



(12) **Offenlegungsschrift**

(21) Aktenzeichen: **10 2013 015 932.6**  
(22) Anmeldetag: **19.09.2013**  
(43) Offenlegungstag: **19.03.2015**

(51) Int Cl.: **G02B 21/00** (2006.01)  
**G02B 21/36** (2006.01)  
**G02B 6/43** (2006.01)

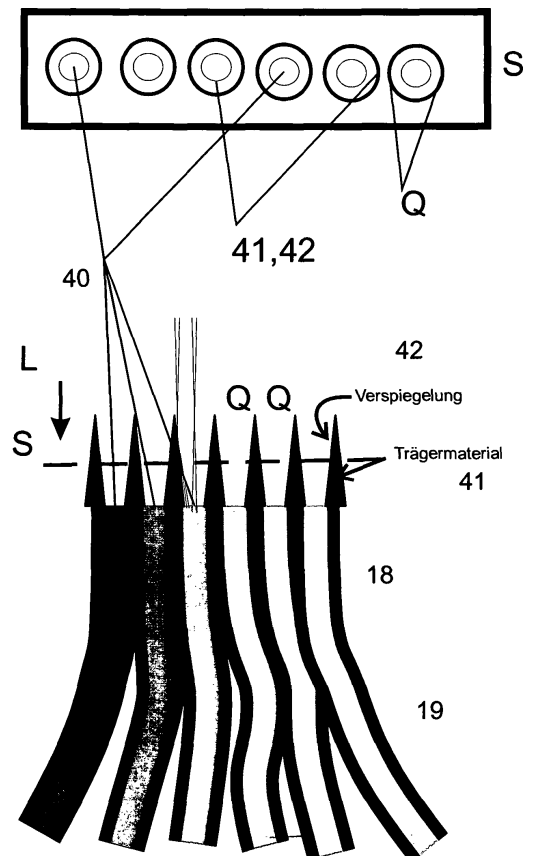
(71) Anmelder:  
**Carl Zeiss Microscopy GmbH, 07745 Jena, DE**

(72) Erfinder:  
**Huhse, Dieter, Dr., 12167 Berlin, DE**

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Hochauflösende Scanning-Mikroskopie**

(57) Zusammenfassung: Mikroskop zur hochauflösenden Scanning-Mikroskopie einer Probe (2), mit einer Beleuchtungseinrichtung (3) zum Beleuchten der Probe (2), einer Abbildungseinrichtung (4) zum Scannen mindestens eines Punkt- oder Linien-Spots (14) über die Probe (2) und zum Abbilden des Punkt- oder Linien-Spots (14) in ein beugungsbegrenztes, ruhendes Einzelbild (17) unter einem Abbildungsmaßstab in eine Detektionsebene (18), einer Detektoreinrichtung (19) zum Erfassen des Einzelbildes (17) in der Detektionsebene (18) für verschiedene Scanpositionen mit einer Ortsauflösung, welche unter Berücksichtigung des Abbildungsmaßstabes in mindestens einer Ausdehnung/Dimension mindestens doppelt so groß ist wie eine Halbwertsbreite des beugungsbegrenzten Einzelbildes (17), einer Auswerteeinrichtung (C) zum Auswerten einer Beugungsstruktur des Einzelbildes (17) für die Scanpositionen aus Daten der Detektoreinrichtung (19) und zum Erzeugen eines Bildes der Probe (17), das eine Auflösung aufweist, die über die Beugungsgrenze gesteigert ist, wobei die Detektoreinrichtung (19) aufweist:  
ein Detektorarray (24), das Pixel (25) aufweist und größer ist als das Einzelbild (17), und  
ein nicht-abbildendes Umverteilungselement (20–21; 30–34; 30–35), das dem Detektorarray (24) vorgeordnet ist und die Strahlung aus der Detektionsebene (18) nicht-abbildend auf die Pixel (25) des Detektorarrays (24) verteilt und das Umverteilungselement ein Bündel (20) aus Lichtleitfasern (21), vorzugsweise aus Multi-Mode Lichtleitfasern, umfaßt, welches einen in der Detektionsebene (18) angeordneten Eingang (22) und einen Ausgang (23) aufweist, an dem die Lichtleitfasern (21) in einer geometrischen Anordnung, welche sich von der des Eingangs (22) unterscheidet, an den Pixeln (25) des Detektorarrays (24) enden wobei dem Bündel aus Lichtleitfasern in Lichtrichtung vorgeordnet die Lichtrichtung beeinflussende Elemente vorgesehen sind die den Lichteintrittsöffnungen der Einzellichtfasern Detektionslicht zuordnen und insbesondere zumindest einem Teil der Einzelfasern Linsen eines Linsenarrays optisch zugeordnet sind.



## Beschreibung

**[0001]** Die Erfindung bezieht sich auf ein Mikroskop zur hochauflösenden Scanning-Mikroskopie einer Probe, mit einer Beleuchtungseinrichtung zum Beleuchten der Probe, einer Abbildungseinrichtung zum Scannen eines Punkt- oder Linien-Spots über die Probe und zum Abbilden des Punkt- oder Linien-Spots in ein beugungsbegrenztes, ruhendes Einzelbild unter einem Abbildungsmaßstab in eine Detektionsebene, einer Detektoreinrichtung zum Erfassen des Einzelbildes in der Detektionsebene für verschiedene Scanpositionen mit einer Ortauflösung, welche unter Berücksichtigung des Abbildungsmaßstabes mindestens doppelt so groß ist wie eine Halbwertsbreite des beugungsbegrenzten Einzelbildes, einer Auswerteeinrichtung zum Auswerten einer Beugungsstruktur des Einzelbildes für die Scanpositionen aus Daten der Detektoreinrichtung und zum Erzeugen eines Bildes der Probe, das eine Auflösung aufweist, die über die Beugungsgrenze gesteigert ist. Die Erfindung bezieht sich weiter auf ein Verfahren zur hochauflösenden Scanning-Mikroskopie einer Probe, bei dem die Probe beleuchtet wird, ein scannend über die Probe geführter Punkt- oder Linien-Spot in ein Einzelbild abgebildet wird, wobei der Spot unter einem Abbildungsmaßstab beugungsbegrenzt in das Einzelbild abgebildet wird und das Einzelbild ruhend in einer Detektionsebene liegt, für verschiedene Scanpositionen das Einzelbild mit einer Ortauflösung erfaßt wird, welche unter Berücksichtigung des Abbildungsmaßstabes mindestens doppelt so groß ist wie eine Halbwertsbreite des beugungsbegrenzten Einzelbildes, so daß eine Beugungsstruktur des Einzelbildes erfaßt wird, für jede Scanposition die Beugungsstruktur des Einzelbildes ausgewertet wird und ein Bild der Probe erzeugt wird, das eine Auflösung aufweist, die über die Beugungsgrenze gesteigert ist.

**[0002]** Ein solches Mikroskop bzw. Mikroskopieverfahren ist beispielsweise aus der Veröffentlichung C. Müller und J. Enderlein, Physical Review Letters, 104, 198101 (2010), oder der EP 2317362 A1 bekannt, die auch weitere Nachweise zum Stand der Technik aufführt.

**[0003]** Dieser Ansatz erreicht eine Auflösungserhöhung, indem ein Spot beugungsbegrenzt auf eine Detektionsebene abgebildet wird. Die beugungsbegrenzte Abbildung bildet einen Punkt-Spot als Airy-Scheibe ab. Diese Beugungsscheibe wird in der Detektionsebene so erfaßt, daß ihre Struktur aufgelöst werden kann. Bezogen auf die Abbildungsleistung des Mikroskops erfolgt somit detektorseitig eine Überabtastung. Bei der Abbildung eines Punkt-Spots wird die Form der Airy-Scheibe aufgelöst. Durch geeignete Auswertung der Beugungsstruktur, die in den genannten Schriften geschildert ist und deren Offenbarung diesbezüglich vollumfänglich hier einbezogen

sei, erreicht man eine Auflösungssteigerung um den Faktor 2 über die Beugungsgrenze.

**[0004]** Detektionsseitig ist es dabei jedoch unvermeidlich, daß für jeden Punkt, der auf der Probe in dieser Weise abgetastet wird, verglichen mit einem herkömmlichen Laser-Scanning-Mikroskop (nachfolgend auch als LSM abgekürzt) ein Einzelbild mit einem Vielfachen an Bildinformation aufgenommen werden muß. Erfasst man die Struktur des Einzelbildes des Spots beispielsweise mit 16 Pixeln, hat man pro Spot nicht nur die 16-fache Datenmenge, ein einzelnes Pixel enthält auch im Mittel nur ein 1/16 der Strahlungsintensität, die bei einer üblichen Pinhole-Detektion auf den Detektor eines LSM fallen würde. Da die Strahlungsintensität über die Struktur des Einzelbildes, beispielsweise die Airy-Scheibe, natürlich nicht gleichmäßig verteilt ist, fällt am Rande dieser Struktur tatsächlich sogar noch bedeutend weniger Strahlungsintensität an, als der Mittelwert von 1/n bei n-Pixeln.

**[0005]** Man steht also vor der Aufgabe, detektorseitig Strahlungsmengen hochauflösend erfassen zu können. Herkömmliche CCD-Arrays, die üblicherweise in der Mikroskopie eingesetzt werden, erreichen kein hinreichendes Signal/Rausch-Verhältnis, so daß selbst eine Verlängerung der Bildaufnahmedauer, die per se schon als nachteilig in der Anwendung wäre, nicht weiterhelfen würde. APD-Arrays sind auch mit einem zu hohen Dunkelrauschen behaftet, so daß auch eine Verlängerung der Meßdauer in einem unzureichenden Signal/Rausch-Verhältnis resultieren würde. Gleiches gilt für CMOS-Detektoren, die zudem hinsichtlich der Detektorelementgröße nachteilig sind, da das beugungsbegrenzte Einzelbild des Spots auf zu wenige Pixel fallen würde. Ähnliche Bauraumprobleme bringen PMT-Arrays mit sich; die Pixel sind dort ebenfalls zu groß. Die Bauraumprobleme ruhen insbesondere daher, daß eine Realisierung eines Mikroskops zur Hochauflösung vom Entwicklungsaufwand wie von der Geräteverbreitung nur realisierbar ist, wenn eine Integration in bestehende LSM-Konstruktionen möglich ist. Hier sind jedoch bestimmte Größen des Einzelbildes vorgegeben. Ein flächenmäßig größerer Detektor könnte nur dann eingebracht werden, wenn zusätzlich eine Optik vorgesehen wird, die das Bild noch einmal signifikant, d. h. um mehrere Größenordnungen aufweitet. Eine solche Optik gestaltet sich, will man die beugungsbegrenzte Struktur ohne weitere Abbildungsfehler erhalten, als sehr aufwendig.

**[0006]** Es sind im Stand der Technik andere Verfahren bekannt, welche die geschilderten detektorseitigen Probleme bei der Hochauflösung vermeiden. So ist beispielsweise in der EP 1157297 B1 ein Verfahren angesprochen, bei dem mittels strukturierter Beleuchtung nicht linearer Prozesse ausgenutzt werden. Eine strukturierte Beleuchtung wird in mehre-

ren Dreh- und Ortslagen über die Probe verschoben und die Probe in diesen unterschiedlichen Zuständen auf einen Weitfelddetektor abgebildet, für den die geschilderten Beschränkungen nicht bestehen.

**[0007]** Ein Verfahren, das ohne die geschilderten Detektoreinschränkungen ebenfalls eine Hochauflösung (also eine Auflösung eines Probenbildes jenseits der Beugungsgrenze) erreicht, ist aus der WO 2006127692 und der DE 10 2006 021 317 bekannt. Dieses mit PALM abgekürzte Verfahren verwendet eine Markierungssubstanz, welche mittels eines optischen Aktivierungssignals aktiviert werden kann. Nur im aktivierten Zustand kann die Markierungssubstanz mit Anregungsstrahlung zur Abgabe von bestimmter Fluoreszenzstrahlung angeregt werden; nicht aktivierte Moleküle senden auch nach Einstrahlung von Anregungsstrahlung keine Fluoreszenzstrahlung aus. Die Aktivierungsstrahlung schaltet die Aktivierungssubstanz also in einen Zustand, in dem sie zur Fluoreszenz anregbar ist. Man spricht deshalb allgemein von einem Umschaltsignal. Dieses wird nun so aufgebracht, daß zumindest ein gewisser Anteil der aktivierten Markierungsmoleküle von benachbarten, ebenfalls aktivierten Markierungsmolekülen so beabstandet ist, daß die aktivierten Markierungsmoleküle gemessen an der optischen Auflösung der Mikroskopie getrennt oder nachträglich trennbar sind. Man spricht von Isolierung der aktivierten Moleküle. Für diese isolierten Moleküle ist es einfach, das Zentrum deren auflösungsbegrenzt bedingter Strahlungsverteilung zu ermitteln und somit rechnerisch die Lage der Moleküle mit höherer Genauigkeit zu bestimmen, als es die optische Abbildung eigentlich zuläßt. Zum Abbilden der gesamten Probe benutzt das PALM-Verfahren die Tatsache, daß die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Markierungsmolekül durch das Umschaltsignal bei gegebener Intensität des Umschaltsignals aktiviert wird, für alle Markierungsmoleküle gleich ist. Die Intensität des Umschaltsignals wird also so aufgebracht, daß die gewünschte Isolierung erfolgt. Diese Verfahrensschritte werden so lange wiederholt, bis möglichst alle Markierungsmoleküle einmal in einer Teilmenge, die zur Fluoreszenz angeregt wurde, enthalten waren.

**[0008]** Im Rahmen der Erfindung wird der auf der Probe abgetastete Spot ruhend in eine Detektionsebene abgebildet. Die Strahlung aus der Detektionsebene wird dann nicht-abbildend umverteilt und auf das Detektorarray geleitet. Der Begriff „nicht-abbildend“ ist dabei auf das in der Detektionsebene vorhandene Einzelbild bezogen. Einzelne Flächenbereiche dieses Einzelbildes können natürlich dennoch gemäß den Abbildungsgesetzen abgebildet werden. Insofern kann zwischen Detektorarray und Umverteilungselement durchaus abbildende Optik liegen. Das in der Detektionsebene vorliegende Einzelbild bleibt jedoch bei der Umverteilung als solches nicht erhalten.

**[0009]** Der Begriff „beugungsbegrenzt“ soll nicht auf die Beugungsgrenze gemäß der Abbe'schen Theorie beschränkt sein, sondern auch Fälle erfassen, in denen auf Grund realer Unzulänglichkeiten oder Einschränkungen das theoretische Maximum um 20% verfehlt wird. Auch dann hat das Einzelbild eine Struktur, die hier als Beugungsstruktur bezeichnet wird. Sie wird überabgetastet.

**[0010]** Dieses Prinzip ermöglicht es, ein Detektorarray zu verwenden, das in seiner Größe nicht zum Einzelbild paßt. Das Detektorarray ist vorteilhaft in mindestens einer Ausdehnung größer oder kleiner als das zu erfassende Einzelbild. Unter den Begriff der unterschiedlichen geometrischen Ausbildung fallen sowohl eine unterschiedliche Ausdehnung des Detektorarrays als auch eine Anordnung mit unterschiedlichen Aspektverhältnis bezogen auf Höhe und Breite der Ausdehnung des Einzelbildes in der Detektionsebene. Die Pixel des Detektorarrays können zusätzlich für die erforderliche Auflösung zu groß sein. Auch ist es nun zulässig, daß der Umriß der Pixelanordnung des Detektorarrays grundlegend anders ist, als der Umriß, den das Einzelbild in der Detektionsebene hat. Letztlich hat das Detektorarray erfindungsgemäß eine andere Größe als das Einzelbild in der Detektionsebene. Die Umverteilung im Verfahren bzw. das Umverteilungselement im Mikroskop ermöglichen es, ein Detektorarray zu wählen, ohne die Abmessungseinschränkungen und PixelgröÙeneinschränkungen beachten zu müssen, welche durch das Einzelbild und dessen Größe entstehen. Insbesondere kann als Detektorarray eine Detektorzeile verwendet werden.

**[0011]** Das Bild der Probe entsteht LSM-üblich durch Abtasten der Probe mit dem Spot aus einer Vielzahl von Einzelbildern, die jeweils einem anderen Abtastort, also einer anderen Scanposition, zugeordnet sind.

**[0012]** Das erfindungsgemäÙe Konzept kann auch in parallelisierter Form für mehrere Spots gleichzeitig durchgeführt werden, wie dies für die Laserscanningmikroskopie bekannt ist. Es werden dann mehrere Spots auf der Probe scannend abgetastet, und die Einzelbilder der mehreren Spots liegen ruhend in der Detektionsebene nebeneinander. Sie werden dann entweder von einem gemeinsamen Umverteilungselement, das flächenmäÙig entsprechend groß ist bzw. von mehreren einzelnen Umverteilungselementen umverteilt und dann auf ein entsprechend größeres einzelnes oder mehrere einzelne Detektorarrays geleitet.

**[0013]** Die nachfolgende Beschreibung konzentriert sich exemplarisch auf die Abtastung mit einem einzelnen Punkt-Spot. Dies soll jedoch nicht als Einschränkung verstanden werden, und die erläuterten Merkmale und Grundsätze gelten sinngemäß auch für die

parallel Abtastung mehrerer Punkt-Spots wie auch für die Verwendung eines Linienspots. Letzterer ist natürlich nur quer zur Linienerstreckung beugungsbegrenzt, so daß die diesbezüglichen Merkmale dieser Beschreibung dann nur in einer Richtung (quer zur Linienerstreckung) gelten.

**[0014]** Durch das erfindungsgemäße Vorgehen kann das ISM-Verfahren bei zufriedenstellender Geschwindigkeit und mit vertretbarem apparativen Aufwand ausgeführt werden. Die Erfindung eröffnet für ein hochauflösendes Mikroskopieprinzip ein breites Anwendungsfeld, das so bislang nicht gegeben war.

**[0015]** Eine Möglichkeit der Umverteilung bzw. das Umverteilungselement zu realisieren besteht darin, ein Bündel aus Lichtleitfasern zu verwenden. Diese können vorzugsweise als Multimode-Lichtleitfasern ausgeführt werden. Das Bündel hat einen Eingang, der in der Detektionsebene angeordnet ist und in seinem Umriß den Ausdehnungen des beugungsbegrenzten Einzelbildes in der Detektionsebene genügt. Am Ausgang sind die Lichtleitfasern hingegen in der geometrischen Anordnung angeordnet, welche durch das Detektorarray vorgegeben ist, und welche sich von der des Eingangs unterscheidet. Die ausgangsseitigen Enden der Lichtleitfasern können dabei direkt auf die Pixel des Detektorarrays geführt werden. Besonders vorteilhaft ist es, wenn der Ausgang des Bündels in einem Stecker zusammengefaßt ist, der bequem auf eine Detektorzeile, beispielsweise eine APD- oder PMT-Zeile aufgesteckt werden kann.

**[0016]** Für das Verständnis der Erfindung ist es wichtig, zwischen den Pixeln des Detektorarrays und Bildpixeln zu unterscheiden, mit denen das Einzelbild in der Detektionsebene aufgelöst wird. Jedes Bildpixel ist i. d. R. genau einem Pixel des Detektorarrays zugeordnet; hinsichtlich ihrer Anordnung sind die beiden aber unterschiedlich. Kennzeichnend für die Erfindung ist es unter anderem, daß in der Detektionsebene die Strahlung an Bildpixeln aufgenommen wird, welche hinsichtlich ihrer Größe und Anordnung eine Überabtastung des Einzelbildes bewirken. Auf diese Weise wird die Struktur des Einzelbildes aufgelöst, die aufgrund der beugungsbegrenzten Erzeugung des Einzelbildes eine Beugungsstruktur ist. Das Umverteilungselement hat eine Eingangsseite, an der diese Bildpixel vorgesehen sind. Die Eingangsseite liegt in der Detektionsebene. Das Umverteilungselement leitet die Strahlung an jedem Bildpixel zu einem der Pixel des Detektorarrays. Die Zuordnung von Bildpixeln zu Pixeln des Detektorarrays hält die Bildstruktur nicht aufrecht, weshalb die Umverteilung bezogen auf das Einzelbild nicht-abbildend ist. Die Erfindung könnte also auch dadurch charakterisiert werden, daß in einem gattungsgemäßen Mikroskop die Detektoreinrichtung ein nicht-abbildendes Umverteilungselement aufweist, das eine

in der Detektionsebene liegende Eingangsseite aufweist, an der die Strahlung mit Bildpixeln aufgenommen wird. Das Umverteilungselement weist weiter eine Ausgangsseite auf, an der die an den Bildpixeln aufgenommene Strahlung Pixeln eines Detektorarrays zugeführt wird, wobei die Strahlung von der Eingangsseite zur Ausgangsseite bezogen auf das Einzelbild nicht-abbildend umverteilt ist. Analog könnte das erfindungsgemäße Verfahren dadurch charakterisiert werden, daß bei einem gattungsgemäßen Verfahren die Strahlung in der Detektionsebene mit Bildpixeln aufgenommen wird, die bezogen auf das Einzelbild nicht-abbildend auf Pixel des Detektorarrays umverteilt werden. Das Detektorarrays unterscheidet sich hinsichtlich Anordnung und/Größe seiner Pixel von der Anordnung und/oder Größe der Bildpixel in der Detektionsebene. Weiter sind die Bildpixel in der Detektionsebene vom Umverteilungselement so bereitgestellt, daß bezogen auf die Beugungsgrenze die Beugungsstruktur des Einzelbildes überabgetastet ist.

**[0017]** Bei hochempfindlichen Detektorarrays ist es bekannt, daß benachbarte Pixel bei hohen Strahlungsintensitätsunterschieden eine Störung durch Übersprechen zeigt. Um solches zu vermeiden, ist eine Weiterbildung bevorzugt, bei der die Lichtleitfasern so vom Eingang zum Ausgang geführt sind, daß am Ausgang benachbarte Lichtleitfasern auch am Eingang benachbart sind. Da das beugungsbegrenzte Einzelbild keine sprungartigen Strahlungsintensitätsänderungen zeigt, stellt eine derartige Ausgestaltung des Umverteilungselementes automatisch sicher, daß nebeneinanderliegende Pixel des Detektorarrays möglichst geringe Strahlungsintensitätsunterschiede erhalten, was das Übersprechen minimiert.

**[0018]** Anstelle einer auf Lichtleitfasern basierten Umverteilung ist es auch möglich, das Umverteilungselement mit einem Spiegel auszurüsten, der unterschiedlich geneigte Spiegelemente hat. Ein solcher Spiegel kann beispielsweise als Facettenspiegel, DMD oder adaptiver Spiegel ausgestaltet werden, wobei bei den letzten beiden Varianten eine entsprechende Einstellung bzw. Ansteuerung die Neigung der Spiegelemente sicherstellt. Die Spiegelemente leiten die Strahlung aus der Detektionsebene auf die Pixel des Detektorarrays, dessen geometrische Ausbildung sich von der der Spiegelemente unterscheidet.

**[0019]** Die Spiegelemente stellen wie die Lichtleitfaserenden im Eingang des Lichtleitfaserbündels die Bildpixel hinsichtlich der Auflösung der Beugungsstruktur des Einzelbildes dar. Ihre Größe ist für die Überabtastung entscheidend, nicht (mehr) die Pixelgröße des Detektorarrays. Insofern wird hier auch eine Gruppe aus mehreren Einzeldetektoren als Detektorarray verstanden, da diese in ihrer Anordnung immer

anders (also größer) als die Bildpixel in der Detektionsebene sind.

**[0020]** Bei LSM werden je nach erwünschter Auflösung unterschiedliche Objektive verwendet. Der Wechsel eines Objektivs verändert die Ausdehnung eines Einzelbildes in der Detektionsebene. Es ist deshalb bevorzugt, der Detektionsebene in Abbildungsrichtung eine Zoomoptik zur Anpassung der Größe des Einzelbildes an die der Detektoreinrichtung vorzuordnen. Eine solche Zoomoptik variiert die Größe des Einzelbildes in einem Prozentbereich deutlich kleiner 100%, ist also sehr viel einfacher auszuführen, als eine Vervielfachung der Größe des Einzelbildes, die eingangs als nachteilig geschildert wurde.

**[0021]** Die Beleuchtung der Probe erfolgt bevorzugt wie in einem üblichen LSM ebenfalls scannend, obwohl dies nicht zwingend ist. Man erreicht dann allerdings die maximale Auflösungssteigerung. Beleuchtet man die Probe scannend, ist es zweckmäßig, daß die Beleuchtungseinrichtung und die Abbildungseinrichtung eine gemeinsame Scaneinrichtung haben, welche einen Beleuchtungsspot über die Probe führt und zugleich den mit dem Beleuchtungsspot zusammenfallenden Spot, an dem die Probe abgebildet wird, in Bezug auf den Detektor wieder descannt, so daß das Einzelbild ruhend in der Detektionsebene ist. Bei einem solchen Aufbau kann man die Zoomoptik in dem gemeinsamen Teil von Beleuchtungs- und Abbildungseinrichtung setzen. Sie erlaubt es dann nicht nur, die Anpassung des Einzelbildes an die Größe des Detektors in der Detektionsebene vorzunehmen, sondern erlaubt auch zusätzlich die verfügbare Beleuchtungsstrahlung ohne Randverluste vollständig in die Objektivpupille, welche sich mit Wahl des Objektivs ändern kann, einzukoppeln.

**[0022]** Ein strahlungsintensitätsabhängiges Übersprechen zwischen nebeneinanderliegenden Pixeln des Detektorarrays kann, wie bereits eingangs erwähnt, bei Umverteilung mittels Lichtleitfaserbündel durch geeignete Anordnung der Lichtleitfasern im Bündel reduziert werden. Zusätzlich oder alternativ ist es auch möglich, eine Kalibrierung durchzuführen. Dazu wird jede Lichtleitfaser nacheinander mit Strahlung beaufschlagt und das Störsignal in benachbarten Pixeln erfaßt. Auf diese Weise wird eine Kalibriermatrix aufgestellt, mit der bei der späteren Mikroskopie der Probe ein strahlungsintensitätsabhängiges Übersprechen nebeneinanderliegender Pixel korrigiert wird.

**[0023]** Die Auflösung der Beugungsstruktur des Einzelbildes erlaubt es zusätzlich, eine Bewegungsrichtung des Spots zu ermitteln, entlang dieser während des Abtastens der Probe verschoben wird. Diese Bewegungsrichtung ist zwar grundsätzlich aus der Mechanik des Scanners (beispielsweise eines Scanspiegels oder eines beweglichen Probenstückes) be-

kannt, jedoch ergeben sich hier mechanisch bedingte Restungenauigkeiten. Diese können eliminiert werden, indem Signale einzelner Pixel des Detektorarrays mittels Kreuzkorrelation ausgewertet werden. Dabei macht man sich zunutze, daß sich, bezogen nebeneinanderliegende Bildpixel in der Probe aufgrund der beugungsbegrenzten Abbildung des Spots in einem gewissen Maß überlappen, ihre Zentren jedoch nebeneinander liegen. Unterzieht man die Signale solcher Bildpixel einer Kreuzkorrelation, kann man eine Restungenauigkeit, welche aufgrund unvermeidlicher Toleranzen der Scanmechanik verbleibt, reduzieren bzw. vollständig eliminieren.

**[0024]** Neben der erhöhten Auflösung läßt sich über die räumliche und zeitliche Korrelation der Signale aus einer Meßreihe der einzelnen Detektorelemente (die Bildpixeln in der Detektionsebene zugeordnet sind) eine zeitliche Veränderung der Fluoreszenz im vom Spot erfaßten Detektionsvolumen erfassen, z. B. können aus einer zeitlichen Korrelation wie bei der Fluoreszenzkorrelationspektroskopie Diffusionskoeffizienten bestimmt werden und auch durch das Einbeziehen der räumlichen Korrelation zwischen Bildpixeln gerichtete Diffusion und Diffusionsbarrieren visualisiert werden. Bewegungsabläufe der Fluoreszenzmoleküle sind darüber hinaus auch für Trackinganwendungen von großem Interesse, da dort der Beleuchtungsspot der Bewegung der Fluoreszenzmoleküle folgen soll. Die hier beschriebene Anordnung erlaubt es hochgenau die Bewegungsrichtung schon innerhalb einer Pixelbeleuchtungszeit zu ermitteln. Es ist deshalb als Weiterbildung bevorzugt, daß Veränderungen in der Probe erfaßt werden, indem bei in der Probe ruhendem Punkt- oder Linien-Spot eine zeitliche Veränderung des beugungsbegrenzten Einzelbildes ermittelt und ausgewertet wird.

**[0025]** Das erfindungsgemäße Vorgehen ermöglicht weiter bei gescannter Beleuchtung die Beleuchtungsverteilung zu modifizieren, beispielsweise mittels eines Phasenfilters. Kann damit sehr einfach das Verfahren realisiert werden, wie es beschrieben ist in Gong et al., Opt. Let., 34, 3508 (2009).

**[0026]** Soweit hier ein Verfahren beschrieben wird, realisiert ein Steuergerät diese Verfahrensschritte im Betrieb des Mikroskops.

**[0027]** Es versteht sich, daß die vorstehend genannten und die nachstehend noch zu erläuternden Merkmale nicht nur in den angegebenen Kombinationen, sondern auch in anderen Kombinationen oder in Alleinstellung einsetzbar sind, ohne den Rahmen der vorliegenden Erfindung zu verlassen.

**[0028]** Nachfolgend wird die Erfindung beispielsweise anhand der beigefügten Zeichnungen, die auch erfindungswesentliche Merkmale offenbaren, noch näher erläutert. Es zeigen:

**[0029]** Fig. 1 eine Schemadarstellung eines Laser-Scanning-Mikroskops zur hochauflösenden Mikroskopie,

**[0030]** Fig. 2 eine vergrößerte Darstellung einer Detektoreinrichtung des Mikroskops der Fig. 1;

**[0031]** Fig. 3 und Fig. 4 Draufsichten auf mögliche Ausführungsformen der Detektoreinrichtung 19 in einer Detektionsebene,

**[0032]** Fig. 5 eine Weiterbildung des Mikroskops der Fig. 1 durch eine Zoom-Optik zur Anpassung der Größe des Detektorfeldes,

**[0033]** Fig. 6 eine Abwandlung des Mikroskops der Fig. 5 hinsichtlich der Zoom-Optik sowie hinsichtlich einer Weiterbildung zur mehrfarbigen Abbildung,

**[0034]** Fig. 7 eine Abwandlung des Mikroskops der Fig. 1, wobei die Abwandlung die Detektoreinrichtung betrifft, und

**[0035]** Fig. 8 eine Abwandlung der Detektoreinrichtung 19 der Fig. 7.

**[0036]** Fig. 1 zeigt schematisch ein Laserscanningmikroskop 1, das zum Mikroskopieren einer Probe 2 ausgebildet ist. Das Laserscanningmikroskop (nachfolgend als LSM abgekürzt) 1 wird von einem Steuergerät C gesteuert und umfaßt einen Beleuchtungsstrahlengang 3 sowie einen Abbildungsstrahlengang 4. Der Beleuchtungsstrahlengang beleuchtet einen Spot in der Probe 2, und der Abbildungsstrahlengang 4 bildet diesen Spot beugungsbegrenzt zur Detektion ab. Beleuchtungsstrahlengang 3 und Abbildungsstrahlengang 4 teilen sich eine Vielzahl von Elementen. Dies ist aber ebenso wenig zwingend, wie eine gescannte Spot-Beleuchtung der Probe 2. Diese könnte auch weitfeldbeleuchtet werden.

**[0037]** Die Beleuchtung der Probe 2 erfolgt im LSM 1 mittels eines bereitgestellten Laserstrahls 5, der über einen nicht weiter funktionell erforderlichen Umlenkspiegel 6 und eine Linse 7 auf einen Spiegel 8 eingekoppelt wird. Der Spiegel 8 sorgt dafür, daß der Laserstrahl 5 unter einem Reflexionswinkel auf einen Emissionsfilter 9 fällt. Zur übersichtlicheren Darstellung ist für den Laserstrahl 5 lediglich dessen Hauptachse eingezeichnet.

**[0038]** Nach Reflexion am Emissionsfilter 9 wird der Laserstrahl 5 von einem Scanner 10 zweiachsig abgelenkt und mittels Linsen 11 und 12 durch ein Objektiv 13 in einen Spot 14 in der Probe 2 fokussiert. Der Spot ist dabei in der Darstellung der Fig. 1 punktförmig, es ist jedoch auch ein linienförmiger Spot möglich. Im Spot 14 angeregte Fluoreszenzstrahlung wird über das Objektiv 13, die Linsen 11 und 12 wieder zum Scanner 10 gelangt, nachdem in Abbildungsrichtung

wiederum ein ruhender Lichtstrahl vorliegt. Dieser fällt durch die Emissionsfilter 9 und 15, welche die Funktion haben, die Fluoreszenzstrahlung im Spot 14 hinsichtlich ihrer Wellenlänge zu selektieren und insbesondere von der Beleuchtungsstrahlung des Laserstrahls 5, die beispielsweise als Anregungsstrahlung dienen kann, zu trennen. Eine Linse 16 sorgt dafür, daß insgesamt der Spot 14 in ein beugungsbegrenztes Bild 17 abgebildet wird, welches in einer Detektionsebene 18 liegt. Die Detektionsebene 18 ist eine konjugierte Ebene zur Ebene, in welcher der Spot 14 in der Probe 2 liegt. Das Bild 17 des Spots 14 wird in der Detektionsebene 18 von einer Detektoreinrichtung 19 aufgenommen, die nachfolgend anhand der Fig. 2 bis Fig. 4 näher erläutert wird. Wesentlich ist hier, daß die Detektoreinrichtung 19 das beugungsbegrenzte Bild 17 des Spots 14 in der Detektionsebene 18 räumlich auflöst. Die Intensitätsverteilung des Spots über den Detektionsquerschnitt (Gaussverteilung) in 18 ist als 18a darunter in Fig. 1 dargestellt.

**[0039]** Das Steuergerät C steuert alle Komponenten des LSM 1, insbesondere Scanner 10 und Detektoreinrichtung 19. Das Steuergerät nimmt für verschiedene Scanstellungen die Daten jedes einzelnen Bildes 17 auf, analysiert dessen Beugungsstruktur und erzeugt ein hochaufgelöstes Gesamtbild der Probe 2.

**[0040]** Das LSM 1 der Fig. 1 ist exemplarisch für einen einzigen Spot, der auf der Probe abgetastet wird, dargestellt. Es kann jedoch zugleich auch zur Abtastung gemäß einem Linien-Spot verwendet werden, der sich beispielsweise senkrecht zur Zeichnungsebene der Fig. 1 erstreckt. Auch ist es möglich, das LSM 1 der Fig. 1 so auszuführen, daß mehrere nebeneinanderliegende Punkt-Spots in der Probe abgetastet werden. Ihre entsprechenden Einzelbilder 17 liegen dann in der Detektionsebene 18 ebenfalls nebeneinander. Die Detektoreinrichtung 19 ist dann entsprechend ausgestaltet, um die nebeneinanderliegenden Einzelbilder 17 in der Detektionsebene 18 zu erfassen.

**[0041]** Die Detektoreinrichtung 19 ist vergrößert in Fig. 2 dargestellt. Sie besteht aus einem Lichtleitfaserbündel 20, welches ein Detektorarray 24 speist. Das Lichtleitfaserbündel 20 ist aus Einzellichtfasern 21 aufgebaut. Die Enden der Lichtleitfasern 21 bilden den Lichtleitfaserbündeleingang 22, der in der Detektionsebene 18 liegt. Die einzelnen Enden der Lichtleitfasern 21 stellen somit Pixel dar, mit denen das beugungsbegrenzte Bild 17 des Spots 14 aufgenommen wird. Da der Spot 14 in der Ausführungsform der Fig. 1 exemplarisch ein Punkt-Spot ist, ist das Bild 17 ein Airy-Scheibchen, dessen Ausdehnung innerhalb des Kreises liegt, welcher in den Fig. 1 und Fig. 2 die Detektionsebene 18 veranschaulicht. Die Ausdehnung des Lichtleitfaserbündeleingangs 22 ist also so groß, daß damit die Ausdehnung der Airy-Scheibe abgedeckt wird. Die einzelnen Lichtleitfasern 21 im

Leichtleitfaserbündel **20** sind an ihren Ausgängen in eine andere geometrische Anordnung gebracht, als am Lichtleitfaserbündeleingang **22**, nämlich in Form eines längserstreckten Steckers **23**, in dem die ausgangsseitigen Enden der Lichtleitfasern **21** nebeneinander liegen. Der Stecker **23** ist passend zur geometrischen Anordnung der Detektorzeile **24** ausgebildet, d. h. jedes ausgangsseitige Ende einer Lichtleitfaser **21** liegt genau vor einem Pixel **25** der Detektorzeile **24**.

**[0042]** Die geometrische Ausdehnung des Umverteilungselementes ist ganz grundsätzlich, d. h. unabhängig von seiner Realisierung, die in **Fig. 4** durch ein Faserbündel erfolgt, eingangsseitig an die Ausdehnung des Einzelbildes (bzw. im Falle mehrerer Punkt-Spots der nebeneinanderliegenden Einzelbilder) angepaßt. Das Umverteilungselement hat die Funktion, aus der Detektionsebene **18** die Strahlung so aufzunehmen, daß gemessen am Abtasttheorem die Intensitätsverteilung des Einzelbildes **17** bezogen auf die Beugungsgrenze überabgetastet wird, das Umverteilungselement hat also in der Detektionsebene **18** liegende Pixel (in der Bauweise der **Fig. 3** durch die Eingangsenden der Lichtleitfasern gebildet), die mindestens um den Faktor 2 kleiner sind als die kleinste auflösbare Struktur, die sich aus der Beugungsgrenze unter Berücksichtigung des Abbildungsmaßstabes in der Detektionsebene **18** ergibt.

**[0043]** Natürlich ist die Verwendung eines Steckers **23** nur eine von vielen Möglichkeiten, die ausgangsseitigen Enden der Lichtleitfasern **21** vor den Pixeln **25** anzuordnen. Gleichermäßen ist es möglich, andere Verbindungen zu verwenden. Auch können die einzelnen Pixel **25** direkt mit den Lichtleitfasern **21** fusioniert werden. Es ist nicht einmal erforderlich, eine Detektorzeile **24** zu verwenden; stattdessen kann für jedes Pixel **25** ein einzelner Detektor verwendet werden.

**[0044]** Die **Fig. 3** und **Fig. 4** zeigen mögliche Ausführungsformen des Lichtleitfaserbündeleingangs **22**. Die Lichtleitfasern **21** können am Lichtleitfaserbündeleingang **22** miteinander verschmolzen werden. Hierdurch wird ein höherer Füllfaktor erreicht, d. h. Lücken zwischen den einzelnen Lichtleitfasern **21** am Lichtleitfaserbündeleingang **22** werden minimiert. Das Verschmelzen führt andererseits zu einem gewissen Übersprechen zwischen benachbarten Lichtleitfasern. Möchte man dieses vermeiden, können die Lichtleitfasern geklebt werden. Auch ist eine quadratische Anordnung der Enden der Lichtleitfasern **21** möglich, wie **Fig. 4** zeigt.

**[0045]** Bevorzugt sind die einzelnen Lichtleitfasern **21** so den einzelnen Pixeln **25** des Detektorarrays **24** zugeordnet, daß am Lichtleitfaserbündeleingang **22** nebeneinander liegende Lichtleitfasern **21** auch am Detektorarray **24** nebeneinander liegen. Durch

dieses Vorgehen minimiert man Übersprechen zwischen benachbarten Pixeln **25**, das beispielsweise durch Streustrahlung oder in der Signalverarbeitung der einzelnen Pixel **25** auftreten kann. Ist das Detektorarray **24** eine Zeile, kann man die entsprechende Anordnung dadurch erreichen, indem die Reihenfolge der Einzellichtleitfasern auf der Detektorzeile durch eine Spirale festgelegt wird, welche in Draufsicht auf die Detektionsebene **18** die Einzellichtleitfasern nacheinander verbindet.

**[0046]** **Fig. 3** zeigt weiter noch Blindfasern **26**, die in den Ecken der Anordnung der Lichtleitfasern **21** am Lichtleitfaserbündeleingang **22** liegen. Diese Blindfasern sind nicht auf Pixel **25** des Detektorarrays geführt. An den Orten der Blindfasern wäre keine für die Auswertung der Signale erforderliche Signalintensität mehr vorhanden. Man kann dadurch die Anzahl der Lichtleitfasern **21** und damit die Anzahl der Pixel **25** in der Detektorzeile **24** oder dem Detektorarray so reduzieren, daß beispielsweise mit 32 Pixeln gearbeitet werden kann. Solche Detektorzeilen **24** sind bereits anderweitig in Laser-Scanning-Mikroskopen im Einsatz, was den Vorteil hat, daß die Signalauswerteelektronik in solchen Laser-Scanning-Mikroskopen nur einmal vorgehalten werden muß und zwischen einer bereits bestehenden Detektorzeile **24** und der durch die Detektoreinrichtung **19** hinzugekommenen weiteren Detektorzeile **24** umgeschaltet wird.

**[0047]** Gemäß **Fig. 4** werden Lichtleitfasern mit quadratischer Grundform für das Bündel verwendet. Sie haben ebenfalls einen hohen Abdeckungsgrad in der Detektionsebene, sammeln die Strahlung also effizient auf.

**[0048]** **Fig. 5** zeigt eine Weiterbildung des LSM **1** der **Fig. 1**, in dem der Detektionsebene **18** eine Zoomoptik **27** vorgeordnet ist. Die konjugierte Ebene, in welcher bei der Bauweise der **Fig. 1** die Detektionsebene **18** angeordnet wurde, bildet nun eine Zwischenbildebene **28**, aus welcher die Zoomoptik **27** die Strahlung aufnimmt und zur Detektionsebene **18** leitet. Die Zoomoptik **27** erlaubt es, das Bild **17** optimal an die Ausdehnung des Eingangs der Detektoreinrichtung **19** anzupassen.

**[0049]** **Fig. 6** zeigt eine nochmalige Abwandlung des Laser-Scanning-Mikroskops **1** der **Fig. 1**. Zum einen ist hier die Zoomoptik als Zoomoptik **29** so angeordnet, daß sie im Teil des Strahlenganges liegt, der sowohl vom Beleuchtungsstrahlengang **3** als auch vom Abbildungsstrahlengang **4** durchlaufen wird. Man erhält damit den Vorteil, daß nicht nur die Größe des Bildes **17** auf der Eingangsseite der Detektoreinrichtung **19** angepaßt werden kann, es kann auch bezüglich des Abbildungsstrahlenganges **4** die Pupillenfüllung des Objektivs **13** und damit die Ausnutzung des Laserstrahls **5** angepaßt werden.

**[0050]** Zusätzlich ist in **Fig. 6** das LSM **1** noch zweikanalig ausgebildet, indem dem Emissionsfilter **9** ein Stahlteiler nachgeordnet ist, welcher die Strahlung in zwei getrennte Farbkanäle abtrennt. Die entsprechenden Elemente der Farbkanäle entsprechen jeweils den Elementen, die im LSM **1** der **Fig. 1** dem Emissionsfilter **9** in Abbildungsrichtung nachgeordnet sind. Die Farbkanäle sind in der Darstellung der **Fig. 6** durch das Bezugszeichensuffix „a“ bzw. „b“ unterschieden.

**[0051]** Natürlich ist die Realisierung mit zwei Farbkanälen unabhängig von der Verwendung der Zoomoptik **29**. Die Kombination hat jedoch den Vorteil, daß eine Zoomoptik **27**, die in beiden Farbkanälen jeweils eigenständig vorgesehen werden müßte und damit doppelt vorhanden wäre, nur einmal erforderlich ist. Selbstverständlich kann jedoch die Zoomoptik **27** auch in der Bauweise gemäß **Fig. 1** zum Einsatz kommen und das LSM **1** der **Fig. 6** kann auch ohne Zoomoptik **29** verwirklicht werden.

**[0052]** **Fig. 7** zeigt eine Abwandlung des LSM **1** der **Fig. 1** hinsichtlich der Detektoreinrichtung **19**.

**[0053]** Die Detektoreinrichtung **19** weist nun einen Facettenspiegel **30** auf, der einzelne Facetten **31** trägt. Die Facetten **31** entsprechen hinsichtlich der Auflösung des Bildes **17** den Enden der Lichtleitfasern **21** am Lichtleitfaserbündeleingang **22**. Die einzelnen Facetten **31** unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Neigung zur optischen Achse des Strahlungseinfalls. Zusammen mit einer Linse **32** und einem Minilinsenarray **33** sowie einem nur der Strahlfaltung dienenden Umlenkspiegel **34** bildet jede Facette **31** einen Flächenabschnitt des Einzelbildes **17** auf ein Pixel **25** eines Detektorarrays **24** ab. Je nach Orientierung der Facetten **31** kann das Detektorarray **24** dabei bevorzugt ein 2D-Array sein, aber auch eine Detektorzeile ist möglich.

**[0054]** **Fig. 8** zeigt eine Weiterbildung der Detektoreinrichtung **19** der **Fig. 7**, in welcher der Linse **32** noch ein refraktives Element **35** vorgeordnet ist, das die Strahlung besonders gut auf eine Detektorzeile verteilt.

**[0055]** Das Detektorarray **24** kann, wie bereits erwähnt, hinsichtlich seiner Geometrie ohne weitere Einschränkungen gewählt werden. Selbstverständlich muß das Umverteilungselement in der Detektoreinrichtung **19** dann auf das entsprechende Detektorarray angepaßt werden. Die einzelnen Pixel, mit denen das Bild **17** aufgelöst wird, sind letztlich hinsichtlich ihrer Größe nicht mehr durch das Detektorarray **24** vorgegeben, sondern durch das Element, welches die Umverteilung der Strahlung aus der Detektorebene **18** bewirkt. Bei einer Airy-Scheibe ergibt sich der Durchmesser der Scheibe bei einer beugungsbegrenzten Abbildung gemäß der Formel  $1,22 \lambda/NA$ ,

wobei  $\lambda$  die mittlere Wellenlänge der abgebildeten Strahlung und NA die numerische Apertur des Objektivs **13** ist. Die Halbwertsbreite ist dann  $0,15 \lambda/NA$ . Um die Hochauflösung zu erreichen, genügt es, die Ortsauflösung bei der Detektion doppelt so groß wie die Halbwertsbreite zu gestalten, d. h. die Halbwertsbreite zweimal abzutasten. Ein Facettenelement **31** bzw. ein Ende einer Lichtleitfaser **21** am Lichtleitfaserbündeleingang **22** darf somit maximal halb so groß wie die Halbwertsbreite des beugungsbegrenzten Einzelbildes sein. Dies gilt natürlich unter Berücksichtigung des Abbildungsmaßstabes, den die Optik nach dem Objektiv **13** bewirkt. Im einfachsten Fall würde also ein  $4 \times 4$ -Array von Pixeln in der Detektorebene **18** pro Halbwertsbreite mehr als genügen. Die Zoomoptik, welche anhand der **Fig. 5** und **Fig. 6** erläutert wurde, erlaubt neben einer Anpassung der Gestalt, daß die Beugungsverteilung des beugungsbegrenzten Bildes **17** des Spots **14** die Eingangsfläche der Detektoreinrichtung **19** optimal ausfüllt, auch noch eine weitere Betriebsart, wenn nämlich mehr als eine Airy-Scheibe in die Detektorebene **18** abgebildet wird. Bei einer Messung, bei der mehr als eine Airy-Scheibe auf die Detektoreinrichtung **19** abgebildet wird, wird Licht aus weiteren Tiefenebenen der Probe **2** an den äußeren Pixeln der Detektoreinrichtung **19** detektiert. Im Zuge der Verarbeitung des Bildes erhält man dabei zusätzliche Signalstärke, ohne daß die Tiefenauflösung des LSM **1** beeinträchtigt wäre. Die Zoomoptik **27** bzw. **29** erlaubt es somit, einen Kompromiß zwischen Signal/Rauschverhältnis des Bildes und Tiefenauflösung einzustellen.

**[0056]** Beim Aufbau eines LSM entsprechend der oben beschriebenen Ausführungsformen wird eine „verschmolzene oder geklebte Multi-Mode-Faser-Anordnung für die Sub-Airy orts aufgelöste Detektion in der Mikroskopie“ verwendet.

**[0057]** Diese Anordnung hat zwei in **Fig. 9** dargestellte Nachteile:

Es ist eine Verteilung von Fasereintrittsflächen **40** dargestellt. Erstens tritt ein Effizienzverlust wegen des geometrischen Füllfaktors zwischen einer effektiven Fläche FK (Faserkern) und einem Totbereich FT um den Faserkern herum (Fasercladding) auf. Zweitens gibt es mechanische Ungenauigkeiten bezüglich der exakten Positionierung der jeweiligen Faserkerne im Faserarray, so dass in der Realität keine ideale Gleichverteilung bzw. Ausrichtung der Faserkerne existiert.

**[0058]** Ziel der Erfindung ist es, eine Anordnung anzugeben, die beide Probleme minimiert. Die Erfindung wird durch die Merkmale der unabhängigen Ansprüche charakterisiert. Bevorzugte Weiterbildungen sind Gegenstand der abhängigen Ansprüche.

**[0059]** Die Erfindung betrifft die Anordnung eines zweidimensionalen (nicht notwendigerweise regel-

mäßigen) Arrays von optischen Elementen vor einem Faserarray zur Minimierung der Totbereiche der Fasern und/oder zur Änderung der Geometrie der Messbereiche der einzelnen Fasern. Dieses Array kann geometrisch sehr viel genauer als die Position der einzelnen Fasern kontrolliert werden kann, so dass eine höhere Präzision der Messung mit dem SR-LSM möglich wird. Die numerische Apertur (NA) des einfallenden Lichtes sollte hierbei deutlich kleiner als die NA der Faser sein, da sonst durch die Umlenkung des Lichtes aus den Totbereichen heraus zu große Winkel der auf die Faser einfallenden Lichtstrahlen entstehen können.

- Das Array kann als Lichttrichter
  - Mit geraden Wänden
  - Mit parabolisch geformten Wänden
  - Mit verspiegelten Wänden

ausgeführt sein.

- Es kann als Prismenzeile aus Glas oder Plastik (PMMA) bestehen
- Es kann aus Linsen (Glas oder Plastik) bestehen
- Eine Herstellung des Arrays kann mittels lithographischer Verfahren (Mikrooptik) erfolgen
- Es kann durch Änderung der Geometrie der verschiedenen Bereiche die geometrische Form oder Größe der Empfangsbereiche der verschiedenen Fasern individuell gestaltet werden. Der Bereich, auf den hin das Licht geleitet wird, sollte kleiner als die empfindliche Fläche der Faser sein. Dadurch können ungewünschte laterale Verschiebungen einzelner Fasern (Fertigungstoleranzen) des Faserbündels zumindest teilweise ausgeglichen werden.

**[0060]** Im Folgenden wird die Erfindung anhand der **Abb. 10–Abb. 14** näher erläutert. Die Bezugszeichen in **Fig. 9–Fig. 14** bedeuten:

#### Bezugszeichenliste

<b>FK</b>	Faserkern
<b>FT</b>	Totbereich
<b>40</b>	Eintrittsfläche
<b>41</b>	Träger
<b>42</b>	Verspiegelung
<b>43</b>	Einzellinse
<b>44</b>	Linsenarray
<b>45</b>	Aufsatz
<b>46</b>	Mittbereich
<b>47</b>	abgeschrägter Bereich
<b>48</b>	Zwischenbildebene
<b>49 1, 2, 3</b>	Lichtstrahlenbündel
<b>50</b>	Linsenarray
<b>51</b>	Innere Geometrie
<b>52</b>	Äußere Geometrie
<b>E</b>	Lichteintrittsflächen

**[0061]** Ein erfindungsgemässes Array von lichtbeeinflussenden Elementen ist erfindungsgemäss so

dimensioniert dass Eintrittslicht in einen Bereich konzentriert oder fokussiert ist, der vorzugsweise kleiner als der optisch aktive Kern der Faser ist, wodurch Positionierfehler und Größenunterschiede der Einzelfasern ausgeglichen werden können.

**[0062]** Die numerische Apertur (NA) des auf das Faserarray fallenden Lichtes ist viel kleiner als die NA der einzelnen Fasern des Arrays. Daher kann der Winkel des einfallenden Lichtes vergrößert werden, ohne dass wegen der dann größer werdenden NA das Licht nicht mehr von der Faser aufgenommen werden könnte. Durch geeignete, verspiegelte „Lichttrichter“ (Compound Parabolic Concentrator) könnte also Licht aus den beschriebenen Totbereichen auf den eigentlichen Faserkern hin abgebildet werden. Das Prinzip ist (für ein eindimensionales Faserarray) in **Fig. 10** dargestellt.

**[0063]** In **Fig. 10** sind in Lichtrichtung L vor den Fasereintrittsflächen **40** angeordnete „Lichttrichter“ angeordnet, die aus verspiegelten keilförmigen Elementen, bestehend aus Träger **41** und Verspiegelung **42**, bestehen die sich in Lichtrichtung konisch verjüngen und dadurch ein einer Entfernung zu den Flächen **40** gegen die Lichtrichtung L eine in Bezug zu den Faseroberflächen vergrößerte Lichteintrittsfläche aufweisen.

**[0064]** Dadurch ist gewährleistet dass jeweils das gesamte auf die Querschnitte gelangende Licht jeweils auf eine Fasereintrittsfläche **40** gelangt. Dies wird auch durch die die verspiegelte Ausführung der Seitenflächen der beschriebenen „Lichttrichter,“ gewährleistet.

**[0065]** In **Fig. 1a** ist ein schematischer Querschnitt entlang einer Schnittfläche S in **Fig. 1** in Lichtrichtung dargestellt.

**[0066]** Durch diese Lichttrichter wurde erst einmal der Totbereich deutlich verkleinert. Wenn zudem die untere (kleinere) Ausgangsöffnung des Trichters kleiner als der aktive Kern der Glasfaser gewählt wird, so würden leichte mechanische Verschiebungen einzelner Fasern zueinander (Toleranzen bei der Fertigung des Faserbündels) nicht mehr stören, solange nur das Lichttrichterarray genau genug geformt ist. Durch lithographische Verfahren (Mikrooptik) lässt sich das problemlos erreichen.

**[0067]** In **Fig. 11** ist der Fasern ein aufgesetzter Glasblock mit einem Linsenarray **44**, bestehend aus konkaven Einzellinsen **43**, vorgeordnet wobei jede Einzellinse den gesamten Lichteinfall LF entlang ihrer Lichtöffnungsfläche in eine Lichteintrittsfläche **40** fokussiert.

**[0068]** Idealerweise wird dabei das Array **44** gleich so dimensioniert, dass der Bereich, auf den das Licht konzentriert wird, wiederum kleiner als der aktive

Kern einer Faser ist, um die möglichen Positionierfehler der einzelnen Fasern gleich mit auszugleichen. Hierdurch geht keine Lichtenergie verloren und es wird das gesamte Licht auf die Fasereintrittsflächen transportiert.

**[0069]** In **Abb. 12** sind kantige Lichteintrittsflächen **46, 47** eines Aufsatzes **45** vorgesehen so dass jeweils in einem Mittenbereich **46** das Licht unabgelenkt in Richtung der Faser gelangt und in abgelenkten Bereichen **57** das Licht in Richtung der jeweiligen Fasereintrittsfläche gebrochen wird. Auch hier gelangt vorteilhaft fast der gesamte Lichtquerschnitt pro Element **46, 47** in das Innere der Faser.

**[0070]** Eine weitere Möglichkeit ist es, jede einzelne, individuelle Faser (inkl. des zugehörigen Totbereichs) vergrößert in eine Zwischenbildebene **48** die zur Probenebene optisch konjugiert ist, abzubilden, und zwar so, dass sich die jeweiligen sensitiven Bereiche an den Rändern jeweils berühren. Dies ist in **Abb. 13** dargestellt, in der sich ein Linsenarray **50**, bestehend aus beispielsweise holografisch hergestellten Einzellinsen vor den Lichtleitereingängen **40** befindet und die Ebene der Lichtleitereingänge vergrößert in die Zwischenbildebene **48** abbildet. Dargestellt sind Einzelstrahlenbündel **49.1, 2, 3** in einer Zwischenbildebene **48**.

**[0071]** Das Bündel **49,1** durchtritt die Zylinderlinse mittig ohne nennenswerte Ablenkung während die Bündel **49,2** und **49,3** in Randbereichen der jeweiligen Zylinderlinsen jeweils in Richtung der jeweiligen Faserbündel umgelenkt werden.

**[0072]** Ein wichtiger Aspekt der Erfindung ist auch, dass (in beschränktem Maße) relativ einfach von der quadratischen Anordnung abweichende Geometrien der Zuordnung der empfindlichen Fläche zu den einzelnen Fasern vorgenommen werden können, wie es beispielsweise in **Abb. 14** angedeutet ist.

**[0073]** **Abb. 14** zeigt das Prinzip einer von der regelmäßigen quadratischen Anordnung abweichenden Zuordnung der Bereiche.

**[0074]** Durch die lithographischen Herstellungsverfahren lassen sich hier im Prinzip beliebige Bereichsgrenzen formen. Limitierend ist hier lediglich, dass die Ablenkwinkel von den Bereichsgrenzen hin zum Kern der Glasfaser nicht größer als der Akzeptanzwinkel der Glasfaser werden dürfen. Schematisch dargestellt sind unterschiedlich geformte Lichteintrittsflächen **E** eines Optikaufsatzes **OA** vor dem Faserbündel mit den Eintrittsflächen **40**.

**[0075]** Jedem Bereich des Aufsatzes sind eine – oder mehrere Lichteintrittsöffnungen, hier jeweils eine, zugeordnet.

**[0076]** Hier handelt es sich um rechteckige oder quadratische oder sechseckige Eintrittsflächen, wobei in einer inneren runden Geometrie **51** in Bezug auf eine äußere rechteckige Geometrie **52** unterschiedlich große und unterschiedlich geformte Lichteintrittsflächen das Licht jeweils zu den einzelnen Fasern **40** geleiten.

**[0077]** Beispielsweise kann durch den inneren Bereich **51** hier ein rundes Pinhole simuliert werden, dessen Lichtfasern separat zu den Fasern des Außenbereichs **52** durch die Detektorelemente ausgelesen werden.

**[0078]** Auch mehrere konzentrische Kreise von Einzelelemente sind hier vorstellbar die separat durch die Detektorelemente ausgelesen werden.

## 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

- EP 2317362 A1 [0002]
- EP 1157297 B1 [0006]
- WO 2006127692 [0007]
- DE 102006021317 [0007]

### Zitierte Nicht-Patentliteratur

- C. Müller und J. Enderlein, Physical Review Letters, 104, 198101 (2010) [0002]
- Gong et al., Opt. Lett., 34, 3508 (2009) [0025]

## Patentansprüche

1. Mikroskop zur hochauflösenden Scanning-Mikroskopie einer Probe (2), mit

- einer Beleuchtungseinrichtung (3) zum Beleuchten der Probe (2),
- einer Abbildungseinrichtung (4) zum Scannen mindestens eines Punkt- oder Linien-Spots (14) über die Probe (2) und zum Abbilden des Punkt- oder Linien-Spots (14) in ein beugungsbegrenztes, ruhendes Einzelbild (17) unter einem Abbildungsmaßstab in eine Detektionsebene (18),
- einer Detektoreinrichtung (19) zum Erfassen des Einzelbildes (17) in der Detektionsebene (18) für verschiedene Scanpositionen mit einer Ortsauflösung, welche unter Berücksichtigung des Abbildungsmaßstabes in mindestens einer Ausdehnung/Dimension mindestens doppelt so groß ist wie eine Halbwertsbreite des beugungsbegrenzten Einzelbildes (17),
- einer Auswerteeinrichtung (C) zum Auswerten einer Beugungsstruktur des Einzelbildes (17) für die Scanpositionen aus Daten der Detektoreinrichtung (19) und zum Erzeugen eines Bildes der Probe (17), das eine Auflösung aufweist, die über die Beugungsgrenze gesteigert ist, wobei
- die Detektoreinrichtung (19) aufweist:
- ein Detektorarray (24), das Pixel (25) aufweist und größer ist als das Einzelbild (17), und
- ein nicht-abbildendes Umverteilungselement (20–21; 30–34; 30–35), das dem Detektorarray (24) vorgeordnet ist und die Strahlung aus der Detektionsebene (18) nicht-abbildend auf die Pixel (25) des Detektorarrays (24) verteilt.

2. Mikroskop nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Umverteilungselement ein Bündel (20) aus Lichtleitfasern (21), vorzugsweise aus Multi-Mode Lichtleitfasern, umfaßt, welches einen in der Detektionsebene (18) angeordneten Eingang (22) und einen Ausgang (23) aufweist, an dem die Lichtleitfasern (21) in einer geometrischen Anordnung, welche sich von der des Eingangs (22) unterscheidet, an den Pixeln (25) des Detektorarrays (24) enden.

3. Mikroskop nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Lichtleitfasern (21) so vom Eingang (22) zum Ausgang (23) laufen, daß am Ausgang (23) benachbarte Lichtleitfasern (21) auch am Eingang (22) benachbart sind, um ein strahlungsintensitätsabhängiges Übersprechen nebeneinanderliegender Pixel (25) zu minimieren.

4. Mikroskop nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Umverteilungselement einen Spiegel (30) mit unterschiedlich geneigten Spiegelementen (31), insbesondere einen Facettenspiegel, ein DMD oder einen adaptiven Spiegel, umfaßt, der Strahlung aus der Detektionsebene (18) auf die Pixel (25) des Detektorarrays (24) lenkt, wobei die Pi-

xel (25) des Detektorarrays (25) eine geometrische Anordnung haben, welche sich von der der Spiegelemente (31) unterscheidet.

5. Mikroskop nach einem der obigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Abbildungseinrichtung (4) eine der Detektionsebene (18) in Abbildungsrichtung vorgeordnete Zoomoptik (27) zur Anpassung der Größe des Einzelbildes (17) an die der Detektoreinrichtung (19) aufweist.

6. Mikroskop nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Beleuchtungseinrichtung (3) und die Abbildungseinrichtung (4) sich eine Scaneinrichtung (10) teilen, so daß die Beleuchtungseinrichtung (3) die Probe (2) mit einem beugungsbegrenzten Punkt- oder Linien-Spot beleuchtet, der mit dem von der Abbildungseinrichtung abgebildeten Spot (14) zusammenfällt, wobei die Zoomoptik (27) so angeordnet ist, daß sie auch Bestandteil der Beleuchtungseinrichtung (3) ist.

7. Mikroskop nach einem der obigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Detektorarray (24) eine Detektorzeile, bevorzugt eine APD- oder PMT-Zeile ist.

8. Verfahren zur hochauflösenden Scanning-Mikroskopie einer Probe (2), bei dem

- die Probe (2) beleuchtet wird,
- mindestens ein scannend über die Probe (2) geführter Punkt- oder Linien-Spot (14) in ein Einzelbild (17) abgebildet wird, wobei der Spot (14) unter einem Abbildungsmaßstab beugungsbegrenzt in das Einzelbild (17) abgebildet wird und das Einzelbild (17) ruhend in einer Detektionsebene (18) liegt,
- für verschiedene Scanpositionen das Einzelbild (17) mit einer Ortsauflösung erfaßt wird, welche unter Berücksichtigung des Abbildungsmaßstabes mindestens doppelt so groß ist wie eine Halbwertsbreite des beugungsbegrenzten Einzelbildes (17), so daß eine Beugungsstruktur des Einzelbildes (17) erfaßt wird,
- für jede Scanposition die Beugungsstruktur des Einzelbildes (17) ausgewertet wird und ein Bild der Probe (2) erzeugt wird, das eine Auflösung aufweist, die über die Beugungsgrenze gesteigert ist, wobei
- ein Detektorarray (24) bereitgestellt wird, das Pixel (25) aufweist und größer ist als das Einzelbild (17), und
- Strahlung des Einzelbildes aus der Detektionsebene (18) nicht-abbildend auf die Pixel (25) des Detektorarrays (24) umverteilt wird.

9. Verfahren nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Strahlung des Einzelbildes (17) mittels eines Bündels (20) aus Lichtleitfasern (21), vorzugsweise aus Multi-Mode Lichtleitfasern, umverteilt wird, welches einen in der Detektionsebene (18) angeordneten Eingang (22) und einen Ausgang (23)

aufweist, an dem die Lichtleitfasern (21) in einer geometrischen Anordnung, welche sich von der des Eingangs (22) unterscheidet, an den Pixeln (25) des Detektorarrays (24) enden.

10. Verfahren nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Lichtleitfasern (21) so vom Eingang (22) zum Ausgang (23) geführt werden, daß am Ausgang (23) benachbarte Lichtleitfasern (21) auch am Eingang (22) benachbart sind, um ein strahlungsintensitätsabhängiges Übersprechen nebeneinanderliegender Pixel (25) zu minimieren.

11. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Bündel (20) aus Lichtleitfasern (21) und das Detektorarray (24) kalibriert werden, indem jede Lichtleitfaser (21) einzeln mit Strahlung beaufschlagt wird, Störsignal in Pixeln (25), die am Ausgang (23) benachbarten Lichtleitfasern (21) zugeordnet sind, erfaßt werden und eine Kalibriermatrix aufgestellt wird, mit der bei Mikroskopie der Probe (2) ein strahlungsintensitätsabhängiges Übersprechen nebeneinanderliegender Pixel (25) korrigiert wird.

12. Verfahren nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Strahlung des Einzelbildes (17) mittels eines Spiegels (30) mit unterschiedlich geneigten Spiegelementen (31), insbesondere einen Facettenspiegel, ein DMD oder einen adaptiven Spiegel, umverteilt wird, wobei durch den Spiegel (30) die Strahlung aus der Detektionsebene (18) auf die Pixel (25) des Detektorarrays (24) geleitet wird und die Pixel (25) des Detektorarrays (24) eine geometrische Anordnung haben, welche sich von der der Spiegelemente (31) unterscheidet

13. Verfahren nach einem der obigen Verfahrensansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Detektorarray (24) eine Detektorzeile, bevorzugt eine APD- oder PMT-Zeile verwendet wird.

14. Verfahren nach einem der obigen Verfahrensansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine Bewegungsrichtung des Scannens des Punkt- oder Linien-Spots (14) ermittelt wird, indem Signale einzelner Pixel (25) des Detektorarrays (24) mittels Kreuzkorrelation ausgewertet werden.

15. Verfahren nach einem der obigen Verfahrensansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß Veränderungen in der Probe (2) erfaßt werden, indem bei in der Probe (2) ruhendem Punkt- oder Linien-Spot (14) eine zeitliche Veränderung des beugungsbegrenzten Einzelbildes (17) ermittelt und ausgewertet wird.

16. Mikroskop und/oder Verfahren nach einen der vorangehenden Ansprüche, wobei dem Bündel aus Lichtleitfasern in Lichtrichtung vorgeordnet die Lichtrichtung beeinflussende Elemente vorgesehen

sind die den Lichteintrittsöffnungen der Einzellichtfasern Detektionslicht zuordnen.

17. Mikroskop und/oder Verfahren Anspruch 16, wobei verspiegelte Elemente vorgeordnet sind die Einzellichtleitfasern zugeordnet sind.

18. Mikroskop und/oder Verfahren nach einen der vorangehenden Ansprüche 16 oder 17, wobei jeder Einzellichtfaser die Licht in Richtung des Detektorarrays überträgt, ein Element vorgeordnet ist.

19. Mikroskop und/oder Verfahren nach einen der vorangehenden Ansprüche 16–18, wobei die Elemente in Lichtrichtung einen abnehmenden Querschnitt aufweisen.

20. Mikroskop und/oder Verfahren nach einen der vorangehenden Ansprüche 16–19, wobei die Elemente röhrenförmig, insbesondere trichterförmig ausgebildet sind.

21. Mikroskop und/oder Verfahren nach einen der vorangehenden Ansprüche 16–20, wobei der untere Querschnitt der Elemente geringer ist als der Durchmesser des optisch wirksamen Faserkerns der Einzellichtfasern.

22. Mikroskop und/oder Verfahren nach einen der vorangehenden Ansprüche 16–21, wobei lichtbrechende Elemente den Einzellichtfasern zugeordnet sind.

23. Mikroskop und/oder Verfahren nach einen der vorangehenden Ansprüche 16–22, wobei die lichtbrechenden Elemente mindestens eine Krümmung aufweisen die das Licht in Richtung der Lichteintrittsöffnungen bündeln.

24. Mikroskop und/oder Verfahren nach einen der vorangehenden Ansprüche 16–23, mit einer Konvexlinse und/oder Plankonvexlinse zur Lichtbündelung.

25. Mikroskop und/oder Verfahren nach einen der vorangehenden Ansprüche 16–24, wobei die lichtbrechenden Elemente prismatische Strukturen sind die den Einzellichtfasern optisch zugeordnet sind.

26. Mikroskop und/oder Verfahren nach einen der vorangehenden Ansprüche 16–25, wobei die prismatische Struktur einen zur Lichtrichtung senkrechten Zentralbereich und Randbereiche mit einem Winkel zur Lichtrichtung ungleich 90 Grad zur Beeinflussung der Lichtrichtung aufweisen.

27. Mikroskop und/oder Verfahren nach einen der vorangehenden Ansprüche 16–26, wobei zumindest einem Teil der Einzelfasern Linsen eines Linsenarrays optisch zugeordnet sind.

28. Mikroskop und/oder Verfahren nach einen der vorangehenden Ansprüche 16–27, wobei das Linsenarray zur Abbildung der Lichteintrittsflächen in eine Zwischenbildebene die mit der Probenebene optisch konjugiert ist zwischen einer Zwischenbildebene und der Ebene der Lichteintrittsflächen angeordnet ist.

29. Mikroskop und/oder Verfahren nach einen der vorangehenden Ansprüche 16–28, wobei durch die lichtbrechenden oder verspiegelten Elemente eine Bündelung des Lichtes in einen Bereich erfolgt, dessen Durchmesser unterhalb des optisch wirksamen Durchmessers der Lichteintrittsöffnungen der Einzelfasern oder des Faserkerns liegt.

30. Mikroskop und/oder Verfahren nach einen der vorangehenden Ansprüche 16–29, wobei die Anordnung der Elemente zur Beeinflussung der Lichtrichtung in unterschiedlichen geometrischen Verteilungen erfolgt.

31. Mikroskop und/oder Verfahren nach einen der vorangehenden Ansprüche 16–30, wobei mindestens ein Element mindestens eine Eintrittsöffnung des Faserbündels beaufschlagt.

32. Mikroskop und/oder Verfahren nach einen der vorangehenden Ansprüche 16–31, wobei vor dem Faserbündel ein lichtdurchlässiges Bauteil angeordnet ist der mehrere unterschiedliche geometrische Verteilungen der Elemente aufweist.

33. Mikroskop und/oder Verfahren nach einen der vorangehenden Ansprüche 16–32, wobei die Einzelelemente zur Beaufschlagung einer unterschiedlichen Anzahl von Fasereintrittsöffnungen eine unterschiedliche Größe aufweisen.

34. Mikroskop und/oder Verfahren nach einen der vorangehenden Ansprüche 16–33, wobei mindestens eine geometrische Kreisstruktur aus Elementen vorgesehen ist.

Es folgen 12 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

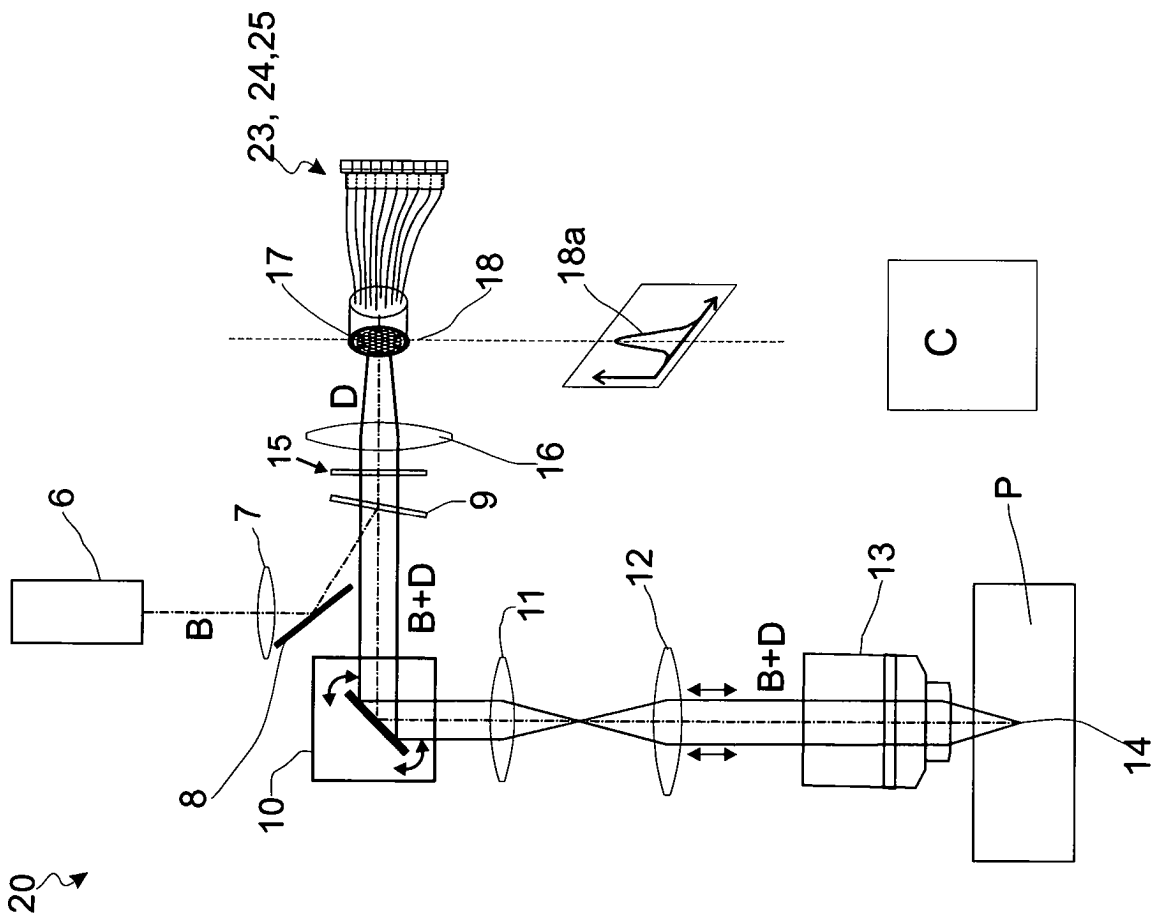
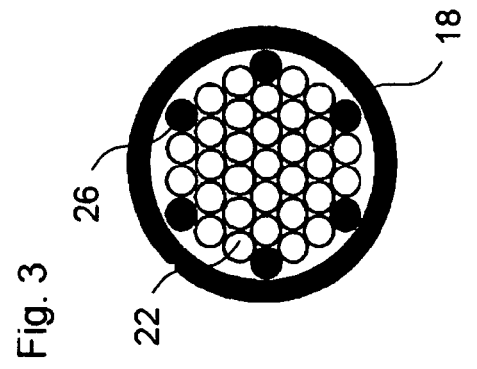
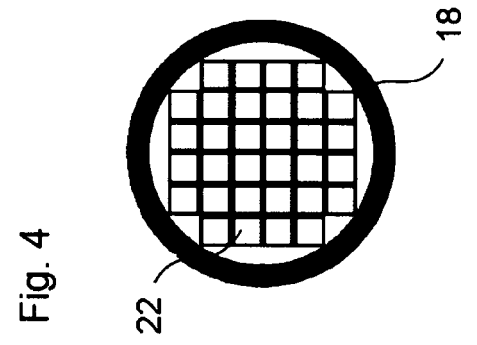
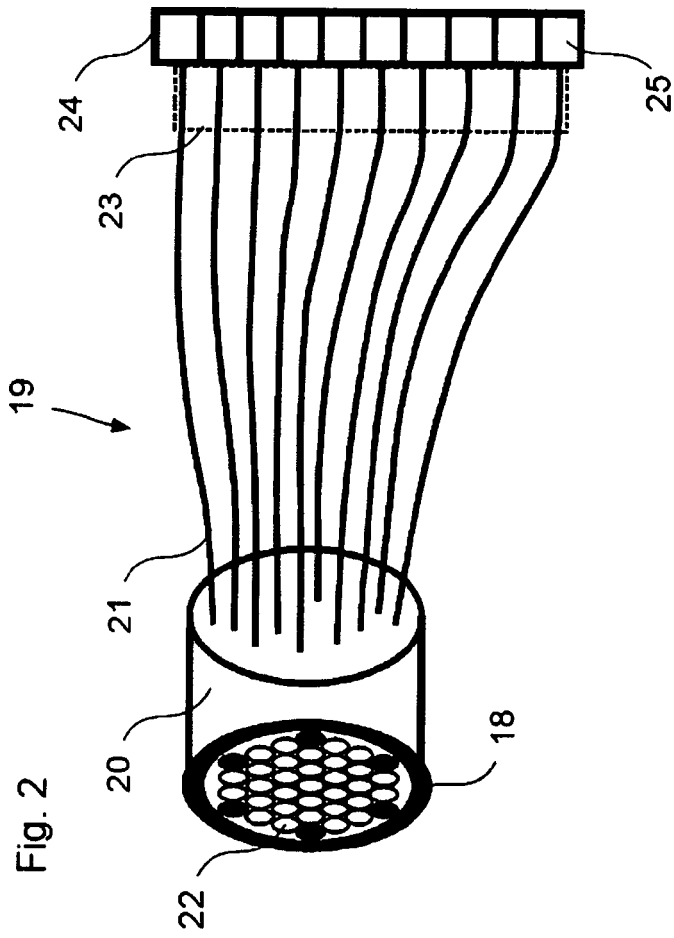


Fig.1



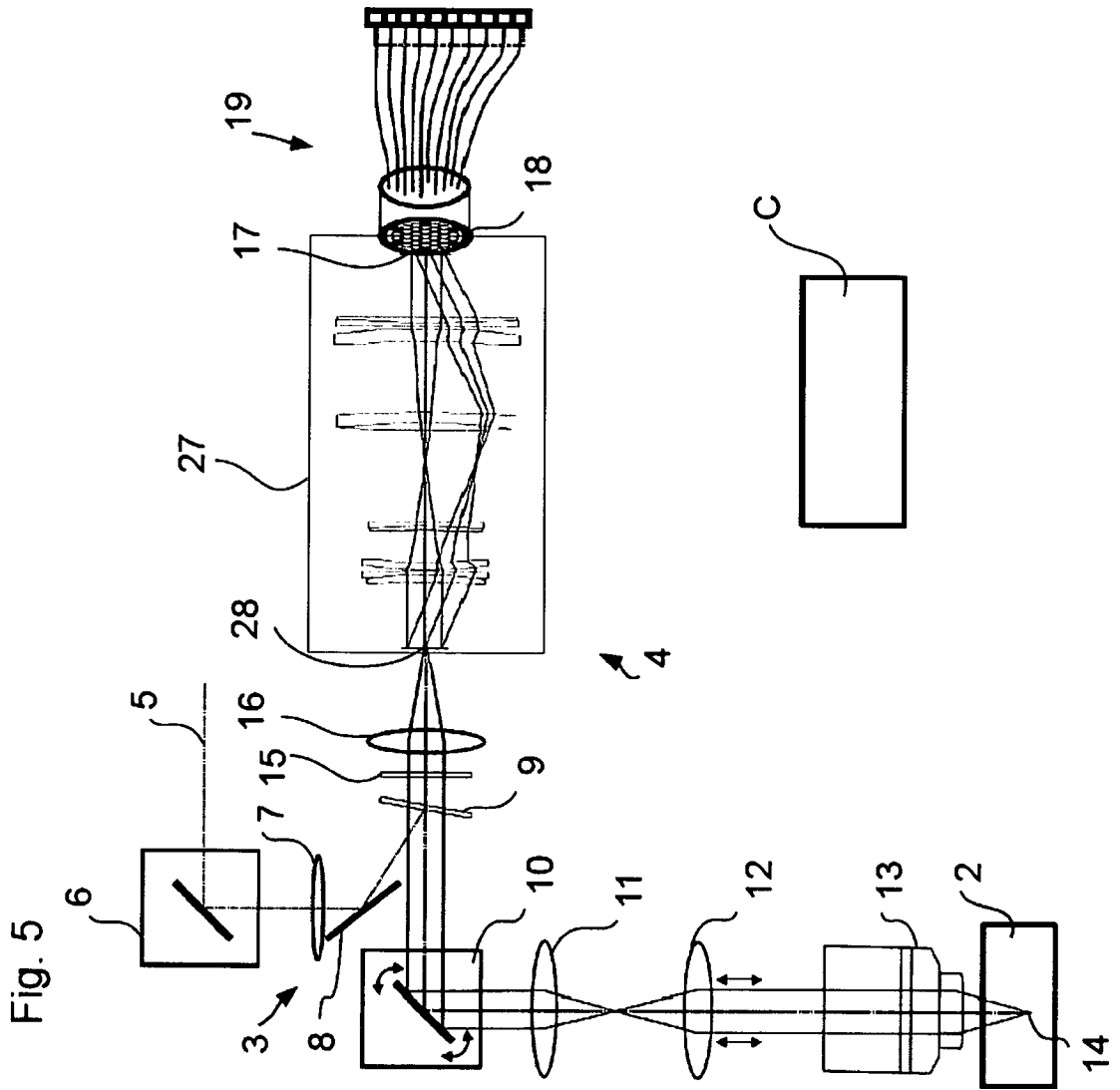


Fig. 6

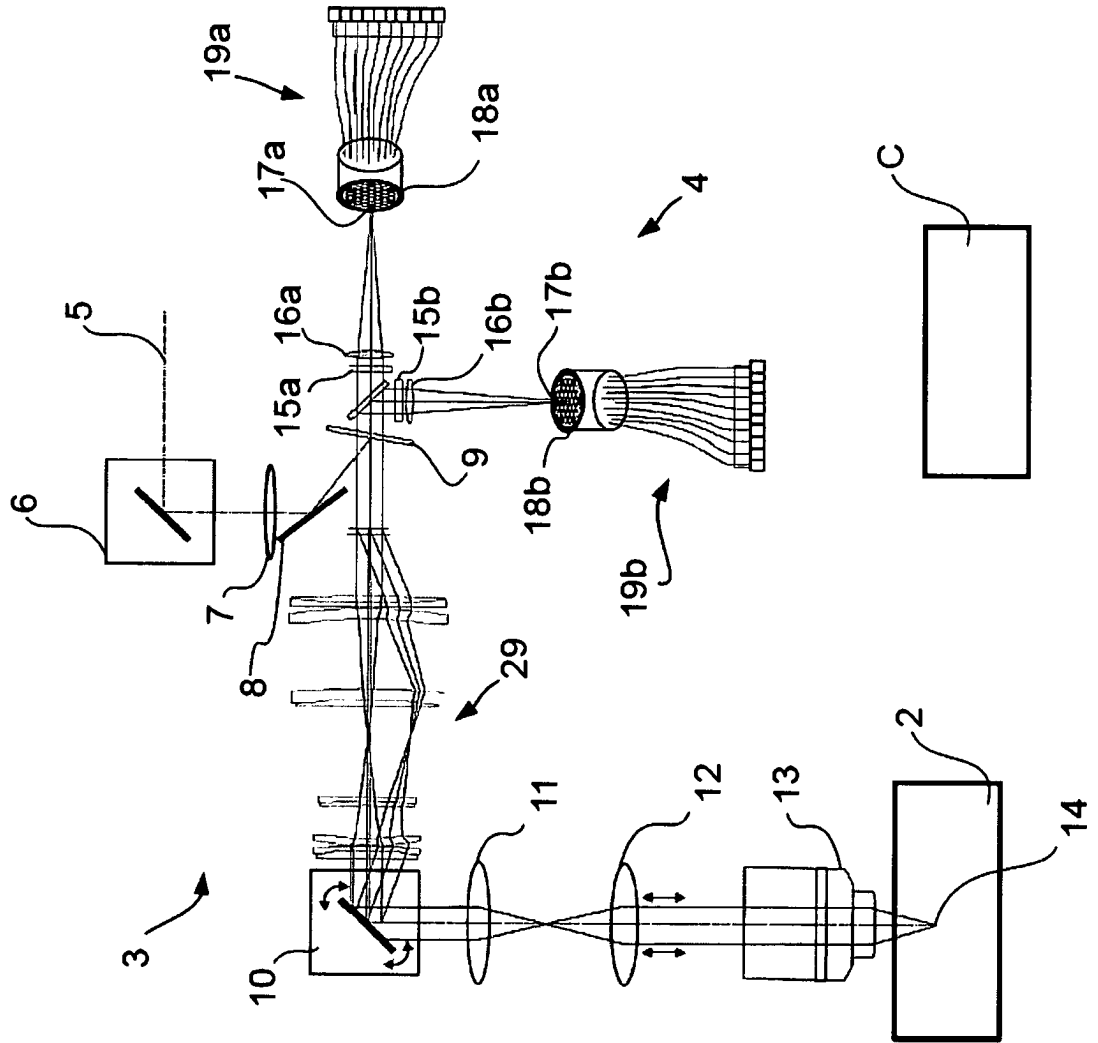


Fig. 7

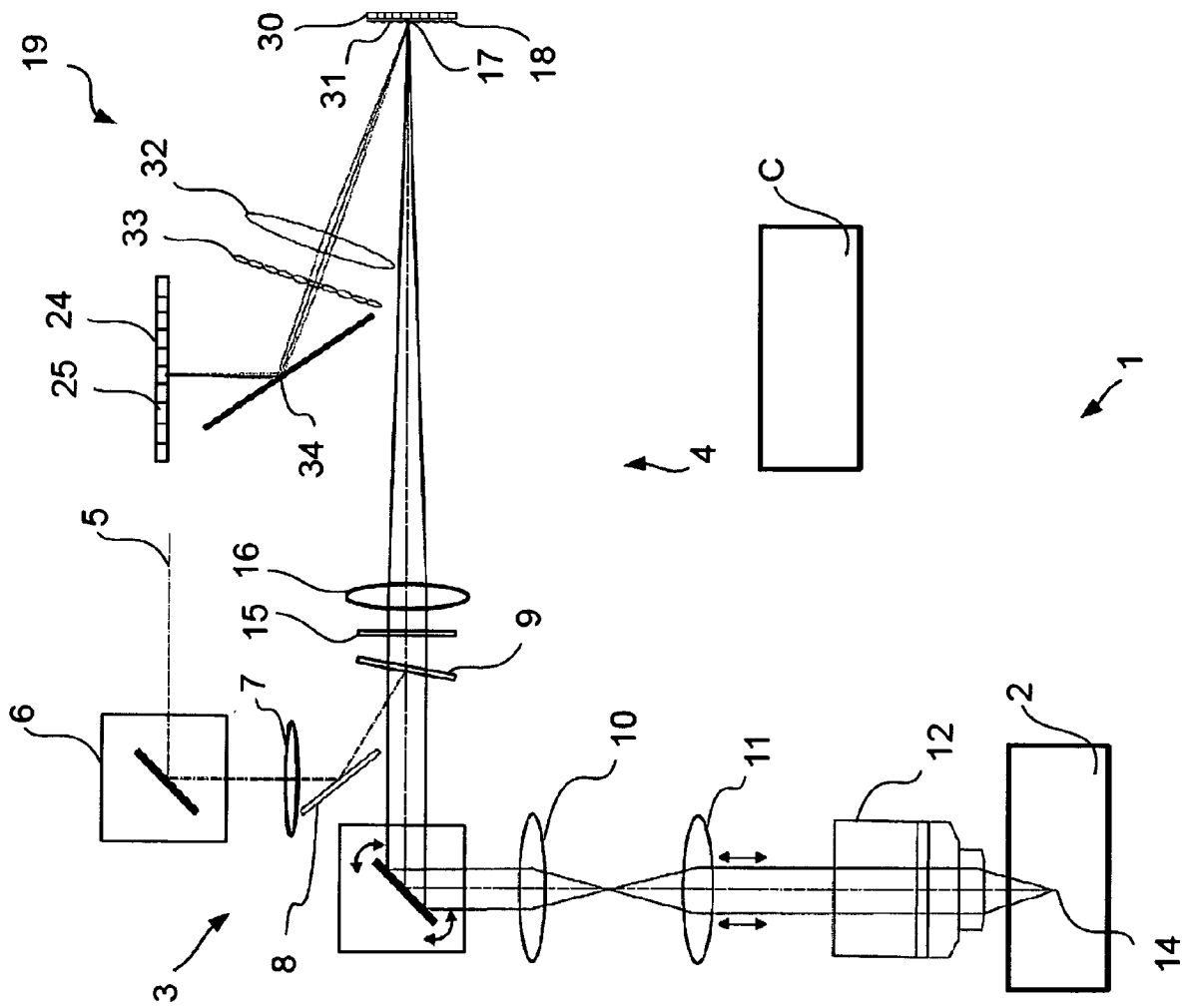
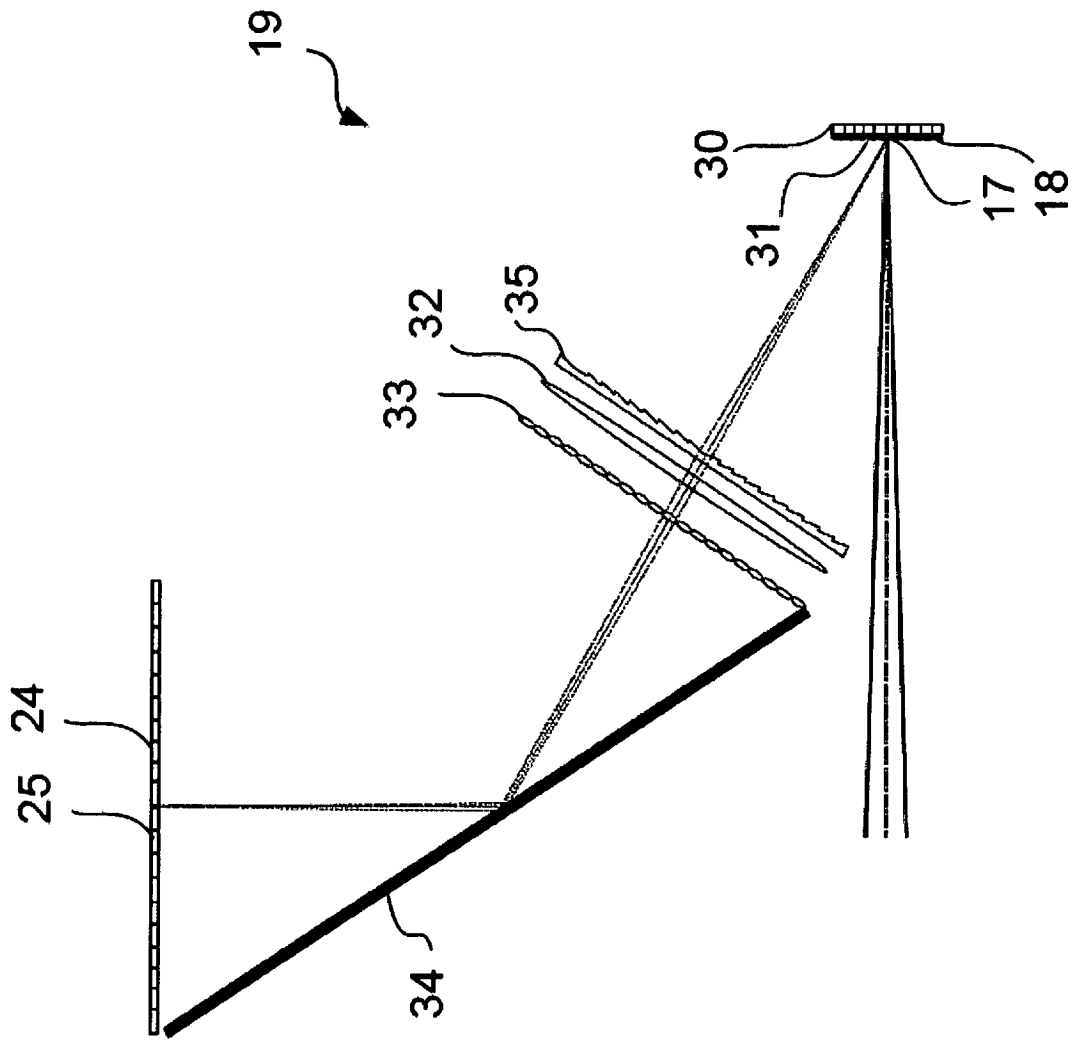


Fig. 8



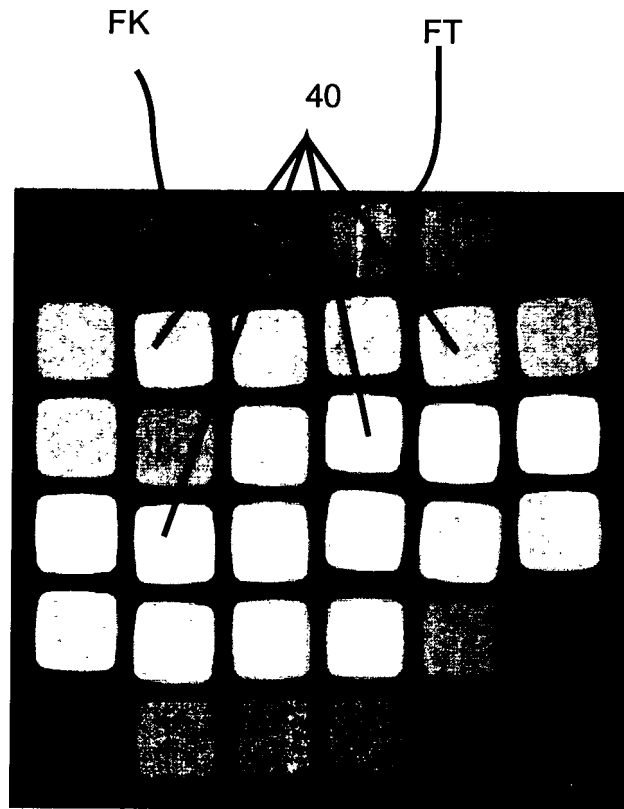


Fig.9

Fig. 10a

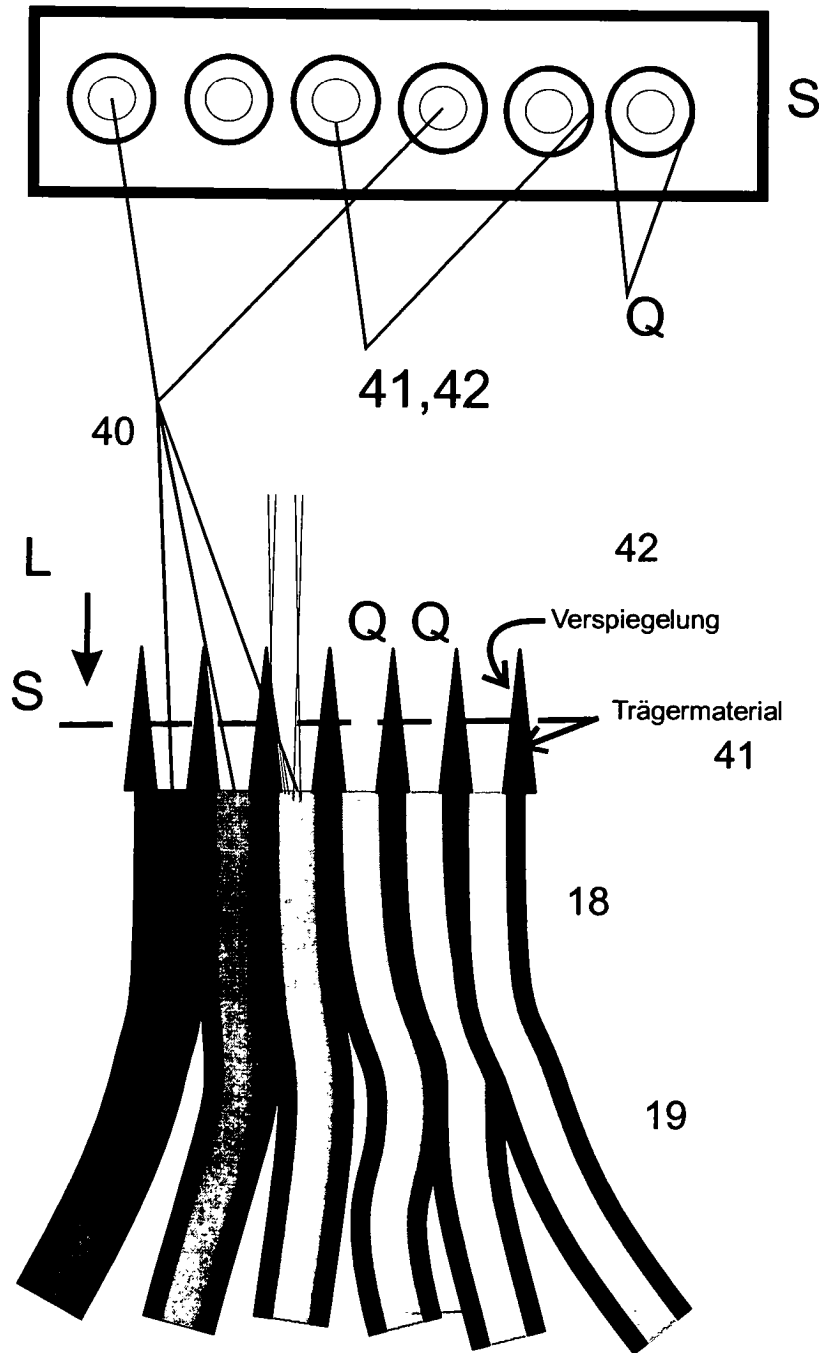
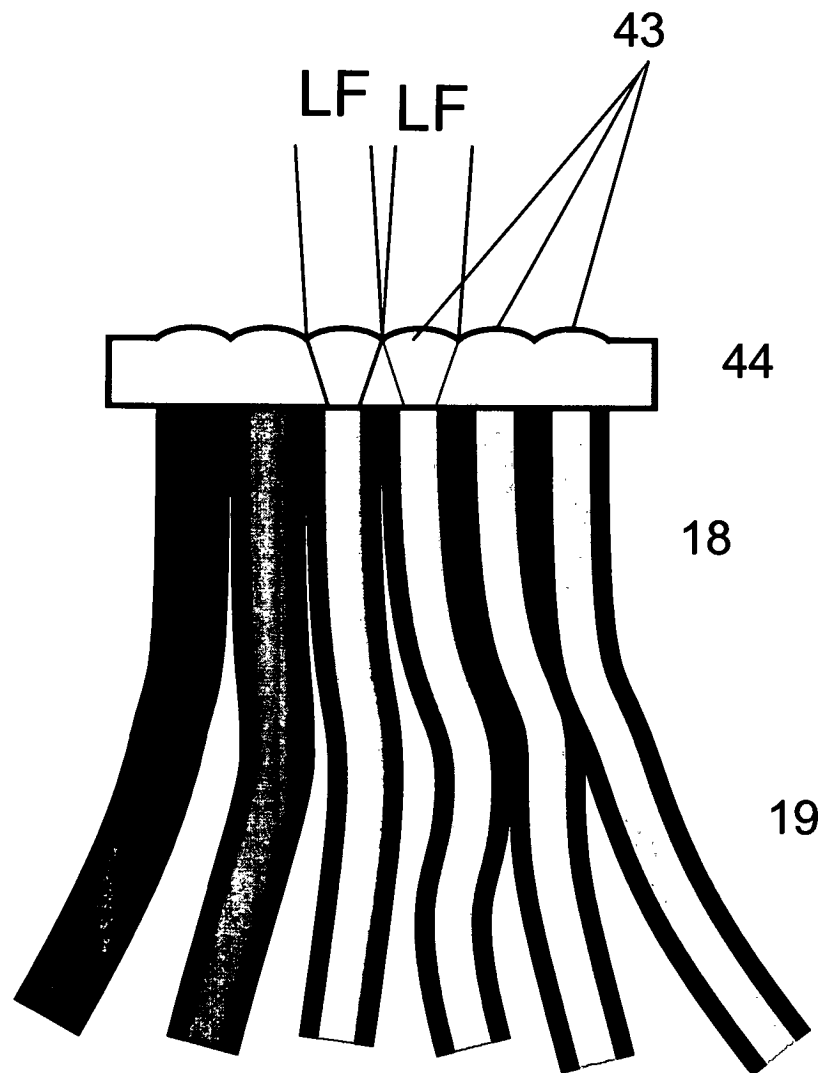


Fig.10

Fig.11



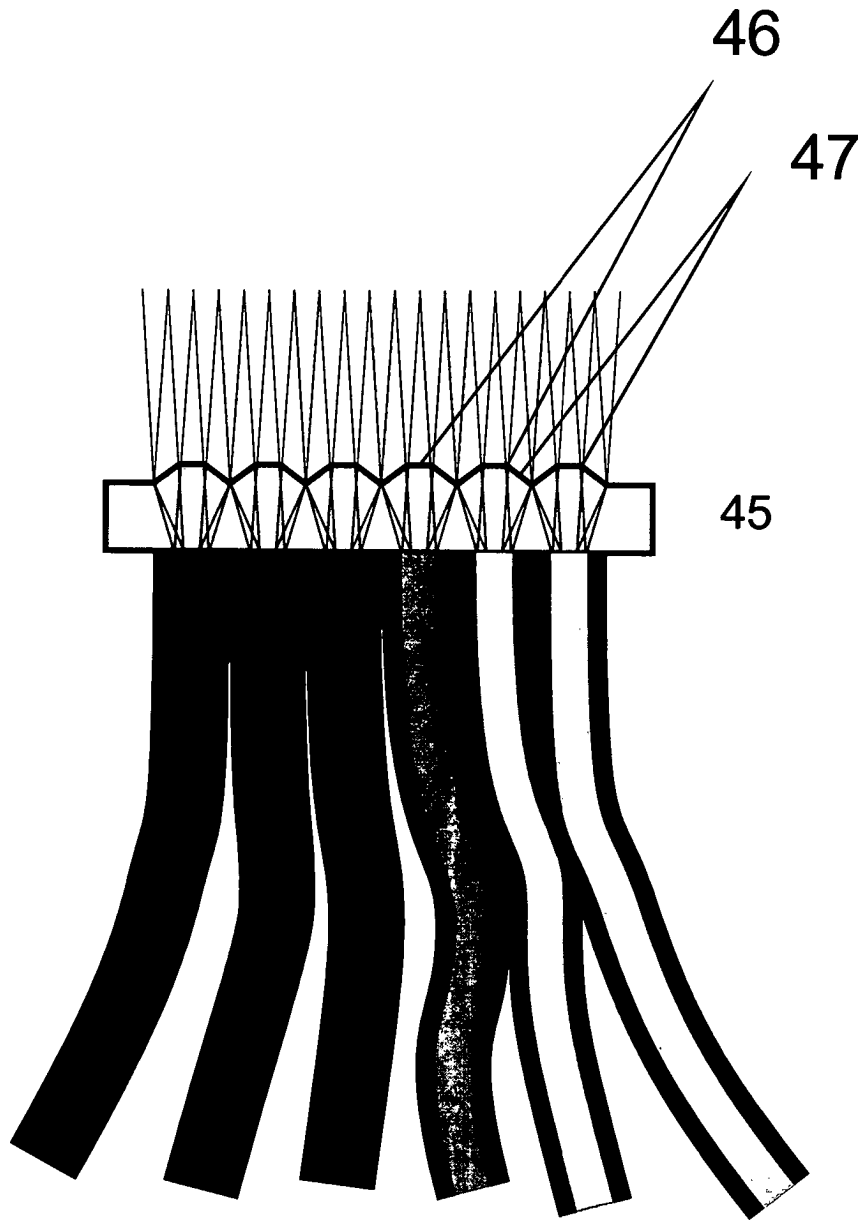


Fig.12

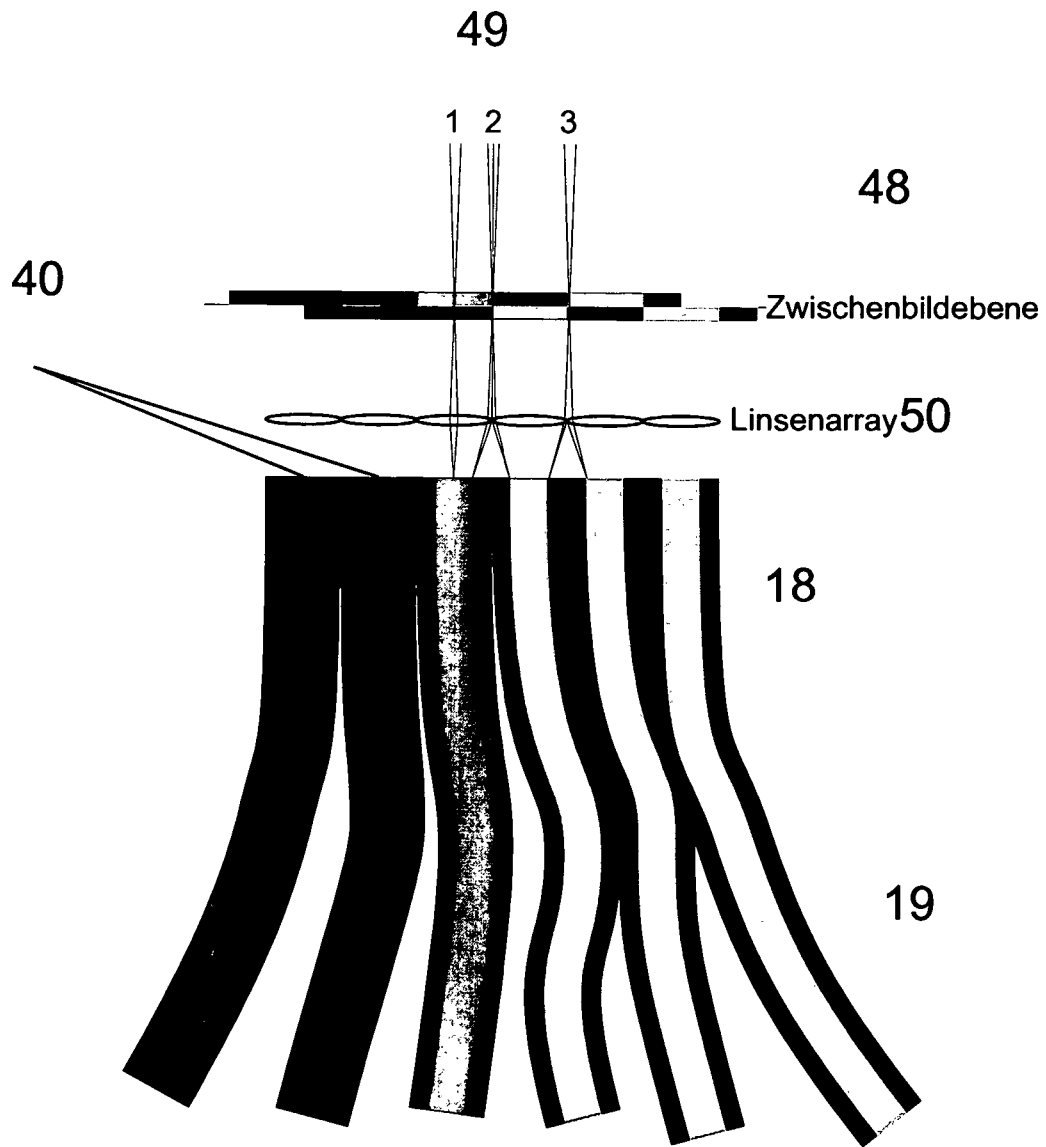


Fig.13

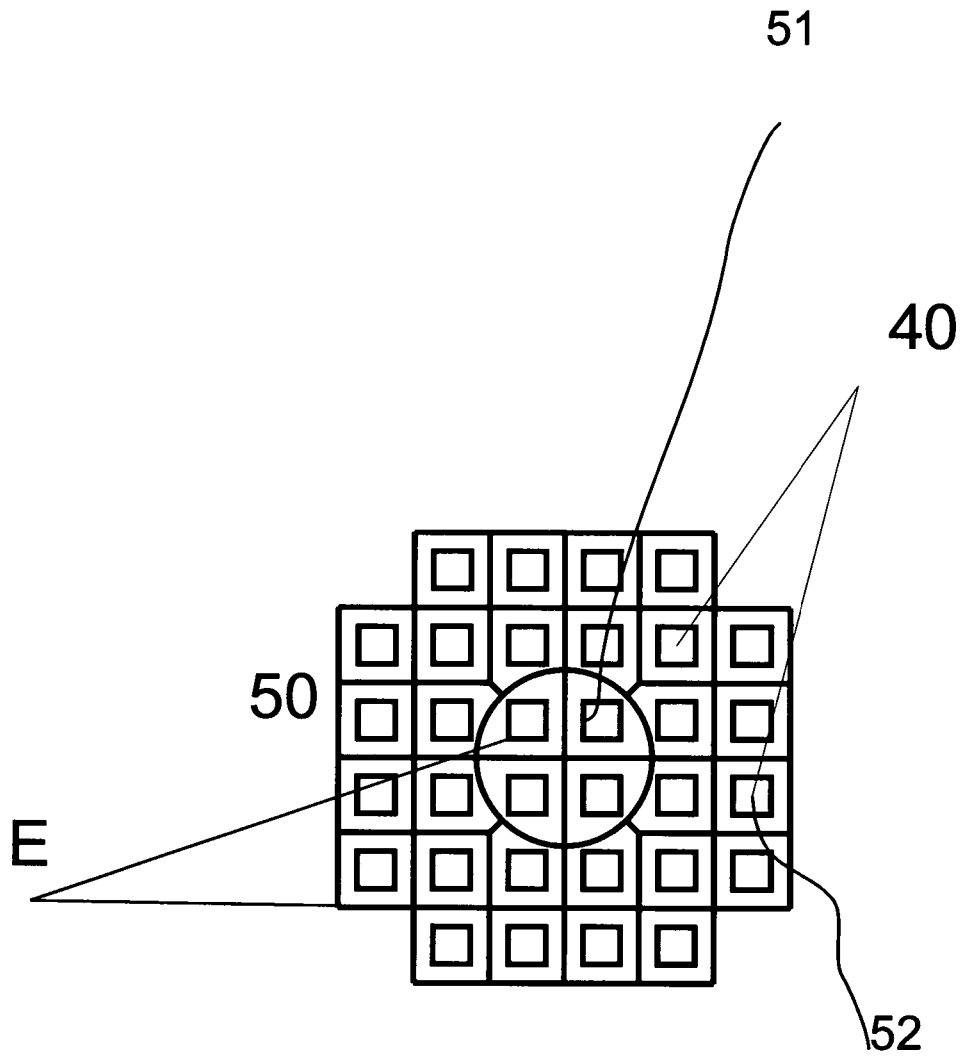


Fig.14