(x_k+\Delta x,x')dx'$$

[0089] Als zu rekonstruierendes Objekt O(x), betrachten wir einen Satz von möglichst gleichverteilten Punkten h_i, I = 1, ..., m:

$$O(x)=\sum_{i=1}^{m} a_i \delta(x-h_i)$$

(4)

wobei □(x) die Dirac Delta Funktion ist, a_i sind die zu rekonstruierenden Bildsignale. In dem gegebenen Modell kann das "over-sampling" mit m/2 quantifiziert werden. Mit (4) nehmen die detektierten Pixel $D(x_k, p)$ and $D(x_k + □x, p)$ die folgende Form an

$$D(x_k,p)=\sum_{i=1}^{m} a_i E(h_i-p)\hat{H}(x_k,h_i)$$

$$D(x_k+\Delta x,p)=\sum_{i=1}^{m} a_i E(h_i-p)\hat{H}(x_k+\Delta x,h_i)$$

[0090] Wenn außerdem das Anregungsprofil ein Kosinus und die PSF H(x) ein Gaussprofil ist, dann erhalten wir:

$$D(x_k,p)=\sum_{i=1}^{m} a_i \cos\{\omega(h_i-p)\}\hat{H}(x_k,h_i)$$

$$D(x_k+\Delta x,p)=\sum_{i=1}^{m} a_i \cos\{\omega(h_i-p)\}\hat{H}(x_k+\Delta x,h_i)$$

(5)

mit

$$\hat{H}(x_k,x')=\int_{x_k-\Delta x}^{x_k+\Delta x} H(x-x')dx=\int_{x_k-\Delta x}^{x_k+\Delta x}\exp\left\{-(x-x')^2/(2\sigma^2)\right\}dx$$

[0091] Die Standardabweichung σ kann näherungsweise beschrieben werden mit σ = 0.21 λ/NA, wo λ die Emissionswellenlänge und NA die numerische Apertur ist.

[0092] Die zwei Sätze von linear algebraischen Gleichungen (5) können hinsichtlich der unbekannten a_0 und a_1 gelöst werden. Es ist zu beachten, dass die Gleichungen (5) zusätzlich durch die Phase des Anregungsprofils parametrisiert sind. Deshalb können mehr linear unabhängige Gleichungen für verschiedene p erzeugt werden. Dies erhöht den Informationsgehalt des Gleichungssatzes (5) und führt schlussendlich zu einer genaueren Rekonstruktion mit besserer Auflösung.

[0093] Das Gleichungssystem kann schlussendlich in Matrixform angegeben werden:

D = SA

wo

$$\mathbf{D} = [D(x_k, p_1), D(x_k + \Delta x, p_1), ..., D(x_k, p_n), D(x_k + \Delta x, p_n)]^T$$

$$\mathbf{S} = \begin{bmatrix} \cos\{\omega(h_i - p_1)\}\hat{H}(x_k, h_i) \\ \cos\{\omega(h_i - p_1)\}\hat{H}(x_k + \Delta x, h_i) \\ \cdots \\ \cos\{\omega(h_i - p_n)\}\hat{H}(x_k, h_i) \\ \cos\{\omega(h_i - p_n)\}\hat{H}(x_k + \Delta x, h_i) \end{bmatrix}_{i=1,...,m}$$

$$\mathbf{A} = [a_i]^T_{i=1,...,m}$$

und n die Anzahl von scans ist.

[0094] Die Elemente der Matrix D sind gemessene Werte, d. h. sie haben einen gewissen Fehler ΔD.

[0095] Diese Fehler übertragen sich in die Lösung A, so dass A mit einen Fehler ΔA behaftet ist.

[0096] Der Fehler von A ist bekanntermassen mit dem Fehler von D verknüpft über

$$\frac{\|\Delta \mathbf{D}\|}{\|\mathbf{D}\|} \leq \kappa(\mathbf{S}) \frac{\|\Delta \mathbf{A}\|}{\|\mathbf{A}\|}$$

wo

$$\kappa(\mathbf{S}) = \|\mathbf{S}\|\|\mathbf{S}^{-1}\|$$

die Konditionierungszahl der Matrix S und ||.|| die Norm der Matrix sind.

[0097] Umso größer die Konditionierungszahl ist, desto weniger resistent ist das System hinsichtlich der Fehler der Eingangsdaten.

[0098] Eine Möglichkeit zur Abschätzung der Konditionierungszahl ergibt sich durch die Verwendung der singulären Werte der Matrix S:

$\kappa(S) = s_{max}(S)/s_{min}(S)$

wo $s_{max}(S)$ und $s_{min}(S)$ der maximale und minimale singuläre Wert von S sind.

[0099] Die Konditionierungszahl ist also ein Mass dafür, wie gut die Hochauflösungsinformation rekonstruiert werden kann. Aus der Herleitung wird klar, daß die Verbesserung der Auflösung vom Zusammenspiel zweier Faktoren abhängig ist:

1. Vom Signal-zu Rausch-Verhältnis, ähnlich wie die übliche Dekonvolution. Das heißt die oben beschriebenen Gleichungen werden aufgrund von Rauschen u. U. als nicht mehr linear unabhängig erkannt und können somit nicht mehr zur Lösung beitragen. Die Lösung verliert Eindeutigkeit.
2. Die Steilheit der „Beleuchtungs-psf". Je größer die Modulation, desto eher erlangt man linear unabhängige Information die zur Lösung des Gleichungssystem beitragen kann.

[0100] Die Verbesserung der Auflösung sollte mindestens um den Faktor zwei der konfokalen Auflösung liegen da die scannende Beleuchtung analog zur strukturierten Beleuchtung mit ihren Frequenzen die Auflösungsgrenze hinaus schiebt. Da die höchste in die Probe mit Licht durch das Objektiv abbildbare Frequenz jedoch genauso beugungslimitert ist, ergibt sich wie oben und auch bei strukturierter Beleuchtung hergeleitet der Faktor zwei. Jedoch gilt hier, dass die konfokale.

[0101] Auflösung Ausgangspunkt ist und nicht wie bei strukturierter Beleuchtung die Auflösung des Weitfeld Mikroskops.

[0102] Erste Experimente haben Auflösung von < 90 nm gezeigt.

Modulierte Beleuchtung:

[0103] Das beschriebene Verfahren (Anregung über die Detektion zu scannen) hat aufgrund des Abfalls der PSF sowohl Detektions- als auch Anregungsseitig den Nachteil, dass bei nur geringem Überlapp von Anregung und Detektion, die gemessene Intensität klein ist und damit das Signal-zu-Rauschverhältnis ebenfalls. Modulation der Beleuchtung wie z. B. die Erhöhung der Laserintensität über einen AOTF oder direkte Modulation des Laser und bei gepulster Beleuchtung durch Anpassung der Pulsrate oder Höhe oder Anpassung der Belichtungszeit usw. kann diesen Effekt vollständig eliminieren und das SNR für diese Datenpunkte entscheidend verbessern. Hierbei kann die Veränderung der Intensität oder Modulation in einem Regelkreis eine einstellbare Regelgröße zur Erzielung g eines optimalen Detektionssignals darstellen.

[0104] Besonders attraktiv ist es das Signal/Rauchsverhältnis SNR während des gesamten Vorgangs konstant zu halten oder sogar in den Bereichen mit geringem Überlapp von Anregung und Detektion zu erhöhen, um die Entfaltung (das Lösen des oben beschriebenen Linearen Gleichungssystems) entscheidend zu verbessern und damit die Auflösung im Bild. Das Gleichungssystem für die Bildpunkte mit nur geringem Überlapp ist klein da die meisten detektierten Punkte nicht beleuchtet sind und damit nur Null-Beiträge liefern. Je genauer man also diese Intensitäten messen kann desto besser kann man dieses kleine Gleichungssystem mit nur wenigen unbekannten lösen.

[0105] Allgemeiner formuliert ermöglicht die Modulation durch Verbesserung des SNR, die gemessene linear unabhängige Information wirklich zu nutzen und nicht im Rauschen zu verlieren.

[0106] Aus diesen Überlegungen ergibt sich dass eine Kombination der Technik mit DIM (Dynamic Illumination Microscopy oder CLEM) besonders vorteilhaft ist, da hier ein voreingestelltes optimales SNR punktweise über die Regelung der Beleuchtung erreicht werden kann.

[0107] Außerdem ist eine Kombination mit folgenden nichtlinearen Verfahren denkbar und vorteilhaft:

1. STED/RESOLFT, da dort die PSF schon um einen Faktor 2–3 oder mehr steiler ist, und somit sich die hiermit erzeugte Auflösungsteigerung noch hinzukommt.
2. Verwendung von photoaktivierbaren Farbstoffen, da sich hier die PSF der Aktivierung und der Fluoreszenzanregung multiplizieren und die effektive PSF damit steiler wird.
3. Alle Verfahren wie Saturierung des Farbstoffes etc., die auch für die nichtlineare strukturierte Beleuchtung verwendet werden können (R. Heintzmann, T. M. Jovin, and C. Cremer. Saturated pattemed excitation microscopy – A concept for optical resolution improvement. J. Opt. Soc. Am. A, 19(8): 1599–1609, 2002)
4. Multiphotonen Mikroskopie (EP 500717 B2)

[0108] Mögliche vorteilhafte und überraschende Implementierungen der Erfindung sind ohne Anspruch auf Vollständigkeit:
Das Durchschieben einer Blende im Zwischenbild:
Das Verfahren funktioniert auch in einfacheren Systemen, bei denen beleuchtungsseitig durch schieben einer Blende im Zwischenbild dasselbe Verfahren angewendet werden kann. Die Kante der Beleuchtung dient hier als Beleuchtungsgewichtung und wird zur Entfaltung genutzt.

[0109] Eine Weitfeldbeleuchtung mit scharfer Kante stellt im weitesten Sinne eine Strukturierung der Beleuchtung dar.

[0110] Besonders vorteilhaft ist die Anwendung des Verfahrens außerdem in Reflexion (ohne Fluoreszenz) da gewöhnlich die Signal zu Rausch Verhältnisse in Reflexion deutlich besser sind (beispielweise Punktscanner in der Materialmikroskopie) Spinning Disc.

[0111] Die Verwendung des Verfahrens in einem spinning disc Aufbau ist ebenfalls vorteilhaft. Dabei wird nur durch die Disk beleuchtet und auf einer Kamera ohne einhole detektiert. Die Konfokalität kann durch Software/Bildverarbeitung auf der Kamera erfolgen (Virtual einhole). Hier kann die Genauigkeit mit der das Scanning zur Detektion und Probe steht in die Fertigung der Scheibe fließen, was extrem vorteilhaft ist und Fehlerquellen für die Verrechnung vermeidet.

SPIM

[0112] Die SPIM Technologie ist beispielsweise in DE 102 57 423 A1, WO 2004/0530558 beschrieben.

[0113] Die Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens birgt für SPIM bei Scannen des Lichtblattes einen Auflösungsgewinn in axialer Richtung. Die Auflösungssteigerung lateral kann beispielweise durch eine Strukturierung des Lichtblattes erfolgen, deren Phase scannend durch die probe geschoben wird. Es ergeben sich alle typischen Vorteile des SPIM plus Auflösungssteigerung! CARS, SHG, RAMAN: Da Fluoreszenz und Linearität der Anregung in keiner Weise Voraussetzung dieses Verfahrens sind, ergibt sich ebenfalls ein Vorteil für Verfahren wie CARS, Second Harmonic Generation oder stimulated RAMAN.

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 5043570 [0005]
- US 5866911 [0007]
- DE 4416558 C2 [0007]
- US 6633432 [0007]
- DE 10325460 A1 [0007]
- US 5867604 [0008]
- EP 1157297 B1 [0009]
- WO 2006127692 [0010]
- DE 102006021317 [0010]
- DE 19702753 [0032]
- EP 500717 B2 [0107]
- DE 10257423 A1 [0112]
- WO 2004/0530558 [0112]

Zitierte Nicht-Patentliteratur

- Egner et al., Biophysical Journal, S. 3285-3290, Band 93, November 2007 [0013]
- Hell, S. W. (2007): "Far-Field Optical Nanoscopy". Science 316, 1153–1158 [0014]
- SAX(Saturated exitation)Microscopy: Fujita et al., Phys. Rev. Lett. (2007), Yamanaka et al., J. Biomed. Opt. (2008)) [0014]
- R. Heintzmann, T. M. Jovin, and C. Cremer. Saturated pattemed excitation microscopy – A concept for optical resolution improvement. J. Opt. Soc. Am. A, 19(8): 1599–1609, 2002 [0107]

Patentansprüche

1. Verfahren zur Steigerung der Auflösung eines Mikroskops bei der Detektion einer beleuchteten Probe, wobei in einer ersten Position ein Beleuchtungsmuster auf der Probe erzeugt wird, mit einer Auflösung die vorzugsweise etwa in der Größenordnung der erreichbaren optischen Auflösung des Mikroskopes oder darüber liegt,
wobei zwischen der Detektion und dem Beleuchtungsmuster mindestens einmal mit einer Schrittweite unterhalb der Auflösungsgrenze des Mikroskops eine Relativverschiebung, vorteilhaft senkrecht zur Beleuchtungsrichtuing, von einer ersten in mindestens eine zweite Position des Beleuchtungsmusters auf der Probe erzeugt wird und sowohl in der ersten als auch in der zweiten Position eine Detektion und Abspeicherung der Detektionssignale erfolgt.

2. Verfahren zur Steigerung der Auflösung eines Mikroskops bei der Detektion einer. beleuchteten Probe, wobei ein moduliertes Beleuchtungsfeld, vorzugsweise ein Beleuchtungsmuster, mindestens ein beugungsbegrenzter Punkt auf der Probe erzeugt wird, und dieses relativ zu Probe und/oder Detektion verschoben wird, wobei bei die Schrittweite der Verschiebung kleiner als die Auflösungsgrenze des Mikroskopes, vorzugsweise unterhalb der Hälfte der Auflösungsgrenze liegt und jeweils eine Abspeicherung der Detektionssignale erfolgt.

3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei durch Verrechnung der abgespeicherten Detektionssignale ein hochaufgelöstes Bild erzeugt wird.

4. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Relativerschiebung zur horizontalen Auflösungserhöhung senkrecht zur optischen Achse des Mikroskopes und/oder zur vertikalen Auflösungserhöhung in Richtung der optischen Achse erfolgt.

5. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei bei einer Signalintensität D an jedem Bildpunkt auf dem Detektor mit

$$\boldsymbol{D}(\boldsymbol{x}_0) \propto \int_{-\infty}^{\infty} \boldsymbol{H}(\boldsymbol{x}-\boldsymbol{x}_0)\cdot \boldsymbol{I}(\boldsymbol{x})\cdot \boldsymbol{c}(\boldsymbol{x})d\boldsymbol{x}$$

mit c(x): Konzentrationsverteilung der Fluorophore, H: „Point-Spread-Funktion" der Detektion, /(x) Beleuchtungsintensitätverteilung in Abhängigkeit von x,
x: Vektor (x, y),
ein Anregungs-Spot oder ein Anregungs-Muster entlang einer Richtung (z. B. x) über die Probe bewegt wird und für Positionen 1,2 n für die Beleuchtungseinstellungen und j als Index für den Detektor(Kamera)pixel jeweils die Intensität bestimmt wird:

$$\boldsymbol{D}_{1,j} = \sum_j \boldsymbol{I}_{1,j} \bullet \boldsymbol{c}_j \bullet \boldsymbol{H}_{1,j}$$

$$\boldsymbol{D}_{2,j} = \sum_j \boldsymbol{I}_{2,j} \bullet \boldsymbol{c}_j \bullet \boldsymbol{H}_{2,j}$$

$$\vdots$$

$$\boldsymbol{D}_{n,j} = \sum_j \boldsymbol{I}_{n,j} \bullet \boldsymbol{c}_j \bullet \boldsymbol{H}_{n,j}$$

und die resultierenden Gleichungssysteme zumindest näherungsweise nach c gelöst werden.

6. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Beleuchtungsmuster durch Punkt- oder linienförmige Abrasterung der Probe und Erzeugung eines Punkt- oder Linienrasters entsteht.

7. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Weitfeldbeleuchtung der Probe erfolgt und das Beleuchtungsmuster durch eine Gitterprojektion oder Projektion einer Lichtverteilung oder Projektion einer Lochscheibe entsteht.

8. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche,
wobei die Relativverschiebung erzeugt wird durch
– Verschiebung der Probe und/oder

– Verschiebung eines Scanfeldes und/oder
– Verschiebung von ausgelesenen Detektorelementen und/oder
– Verschiebung eines Gitters oder Beleuchtungsmusters

9. Mikroskop, insbesondere nach einem der vorangehenden Ansprüche, bestehen aus Beleuchtungslicht, das über die Mikroskopanordnung auf die Probe gelangt und einer Detektionseinheit zur Detektion des Probenlichtes,
wobei Mittel zur Erzeugung eines modulierten Beleuchtungsfeldes, vorzugsweise eines Beleuchtungsmusters, mindestens eines Punktes auf der Probe vorgesehen sind, die jeweils einen Abstand zwischen beleuchteten und/oder detektierten Probenabschnitten aufweist, der vorzugsweise etwa in der Größenordnung der erreichbaren optischen Auflösung des Mikroskopes oder darüber liegt
und Mittel zur Erzeugung einer Relativverschiebung zwischen der Probe und/oder der Detektion und dem Beleuchtungsmuster von einer ersten in mindestens eine zweite Position des Beleuchtungsmusters der Probe vorgesehen sind, die eine Relativverschiebung um einen Betrag kleiner als den Abstand erzeugen sowie in der Detektionseinheit Detektions- und Speichermittel zur Detektion und Abspeicherung der Detektionssignale sowohl in der ersten als auch in der mindestens zweiten Position vorgesehen sind.

10. Mikroskop nach Anspruch 9, wobei Mittel und/oder eine Software zur Verrechnung der abgespeicherten Detektionssignale und Erzeugung eines hochaufgelösten Bildes, vorzugsweise nach dem Verfahren gemäß Anspruch 5, vorgesehen sind.

11. Mikroskop nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Mikroskop ein Laser-Scanning-Mikroskop mit rasternder Beleuchtung ist, vorzugsweise punktscannend oder linienscannend.

12. Mikroskop nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei
das Mikroskop ein Weitfeldmikroskop mit strukturierter Beleuchtung ist, vorzugsweise über
Gitter oder eine projizierte Intensitätsverteilung oder eine Nipkowscheibe.

13. Mikroskop nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei
die Mittel zur Erzeugung der Relativverschiebung
Mittel zur Verschiebung der Probe und/oder
Mittel zur Verschiebung eines Scanfeldes und/oder
Mittel zur Erzeugung einer Verschiebung ausgelesener Detektorelemente und/oder
Mittel zur Verschiebung eines Gitters oder Beleuchtungsmusters sind.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

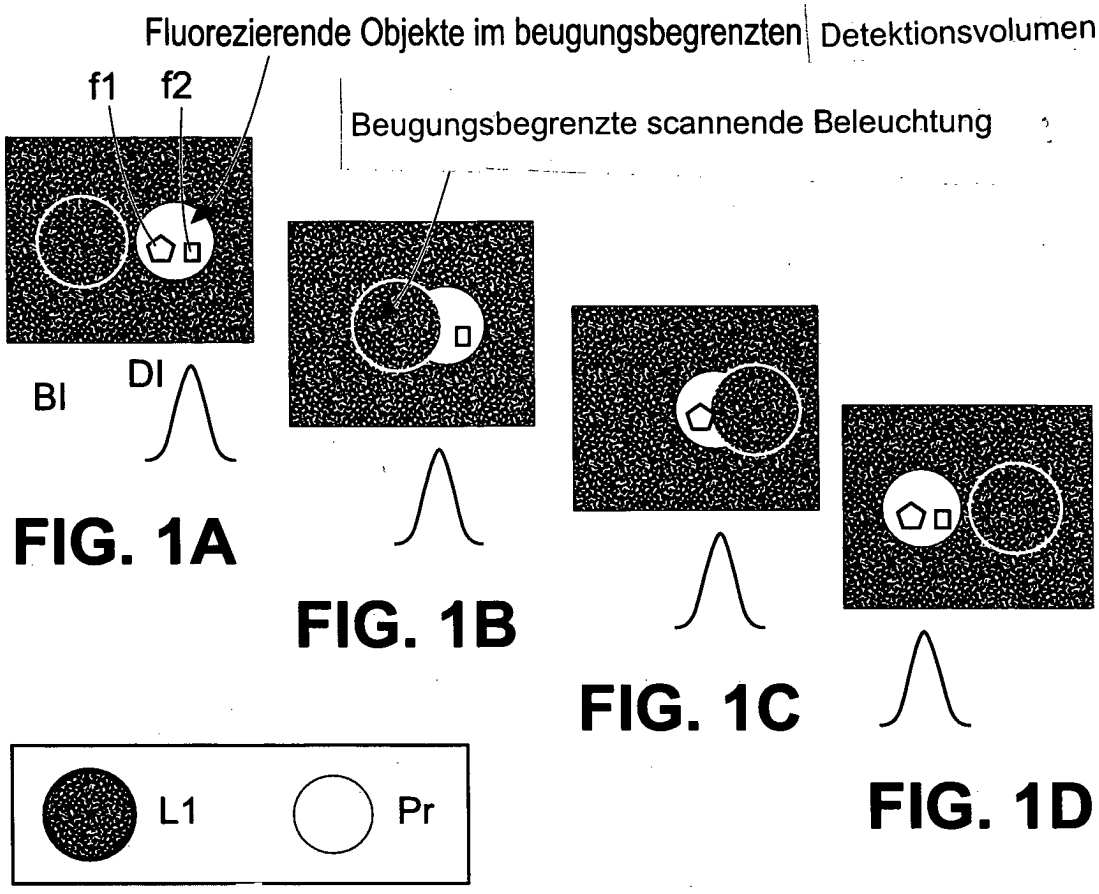


FIG. 1A

FIG. 1B

FIG. 1C

FIG. 1D

FIG. 2

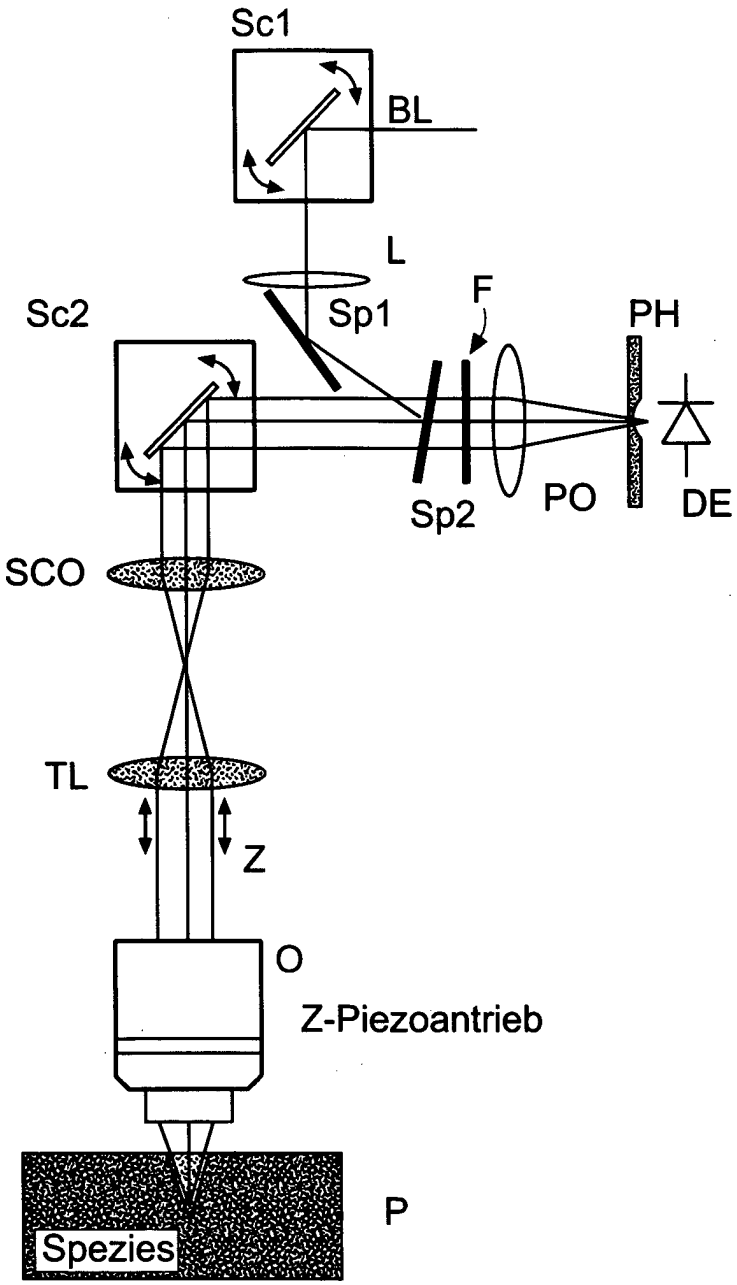

Sc1
BL
L
Sc2
Sp1
F
PH
Sp2
PO
DE
SCO
TL
Z
O
Z-Piezoantrieb
P
Spezies

FIG. 3

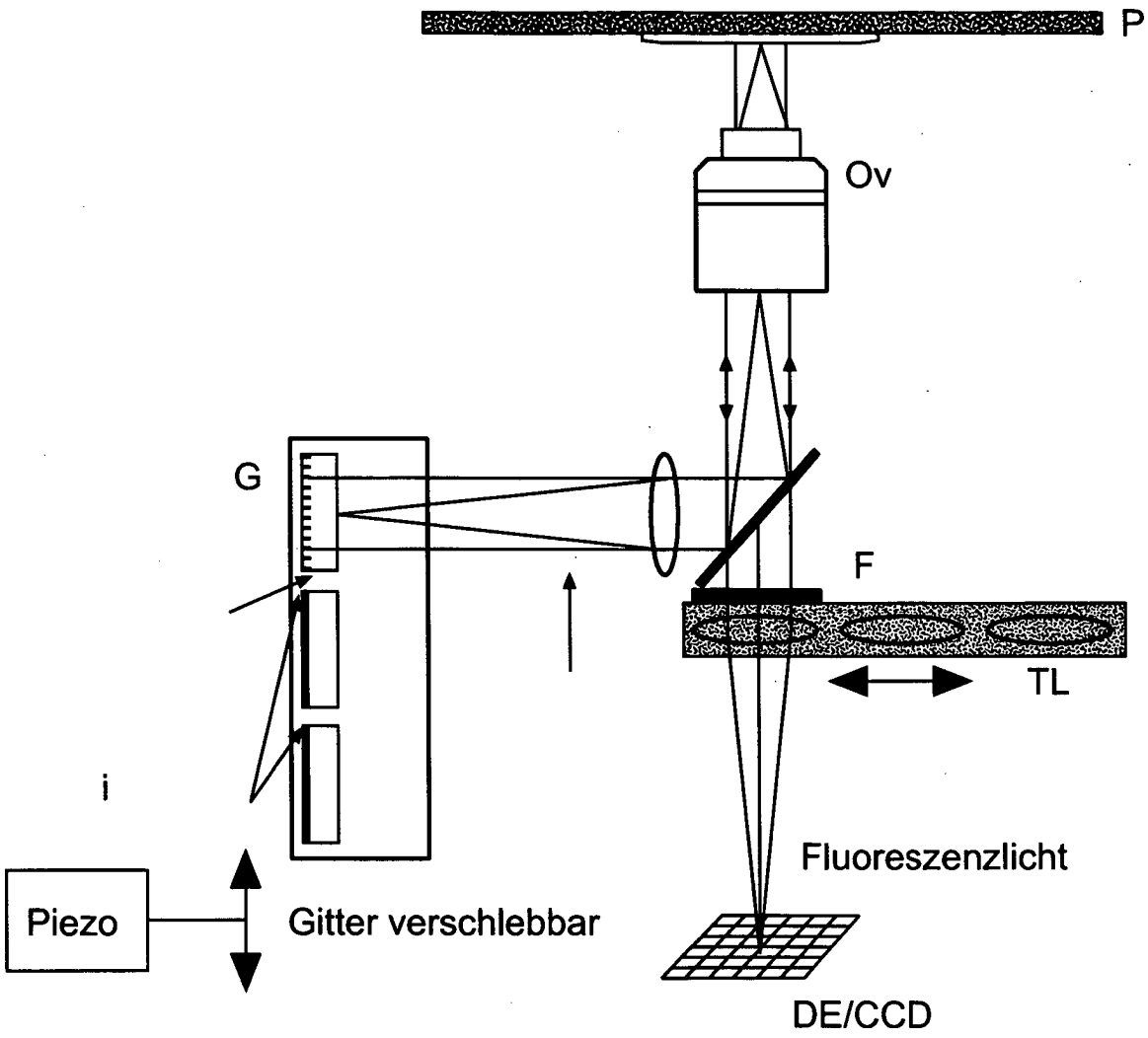

P
Ov
G
F
TL
i
Fluoreszenzlicht
Piezo
Gitter verschlebbar
DE/CCD

FIG. 4

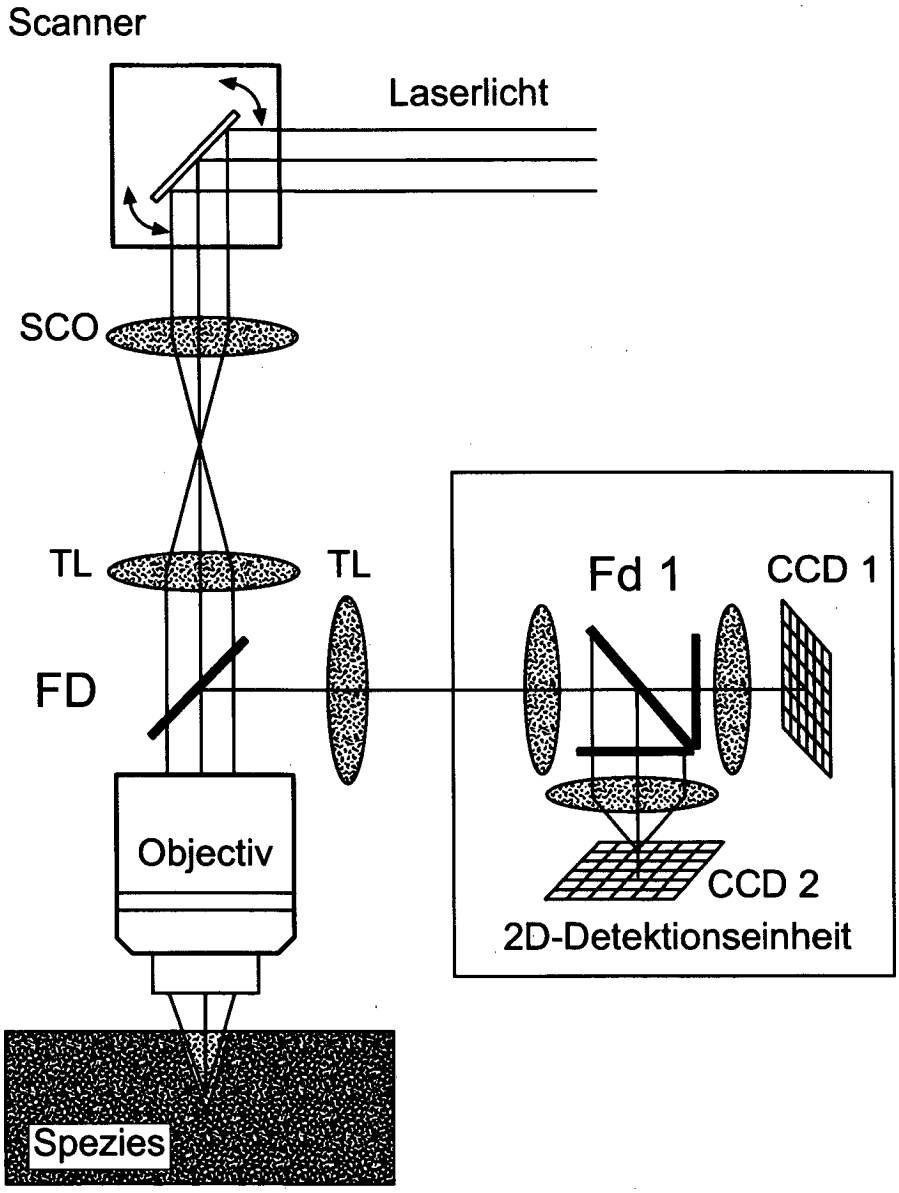
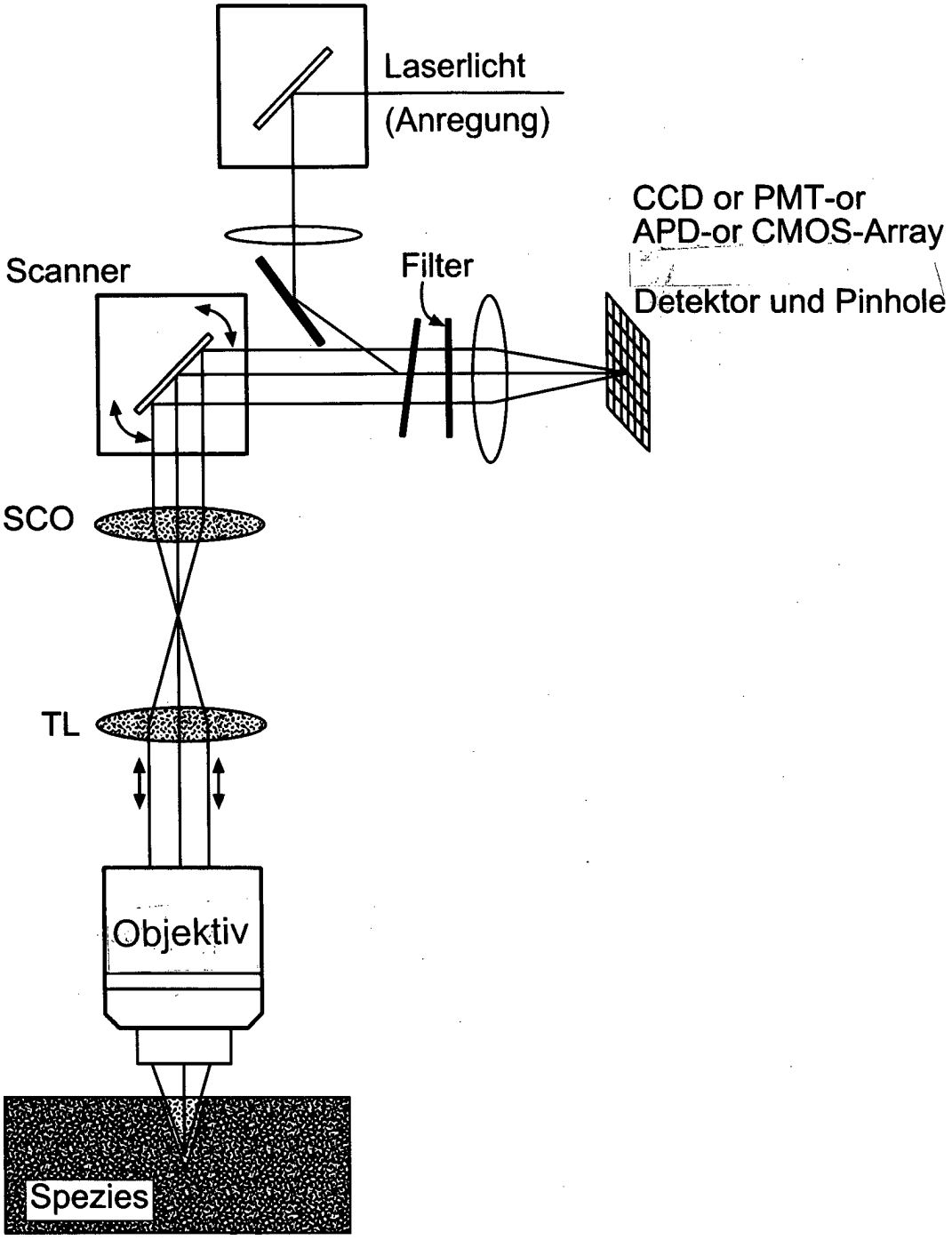

Scanner
Laserlicht
SCO
TL
TL
FD
Objectiv
Spezies
Fd 1
CCD 1
CCD 2
2D-Detektionseinheit

FIG. 5


Laserlicht
(Anregung)
CCD or PMT-or
APD-or CMOS-Array
Detektor und Pinhole
Filter
Scanner
SCO
TL
Objektiv
Spezies