



(10) **DE 10 2009 043 747 A1** 2011.03.31

(12)

## Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2009 043 747.9**

(22) Anmeldetag: **30.09.2009**

(43) Offenlegungstag: **31.03.2011**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **G01N 21/63** (2006.01)  
**G02B 21/24** (2006.01)

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

(72) Erfinder:  
**Kleppe, Ingo, Dr., 07743 Jena, DE; Novikau,  
Youheni, 07743 Jena, DE**

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Erzeugung eines Mikroskopbildes und Mikroskop**

(57) Zusammenfassung: Verfahren und Mikroskop zur Erzeugung eines Mikroskopbildes, wobei

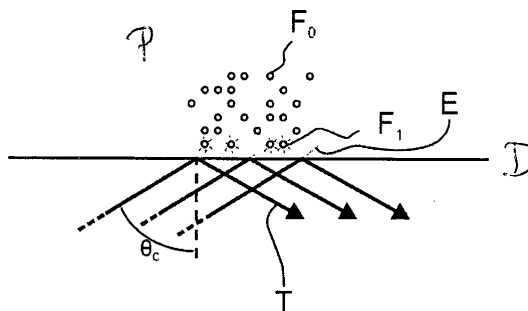
a) die Probe jeweils über das Mikroskopobjektiv über ein TIRF Verfahren beleuchtet wird

und

b) die Probe strukturiert in unterschiedlichen Verschiebelagen der Struktur beleuchtet wird,

das Probenlicht der Verfahren nach a) und b) jeweils zur Bilderzeugung mindestens eines Probenbereichs detektiert wird,

wobei die nach a) und b) erzeugten Probenbilder miteinander verrechnet, vorzugsweise multipliziert, werden und das Ergebnis zur Erzeugung eines neuen Probenbildes abgespeichert wird.



## Beschreibung

**[0001]** Die Mikroskopie unter Anwendung der sogenannten Totalreflexions-Fluoreszenz (engl. „total internal reflection fluorescence“, TIRF) ist eine besondere Form der Fluoreszenzmikroskopie. Sie ist beispielsweise in WO 2006/127692 A2 (dort beispielsweise in **Fig. 9** und **Fig. 10C**) offenbart. **Fig. 1** erläutert die Zusammenhänge. Die Fluorophore  $F_0$  der Probe P werden mittels eines evaneszenten Beleuchtungsfelds E ausschließlich in einer dünnen Schicht hinter der Grenzfläche zwischen Deckglas D und Probe zur Fluoreszenz  $F_1$  angeregt. Das evaneszente Beleuchtungsfeld E in der Probe wird erzeugt, in dem die Anregungsstrahlung T innerhalb des Deckglases D unter einem Winkel  $\theta_C$ , der zur Totalreflexion führt, auf die Grenzfläche Deckglas-Probe geleitet wird. Indem nur die dünne Schicht zur Fluoreszenz angeregt wird, kann eine besonders hohe axiale Auflösung erzielt werden. Die optische axiale Auflösung eines TIRF-Mikroskops ergibt sich aus der Eindringtiefe  $d$  des evaneszenten Feldes in die Probe. In Abhängigkeit des Einfallswinkels  $\theta$  ergibt sich die axiale Auflösung aus

$$d = \frac{\lambda}{4\pi\sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta - n_2^2}},$$

wobei  $\lambda$  die Anregungswellenlänge,  $n_1$  die Brechzahl des Deckglases und  $n_2$  die Brechzahl des Mediums der Probe ist.

**[0002]** Die Beleuchtung erfolgt typischerweise wie in **Fig. 2** schematisch dargestellt durch das Mikroskopobjektiv O hindurch in dessen Randbereich so, dass das Beleuchtungslicht nach Verlassen des Objektivs O die optische Achse des Objektivs O unter einem Winkel kreuzt, der größer oder gleich dem Totalreflexionswinkel  $\theta_C$  ist. Um die notwendigen großen Einfallswinkel für das Anregungslicht T zu ermöglichen, muss das Mikroskopobjektiv O eine hohe numerische Apertur aufweisen. Die entstehende Fluoreszenz wird durch dasselbe Objektiv O gesammelt und auf eine CCD-Kamera (nicht dargestellt) abgebildet.

**[0003]** Ebenfalls aus WO 2006/127692 A2 ist zur Erhöhung des mikroskopischen Auflösungsvermögens die Verwendung photoschaltbarer Fluoreszenzfarbstoffe bekannt (engl. „Photo-activated Localization Microscopy“; PALM, auch PAL-M). Durch Licht sehr geringer Intensität bei einer Aktivierungswellenlänge wird eine äußerst geringe Anzahl zufällig verteilter Fluorophore in einen anregbaren Zustand transformiert (aktiviert) und anschließend auf bekannte Weise durch Licht einer Anregungswellenlänge zur Fluoreszenz angeregt. Die übrigen, nichtaktivierten Fluorophore lassen sich durch die Anregungswellenlänge nicht zur Fluoreszenz anregen. Aufgrund der zufälligen Verteilung liegen die aktivierten und angeregten Fluorophore in der Regel räumlich soweit auseinander, dass die aus den Fluoreszenzereignissen entstehenden, beugungsbegrenzt verbreiterten Intensitätsverteilungen der Punktquellenabbilder einander nicht überlappen. Das gilt insbesondere auch für eine Projektion auf ein zweidimensionales Bild, in dem sich die Intensitätsverteilungen aufgrund der Beugungsverbreiterung zwangsläufig über mehrere Bildelemente (engl. „picture elements“; Pixel) erstrecken. In der PAL-Mikroskopie wird eine Vielzahl von Einzelbildern mit einer jeweils geringen Anzahl von in der Regel räumlich nichtüberlappenden Fluoreszenzereignissen aufgenommen. Die Aktivierung einer kleinen Gruppe von Fluorophoren wird dabei erst wiederholt, wenn die zuletzt aktivierten Fluorophore ausgebleicht sind. Die Ursprünge der einzelnen Fluoreszenzereignisse werden in den Einzelbildern anhand der beugungsverbreiterten Intensitätsverteilungen mittels einer Ausgleichsrechnung mit Subpixelauflösung lokalisiert und in ein hochauflösendes Ergebnisbild eingetragen.

**[0004]** Discloses a method to improve lateral resolution of optical imaging system by scanning the object with periodic pattern illumination.

**[0005]** Ein hochauflösendes Mikroskopieverfahren im Rahmen der Erfindung ist beispielsweise in US05867604 angesprochen, in der ein Objekt mit einer periodischen Struktur abgetastet wird.

**[0006]** In EP 1157297 B1 werden mittels strukturierter Beleuchtung nichtlineare Prozesse ausgenutzt. Als Nichtlinearität dient die Sättigung der Fluoreszenz. Durch eine strukturierte Beleuchtung, welche mittels eines Beleuchtungsstrahlungsmodulators erzeugt wird, erfolgt eine Verschiebung des Objektraumspektrums relativ zur Übertragungsfunktion des optischen Systems. Konkret bedeutet die Verschiebung des Spektrums, dass Objektraumfrequenzen  $V_0$  bei einer Raumfrequenz  $V_0 - V_m$ , wobei  $V_m$  die Frequenz der strukturierten Beleuchtung ist, übertragen werden. Bei gegebener, durch das System maximal übertragbarer Raumfrequenz ermöglicht dies den Transfer von um die Verschiebefrequenz  $V_m$  über der maximalen Frequenz der Übertragungsfunktion liegender Raumfrequenzen des Objektes. Dieser Ansatz erfordert einen Rekonstruktionsalgorithmus zur Bilderzeugung und die Verwertung mehrerer Aufnahmen für ein Bild. Die bezüglich der entspre-

chenden Beschreibung des auflösenden Mikroskopieverfahrens ebenfalls voll einbezogene EP 1157297 B1 verwendet also eine strukturierte Weitfeldbeleuchtung der Probe, wobei, beispielsweise durch ein Amplituden/Phasen-Gitter, eine streifenförmige Modulation aufgeprägt wird. Fluoreszenz in der Probe wird ebenfalls weitfelddetektiert. Die Modulation wird nun in mindestens drei verschiedene Drehlagen gebracht, z. B. 0°, 120° und 240°, und in jeder Drehlage wird die Modulation in mind. drei verschiedene Positionen verschoben. In jeder Verschiebung der Drehlagen (insgesamt also mind. 9 Bildpositionen) wird die Probe weitfelddetektiert. Weiter hat das Gitter Frequenzen möglichst nahe der Grenzfrequenz, zu deren Übertragung die verwendete optische Anordnung in der Lage ist. Unter Verwendung einer Fourieranalyse erfolgt dann die erwähnte Spektrumverschiebung, wobei insbesondere die 0. und +/-1. Beugungsordnung in den Bildern ausgewertet wird. Dieses Mikroskopieverfahren wird auch als SIM-Verfahren bezeichnet.

**[0007]** Eine Weiterbildung des SIM-Verfahrens kann mit einer linienförmigen Beleuchtung erreicht werden, die senkrecht zur Streifenrichtung der Modulation liegt. Man hat dann eine Linienbeleuchtung, wobei längs der Linie sich die Streifenstruktur wiederfindet. Die linienförmige Beleuchtung ist ihrerseits durch die Modulation strukturiert. Die linienförmige Beleuchtung erlaubt eine konfokale Schlitzdetektion und damit nochmals eine Auflösungssteigerung. Dieses Verfahren wird auch als SLIM abgekürzt.

**[0008]** Eine nochmalige Steigerung der Auflösung erhält man, wenn die Beleuchtungsstrahlungsmodulation an Beleuchtungsstrahlung ausgeführt wird, die derart intensiv ist, dass die Fluoreszenz der Probe in den hellen Bereich der strukturierten Beleuchtung eine Sättigung erreicht. Dann hat die Modulation auf der Probe bezüglich der Fluoreszenz keine Sinusverteilung mehr, sondern aufgrund der Sättigungseffekte noch höhere Harmonische jenseits der optischen Grenzfrequenz. Dieses Verfahren wird auch als saturated pattern excitation microscopy (SPEE) abgekürzt.

**[0009]** Die Erfindung beschreibt nachstehend ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Erzielung einer mikroskopischen Auflösung unterhalb der Beugungsgrenze des Mikroskops gemäß den unabhängigen Ansprüchen. Bevorzugte Weiterbildungen sind Gegenstand der abhängigen Ansprüche

**[0010]** In [Fig. 3](#) ist ein Mikroskop **1** dargestellt, das klassische Mikroskopieverfahren, d. h. Mikroskopieverfahren deren Auflösung beugungsbegrenzt ist, mit hochauflösenden Mikroskopieverfahren simultan ausführen kann, d. h. mit Mikroskopieverfahren deren Auflösung über die Beugungsgrenze hinaus gesteigert ist. Das Mikroskop **1** ist modular aufgebaut, und zur besseren Erläuterung der Erfindung wird es in einer umfangreichen Ausbaustufe beschrieben. Es ist aber auch eine reduzierte Bauweise mit weniger Modulen möglich. Auch ist der modulare Aufbau auch nicht zwingend; eine einteilige oder nicht-modulare Bauform ist ebenfalls möglich. Das Mikroskop **1** dieses Beispiels der [Fig. 1](#) ist auf Basis eines herkömmlichen Laser-Scanning-Mikroskops aufgebaut und erfasst eine Probe **2**.

**[0011]** Es weist ein Objektiv **3** auf, durch das die Strahlung für alle Mikroskopieverfahren läuft. Das Objektiv **3** bildet über einen Strahlteiler **4** die Probe zusammen mit einer Tubuslinse **5** auf einen CCD-Detektor **6** ab, der ein Beispiel für einen allgemein möglichen Flächendetektor ist. Insofern verfügt das Mikroskop **1** über ein herkömmliches Lichtmikroskopmodul **7**, und der Strahlengang von der Probe **2** durch das Objektiv **3** und die Tubuslinse **5** zum CCD-Detektor **6** entspricht einem herkömmlichen Weitfeld-Detektionsstrahlengang **8**. Der Strahlteiler **4** ist, wie durch den Doppelpfeil in [Fig. 1](#) angedeutet, austauschbar, um zwischen Strahlteilern mit verschiedenen dichroitischen Eigenschaften bzw. achromatischen Strahlteilern gemäß US 2008/0088920 wechseln zu können.

**[0012]** In den Strahlengang zum Objektiv **3** ist weiter ein Laser-Scanning-Modul **9** angebunden, dessen LSM-Beleuchtungs- und Detektionsstrahlengang über einen Schaltspiegel **11**, der ebenfalls Strahlteilerfunktionen hat, in den Strahlengang zum Objektiv **3** eingekoppelt ist. Der Strahlengang vom Schaltspiegel **11** zum Objektiv **3** durch den Strahlteiler **4** ist also ein Strahlengang, in dem Beleuchtungsstrahlengang und Detektionsstrahlengang vereint sind. Dies gilt sowohl hinsichtlich des Laser-Scanning-Moduls **9** also auch hinsichtlich des Weitfeld-Detektionsstrahlengangs **8**, da, wie noch zu erläutern sein wird, am Schaltspiegel **11** auch Beleuchtungsstrahlung eingekoppelt wird, die zusammen mit dem Weitfeld-Detektionsstrahlengang **8**, d. h. dem CCD-Detektor **6**, Mikroskopieverfahren realisiert.

**[0013]** Der Schaltspiegel **11** und der Strahlteiler **4** sind zu einem Strahlteilermodul **12** zusammengefasst, wodurch die Möglichkeit besteht, den Schaltspiegel **11** und den Strahlteiler **4** anwendungsabhängig zu wechseln. Dies ist durch Doppelpfeile veranschaulicht. Weiter ist im Strahlteilermodul **12** ein Emissionsfilter **13** vorgesehen, das im Weitfeld-Detektionsstrahlengang **8** liegt und die spektralen Anteile, welche durch den Weitfeld-

Detektionsstrahlengang **8** propagieren können, geeignet filtert. Natürlich ist auch das Emissionsfilter **13** im Strahlteilermodul **12** austauschbar.

**[0014]** Das Laser-Scanning-Modul **9** erhält für den Betrieb erforderliche Laserstrahlung über eine Lichtleitfaser **14** von einem Lasermodul **15**.

**[0015]** In der in [Fig. 1](#) dargestellten Bauweise wird am Strahlteilermodul **12**, genauer am Schaltspiegel **14**, ein Sammel-Beleuchtungsstrahlengang **16** eingekoppelt, durch den Beleuchtungsstrahlung für verschiedene Mikroskopieverfahren läuft. In diesen Sammel-Beleuchtungsstrahlengang **16** sind verschiedene Teil-Beleuchtungsstrahlengänge einzelner Beleuchtungsmodule eingekoppelt. Beispielsweise koppelt ein Weitfeldbeleuchtungsmodul **17** über einen Schaltspiegel **18** Weitfeldbeleuchtungsstrahlung in den Sammel-Beleuchtungsstrahlengang **16**, so dass über eine Tubuslinse **27** und das Objektiv **3** die Probe **2** weitfeldbeleuchtet wird. Das Weitfeldbeleuchtungsmodul kann beispielsweise eine HBO-Lampe aufweisen. Als weiteres Beleuchtungsmodul ist ein TIRF-Beleuchtungsmodul **19** vorgesehen, das bei geeigneter Stellung des Schaltspiegels **18** eine TIRF-Beleuchtung realisiert. Das TIRF-Beleuchtungsmodul **19** erhält dazu Strahlung von Lasermodul **15** über eine Lichtleitfaser **20**. Das TIRF-Beleuchtungsmodul **19** weist einen Spiegel **21** auf, der längsverschieblich ist. Durch die Längsverschiebung wird der Beleuchtungsstrahl, der vom TIRF-Beleuchtungsmodul **19** abgegeben wird, senkrecht zur Hauptausbreitungsrichtung des abgegebenen Beleuchtungsstrahls verschoben, wodurch im Ergebnis am Objektiv **3** die TIRF-Beleuchtung unter einem einstellbaren Winkel zur optischen Achse des Objektivs **3** einfällt. Auf diese Weise kann einfach der nötige Winkel der Totalreflexion am Deckglas sichergestellt werden. Natürlich sind auch andere Mittel geeignet, um diese Winkelverstellung zu bewirken. Auch kann das TIRF-Beleuchtungsmodul **19** als Weitfeldbeleuchtungsquelle arbeiten, indem der Spiegel **21** so eingestellt wird, dass der Beleuchtungsstrahl auf der optischen Achse einfällt.

**[0016]** Weiter ist an dem Sammel-Beleuchtungsstrahlengang der Beleuchtungsstrahlengang eines Manipulatormoduls **22** angekoppelt, das ebenfalls über eine nicht näher bezeichnete Lichtleitfaser Strahlung vom Lasermodul **15** erhält und eine punkt- oder linienförmige Strahlverteilung scannend über die Probe **2** führt. Das Manipulatormodul **22** entspricht also im Wesentlichen dem Beleuchtungsmodul eines Laserscanningmikroskops, und demzufolge kann das Manipulatormodul **22** auch mit dem Detektor des Laser-Scanning-Moduls **9** oder der Weitfeld-Detektion durch den CCD-Detektor **6** kombiniert betrieben werden.

**[0017]** Im Sammel-Beleuchtungsstrahlengang **16** ist weiter als Strahlungsmodulator ein Streifengitter **23** vorgesehen, das in einer Zwischenbildebene des Beleuchtungsstrahlenganges liegt und dessen Gitterkonstante unterhalb der Grenzfrequenz liegt, die mit dem Mikroskop **1** in die Probe **2** übertragen werden kann. Das Gitter **23** bewirkt eine streifenförmige Modulation der auf es einfallenden Beleuchtungsstrahlung. Das Gitter **23** ist quer zur optischen Achse des Sammel-Beleuchtungsstrahlengangs **16** verschieblich und kann auch aus dem Strahlengang herausgeschwenkt werden. Hierzu ist ein entsprechender Verschiebeantrieb **24** vorgesehen.

**[0018]** In Beleuchtungsrichtung dem Gitter nachgeordnet sitzt im Sammel-Beleuchtungsstrahlengang **16** weiter ein Bildfeldrotator **25**, der von einem Rotatorantrieb **26** gedreht wird. Bei dem Bildfeldrotator kann es sich beispielsweise um ein Abbe-König-Prisma handeln.

**[0019]** Die Module und Antriebe sowie Detektoren des Mikroskops **1** sind alle über nicht näher bezeichnete Leitungen mit einer Steuereinrichtung **28** verbunden. Diese Verbindung kann beispielsweise über einen Daten- und Steuerbus erfolgen. Die Steuereinrichtung **28** steuert das Mikroskop **1** in verschiedene Betriebsmodi.

**[0020]** Das Steuergerät **28** ist ausgebildet, um am Mikroskop **1** klassische Mikroskopie, d. h. Weitfeldmikroskopie (WF), Laserscanningmikroskopie (LSM) und auch Fluoreszenzmikroskopie mit totaler interner Reflexion (TIRF) auszuführen und diese mit hochauflösenden Mikroskopieverfahren, wie in den eingangs erwähnten PAL-M, SIM, SLIM, SPEM, STED, RESOLFT, zu kombinieren und auch diese untereinander zu kombinieren. Das Mikroskop **1** der [Fig. 1](#) weist im wesentlichen zwei zum Laserscannerbeleuchten geeignete Module auf, nämlich das Laserscanningmodul **9** sowie das Manipulatormodul **22**. Natürlich sind auch andere Kombinationen möglich. Diese Module sind über Tubuslinsen mit dem Objektiv **3** auf die Probe **2** gekoppelt. Das Manipulatormodul **22** beinhaltet lediglich den Anregungsteil eines Laserscanningmoduls, also ohne Detektion. Dadurch kann die Probe punktförmig beleuchtet und der Beleuchtungsspot über die Probe **2** gerastert werden. Vorzugsweise befindet sich im Manipulatormodul **22** auch eine Umschalteinheit, z. B. eine Umschaltlinse oder Zylinderlinse, mit welcher eine Umschaltung zwischen einer punktförmigen und einer linienförmigen Beleuchtung erfolgt. Diese linienförmige Beleuchtung ist besonders dann vorteilhaft, wenn das Gitter **23**, welches sich in einem Zwischenbild des Sammel-Beleuchtungsstrahlengangs **16** befindet, eingeschwenkt ist und senkrecht

zur Linie der linienförmigen Beleuchtung liegt. Dann kann mittels des Manipulatormoduls **22** auf einfache Weise das SLIM-Mikroskopieverfahren realisiert werden.

**[0021]** Alternativ zum Gitter **23** kann auch ein variabel einstellbarer Streifenmodulator oder ein DMD zur Erzeugung einer strukturierten Beleuchtung in der Probe **2** eingesetzt werden. Dann ist natürlich der Verschiebeantrieb **24** sowie die Ein-/Aussschwenkbarkeit des Gitters **23** nicht mehr erforderlich.

**[0022]** Der Bildfeldrotator **25** erlaubt es, die strukturierte Beleuchtung, die durch das Gitter **23** (oder die dieses ersetzende Elemente) erzeugt werden, um die optische Achse des Sammel-Beleuchtungsstrahlenganges **16** zu drehen, so daß die strukturierte Beleuchtung in verschiedenen Winkeln in der Probe **2** liegt. Somit kann durch Betrieb des Manipulatormoduls **22** oder des Weitfeldbeleuchtungsmoduls **17**, jeweils in Kombination mit geeigneter Verstellung des Gitters **23** durch das Steuergerät **28** SIM-, SLIM- oder SPEM-Mikroskopie mit dem Mikroskop **1** ausgeführt werden. Natürlich ist der Schaltspiegel **18** dann in die geeignete Stellung zu bringen.

**[0023]** Bei ausgeschwenktem Gitter **23** kann eine klassische Weitfeldbeleuchtung durch das Weitfeldbeleuchtungsmodul **17** bzw. eine klassische TIRF-Beleuchtung durch das TIRF-Beleuchtungsmodul **19** erfolgen.

**[0024]** Zur Umschaltung zwischen den einzelnen Betriebsarten werden die Schaltspiegel **18** und **11** sowie der Strahlteiler **4** geeignet eingestellt. Hierzu können in der Realisierung Klapp- oder Einschenkspiegel verwendet werden, so daß eine Umschaltung zwischen den Betriebsarten sequentiell erfolgen kann. Alternativ sind auch dichroitische Spiegel möglich, welche einen gleichzeitigen Betrieb der verschiedenen Module ermöglichen.

**[0025]** Der Strahlteiler **4** ist vorzugsweise als dichroitischer Strahlteiler ausgeführt, dessen Spektraleigenschaften so einstellbar sind, dass Spektralanteile von Fluoreszenzemission von Markierungsmolekülen, die mit Hilfe des CCD-Detektors **6** detektiert werden sollen, in den Weitfeld-Detektionsstrahlengang **8** gelangen und die übrigen Spektralkomponenten möglichst transmittiert werden. Zur Erhöhung der Flexibilität bezüglich der Verwendbarkeit von Markierungsmolekülen mit verschiedenen Emissionscharakteristiken sind im Strahlteilermodul **12** mehrere verschiedene Strahlteiler **4** und Emissionsfilter **13** austauschbar angeordnet, z. B. auf einem Filterrad.

**[0026]** **Abb. 4** zeigt schematisch die Überlagerung verschiedener Mikroskopie-Bilder, die mit Hilfe des erfindungsgemäßen Kombinations-Mikroskops gewonnen werden. Das Mikroskopie-Bild **29** stammt dabei aus einem klassischen Mikroskopieverfahren, beispielsweise aus normaler Fluoreszenzmikroskopie unter Verwendung der Weitfeld-Beleuchtungsquelle **17** und der Weitfeld-Detektion. Das Mikroskopie-Bild **30** stammt hingegen aus einem hochauflösenden Verfahren, beispielsweise einer SIM- oder PAL-Mikroskopie. Im Mikroskopie-Bild **29** finden sich Strukturen **31**; Strukturen **32** sind im hochauflösenden Mikroskopie-Bild **30** vorhanden. Das Steuergerät **28** überlagert nun in einem durch einen Pfeil symbolisierten Überlagerungsvorgang **33** die jeweiligen Bilder zu einem Gesamtbild. Die Überlagerung kann zweidimensional, dreidimensional und für beide Varianten auch jeweils über die Zeit erfolgen. **Fig. 2** zeigt exemplarisch eine zweidimensionale Darstellung. **Fig. 2** ist weiter schematisch dafür, dass ein höher aufgelöstes Mikroskopie-Bild **30** mit einem niedriger aufgelösten Mikroskopie-Bild **29** kombiniert wird, d. h. dass die Kombination zweier unterschiedlich auflösender Mikroskopieverfahren zu einem Gesamtbild führen. Zu erkennen ist in **Fig. 2**, dass erst mit Hilfe des niedriger aufgelösten Mikroskopie-Bildes **29** ein Zusammenhang zwischen den hoch aufgelösten Details des höher aufgelösten Mikroskopie-Bildes **30** hergestellt werden kann.

**[0027]** **Abb. 5** zeigt eine Ausführungsform einer für die Erfindung weiterhin optischen Anordnung.

**[0028]** Über eine Fasereinkopplung **5.1**, die aus Lichtleitfasern, Kollimationslinsen und Umlenkspiegeln besteht wird Beleuchtungslicht eingekoppelt.

**[0029]** Über Umlenkspiegel **5.2** gelangt es über ein vorzugsweise einstellbares Teleskop **5.3** zur Bildfeldreduktion im TIRF Mode auf einen kippbaren Spiegel **5.4**, mittels dessen der TIRF Winkel verstellt werden kann.

**[0030]** Über eine weites Teleskop **5.5** und einen Umlenkspiegel **5.6** sowie eine drehbare lambda/halbe Platte zur Drehung der Polarisierung gelangt das kollimierte Licht in die Ebene eines Gitters **5.8** zur strukturierten Beleuchtung wie oben beschrieben, das vorzugsweise auswechselbar und mittels eines Piezoantriebs senkrecht zur optischen Achse fein verschiebbar ist und einem rotierfähigen Prisma zur Bildrotation **5.9**, eine Tubuslinse **5.10** in ein nur schematisch dargestelltes Mikroskop, das für die Z-Verstellung einen Piezoantrieb ausweist. An das Mikroskop ist in bekannter Weise ein LSM **5.11** Strahlengang angekoppelt (siehe z. B. DE 19702753 A1). Zur Weitfelddetektion sind hier zwei parallele CCD Kameras **5.12** in der Detektion angeordnet.



**[0031]** Anhand [Fig. 5](#) wird wiederum deutlich dass in einem Kombinationsgerät zur TIRF Beleuchtung und zur strukturierten (SIM) Beleuchtung abgespeicherte Bilder aus beiden Verfahren erzeugt werden können. Vorzugsweise wird zur TIRF Beleuchtung und anschließenden Detektion das Gitter ausgeschwenkt.

**[0032]** Mit einem oder mehreren Empfängern [5.1](#) wird bei eingeschwenktem Gitter ein hochauflösendes Weitfeldbild aus der Beleuchtung bei mehreren Gitterphasen und anschließender Berechnung ermittelt.

**[0033]** Bei Verwendung desselben Objektivs sind die Bildfelder bei der SIM Aufnahme und der TIRF Aufnahme gleich so dass eine Verrechnung der Bilder ohne weiteres möglich ist. Bei Verwendung unterschiedlicher Objektive oder anderer Änderung der Aufnahmebedingungen könnten fachmännisch bekannte Maßnahmen zur Anpassung des Bildfeldes, beispielsweise mit einer Kalibrierung der verwendeten Objektive, und einer rechnerischen Korrektur der Bildfelder, erfolgen.

**[0034]** Die Datenaufnahme ist also eine zeitlich Abfolge von Bildern die zum einen alle nötigen Bilder für SIM enthält sowie ein TIRF Bild ohne Gitter im Strahlengang, also ohne Strukturierung. Die Reihenfolge der Aufnahme ist unerheblich und bietet nur je nach Hardware Geschwindigkeitsvorteile. Wenn beispielsweise das Verändern der Beleuchtung auf TIRF zeitaufwendig ist, macht es Sinn diese Bewegung nur einmal durchzuführen also das TIRF Bild am Anfang oder Ende der Bildserie aufzunehmen. Anders gesagt, das dünne TIRF Plättchen in der Nähe des Objektträgers kann durch die Berechnung „lateral“ strukturiert werden.

**[0035]** Es kann auch eine durch Z-Verstellung stapelweise SIM Bilderzeugung erfolgen und beim unteren Bild des Stapels (der untersten Schicht des Objektes) wird zusätzlich eine TIRF Aufnahme erfolgen. Mit unterster Schicht ist hier die Schicht gemeint die in der Nähe des Deckglases liegt. Bei einem anderen als einem inversen Mikroskop könnte es sich auch um die „oberste“ Schicht handeln. Überraschend entsteht also nach einer Verrechnung durch Multiplikation der Bilddaten für diese unterste Schicht ein bezüglich z, aber auch in Y/Y Richtung seitlich lateral gut aufgelöstes Bild.

**[0036]** Nach der Daten Aufnahme liegen also beispielsweise für SIM z. B. 15 Bilder vor (5 Phasen sind die 5 Phasen 0 Grad, 72 Grad, 144 Grad usw., 3 Bildrichtungen durch Verstellung von [5.9](#)) und ein aufgenommenes TIRF Bild.

**[0037]** In [Fig. 6](#) sind die gespeicherten Einzelbilder für TIRF 6ab und 6b für strukturierte (SIM) Beleuchtung dargestellt.

**[0038]** Diese werden nun in 6c) rechnerisch miteinander verknüpft (vorzugsweise multipliziert) wodurch ein Bild 6d) berechnet wird, das dem in der Nähe des Objektträgers aufgenommenen Bild zusätzlich eine laterale Strukturierung für ein Objekt O, das auf beiden Bildern vorhanden ist, verleiht.

**[0039]** Die eigentliche Verknüpfung der Bilder besteht, wie in [Fig. 7](#) dargelegt, im Filterprozess der SIM Daten mit dem TIRF Bild, was durch einfache Multiplikation erfolgen kann. Das Bild zeigt zwei sinnvolle Abläufe der Verrechnung von SIM Daten und Stellen in an denen die Kombination mit dem TIRF Bild erfolgen kann.

**[0040]** Die Schritte 1–4, 6 sind alle Standard SIM Verrechnungen, Schritt 5 der hier neu eingeführte Schritt der TIRF Gewichtung,

Im Einzelnen ist der Ablauf wie folgt:

1. Die 15 Bilder werden wie für SIM üblich zunächst vorverarbeitet (z. B. Abzug von Hintergrund (evtl. durch die Aufnahme eines zusätzlichen Hintergrundbildes), Skalierung der jeweils 5 Phasen auf selbe mittlere Intensitäten, die Ränder der Bilder werden gedämpft um Artefakte der Fouriertransformation zu vermeiden).
2. Es schliesst sich der Schritt an an dem die Ordnungen zunächst pre-separiert werden um nach Optimierung der Separationsmatrix tatsächlich getrennt zu werden. Mit Ordnungen ist hier die durch die verschiedenen Beugungsordnungen des Gitters erzeugten Moireemuster gemeint, deren Linearkombination man in jedem einzelnen Bild beobachtet. Durch das Aufnehmen verschiedener Phasenbilder erhält man ein lineares Gleichungssystem, dessen Lösung die separierten Beiträge (Ordnungen) sind. Details der Herleitung finden sich auch in:

„Doubling the lateral resolution of wide field fluorescence microscopy“ von Gustafson, Agard, Sedat, SPIE Vol. 3919 (2000), 1605–7422

**[0041]** Um Relationen (Konzentrationen der Fluorophore) im Bild die nicht mit dem TIRF sectioning zu tun haben zu erhalten, sollte ausserdem nach der Multiplikation eine Normalisierung erfolgen die für den linearen Fall korrigiert, also die Quadratwurzel zieht, sodass laterale Intensitätsrelationen erhalten bleiben. Das heißt,

Intensitätswerte die im TIRF und im SIM zu sehen sind erhalten nach der Gewichtung ihren ursprünglichen Wert zurück und sind nicht quadriert.

**[0042]** In **Fig. 7a** und **Fig. 7b** sind mögliche Abläufe dargestellt.

**[0043]** Es handelt sich um die Schritte (siehe auch die Beschreibung der Formeln und der Bezug zu diesen Schritten):

1. Bildvorverarbeitung (zum Beispiel Eliminieren des Hintergrundes, Glättungsfilter anwenden)
2. Vorseparieren der Ordnungen
3. Optimieren der Separationsmatrix
4. Separieren der Ordnungen
5. Filtern der Ordnungen mit TIRF, beispielsweise durch Multiplikation vorzugsweise mit anschließender Normalisierung (z. B. Quadratwurzel)
6. Kombinieren der Ordnungen (gemeinsame Verrechnung und bildliche Darstellung)

**[0044]** In **Fig. 7a** wird zunächst eine Aufnahme und Berechnung der einzelnen Ordnungen eines mit strukturierter Beleuchtung aufgenommenen Bildes durchgeführt und dann mit dem TIRF Bild verrechnet und dann aus den Ordnungen ein Bild berechnet und abgespeichert (Schritt 5), in **Fig. 7b** erfolgt erst eine TIRF Aufnahme und danach die Aufnahme des strukturierten Bildes und die Berechnung der Ordnungen und Verrechnung mit dem TIRF Bild und anschließende Kombination der Ordnungen der Bilder.

**[0045]** Zu den mathematischen Grundlagen des SIM Verfahrens ist folgendes ergänzend auszuführen (siehe auch die angegebene Literatur):

Beleuchtungsmuster im Fourier Raum:

**[0046]**

$$I(\mathbf{k}) = a_0 \delta(\mathbf{k}) + a_1 \left[ e^{-i\varphi} \delta(\mathbf{k} + \mathbf{k}_g) + e^{i\varphi} \delta(\mathbf{k} - \mathbf{k}_g) \right] + a_2 \left[ e^{-i2\varphi} \delta(\mathbf{k} + 2\mathbf{k}_g) + e^{i2\varphi} \delta(\mathbf{k} - 2\mathbf{k}_g) \right] \quad (1)$$

mit  $a_0$ ,  $a_1$  und  $a_2$  als Amplituden der Stärke Beleuchtungsordnungen,  $\mathbf{k}_g$  beschreibt den Gittervektor. Der Gittervektor  $\mathbf{k}_g = (x_k, y_k)$  enthält Informationen über die Gitterfrequenz ("Pixel Größe"/ $|\mathbf{k}_g|$ ) und Richtung ( $\text{atan2}(y_k/x_k)$ ).

**[0047]** Bildgebung:  $I(\mathbf{k})$  wird mit der Optischen Transferfunktion (OTF) multipliziert,  $H_{\text{ex}}(\mathbf{k})$

$$I_{\text{ex}}(\mathbf{k}) = H_{\text{ex}}(\mathbf{k})I(\mathbf{k}) \quad (2)$$

**[0048]**  $I_{\text{ex}}(\mathbf{k})$  ist mit dem Objekt  $S(\mathbf{k})$  im Fourier Raum gefaltet

$$I_s(\mathbf{k}) = \int I_{\text{ex}}(\mathbf{k}') S(\mathbf{k} - \mathbf{k}') d\mathbf{k}' = \int H_{\text{ex}}(\mathbf{k}') I(\mathbf{k}') S(\mathbf{k} - \mathbf{k}') d\mathbf{k}' \quad (3)$$

**[0049]**  $I_s(\mathbf{k})$  wird mit der Emissions OTF multipliziert,  $H_{\text{em}}(\mathbf{k})$

$$I_{\text{em}}(\mathbf{k}) = H_{\text{em}}(\mathbf{k})I_s(\mathbf{k}) = H_{\text{em}}(\mathbf{k}) \int H_{\text{ex}}(\mathbf{k}') I(\mathbf{k}') S(\mathbf{k} - \mathbf{k}') d\mathbf{k}' \quad (4)$$

**[0050]** Einsetzen von (1) in (4) führt zu

$$I_{\text{em}}(\mathbf{k}) = a_0 \hat{D}_0(\mathbf{k}) + a_1 \left[ e^{-i\varphi} \hat{D}_{-1}(\mathbf{k}) + e^{i\varphi} \hat{D}_1(\mathbf{k}) \right] + a_2 \left[ e^{-i2\varphi} \hat{D}_{-2}(\mathbf{k}) + e^{i2\varphi} \hat{D}_2(\mathbf{k}) \right] \quad (5)$$

mit den Ordnungen:

$$\hat{D}_x(\mathbf{k}) = H_{\text{em}}(\mathbf{k})H_{\text{ex}}(x\mathbf{k}_g)S(\mathbf{k} - x\mathbf{k}_g), \quad (6)$$

**[0051]** Einsetzen der Ordnungsstärken  $a_0$ ,  $a_1$ , und  $a_2$  in  $D_x(\mathbf{k})$  gibt

$$I_{em}(\mathbf{k}) = D_0(\mathbf{k}) + e^{-i\varphi}D_{-1}(\mathbf{k}) + e^{i\varphi}D_1(\mathbf{k}) + e^{-i2\varphi}D_{-2}(\mathbf{k}) + e^{i2\varphi}D_2(\mathbf{k}) \quad (7)$$

**[0052]** Separieren der Ordnungen: Um fünf Ordnungen zu separieren,  $D_0(\mathbf{k})$ ,  $D_{-1}(\mathbf{k})$ ,  $D_1(\mathbf{k})$ ,  $D_{-2}(\mathbf{k})$  and  $D_2(\mathbf{k})$ , braucht man mindestens fünf Bilder ( $N_p = 5$ ) aufgenommen mit verschiedenen Phasen,  $n = 1, \dots, N_p$ :

$$I_{em}(\mathbf{k}) = a_0 \hat{D}_0(\mathbf{k}) + a_1 \left[ e^{-i\varphi} \hat{D}_{-1}(\mathbf{k}) + e^{i\varphi} \hat{D}_1(\mathbf{k}) \right] + a_2 \left[ e^{-i2\varphi} \hat{D}_{-2}(\mathbf{k}) + e^{i2\varphi} \hat{D}_2(\mathbf{k}) \right] \quad (5)$$

**[0053]** Das Set (8) kann wie folgt in Matrix-Form geschrieben werden:

$$\mathbf{I} = \mathbf{A} \mathbf{D} \quad (9)$$

mit

$$\begin{aligned} \mathbf{I} &= \left\{ I_{em}^n(\mathbf{k}) \right\}_{n=1, \dots, N_p}, \\ \mathbf{A} &= \left\{ 1, e^{-i\varphi_n}, e^{i\varphi_n}, e^{-i2\varphi_n}, e^{i2\varphi_n} \right\}_{n=1, \dots, N_p}, \\ \mathbf{D} &= \left\{ D_0(\mathbf{k}), D_{-1}(\mathbf{k}), D_1(\mathbf{k}), D_{-2}(\mathbf{k}), D_2(\mathbf{k}) \right\} \end{aligned} \quad (10)$$

**[0054]** Bemerke, dass die Phasen so ausgewählt sein sollten, dass das lineare Gleichungssystem (8) aus linear unabhängigen Gleichungen besteht. Set (8) kann dann wie folgt nach  $D_0(\mathbf{k})$ ,  $D_{-1}(\mathbf{k})$ ,  $D_1(\mathbf{k})$ ,  $D_{-2}(\mathbf{k})$  und  $D_2(\mathbf{k})$  gelöst werden.

**[0055]** Optimieren der Separationsmatrix: Separieren der Ordnungen gemäß der Gleichungen (8) setzt voraus, dass die Phasen  $\varphi_n$  genau genug bekannt sind. Im Experiment jedoch können diese Werte manchmal substantiell von den Voreinstellungen abweichen, die Gitterfrequenz und Phase sollte also zusammen mit den Ordnungen aus den Daten bestimmt werden. Daher wird zunächst mit den Voreinstellungen für die Phasen vorsepariert (Vorseparieren der Ordnungen gemäß Schritt 2 in [Fig. 7](#)) nach Gleichungssystem (8).

**[0056]** Anschliessend werden diese pre-separierten Ordnungen benutzt um die Separationsmatrix  $\mathbf{A}$  zu optimieren (Optimieren der Separationsmatrix, Schritt 3 in [Fig. 7](#)) durch Minimierung der Krosskorrelationen zwischen den preseparierten Ordnungen. Mit dieser Matrix  $\mathbf{A}$  werden dann abschliessend die Ordnungen getrennt (Schritt 4 in [Fig. 7](#)).

**[0057]** An dieser Stelle kann dann das Filtern der einzelnen Ordnungen mit dem TIRF Bild durch Multiplikation erfolgen (Filtern der Ordnungen mit TIRF Schritt 5 in [Fig. 7](#)). Normalisieren durch ziehen der Quadratwurzel erhält die relativen Intensitäten im Bild da Intensitäten die gleich hell im TIRF und Weitfeldbild zusehen sind, den identischen Helligkeitswert behalten, andere, die im TIRF weniger gut zu sehen sind jedoch dunkler dargestellt werden, so dass das gewünschte z-sectioning erfolgt.

**[0058]** Das Hochaufgelöste Bild wird dann genau wie bei Gustaffson et al. beschrieben durch Kombinieren der Ordnungen (verschieben im Frequenzraum und summieren der Ordnungen mit Gewichtung der OTF) zusammengesetzt, (Kombinieren der Ordnungen, Schritt 6 in [Fig. 7](#)).



## 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

- WO 2006/127692 A2 [[0001](#), [0003](#)]
- US 05867604 [[0005](#)]
- EP 1157297 B1 [[0006](#), [0006](#)]
- US 2008/0088920 [[0011](#)]
- DE 19702753 A1 [[0030](#)]

### Zitierte Nicht-Patentliteratur

- „Doubling the lateral resolution of wide field fluorescence microscopy“ von Gustafson, Agard, Sedat, SPIE Vol. 3919 (2000), 1605–7422 [[0040](#)]

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Erzeugung eines Mikroskopbildes,  
wobei

a) die Probe jeweils über das Mikroskopobjektiv über ein TIRF Verfahren beleuchtet wird  
und

b) die Probe strukturiert in unterschiedlichen Verschiebelagen der Struktur beleuchtet wird,  
das Probenlicht der Verfahren nach a) und b) jeweils zur Bilderzeugung mindestens eines Probenbereichs  
detektiert wird,

wobei die nach a) und b) erzeugten Probenbilder miteinander verrechnet, vorzugsweise multipliziert, werden  
und das Ergebnis zur Erzeugung eines neuen Probenbildes abgespeichert wird.

2. Verfahren zum Erzeugen eines Bildes einer Probe,

insbesondere nach Anspruch 1, mittels Mikroskopieverfahren die unterschiedliche Ortsauflösungen realisieren,  
wobei mindestens zwei der folgenden Mikroskopieverfahren kombiniert werden:

– ein erstes Mikroskopieverfahren, in dem die Probe durch strukturierte Linien- oder Weitfeldbeleuchtung zur  
Lumineszenz angeregt wird, die Strukturierung vorzugsweise gedreht und für jede Drehstellung mehrmals ver-  
schoben wird, wobei mindestens drei Drehlagen und pro Drehlage mindestens drei Verschiebelagen realisiert  
werden, jeweils die lumineszierende Probe mit einer vorbestimmten optischen Auflösung auf einen Flächen-  
detektor abgebildet wird und aus den so erhaltenden Bildern durch eine Fourieranalyse umfassende rechneri-  
sche Bearbeitung ein erstes Mikroskopie-Bild mit über die vorbestimmte optische Auflösung hinaus gesteiger-  
ter Ortsauflösung erzeugt wird,

und in einem zweiten Mikroskopieverfahren über ein TIRF-Beleuchtungsmodul die Probe durch das Objektiv  
so schräg zu beleuchtet wird, dass in einer am Deckglas angeordneten Probe Totalreflexion stattfindet, die  
ortsauflösend detektiert wird und ein zweites Mikroskopie-Bild erzeugt wird,

wobei erstes und zweites Mikroskopie-Bild miteinander bildpunktweise rechnerisch, vorzugsweise durch Mul-  
tiplikation verknüpft werden.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Ergebnis der rechnerischen Verknüpfung bildlich dargestellt  
wird.

4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,

gekennzeichnet durch die Verfahrensschritte:

– Separieren von Ordnungen durch Bildaufnahme bei mehreren unterschiedlichen Phasen der strukturierten  
Beleuchtung

– Filtern der Ordnungen mit dem TIRF Bild vorzugsweise durch Multiplikation

– Kombinieren der Ordnungen durch gemeinsame Verrechnung und bildliche Darstellung

5. Mikroskop, insbesondere zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1, 2, 3 oder 4,

wobei erste Beleuchtungsmittel zur Erzeugung einer TIRF Beleuchtung und zweite Beleuchtungsmittel zur  
Erzeugung einer strukturierten Beleuchtung vorgesehen sind Detektionsmittel zur Detektion des TIRF Bildes  
und des Bildes der strukturiert beleuchteten Probe vorgesehen sind,

Mittel zur Abspeicherung des TIRF Bildes und des aus der strukturierten Beleuchtung in unterschiedlichen  
Verschiebelagen der Struktur berechneten Bildes der Probe vorgesehen sind

und Mittel zur rechnerischen Verknüpfung der genannten Bilder, insbesondere durch Multiplikation, vorgese-  
hen sind.

6. Mikroskop zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1, 2, 3 oder 4, bestehend aus Beleuchtungs-  
mitteln, Detektionsmitteln sowie einem Abbildungs- und Beleuchtungsstrahlengang, der ein Mikroskopobjektiv  
beinhaltet Detektionsmittel zur Detektion des TIRF Bildes und des Bildes der strukturiert beleuchteten Probe  
vorgesehen sind, Mittel zur Abspeicherung des TIRF Bildes und des aus der strukturierten Beleuchtung in  
unterschiedlichen Verschiebelagen der Struktur erzeugten Bilder der Probe vorgesehen sind und Mittel zur  
rechnerischen Verknüpfung der genannten Bilder und Abspeicherung des Ergebnisses vorgesehen sind.

7. Kombinations-Mikroskop, ausgebildet zur Mikroskopie einer Probe mit mindestens zwei sich in ihrer Auf-  
lösung unterscheidenden Mikroskopieverfahren,

insbesondere nach einem der vorangehenden Ansprüche,

wobei das Mikroskop aufweist:

– ein Objektiv, das für die Mikroskopieverfahren die Probe erfasst,

- einen Detektionsstrahlengang und mindestens einen Beleuchtungsstrahlengang, die zumindest teilweise zusammenfallen und durch das Objektiv laufen,
- ein an den Detektionsstrahlengang angebundenes Mikroskopmodul, das eine Tubuslinse und einen Flächendetektor aufweist und zusammen mit dem Objektiv die Probe auf den Flächendetektor abbildet,
- ein an den Beleuchtungsstrahlengang angebundenes Weitfeldbeleuchtungsmodul zur Weitfeldbeleuchtung der Probe durch das Objektiv, wobei das Weitfeldbeleuchtungsmodul zur Abgabe von Beleuchtungsstrahlung bei mindestens zwei verschiedenen Wellenlängenbereichen ansteuerbar ist und
- ein im Beleuchtungsstrahlengang in Beleuchtungsrichtung dem Weitfeldbeleuchtungsmodul nachgeordneter Beleuchtungsstrahlungsmodulator, der von einer Steuereinrichtung ansteuerbar im Beleuchtungsstrahlengang aktivier- und deaktivierbar ist und im aktivierten Zustand der Beleuchtungsstrahlung eine streifenförmige Modulation aufprägt, wobei der Beleuchtungsstrahlungsmodulator derart ansteuerbar ist, dass die streifenförmige Modulation senkrecht zu einer optischen Achse des Beleuchtungsstrahlenganges verschiebbar ist, sowie ein ebenfalls von der Steuereinrichtung angesteuertes TIRF-Beleuchtungsmodul aktivierbar an den Beleuchtungsstrahlengang angebunden ist, um die Probe durch das Objektiv so schräg zu beleuchten, dass in einem auf der Probe angeordneten Deckglas Totalreflexion stattfindet und das in einem evaneszenten Feld angeregte Probenlicht auf einen Detektor gelangt dessen Detektionssignale abgespeichert werden wobei eine Detektion eines in einem evaneszenten Feld angeregten Probenvolumens erfolgt, Detektionsmittel zur Detektion des TIRF Bildes und des Bildes der strukturiert beleuchteten Probe vorgesehen sind, Mittel zur Abspeicherung des TIRF Bildes und des aus der strukturierten Beleuchtung in unterschiedlichen Verschiebelagen der Struktur erzeugten Bilder der Probe vorgesehen sind und Mittel zur rechnerischen Verknüpfung der genannten Bilder, insbesondere durch Multiplikation, vorgesehen sind.

8. Mikroskop nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei Mittel zur bildlichen Darstellung des durch Verrechnung entstandenen Bildes vorgesehen sind.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

P

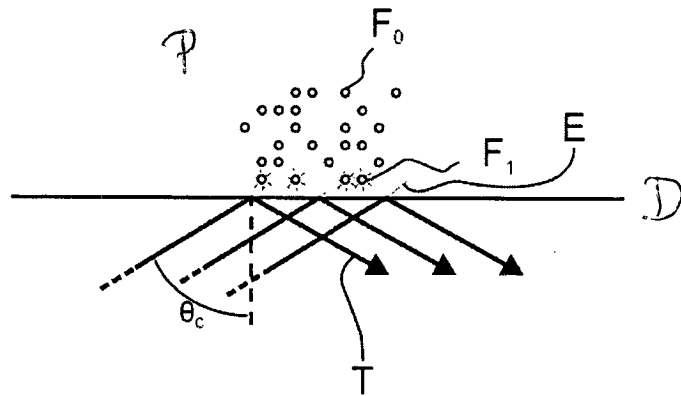


Fig. 1 - Stand der Technik

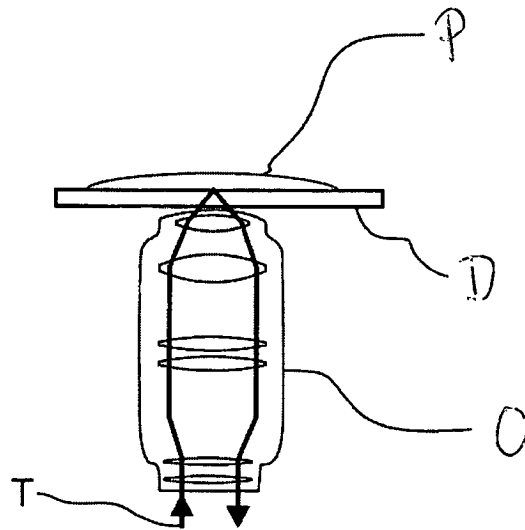


Fig. 2 - Stand der Technik

Fig.3

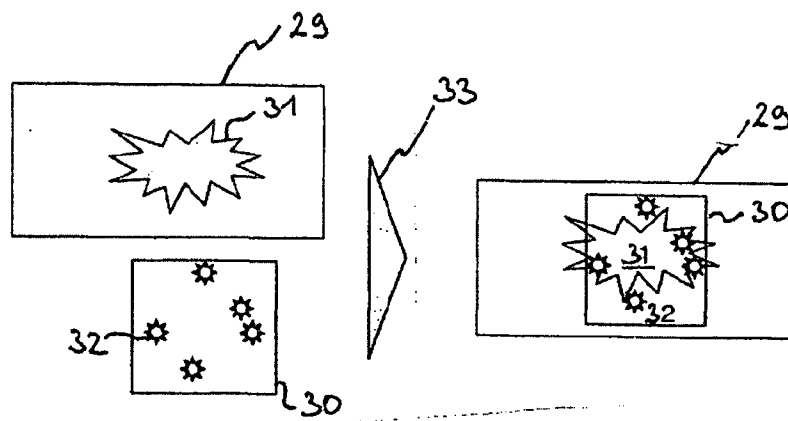
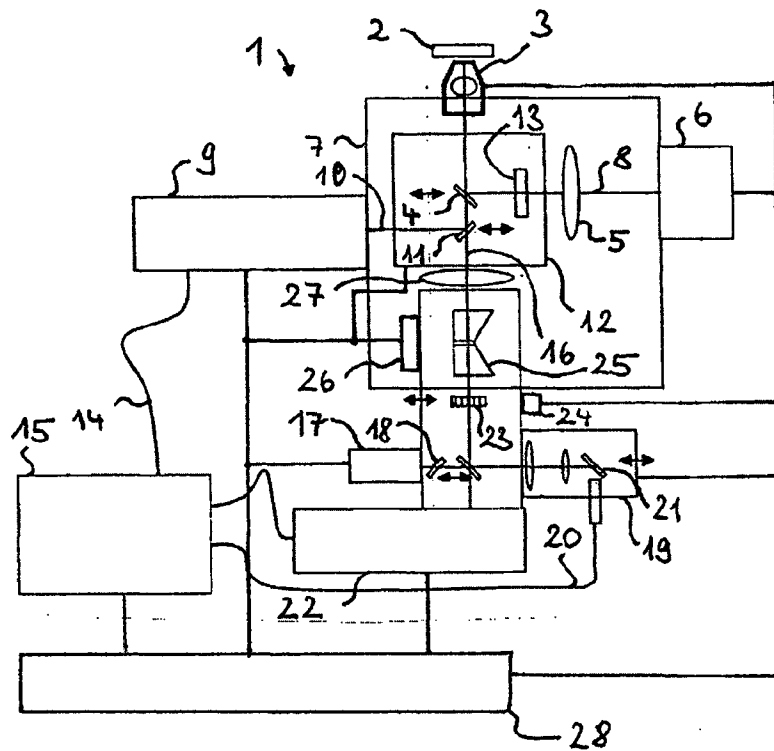


Fig.4



Fig. 5

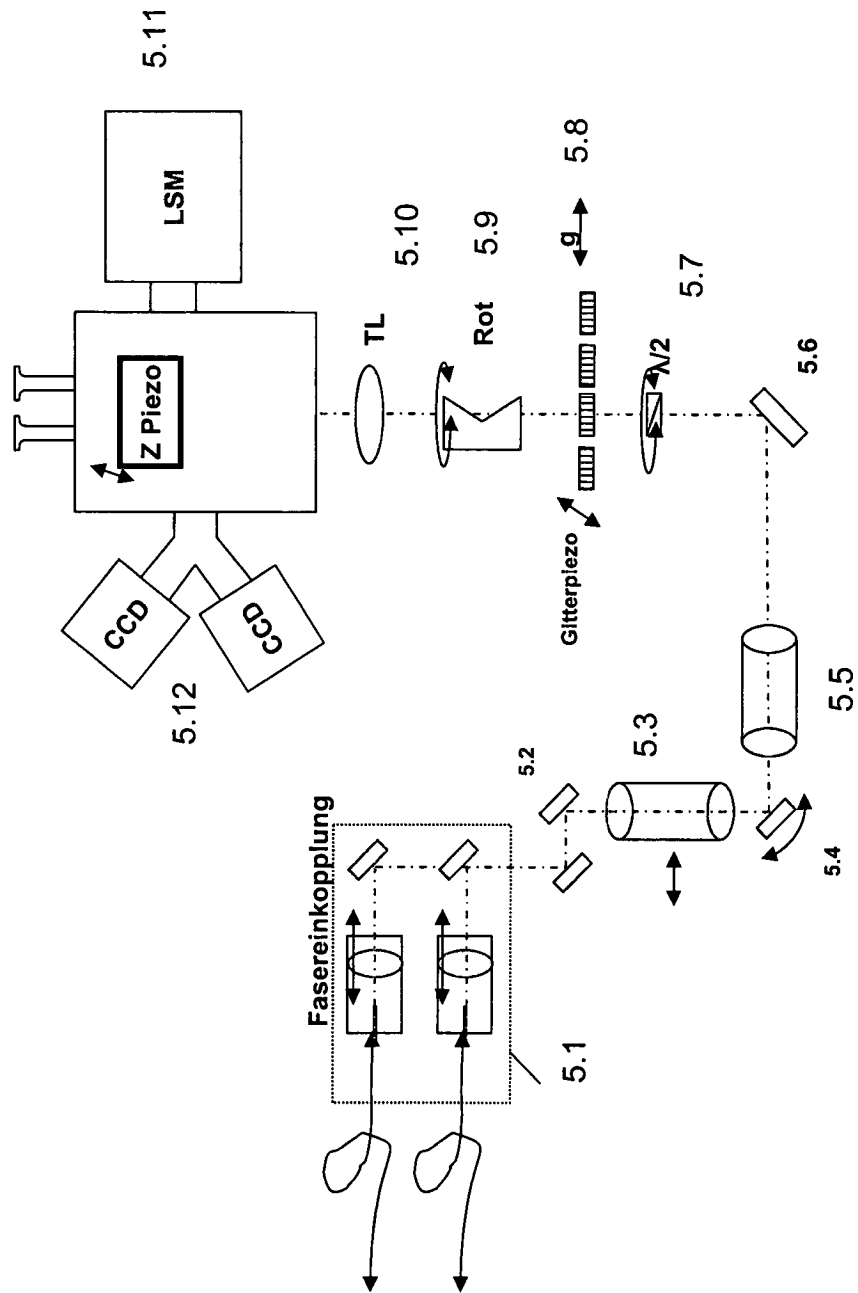
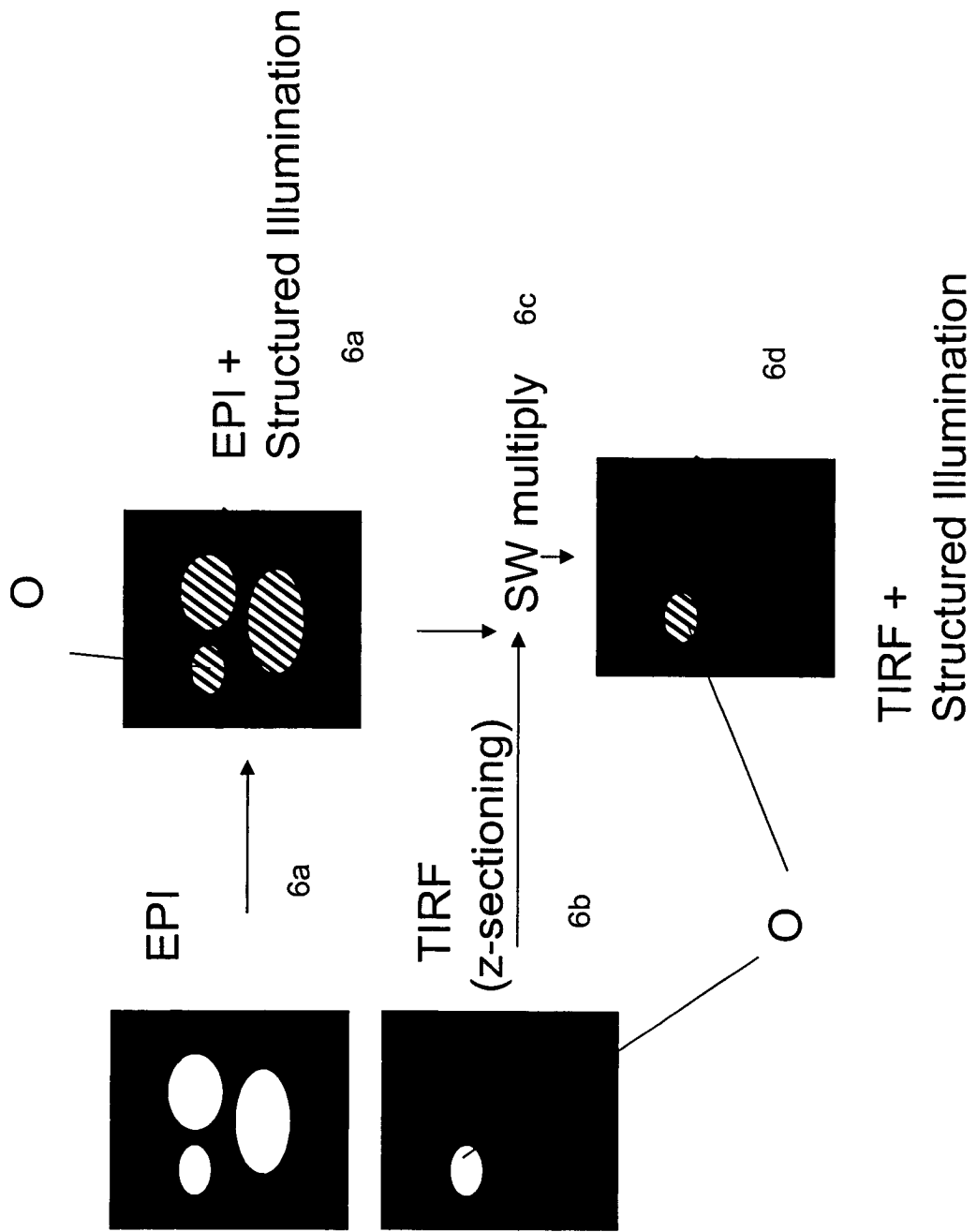


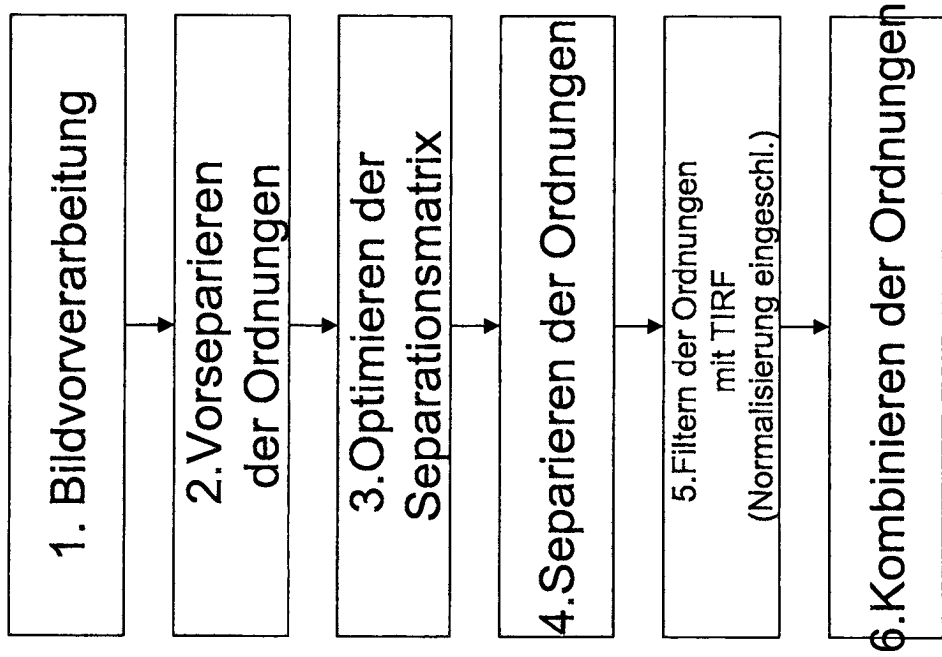
Fig. 6



# SIM+TIRF

Fig.7

7a



7b

