



(10) **DE 10 2011 114 500 B4** 2022.05.05

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2011 114 500.5**

(22) Anmeldetag: **29.09.2011**

(43) Offenlegungstag: **04.04.2013**

(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: **05.05.2022**

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

G02B 21/06 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G02B 27/58 (2006.01)

Innerhalb von neun Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:
FEI Company, Hillsboro, OR, US

(74) Vertreter:
**Schwan Schorer und Partner Patentanwälte mbB,
80796 München, DE**

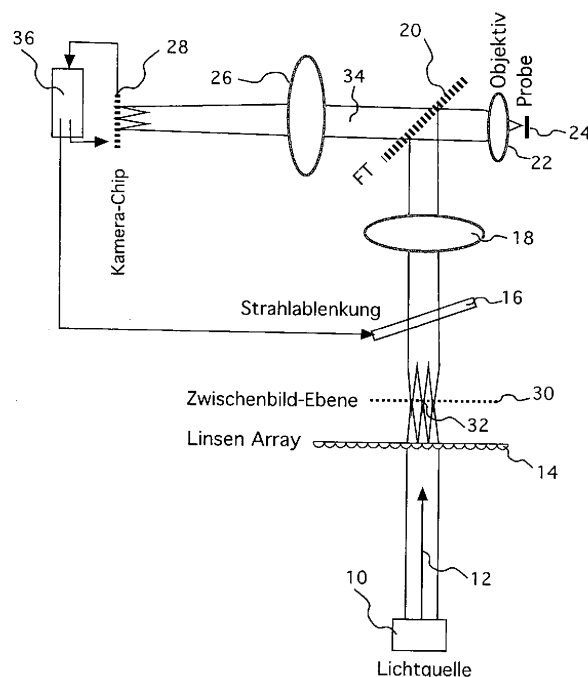
(72) Erfinder:
**Uhl, Rainer, 82166 Gräfelfing, DE; Schropp,
Martin, 81373 München, DE**

(56) Ermittelter Stand der Technik:

DE	103 30 716	A1
DE	10 2006 031 177	A1
DE	10 2007 047 465	A1
WO	2008/ 152 605	A1

(54) Bezeichnung: **Mikroskopvorrichtung**

(57) Hauptanspruch: Mikroskopvorrichtung mit einem Objektiv (22), einer Lichtquelle (10) zum Beleuchten einer Probe (24) über einen Beleuchtungsstrahlengang (12), einer Anordnung (14, 18, 22, 50) zum Erzeugen eines flächigen, in zwei Raumrichtungen strukturierten Beleuchtungsmusters (32) auf der Probe, einem Flächen-Detektor (28) zum Erfassen von über einen Bildstrahlengang (34) von der Probe kommendem Licht, einer Anordnung (16) zum Verschieben des Beleuchtungsmusters auf der Probe in einer Verschieberichtung, sowie einer Steuereinheit (36), die ausgebildet ist, um in unterschiedlichen Positionen des Musters entlang der Verschieberichtung (42) jeweils ein Bild des vom Detektor erfassten Lichts als Phasenbild aufzunehmen und aus diesen Phasenbildern ein Gesamtbild des strukturiert beleuchteten Probenbereichs rechnerisch zu rekonstruieren, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Verschieberichtung schräg zu den Hauptsymmetrieachsen (40, 40', 40'', 140, 140') des Beleuchtungsmusters (32) steht und in Abhängigkeit vom Beleuchtungsmuster so gewählt wird, dass die Zahl der für die Rekonstruktion des Gesamtbilds erforderlichen Phasenbilder dem für die Anzahl der bei der rechnerischen Rekonstruktion verwendeten Fourierordnungen des Beleuchtungsmusters theoretisch minimal erforderlichen Wert entspricht.



Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft eine Mikroskopvorrichtung mit einem Objektiv, einer Lichtquelle zum Beleuchten einer Probe, einer Anordnung zum Erzeugen eines strukturierten Beleuchtungsmusters auf der Probe, einem Detektor für von der Probe kommendes Licht, einer Anordnung zum Verschieben des Beleuchtungsmusters auf der Probe sowie einer Steuereinheit zum Aufnehmen von Bildern der Probe in unterschiedlichen Positionen des Beleuchtungsmusters als Phasenbilder, aus denen ein Gesamtbild des beleuchteten Probenbereichs rechnerisch rekonstruiert wird.

[0002] Kamera-basierte mikroskopische Fluoreszenz-(Weitfeld-)Aufnahmen leiden darunter, dass die gewünschte Information aus der Fokus-Ebene durch Information aus anderen Ebenen des Präparats bis zur Unkenntlichkeit entstellt wird.

[0003] Zur Erzeugung von Schichtaufnahmen, bei denen die Information aus einer ausgewählten Schicht isoliert betrachtet werden kann, werden üblicherweise konfokale Laserscanning Verfahren eingesetzt, bei denen die Probe mit einem oder mehreren Laser-Spot(s) abgerastert wird.

[0004] Aus der WO 92/14118 A1 ist ein Mikroskop bekannt, das unter Verwendung eines Flächensensors Schichtaufnahmen rechnerisch aus Einzelbildern erzeugt, welche mit einer strukturierten Beleuchtung aufgenommen wurden. Die zur Berechnung herangezogenen Einzelbilder unterscheiden sich durch die Position der projizierten Struktur auf dem Präparat (solche Bilder werden im folgenden als „Phasenbilder“ bezeichnet). Bei der in der WO 92/14118 A1 beschriebenen Beleuchtungsstruktur handelt es sich um ein zweidimensionales Schachbrettmuster, das genau um eine halbe Periode bewegt werden muss, um zwei zur Berechnung erforderliche Phasenbilder zu erzeugen, wobei eine genaue Abbildung der Karos des Schachbrett-Musters auf einzelne Pixel erforderlich ist, so dass das Ergebnis extrem kritisch auf kleinste Ungenauigkeiten beim Verschieben des Musters reagiert. Zudem stellt die Abtastung eines periodischen Signals (in diesem Fall die verschobene Mustermodulation) mit nur 2 Punkten eine Verletzung des Nyquist-Shannonschen Abtasttheorems dar, was zu systematischen und periodischen Auswertungsfehlern (Artefakten) führt.

[0005] Eine ähnliche Vorrichtung ist in der DE 103 30 716 A1 beschrieben.

[0006] Eine praktikablere Variante des Ansatzes, Schichtaufnahmen rechnerisch aus Phasenbildern zu erzeugen, die bei unterschiedlichen Positionen eines auf die Probe projizierten Musters erzeugt werden, findet sich in der WO 98/45745 A1 und der WO 02/12945 A2. Anstelle eines zweidimensional strukturierten Beleuchtungsmusters werden dort eindimensionale Strichgitter eingesetzt, deren Projektion auf der Probe mindestens zweimal verschoben werden muss, um aus drei oder mehr Phasenbildern die gewünschte Schichtaufnahme errechnen zu können.

[0007] Bei den mit der genannten Vorgehensweise, die als „strukturierte Beleuchtung“ bezeichnet wird, erzeugten Schichtaufnahmen wird Außer-Fokus-Information besser unterdrückt als mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop. Außerdem liefert das Verfahren eine Auflösung-Steigerung in der zur Strichorientierung senkrechten Richtung. Dies macht sich das in dem Artikel „Doubling the lateral resolution of widefield fluorescence microscopy by structured illumination“, M.G.L. Gustafsson, D.A. Agard, und J.W. Sedat, Proc. of SPIE 3919: 141-150, 2000, beschriebene Verfahren zu Nutze, bei welchem 3 mal 3 Phasenbilder aufgezeichnet werden, bei denen je drei durch Verschieben erzeugte Gitterpositionen mit jeweils drei Drehpositionen in den Gitter-Vorzugsrichtungen (0°, 120° und 240°) kombiniert werden. Was die Rotation angeht, so genügen drei Orientierungen, die Translation dagegen kann statt 3 auch 5 oder mehr Positionen umfassen. Somit werden aus mindestens 9 durch lineare Translation und Drehung erzeugten Phasenbilder Schichtaufnahmen errechnet, die hinsichtlich der um maximal einen Faktor 2 gesteigerten Auflösung keine Vorzugsrichtung mehr aufweisen.

[0008] In der EP 1 936 422 A1 ist ein Mikroskop mit strukturierter Beleuchtung beschrieben, bei welchem das Beleuchtungsmuster mittels eines Strichgitters erzeugt wird, welches zur Aufnahme der Phasenbilder gedreht und in einer Richtung senkrecht zu den Gitterlinien verschoben wird. Das Gitter dient auch zur optischen Demodulation des von der Probe stammenden Lichts. Es wird auch erwähnt, dass statt eines eindimensionalen Strichgitters auch ein zweidimensionales Gitter verwendet werden kann, das dann in zwei Richtungen senkrecht zu den Gitterlinien verschoben werden muss, um die Phasenbilder aufzunehmen.

[0009] Die DE 10 2007 047 465 A1 betrifft ein konfokales Mikroskop, bei welchem ein Phasenbild durch Abtastung der Probe mit einem mittels eines optischen Modulators erzeugten und in einer Richtung periodi-

schen Streifenmusters gewonnen wird, wobei aufeinander folgend mehrere solcher Bilder aufgenommen werden, bei welchen jeweils die Position des Streifenmusters um eine Detektorzeile verschoben ist. Die einzelnen Bilder werden so dann aufsummiert, dass lediglich die Zeilen des Detektors ausgewählt werden, die den entsprechenden beleuchteten Zeilen im Fokus des Objekts entsprechen, wobei die dazwischen liegenden benachbarten Bildbereiche maskiert und nicht ausgewertet, d.h. weggeworfen, werden.

[0010] In der DE 10 2007 047 466 A1 ist ein Mikroskop mit strukturierter Beleuchtung beschrieben, bei welchem ein mittels eines Strichgitters oder eines zweidimensional strukturierten Gitters ein Beleuchtungsmuster erzeugt wird, das zur Aufnahme von Phasenbildern auf der Probe verschoben wird. Mittels des Gitters wird eine Beugungsverteilung in der Pupille des Objektivs erzeugt, die dann manipuliert wird, beispielsweise durch Selektion oder Rotation der Beugungsordnungen, wobei eine strukturierte Phasenplatte gedreht wird.

[0011] Aus der DE 10 2007 047 468 A1 ist ein Mikroskop mit strukturierter Beleuchtung bekannt, bei welchem die Probe mittels einer linienförmigen, in Längsrichtung strukturierten Beleuchtung abgetastet wird, wobei das Abtasten der Probe mehrmals mit unterschiedlichen Phasenpositionen, d.h. nach Verschiebung der Linie in Richtung der Strukturierung, erfolgt, um verschiedene Phasenbilder zu erzeugen, die miteinander verrechnet werden. Das Verschieben der Beleuchtungslinie zwecks Probenabtastung und Phasenverschiebung erfolgt mittels eines X-Y-Scanners, der zwischen der mittels einer Zylinderlinse beleuchteten Beleuchtungsmaske und der Tubuslinse angeordnet ist. Das von der Probe kommende Licht durchläuft ebenfalls die Tubuslinse, bevor es auf einen CCD-Detektor fällt. Zwischen Lichtquelle und Beleuchtungsmaske ist ein schaltbarer Attenuator vorgesehen, um die Lichtintensität während des Abtastens der Probe in der Abtastrichtung zu modulieren. Auf dem CCD-Detektor erfolgt eine „nicht-descanned“-Detektion. Die Abtastung der Probe wird mehrfach wiederholt, wobei das Zeilenmuster auf dem Detektor beispielsweise um eine Zeile verschoben wird, was durch eine entsprechende Verzögerung beim Anschalten des Modulators erzielt wird; Um ein einziges Phasenbild zu erhalten müssen Einzelbilder aufsummiert werden, welche durch Selektion bestimmter Zeilen und das „Wegwerfen“ dazu benachbarter Bildbereiche erzeugt werden. Hierdurch wird eine nachträglich einstellbare Konfokalität erzielt.

[0012] Aus der DE 101 18 463 A1 und DE 101 55 002 A1 sind Mikroskopvorrichtungen mit strukturierter Beleuchtung bekannt, bei denen zur Gewinnung eines Phasenbildes ein in Längsrichtung sinusförmig modulierter Linienfokus auf die Probe projiziert wird, und wobei durch Verschiebung des Linienfokus in Längsrichtung unterschiedliche Phasenbilder gewonnen werden, die anschließend miteinander verrechnet werden. Um die Tiefenauflösung zu steigern, ist eine Schlitzeblende vor dem Detektor vorgesehen. Es wird erwähnt, dass auf die Schlitzeblende verzichtet werden kann, wenn als Detektor eine CCD Kamera verwendet wird, die eine Zwischenbildebene betrachtet.

[0013] In der DE 10 2007 009 550 B4 ist eine Mikroskopvorrichtung zum Beobachten einer bewegten, mittels einer Maske strukturiert beleuchteten Probe beschrieben, wobei ein CCD-Chip als Detektor verwendet wird, der als adaptiv variable Blende dient.

[0014] Dass das structured illumination microscope (SIM) das klassische confocal laserscanning microscope (CLSM) trotz der genannten Vorzüge noch nicht in weiten Bereichen ersetzen konnte liegt an zwei gravierenden Nachteilen des Verfahrens:

Die für die Erzeugung einer Schichtaufnahme erforderliche Aufnahme mehrerer Bilder ist zwar weniger zeitaufwendig als die Bildaufnahme mittels Punktscanner, jedoch deutlich zeitaufwendiger als bei einem Punktmuster-Scanner (spinning disk). Der Geschwindigkeitsnachteil gegenüber letzterem ist um so ausgeprägter, je mehr Phasenbilder für die Berechnung eines Schichtbilds erforderlich sind und je mehr Operationen zwischen der Aufnahme einzelner Phasenbilder durchgeführt werden müssen.

[0015] Je dicker die Probe und je stärker gefärbt diese ist, um so geringer ist die durch das Muster hervorgerufene Helligkeitsmodulation in den Einzelbildern. Damit wird das in der Modulation versteckte Signal, welches die gewünschte Schicht-Information beinhaltet, durch das Hintergrundrauschen maskiert und verschwindet zunehmend im Rauschen. Entsprechend leidet auch das Signal-zu-Rauschverhältnis der Schichtaufnahme.

[0016] Ziel der vorliegenden Erfindung ist es daher, die genannten Nachteile zu mildern und eine einfache und robuste Vorrichtung bereitzustellen, welche zum Standard-Instrument für die dreidimensionale Mikroskopie werden könnte. Dies wird u.a. erreicht durch eine Minimierung der Anzahl der erforderlichen Phasenbilder, durch eine Reduzierung der Anzahl von Operationen zwischen Phasenbildern (statt Translation und Drehung nur noch Translation), sowie durch eine Reihe von Maßnahmen, die geeignet sind, eine Steigerung der

Modulationstiefe einzelner Phasenbilder zu erzielen, was zu Schichtaufnahmen mit verbesserten Signal-zu-Rauschverhältnis führt.

[0017] Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch eine Mikroskopvorrichtung gemäß Anspruch 1.

[0018] Bei der erfindungsgemäßen Lösung gemäß Anspruch 1 ist vorteilhaft, dass durch eine entsprechend gewählte 2-dimensionale Beleuchtungsstruktur und eine dafür zweckmäßig gewählte Verschieberichtung des flächigen Beleuchtungsmusters relativ zur Probe die Anzahl der erforderlichen Phasenbilder minimiert werden kann. Dies gilt insbesondere für die Anzahl der erforderlichen Operationen zwischen den einzelnen Phasenbildern: statt der im Stand der Technik beschriebenen Translation und Drehung ist nur noch eine Translation erforderlich.

[0019] Bevorzugte Ausgestaltungen der Erfindung sind in den abhängigen Ansprüchen angegeben.

[0020] Im Folgenden wird die Erfindung anhand der beigefügten Zeichnungen beispielhaft näher erläutert. Dabei zeigen:

Fig. 1 ein schematisches Beispiel einer erfindungsgemäßen Mikroskopvorrichtung;

Fig. 2 ein erstes Beispiel eines Beleuchtungsmusters zur Verwendung mit der vorliegenden Erfindung;

Fig. 3 eine Ansicht wie **Fig. 2**, wobei jedoch ein anderes Beispiel gezeigt ist;

Fig. 4 eine Ansicht wie **Fig. 1**, wobei ein alternatives Beispiel einer erfindungsgemäßen Mikroskopvorrichtung dargestellt ist, das besonders für eine sequentielle Beleuchtung der Probe geeignet ist;

Fig. 5 eine Veranschaulichung des sequentiellen Auf- und Abbaus des Beleuchtungsmusters auf dem Mikrolinsen-Array, der Probe bzw. dem Kamera-Chip;

Fig. 6A und **Fig. 6B** Ansichten wie **Fig. 5**, wobei jedoch zwei verschiedene abgewandelte Ausführungsformen mit Zylinderlinsen-Array gezeigt sind.

Fig. 7 einen beispielhaften Verlauf des Signals auf einem Detektorpixel bei kontinuierlicher Verschiebung eines hexagonalen Beleuchtungsmusters über die Probe (durchgezogene Linie) bzw. den zu jedem Phasenbild aufgenommenen Messpunkt (Punkte I_n);

Fig. 8 die einzelnen harmonischen Anteile aus der Darstellung von **Fig. 7** für die erste (durchgezogen), die zweite (gestrichelt) und die dritte (gepunktet) Ordnung;

Fig. 9 ein Schachbrettmuster gemäß Gl. (23);

Fig. 10 ein hexagonales Muster gemäß Gl. (41);

Fig. 11 Kontrastverläufe für ein hexagonales Muster (gestrichelt) und für ein Strichgitter (durchgezogen) als Funktion der normalisierten Strukturfrequenz;

Fig. 12 die orthogonale Projektion des Verschiebevektors im Frequenzraum in der ersten Ordnung für ein schachbrettartiges Beleuchtungsmuster;

Fig. 13 die orthogonale Projektion des Verschiebevektors im Frequenzraum in der ersten Ordnung für ein hexagonales Beleuchtungsmuster;

Fig. 14 zeigt eine erste Kurve (durchgezogen), welche den Verlauf einer theoretischen Intensitäts-Punktspreizfunktion vom Maximum in axialer Richtung dar, welche in etwa dem inkohärenten Kontrastverlauf eines hexagonalen Musters (mit einer Periode von etwa λ/NA) in Richtung des Defokus entspricht, sowie eine zweite Kurve (gestrichelt), welche diesen Kontrast in z-Richtung unter der Annahme kohärenter Beleuchtung repräsentiert;

Fig. 15 zeigt einen graduellen Übergang zwischen den beiden Kurven von **Fig. 14**, wobei der theoretische Kontrastverlauf in z-Richtung (bei Abbildung einer periodischen Struktur) bei verschiedenen räumlichen Kohärenzlängen bzw. verschiedener relativer Pupillenausleuchtung zwischen 24% und 100% (Zwischenwerte; 29,4%, 38,5%, 45%, 56%, 70%) gezeigt ist

[0021] In **Fig. 1** ist ein erstes schematisches Beispiel einer erfindungsgemäßen Mikroskopvorrichtung mit strukturierter Beleuchtung gezeigt, wobei eine Lichtquelle 10 zum Erzeugen eines Beleuchtungslichtstrahls 12, ein Mikrolinsenarray 14, ein Strahlableitungselement 16, eine erste Tubuslinse 18 für das Beleuchtungslicht, ein Farbteiler 20, ein Mikroskopobjektiv 22, eine zweite Tubuslinse 26 für von einer Probe 24 ausgehen-

des Licht sowie ein Kamera Detektor 28 (beispielsweise ein CCD-Kamera-Chip) dargestellt sind. Das Linsenarray 14 ist zwischen der Lichtquelle 10 und einer Zwischenbildebene 30 angeordnet und dient dazu, den Anregungslichtstrahl 12 so in die Zwischenbildebene 30 zu fokussieren, dass dort ein flächiges Punktmuster 31 erzeugt wird, das in beiden Raumrichtungen strukturiert ist. Mittels der ersten Tubuslinse 18 und dem Objektiv 22 wird das Punktmuster 31 als strukturiertes Beleuchtungsmuster 32 auf die Probe 24 abgebildet, wobei der Farbteiler 20 gemäß dem in **Fig. 1** gezeigten Beispiel für das Beleuchtungslicht reflektierend ausgebildet ist. Das von der Probe stammende Licht 34, bei dem es sich beispielsweise um Fluoreszenzlicht handeln kann (wobei das Beleuchtungslicht dann als Anregungslicht wirkt), wird vom Farbteiler 20 durchgelassen und mittels dem Objektiv 22 und der zweiten Tubuslinse 26 auf dem Detektor 28 abgebildet.

[0022] Mittels dem Strahlablenkungselement 16 kann das Beleuchtungsmuster 32 relativ zur Probe 24 verschoben werden, um unterschiedliche Phasenbilder, d.h. Bilder mit unterschiedlicher Phasenlage des räumlich strukturierten Beleuchtungsmusters bezüglich der Probe 24, aufzunehmen. Eine Steuereinheit 36 synchronisiert das für die Erzeugung der Phasenverschiebung erforderliche Strahlablenkungselement 16 mit der Bildaufnahme durch die Kamera 28 und bewirkt so die Aufnahme von Phasenbildern, die miteinander verrechnet werden können, um die gewünschte Schichtaufnahme der Probe zu erhalten.

[0023] Die in **Fig. 1** gezeigte Anordnung mit dem Mikrolinsenarray 14 ist insbesondere für Anregung mit Laserlicht, d.h. kohärentem Licht geeignet, wobei alternativ zur Erzeugung des Musters durch ein Mikrolinsen-Array vor der Zwischenbildebene 30 ein Lochmasken-Array (nicht gezeigt) in besagter Zwischenbildebene 30 platziert werden kann. Dies reduziert jedoch die Lichtausbeute entsprechend. Eine dritte Möglichkeit, die ausschließlich mit kohärentem Licht funktioniert, wird weiter unten beschrieben werden.

[0024] Bei der in **Fig. 1** gezeigten Ausführungsform ist das Strahlablenkungselement 16 in einem nicht-unendlichen Raum zwischen der Zwischenbildebene 30 und der ersten Tubuslinse 18 angeordnet. Bei dem Strahlablenkelement 16 kann es sich beispielsweise um einen motorisierten Umlenkspiegel oder ein drehbar gelagertes Glasfenster handeln. Ersterer beeinflusst nicht nur die Position des Musters auf der Probe, sondern auch den Pupillenstrahl, letzteres dagegen lässt den Pupillenstrahl unverändert, weil der bewirkte Strahlversatz des Beleuchtungsstrahls 12 dessen Winkel nicht ändert. Da zur Erzeugung der unterschiedlichen Phasenbilder jedoch nur eine relativ geringe Verschiebung des Beleuchtungsmusters 32 auf der Probe 24 erforderlich ist (in der Größenordnung der Beleuchtungslichtwellenlänge), kann durch eine geeignete Platzierung eines als Umlenkspiegel ausgebildeten Strahlablenkelements 16 der Strahlversatz in der Objektivpupille vernachlässigbar klein gehalten werden. Um gleiches bei einer Platzierung des Strahlablenkungselements 16 zwischen Tubuslinse 18 und Objektiv 22 zu erreichen, müsste das Strahlablenkelement 16 nahe der Objektivpupille platziert werden.

[0025] Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird mit einem räumlich modulierten Anregungslichtmuster angeregt, und die verbleibende räumliche Modulation des von der Probe emittierten Lichts wird ausgewertet. Um eine möglichst große Modulation zu erzielen, sollte die Anzahl der kritischen optischen Elemente im Strahlengang, welche die Modulationstiefe reduzieren könnten, auf das Minimum reduziert werden. Dies gelingt am besten, wenn das Beleuchtungsmuster erst in der Objektebene oder - wo das nicht möglich ist - in einer zur Bildebene konjugierten Ebene entsteht, so dass sich Abbildungsfehler maximal kompensieren lassen.

[0026] Während bei dem in **Fig. 1** gezeigten Beispiel die Projektion eines in der Zwischenbildebene 30 erzeugten flächigen Musters auf die Probe 24 verwendet wird, kann alternativ die gewünschte Strukturierung des Beleuchtungslichts auch erst in der Probe 24 selbst erzeugt werden, und zwar mittels interferierender Fokuspunkte von kohärentem Beleuchtungslicht aus der Objektivpupille. Beispielsweise erzeugt die Interferenz von aus sieben hexagonal angeordneten Punkten in der Objektivpupille stammendem, kohärentem Licht in der Probenebene 24 (d.h. der anderen Brennebene des Objektivs 22) ein flächendeckendes hexagonales Beleuchtungsmuster 32 (s. **Fig. 3**). Zur Erzeugung dieser sieben Punkte in der Objektivpupille kann - bei telezentrischem optischem Aufbau - eine geeignete Phasenplatte in die Zwischenbildebene 30 eingebracht werden.

[0027] Die für die Aufnahme von verschiedenen Phasenbildern erforderliche Verschiebung des Beleuchtungsmusters auf der Probe 24 kann dann, außer durch ein weiter oben beschriebenes Strahlablenkelement 16, auch durch eine geeignete relative Phasenverschiebung der Amplituden der Fokuspunkte und der Objektivpupille erfolgen. Die Fokuspunkte können den Beugungsordnungen des Beleuchtungsmusters zugeordnet werden, wobei die relative Phasenverschiebung der Fokuspunkte gerade der relativen Phasenverschiebung der Fourierordnungen des Beleuchtungsmusters auf der Probe 24 entspricht. Die Phasenverschiebung kann

beispielsweise durch einen galvanometrischen Scanner in oder nahe der Objektivpupille, einen akusto-optischen Modulator oder auch durch eine direkte Beeinflussung des optischen Wegs im Unendlichstrahlengang (wenn dieser beispielsweise als Interferometer mit einer Kombination aus einem piezoelektrischen Aktuator und einem Spiegel in einem Arm des Interferometers ausgebildet ist), erzeugt werden.

[0028] Die Erzeugung des gewünschten Beleuchtungsmusters durch Interferenz in der Probe erlaubt auch eine hochauflösende Variante der Totalen Internen Reflexions Fluoreszenz Mikroskopie (TIRFM): Da die Ortsfrequenz des interferometrisch erzeugten Beleuchtungsmusters vom relativen Abstand der Fokuspunkte zueinander abhängt, kann man durch Wahl dieser Frequenz nahe der Auflösungsgrenze, d.h. durch Positionierung der Fokuspunkte am Rand der Pupille, mit geeigneten Objekten zu einer totalen Reflexion der einzelnen interferierenden Strahlkomponenten am Übergang vom Deckglas zur Probe gelangen. Dies erlaubt eine TIRF-Anregung mit gesteigerter Flächenauflösung. Bei der Erzeugung des Interferenzmusters in der Probe ist dabei jedoch zu berücksichtigen, dass TIRF nur dann gewährleistet ist, wenn nur 6 Punkte aus der Objektivpupille in der Probe zur Interferenz gebracht werden. Bei der weiter oben beschriebenen Vorgehensweise, ein hexagonales Muster in der Objektivpupille mit Hilfe einer Phasenplatte zu erzeugen, resultieren dort durch Beugung sechs hexagonal angeordnete Punkte mit einem Punkt im Zentrum, der von der nullten Beugungsordnung der Interferenz stammt. Würde diese nullte Beugungsordnung nicht unterdrückt, resultierte ein beträchtlicher Hintergrund der eine TIRF-Messung zunichte macht! Aus diesem Grund ist es vorteilhaft, im TIRF-Fall die zur Interferenz in der Probe 24 benötigten 6 Fokuspunkte in der Objektivpupille bereits „weiter vorn“ im Beleuchtungsstrahlengang 12 zu erzeugen. Das ermöglicht dann auch eine variable Anpassung des TIRF-Winkels.

[0029] Bei der in **Fig. 1** gezeigten Ausführungsform werden für jedes Phasenbild alle Bereiche der zu beleuchtenden Probenfläche gleichzeitig mit dem Beleuchtungsmuster beleuchtet, d.h. das Mikrolinsenarray 14 (oder, in den alternativen Ausführungsformen die Punkt- oder Phasenmaske) wird durch den Beleuchtungslichtstrahl 12 großflächig ausgeleuchtet. Typischerweise wird die auszuleuchtende Fläche rechteckig sein, wobei die Fläche möglichst gleichmäßig ausgeleuchtet werden soll.

[0030] Bei dem Beleuchtungsmuster handelt es sich vorzugsweise um ein hexagonales Punktmuster, da ein hexagonales Muster einerseits eine räumlich homogenere Auflösungssteigerung in der Bildebene nach dem Verrechnen der Phasenbilder liefert als beispielsweise ein schachbrettartiges Punktmuster (mit einem hexagonalen Muster wird eine genauso große Auflösungssteigerung erzielt, wie mit dem dreimal gedrehten Strichgittermuster, das in dem eingangs erwähnten Artikel von Gustafsson et al. beschrieben ist) und andererseits auch einen um einen Faktor 1,5 geringeren Füllfaktor aufweist als ein Linien- oder Schachbrettmuster. Aufgrund des Füllfaktors wird der unerwünschte Hintergrund und somit der Rauschbeitrag aus unerwünschten Fokusebenen reduziert. Grundsätzlich kann durch die Beleuchtung einer Probe mit einem räumlich strukturierten Beleuchtungsmuster und nachfolgende Auswertung mehrerer Phasenbilder nicht nur eine Schichtaufnahme unter Entfernung unerwünschter Außer-Fokus Information generiert, sondern auch eine horizontale Auflösungssteigerung in der betreffenden Bildebene erzielt werden, wenn mehrere Phasenbilder aufgenommen werden, bei denen das Muster bezüglich der Probe jeweils verschoben wird, um die räumliche Phase des Beleuchtungsmusters zu verändern, und diese Phasenbilder dann in geeigneter Weise miteinander verrechnet werden. Dabei kann maximal pro Raumrichtung eine Auflösungssteigerung um den Faktor 2 erzielt werden, d.h. die beugungsbedingte Auflösungsgrenze des Mikroskops kann dadurch maximal um den Faktor 2 übertroffen werden (eine Beschreibung dieses Effekts ist beispielsweise in dem eingangs zitierten Artikel von Gustafsson et al. zu finden). Für die praktische Anwendung dieses Prinzips ist es wünschenswert, die für die Gewinnung der Phasenbilder erforderliche Bewegung zwischen Probe und Beleuchtungsmuster hinsichtlich Zahl der erforderlichen Phasenbilder und Einfachheit der erforderlichen Bewegungen zu optimieren.

[0031] Gemäß einem Aspekt der vorliegenden Erfindung wurde erkannt, dass es bei geschickter Wahl des Winkels der Verschieberichtung des Musters relativ zu den Hauptsymmetrieachsen des Musters möglich ist, Schichtaufnahmen mit maximaler Auflösungssteigerung bereits durch alleinige Verschiebung des Musters entlang dieser Verschieberichtung mit einigen wenigen entlang dieser Verschieberichtung aufgenommenen Phasenbildern zu erzielen. Dabei wird die Verschieberichtung in Abhängigkeit vom Beleuchtungsmuster so gewählt, dass die Zahl der für die Bildrekonstruktion erforderlichen Phasenbilder dem für die Anzahl der berücksichtigten Frequenzordnungen des Beleuchtungsmusters (d.h. der Anzahl der bei der Bildentstehung rekombinierten Fourierordnungen des Beleuchtungsmusters) theoretisch minimal erforderlichen Wert entspricht. Im Frequenzraum entspricht diese dem Kriterium, dass bei der gewählten Verschieberichtung jede der berücksichtigten Frequenzordnungen von einem zum nächsten Phasenbild eine möglichst eindeutige Phasenverschiebung erfährt in dem Sinn, dass sich die Phasenverschiebung jeder Frequenzordnung mög-

lichst stark von der Phasenverschiebung der anderen Frequenzordnungen unterscheidet, d.h. jede Frequenzordnung wird sozusagen mit einer eigenen Geschwindigkeit verschoben.

[0032] Zunächst werden die wesentlichen Ergebnisse der in den Abschnitten 1. bis 3. noch folgenden detaillierten mathematischen Ableitung zusammengefasst.

[0033] In **Fig. 3** ist als Beispiel ein hexagonales Punktmuster als Beleuchtungsmuster gezeigt, bei welchem sich der Winkel α der Verschieberichtung 42 bezüglich einer der drei gleichwertigen Hauptsymmetrierichtungen (in **Fig. 3** mit 40 bezeichnet) zu $\pm 19,11^\circ$ bzw. zu $n \cdot 60^\circ \pm 19,11^\circ$ ($n = 1, 2, 3, \dots$) ergibt, wenn nur die ersten Frequenzordnungen des Beleuchtungsmusters berücksichtigt werden (aufgrund der hexagonalen Symmetrie mit den drei gleichwertigen Hauptsymmetrierichtungen gibt es hier drei erste Ordnungen; bei einem schachbrettartigen Muster gibt es entsprechend nur zwei erste Ordnungen); in **Fig. 3** ist der Winkel der mit 44 bezeichneten Richtung, die senkrecht zur Verschieberichtung 42 steht, mit der Hauptsymmetrieachse 40' gezeigt, der entsprechend $10,89^\circ$ beträgt; die dritte Hauptsymmetrierichtung ist in **Fig. 3** mit 40'' bezeichnet. Wie im Abschnitt 2.3. noch ausgeführt wird, gibt es für die ersten Ordnungen noch eine zweite Lösung, nämlich $10,9^\circ$; aus praktischen Gründen (kleinere erforderliche absolute Verschiebung und bessere Fehlertoleranz) wird jedoch die erste Lösung bevorzugt. Vorzugsweise sollte die Verschieberichtung 42 in der Praxis so gewählt werden, dass dieser Winkel α im Bereich zwischen $18,6^\circ$ und $19,6^\circ$ liegt.

[0034] In **Fig. 2** ist ein Schachbrettmuster als Beleuchtungsmuster gezeigt, wobei hier der theoretisch optimale Winkel α zwischen der Verschieberichtung 42 und der Hauptsymmetrieachse $140 \cdot 71,565^\circ$ beträgt, wenn nur die ersten Frequenzordnungen des Beleuchtungsmusters berücksichtigt werden (die andere Hauptsymmetrieachse ist in **Fig. 2** mit 140' bezeichnet). Grundsätzlich kann der Winkel hier $n \cdot 90^\circ \pm 71,565^\circ$ betragen (gemäß Abschnitt 2.2. gibt es auch hier noch zweite theoretische Lösung, die jedoch in der Praxis aus den bereits für das Hexagon genannten Gründen weniger günstig ist). Im allgemeinen wird jedoch ein hexagonales Muster aufgrund der höheren Symmetrie und des geringeren Füllfaktors bevorzugt.

[0035] Bei Berücksichtigung lediglich der ersten Frequenzordnungen des Beleuchtungsmusters müssen im Falle eines hexagonalen Musters mindestens sieben unterschiedliche Phasenbilder entlang der Verschieberichtung 42 aufgenommen werden, während im Fall des Schachbrettmusters bereits fünf unterschiedliche Phasenbilder genügen.

[0036] Die Ergebnisse für die Berücksichtigung höherer Ordnungen bei einem hexagonalen Beleuchtungsmuster sind in Abschnitt 2.5. und insbesondere in Tabelle 1 wiedergegeben. Demnach liegt beispielsweise der optimale Verschiebewinkel bei Berücksichtigung der ersten und zweiten Ordnungen des Musters bei $13,90^\circ$ (die zweite Lösung $5,21^\circ$ ist weniger vorteilhaft), wobei 13 verschiedene Phasenbilder zur vollständigen Bildrekonstruktion erforderlich sind. Bei Berücksichtigung der ersten, zweiten und dritten Ordnungen des Musters liegt der optimale Verschiebewinkel bei $6,59^\circ$, wobei dann 19 verschiedene Phasenbilder zur vollständigen Bildrekonstruktion erforderlich sind. Aus Tabelle 1 ist dabei auch ersichtlich, dass der gewählte Verschiebewinkel für ein hexagonales Beleuchtungsmuster in der Praxis im Bereich von 1° bis 20° , vorzugsweise 4 bis 20° Grad (da die Θ_1 -Lösungen jeweils besser geeignet sind), gewählt werden sollte, wobei der genaue Wert von der Zahl im jeweiligen Anwendungsfall zu berücksichtigenden Fourierordnungen des Beleuchtungsmusters abhängt. In den meisten Fällen wird die Berücksichtigung der ersten Ordnungen oder der ersten und zweiten Ordnungen ausreichend sein, so dass der gewählte Verschiebewinkel in der Regel zwischen 13° und 20° liegen wird.

[0037] Bei der hexagonalen Beleuchtung ist der Füllfaktor geringer als bei einer schachbrettartigen Beleuchtung, und jedes beleuchtete Feld ist in allen Richtungen von unbeleuchteten Regionen umgeben, wodurch die Modulation der einzelnen Phasenbilder verstärkt und der bei der Verrechnung der Phasenbilder zu beseitigende Rauschbeitrag aus unerwünschten Fokusebenen reduziert ist.

[0038] Die jeweiligen Phasen für die unterschiedlichen Phasenbilder verteilen sich vorzugsweise gleichmäßig über den Bereich der möglichen Phasenwinkel. Die für die einzelnen Phasenbilder erforderliche Verschiebung des Musters liegt in der Größenordnung der Wellenlänge des Anregungslichts (typischerweise wird die räumliche Strukturierung des Beleuchtungsmusters in der Nähe der Beugungsbegrenzung und somit in der Größenordnung der Wellenlänge des Anregungslichts liegen. Da die erforderliche Verschiebung des Beleuchtungsmusters somit sehr klein ist, ist eine Anordnung des Strahlablenklements 16 im Nichttunendlichtraum, wie in **Fig. 1** gezeigt, nicht kritisch.

[0039] Eine weitere Verringerung des Rauschbeitrags aus anderen als der erwünschten Fokusebene kann gemäß einem Aspekt der Erfindung dadurch erzielt werden, dass das Beleuchtungsmuster nicht an allen Stellen der Probe gleichzeitig appliziert und registriert wird, sondern so lange sequentiell auf der Probe auf- und wieder abgebaut wird, bis das gesamte Gesichtsfeld erfasst wurde. Für jedes Phasenfeld wird also das Beleuchtungsmuster in Teilbereichen der zu beleuchtenden Probenfläche auf- und wieder abgebaut, wobei die Teilbereiche insgesamt die zu beleuchtende Probenfläche abdecken. Jedes Phasenbild entsteht demnach nicht durch simultane Beleuchtung der gesamten Probenfläche, sondern sequentiell durch partielle Beleuchtung mit dem Beleuchtungsmuster. Dabei wird der Detektor 28 so angesteuert, dass jeweils im Wesentlichen nur der Detektorbereich 137 aktiv ist, auf welchen der gerade beleuchtete Teilbereich der Probenfläche abgebildet wird. Der Detektor selbst dient somit als quasi-konfokale Schlitz-Blende. Die aus anderem Zusammenhang bekannte Technik, ein Kamera-Bild durch Registrierung mit einer definierten Schlitzbreite aufzunehmen, wird auch als „rolling shutter“-Technik bezeichnet.

[0040] Zweckmäßigerweise wird das Beleuchtungsmuster dabei in Form eines Streifens auf- und abgebaut, der in die gleiche Richtung wandert wie sich der „rolling shutter“ bewegt. Dies ist in **Fig. 5** anhand eines hexagonalen Musters veranschaulicht, wo im oberen Teil zum Zeitpunkt t_0 die Lage eines Beleuchtungsstreifens 112 auf dem mit hexagonaler Symmetrie ausgebildetem Mikrolinsenarray 14 (links in **Fig. 5**), die Lage eines daraus resultierenden Streifens 132 des hexagonal strukturierten Beleuchtungsmusters auf der Probe 24 (Mitte in **Fig. 5**) und die Lages des streifenförmigen Abbilds 137 des von dem Streifen 132 beleuchteten Probenbereichs auf dem Kamerachip 28 (rechts in **Fig. 5**; der Bereich 137 entspricht auch dem zum Zeitpunkt t_0 aktiv geschalteten Teil des Kamera-Chips) dargestellt ist; im unteren Teil von **Fig. 5** ist die jeweilige Lage der Streifens 112, 132 und 137 zum Zeitpunkt t_n dargestellt, wobei die Richtung, in welcher die Streifen 112, 132 und 137 wandern, in **Fig. 5** mit 133 bezeichnet ist. Der zum jeweiligen Zeitpunkt nicht aktive Teil des Detektors 28 ist in **Fig. 5** mittels einer mit 135 bezeichneten grauen Fläche angedeutet.

[0041] Je schmaler der beleuchtete und erfasste Streifen 132 in der Richtung 133 ist, um so mehr nähert sich die Anordnung einer in eine Richtung konfokalen Anordnung an, wobei es sich im Grenzfall um ein Streifen-Konfokalmikroskop („slit scan confocal“) handelt. Wenn man die Breite des Streifens 132 so wählt, dass sie der Höhe des Kamerachips 28 entspricht, entspricht dies dem vorstehend unter Bezugnahme auf die **Fig. 1** bis **Fig. 3** beschriebenen Fall mit während der Aufnahme eines Phasenbilds stationärem Beleuchtungsmuster. Je schmaler der Streifen 132 gewählt wird, um so besser werden Signalbeiträge auf unerwünschten Fokusebenen unterdrückt, wodurch die Modulationstiefe erhöht wird und das Signal/Rauschverhältnis verbessert wird. Gleichzeitig wird damit jedoch auch die Belichtungszeit kürzer und entsprechend heller müssen die einzelnen Musterpunkte gemacht werden um ein gegebenes Signal/Rauschverhältnis zu erzielen. Da die Probenschädigung jedoch eher mit der Spitzenintensität als mit der applizierten Lichtdosis ansteigt, nimmt die Probenschädigung durch das Anregungslicht mit zunehmender Konfokalität ebenfalls zu. Zur Vermeidung von Probenschädigung muss man darum längere Messzeiten oder ein schlechteres Signal-zu-Rauschverhältnis in Kauf nehmen. Im ersteren Fall wird man vorzugsweise, statt den Beleuchtungsstreifen 132 langsamer über die Probe zu bewegen, mehrere Phasenbilder bei einer Streifenposition aufnehmen und daraus den Mittelwert bilden. Durch Variation der Breite des Beleuchtungsstreifens kann der jeweils beste Kompromiss zwischen Signal/Rauschverhältnis, Aufnahmegeschwindigkeit und Probenschädigung gewählt werden.

[0042] Bei Verwendung eines hexagonalen Musters (wie es in **Fig. 5** gezeigt ist), kann bereits mit einem dreizeiligen Beleuchtungsstreifen 132 (wie er in **Fig. 5** gezeigt ist) die theoretisch maximal mögliche Auflösungssteigerung erzielt werden; allerdings kann es zur Vermeidung von Artefakten sinnvoll sein, die aktive Detektionsspaltbreite auf dem Kamerachip 28 etwas kleiner oder etwas größer auszulegen, als es dieser Streifenbreite exakt entsprechen würde.

[0043] Dieses Vorgehen kombiniert strukturierte Beleuchtung mit einer „descanned“ konfokalen Detektion auf dem Kamerachip 28 (im Gegensatz beispielsweise zu dem in DE 10 2007 047 468 A1 beschriebenen Verfahren). Es ist im Gegensatz zu dem in DE 10 2007 047 468 A1 beschriebenen Verfahren auch nicht erforderlich, die Intensität des Beleuchtungslichts während des sequentiellen Auf- und Abbaus des Beleuchtungsmusters zeitlich zu modulieren, es gibt kein „Übersprechen“ von einer Position des Beleuchtungsstreifens zur nächsten, und es liegt am Ende eines einzigen Scan-Vorgangs bereits ein komplettes Phasenbild vor, das alle Zeilen des Detektorchips ausnutzt, wobei keine nachträgliche konfokale Bereinigung des Bilds erforderlich ist.

[0044] Die praktischen Vorteile des vorgeschlagenen Verfahrens seien kurz anhand eines sCMOS Chips erläutert. In dessen rolling shutter Modus kann der Chip 1.080 Zeilen in 10 ms auslesen. Das sind 10

μs /Pixelzeile. Projiziert man ein „Airy Disk“ auf 8 Pixelzeilen, dann gehören zu einer hexagonalen Elementarzelle 24 Pixelzeilen, deren Auslesen 222 μs dauert. Die Aufnahme eines Phasenbildes dauert somit 10.222ms. Veranschlagt man - was realistisch ist - für die Rückführung des Strahls maximal 768 μs , dann dauert die Aufnahme eines Phasenbildes 11 ms und die Aufnahme aller für eine hochauflösende Schichtaufnahme erforderlichen Phasenbilder 7x so lang, d.h. 77 ms. Man erhält demnach prinzipiell 13 Schichtaufnahmen/Sekunde, und das bei einer Bildgröße von 2.540 x 1.080 Pixeln. Ein konfokales Mikroskop benötigt dafür um ein vielfaches länger und belastet gleichzeitig die Probe dramatisch mehr. Durch Verkleinerung des Feldes können ohne Steigerung der Probenbelastung entsprechend höhere Aufnahmeraten erzielt werden.

[0045] In **Fig. 4** ist schematisch eine Mikroskopvorrichtung gezeigt, mit der die beschriebene sequentielle strukturierte Beleuchtung der Probe umgesetzt werden kann. Im Unterschied zum Aufbau gemäß **Fig. 1** sind zwischen der Lichtquelle 10 und dem Mikrolinsenarray 14 eine Scanvorrichtung 50, eine Scanlinse 52 und ein motorisierter Scannerspiegel 54 vorgesehen, um den zur Beleuchtung des Linsenarrays 14 verwendeten Laserstrahl 12 in einer Weise über das Mikrolinsenarray 14 zu bewegen, dass dieses in Form eines in der Richtung 133 wandernden Streifens 112 sequentiell beleuchtet wird. Dabei entsteht in der Zwischenbildebene 30 ein entsprechend wandernder beleuchteter Streifen des Punktmusters, welches mittels der ersten Tubuslinse 18 und des Objekts 22 entsprechend auf die Probe 24 abgebildet wird, so dass ein entsprechend wandernder Streifen 132 des sich sequentiell auf- und wieder abbauenden Beleuchtungsmusters entsteht. Da für die Bewegung des Beleuchtungslichtstreifens 132 auf der Probe wesentlich größere Wege als bei der für die Gewinnung verschiedener Phasenbilder erforderliche Verschiebung des Beleuchtungslichtmusters auf der Probe erforderlich sind, muss dafür eine spezielle Scanvorrichtung 50 vorgesehen werden, die - von der Lichtquelle 10 aus gesehen - vor der Zwischenbildebene 30 in einer zur Objektivpupille konjugierten Ebene liegt, so dass beim Scannen die Strahlposition in der Objektivpupille konstant bleibt. Die Scanvorrichtung 50 bewegt hierbei nur den unkritischen Beleuchtungsstreifen 132 (indem sie den Lichtstreifen 112 über das Mikrolinsen-Array 14 bewegt), nicht jedoch das außerordentlich kritisch modulierte Beleuchtungslicht, dessen Modulationstiefe sich beim Durchgang durch eine Scanoptik kritisch verschlechtern würde. Jeder Verlust an Modulationstiefe würde nämlich zugleich die Modulationstiefe des Phasenbilds verschlechtern. Bei dem Aufbau gemäß **Fig. 4** werden solche Probleme vermieden, indem das modulierte Beleuchtungsbild erst in einer zum Kamerabild absolut symmetrischen Ebene erzeugt wird, wodurch sich alle Fehler des optischen Systems kompensieren. Analog zu den weiter oben gemachten Ausführungen kann statt eines Mikrolinsenarrays 14 vor der Zwischenbildebene 30 auch ein Lochmasken-Array (nicht gezeigt) oder eine Phasenplatte (ebenfalls nicht gezeigt) in der Zwischenbildebene 30 selber eingebracht werden. Die zur Erzeugung der Phasenbilder erforderliche Strahlablenkung erfolgt, genau so wie weiter oben beschrieben, beispielsweise mit Hilfe eines Strahlablenkungselements 16.

[0046] Wie im Beispiel von **Fig. 1** wird dabei vorzugsweise ein Muster mit hexagonaler Symmetrie verwendet, wodurch die Auflösung in der Probenebene maximiert werden kann. Dabei könnte auch im Beispiel von **Fig. 4**, wie im Beispiel von **Fig. 1**, statt eines Linsenarrays 14 eine entsprechende Lochmaske in der Zwischenbildebene 30 verwendet werden.

[0047] Wenn man unter Verzicht auf maximale Auflösungssteigerung höhere Bildraten erzielen will, kann man anstelle eines hexagonalen Musters ein Streifenmuster als Beleuchtungsmuster auf der Probe erzeugen und in der mit Bezug auf **Fig. 4** und **Fig. 5** hinsichtlich eines hexagonalen Musters beschriebenen Art und Weise sequentiell und unter Ausblendung aller Emissionen aus gerade nicht beleuchteten Probenregionen (Descanned-Detektion) abtasten. Bei diesem Aspekt der Erfindung ist das auf der Probe sequentiell für jeweils ein Phasenbild entstehende Beleuchtungsmuster nur in einer Raumrichtung, d.h. in der Längsrichtung des Beleuchtungsstreifens, strukturiert, während in der Richtung senkrecht dazu, d.h. der Richtung 133 des sequentiellen Auf- bzw. Abbaus des Beleuchtungsmusters keine räumliche Strukturierung vorliegt. Diese entsteht nur auf dem Detektor durch die synchronisierte Bewegung des „rolling shutter“.

[0048] Auch hier kann über die gewählte Breite des Beleuchtungsstreifens 132 ein optimierter Kompromiss zwischen Probenschädigung auf der einen Seite (je breiter der Streifen ist, desto geringer wird die Intensität, mit der die Probe lokal beleuchtet wird) und Verbesserung des Signal/Rauschverhältnisses durch Steigerung der Modulationstiefe einstellen kann.

[0049] In **Fig. 6A** ist ein Grenzfall gezeigt, bei dem man nur einen in der Höhe beugungsbegrenzten Streifen 132 beleuchtet, wodurch die Vorteile eines „slit confocal“-Aufbaus mit denen eines Aufbaus mit strukturierter Streifenbeleuchtung kombiniert werden.

[0050] Für die Erzeugung eines Streifenmusters kann beispielsweise, wie in **Fig. 6A** gezeigt, ein Zylinderlinsenarray 114 verwendet werden, wobei die axiale Richtung der Linsen mit der Richtung 133 zusammenfällt, in welche der Beleuchtungsstreifen 132 auf- und wieder abgebaut wird, indem der Beleuchtungslichtstrahlstreifen 112 mittels der Scanvorrichtung 50 über das Zylinderlinsenarray 114 bewegt wird. Alternativ kann eine Streifenmaske in der Zwischenbildebene 30 verwendet werden, deren Streifen parallel zu der Richtung 133 verlaufen. Bei Verwendung eines Zylinderlinsenarrays 114 ist jedoch die Lichtausbeute (fast) doppelt so hoch. Durch Weglassen des Zylinderlinsenarrays (oder der Strichmaske) erhält man ein klassisches Schlitzmasken-Konfokalmikroskop. Seine Tiefenauflösung ist zwar geringer als die einer erfindungsgemäßen Anordnung, jedoch benötigt man zur Bildaufnahme nur einen einzigen Scan und nicht deren drei.

[0051] Eine weitere Maßnahme, die geeignet ist, Information aus allen außerhalb der gewünschten Fokusebene liegenden Ebenen zu minimieren und dadurch eine maximale Modulationstiefe und ein optimales Signal/Rauschverhältnis zu erzielen, besteht in der Erzeugung des gewünschten Beleuchtungsmusters in der Probe mittels Multiphotonenanregung. Dabei wird die bekannte Schichtselektivität der Multiphotonenanregung ausgenutzt, wobei aufgrund der Nichtlinearität der Multiphotonenanregung im Wesentlichen nur in der gewünschten Fokusebene eine Fluoreszenzanregung der Probe stattfindet. Damit wird auch noch tief in der Probe eine maximale Modulationsanregung des Lichts erreicht, und bei der rechnerischen Auswertung der Phasenbilder muss lediglich noch gestreutes Emissionslicht aus anderen Ebenen der Probe entfernt werden.

[0052] Ein flächendeckendes, d.h. den gesamten Kamerachip überstreichendes, Punktmuster würde die Laserleistung auf zu viele Punkte verteilen und - infolge der quadratischen Intensitätsabhängigkeit der Anregung - unrealistisch hohe Laserleistungen erforderlich machen. Deshalb ist es vorteilhaft, die Laserleistung wie vorstehend beschrieben nur auf einen schmalen Streifen 132 zu konzentrieren und diesen als sich sequentiell auf- und wieder abbauendes Punktmuster über die zu beleuchtende Probenfläche zu führen. Das resultierende Fluoreszenzlicht wird parallel dazu in der beschriebenen Weise sequentiell und selektiv auf dem jeweils aktiv geschalteten Bereich 137 des Kamerachips 28 erfasst. Die doppelte (oder bei Drei-Photonenanregung die dreifache) Anregungswellenlänge sorgt zwar für eine schlechtere Auflösung, jedoch zielt das Verfahren vorrangig auf einen guten Kontrast, hohe Geschwindigkeit und geringe Photonenbelastung der Probe. Entsprechend ist der in **Fig. 6A** beschriebene Beleuchtungsmodus für eine Multiphotonenanregung besonders gut geeignet.

[0053] Ist die Leuchtdichte eines Sensor-breiten Streifens (bei Mehrphotonenanregung wird es sich zumeist um einen Strich handeln, da nur so eine ausreichend hohe lokale Intensität erwartet werden darf) immer noch nicht hoch genug um ein ausreichendes Signal zu erzielen, kann der Beleuchtungsstrich in seiner Breite reduziert werden. Das Manko des geschmäleren Felds kann (partiell zumindest) ausgeglichen werden, wenn der Strich während des Scanvorgangs senkrecht zur Scanrichtung verschoben werden kann, d.h. wenn die Scanvorrichtung 50 bidirektional ausgelegt wird. Der Einachsen-Scanner 54 muss dazu durch eine Zweiachsen-Scanvorrichtung (nicht gezeigt) ersetzt werden. Da Mehrphotonenmikroskopie sehr häufig zur Beobachtung neuronalen Strukturen eingesetzt wird, die eine Vorzugsrichtung besitzen, kann der „Schneisen-Scan“ in vielen Fällen alle wesentlichen Bildelemente erfassen, obwohl er nur einen Bruchteil des Gesichtsfeldes überstreicht. Ein Beispiel für einen solchen Schneisen-Scan ist in **Fig. 6B** als Abwandlung des in **Fig. 6A** gezeigten Beispiels veranschaulicht.

[0054] Während bei es bei zweidimensionalen Beleuchtungsmustern optimale Winkel gibt, in die das Muster linear verschoben werden muss, um aus einer minimalen Anzahl von Phasenbildern ein optimales Ergebnis erzielen zu können, gibt es bei Verwendung eines Streifenmusters (d.h. eines nur in einer Richtung modulierten Beleuchtungsmusters) grundsätzlich keine Vorzugsrichtung der Verschiebung des Beleuchtungsmusters zwischen den einzelnen Phasenbildern, solange die Verschiebung eine Komponente in der Richtung quer zu den Streifen eine Modulationsphase aufweist und man die mindestens erforderliche Anzahl von drei unterschiedlichen Phasenbilder aufnehmen kann. Um mit ein und der selben Messanordnung schnell und einfach zwischen einem schnellen Modus (mit sequentiellem Streifenaufbau und nur drei erforderlichen Phasenbildern) und einem hochauflösenden Modus mit beispielsweise hexagonalem Beleuchtungsmuster mit mindestens 7 Phasenbildern umschalten zu können, ohne dass mehr als das Mikrolinsenarray 14 vor der Zwischenbildebene 30 (oder die Lochmaske oder die Phasenplatte, beide nicht gezeigt, in der Zwischenbildebene 30) ausgetauscht werden müssen, wählt man die Orientierung der Strahlablenkung 16 vorzugsweise so, dass sie den für das hexagonale Muster optimalen Verschiebewinkel gestattet. Die zweifache Verschiebung einer linearen Streifenbeleuchtung zur Erzeugung der (mindestens) drei Phasenbilder kann dann mit Hilfe der gleichen Anordnung realisiert werden.

[0055] Zusätzlich zu der beschriebenen Auflösungssteigerung in der Beleuchtungsebene erlaubt die strukturierte Beleuchtung auch noch eine Auflösungssteigerung in z-Richtung. Sie resultiert aus der Tatsache, dass bei flächiger Beleuchtung mit einem periodischen Muster aus kohärentem Licht aufgrund des Talbot-Effekts automatisch eine Reihe von Nebenfoki ober- und unterhalb der eigentlichen Fokusebene des Objektivs entstehen, wobei die ersten Nebenfoki in beiden Richtungen ein invertiertes Muster mit geringerer Intensität darstellen. Gleichzeitig sind alle diese Foki in z-Richtung schärfer als ein einzelner, beugungslimitierter Fokus. Für den Fall eines 1-dimensionalen Strichgitters ist das von Gustafsson et al. bereits beschrieben worden. Auch hier liefert eine zweidimensionale Beleuchtung mit hexagonaler Struktur bessere Ergebnisse im ausgewerteten Bild. Der für die Auflösung günstige Effekt ergibt sich auch, wenn gleichzeitig nur drei oder mehr Zeilen eines hexagonalen Musters beleuchtet werden.

[0056] Somit kann mit dem erfindungsgemäßen Verfahren die Auflösung eines Lichtmikroskops sowohl in lateraler als auch in axialer Richtung deutlich gesteigert werden, was die Aufnahme hoch aufgelöster dreidimensionaler Bilder der Probe ermöglicht.

[0057] Im Folgenden wird eine mathematische Herleitung der optimalen Verschiebewinkel für ein Schachbrettmuster und für ein hexagonales Muster dargelegt.

1 Eindimensionale Strukturierte Beleuchtung

[0058] In allen heute gängigen Verfahren zur Strukturierten Beleuchtung werden Muster mit einer oder mehreren Frequenzen in einer Raumrichtung verwendet. Dabei werden mehrere Phasenbilder aufgenommen, zwischen denen das Muster bzw. das Bild des Musters verschoben werden muss. Geht man von einer Frequenz in einer Raumrichtung aus, so lässt sich die Intensität auf einem Pixel (x,y) für das l-te Phasenbild schreiben als

$$I_l(x, y) = I_0 + I_s \cos\left(\underbrace{k_g}_{\frac{2\pi}{p_g}} (x - x_0) - \alpha_l\right)$$

wobei k_g die Raumfrequenz des Gitters, p_g dementsprechend die Periode und x_0 die absolute Lage des Intensitätsmaximums relativ zum Nullpunkt des Koordinatensystems ist. I_0 bezeichnet das nicht konfokale Signal, α_l den Betrag der Phasenverschiebung und I_s das sogenannte Sectioning-Signal, welches für alle Pixel zusammen ein optisches Schnittbild (oder auch quasi-konfokales Bild) ergibt.

[0059] O.B.d.A. liegt in obiger Gleichung die Gitterfrequenz in x-Richtung.

Die unbekannten Variablen in obiger Gleichung sind I_0, I_s und x_0 bzw. $k_g x_0 =: \Phi_0$. Schreibt man die cos-Funktion mit komplexen Exponentialfunktionen und benutzt $\Phi(x) := k_g x - \Phi_0$, so erhält man

$$I_l(x, y) = I_0 + \frac{1}{2} I_s e^{i\Phi(x)} e^{-i\alpha_l} + \frac{1}{2} I_s e^{-i\Phi(x)} e^{i\alpha_l} \quad (1)$$

[0060] Für mehrere Werte des Index l (welche mehreren Phasenbildern entsprechen) ergibt sich aus (1) ein lineares Gleichungssystem. Aufgrund der 3 Unbekannten I_0, I_s und Φ benötigt man mindestens 3 Gleichungen um ein bestimmtes bzw. sogar überbestimmtes Gleichungssystem zu erhalten.

[0061] Die Lösbarkeit hängt aber auch davon ab, welche Werte für α_l gewählt werden. Speziell für 3 Zeilen (also 3 Phasenbilder) gibt das

$$\begin{pmatrix} I_1 \\ I_2 \\ I_3 \end{pmatrix} = \underbrace{\begin{pmatrix} 1 & e^{-i\alpha_1} & e^{i\alpha_1} \\ 1 & e^{-i\alpha_2} & e^{i\alpha_2} \\ 1 & e^{-i\alpha_3} & e^{i\alpha_3} \end{pmatrix}}_{=: \hat{A}} \begin{pmatrix} I_0 \\ \frac{1}{2} I_s e^{i\Phi} \\ \frac{1}{2} I_s e^{-i\Phi} \end{pmatrix} \quad (2)$$

[0062] Dieses 3x3 Gleichungssystem ist lösbar, solange die Determinante von \hat{A} ungleich 0 ist, denn genau dann ist \hat{A} invertierbar. Ein möglichst gut konditioniertes Gleichungssystem erhält man durch die Wahl

$$\alpha_l = \left\{ 0, \frac{2\pi}{3}, \frac{4\pi}{3} \right\}, \text{ für die die Zeilen von } \hat{A} \text{ orthogonal sind (maximale Determinante).}$$

$$\hat{A} = \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & e^{-i\frac{2\pi}{3}} & e^{i\frac{2\pi}{3}} \\ 1 & e^{-i\frac{4\pi}{3}} & e^{i\frac{4\pi}{3}} \end{pmatrix}$$

[0063] \hat{A} ist in dem Fall bis auf einen Faktor $\sqrt{3}$ unitär, d.h. die Inverse von \hat{A} ist proportional zu ihrer adjungierten Matrix:

$$\hat{A}^{-1} = \frac{1}{3} \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & e^{i\frac{2\pi}{3}} & e^{-i\frac{2\pi}{3}} \\ 1 & e^{i\frac{4\pi}{3}} & e^{-i\frac{4\pi}{3}} \end{pmatrix}$$

[0064] Man erhält als Lösung das Schnittbild

$$I_s = \left| I_1 + I_2 e^{i\frac{2\pi}{3}} + I_3 e^{i\frac{4\pi}{3}} \right| = \sqrt{(I_1 - I_2)^2 + (I_2 - I_3)^2 + (I_3 - I_1)^2} \quad (3)$$

getrennt vom Ausserfokus-Signal

$$I_0 = I_1 + I_2 + I_3 \quad (4)$$

[0065] Gleichung (3) ist in der Fachliteratur bekannt als Wilson-Algorithmus. (siehe z.B. http://www.aurox.co.uk/wp-content/uploads/som_1997-3.pdf) Eine Andere Möglichkeit obige Situation aufzufassen besteht darin, sich das (Raumfrequenz) Spektrum eines einzelnen Phasenbildes zu überlegen:

[0066] In der Fokusebene des Mikroskopobjektives ist bei linearer Fluoreszenzanregung die Intensitätsverteilung der Emission $E(x, y)$ gegeben durch

$$E(\vec{x}) \propto O(\vec{x})S(\vec{x})$$

wobei $O(\vec{x})$ die lokale Dichte an Fluorophoren im Objekt und $S(\vec{x})$ die Intensität des Anregungslichtes ist. Aufgrund des Faltungstheorems ergibt sich für das Spektrum der Emission

$$\tilde{E}(\vec{k}) \propto \tilde{O}(\vec{k}) * \tilde{S}(\vec{k}) = \int d\vec{k}' \tilde{O}(\vec{k}') \tilde{S}(\vec{k} - \vec{k}') \quad (5)$$

[0067] Für den Fall dass $S(\vec{x}) \equiv \text{const.}$ gilt $\tilde{S}(\vec{k}) \propto \delta(\vec{k})$, also auch $\tilde{E}(\vec{x}) \propto \tilde{O}(\vec{k})$. Bei Verwendung einer periodischen Anregung mit einem Gitter

$$S(\vec{x}) = 1 + \cos(\vec{k}_g \vec{x} - \Phi_0)$$

ergibt sich ein Satz an Dirac'schen Deltadistributionen für $\tilde{S}(\vec{k})$:

$$\tilde{E}(\vec{k}) \propto \tilde{O}(\vec{k}) * \underbrace{\left(\delta(\vec{k}) + \frac{C_g}{2} \delta(\vec{k} - \vec{k}_g) e^{-i\Phi_0} + \frac{C_g}{2} \delta(\vec{k} + \vec{k}_g) e^{i\Phi_0} \right)}_{\tilde{S}(\vec{k})} = \quad (6)$$

$$= \tilde{O}(\vec{k}) + \frac{C_g}{2} \tilde{O}(\vec{k} - \vec{k}_g) e^{-i\Phi_0} + \frac{C_g}{2} \tilde{O}(\vec{k} + \vec{k}_g) e^{i\Phi_0} \quad (7)$$

[0068] C_g bezeichnet den Kontrast des Gitters, der für den Fall eines Objektes mit der Dicke 0 (also vollkommen ohne Ausserfokus Signal) erreicht werden kann. Mit Gleichung (7) sieht man, dass sich das Spektrum

eines Phasenbildes aus mehreren Überlagerungen des Objektspektrums zusammensetzt, wobei der Ursprung jeweils an die entsprechende Frequenz verschoben worden ist.

[0069] Nach einer Trennung dieser überlagerten Ordnungen ist es möglich ein Bild mit erhöhter lateraler Auflösung (zunächst in einer Richtung) zu berechnen. (siehe z.B. http://www.msg.ucsf.edu/gustafsson/Files/JMicrosci98_82-87.pdf) Die Trennung der Ordnungen funktioniert hier genauso wie die Trennung von Schnittbild und Hintergrund. Dieses Konzept wird im weiteren mit Superresolution bezeichnet.

2 Der magische Winkel

2.1 Die Matrix \hat{A}

[0070] Für die eindimensionale Strukturierte Beleuchtung kann die Matrix \hat{A} mehr als 3×3 Einträge haben. Falls die Gitterfrequenz auf etwa n Airy gesetzt wird, werden (analog zu Gleichung (1)) n Beugungsordnungen im Bild des Gitters rekombiniert:

$$I_l(\vec{x}) = I_0(\vec{x}) + \frac{1}{2} \sum_{m=1}^n I_s^{(m)}(\vec{x}) e^{i\Phi_m(\vec{x})} e^{-i\alpha_{l,m}} + \frac{1}{2} \sum_{m=1}^n \underbrace{I_s^{(-m)}(\vec{x})}_{I_s^{(m)}} \underbrace{e^{-i\Phi_m(\vec{x})}}_{e^{i\Phi_{-m}(\vec{x})}} \underbrace{e^{i\alpha_{l,m}}}_{e^{-i\alpha_{l,-m}}} = \quad (8)$$

$$= \underbrace{e^{i\cdot 0}}_{e^{i\Phi_0(\vec{x})}} \underbrace{e^{-i\cdot 0}}_{e^{-i\alpha_{l,0}}} I_0(\vec{x}) + \sum_{m=1}^n e^{-i\alpha_{l,m}} \cdot \frac{1}{2} I_s^{(m)}(\vec{x}) e^{i\Phi_m(\vec{x})} + \sum_{m=-1}^{-n} e^{-i\alpha_{l,m}} \cdot \frac{1}{2} I_s^{(m)}(\vec{x}) e^{i\Phi_m(\vec{x})} \quad (9)$$

[0071] Das Signal auf dem Pixel $\vec{x} = (x, y)$ ist also durch eine Superposition von $N = 2n + 1$ Ordnungen gegeben. Der Index l steht hier für das l -te Phasenbild, der Index m kennzeichnet die harmonische Ordnung der jeweiligen Frequenz. Es gilt $\Phi_m(\vec{x}) = \vec{k}_m \circ \vec{x}$.

[0072] Gleichung (9) lässt sich in Matrixschreibweise schreiben:

$$\underbrace{\begin{pmatrix} I_1(\vec{x}) \\ I_2(\vec{x}) \\ \vdots \\ I_M(\vec{x}) \end{pmatrix}}_{\text{gemessene Werte}} = \hat{A} \cdot \begin{pmatrix} I_0(\vec{x}) \\ \frac{1}{2} I_s^{(1)}(\vec{x}) e^{-i\Phi_1(\vec{x})} \\ \frac{1}{2} I_s^{(-1)}(\vec{x}) e^{+i\Phi_1(\vec{x})} \\ \frac{1}{2} I_s^{(2)}(\vec{x}) e^{+i\Phi_2(\vec{x})} \\ \vdots \\ \frac{1}{2} I_s^{(-n)}(\vec{x}) e^{+i\Phi_n(\vec{x})} \end{pmatrix} \quad (10)$$

[0073] M bezeichnet die Anzahl genommener Messungen (Phasenbilder). Der Vektor auf der rechten Seite von (10) hat $N = 2n + 1$ Einträge, \hat{A} ist also eine $M \times N$ Matrix.

[0074] Damit \hat{A} bijektiv und invertierbar ist, muss gelten

$$M = N$$

$$\text{und } \text{rang}(\hat{A}) = N.$$

[0075] Die Einträge von \hat{A} sind gegeben durch

$$\hat{A}_{l,m} = e^{-i\alpha_{l,m}} \quad (11)$$

[0076] Nimmt man an, dass von einem zum nächsten Phasenbild immer die gleiche laterale Verschiebung $\vec{\Delta}$ erfolgt, und dass das erste Phasenbild ($l = 1$) gar nicht verschoben ist, so gilt

$$\alpha_{l,m} = (l-1) = \delta\Phi_m = (l-1) \vec{k}_m \circ \vec{\Delta} \quad (12)$$

[0077] Für den speziellen Fall eines Gitters (o.B.d.A. in x-Richtung), ist $\vec{k}_m = m \frac{2\pi}{p} \hat{e}_x$ und

$$\alpha_{l,m} = (l-1) \cdot m \cdot \Delta \frac{2\pi}{p} \cdot \cos(\theta)$$

, wobei θ den Winkel zwischen der Verschieberichtung und der x—Achse bezeichnet und $\Delta = |\vec{\Delta}|$.

[0078] Beim Gitter ist also jede Verschieberichtung ausser der Senkrechten zur Frequenzrichtung möglich.

[0079] Wählt man $\Delta = \frac{p}{N \cos(\theta)}$, so ist

$$\alpha_{l,m} = (l-1) \cdot m \cdot \frac{2\pi}{N} \quad (13)$$

$\hat{A}_{l,m} = e^{-i(l-1)m \frac{2\pi}{N}}$ vermittelt für diese spezielle Wahl eine diskrete inverse Fouriertransformation und es gilt

$$\sum_m \hat{A}_{l,m} \hat{A}_{n,m}^* = \sum_{m=1}^N e^{-i(l-1)m \frac{2\pi}{N}} = N \cdot \delta_{l,m}$$

\hat{A} ist also proportional zu einer unitären Matrix.

[0080] Anschaulich kann man sich das Signal auf einem Pixel als periodische Funktion (mit N harmonischen Anteilen) vorstellen, die mit N Punkten diskret abgetastet wird (siehe Abbildung (7)).

[0081] Da gerade die relativen Stärken der harmonischen Anteile gesucht sind, ist die diskrete Fouriertransformation gerade die richtige Transformation. Abbildung (8) zeigt die rechnerisch zerlegten Anteile aus Abbildung (7).

[0082] Die Darstellung in Gleichung (10) gilt auch dann noch, wenn statt eines Gitters eine allgemeinere periodische Struktur (mit Frequenzordnungen in mehreren Richtungen) verwendet wird. Um wie hier beschrieben eine optimal lösbare Situation für allgemeinere periodische Strukturen zu erreichen, sollen sich die $\alpha_{l,m}$ (also die Phasenverschiebung für die l-te Ordnung im m—ten Phasenbild) schreiben lassen wie in Gleichung (13):

$$\alpha_{l,m} = (m-1) \cdot l \cdot \frac{2\pi}{N}$$

, wobei die Fourier-Ordnungen für Strukturen mit Frequenzen in mehreren Richtungen beliebig indiziert werden können.

[0083] Optimal lösbar heisst in diesem Zusammenhang eine optimale Konditionierung der Matrix bzw. eine minimale Konditionszahl. Die Konditionszahl einer Matrix gibt an, wie sich Fehler bei der Lösung eines linearen Gleichungssystems fortpflanzen. Der kleinste mögliche Wert für die Konditionszahl wäre also 1:

$$\hat{A} \vec{x} = \vec{y} \quad (14)$$

$$\Rightarrow \vec{x} = \hat{A}^{-1} \vec{y} \quad (15)$$

$$\Rightarrow \frac{\|\delta \vec{x}\|}{\|\vec{x}\|} \leq \frac{\|\delta \vec{y}\|}{\|\vec{y}\|} \cdot \text{cond}(\hat{A}) \quad (16)$$

$$\text{cond}(\hat{A}) := \|\hat{A}\| \cdot \|\hat{A}^{-1}\| \quad (17)$$

[0084] Die Konditionszahl wird gerade minimal (1) für den Fall, dass \hat{A} eine unitäre Matrix ist. (Die Eigenwerte einer unitären Matrix (sowie ihrer Inversen) liegen alle auf dem Einheitskreis in \mathbb{C} , woraus mit (17) folgt, dass $\text{cond}(\hat{A}) = 1 \cdot 1 = 1$).

2.2 Schachbrett

[0085] Als eine Erweiterung obigen Verfahrens wurde überlegt, ob man auch Frequenzanteile in mehreren Richtungen durch Verwendung einer Struktur, die Frequenzen in mehreren Richtungen enthält voneinander trennen kann, wenn diese Struktur bei der Erzeugung der Phasenbilder nur in einer Richtung verschoben wird.

[0086] Das hat zum einen die Motivation, dass das übliche Verfahren zur quasi-konfokalen Strukturierten Beleuchtung (Gitter in einer Orientierung, keine Drehung) sehr anisotrop ist, d.h. dass Kontraste aus der Fokusebene nur in einer Richtung rekonstruiert werden.

[0087] Zum anderen, macht die Auswertung von Frequenzanteilen in mehr als einer Richtung eine Superresolution-Auswertung ohne Drehung der Struktur relativ zur optischen Achse und mit weniger Phasenbildern möglich. Dass die Verschiebung nur in einer Richtung stattfindet vereinfacht die Anwendung von Strukturierter Beleuchtung mit Superresolution und macht das Konzept schneller und robuster.

[0088] Vergleicht man die Situation mit der in Gleichung (2), so sieht man, dass das mathematische Problem darin besteht, die einzelnen Frequenzen mit einer jeweils eindeutigen Phasenverschiebung zu markieren und dadurch unterscheidbar zu machen.

[0089] Die Fourierdarstellung eines Schachbretts $\mathfrak{S}(x, y)$ mit Kantenlänge a lautet

$$\mathfrak{S}(x, y) \propto \quad (18)$$

$$\int d\vec{k} e^{i\vec{k}(\vec{x}-\vec{x}_0)} \left(\sum_{m,n=-\infty}^{+\infty} \delta\left(-\frac{\pi}{a} \begin{pmatrix} m \\ n \end{pmatrix}\right) \right) \text{sinc}\left(\frac{k_x a}{2}\right) \text{sinc}\left(\frac{k_y a}{2}\right) \quad (19)$$

$$\cdot \cos\left[\frac{a}{2}(k_x + k_y)\right] = \quad (20)$$

$$\sum_{m,n=-\infty}^{+\infty} e^{i\frac{\pi}{a}(\vec{x}-\vec{x}_0) \circ \begin{pmatrix} m \\ n \end{pmatrix}} \text{sinc}\left(\frac{\pi m}{2}\right) \text{sinc}\left(\frac{\pi n}{2}\right) \cos\left[\frac{\pi}{2}(m+n)\right] = \quad (21)$$

$$\sum_{m,n=-\infty}^{+\infty} e^{i\frac{\pi}{a}((x-x_0)m+(y-y_0)n)} \text{sinc}\left(\frac{\pi m}{2}\right) \text{sinc}\left(\frac{\pi n}{2}\right) \cos\left[\frac{\pi}{2}(m+n)\right] = \quad (22)$$

$$1 + \sum_{\substack{m, n \\ (m+n) \text{ gerade}}} \left(\frac{2(-1)^{\frac{m-1}{2}}}{m\pi} \right) \left(\frac{2(-1)^{\frac{n-1}{2}}}{n\pi} \right) e^{i\frac{\pi}{a}[(x-x_0)m+(y-y_0)n]} \quad (23)$$

[0090] Das Schachbrett ist in dieser Darstellung so orientiert, wie es auch beim Schach-Spielen üblich ist bzw. wie in Abbildung (9) gezeigt.

[0091] Die Raumfrequenzvektoren des Schachbretts sind also allgemein gegeben durch

$$\vec{k}_{m,n} = \frac{\pi}{a} \begin{pmatrix} m \\ n \end{pmatrix}$$

[0092] Wählt man die Frequenz des Schachbretts nahe der Auflösungsgrenze des Mikroskopobjektives, werden nur noch die ersten Ordnungen $\vec{k}_{1,1} =: \vec{k}^+$ und $\vec{k}_{1,-1} =: \vec{k}^-$ zu einem Bild rekombiniert:

$$\mathfrak{S}(x, y) \propto 1 + \frac{8}{\pi^2} \cos\left[\frac{\pi}{a}(x+y) - \Phi_0^+\right] + \frac{8}{\pi^2} \cos\left[\frac{\pi}{a}(x-y) - \Phi_0^-\right]$$

[0093] Die beiden Frequenzrichtungen des Schachbretts werden hier mit + und - indiziert.

[0094] Analog zu Gleichung (1) erhält man

$$I(x, y) = I_0 + I_s^+ \frac{8}{\pi^2} \cos \left[\frac{\pi}{a} (x + y) - \Phi_0^+ \right] + I_s^- \frac{8}{\pi^2} \cos \left[\frac{\pi}{a} (x - y) - \Phi_0^- \right] \quad (24)$$

[0095] Verglichen mit (1) ergeben sich hier 5 Unbekannte I_0 , I_s^\pm und Φ_0^\pm . Es sind also mindestens 5 Phasenbilder nötig, um die Unbekannten zu bestimmen. ($N = 5$)

[0096] Die Phasenverschiebung, die sich für eine laterale Verschiebung um $\vec{\Delta} = (\Delta_x, \Delta_y)$ für die l -te Ordnung ergibt ist

$$\delta\Phi_l = \vec{k}_l \circ \vec{\Delta}$$

, also gerade gegeben durch die orthogonale Projektion des Verschiebevektors auf den Frequenzvektor \vec{k}_l .

[0097] Um wie in Gleichung (2) für \hat{A} eine unitäre Matrix zu erhalten, sucht man also einen Verschiebevektor $\vec{\Delta}$, so dass

$$\begin{aligned} \vec{k}^+ \circ \vec{\Delta} &= \delta\Phi_+ \\ \vec{k}^- \circ \vec{\Delta} &= \delta\Phi_- = \kappa \delta\Phi_+ \end{aligned}$$

\Leftrightarrow

$$\begin{aligned} \Delta_x + \Delta_y &= \frac{a}{\pi} \delta\Phi_+ \\ \Delta_x - \Delta_y &= \kappa \frac{a}{\pi} \delta\Phi_+ \end{aligned}$$

\Leftrightarrow

$$\begin{aligned} \Delta_x &= \frac{(1+\kappa)a}{2\pi} \delta\Phi_+ \\ \Delta_y &= \frac{(1-\kappa)a}{2\pi} \delta\Phi_+ \end{aligned}$$

[0098] Mit einem noch zu bestimmendem Parameter κ .

[0099] Für einen beliebigen Wert von κ lassen sich obige Gleichungen erfüllen, falls der Verschiebevektor Δ einen Winkel θ zur x -Achse einschliesst, so dass

$$\tan(\theta) = \frac{\Delta_y}{\Delta_x} \Rightarrow \theta = \arctan \left(\frac{1-\kappa}{1+\kappa} \right)$$

[0100] Die Phasenverschiebungen $\alpha_{l,m}$ sind hier gegeben durch

$$\alpha_{l,0} \equiv 0 \quad (25)$$

$$\alpha_{l,+} = (l-1) \Delta \frac{2\pi}{a} \cos(\gamma) \quad (26)$$

$$\alpha_{l,-} = (l-1) \kappa \Delta \frac{2\pi}{a} \cos(\gamma) \quad (27)$$

, wobei γ den Winkel zwischen $\vec{\Delta}$ und \vec{k}^+ bezeichnet ($\theta = \gamma + 45^\circ$). Wählt man für die Strecke der Verschiebung gerade $\Delta = \frac{a}{5\cos(\gamma)}$, ergibt sich

$$\alpha_{l,+} = (l-1) \frac{2\pi}{5} \quad (28)$$

$$\alpha_{l,-} = (l-1)\kappa \frac{2\pi}{5} \quad (29)$$

[0101] Es lässt sich zeigen, dass es gerade zwei mögliche Werte für κ gibt, so dass $\hat{A} = \exp(-i\alpha_{l,m})$ eine unitäre Matrix ist:

$$\kappa_1 = 2 \quad (30)$$

$$\kappa_2 = 3 \quad (31)$$

[0102] Das bedeutet, dass unter 2 verschiedenen Orientierungswinkel eine Lösung möglich ist. Technisch gesehen, sollte die Lösung bevorzugt werden, bei der sich der kleinere Winkel für $\gamma = \theta - 45^\circ$ ergibt. Das liegt zum einen daran, dass die absolute Verschiebung

$$\Delta = \frac{a}{5} \frac{1}{\cos(\gamma)}$$

mit wachsendem γ größer wird. Diese sollte aber nicht unbedingt größer als notwendig sein. Zum anderen hängt der Fehler von $\alpha_{l,-}$ direkt von κ , ab. Für den Fehler von κ ergibt sich

$$\delta\kappa = \delta \left(\frac{\cos(90^\circ - \gamma)}{\cos \gamma} \right) = \delta(\tan(\gamma)) = (1 + \tan^2(\gamma)) \delta\gamma \quad (32)$$

[0103] Ein möglicher Orientierungsfehler des Schachbretts, hat also bei einem größeren Wert von γ größere Auswirkungen auf die Konditionierung der Matrix A .

[0104] Aufgrund dieser Überlegungen sollte beim Schachbrett als magischer Winkel bevorzugterweise θ_1 verwendet werden.

$$\theta_1 = \arctan\left(-\frac{1}{3}\right) \approx -18.435^\circ$$

[0105] Der zweite mögliche Winkel wäre $\theta_2 = \arctan\left(-\frac{1}{2}\right) \approx -26.565^\circ$.

[0106] Durch Vertauschung der oben mit + und - bezeichneten Frequenzen, sieht man, dass auch ein Winkel von $+18.435^\circ$ möglich ist.

[0107] Legt man die Verschieberichtung o.B.d.A. längs der x-Achse, erreicht man obige Bedingung durch ein Verdrehen des Schachbrettmusters.

[0108] Nach Rotation um $+18.435^\circ$ ist das Schachbrett gegeben durch:

$$1 + \frac{8}{\pi^2} \cos\left(\underbrace{\frac{2\pi}{\sqrt{10}a}(2x+y) - \Phi_0^+}_{\Phi^+(\vec{x})}\right) + \frac{8}{\pi^2} \cos\left(\underbrace{\frac{2\pi}{\sqrt{10}a}(x-2y) - \Phi_0^-}_{\Phi^-(\vec{x})}\right)$$

[0109] Durch Vertauschung von x und y erhält man die Darstellung für den Fall einer Rotation des Musters um -18.435° .

[0110] Das l -te Phasenbild des Schachbretts auf der Kamera ist

$$I_l(x, y) = I_0 + I_s^+ \frac{8}{\pi^2} \cos\left[\Phi^+(\vec{x}) - 2\alpha_l\right] + I_s^- \frac{8}{\pi^2} \cos\left[\Phi^-(\vec{x}) - \alpha_l\right]$$

[0111] Entsprechend den $\alpha_{l,m}$ aus Gleichungen (28) - (31) ergibt sich mit $\kappa_1 = 2$ für \hat{A} :

$$\hat{A} = \frac{1}{\sqrt{5}} \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & \exp\left(-i\frac{2\pi}{5}\right) & \exp\left(-i\frac{8\pi}{5}\right) & \exp\left(-i\frac{4\pi}{5}\right) & \exp\left(-i\frac{6\pi}{5}\right) \\ 1 & \exp\left(-i\frac{4\pi}{5}\right) & \exp\left(-i\frac{6\pi}{5}\right) & \exp\left(-i\frac{8\pi}{5}\right) & \exp\left(-i\frac{2\pi}{5}\right) \\ 1 & \exp\left(-i\frac{6\pi}{5}\right) & \exp\left(-i\frac{4\pi}{5}\right) & \exp\left(-i\frac{2\pi}{5}\right) & \exp\left(-i\frac{8\pi}{5}\right) \\ 1 & \exp\left(-i\frac{8\pi}{5}\right) & \exp\left(-i\frac{2\pi}{5}\right) & \exp\left(-i\frac{6\pi}{5}\right) & \exp\left(-i\frac{4\pi}{5}\right) \end{pmatrix}$$

[0112] Diese Matrix ist unitär, somit ist die Inverse gerade

$$\hat{A}^{-1} = \frac{1}{\sqrt{5}} \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & \exp\left(i\frac{2\pi}{5}\right) & \exp\left(i\frac{4\pi}{5}\right) & \exp\left(i\frac{6\pi}{5}\right) & \exp\left(i\frac{8\pi}{5}\right) \\ 1 & \exp\left(i\frac{8\pi}{5}\right) & \exp\left(i\frac{6\pi}{5}\right) & \exp\left(i\frac{4\pi}{5}\right) & \exp\left(i\frac{2\pi}{5}\right) \\ 1 & \exp\left(i\frac{4\pi}{5}\right) & \exp\left(i\frac{8\pi}{5}\right) & \exp\left(i\frac{2\pi}{5}\right) & \exp\left(i\frac{6\pi}{5}\right) \\ 1 & \exp\left(i\frac{6\pi}{5}\right) & \exp\left(i\frac{2\pi}{5}\right) & \exp\left(i\frac{8\pi}{5}\right) & \exp\left(i\frac{4\pi}{5}\right) \end{pmatrix}$$

[0113] Für die Lösungen der Schnittbilder ergeben sich also

$$I_0 = I_1 + I_2 + I_3 + I_4 + I_5 \quad (33)$$

$$I_s^+ = \left| I_1 + I_2 e^{i\frac{2\pi}{5}} + I_3 e^{i\frac{4\pi}{5}} + I_4 e^{i\frac{6\pi}{5}} + I_5 e^{i\frac{8\pi}{5}} \right| \quad (34)$$

$$I_s^- = \left| I_1 + I_2 e^{i\frac{4\pi}{5}} + I_3 e^{i\frac{8\pi}{5}} + I_4 e^{i\frac{2\pi}{5}} + I_5 e^{i\frac{6\pi}{5}} \right| \quad (35)$$

[0114] Die übrigen beiden Lösungen sind komplex konjugiert zu den angeführten Lösungen für I_s^+ und I_s^- . Für das quadratische Mittel aus I_s^+ und I_s^- , und also $\sqrt{\langle I_s^2 \rangle} = \sqrt{(I_s^+)^2 + (I_s^-)^2}$ ergibt sich

$$\sqrt{\langle I_s^2 \rangle} = \sqrt{(I_1 - I_3)^2 + (I_2 - I_4)^2 + (I_3 - I_5)^2 + (I_4 - I_1)^2 + (I_5 - I_2)^2} \quad (36)$$

[0115] In der Praxis wird der Orientierungswinkel des Musters θ einen Fehler aufweisen. Dieser Fehler kann gemessen und in obiger Auswertung kompensiert werden.

[0116] Bei einer Kalibrationsaufnahme werden eine Anzahl von Phasenbildern auf einer möglichst gleichmäßig fluoreszierenden Schicht (so dass $\tilde{O}(\vec{k}) \approx \delta(\vec{k})$) aufgenommen, bei denen das Muster von einem zum nächsten Bild um jeweils die gleiche unbekannte Phase verschoben wird. Kennt man die Frequenz des Schachbretts in der Probe, so kann man diese Phasenverschiebung in etwa auf einen theoretischen Wert von einer zehntel Periode einstellen. (Es ist nur wichtig die Verschiebung beim Kalibrieren nicht zu groß zu wählen)

[0117] Analog zu Gleichung (7) ergibt sich in dieser Situation für das Raumfrequenzspektrum der Bilder:

$$\tilde{E}_l(\vec{k}) \propto \underbrace{\delta(\vec{k})}_{\approx \tilde{O}(\vec{k})} + \frac{C_s^+}{2} \delta(\vec{k} - \vec{k}^+) e^{-i(\Phi_0^+ + l\alpha^+)} + \frac{C_s^+}{2} \delta(\vec{k} + \vec{k}^+) e^{i(\Phi_0^+ + l\alpha^+)} +$$

$$+ \frac{C_s^-}{2} \delta(\vec{k} - \vec{k}^-) e^{-i(\Phi_0^- + l\alpha^-)} + \frac{C_s^-}{2} \delta(\vec{k} + \vec{k}^-) e^{i(\Phi_0^- + l\alpha^-)}$$

[0118] In den Fouriertransformierten dieser Serie aus Kalibrations-Phasenbildern werden anschließend die jeweils positiven Peaks (also die mit $\delta(\vec{k} + \vec{k}^\pm)$ der Schachbrettordnungen gesucht und deren Realteile als Funktion des Bildindex ausgewertet.

$$\Re\left(\frac{C_s^\pm}{2} \delta(\vec{k} - \vec{k}^\pm) e^{-i(\Phi_0^\pm + l\alpha^\pm)}\right) = \frac{C_s^\pm}{2} \delta(\vec{k} - \vec{k}^\pm) \cos(\Phi_0^\pm + l\alpha^\pm)$$

[0119] Durch ein Fit an das Modell

$$a + b \cos(cx + d) \quad (37)$$

erhält man so den Kontrast auf dem Kalibrationsobjekt $C_s^\pm = 2\frac{b}{a}$, die Startphase $\Phi_0^\pm = d$ und die gesuchte Phasenverschiebung $\alpha_l^\pm = c^\pm$ für jede Frequenzrichtung des Schachbretts. Aus den ermittelten Phasenverschiebungen für die + und — Richtung ergibt sich gerade der Orientierungswinkel des Musters relativ zur Verschieberichtung:

$$\theta = \arctan\left(\frac{c^+ - c^-}{c^+ + c^-}\right) \quad (38)$$

[0120] Das Verhältnis aus c^+ und c^- ist identisch mit oben definiertem Parameter κ und kann in der Matrix \hat{A} berücksichtigt werden:

$$\frac{c^+}{c^-} = \kappa \quad (39)$$

$$\hat{A} = \frac{1}{\sqrt{5}} \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & \exp\left(-i\frac{2\pi}{5}\right) & \exp\left(-i\frac{8\pi}{5}\right) & \exp\left(-i\frac{2\pi}{5}\right) & \exp\left(-i\frac{8\pi}{5}\right) \\ 1 & \exp\left(-i\frac{4\pi}{5}\right) & \exp\left(-i\frac{6\pi}{5}\right) & \exp\left(-i\frac{4\pi}{5}\right) & \exp\left(-i\frac{6\pi}{5}\right) \\ 1 & \exp\left(-i\frac{6\pi}{5}\right) & \exp\left(-i\frac{4\pi}{5}\right) & \exp\left(-i\frac{6\pi}{5}\right) & \exp\left(-i\frac{4\pi}{5}\right) \\ 1 & \exp\left(-i\frac{8\pi}{5}\right) & \exp\left(-i\frac{2\pi}{5}\right) & \exp\left(-i\frac{8\pi}{5}\right) & \exp\left(-i\frac{2\pi}{5}\right) \end{pmatrix} \quad (40)$$

[0121] Für den magischen Winkel ist $\kappa = 2$ und \hat{A} unitär. Für Abweichungen erhält man eine korrigierte Auswertung, wenn man \hat{A} invertiert.

[0122] Obige Lösung kann analog für den 2. möglichen magischen Winkel θ_2 durchgeführt werden.

2.3 Hexagon

[0123] Alternativ zum oben beschriebenen Schachbrettmuster, ist es auch mit einem hexagonalem Muster möglich Phasenbilder, die unter Verschiebung des Musters in einer Raumrichtung aufgenommen wurden, auszuwerten.

[0124] Motivation hierfür ist, dass das Hexagon Frequenzen in 3 Raumrichtungen enthält. Beim Stand der Technik für Superresolution Strukturierte Beleuchtung wird ein Gitter verwendet, für welches Phasenbilder in 3 Orientierungen des Gitters aufgenommen werden. Üblicherweise wird ein Winkel von 120° für die Orientierungen des Gitters gewählt, um final eine ausreichend isotrope Punktspreizfunktion zu erhalten. Genau dieser Winkel besteht auch zwischen den Grund-Frequenzrichtungen des Hexagons.

[0125] Für ein hexagonales Muster $\mathfrak{h}(\vec{x})$ mit Grundperiode a , wie in Abbildung (10) gezeigt,

$$\mathfrak{h}(\vec{x}) = \sum_{m,n} \delta\left(x - m\frac{2a}{\sqrt{3}}\right) \delta(y - n2a) + \sum_{m,n} \delta\left(x - \left(m + \frac{1}{2}\right)\frac{2a}{\sqrt{3}}\right) \delta\left(y - \left(n + \frac{1}{2}\right)2a\right) \quad (41)$$

lautet die Fourierdarstellung:

$$\mathfrak{h}(\vec{x}) = \sum_{m,n} \left(1 + e^{-i(m\pi+n\pi)}\right) e^{i\left(m\sqrt{3}\frac{\pi}{a}x + n\frac{\pi}{a}y\right)} = 2 \sum_{\substack{m,n \\ (m+n) \text{ gerade}}} e^{i\left(m\sqrt{3}\frac{\pi}{a}x + n\frac{\pi}{a}y\right)} \quad (42)$$

[0126] Für den Frequenzvektor ergibt sich hier allgemein:

$$\vec{k}_{m,n} = \frac{\pi}{a} \begin{pmatrix} m\sqrt{3} \\ n \end{pmatrix} \quad (43)$$

[0127] Auf dem Kreis mit Radius der Grundfrequenz $|\vec{k}| = \frac{2\pi}{a}$ liegen wie zu erwarten die 3 Grund-Frequenzvektoren $\vec{k}_{0,2}$, $\vec{k}_{1,1}$ und $\vec{k}_{1,-1}$ des Hexagons:

$$\vec{k}_{0,2} = \frac{2\pi}{a} \begin{pmatrix} 0 \\ 1 \end{pmatrix} =: \vec{k}_1 \quad (44)$$

$$\vec{k}_{1,-1} = \frac{\pi}{a} \begin{pmatrix} \sqrt{3} \\ -1 \end{pmatrix} =: \vec{k}_2 \quad (45)$$

$$\vec{k}_{1,1} = \frac{\pi}{a} \begin{pmatrix} \sqrt{3} \\ 1 \end{pmatrix} =: \vec{k}_3 \quad (46)$$

[0128] Bei Vertauschung der Vorzeichen von m und n erhält man die zugehörigen negativen Frequenzvektoren.

[0129] Man sieht hier eine wichtige Eigenschaft der hexagonalen Symmetrie, nämlich dass die Frequenzvektoren der Grundfrequenz gerade ein gleichseitiges Dreieck aufspannen, bzw. dass gilt:

$$\vec{k}_1 + \vec{k}_2 = \vec{k}_3 \quad (47)$$

[0130] Betrachtet man nur die ersten Ordnungen, erhält man

$$\mathfrak{h} \propto 1 + \underbrace{\frac{1}{3} \cos\left(\frac{2\pi}{a}y - \Phi_0^1\right)}_{\Phi^1(\vec{x})} + \underbrace{\frac{1}{3} \cos\left(\frac{\pi}{a}(\sqrt{3}x - y) - \Phi_0^2\right)}_{\Phi^2(\vec{x})} + \underbrace{\frac{1}{3} \cos\left(\frac{\pi}{a}(\sqrt{3}x + y) - \Phi_0^3\right)}_{\Phi^3(\vec{x})} \quad (48)$$

bzw. die gemessene Intensität der Phasenbilder (entsprechend Gleichung (24))

$$I_I(x, y) = I_0 + I_s^{(1)} \cos(\Phi^1(\vec{x}) - \alpha_I^1) + I_s^{(2)} \cos(\Phi^2(\vec{x}) - \alpha_I^2) + I_s^{(3)} \cos(\Phi^3(\vec{x}) - \alpha_I^3) \quad (49)$$

[0131] Für den Fall des Hexagons ergeben sich 7 Unbekannte Variablen $\left(l_0, l_s^{(1),(2),(3)}, \Phi^{(1),(2),(3)}(\vec{x})\right)$, daher werden 7 Phasenbilder für eine Auswertung benötigt. (N = 7) Analog zum Schachbrett kann man beim Hexagon schreiben:

$$\vec{k}_1 \circ \vec{\Delta} = \delta\Phi_1$$

$$\vec{k}_2 \circ \vec{\Delta} = \delta\Phi_2 = \kappa\delta\Phi_1$$

dann gilt nach (47) auch

$$\vec{k}_3 \circ \vec{\Delta} = \delta\Phi_3 = (1 + \kappa)\delta\Phi_1$$

, wobei ϕ_{Shift} eine beliebige Phasenverschiebung darstellt.

[0132] Einsetzen liefert

$$\begin{cases} \vec{k}_1 \circ \vec{\Delta} = \delta\Phi_1 \\ \vec{k}_2 \circ \vec{\Delta} = \kappa\delta\Phi_1 \end{cases}$$

\Leftrightarrow

$$\begin{cases} \frac{2\pi}{a}\Delta_y = \delta\Phi_1 \\ \frac{\pi}{a}\sqrt{3}\Delta_x - \frac{\pi}{a}\Delta_y = \kappa\delta\Phi_1 \end{cases}$$

\Leftrightarrow

$$\begin{cases} \Delta_x = \frac{a(2\kappa + 1)}{2\pi\sqrt{3}}\delta\Phi_1 \\ \Delta_y = \frac{a}{2\pi}\delta\Phi_1 \end{cases}$$

[0133] Obige Bedingungen lassen sich erreichen, falls man für den Winkel zwischen dem Verschiebevektor und der x-Achse einen Winkel von

$$\tan(\theta) = \frac{\Delta_y}{\Delta_x} \Rightarrow \theta = \arctan\left(\frac{\sqrt{3}}{(2\kappa + 1)}\right)$$

einstellt.

[0134] Für die Phasenverschiebungen $\alpha_{l,m}$ erhält man hier:

$$\alpha_{l,0} \equiv 0 \forall l \quad (50)$$

$$\alpha_{l,\pm 1} = \pm(l-1)\Delta \frac{2\pi}{a} \cos(\gamma) \quad (51)$$

$$\alpha_{l,\pm 2} = \pm(l-1)\kappa\Delta \frac{2\pi}{a} \cos(\gamma) \quad (52)$$

$$\alpha_{l,\pm 3} = \pm(l-1)(1+\kappa)\Delta \frac{2\pi}{a} \cos(\gamma) \quad (53)$$

, wobei γ den Winkel zwischen $\vec{\Delta}$ und \vec{k}_1 bezeichnet. Man wählt wieder $\Delta = \frac{a}{N \cos \gamma} = \frac{a}{7 \cos \gamma}$ und erhält

$$\alpha_{l,\pm 1} = \pm(l-1)\frac{2\pi}{7} \quad (54)$$

$$\alpha_{l,\pm 2} = \pm(l-1)\kappa \frac{2\pi}{7} \quad (55)$$

$$\alpha_{l,\pm 3} = \pm(l-1)(1+\kappa) \frac{2\pi}{7} \quad (56)$$

[0135] Genau wie beim Schachbrettverfahren, kann man auch hier zeigen, dass 2 mögliche Werte für κ zu einer unitären Matrix für \hat{A} führen:

$$\kappa_1 = 2 \quad (57)$$

$$\kappa_2 = 4 \quad (58)$$

[0136] Es sind also wieder 2 Orientierungswinkel zwischen dem Verschiebevektor und der x-Achse möglich, wobei aus analogen Überlegungen wie beim Schachbrett derjenige Winkel gewählt wird, für den sich der kleinere Wert für $\gamma = \theta - 90^\circ$ ergibt. $\left(\delta\kappa = \frac{1}{2}\sqrt{3}\left(1 + \tan^2(\gamma)\right) \right)$

$$\theta_1 = \arctan\left(\frac{\sqrt{3}}{5}\right) \approx 19.107^\circ \quad (59)$$

[0137] Der zweite (theoretisch) mögliche Winkel wäre $\theta_2 = \arctan\frac{\sqrt{3}}{9} \approx 10.893^\circ$.

[0138] Aufgrund der 60° Symmetrie des hexagonalen Musters und unter Berücksichtigung der negativen Frequenzrichtungen, sieht man, dass alle Winkel aus $\{n60^\circ \pm 19.107^\circ\} \in \mathbb{Z}$ möglich sind.

[0139] Der Winkel zwischen x- Achse und $\bar{\lambda}$ ist hier $\theta_1 - 90^\circ \approx -70.89^\circ$. Wählt man wie oben o.B.d.A. $\bar{\lambda}$ in Richtung der x- Achse, so muss das Hexagonmuster um 70.89° gedreht werden um es in die gewünschte Orientierung zu bringen.

[0140] Entsprechend den $\alpha_{l,m}$ aus (50) - (56) ergibt sich mit $\kappa_1 = 2$ für \hat{A} :

$$\hat{A} = \frac{1}{\sqrt{7}} \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & \exp\left(-i\frac{2\pi}{7}\right) & \exp\left(-i\frac{12\pi}{7}\right) & \exp\left(-i\frac{4\pi}{7}\right) & \exp\left(-i\frac{10\pi}{7}\right) & \exp\left(-i\frac{6\pi}{7}\right) & \exp\left(-i\frac{8\pi}{7}\right) \\ 1 & \exp\left(-i\frac{4\pi}{7}\right) & \exp\left(-i\frac{10\pi}{7}\right) & \exp\left(-i\frac{8\pi}{7}\right) & \exp\left(-i\frac{6\pi}{7}\right) & \exp\left(-i\frac{12\pi}{7}\right) & \exp\left(-i\frac{2\pi}{7}\right) \\ 1 & \exp\left(-i\frac{6\pi}{7}\right) & \exp\left(-i\frac{8\pi}{7}\right) & \exp\left(-i\frac{12\pi}{7}\right) & \exp\left(-i\frac{2\pi}{7}\right) & \exp\left(-i\frac{4\pi}{7}\right) & \exp\left(-i\frac{10\pi}{7}\right) \\ 1 & \exp\left(-i\frac{8\pi}{7}\right) & \exp\left(-i\frac{6\pi}{7}\right) & \exp\left(-i\frac{2\pi}{7}\right) & \exp\left(-i\frac{12\pi}{7}\right) & \exp\left(-i\frac{10\pi}{7}\right) & \exp\left(-i\frac{4\pi}{7}\right) \\ 1 & \exp\left(-i\frac{10\pi}{7}\right) & \exp\left(-i\frac{4\pi}{7}\right) & \exp\left(-i\frac{6\pi}{7}\right) & \exp\left(-i\frac{8\pi}{7}\right) & \exp\left(-i\frac{2\pi}{7}\right) & \exp\left(-i\frac{12\pi}{7}\right) \\ 1 & \exp\left(-i\frac{12\pi}{7}\right) & \exp\left(-i\frac{2\pi}{7}\right) & \exp\left(-i\frac{10\pi}{7}\right) & \exp\left(-i\frac{4\pi}{7}\right) & \exp\left(-i\frac{8\pi}{7}\right) & \exp\left(-i\frac{6\pi}{7}\right) \end{pmatrix}$$

[0141] Für die Lösungen ergibt sich konkret:

$$I_0 = I_1 + I_2 + I_3 + I_4 + I_5 + I_6 + I_7 \quad (60)$$

$$I_s^{(1)} = \left| I_1 + I_2 e^{i\frac{2\pi}{7}} + I_3 e^{i\frac{4\pi}{7}} + I_4 e^{i\frac{6\pi}{7}} + I_5 e^{i\frac{8\pi}{7}} + I_6 e^{i\frac{10\pi}{7}} + I_7 e^{i\frac{12\pi}{7}} \right| \quad (61)$$

$$I_s^{(2)} = \left| I_1 + I_2 e^{i\frac{4\pi}{7}} + I_3 e^{i\frac{8\pi}{7}} + I_4 e^{i\frac{12\pi}{7}} + I_5 e^{i\frac{2\pi}{7}} + I_6 e^{i\frac{6\pi}{7}} + I_7 e^{i\frac{10\pi}{7}} \right| \quad (62)$$

$$I_s^{(3)} = \left| I_1 + I_2 e^{i\frac{6\pi}{7}} + I_3 e^{i\frac{12\pi}{7}} + I_4 e^{i\frac{4\pi}{7}} + I_5 e^{i\frac{10\pi}{7}} + I_6 e^{i\frac{2\pi}{7}} + I_7 e^{i\frac{8\pi}{7}} \right| \quad (63)$$

$$\langle I_s^2 \rangle = \sqrt{(I_1 - I_4)^2 + (I_2 - I_5)^2 + (I_3 - I_6)^2 + (I_4 - I_7)^2 + (I_5 - I_1)^2 + (I_6 - I_2)^2 + (I_7 - I_3)^2} \quad (64)$$

[0142] Genau wie beim Schachbrett lassen sich beim Hexagon Fehler in der Orientierung durch Kalibration ermitteln und können ebenso in der Auswertung kompensiert werden. Aufgrund der Bedingung (47) ergibt sich beim Hexagon noch eine Möglichkeit einen Plausibilitätstest zu machen:

[0143] Für die Kalibration auf allen 3 Ordnungen muss (näherungsweise) immer gelten:

$$c_1 + c_2 = c_3$$

wobei mit c_k der gleiche Fitparameter wie in Gleichung (37) gemeint ist.

[0144] Somit ergibt sich z.B. für ein automatisiertes System immer die Möglichkeit festzustellen, ob eine bestimmte Kalibrationsaufnahme (oder auch Auswertung) sinngemäß oder fehlerhaft durchgeführt wurde.

[0145] Auch wenn beim Gitter nur 1 Beugungsordnung wie in Kapitel 1 enthalten ist, können mehr als 3 Phasenbilder zu einer Lösung verrechnet werden. Nimmt man N Phasenbilder, kann man N Frequenzordnungen voneinander lösen. Falls nur eine Ordnung enthalten ist, ergeben sich für die anderen Ordnungen als Lösung 0.

[0146] Das bedeutet andererseits, dass Gleichungen (33 - 35) auch auf das Gitter mit einer relativen Phasenverschiebung von $\frac{2\pi}{5}$ anwendbar sind. Dabei müssen dann 5 Bilder genommen werden. Die nichttrivialen Lösungen sind hier (33) und (34).

[0147] Genauso können Gleichungen (60) bis (63) sowohl auf ein Gitter- als auch auf ein Schachbrettartiges Muster angewendet werden, wenn als relative Phasenverschiebung zwischen den Phasenbildern gerade $\frac{2\pi}{7}$ gewählt wird und insgesamt 7 Phasenbilder genommen werden. Der Parameter κ sowie sein Fehler, lässt sich unabhängig vom verwendeten Muster formulieren:

$$\kappa = \cos(\theta_s) - \sin \theta_s \tan \gamma \quad (65)$$

$$\delta\kappa = \sin \theta_s (1 + \tan^2 \gamma) \delta\gamma \quad (66)$$

,wobei θ_s der Symmetriewinkel der Struktur

$$\theta_s = \begin{cases} 90^\circ & \text{beim Schachbrett} \\ 60^\circ & \text{beim Hexagon} \end{cases}$$

ist und γ wie oben der Winkel zwischen \vec{k}_1 und $\vec{\Delta}$.

2.3.1 Kontrast beim Hexagon

[0148] Im Gegensatz zu einem Strichgitter- oder Schachbrettmuster besitzt ein Hexagonales Muster einen Fill-Factor von $\frac{1}{3}$ (statt $\frac{1}{2}$).

[0149] Dies führt zwar einerseits zu einer verringerten Lichtmenge in der Probe, andererseits ergibt sich aufgrund des Fill-Factors für das Hexagon eine etwas andere Modulationstransferfunktion (gezeigt in Abbildung (11)).

$\tilde{\nu} = \frac{\lambda}{NA}$ ist die (auf die PSF-Halbwertsbreite) normalisierte Strukturfrequenz, die in jedem Fall zwischen 0 und 2 liegen muss. ($\tilde{\nu} = 2$ entspricht gerade der optischen cut-off-Frequenz) Für quasikonfokale Strukturierte Beleuchtung ist eine Strukturfrequenz von $\tilde{\nu} \approx 1$ besonders günstig, da das Bild der Struktur für diese Frequenz in z-Richtung eine minimale Halbwertsbreite aufweist. Für diese Frequenz ergibt sich für das Hexagon im inkohärenten Fall ein etwa 1.28 mal stärkerer Kontrast.

[0150] Im Kohärenten Fall ist der Effekt deutlich weniger stark ausgeprägt, jedoch können im Kohärenten Fall auch Phasensubstrate benutzt werden, die wiederum zu deutlich höheren Kontrasten führen.

2.4 Geometrische Interpretation

2.4.1 Schachbrett

[0151] Geht man von Gleichung (12) aus,

$$\alpha_{l,m} = (l-1)\vec{k}_m \circ \vec{\Delta} = (l-1)|\vec{k}_m|\Delta \cos(\theta_m)$$

sieht man, dass die Einträge von $\alpha_{l,m}$ (und damit auch die Einträge von \hat{A}) von der orthogonalen Projektion des Verschiebevektors $\vec{\Delta}$ auf den jeweiligen Frequenzvektor abhängen. Für den magischen Winkel beim Schachbrett ist gerade die orthogonale Projektion des Verschiebevektors auf den Frequenzvektor \vec{k}^+ gerade doppelt so groß, wie die orthogonale Projektion des Verschiebevektors auf \vec{k}^- (siehe Abbildung (12)) Würde man für den Orientierungswinkel θ z.B. 45° wählen, so wären beide Projektionen gleich lang, woraus für die $\alpha_{l,m}$ folgt, dass

$$\alpha_{l,\pm 1} = \alpha_{l,\pm 2}$$

$\forall l$, und die Matrix \hat{A} wäre damit singulär.

2.4.2 Hexagon

[0152] Für das Hexagon kennzeichnet der magische Winkel entsprechend diejenige eindeutig festgelegte Richtung für den Verschiebevektor, für die die orthogonale Projektion des Verschiebevektors auf \vec{k}_2 gerade 2 mal so groß ist wie die orthogonale Projektion auf \vec{k}_1 . Mit (47) folgt daraus, dass die orthogonale Projektion des Verschiebevektors auf \vec{k}_3 gerade 3 mal so groß ist, wie die orthogonale Projektion auf \vec{k}_1 (siehe Abbildung (13)).

2.5 Die weiteren magische Winkel

2.5.1 N=13

[0153] Durch kohärente Laseranregung kann der Fall eintreten, dass auch die 2. harmonischen Ordnungen des Hexagons im Bild rekombiniert werden. Neben den 3 ersten Ordnungen aus Gleichungen (44) - (46) mit dem Betrag $\frac{2\pi}{a}$, ergibt sich für 3 weitere Ordnungen mit der Frequenz $|\vec{k}| = \sqrt{3} \frac{2\pi}{a}$ entsprechend Gleichung (43):

$$\vec{k}_{1,-3} = \frac{\pi}{a}\sqrt{3}\begin{pmatrix} 1 \\ -\sqrt{3} \end{pmatrix} =: \vec{k}_4 \quad (67)$$

$$\vec{k}_{1,3} = \frac{\pi}{a}\sqrt{3}\begin{pmatrix} 1 \\ \sqrt{3} \end{pmatrix} =: \vec{k}_5 \quad (68)$$

$$\vec{k}_{2,0} = \frac{2\pi}{a}\sqrt{3}\begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix} =: \vec{k}_6 \quad (69)$$

[0154] Es gilt:

$$\vec{k}_4 = \vec{k}_2 - \vec{k}_1 \quad (70)$$

$$\vec{k}_5 = \vec{k}_1 + \vec{k}_3 \quad (71)$$

$$\vec{k}_6 = \vec{k}_2 + \vec{k}_3 = \vec{k}_4 + \vec{k}_5 \quad (72)$$

bzw.

$$\vec{k}_2 = \vec{k}_1 + \vec{k}_4 \quad (73)$$

$$\vec{k}_3 = 2\vec{k}_1 + \vec{k}_4 \quad (74)$$

$$\vec{k}_5 = 3\vec{k}_1 + \vec{k}_4 \quad (75)$$

$$\vec{k}_6 = 3\vec{k}_1 + 2\vec{k}_4 \quad (76)$$

[0155] Es werden insgesamt 6 Ordnungen rekombiniert, also sind $2 \cdot 6 + 1 = 13$ Messungen notwendig. Einer übersichtlicheren Formulierung willen, werden die Vektoren \vec{k}_1 und \vec{k}_4 als Basis betrachtet, anstatt \vec{k}_1 und \vec{k}_2 wie in Kapitel 2.3.

[0156] Analog zu vorherigen Lösungen betrachten wir wieder die Phasenverschiebungen $\alpha_{l,m}$ für \vec{k}_1 und \vec{k}_4 :

$$\alpha_{l,\pm 1} = (l-1) \underbrace{\Delta \frac{2\pi}{a} \cos(\theta_{\pm 1})}_{\pm \delta\Phi_1 = \pm \vec{k}_1 \circ \vec{\Delta}} \quad (77)$$

$$\alpha_{l,\pm 4} = (l-1) \underbrace{\Delta \frac{2\pi}{a} \cos(\theta_{\pm 1})}_{\kappa \cdot \delta\Phi_1 = \kappa \cdot (\pm \vec{k}_1) \circ \vec{\Delta} = \pm \vec{k}_4 \circ \vec{\Delta}} = \kappa \Delta \frac{2\pi}{a} \cos(\theta_{\pm 1}) \quad (78)$$

, wobei $\theta_{\pm 1}$ und $\theta_{\pm 4}$ gerade die Winkel zwischen $\vec{\Delta}$ und $\vec{k}_{\pm 1}$ bzw. $\vec{k}_{\pm 4}$ bezeichnen. Aus (73) - (76) erhält man:

$$\alpha_{l,\pm 2} = \pm (l-1) (\vec{k}_1 + \vec{k}_4) \circ \vec{\Delta} = \pm (l-1) (1 + \kappa) \cdot \delta\Phi_1 \quad (79)$$

$$\alpha_{l,\pm 3} = \pm (l-1) (2\vec{k}_1 + \vec{k}_4) \circ \vec{\Delta} = \pm (l-1) (2 + \kappa) \cdot \delta\Phi_1 \quad (80)$$

$$\alpha_{l,\pm 5} = \pm (l-1) (3\vec{k}_1 + \vec{k}_4) \circ \vec{\Delta} = \pm (l-1) (3 + \kappa) \cdot \delta\Phi_1 \quad (81)$$

$$\alpha_{l,\pm 6} = \pm (l-1) (3\vec{k}_1 + 2\vec{k}_4) \circ \vec{\Delta} = \pm (l-1) (3 + 2\kappa) \cdot \delta\Phi_1 \quad (82)$$

[0157] Gleichungen (77) - (78) führen geometrisch auf

$$\begin{cases} \frac{2\pi}{a} \Delta_y = \delta\Phi_1 \\ \frac{\pi}{a} (\Delta_x - \sqrt{3}\Delta_y) = \kappa \delta\Phi_1 \end{cases} \quad (83)$$

$$\Leftrightarrow \quad (84)$$

$$\begin{cases} \Delta_x = \frac{a}{2\pi\sqrt{3}} (3 + 2\kappa) \delta\Phi_1 \\ \Delta_y = \frac{a}{2\pi} \delta\Phi_1 \end{cases} \quad (85)$$

$$\Leftrightarrow \quad (86)$$

$$\tan \theta = \frac{\Delta_y}{\Delta_x} = \frac{\sqrt{3}}{3+2\kappa} \quad (87)$$

[0158] Wie oben gibt es wieder 2 mögliche Werte für κ und letztlich für \hat{A} eine unitäre Matrix zu erhalten:

$$\kappa_1 = 2 \quad (88)$$

$$\kappa_2 = 8 \quad (89)$$

[0159] Somit ist

$$\theta_1 = \arctan\left(\frac{\sqrt{3}}{7}\right) \approx 13.898^\circ \quad (90)$$

und $\theta_2 = \arctan\frac{\sqrt{3}}{19} \approx 5.20^\circ$. Für die zugehörigen Winkel $\gamma_1 = \theta_1 - 90^\circ$ zwischen $\vec{\Delta}$ und \vec{k}_1 ergibt sich $\gamma_1 \approx -76.102^\circ$ und $\gamma_2 \approx -84.8^\circ$.

[0160] Für $\kappa_1 = 2$ erhält man für $\alpha_{l,m}$ insgesamt

$$\alpha_{l,m} = \frac{2\pi}{\underbrace{13}_{\delta\Phi_0}} \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 12 & 3 & 10 & 4 & 9 & 2 & 11 & 5 & 8 & 7 & 6 \\ 0 & 2 & 11 & 6 & 7 & 8 & 5 & 4 & 9 & 10 & 3 & 1 & 12 \\ 0 & 3 & 10 & 9 & 4 & 12 & 1 & 6 & 7 & 2 & 11 & 8 & 5 \\ 0 & 4 & 9 & 12 & 1 & 3 & 10 & 8 & 5 & 7 & 6 & 2 & 11 \\ 0 & 5 & 8 & 2 & 11 & 7 & 6 & 10 & 3 & 12 & 1 & 9 & 4 \\ 0 & 6 & 7 & 5 & 8 & 11 & 2 & 12 & 1 & 4 & 9 & 3 & 10 \\ 0 & 7 & 6 & 8 & 5 & 2 & 11 & 1 & 12 & 9 & 4 & 10 & 3 \\ 0 & 8 & 5 & 11 & 2 & 6 & 7 & 3 & 10 & 1 & 12 & 4 & 9 \\ 0 & 9 & 4 & 1 & 12 & 10 & 3 & 5 & 8 & 6 & 7 & 11 & 2 \\ 0 & 10 & 3 & 4 & 9 & 1 & 12 & 7 & 6 & 11 & 2 & 5 & 8 \\ 0 & 11 & 2 & 7 & 6 & 5 & 8 & 9 & 4 & 3 & 10 & 12 & 1 \\ 0 & 12 & 1 & 10 & 3 & 9 & 4 & 11 & 2 & 8 & 5 & 6 & 7 \end{pmatrix} \quad (91)$$

und dementsprechend ist $\hat{A}_{l,m} = \exp(-i\alpha_{l,m})$ in diesem Fall wieder eine unitäre Matrix.

[0161] Durch eine Orientierung des Hexagonmusters entsprechend dem Winkel θ und Aufnahme von 13 Phasenbildern mit einer Phasenverschiebung von $\frac{2\pi}{13}$ von einem zum nächsten Bild, lassen sich sowohl die ersten als auch die 2. Ordnungen des Hexagons voneinander trennen. Diese Betrachtungen sind hauptsächlich für den kohärenten Fall relevant. In diesem Fall ergibt sich aus der Kohärenz der periodisch strukturierten Anregung eine verschmälerte PSF in axialer Richtung, wie in Abbildung (14) gezeigt. Bei partiell kohärentem Licht (wie man es z.B. durch eine Kohärenz-Blende) leicht erzeugen kann, ergibt sich in ähnlicher Weise ein verschmälertes (Struktur-) Fokus in z-Richtung. Für eine partielle Ausleuchtung des Mikroskopobjektivs ergibt sich eine partielle Kohärenz, wie in Abbildung (15) dargestellt. Die Verschmälerung des Fokus bei Verwendung von kohärenterem Licht findet nur dann statt, falls die verwendete Strukturfrequenz $\tilde{\nu}$ größer als ca. 0.7 ist. Das Minimum der PSF-Halberwertsbreiten in z-Richtung liegt immer bei $\tilde{\nu} = 1$ (unabhängig vom Kohärenzgrad).

2.5.2 N=19

[0162] Betrachtet man auch noch die Frequenzvektoren mit $|\vec{k}| = 2 * \frac{2\pi}{a}$

$$\vec{k}_7 := \vec{k}_{0,4} = 2\vec{k}_1 \quad (92)$$

$$\vec{k}_8 := \vec{k}_{2,-2} = 2\vec{k}_2 \quad (93)$$

$$\vec{k}_9 := \vec{k}_{2,2} = 2\vec{k}_3 \quad (94)$$

, sieht man, dass insgesamt 19 Phasenbilder für eine Lösung notwendig sind (mit einer relativen Phasenverschiebung von $\frac{2\pi}{19}$).

[0163] Analog zu den obigen Verfahren gelingt es auch hier eine unitäre Matrix zu konstruieren.

[0164] Als mögliche Werte für κ erhält man

$$\kappa_1 = 6 \quad (95)$$

$$\kappa_2 = 10 \quad (96)$$

[0165] Aus Gleichung (87), folgen die zugehörigen Werte für θ :

$$\theta_1 = 6.59^\circ \quad (97)$$

$$\theta_2 = 4.31^\circ \quad (98)$$

2.5.3 weitere Lösungen

[0166] Für die Anwendung nichtlinearer Superresolution mit Strukturierter Beleuchtung, wäre es unter Umständen notwendig auch noch höhere Ordnungen des Hexagons (bei einer entsprechenden Anzahl an genommenen Phasenbildern) in der Rechnung zu berücksichtigen. Bis zu einem Wert von $N=43$ wurden unitäre Matrizen und damit optimale theoretische Lösungen gefunden.

Tabelle 1: Zusammenfassung aller möglichen Lösungen für das Hexaogon mit zugehörigen Werten für N und den jeweiligen magischen Winkeln

n	1	2	3	4	5	6
N	7	13	19	31	37	43
κ_1	1	2	6	4	9	5
κ_2	5	8	10	24	25	35
$ \vec{k} / \frac{2\pi}{a}$	1	$\sqrt{3}$	2	$\sqrt{7}$	3	$2\sqrt{3}$
$\theta_1 [^\circ]$	19.11	13.90	6.59	8.95	4.72	7.59
$\theta_2 [^\circ]$	7.59	5.21	4.31	1.95	1.87	1.36

3 Zum Noise

[0167] Wie bereits im Teil (2.1) angedeutet, ist der mittlere Fehler (bzw. genauer der Mittelwert der Varianz des Fehlers) bei einer Auswertung mit einer unitären Matrix

$$\hat{A}_{m,l} := \frac{1}{\sqrt{N}} e^{-i \frac{2\pi}{N} ml}$$

invariant:

$$\langle |\delta I_s^{(m)}|^2 \rangle = \left\langle \sum_{l,n} \hat{A}_{m,l}^{-1} \delta I_l \underbrace{(\hat{A}_{m,n}^*)^{-1}}_{\hat{A}_{n,m}} \delta I_n \right\rangle = \quad (99)$$

$$= \frac{1}{N} \left\langle \sum_{l,n} e^{i \frac{2\pi}{N} m(l-n)} \delta I_l \delta I_n \right\rangle = \frac{1}{N} N \langle \delta(I_l)^2 \rangle = \quad (100)$$

$$= \langle |\delta I_l|^2 \rangle \quad (101)$$

[0168] Um Gleichung (100) einzusehen, kann man sich überlegen, dass die Summe auf der Linken Seite im Mittel nur Beiträge mit $l = n$ liefern wird, da die Messfehler auf verschiedenen Rohbildern nicht korreliert sind.

[0169] Vergleicht man mit Gleichung (10), so sieht man, dass eine bestimmte Modulation im Rohbild, bei dieser Wahl von \hat{A} um einen Faktor \sqrt{N} verstärkt wird:

$$\hat{A}^{-1} \begin{pmatrix} I_1(\vec{x}) \\ I_2(\vec{x}) \\ \vdots \\ I_M(\vec{x}) \end{pmatrix} = \sqrt{N} \begin{pmatrix} I_0(\vec{x}) \\ \frac{1}{2} I_s^{(1)}(\vec{x}) e^{-i\Phi_1(\vec{x})} \\ \frac{1}{2} I_s^{(-1)}(\vec{x}) e^{+i\Phi_1(\vec{x})} \\ \frac{1}{2} I_s^{(2)}(\vec{x}) e^{+i\Phi_2(\vec{x})} \\ \vdots \\ \frac{1}{2} I_s^{(-n)}(\vec{x}) e^{+i\Phi_n(\vec{x})} \end{pmatrix} \quad (102)$$

[0170] Für den relativen Fehler in der Auswertung ergibt sich daher

$$\frac{\langle |\delta I_s^{(m)}| \rangle}{I_s^{(m)}} = \frac{1}{\sqrt{N}} \frac{|\delta I_l|}{I_{\text{in-focus}}} \quad (103)$$

[0171] Will man noch evtl. Orientierungsfehler des Musters berücksichtigen, so geht auch noch die Konditionszahl der Matrix mit in den Fehler ein

$$\frac{\langle |\delta I_s^{(m)}| \rangle}{I_s^{(m)}} = \text{cond}(\hat{A}) \frac{1}{\sqrt{N}} \frac{|\delta I_l|}{I_{\text{in-focus}}}$$

[0172] Nimmt man an, dass der Eingangsfehler $|\delta I_l|$ Poisson-verteilt ist, so erhält man insgesamt für den relativen Fehler in der Auswertung:

$$\frac{\langle |\delta I_s^{(m)}| \rangle}{I_s^{(m)}} = \text{cond}(\hat{A}) \sqrt{\frac{\gamma}{N K \Phi_{\text{in-focus}} \tau}} \quad (104)$$

[0173] Hierbei ist γ der Detektor-gain, K der erreichte Kontrast der Struktur in der Probe (abhängig vom detektierten out-of-focus Anteil), $\Phi_{\text{in-focus}}$ die pro Zeiteinheit emittierten Photonen aus dem In-focus und τ die gesamte Belichtungszeit für ein Rohbild.

[0174] Man sieht, dass die Anzahl der verrechneten Rohbilder keinen Einfluss auf die Dauer einer Aquisition hat. Vergleicht man die Fehler zweier beliebiger Verfahren, die verschiedene Werte N_1 und N_2 ($N_2 > N_1$) für

die Auswertung benutzen, so sieht man dass das Verfahren mit N_2 Bildern bei einer Wahl von $\tau_2 = \tau_1 \frac{N_1}{N_2}$ den gleichen relativen Auswertungsfehler hat wie das Verfahren, welches nur N_1 Bilder verrechnet.

[0175] Für die Geschwindigkeit der Aquisition ist die Anzahl der genommenen Phasenbilder also nicht direkt entscheidend. Es ist allerdings darauf zu achten, dass

- der Wert für N keinesfalls so groß eingestellt wird, dass sich die Signalstärke auf einem einzelnen Phasenbild dem Read-Noise der Kamera nähert.
- die Kamera noch in der Lage ist, innerhalb von τ ein komplettes Bild auszulesen.

[0176] Für die in Teil (2.2) und (2.3) beschriebenen Verfahren mit Schachbrett und Hexagon, ergeben sich für jede Auswertung im Falle des Schachbretts 2, für das Hexagon 3 unabhängige Sections bzw. quasi-konfokale Bilder.

zum Vergleich: Bei Verwendung eines Gitters und Auswertung von z.B. 7 Rohbildern, erhält man ein quasikonfokales Bild das einen um $\sqrt{\frac{3}{7}}$ kleineren Fehler als wenn man 3 Rohbilder mit der gleichen Belichtungszeit verrechnet hätte. Allerdings erhält man bei Anwendung der Gleichungen (60) - (63) nur eine Lösung für (60) (ein nicht-konfokales Bild) und (61) (ein quasi-konfokales Bild). Die Anderen Lösungen liefern (falls nur die 1. Ordnung im Bild des Gitters enthalten sind) 0 bzw. einen mittleren Fehler

[0177] Durch Mittelung über mehrere Sections beim Schachbrett bzw. Hexagon wird der relative Fehler nochmals reduziert:

$$\frac{\langle |\delta I_s^{(m)}| \rangle}{I_s^{(m)}} = \begin{cases} \text{cond}(\hat{A}) \sqrt{\frac{\gamma}{2NK\Phi_{\text{in-focus}}\tau}} & \text{Schachbrett} \\ \text{cond}(\hat{A}) \sqrt{\frac{\gamma}{3NK\Phi_{\text{in-focus}}\tau}} & \text{Hexagon} \end{cases} \quad (105)$$

[0178] Berücksichtigt man noch, dass für das Hexagon aufgrund des Filling-Factors bis zu 1.28 mal stärkere Kontrastwerte erreicht werden können, (vgl. Kapitel (2.3.1)) so ergibt sich speziell für das Hexagon

$$\frac{\langle |\delta I_s^{(m)}| \rangle}{I_s^{(m)}} \approx \text{cond}(\hat{A}) \sqrt{\frac{\gamma}{4.91NK\Phi_{\text{in-focus}}\tau}} \approx \frac{1}{2.2} \text{cond}(\hat{A}) \sqrt{\frac{\gamma}{NK\Phi_{\text{in-focus}}\tau}} \quad (106)$$

ein bis zu 2 mal kleineren Fehler. Theoretisch sollte also eine quasikonfokale Strukturierte Beleuchtung mit Hexagon im Vergleich zum Strichgitter bei einem viertel der Belichtungszeit das gleiche Signal-zu-Noise in der Auswertung liefern.

Patentansprüche

1. Mikroskopvorrichtung mit einem Objektiv (22), einer Lichtquelle (10) zum Beleuchten einer Probe (24) über einen Beleuchtungsstrahlengang (12), einer Anordnung (14, 18, 22, 50) zum Erzeugen eines flächigen, in zwei Raumrichtungen strukturierten Beleuchtungsmusters (32) auf der Probe, einem Flächen-Detektor (28) zum Erfassen von über einen Bildstrahlengang (34) von der Probe kommendem Licht, einer Anordnung (16) zum Verschieben des Beleuchtungsmusters auf der Probe in einer Verschieberichtung, sowie einer Steuereinheit (36), die ausgebildet ist, um in unterschiedlichen Positionen des Musters entlang der Verschieberichtung (42) jeweils ein Bild des vom Detektor erfassten Lichts als Phasenbild aufzunehmen und aus diesen Phasenbildern ein Gesamtbild des strukturiert beleuchteten Probenbereichs rechnerisch zu rekonstruieren, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Verschieberichtung schräg zu den Hauptsymmetrieachsen (40, 40', 40'', 140, 140') des Beleuchtungsmusters (32) steht und in Abhängigkeit vom Beleuchtungsmuster so gewählt wird, dass die Zahl der für die Rekonstruktion des Gesamtbilds erforderlichen Phasenbilder dem für die Anzahl der bei der rechnerischen Rekonstruktion verwendeten Fourierordnungen des Beleuchtungsmusters theoretisch minimal erforderlichen Wert entspricht.

2. Mikroskopvorrichtung gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Beleuchtungsmuster (32) ein hexagonales Punktmuster ist und die Verschieberichtung (42) im Bereich von 1 bis 20 Grad relativ zu einer (40) der drei Hauptsymmetrieachsen (40, 40', 40'') gewählt ist, wobei mindestens 7 Phasenbilder aufzunehmen sind.

3. Mikroskopvorrichtung gemäß Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Verschieberichtung (42) im Bereich von 4 bis 20 Grad, vorzugsweise 13 bis 20 Grad, relativ zu einer (40) der drei Hauptsymmetrieachsen (40, 40', 40'') gewählt ist.

4. Mikroskopvorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Anordnung (14, 18, 22) zum Erzeugen des Beleuchtungsmusters ausgebildet ist, um für jedes Phasenbild alle Bereiche der zu beleuchtenden Probenfläche gleichzeitig mit dem Beleuchtungsmuster (32) zu beleuchten.

5. Mikroskopvorrichtung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Anordnung (14, 18, 22, 50) zum Erzeugen des Beleuchtungsmusters (32) ausgebildet ist, um für jedes Phasenbild das Beleuchtungsmuster in Teilbereichen (132) der zu beleuchtenden Probenfläche sequentiell auf- und wieder abzubauen, wobei die Teilbereiche insgesamt die zu beleuchtende Probenfläche abdecken, so dass die zu beleuchtende Probenfläche nicht simultan sondern sequentiell partiell mit dem Beleuchtungsmuster beleuchtet wird, wobei die Steuereinheit (36) ausgebildet ist, den Detektor (28) so zu steuern, dass jeweils nur der Detektorbereich (137) aktiv ist, auf welchen der gerade beleuchtete Teilbereich der Probenfläche abgebildet wird.

6. Mikroskopvorrichtung gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Anordnung zum Erzeugen des Beleuchtungsmusters ausgebildet ist, um für jedes Phasenbild das Beleuchtungsmuster in Teilbereichen (132) der zu beleuchtenden Probenfläche in Form eines in einer Richtung wandernden Streifens sequentiell auf- und wieder abzubauen, wobei die Teilbereiche insgesamt die zu beleuchtenden Probenfläche abdecken, so dass die zu beleuchtende Probenfläche nicht simultan sondern sequentiell partiell mit dem Beleuchtungsmuster beleuchtet wird, und wobei die Steuereinheit ausgebildet ist, den Detektor so zu steuern, dass jeweils nur der Detektorbereich (137) aktiv ist, auf welchen der gerade beleuchtete Teilbereich der Probenfläche abgebildet wird.

7. Mikroskopvorrichtung gemäß Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Breite des Streifens (132) so gewählt ist, dass der damit beleuchtete Probenbereich auf mindestens drei Detektorzeilen (137) abgebildet wird.

8. Mikroskopvorrichtung gemäß einem der Ansprüche 6 und 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Streifen (132) nur in Längsrichtung strukturiert ist

9. Mikroskopvorrichtung gemäß einem der Ansprüche 6 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Streifen (132) in der Querrichtung beugungsbegrenzt ist.

10. Mikroskopvorrichtung gemäß einem der Ansprüche 6 bis 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Anordnung (14, 18, 22, 50, 114) zum Erzeugen des Beleuchtungsmusters ausgebildet ist, um den Streifen (132) nur in Richtung quer zum Streifen wandern zu lassen.

11. Mikroskopvorrichtung gemäß einem der Ansprüche 6 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Anordnung (18, 22, 50, 114) zum Erzeugen des strukturierten Beleuchtungsmusters (32) ein Zylinderlinse-Array (114) aufweist, wobei die Richtung des wandernden Streifens (112) parallel zur axialen Richtung der Zylinderlinsen ist.

12. Mikroskopvorrichtung gemäß einem der Ansprüche 6 bis 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass sich die Abbildung des Streifens (132) auf dem Detektor (28) in Längsrichtung des Streifens nur über einen Teilbereich der Detektorfläche erstreckt, wobei die Anordnung (14, 18, 22, 50, 114) zum Erzeugen des Beleuchtungsmusters ausgebildet ist, um den Streifen beim Aufbau des Musters nicht nur in Richtung quer zum Streifen sondern auch in Richtung längs zum Streifen wandern zu lassen, um beim Auf- und Abbauen des Beleuchtungsmusters einer gekrümmten Trajektorie entsprechend einer Probenstruktur zu folgen.

13. Mikroskopvorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche 6 bis 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Verschieberichtung des Beleuchtungsmusters (32) eine Komponente in Längsrichtung des Streifens (132) enthält.

14. Mikroskopvorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Anordnung (14, 18, 22, 50, 114) zum Erzeugen des strukturierten Beleuchtungsmusters (32) ausgebildet ist, um das Beleuchtungsmuster in der Objektebene oder einer zur Objektebene konjugierten Ebene (30) zu erzeugen.

15. Mikroskopvorrichtung gemäß Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Anordnung zum Erzeugen des strukturierten Beleuchtungsmusters ausgebildet ist, um das Beleuchtungsmuster mittels interferierender Fokuspunkte von kohärentem Beleuchtungslicht in der Objektivpupille zu erzeugen.

16. Mikroskopvorrichtung gemäß Anspruch 15, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Anordnung zum Verschieben des Beleuchtungsmusters auf der Probe (24) ausgebildet ist, um eine relative Phasenverschiebung der Amplituden der Fokuspunkte in der Objektivpupille zu bewirken, um das Beleuchtungsmuster (32) auf der Probe zu verschieben.

17. Mikroskopvorrichtung gemäß Anspruch 16, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Anordnung zum Verschieben des Beleuchtungsmusters auf der Probe (24) einen galvanometrischen Scanner in oder nahe der Pupille, einen akusto-optischen Modulator oder ein Interferometer mit einer Kombination aus Piezo-Aktuator und Spiegel in einem Arm des Interferometers aufweist, um die relative Phasenverschiebung der Fokuspunkte in der Objektivpupille zu bewirken.

18. Mikroskopvorrichtung gemäß Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Anordnung (14, 18, 22, 50, 114) zum Erzeugen des strukturierten Beleuchtungsmusters ein Element (14, 114) zum Erzeugen eines Punktmusters in einer Zwischenbildebene (30) aufweist.

19. Mikroskopvorrichtung gemäß Anspruch 18, **dadurch gekennzeichnet**, dass es sich bei dem Element zum Erzeugen des Punktmusters in der Zwischenbildebene um eine in der Zwischenbildebene angeordnete Lochmaske handelt.

20. Mikroskopvorrichtung gemäß Anspruch 18, **dadurch gekennzeichnet**, dass es sich bei dem Element zum Erzeugen des Punktmusters in der Zwischenbildebene (30) um ein Mikrolinsen-Array (14, 114) handelt, das zwischen der Lichtquelle (10) und der Zwischenbildebene angeordnet ist, um Fokuspunkte der Beleuchtungslichts in der Zwischenbildebene zu erzeugen.

21. Mikroskopvorrichtung gemäß Anspruch 4 und einem der Ansprüche 18 bis 20, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Anordnung zum Verschieben des Beleuchtungsmusters auf der Probe ein Strahlablenkelement (16) in einem Nicht-Unendlichraum zwischen der Zwischenbildebene (30) und einer ersten Tubuslinse (18) aufweist.

22. Mikroskopvorrichtung gemäß Anspruch 21, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Strahlablenkelement (16) als motorisierter Umlenkspiegel oder als drehbares Glasfenster ausgebildet ist.

23. Mikroskopvorrichtung gemäß Anspruch 5 oder 6 und einem der Ansprüche 18 bis 20, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Anordnung zum Erzeugen des Beleuchtungsmusters eine Scanvorrichtung (50) mit einer Scan-Linse (52) aufweist, um Beleuchtungslicht über das Element (14, 114) zum Erzeugen des Punktmusters in der Zwischenbildebene (30) zu bewegen, um das Beleuchtungsmuster (32) sequentiell auf- und wieder abzubauen.

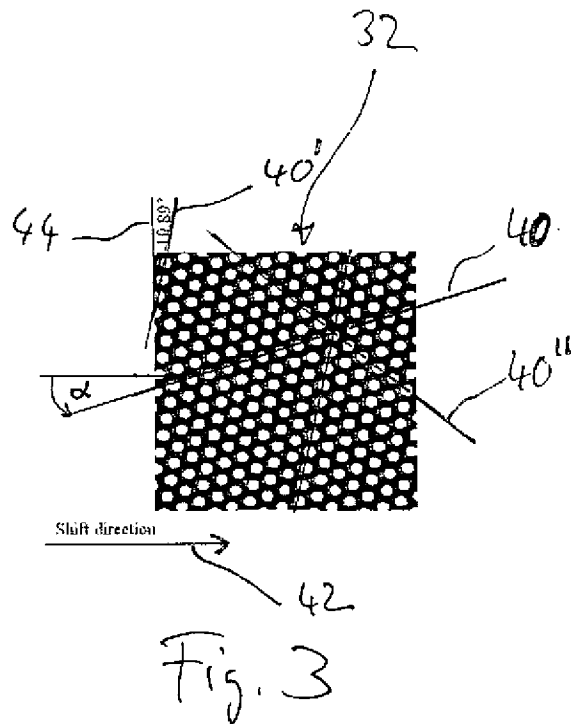
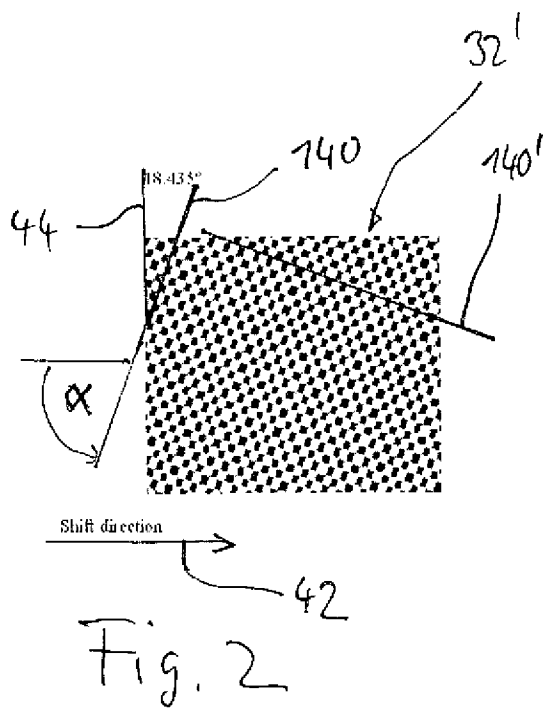
24. Mikroskopvorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Mikroskopvorrichtung so ausgebildet ist, dass der Flächen-Detektor (28) in einer zur Zwischenbildebene (30) mit dem Punktmuster absolut symmetrischen Ebene angeordnet ist.

25. Mikroskopvorrichtung gemäß Anspruch 24, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Zwischenbildebene (30) mittels einer oder der ersten Tubuslinse (18) und des Objektivs (22) auf die Probe (24) abgebildet wird, und die Probe mittels des Objektivs und einer zur ersten Tubuslinse gleichartigen zweiten Tubuslinse (26) auf den Flächen-Detektor (28) abgebildet wird, wobei der Beleuchtungsstrahlengang (12) vom Bildstrahlengang (34) mittels eines Farbteilers (20) getrennt ist.

26. Mikroskopvorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Mikroskopvorrichtung für die Erfassung einer Zweiphotonen-Anregung der Probe ausgebildet ist.

Es folgen 10 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



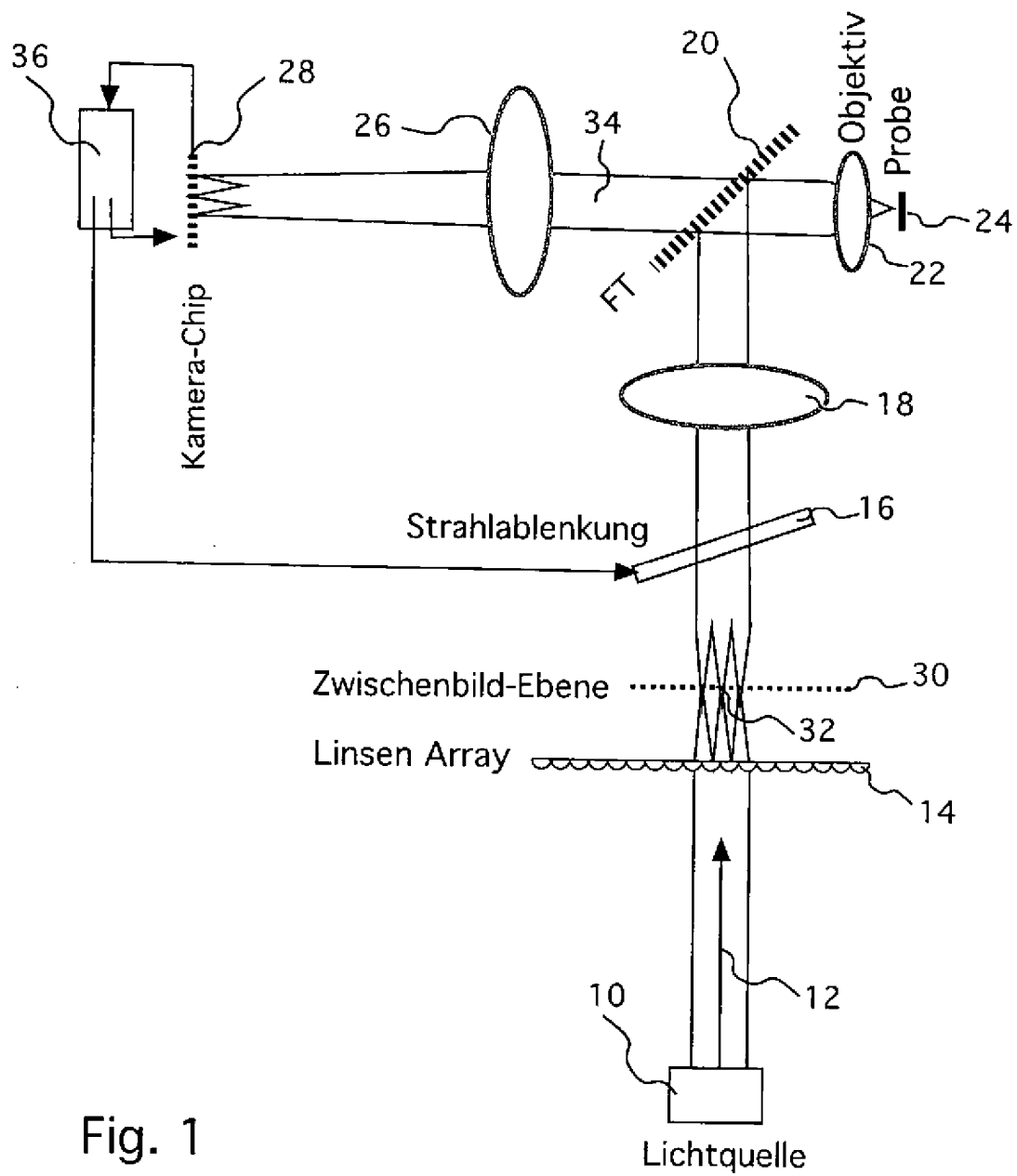
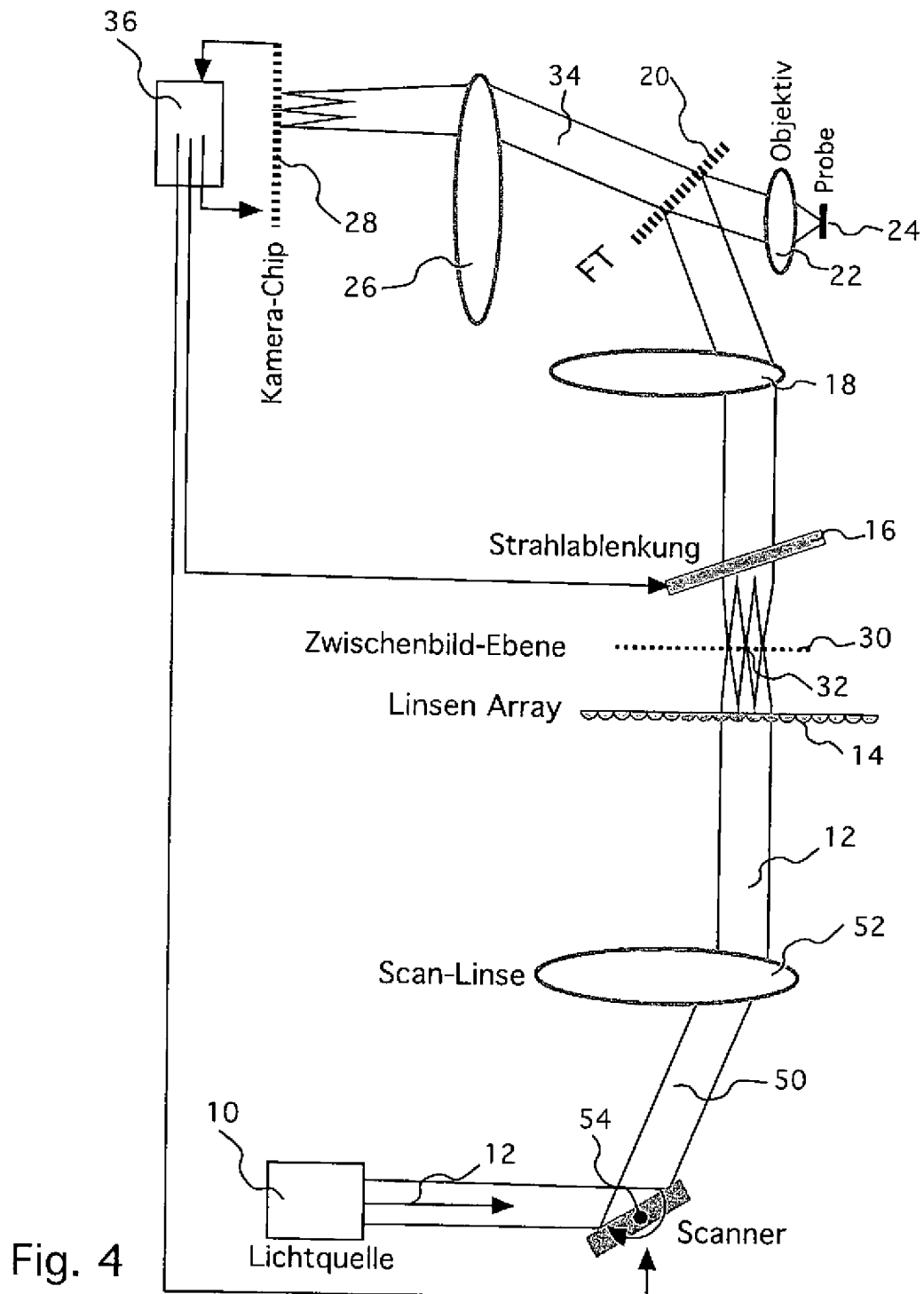


Fig. 1



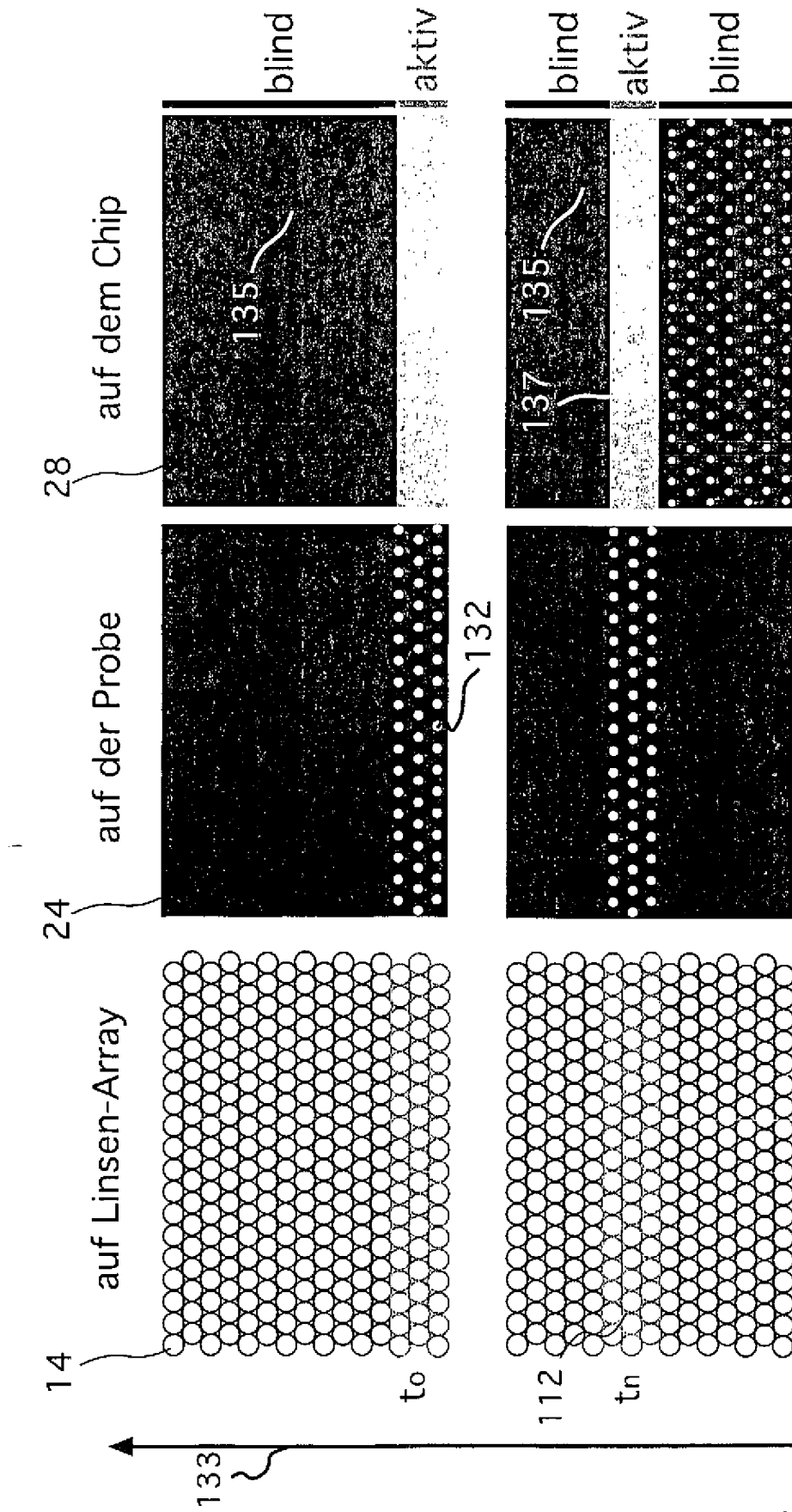


Fig. 5

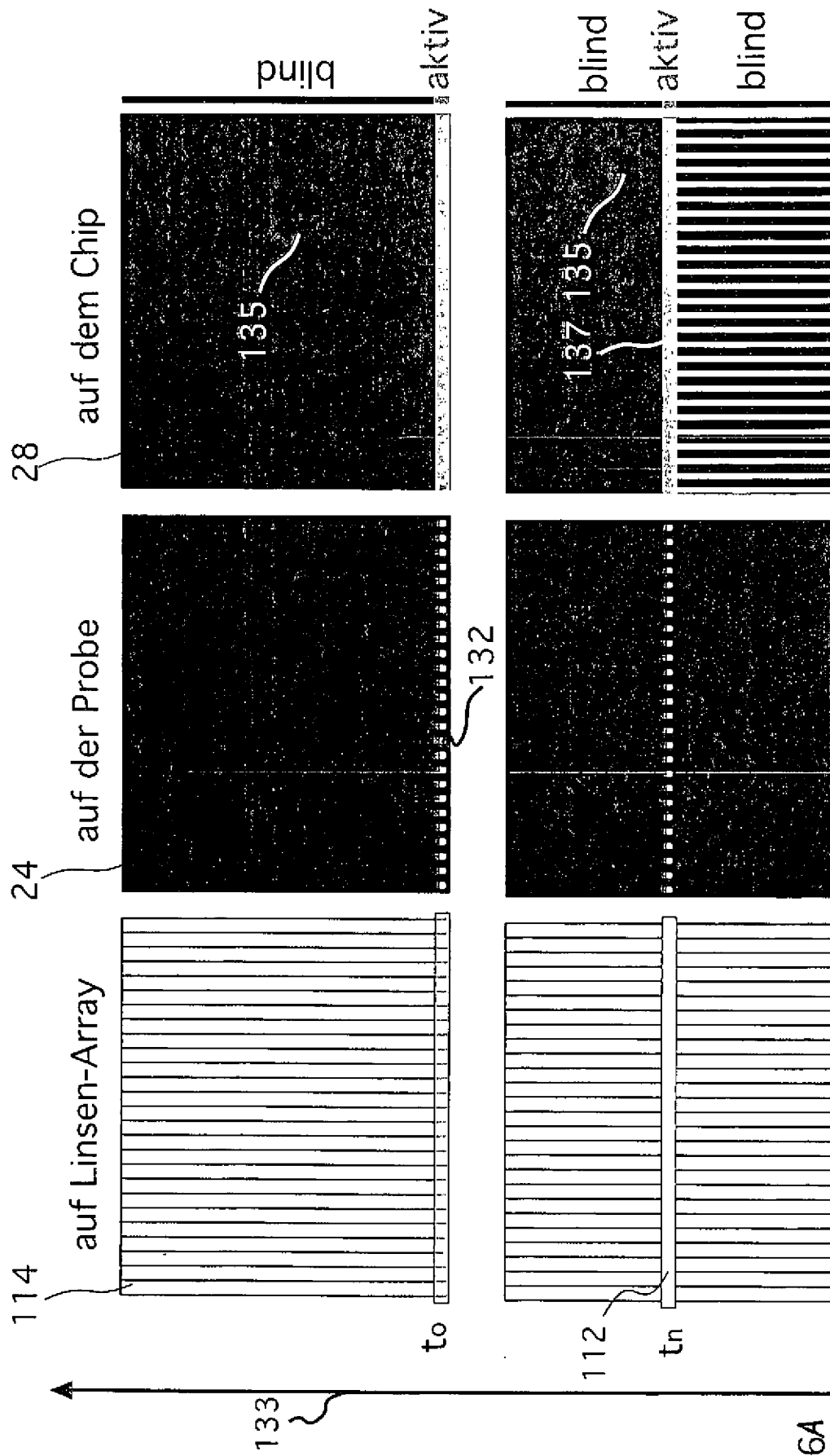


Fig. 6A

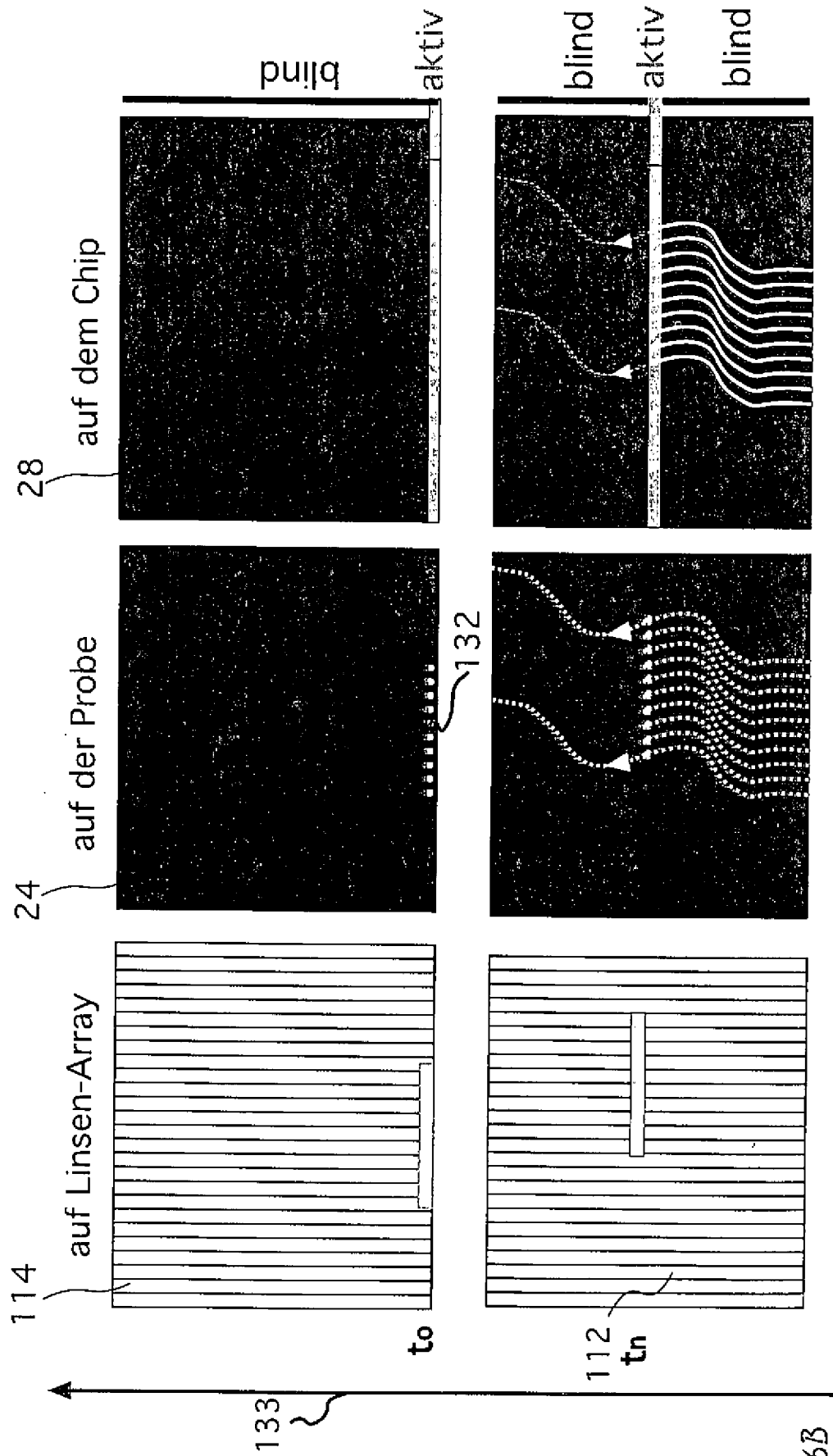


Fig. 6B

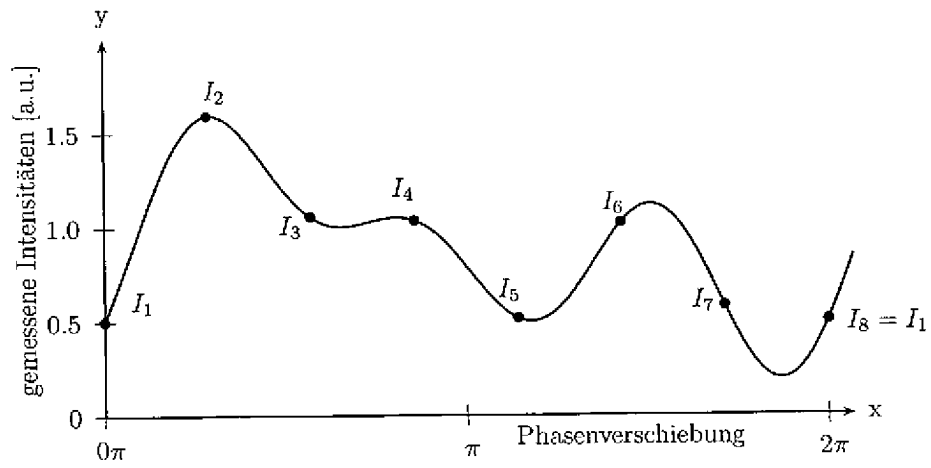


Fig. 7

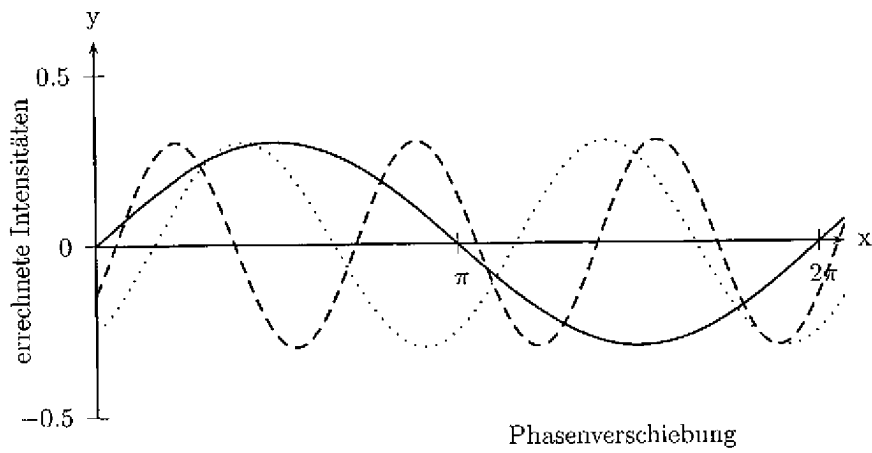


Fig. 8

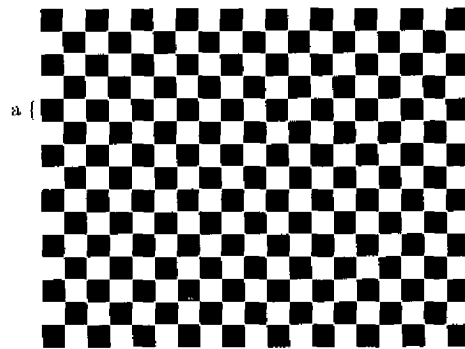


Fig. 9

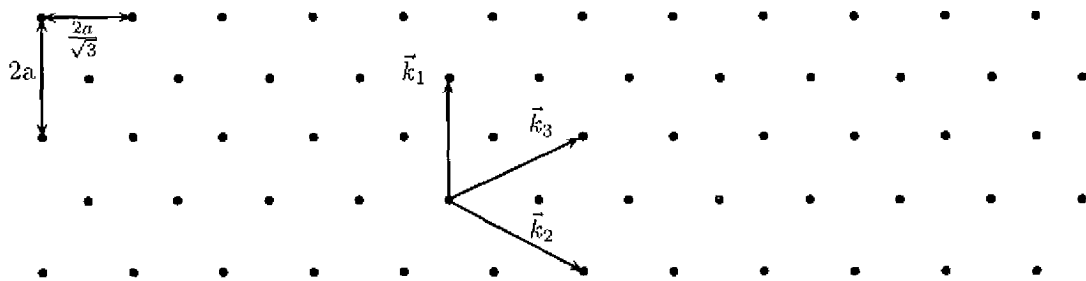


Fig. 10

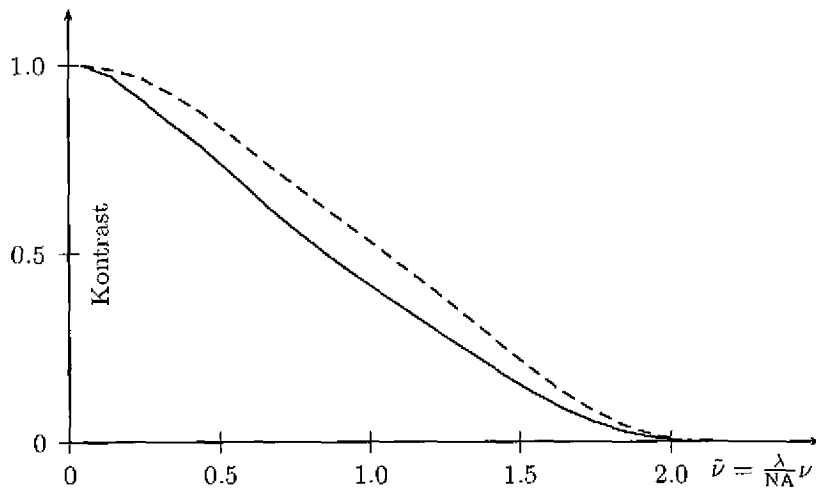


Fig. 11

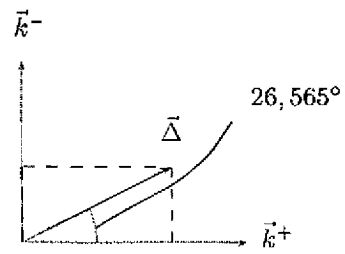


Fig. 12

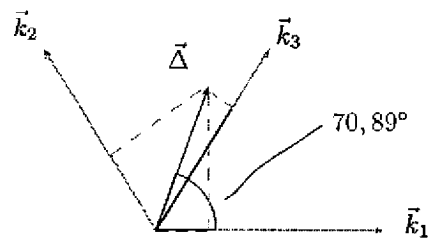


Fig. 13

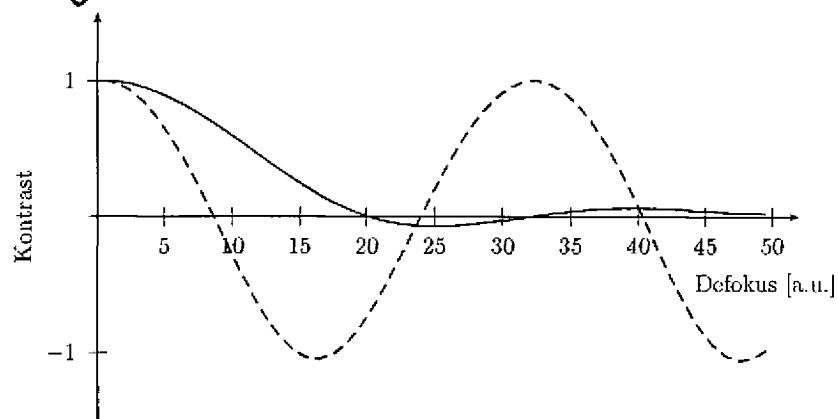


Fig. 14

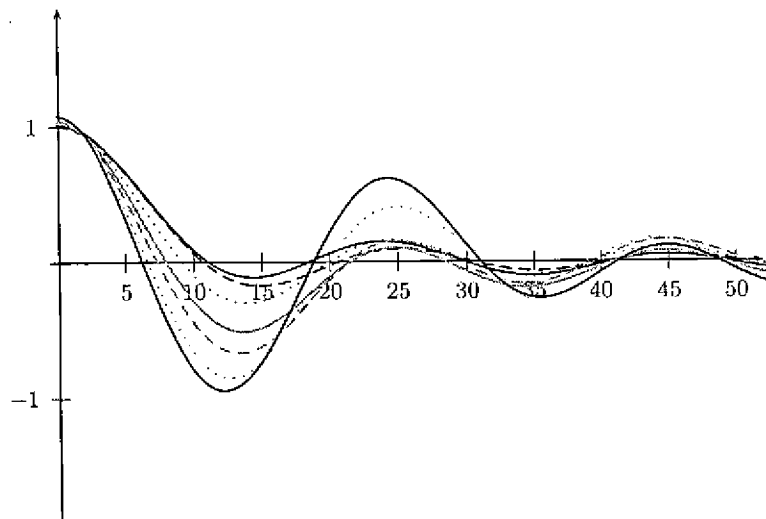


Fig. 15