



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2008 009 216 A1** 2009.08.20

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2008 009 216.9**

(22) Anmeldetag: **13.02.2008**

(43) Offenlegungstag: **20.08.2009**

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

(71) Anmelder:

Carl Zeiss Microlmaging GmbH, 07745 Jena, DE

(72) Erfinder:

Wolleschensky, Ralf, 07743 Jena, DE; Lippert, Helmut, Dr., 07743 Jena, DE; Power, Christopher, 07743 Jena, DE; Radt, Benno, Dr., 07743 Jena, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

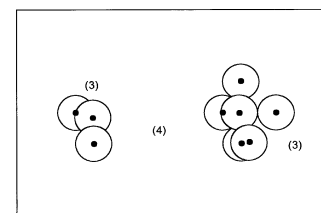
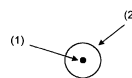
(54) Bezeichnung: **Vorrichtung und Verfahren zum räumlich hochauflösenden Abbilden einer Struktur einer Probe**

(57) Zusammenfassung: Vorrichtung und Verfahren zum räumlich hochauflösenden Abbildung einer Struktur einer Probe, insbesondere ein Mikroskop, charakterisiert durch ein beugungsbegrenztes Auflösungsvolumen, mit mehreren zwischen unterschiedlichen Zuständen umschaltbaren Farbstoffmolekülen (UF), wobei zumindest ein Zustand fluoreszierend ist, die Fluoreszenz mit einem Objektiv (O) gesammelt und mit einem optischen System auf einen ortsauflösenden Detektor abgebildet wird, wobei die UF in mindestens einem Teil der Probe eine Verteilungsdichte aufweisen, die größer ist als das Inverse des beugungsbegrenzten Auflösungsvolumens, eine oder mehrere Lichtquellen zur Aussendung einer Umschaltstrahlung, um eine erste Untermenge der UF in der Probe umzuschalten, und zur Aussendung einer Anregungsstrahlung, um die erste Untermenge der UF anzuregen, wobei

mindestens eine der Lichtquellen derart angeordnet ist, dass sie die Probe durchstrahlt

und eine Umschaltung und/oder Fluoreszenzanregung der UF in der Probe zumindest in einer Richtung annähernd senkrecht zur optischen Achse und insbesondere im Fokus des Objektivs (O) erfolgt, wobei vorteilhaft die Umschaltung eine Photoaktivierung oder -deaktivierung der UF ist und

die Lichtquelle zur Umschaltung und/oder die Lichtquelle zur Anregung eine Fokussiereanordnung zur Erzeugung eines in Richtung der Beleuchtung ausgedehnten, zumindest in einer Richtung zumindest annähernd senkrecht zur optischen Achse des Objektivs linienartigen ...



Beschreibung

Stand der Technik

[0001] Die sogenannte SPIM-Technologie (Selective-Plane-Illumination-Microscopy) ist beispielsweise in Stelzer et al. [1–4] als Mikroskopie-Verfahren beschrieben worden:

[1] Stelzer et al., Optics Letters 31, 1477 (2006).

[2] Stelzer et al., Science 305, 1007 (2004).

[3] DE 102 57 423 A1

[4] WO 2004/0530558 A1

[0002] Wie die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie erlaubt SPIM als Weitfeldtechnik die Aufnahme von 3D-Objekten in Form optischer Schnitte, wobei die Vorteile vor allem in der Geschwindigkeit, dem geringen Ausbleichen der Probe sowie einer erweiterten Eindringtiefe zu suchen sind. In der Regel werden hierzu Fluorophore in der Probe mit Laserlicht in Form eines Lichtblattes angeregt. Das Lichtblatt kann durch die Probe gescannt werden.

[0003] Durch die (rechnerische) Kombination von Bildern, die aus unterschiedlichen Winkeln aufgenommen wurden, lässt sich eine kugelförmige PSF erzeugen. Deren Ausdehnung ist in der Regel durch die laterale Auflösung des verwendeten Detektionsobjektivs bestimmt, welche insgesamt die erreichbare optische Auflösung im herkömmlichen SPIM-Verfahren beschränkt.

[0004] In Breuninger et al., Optics Letters, Vol. 32, No. 13, 2007 ist das SPIM Verfahren mit einem periodisch strukturierten Lichtblatt beschrieben. Durch das periodisch strukturierte Lichtblatt erfolgt die Fluoreszenzangeregung an den Orten hoher Intensität. Die Strukturierung wird zur Unterdrückung von Streulicht aus außerfokalen Ebenen und zur Auflösungssteigerung durch strukturierte Beleuchtung verwendet (siehe weiter unten im Text, Heintzmann et al.).

[0005] In WO2006/127692 ist das sogenannte PALM-Verfahren (photoactivated light microscopy) beschrieben. Das Verfahren beruht auf der Photoaktivierung einzelner gemäß den Ausdehnungen der Detektions-PSF voneinander getrennter Moleküle und deren hochgenauen Lokalisierung durch Fluoreszenzdetektion beruht.

[0006] Das PALM-Verfahren so wie in WO2006/127692 beschrieben, verwendet im wesentlichen folgende primäre Schritte zur Erzeugung eines mikroskopischen Bildes mit einer gegenüber dem Standardmikroskop erhöhten optischen Auflösung:

1.) Photoaktivierung von Einzelmolekülen: Durch die Aktivierung werden die Fluoreszenzeigenschaften der Moleküle geändert (Ein-/Ausschalten, Änderung des Emissionsspektrum, ...), wobei

die Aktivierung so erfolgt, dass der Abstand zwischen aktivierten Molekülen größer gleich der optischen Auflösung des Standardmikroskops (gegeben durch Abbesches Auflösungs-grenze) ist.

2.) Anregung der aktivierten Moleküle und Lokalisieren der Moleküle mit einem ortsauflösenden Detektor.

3.) Deaktivieren der aktivierten Moleküle.

4.) Wiederholung der Schritte 1–3 und Überlagerung der Lokalisationspunkte aus Schritt 2.), die aus verschiedenen Iterationschritten gewonnen wurden zu einem hochaufgelösten Bild.

[0007] Die Aktivierung erfolgt vorzugsweise in Weitfeldbeleuchtung und statistisch verteilt. Durch die Wahl der Aktivierungsenergie wird versucht, zu erreichen, dass möglichst wenige/keine Moleküle (1) mit überlappenden Beugungsscheibchen (2) auf der Kamera entstehen (siehe **Abb. 1a**). Überlappende Beugungsscheibchen werden jedoch in Kauf genommen und können nicht ausgewertet werden ((3) in **Abb. 1b**). Es entstehen dadurch Regionen, bei denen der Abstand zwischen den aktivierten Molekülen größer bzw. sehr viel größer als das Beugungsscheibchen auf der Kamera ist (4). Durch die statistische Aktivierung der Moleküle müssen für die Generierung eines hochaufgelösten Bildes zur Bestimmung der Positionen der Moleküle etwa 10000 Einzelbilder ausgewertet werden. Hierdurch müssen große Datenmengen prozessiert werden und die Messung wird verlangsamt (ca. 1 min pro hochaufgelösten Bild). Die Verrechnung der Einzelbilder zu einem hochaufgelösten Bild erfordert ca. 4 h.

[0008] Die Anwendung des PALM-Verfahrens in der 3D-Abbildung bereitet Schwierigkeiten, da auch Moleküle außerhalb der Fokusebene aktiviert und damit geblichen werden, ohne dass ihr Fluoreszenzlicht bei der Bildgebung ausgenutzt werden könnte. Vor allem wird bei biologischen Proben im gesamten Fokuskegel Autofluoreszenzlicht angeregt, welches als Stör-signal zu werten ist und den Kontrast extrem herabsetzt.

[0009] Hierdurch wird die Aufnahme eines z-Scan verhindert, so dass keine 3D-Abbildung der Probe gewonnen werden kann.

[0010] Zur Vermeidung der Photoaktivierung und störender Autofluoreszenz außerhalb der Fokusebene wird in der WO2006/127692 die Verwendung einer Mehrphotonenangeregung beschrieben. Diese Anordnung ist jedoch technisch aufwendig. Beispielsweise müssen die Farbstoffe (PA-GFP) nichtlinear aktivierbar sein und es müssen hohe Intensitäten eingesetzt werden, die zu Farbstoffschädigung bzw. Probenschädigung führen können.

[0011] Eine weitere eingesetzte Methode zur Vermeidung des Autofluoreszenz-Problems ist die Kom-

bination des PALM-Verfahrens mit der TIRF-Technologie, wo das Anregungsvolumen in z-Richtung aufgrund der Beschränkung auf evaneszenten Wellen sehr klein gehalten wird. Mit TIRF ist allerdings keine 3D-Bildgebung machbar.

[0012] PALM bietet prinzipiell durch die orts aufgelöste Detektion zunächst nur eine Verbesserung der lateralen Auflösung. Die axiale Auflösung ist in erster Linie durch die Ausdehnung der verwendeten Detektions-PSF bestimmt. Dies ist ein weiterer Grund für die Kombination von PALM mit der TIRF-Technologie, die eine hohe axiale Auflösung bietet (siehe auch WO2006/127692).

[0013] Neben PALM sind andere auflösungssteigernde Verfahren bekannt, in denen die Probe so beleuchtet wird, dass eine durch Fluoreszenz detektierbare Region entsteht, die kleiner ist, als es dem Beugungslimit nach Abbe entspricht.

[0014] Dies gelingt durch eine nichtlineare Wechselwirkung nach verschiedenen Verfahren:

- Abregung zuvor angeregte Moleküle durch stimulierte Emission (STED, Klar and Hell, Opt. Lett. 24 (1999) 954–956)
- Abregung zuvor angeregte Moleküle durch Weiteranregung in einen höheren nicht fluoreszenzfähigen Zustand (Excited State Absorption, Watanabe et al., Optics Express 11 (2003) 3271)
- Entvölkerung des Grundzustandes durch Tripletbesetzung (Ground State Depletion, Hell and Kroug, Appl. Phys. B 60 (1995), 495–497)
- Schalten eines Farbstoffs zwischen einem fluoreszierenden und nicht fluoreszierenden, weniger fluoreszierenden oder anders (wie andere Emissionswellenlänge, Polarisation) gekennzeichneten fluoreszierenden Zustand (Hell, Jakobs, and Kastrop, Appl. Phys. A 77 (2003) 859–860)

[0015] In der Regel handelt es sich dabei um punktscannende Verfahren, die Nachteile hinsichtlich einer schnellen Datenaufnahme bieten. Zudem wird die Probe in außerfokalen Bereichen unnötig belastet.

[0016] Heintzmann et al. (R. Heintzmann, T. M. Jovin und C. Cremer, "Saturated patterned excitation microscopy – a concept for optical resolution improvement", JOSA A 19, 1599–1609 (2002).) schlagen als weiteres Konzept zur Auflösungssteigerung einen nichtlinearen Prozess in Form der direkten Sättigung eines Fluoreszenzübergangs vor. Die erhöhte Auflösung beruht dabei auf einer periodisch gitterförmig strukturierten Beleuchtung der Probe, wodurch ein Transfer hoher Objektraumfrequenzen in den Bereich der optischen Übertragungsfunktion des Mikroskops erfolgt. Der Transfer kann indirekt durch theoretische Nachbearbeitung der Daten nachvollzogen werden. Auch bei diesen Verfahren ist als nachteilig

anzusehen, dass die Probe in außerfokalen Bereichen unnötig belastet wird, da die strukturierte Beleuchtung den gesamten Probenraum durchsetzt. Außerdem ist das Verfahren derzeit nicht bei dicken Proben einsetzbar, da die außerfokal angeregte Fluoreszenz als Untergrundsignal mit auf den Detektor gelangt und somit den Dynamikbereich reduziert.

Gegenstand und Darstellung der Erfindung

[0017] Aufgabe der Erfindung ist es, die Nachteile der oben beschriebenen Verfahren zu vermeiden. Die Erfindung beschreibt Verfahren und Anordnung zur Realisierung eines PALM-Mikroskopes mit optimierter Photoaktivierung zur Realisierung einer höheren Bildrate. Gegenüber PALM wird eine Hochauflösung mit 3D-Bildgebung ohne nichtlineare Photoaktivierung erzielt. Eine PALM-TIRF-Kombination zur Reduktion der außerfokalen Autofluoreszenz ist nicht erforderlich.

[0018] Es kann die vorteilhafte Verwendung des MultiView-Verfahrens (mehrere Beleuchtungswinkel auf der Probe) zur Erzielung einer erhöhten Eindringtiefe und einer isotropen optischen Auslösung in x, y, z erfolgen.

[0019] Es erfolgt eine Aktivierung entsprechend [Abb. 2](#) möglichst vieler Moleküle ohne „Lücken“ ((4) in [Abb. 1b](#)) und ohne dass sich die Beugungsscheibchen der Moleküle auf der Kamera überlagern ((3) in [Abb. 1b](#)). Setzt man die Beugungsscheibchen der Einzelmoleküle aneinander so ergibt sich vorzugsweise eine dichte Kugelpackung.

[0020] Hierdurch wird eine Erhöhung der Geschwindigkeit des PALM-Verfahrens und eine Reduktion der Anzahl der Einzelbilder erreicht.

[0021] Die erfindungsgemäßen Anordnungen und ihre Wirkungen sowie Vorteile werden anhand der [Abb. 3–Abb. 7](#) näher beschrieben. Erfindungsgemäß wird vorteilhaft eine überraschend vorteilhafte Verbindung des SPIM-Verfahrens mit dem PALM-Verfahren vorgeschlagen.

[0022] [Fig. 3](#) zeigt schematisch von der Seite (Einstrahlungsrichtung gleich Blickrichtung) ein flächenhaftes Lichtblatt LB, auch Lichtscheibe genannt, das beispielsweise mit einer Zylinderlinse (O2 – ZL) erzeugt wird und durch die Probe (P) geht.

[0023] Oberhalb der Probe befindet sich ein Objektiv O eines Mikroskopes, beispielsweise eines Weitfeldmikroskopes mit einer CCD Kamera, eines Laser-Scanning-Mikroskopes oder eines Mikroskops mit strukturierter Beleuchtung.

[0024] Durch das seitlich in die Probe eingestrahletes Lichtblatt LB in Form des SPIM-Lichtblattes, das im

Wesentlichen genau in der Fokusebene (F) des Objektivs O liegt, erfolgt in [Fig. 3](#) eine Photoaktivierung senkrecht zur optischen Achse der Fluoreszenzanregung und -detektion. Die Fluoreszenzanregung kann hierbei nur innerhalb der Fokusebene (F) erfolgen. Die Fluoreszenzanregung und die Fluoreszenzdetektion erfolgt gemäß WO2006/127692 über das Mikroskopobjektiv O. Somit erfolgt eine lokalisierte Anregung in z-Richtung und es können Proben dreidimensional ohne nichtlineare Photoaktivierung mit dem PALM-Verfahren untersucht werden.

[0025] Die Breite des Lichtstrahls zur Photoaktivierung, d. h. seine Ausdehnung in z-Richtung, ist so angepasst, dass sie vorteilhaft kleiner oder gleich der durch die numerische Apertur des Objektivs O gegebenen axialen Ausdehnung der PSF ist. Hierdurch wird vorteilhaft vermieden, dass Fluoreszenzmoleküle außerhalb der Fokusebene aktiviert und geblichen werden. Zusätzlich kann eine Fluoreszenz nur noch aus dieser durch den Aktivierungsstrahl definierten Ebene kommen. Somit ist diese Anordnung inhärent 3D auflösend.

[0026] Die Detektion erfolgt mit herkömmlichen Mitteln, wie beispielsweise durch klassische Weitfeldmikroskopie, konfokale Mikroskopie oder strukturierte Beleuchtung (ZEISS APOTOM).

[0027] Allerdings besteht hier das Problem, dass der Anregungsstrahl über den gesamten Probenraum Autofluoreszenz anzuregen vermag. Dies kann dadurch verhindert werden, in [Abb. 3](#) zusätzlich der Lichtstrahl zur Anregung der Fluoreszenz (nach Photoaktivierung) mit einem Lichtblatt (LB) senkrecht zur Detektion über O2 – ZL eingestrahlt wird. Hierdurch wird gewährleistet, dass keine außerfokalen Autofluoreszenzsignale generiert werden, die sich störend auf die Bildgebung auswirken. Zusätzlich kann das Fluoreszenzlicht besonders effizient vom Anregungslicht getrennt detektiert werden, da keine spektrale Separierung mittels eines dichroitischen Strahlteilers erforderlich ist. Bei einigen schaltbaren Farbstoffen wie beispielsweise DENTRA erfolgt die Photoaktivierung und Fluoreszenzanregung mit der gleichen Wellenlänge. Dies kann hiermit besonders einfach realisiert werden.

[0028] Es ist weiterhin eine Anordnung denkbar, in der die Photoaktivierung über das Objektiv O. und die Fluoreszenzanregung über das seitlich eingestrahlte Lichtblatt O2 erfolgt. Das Objektiv O dient weiterhin zur Detektion. Auch hier wird außerfokales Autofluoreszenzlicht vermieden. Außerfokale Autofluoreszenz, welche durch den Aktivierungsstrahl generiert wird, lässt sich spektral, insbesondere aber auch zeitlich (die Fluoreszenzanregung erfolgt nach der Aktivierung) von dem eigentlich interessierenden Fluoreszenzsignal separieren.

[0029] Ein Problem stellt bei dieser Methode die Generierung von außerfokal aktivierten Molekülen dar. Es ist daher bei dieser Methode vorteilhaft, Moleküle einzusetzen, die sich nach der Aufnahme einer Bildebene über den gesamten Probenbereich z. B. durch eine Weitlichtbeleuchtung deaktivieren lassen.

[0030] Die Aufnahme des hochaufgelösten Bildes erfolgt für die erfindungsgemäßen Anordnungen wie in WO2006/127692 beschrieben mit den obengenannten Schritten 1–4. Als aktivierbare Fluoreszenzfarbstoffe werden vorzugsweise aus dem Stand der Technik bekannte fluoreszierende Proteine wie PA-GFP oder auch DRONPA verwendet. Die Photoaktivierung erfolgt hierbei mit 405 nm, die Fluoreszenzanregung mit 488 nm und die Detektion im Bereich oberhalb von 490 nm. Weiterhin können auch reversibel schaltbare synthetische Farbstoffe wie Alexa/Cyan Konstrukte eingesetzt werden.

[0031] In [Abb. 4a](#) ist schematisch eine weitere erfindungsgemäße Anordnung mit einer Beleuchtung mittels zweier Lichtblätter LB 1 und LB 2 dargestellt. Durch die interferometrische Überlagerung von Lichtblättern aus mehreren Richtungen (aber in der durch die Detektion definierten Fokusebene) entsteht ein Interferenzmuster entlang der eingezeichneten x-Richtung in der Fokusebene. Die Lichtblätter können wiederum Laserlicht zur Photoaktivierung und/oder Fluoreszenzanregung enthalten. Durch die Überlagerung bildet sich ein so genanntes Stehwellenfeld (SW), welches schematisch in [Abb. 4b](#) als Streifenmuster gezeigt ist. Werden beispielsweise zwei Lichtblätter für die Photoaktivierung verwendet, so kann erreicht werden, dass der Abstand der zu aktivierenden Fluoreszenzemitter größer oder gleich der Breite der PSF der Detektion (O in [Abb. 4a](#)) ist. Hierdurch entstehen vorzugsweise keine sich entlang der x-Richtung räumlich überlagernden Fluoreszenzemitter, die zusätzlich in der z-Richtung am Ort der Fokusebene F lokalisiert sind. Die Detektion erfolgt wiederum analog der Anordnung nach [Abb. 3](#). Ein Verschieben des Stehwellenfeldes in der Fokusebene zur Beleuchtung der Probe in den Intensitätsminima erfolgt durch die Einstellung der relativen Phase zwischen den beiden Lichtblättern beispielsweise mit einem Phasenmodulator (PH).

[0032] Bei Verwendung von 2 Strahlen entsteht durch Interferenz eine streifenförmige, in x und z lokalisierte Aktivierung. Bei Einstrahlung von mehr als zwei, vorteilhaft drei Lichtblättern LB 1 bis LB 3 (120° Winkel) entsteht wie in [Fig. 5](#) dargestellt ein Punktmuster PM, das heißt eine in x, z und y lokalisierte Aktivierung, so dass der Abstand (1) der aktivierten Fluoreszenzemitter größer oder gleich der Breite der PSF der Detektion (O in [Abb. 4a](#)) ist. Die Fluoreszenzanregung kann vorzugsweise ebenfalls über eines oder mehrere Lichtblätter erfolgen, wodurch wiederum außerfokale Autofluoreszenz vermieden wird.

[0033] Die Fluoreszenzanregung aus Richtung O in **Abb. 4a** kann auch in einer oder mehreren Richtungen strukturiert sein und beispielsweise auch ein Lochmuster aufweisen (Strukturierung in x und y). Hierdurch kann sichergestellt werden, dass der Abstand der Fluoreszenzemitter größer oder gleich der Breite der PSF der Detektion ist. Eine derartige Strukturierung kann beispielsweise mit einer Gitterstruktur erfolgen (DE 10257237A1) oder mit einer Multispot-anregung (DE 10 2006 017 841) erfolgen.

[0034] Weiterhin kann die Photoaktivierung über das Objektiv O. erfolgen und die Fluoreszenzanregung mit mehreren Lichtscheibenstrahlen realisiert werden, die ein Interferenzmuster der oben beschriebenen Art ausbilden. Moleküle, die mit sich überlappenden Beugungsscheibchen aktiviert wurden, werden so unterschiedlich stark angeregt. Auch auf diese Weise werden Lücken im Kamerabild vermieden. Durch den Aktivierungsstrahl generierte Autofluoreszenz lässt sich zeitlich und/oder spektral separieren. Nach der Aufnahme einer Ebene muss für 3D-Aufnahmen eine Deaktivierung über den Probenbereich erfolgen.

[0035] Erfolgt die Photoaktivierung durch das Objektiv O, so kann die strukturierte Aktivierung auch durch eine spezielle Abbildung (z. B. eines Gitters – wie oben beschrieben) oder durch einen Scan-Mechanismus realisiert werden. Der Lichtstrahl kann hierzu beispielsweise das Bildfeld abtasten und wird in seiner Intensität während der Bewegung durch beispielsweise einen schnellen AOTF so verändert, dass ein Aktivierungsmuster beispielsweise entsprechend **Fig. 5** in der Fokusebene entsteht. Bei diesem Verfahren werden allerdings auch Moleküle außerhalb der Fokusebene aktiviert. Durch eine seitliche Lichtblatt-Fluoreszenzanregung kann sichergestellt werden, dass dennoch nur Fluoreszenz aus der Fokusebene detektiert wird. Nach der Aufnahme einer Ebene muss für 3D-Aufnahmen allerdings eine Deaktivierung über den Probenbereich erfolgen. Die Intensität des Aktivierungsstrahls ist idealerweise so zu wählen, dass im statistischen Mittel nur ein Molekül pro Aktivierungspot (entspricht ca. PSF-Größe) angeregt wird. Auf diese Weise wird die Wahrscheinlichkeit vermindert, dass 2 Moleküle mit sich überlagernden Beugungsscheibchen gleichzeitig aktiviert werden. Im Verlauf der Bildaufnahme muss das Aktivierungsmuster selbstverständlich phasenverschoben werden, damit alle Moleküle gleichmäßig aktiviert werden. Durch den Aktivierungsstrahl generierte Autofluoreszenz lässt sich zeitlich und/oder spektral separieren. Die Aktivierungsintensitäten sind in der Regel aber so klein, dass Autofluoreszenz keine Rolle spielen sollte.

[0036] Der Photoaktivierungs- und Fluoreszenzanregungsstrahl können hierbei vertauscht werden. Dies hat den Vorteil, dass außerhalb der Fokusebene

keine Photoaktivierung geschieht. Dazu kann die Aktivierung unstrukturiert über das Lichtblatt und die Anregung auf die PSF abgestimmt strukturiert über das Objektiv durchgeführt werden. Moleküle, die mit sich überlappenden Beugungsscheibchen aktiviert wurden, werden so unterschiedlich stark angeregt. Auch auf diese Weise können Lücken im Kamerabild vermieden werden. Allerdings besteht hier das Problem der außerfokalen Autofluoreszenz.

[0037] Ein Problem bei allen beschriebenen Varianten stellt die axiale Auflösung dar, die im SPIM-Verfahren generell durch die Breite des verwendeten Lichtblattes bestimmt ist. Da die zu dessen Erzeugung verwendete NA in der Regel sehr viel kleiner als die NA des Detektionsobjektivs ist, ergibt sich direkt das Problem einer stark elongierten System-PSF (laterale Ausdehnung bestimmt durch die Auflösung des PALM-Verfahrens (Nanometer-Bereich), axiale Ausdehnung bestimmt durch die Lichtblattbreite (Micrometer-Bereich)). Dies bereitet Nachteile bei der 3D-Abbildung. Mit Hilfe der aus dem Stand der Technik bekannten Multiview-Technik (Aufnahme von Stapeln aus unterschiedlichen Winkeln) kann dieses Problem umgangen werden und eine effektive, weitgehend homogene räumliche Auflösung entsprechend der lateralen PALM-Auflösung erzeugt werden.

[0038] Als besonders vorteilhaft erweist sich, wenn die photoaktivierten Moleküle in den Randbereichen des zur Aktivierung verwendeten Lichtblattes durch ein weiteres strukturiertes Lichtblatt im Sinne einer nichtlinearen Wechselwirkung wieder deaktiviert werden, um eine höhere z-Auflösung zu erzielen. Dies kann durch eines der oben beschriebenen Verfahren, vorzugsweise einen Schaltprozess geschehen. Als Deaktivierungsstrahl kann ebenfalls ein Lichtblatt verwendet werden, dass aber so strukturiert ist, dass es in der Fokusebene über den Bereich des zu beobachtenden Bildbereichs eine Nullstelle aufweist, wie in **Abb. 6** gezeigt. Die Pupillen-Intensitätsverteilung (I) des Lichtblattstrahls entspricht hier einer Linie, welche durch eine geeignete Optik (z. B. mit Powell-Linse) zuvor erzeugt wurde. In der Pupille ist eine Phasenplatte (II) eingebracht, die über die Hälfte der Linie einen Bereich (III) aufweist, der einen pi-Phasensprung erzeugt. Das in der xy-Ebene ausgedehnte Lichtblatt (V) wird durch eine geeignete Optik (IV) erzeugt. Es ergibt sich im Bereich der Schärfentiefe der Beleuchtungsoptik (IV) eine Nullstellenebene (VI) parallel zur Fokusebene der Detektionsoptik (VII), in der keine Moleküle abgeregt werden. Entsprechend den STED-artigen Verfahren kann hierdurch die axiale Ausdehnung des Lichtblattes mit photoaktivierten Molekülen in nichtlinearer Weise stark eingeschränkt und die axiale Auflösung verbessert werden.

[0039] **Abb. 7** zeigt ein allgemeines optischen Aus-

führungsbeispiel zur Verwendung der beschriebenen vorteilhaften Verfahren und Applikationen mit Photoaktivierung/-deaktivierung über (x-Richtung strukturiertes) Lichtblatt und CCD-Weitfelddetektion.

förmiges Abrastern des Bildfeldes erlaubt. Zwischen der Scannereinheit (21) und dem Farbteiler (18) ist eine hierfür angepasste Abbildungsoptik (19) vorgesehen.

[0040] Die Probe ist beispielsweise mit Dronpa markiert und kann über 405 nm angeschaltet (aktiviert) werden und mit 488 nm angeregt bzw. wieder ausgeschaltet werden. Die Laser (1) sind für 405 nm (Photoaktivierung) und 488 nm (Fluoreszenzanregung und Photodeaktivierung) vorgesehen und werden über eine Strahlvereinigung (2) und dichroitische Spiegel vereinigt. Für die Fotoaktivierung und Fluoreszenzanregung kann auch ein- und dieselbe Wellenlänge wie oben am Beispiel DENTRA erläutert verwendet werden. Hierdurch kann dann ein Laser (405 nm in diesem Falle) und die Strahlvereinigung (2) entfallen.

[0044] Für die oben anhand von [Abb. 6](#) beschriebene z-Strukturierung des Lichtblatts können Phasenplatten (9) in die Beleuchtungsstrahlengänge eingebracht werden.

[0041] Ein AOTF (3) dient zur Wellenlängenselektion und zum schnellen Schalten/Abschwächen der Laserwellenlängen. Ihm ist in Beleuchtungsrichtung vorzugsweise eine drehbare $\lambda/2$ -Platte (4) und ein Polteiler (PBS) (5) mit Faserankopplung für 2 Kanäle nachgeordnet. Durch Drehung der $\lambda/2$ Platte kann die Leistung in den beiden Kanälen eingestellt werden.

[0042] Über die singlemodigen Fasern (6) wird das Licht über Zylinderoptiken (7) zur Erzeugung eines Lichtblattes und Abbildungsoptiken (8) über Strahlengänge (10) bzw. (11) zur Photoaktivierung (oder auch Deaktivierung bzw. Anregung) auf die Probe (12) eingestrahlt. Zur Erzeugung von Nullstellen in der Fokusebene (x-Strukturierung) gemäß [Abb. 4](#) sind die optischen Weglängen entsprechend angepasst. Ein Verschieben des Stehwellenfeldes in der Fokusebene zur Beleuchtung der Probe in den Intensitätsminima erfolgt durch die Einstellung der relativen Phase zwischen den beiden Lichtblättern beispielsweise mit einem Phasenmodulator (PH).

[0043] Das in der Probe (12) erzeugte Licht wird über ein Detektionsobjektiv (13) (Mikroskopobjektiv) in einem Detektionsstrahlengang (14) über eine Tubulinse (15) und Emissionsfilter (16) mittels einer CCD-Kamera detektiert. Im Detektionsstrahlengang ist gestrichelt ein optionaler (einschwenkbarer) Farbteiler (18) zur Einspiegelung eines Lasers (22) oder einer Weitfeldlichtquelle (23) dargestellt, falls die Fluoreszenzanregung durch das Detektionsobjektiv erfolgt. Zwischen Laser und Weitfeldlichtquelle kann optional mit Hilfe eines einschwenkbaren Spiegels (20) gewählt werden. Der Laser (22) bzw. die Weitfeldlichtquelle (23) kann auch zu Aktivierung benutzt werden, wobei dann statt einer Wellenlänge von 488 nm eine Wellenlänge von 405 nm vorzusehen ist, wenn DRONPA als Farbstoff verwendet wird. Insbesondere ist für den Laserstrahlengang (22) eine Scannereinheit (21) vorgesehen, welche ein punkt-

ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

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

Zitierte Patentliteratur

- DE 10257423 A1 [\[0001\]](#)
- WO 2004/0530558 A1 [\[0001\]](#)
- WO 2006/127692 [\[0005, 0006, 0010, 0012, 0024, 0030\]](#)
- DE 10257237 A1 [\[0033\]](#)
- DE 102006017841 [\[0033\]](#)

Zitierte Nicht-Patentliteratur

- Stelzer et al., Optics Letters 31, 1477 (2006). [\[0001\]](#)
- Stelzer et al., Science 305, 1007 (2004). [\[0001\]](#)
- Breuninger et al., Optics Letters, Vol. 32, No. 13, 2007 [\[0004\]](#)
- Heintzmann et al. [\[0004\]](#)
- STED, Klar and Hell, Opt. Lett. 24 (1999) 954–956 [\[0014\]](#)
- Excited State Absorption, Watanabe et al., Optics Express 11 (2003) 3271 [\[0014\]](#)
- Ground State Depletion, Hell and Kroug, Appl. Phys. B 60 (1995), 495–497 [\[0014\]](#)
- Hell, Jakobs, and Kastrup, Appl. Phys. A 77 (2003) 859–860 [\[0014\]](#)
- Heintzmann et al. [\[0016\]](#)
- R. Heintzmann, T. M. Jovin und C. Cremer, "Saturated patterned excitation microscopy – a concept for optical resolution improvement", JOSA A 19, 1599–1609 (2002) [\[0016\]](#)

Patentansprüche

1. Vorrichtung, insbesondere ein Mikroskop, charakterisiert durch ein beugungsbegrenztes Auflösungsvolumen,

mit mehreren zwischen unterschiedlichen Zuständen umschaltbaren Farbstoffmolekülen (UF), wobei mindestens ein Zustand fluoreszierend ist, die Fluoreszenz mit einem Objektiv (O) gesammelt und mit einem optischen System auf einen ortsauflösenden Detektor abgebildet wird,

wobei die UF in mindestens einem Teil der Probe eine Verteilungsdichte aufweisen, die größer ist als das Inverse des beugungsbegrenzten Auflösungsvolumens;

einer oder mehrere Lichtquellen zur Aussendung einer Umschaltstrahlung, um eine erste Untermenge der UF in der Probe umzuschalten und zur Aussendung einer Anregungsstrahlung, um die erste Untermenge der UF anzuregen,

wobei

mindestens eine der Lichtquellen derart angeordnet ist, dass sie die Probe durchstrahlt und eine Umschaltung und/oder Fluoreszenzanregung der UF in der Probe zumindest in einer Richtung annähernd senkrecht zur optischen Achse und insbesondere im Fokus des Objektivs (O) erfolgt.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, wobei die Umschaltung eine Photoaktivierung oder -deaktivierung der UF ist.

3. Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Ansteuerungseinheit zur Kontrolle der Umschaltstrahlung vorgesehen ist, um zu gewährleisten, dass die Verteilungsdichte der sich im fluoreszierenden Zustand befindenden UF kleiner als das Inverse des beugungsbegrenzten Auflösungsvolumens der Vorrichtung ist.

4. Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei für die Lichtquelle zur Umschaltung und/oder die Lichtquelle zur Anregung eine Fokussieranordnung zur Erzeugung eines in Richtung der Beleuchtung ausgedehnten zumindest in einer Richtung zumindest annähernd senkrecht zur optischen Achse des Objektivs linienartigen Beleuchtungsbereiches vorgesehen ist.

5. Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei ein flächiges Lichtblatt mit der Fokussieranordnung erzeugt wird, das die Probe durchstrahlt und zumindest annähernd senkrecht zur optischen Achse des Objektivs ist.

6. Vorrichtung nach Anspruch 5, wobei die Fokussieranordnung eine astigmatische und/oder asphärische Optik ist.

7. Vorrichtung nach mindestens einem der voran-

gehenden Ansprüche, wobei die zur Umschaltung und Anregung eingesetzten Lichtquellen in einer in der Wellenlänge umschaltbaren Lichtquelle vereinigt sind.

8. Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die zur Umschaltung und Anregung eingesetzten Lichtquellen die gleiche Wellenlänge aufweisen.

9. Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei verschiedene Lichtquellen mit einer Wellenlänge zur Umschaltung und Anregung vorgesehen sind.

10. Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei mehrere Lichtquellen zur Anregung und/oder Umschaltung aus verschiedenen Richtungen vorgesehen sind.

11. Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei zwei einander gegenüberliegende Lichtquellen vorgesehen sind.

12. Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei mindestens drei aus verschiedenen Richtungen einstrahlende Lichtquellen vorgesehen sind.

13. Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei mehrere Lichtquellen durch Aufspaltung des Lichtes einer Lichtquelle gebildet sind.

14. Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei mehrere Lichtquellen zur Erzeugung von Interferenz gleiche Wellenlängen aufweisen.

15. Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei mindestens eine Lichtquelle seitlich eingestrahlt wird und geeignete optische Mittel vorgesehen sind, die zu einer Strukturierung in Richtung der Detektion führen.

16. Verfahren zum räumlich hochauflösenden Abbilden einer Struktur einer Probe, mit den Schritten:

Auswählen einer Substanz aus einer Gruppe von Substanzen, die mit einem Umschaltsignal mindestens einmal aus einem ersten Zustand mit ersten optischen Eigenschaften in einen zweiten Zustand mit zweiten optischen Eigenschaften überführbar sind. Überführen wechselnder Anteile der Substanz mit dem Umschaltsignal in den zweiten Zustand, wobei die Umschaltung so erfolgt, dass der Abstand zwischen umgeschalteten Molekülen größer gleich der beugungsbegrenzten optischen Auflösung des Mikroskops ist.

Anregen der in den zweiten Zustand überführten An-

teile und Lokalisieren der Moleküle mit einem ortsauflösenden Detektor,
räumlich aufgelöstes Registrieren eines optischen Mess-Signals über ein Objektiv mit einem Detektor, das von den im zweiten Zustand befindlichen Farbstoffmolekülen ausgeht,
wobei mindestens die Überführung in den zweiten Zustand und/oder die Anregung zumindest näherungsweise senkrecht zur Detektionsrichtung und/oder zur optischen Achse des Objektivs erfolgt.

17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei eine Deaktivierung der Moleküle aus dem zweiten Zustand in den ersten Zustand erfolgt.

18. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei für die Lichtquelle zur Überführung in den zweiten Zustand und/oder die Lichtquelle zur Anregung durch Fokussierung eine in Richtung der Beleuchtung zumindest in einer Richtung linienartig ausgedehnten Beleuchtungsbereiches erfolgt.

19. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei der Beleuchtungsbereich eine linienförmige Lichtverteilung im Sehfeld des Objektivs darstellt.

20. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei der Beleuchtungsbereich ein flächiges Lichtblatt im Sehfeld des Objektivs darstellt.

21. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Überführung in den zweiten Zustand durch Photoaktivierung erfolgt.

22. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Anregung durch Fluoreszenzanregung erfolgt.

23. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei mindestens die Photoaktivierung und/oder die Fluoreszenzanregung senkrecht zur Fluoreszenzdetektion erfolgen.

24. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,
wobei

1. Eine Photoaktivierung von Einzelmolekülen erfolgt, indem die Fluoreszenzeigenschaften der Moleküle geändert werden, wobei die Aktivierung so erfolgt, dass der Abstand zwischen aktivierten Molekülen größer gleich der optischen Auflösung des Mikroskops ist,
2. Eine Anregung der aktivierten Moleküle und Lokalisieren der Moleküle mit einem ortsauflösenden Detektor erfolgt,
3. Eine Deaktivierung der aktivierten Moleküle erfolgt und

4. eine Wiederholung der Schritte 1–3 erfolgt, wobei durch Überlagerung von Detektionsbildern ein hochaufgelöstes Bild zusammengesetzt wird.

25. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,
wobei

1. Eine Photoaktivierung von Einzelmolekülen über mindestens ein Lichtblatt erfolgt, indem die Fluoreszenzeigenschaften der Moleküle geändert werden,
2. Eine Deaktivierung von Molekülen mittels eines in z-Richtung strukturierten Lichtblatts erfolgt, so dass die Schicht der aktivierten Moleküle in z-Richtung weniger ausgedehnt ist, als es dem Abbeschen Auflösungsvermögen der Detektionsoptik bzw. der numerischen Apertur der Beleuchtungsoptik entspricht,
3. Eine Anregung der aktivierten Moleküle und Lokalisieren der Moleküle mit einem ortsauflösenden Detektor erfolgt, 4. Eine Deaktivierung der aktivierten Moleküle erfolgt und
5. eine Wiederholung der Schritte 1–4 erfolgt, wobei durch Überlagerung von Detektionsbildern ein hochaufgelöstes Bild zusammengesetzt wird.

26. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Aktivierung und/oder Anregung eines Probenbereichs von einer Seite erfolgt.

27. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Aktivierung und/oder Anregung eines Probenbereichs von gegenüberliegenden Seiten erfolgt.

28. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Aktivierung und/oder Anregung eines Probenbereichs von mehr als zwei Seiten, vorzugsweise von 3 Seiten erfolgt.

29. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei mehrere Lichtquellen zur Erzeugung von Interferenz gleiche Wellenlängen aufweisen.

30. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei durch zwei Lichtquellen und Interferenz ein Streifenmuster in der Probe erzeugt wird.

31. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei durch mindestens drei Lichtquellen und Interferenz ein Punktmuster in der Probe erzeugt wird. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche.

32. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei mehrere Lichtquellen durch Aufspaltung des Lichtes einer Lichtquelle gebildet sind.

33. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Anregung durch das Objektiv und die Aktivierung über das Lichtblatt erfolgt.

34. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei Anregung und Aktivierung über das Lichtblatt erfolgt.

35. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Anregungslicht eine Strukturierung aufweist.

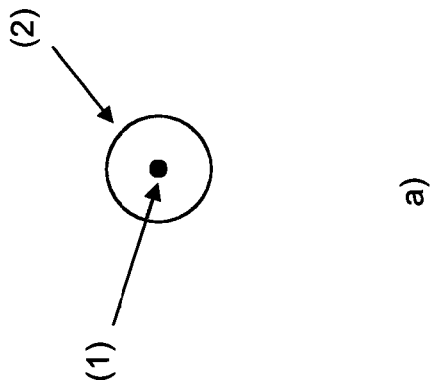
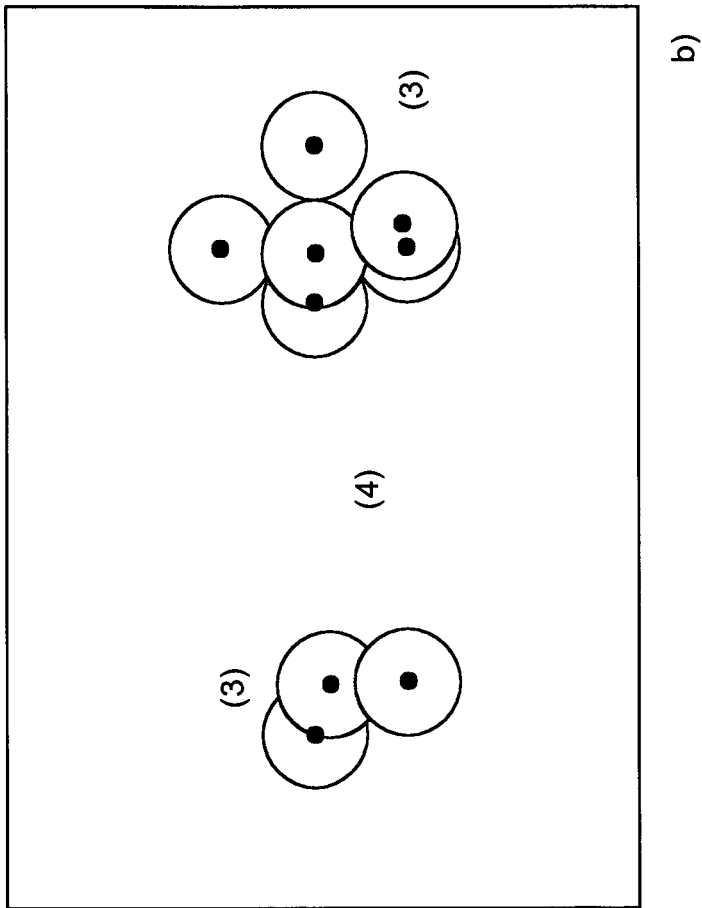
36. Verfahren nach Anspruch 36, wobei eine Strukturierung durch ein im Anregungsstrahlengang angeordnetes Gitter erzeugt ist.

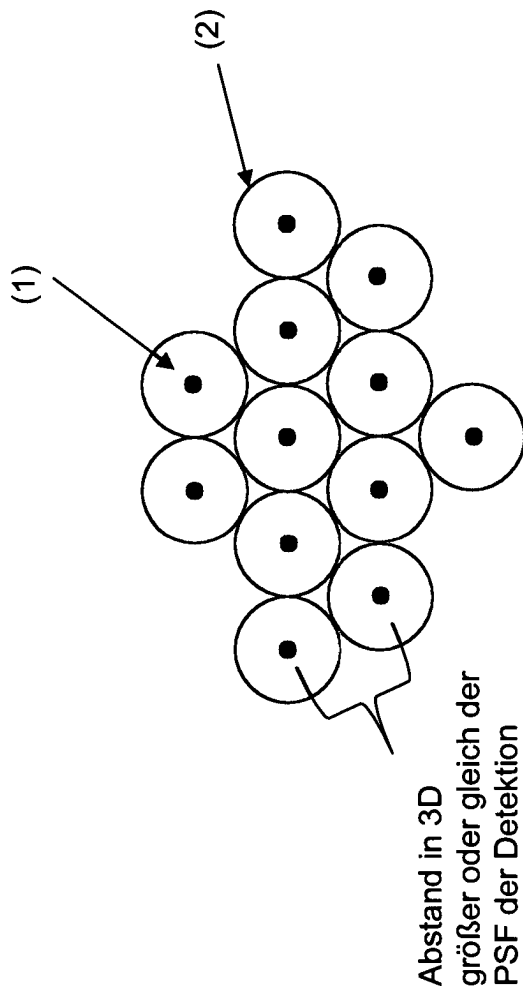
37. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Anregungslicht eine Punktverteilung (Multispot) aufweist.

38. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Aktivierung durch das Objektiv und die Anregung über das Lichtblatt erfolgt und das Aktivierungslicht durch eine modulierte Scanbewegung oder eine Gitterabbildung eine Punktverteilung aufweist.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen





2

Fig.

Anordnung zur Lokalisierung der Aktivierung in z

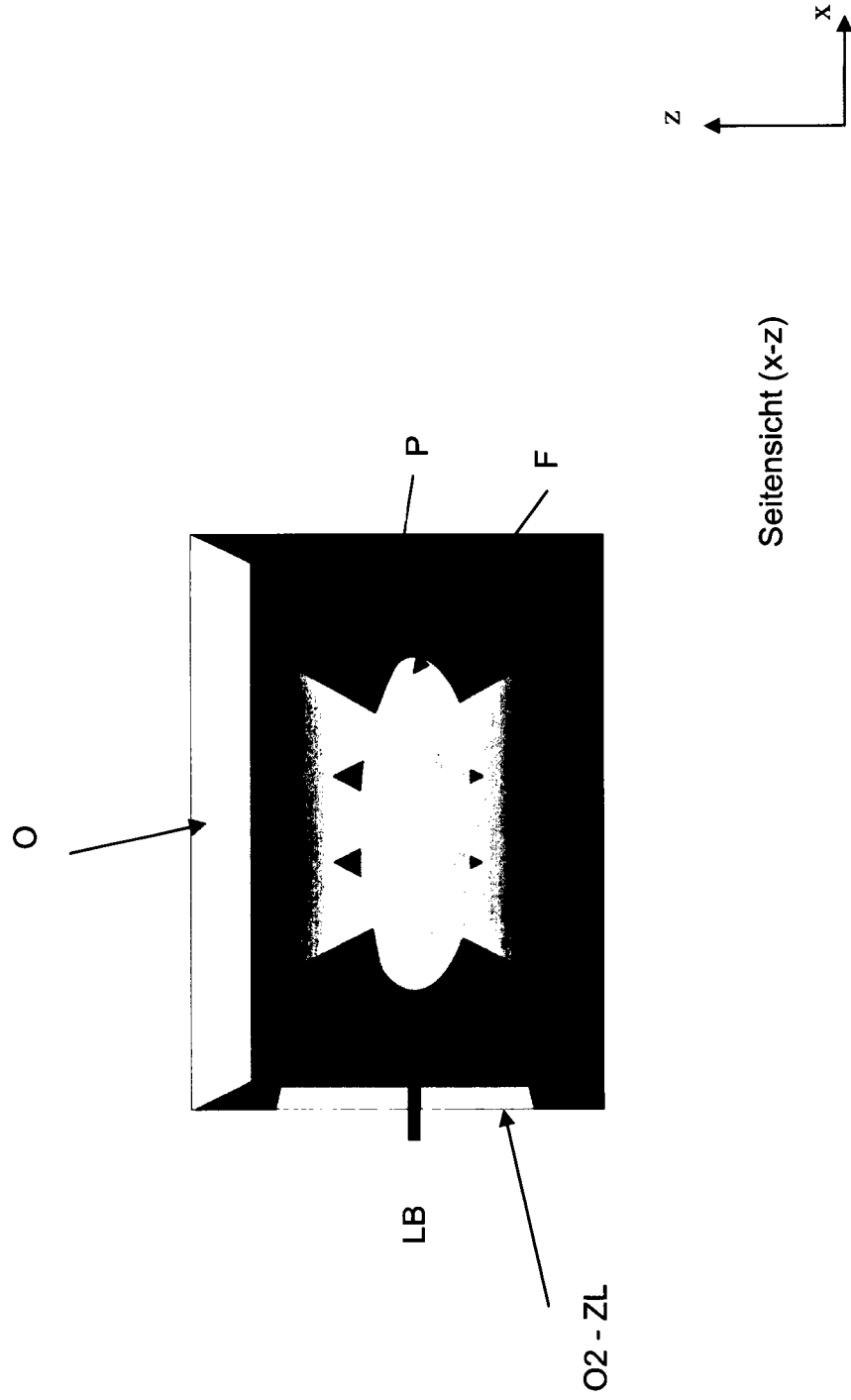
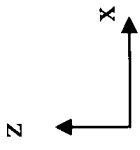
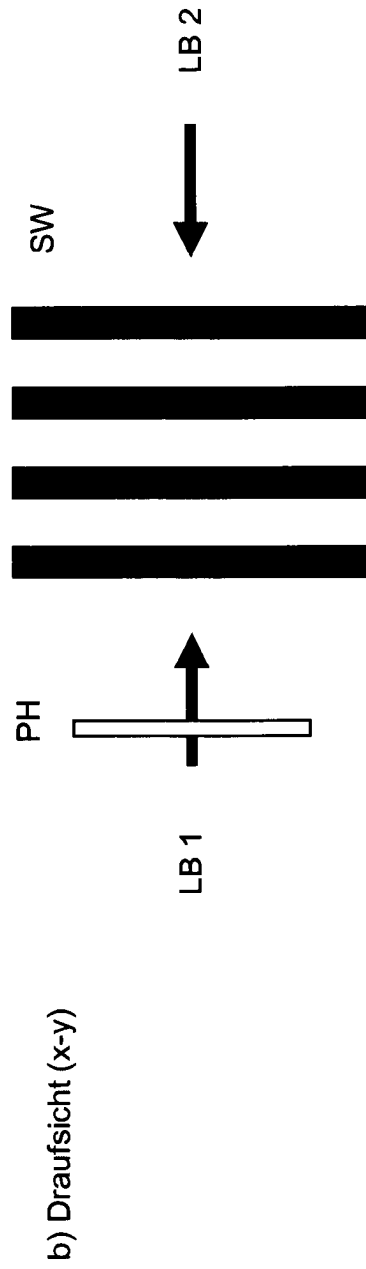
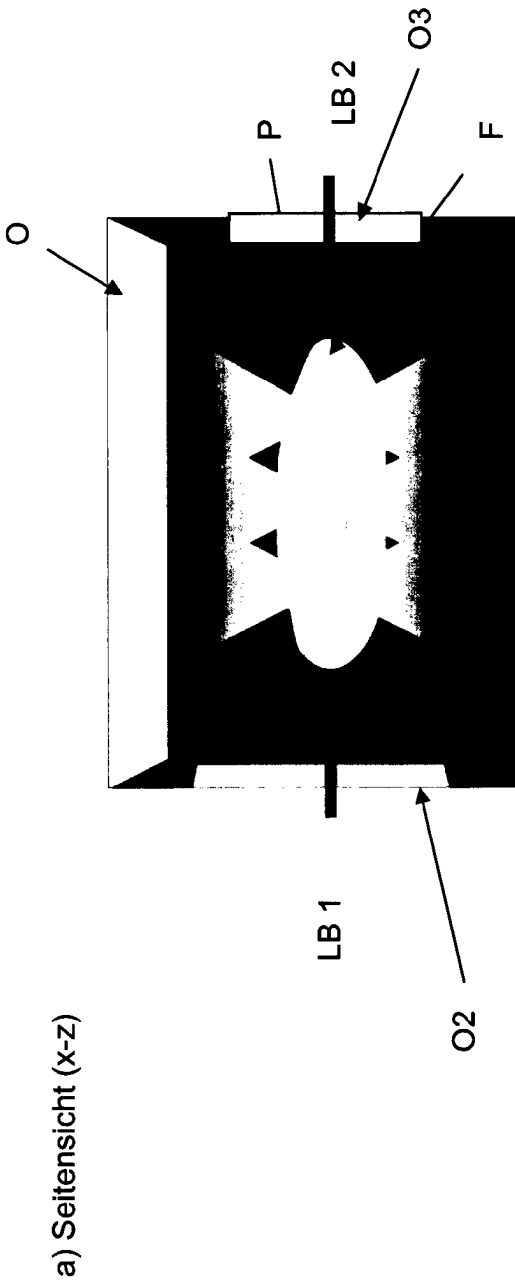


Fig.

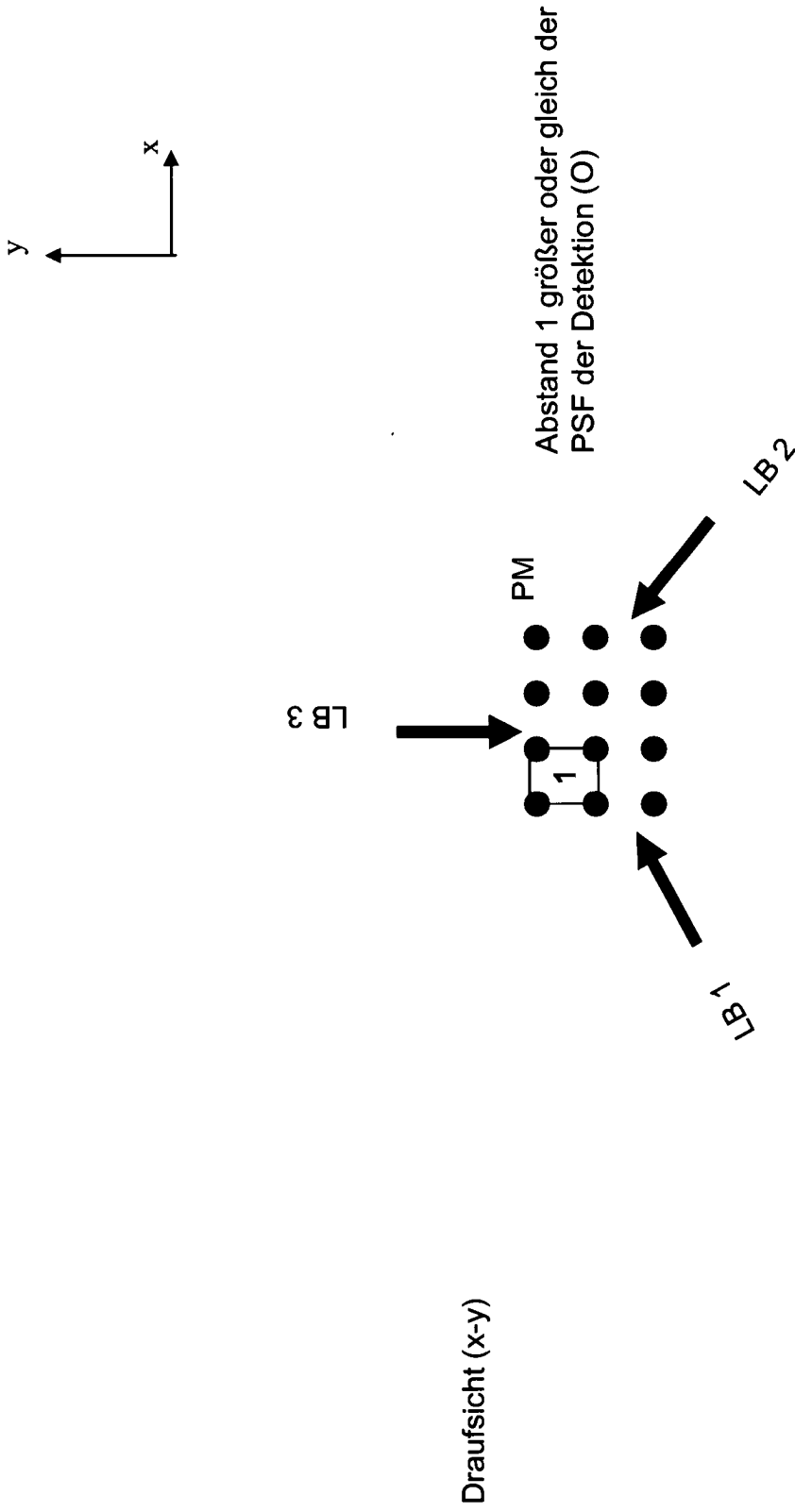


**strukturierte Aktivierung (und Fluoreszenzanregung)
(mehrere Aktivierungsstrahlen) zur Lokalisierung der Aktivierung in x,z**



Fig

**Aktivierung in dichtester Kugelpackung (und Fluoreszenzanregung)
zur Lokalisierung der Aktivierung in x,y,z**



Anordnung zur Lokalisierung der Aktivierung in z plus Deaktivierung mit Nullstelle

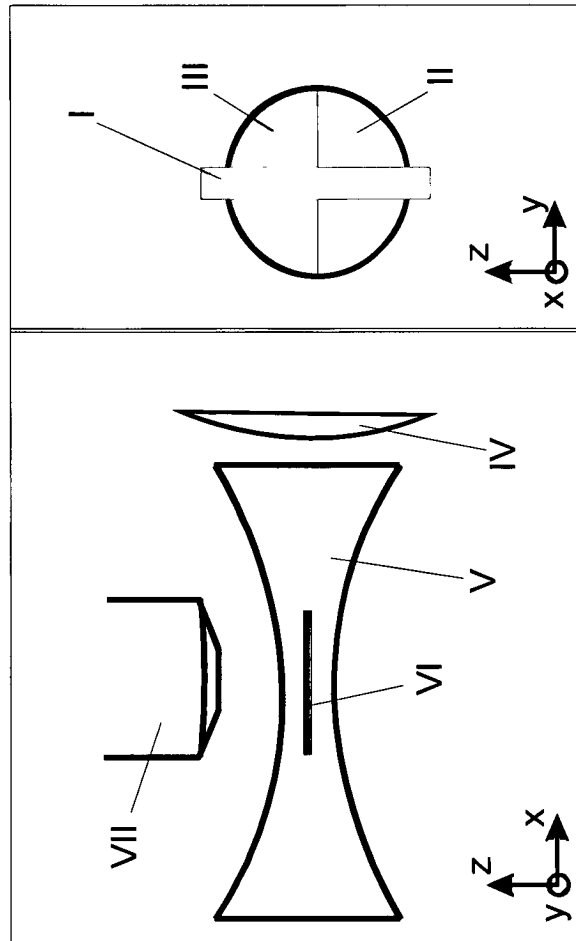


Fig.

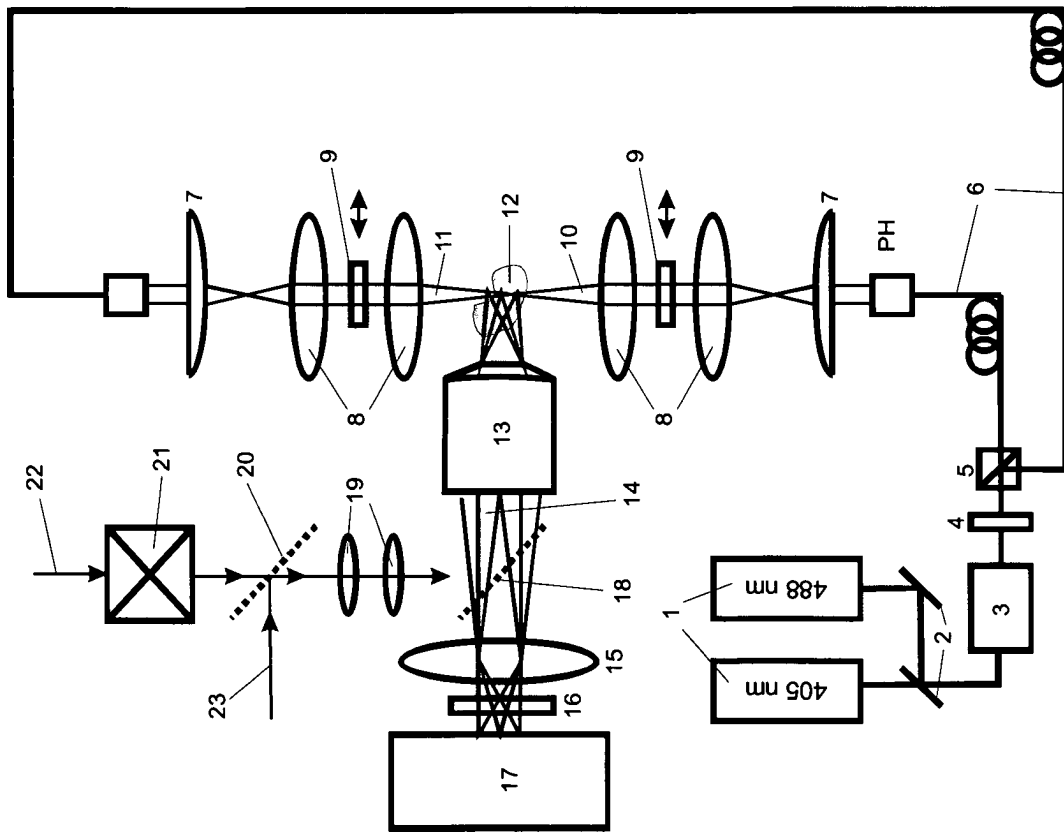


Fig.