



(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: 10 2013 019 347.8

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

(22) Anmeldetag: 15.11.2013

G02B 6/04 (2006.01)

(43) Offenlegungstag: 19.02.2015

(66) Innere Priorität:
10 2013 013 792.6 15.08.2013

(72) Erfinder:
Kleppe, Ingo, Dr., 07743 Jena, DE; Novikau, Yauheni, 07743 Jena, DE; Nieten, Christoph, Dr., 07745 Jena, DE; Netz, Ralf, Dr., 07745 Jena, DE

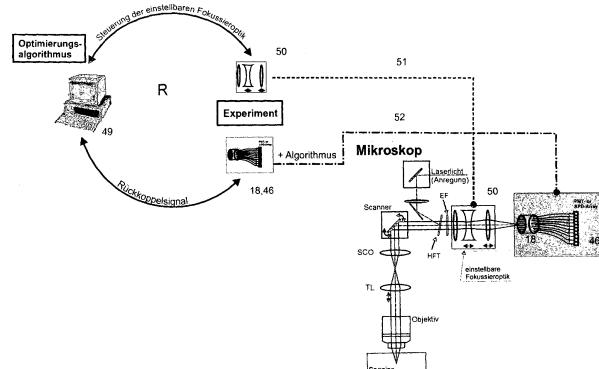
(71) Anmelder:
Carl Zeiss Microscopy GmbH, 07745 Jena, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

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

(57) Zusammenfassung: Mikroskop und Verfahren 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 Ortauflösung, 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
- wobei in einem Regelkreis durch Wechsel von Umverteilungselementen und/oder Einstellung einer Zoomoptik/Fokussieroptik zur Anpassung der Bildgrösse und/oder Zusammenschalten von Einzelpixeln des Detektorarrays anhand eines Regelsignals eine Einstellung erfolgt,
- wobei die Einstellung als Regelgröße den Bildkontrast und/oder die Bildschärfe und/oder das Signal/Rauschverhältnis beinhaltet.



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. Erfäßt 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 aufweitert. 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 detektionsseitigen 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 mehr-

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 aktivierte 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 Umschaltignal. Dieses wird nun so aufgebracht, daß zumindest ein gewisser Anteil der aktivierte Markierungsmoleküle von benachbarten, ebenfalls aktivierte Markierungsmolekülen so beabstandet ist, daß die aktivierte Markierungsmoleküle gemessen an der optischen Auflösung der Mikroskopie getrennt oder nachträglich trennbar sind. Man spricht von Isolierung der aktivierte 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 Umschaltignal 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 Pixelgrößen-einschränkungen 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 erfindungsgemäße 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 flächenmäßig 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-abildendes 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/oder 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 vorzutragen. 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 darstellt, 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 Objektives 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 Kalibermatrix 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 Spiegel- oder eines beweglichen Probentisches) be-

kannt, jedoch ergeben sich hier mechanisch bedingte Restgenauigkeiten. 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 Restgenauigkeit, 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 Fluoreszenzspektroskopie 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 Linienspot 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 Abbildungsrich-

tung 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.

[0039] Die Intensitätsverteilung des Spots über den Detektionsquerschnitt (Gaussverteilung) in **18** ist als **18a** darunter in **Fig.** 1 dargestellt

[0040] 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 hochauflößtes Gesamtbild der Probe **2**.

[0041] 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.

[0042] 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**.

[0043] 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 Bausweise 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.

[0044] Natürlich ist die Verwendung eines Steckers **23** nur eine von vielen Möglichkeiten, die ausgangsseitigen Enden der Lichtleitfasern **21** vor den Pixeln **25** anzuordnen. Gleichermaßen 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.

[0045] 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.

[0046] 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.

[0047] **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.

[0048] 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.

[0049] **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 Bausweise der **Fig. 1** die Detektionsebene **18** angeordnet wurde, bildet nun eine Zwischenbild-ebene **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.

[0050] **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 Pupillenfüll-

lung des Objektivs **13** und damit die Ausnutzung des Laserstrahls **5** angepaßt werden.

[0051] Zusätzlich ist in **Fig. 6** das LSM **1** noch zwei-kanalig 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 Bezugssuffix „a“ bzw. „b“ unterschieden.

[0052] 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.

[0053] **Fig. 7** zeigt eine Abwandlung des LSM **1** der **Fig. 1** hinsichtlich der Detektoreinrichtung **19**.

[0054] 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 Lichtleitfaser **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.

[0055] **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.

[0056] 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 Detektions-

ebene **18** bewirkt. Bei einer Airy-Scheibe ergibt sich der Durchmesser der Scheibe bei einer beugungsbegrenzten Abbildung gemäß der Formel $1,22 \cdot \lambda / \text{NA}$, wobei λ die mittlere Wellenlänge der abgebildeten Strahlung und NA die numerische Apertur des Objektivs **13** ist. Die Halbwertsbreite ist dann $0,15 \cdot \lambda / \text{NA}$. 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 4×4 -Array von Pixeln in der Detektionsebene **18** pro Halbwertsbreite mehr als genügen.

[0057] Die Zoomoptik, welche anhand der **Fig. 5** und **Fig. 6** erläutert wurde, erlaubt neben einer Anpassung dergestalt, daß die Beugungsverteilung des beugungsbegrenzten Bildes **17** des Spots **14** die Einangsfläche der Detektoreinrichtung **19** optimal ausfüllt, auch noch eine weitere Betriebsart, wenn nämlich mehr als eine Airy-Scheibe in die Detektionsebene **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 Signallstärke, 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. Voraussetzung für das Gelingen der Auflösungsverhöhung mit der genannten Methode ist das feine Abtasten der Fluoreszenz-Lichtfeldverteilung in der Pinholeebene (Detektionsebene). Um die Datentransfer- und Datenverarbeitungsrate gering zu halten, wird mit einer minimal notwendigen Anzahl von Detektor-(Faser)-elementen gearbeitet. Dieser Sachverhalt in Kombination mit der Abhängigkeit der Ausdehnung der Feldverteilung in der Detektionsebene vom Objektiv-Pupillendurchmesser und der Wellenlänge der Fluoreszenz macht es erforderlich, die objektivspezifische Ausdehnung der Sub-Airy-Feldverteilung für das optimale Abtasten an das Faserbündel relativ in der Größenausdehnung anpassen zu können.

[0058] Hierzu leistet die nachstehende Erfindung einen wichtigen Beitrag.

[0059] Die Erfindung wird durch die Merkmale der unabhängigen Patentansprüche charakterisiert.

[0060] Bevorzugte Weiterbildungen sind Gegenstand der abhängigen Ansprüche. Weitere Erläute-

rungen zur Erfindung erfolgen nachstehend anhand der Zeichnungen **Fig. 9–Fig. 12**.

[0061] Der klassische vielfach verwendete Ansatz, die Feldverteilung in der Pinhole-Ebene in ihrer Ausdehnung kontrollieren zu können, besteht in der Verwendung eines Zoom-Systems in einer Pupillenebene. Alternativ kann eine Fokussieroptik mit variabler Brennweite und fester Fokuslage verwendet werden (siehe auch **Abb. 11**). Diese Variante besteht i. a. aus weniger Linsen als in einem Pupillen-Zoom-System benötigt werden. D. h. sowohl Komplexität als auch Kosten sind im Fall der Fokussieroptik geringer. Es wird lediglich ein Faserbündel benötigt, die Ausdehnung des Fluoreszenzlichts wird konstant gehalten.

[0062] Möchte man optional oder vollständig auf ein Zoom-System oder eine einstellbare Fokussieroptik verzichten und trotzdem die notwendige Objektiv- und/oder Wellenlängenflexibilität gewährleisten, wird erfahrungsgemäß vorgeschlagen, mehrere Faserbündel mit unterschiedlichen Durchmessern nebeneinander anzurordnen und die Einzelfasern der Bündel auf jeweils vorzugsweise das gleiche Detektorelement eines Detektor-Array enden zu lassen (**Abb. 9**, **Abb. 10**). Das Faserbündel mit dem geeignetsten Sampling wird auf die optische Achse gefahren oder der Hauptfarbteiler im Beleuchtungsstrahlengang in passender Weise so geneigt (analog zu einer Justage des Pinholes mittels HFT), dass das ausgewählte Faserbündel beleuchtet wird und nur dieses Licht detektiert wird und schlussendlich in die Verrechnung einfließt.

[0063] Diese Verfahren zur Auswahl des geeigneten Faserbündels lassen sich sehr schnell schalten (im Vergleich zu einer Größenänderung des Airy-Scheibchens auf einem Faserbündel mittels eines Zoom-Systems), so dass diese Lösung insbesondere bei multispektralen Messungen besonders vorteilhaft ist.

[0064] Wenn die optimale Einstellung der Fokussieroptik (**Abb. 11**) oder das beste Faserbündel (**Abb. 10**) gefunden ist, wird nach Umsortierung der Daten gemäß Sheppard et al. [2] der Bildkontrast erhöht sein (insbesondere für höhere Raumfrequenzen wegen der erzielten Auflösungssteigerung und/oder einer Verbesserung des SNR). Diese Optimierung der für die Auflösungsverbesserung geeigneten Abtastung kann in einem geschlossenen Regelkreis durchgeführt werden (closed loop) (**Abb. 11**). Als Maß zum Auffinden der optimalen Einstellung bzw. des optimalen Faserbündels ist eine Kombination aus Kontrast und Signal-zu-Rausch Verhältnis besonders geeignet, da der optimale Fokus durch beide Bedingungen eindeutig definiert ist.

[0065] Bei dicken Proben mit einem hohen Anteil von außerfokalem Licht wird die Steuergröße SNR eine Fokussieroptikeinstellung oder ein Faserbündel

bevorzugen, bei der mehrere Airy-Scheiben auf das Faserbündel abgebildet werden. Andererseits wird der Kontrast in einem rekonstruierten Bild (Rekonstruktion z. B. nach Sheppard et al., In Optik 80, No. 2, 53 (1982)) eine Detektionslichtabtastung bevorzugen, die für eine optimale Auflösung bevorzugt nur eine Airy-Scheibe auf das Faserbündel abbildet. Mit Hilfe von einem Regelparameter lässt sich das System zwischen Auflösung und SNR optimieren, wobei auf die Regelung die Eigenschaften der verwendeten Probe berücksichtigt.

[0066] Für eine Regelung können beispielsweise die Daten zu Beginn der Aufnahme eines Bildes verwendet werden, um innerhalb eines Bildes die Parameter (Fokussieroptikeinstellung) zu optimieren (falls das Bild schon am Rand repräsentative Informationen aufweist). Alternativ werden zunächst mittels Snapshots die relevanten Informationen zur Optimierung für eine ausgewählte Region im Bild, bei verminderter Laser-Beleuchtung und/oder erhöhter Scan-Geschwindigkeit durchgeführt.

[0067] Eine Alternative zu den genannten opto-mechanischen Ausführungen für das optimale (Sub-)Airy-Abtasten des Detektionslicht kann darin bestehen, von vornherein eine deutlich höhere Anzahl von Lichtleitfasern und Detektorelementen zu verwenden, z. B. $2 \times 2 \times 32 = 128$, als prinzipiell notwendig. Die Optik muss dann nicht veränderlich sein.

[0068] Bei dieser Variante entstehen hohe Datenraten die aktuell von Echtzeit-Rechnern nicht verarbeitet werden können. Aus diesem Grunde ist es vorteilhaft, die Daten der z. B. 128 Kanäle auf 32 Kanäle herunterzusetzen. Für den Fall, dass genau 1 Airy auf das Faserbündel fällt, werden in einer detektornahen Elektronik (FPGA oder Microcontroller) jeweils z. B. 4 Kanäle zusammengefasst, so dass die zusammengefassten Kanäle die bekannte Anordnung besitzen. Für den Fall, dass sich gerade 2 Airy auf dem Faserbündel befinden, werden lediglich die inneren 32 Kanäle ausgelesen. Für Zwischenwerte muss je nach Größe der Airy-Scheibe auf dem Faserbündel eine passende Konfiguration gefunden werden, welche Fasern in einem Kanal zusammengefasst werden, um eine Auflösungssteigerung in jede laterale Richtung zu erzielen. Eine Interpolation im FPGA auf z. B. 32 Kanäle ist ebenfalls möglich.

[0069] Die Erfindung wird anhand der schematischen Darstellungen in **Fig. 9–Fig. 12** nachstehend weiter erläutert.

[0070] Die einzelnen Bezugszeichen (zusätzlich zu den Bezugszeichen der vorangehenden Darstellungen) bedeuten:

Bezugszeichenliste

40, 41, 42	Faserbündel
43, 44, 45	Lichtleiter
46	Mehrkanaldetektor
47	Schwenkbarer Hauptfarbteiler
48	Schieber
R	Regelkreis
49	Kontrolleinheit/Rechner
50	Einstellbare Fokussieroptik
51	Signalzuordnung
52	Signalzuordnung
53	Fasereingänge
54,55,56	Verteilung Airydurchmesser auf Fasereingängen

[0071] **Fig. 9** zeigt in schematischer Darstellung ein Laser-Scanning-Mikroskop wie bereits anhand der Darstellungen in **Fig. 1–Fig. 8** beschrieben, mit Sub-Airy ortsauflöster Detektion in der Pinhole-Ebene und Multi-Faserbündel-Anordnung. Hier wird ein- und derselbe Mehrkanaldetektor, der ein PMT- oder APD Array- oder eine PMT- oder APD-Zeile sein kann von mehreren Faserbündeln beaufschlagt.

[0072] Die von Faserbündeln **40, 41, 42** stammenden Lichtleiter **43, 44, 45** liegen dabei vorteilhaft bezüglich ihrer einzelnen Faserenden auf den einzelnen Detektorelementen übereinander, so dass problemlos eine Detektion des Lichts aus den Faserenden des jeweils optisch wirksamen Faserbündels erfolgen kann.

[0073] Alternativ können auch nur jeweils zwei Faserenden auf dem jeweiligen Detektorelement übereinanderliegen und/oder nebeneinander liegende Abschnitte des Detektors für die Faserbündel unterschiedlicher Faserbündel genutzt werden.

[0074] Vorteilhaft erfolgt eine Beaufschlagung der Detektorelemente durch die einzelnen Faserbündel **40, 41, 42** nacheinander, indem jeweils eines der Faserbündel in Position zum Lichtspot gebracht wird, der vom Probenlicht gebildet auf die Eintrittsflächen der Faserbündel, wie schon weiter vorn beschrieben, abgebildet wird.

[0075] Hierbei kann es sich bei **40–42** um Faserbündel mit unterschiedlichen Faserdurchmessern und/oder Faserabständen handeln.

[0076] Eine Anpassung durch Wechsel der Faserbündel kann beispielsweise bei einem Objektivwechsel des Objektives O und/oder bei einem Wechsel der Beleuchtungswellenlänge erfolgen.

[0077] In **Fig. 10** ist ein Schieber **48** dargestellt, der die Faserbündel **40–42** aufnimmt und der senkrecht zur optischen Achse verschiebbar ist, um die Faserbündel nacheinander in die optische Achse bringen

zu können. Es ist auch möglich, dass der Schieber **48** lediglich die Blendenöffnung auf ein geeigneteres Faserbündel verschiebt und der flexible HFT das Detektionslicht auf dieses geeigneteres Faserbündel ablenkt.

[0078] Alternativ dargestellt ist ein zur optischen Achse verschwenkbarer Hauptfarbteiler **47** um durch seine veränderliche Neigung unterschiedliche Faserbündel **40–42** optisch zu beaufschlagen.

[0079] **Fig. 11** zeigt die erfindungsgemäße Optimierung der Fluoreszenzlichtabtastung in einem geschlossenen Regelkreis mit Feed-Back-Signal.

[0080] In **Fig. 11** ist ein vorteilhafter Regelkreis R dargestellt der auch anhand **Fig. 12** weiter erläutert wird.

[0081] In **Fig. 11** erfolgt über eine Kontrolleinheit/Rechner **49** anhand einer Auswertung von Bildeigenschaften wie dem Bildkontrast, beispielsweise nach der Bildung der Sheppard-Summe (die bereits eine verbesserte Auslösung aufweist), oder dem Signal/Rauschverhältnis oder der Bildauflösung eine Einstellung beispielsweise einer einstellbaren Fokussieroptik **50** sowie ein Wechsel des Faserbündels wie in **Fig. 10** bereits beschrieben.

[0082] Bei optimaler Einstellung der Fokussieroptik **50** sowie des Faserbündels **40–42** wird wegen einer Auflösungserhöhung und/oder der Verbesserung des Signal/Rauschverhältnisses der Bildkontrast erhöht sein, insbesondere für höhere Raumfrequenzen.

[0083] Also kann vorteilhaft über die einzelnen oben beschriebenen Verstellungen und Einstellungen eine Optimierung des aufgenommenen Signals anhand der jeweiligen Bedingungen erfolgen.

[0084] Eine Kombination aus Kontrast und Signal/Rauschverhältnis als Regelgröße ist hierbei besonders geeignet da der optimale Fokus durch beide Bedingungen eindeutig definiert ist.

[0085] Hierzu kann auch vorteilhaft ein optimaler Auswerteprozess des Detektionslichtes durch zusammengefasstes Auslesen mehrerer Detektionsfasern **43–45** beitragen.

[0086] **Fig. 12:** Überabtastung des Detektionslichtes und optimales Binning um die Datenübertragungsrate ohne Auflösungsverlust zu reduzieren. a) Beispiel mit 128 Fasern und Detektorelementen. b) 1 Airy wird auf die 128 Fasern abgebildet und anschließend wird vierfach gebinnt. c) 2 Airy wird auf die 128 Fasern abgebildet, ausgelesen werden nur die 32 inneren Kanäle. d) 1.5 Airy auf dem Gesamt-Faser-Array.

[0087] Für den Fall, dass genau ein Airy auf das Faserbündel fällt, werden in einer detektornahen Elektronik (FPGA oder Microcontroller) jeweils z. B. 4 Kanäle zusammengefasst, so dass die zusammengefassten Kanäle die bekannte Anordnung besitzen (**Abb.** 12b). Für den Fall, dass sich gerade 2 Airy auf dem Faserbündel befinden, werden lediglich die inneren 32 Kanäle ausgelesen (**Abb.** 12c). Für Zwischenwerte muss je nach Größe der Airy-Scheibe auf dem Faserbündel eine passende Konfiguration gefunden werden, welche Fasern in einem Kanal zusammengefasst werden, um eine Auflösungssteigerung in jede laterale Richtung zu erzielen. Eine Interpolation im FPGA auf z. B. 32 Kanäle ist ebenfalls möglich. **Abb.** 12d) zeigt ein Beispiel für die genannte Situation.

[0088] Alternativ zur Umverteilung der Messsignale wie in **Fig.** 12d, wo jede Faser jeweils genau einem Kanal zugeordnet ist, ist es möglich, die D Signale einer Faser in einem FPGD auf mehrere Kanäle zu verteilen, beispielsweise mittellos Algorithmen die bei der Skalierung von Bildern fachüblich sind.

[0089] In **Fig.** 12a) sind beispielhaft Fasereingänge 53 dargestellt wobei im Wesentlichen jedem dieser Fasereingänge 53 ein Detektorelement 1–128 auf dem Detektorarray zugeordnet ist.

[0090] In **Fig.** 12b) ist anhand von zu 32 Segmenten zusammengefassten Faserneingängen 54 eine Zusammenfassung der Signale mehrerer Detektorelemente dargestellt, zugeordnet zu den Einzelfasern für 32 erzeugte Detektionssignale. Dies ermöglicht für den dargestellten Airydurchmesser des Lichtspots AR eine Reduktion der Detektionskanäle.

[0091] Vorteilhaft kann dadurch die Datenübertragungsrate ohne Übertragungsverlust reduziert werden

[0092] In **Fig.** 12c) ist (siehe **Fig.** 11) der Airydurchmesser AR um den Faktor 2 kleiner und wird damit von einer kleineren Anzahl von Fasereintrittsden abgetastet.

[0093] Hier werden auch nur die erfassten inneren Kanäle, hier die inneren 32 aus **Fig.** 12a, ausgelesen.

[0094] In **Fig.** 12d) ist das AR um den Faktor 1,5 kleiner als das Faserbündel.

[0095] Hier ist anhand von unterschiedlich grossen Einzelsegmenten SG dargestellt, dass auch ein unterschiedliches Binning von ausgelesenen Detektionssignalen erfolgen kann indem unterschiedlich viele Fasern zu unterschiedlich großen Segmenten SG zusammengefasst werden.

[0096] Die unterschiedliche Zusammenfassung von Detektionskanälen der dazugehörigen Einzeldetektoren des Detektionsarray 56 über die Lichtleitfasern wie in **Fig.** 12b)–d) dargestellt, kann vorteilhaft zeitgleich oder vor – oder nach einer Anpassung des Airydurchmessers des Lichtspots durch Einstellung über eine variable Optik 50 erfolgen und anhand des aufgenommenen Signals oder des erzeugten Probenbildes wird anhand oben beschriebener Kriterien (Kontrast u. a.) ein Optimierungsprozess über einen Regelkreis, wie anhand **Fig.** 11 beschrieben durchgeführt.

[0097] Die Zusammenfassung der Detektionskanäle stellt auch eine vorteilhafte Alternative zur Anpassung mit einer variablen Optik 50 dar.

[0098] Hierbei kann zusätzlich ein Austausch der Faserbündel wie in **Fig.** 9, **Fig.** 10 erfolgen und auch dafür die Optimierung der Signal- bzw. Bildaufnahme erfolgen.

[0099] Dies erfolgt durch beispielsweise durch jeweiligen Vergleich von mehreren unter unterschiedliche Bedingungen aufgenommenen Bildern der Probe oder einer Testprobe.

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]
- Sheppard et al. [0064]
- Sheppard et al., In Optik 80, No. 2, 53 (1982) [0065]

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 Ortauflösung, 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 Detektions-ebene (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) 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, wobei die Lichtleitfasern Multi-Mode Lichtleitfasern sind.

4. Mikroskop nach Anspruch 2 oder 3, **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 strahlungsin-tensitätsabhängiges Übersprechen nebeneinander-liegender Pixel (25) zu minimieren.

5. Mikroskop nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Umverteilungselement einen Spiegel (30) mit unterschiedlich geneigten Spiegelelementen (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 Pixel (25) des Detektorarrays (24) eine geometrische Anordnung haben, welche sich von der der Spiegel-elemente (31) unterscheidet.

6. Mikroskop nach einem der obigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Abbildungseinrichtung (4) eine der Detektionsebene (18) in Abbil-dungsrichtung vorgeordnete Zoomoptik (27) zur An-passung der Größe des Einzelbildes (17) an die der Detektoreinrichtung (19) aufweist.

7. Mikroskop nach Anspruch 6, **dadurch gekenn-zeichnet**, daß die Beleuchtungseinrichtung (3) und die Abbildungseinrichtung (4) sich eine Scaneinrich-tung (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) zu-sammenfällt, wobei die Zoomoptik (27) so angeordnet ist, daß sie auch Bestandteil der Beleuchtungs-einrichtung (3) ist.

8. Mikroskop nach einem der obigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Detektorarray (24) eine Detektorzeile ist.

9. Mikroskop nach Anspruch 8, **dadurch gekenn-zeichnet**, dass die Detektorzeile eine APD- oder PMT-Zeile ist.

10. Verfahren zur hochauflösenden Scanning-Mi-kroskopie einer Probe (2), bei dem

- die Probe (2) beleuchtet wird,
- mindestens ein scannend über die Probe (2) ge-führter Punkt- oder Linien-Spot (14) in ein Einzelbild (17) abgebildet wird, wobei der Spot (14) unter ei-nem 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 Ortauflösung 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 Detek-torarrays (24) umverteilt wird.

11. Verfahren nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Strahlung des Einzelbildes (17) mittels eines Bündels (20) aus Lichtleitfasern (21) 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.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei die Lichtleitfasern Multi-Mode Lichtleitfasern sind.

13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, **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.

14. Verfahren nach Anspruch 10, 11 oder 12, **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.

15. Verfahren nach Anspruch 10, **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.

16. Verfahren nach einem der obigen Verfahrensansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Detektorarray (24) eine Detektorzeile verwendet wird.

17. Verfahren nach Anspruch 16, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Detektorzeile eine APD- oder PMT-Zeile ist.

18. 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.

19. 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.

20. Mikroskop zur hochauflösenden Mikroskopie nach einem der vorangehenden Patentansprüche 1–9, gekennzeichnet durch eine oder mehrere der folgenden Ausführungen:

- wobei mehrere Umverteilungselemente vorgesehen sind, die dem Detektorarray vorgeordnet sind,
- wobei für mindestens einen Teil der Pixel des Detektorarrays den einzelnen Pixeln jeweils Strahlung aus mindestens zwei Umverteilungselementen zugeordnet ist,
- wobei an den einzelnen Pixeln mindestens zwei Lichtleitfasern aus unterschiedlichen Umverteilungselementen enden,
- wobei die Umverteilungselemente Faserbündel sind die sich in der Anzahl der Fasern und/oder der Anordnung der Fasern und/oder dem Faserdurchmesser und/oder der Form des Faserquerschnitts unterscheiden,
- wobei die Umverteilungselemente in die optische Achse zur Detektion des Probenlichtes einschwenkbar oder einschiebar angeordnet sind,
- wobei durch Zusammenschalten von Einzelpixeln bei der Signalauswertung die Anzahl der Einzelsignale des Detektorarrays verringert wird,
- wobei ein Auslesen der Detektorpixel nur in Bereichen erfolgt die zumindest teilweise von Probenlicht beaufschlagt werden,
- wobei in einem Regelkreis durch Wechsel von Umverteilungselementen und/oder Einstellung einer Zoomoptik/Fokussieroptik zur Anpassung der Bildgrösse und/oder Zusammenschalten von Einzelpixeln des Detektorarrays anhand eines Regelsignals eine Einstellung erfolgt,
- wobei die Einstellung als Regelgröße den Bildkontrast und/oder die Bildschärfe und/oder das Signal/Rauschverhältnis beinhaltet
- wobei in einer dem Detektorarray nachgeschalteten Auswerteschaltung, selektiv Kanäle ausgelesen und/oder zur weiteren Verarbeitung zusammengefaßt werden

21. Mikroskop nach Anspruch 20, wobei die Auswerteschaltung eine FPGA oder ein Mikrocontroller ist.

22. Verfahren zur hochauflösenden Mikroskopie nach einem der vorangehenden Patentansprüche 10–19, gekennzeichnet durch eine oder mehrere der folgenden Ausführungen:

- wobei mehrere Umverteilungselemente vorgesehen sind, die dem Detektorarray vorgeordnet sind,
- wobei für mindestens einen Teil der Pixel des Detektorarrays den einzelnen Pixeln jeweils Strahlung

aus mindestens zwei Umverteilungselementen zugeordnet ist,

- wobei an den einzelnen Pixeln mindestens zwei Lichtleitfasern aus unterschiedlichen Umverteilungselementen enden,
- wobei die Umverteilungselemente Faserbündel sind die sich in der Anzahl der Fasern und/oder der Anordnung der Fasern und/oder dem Faserdurchmesser und/oder der Form des Faserquerschnitts unterscheiden,
- wobei die Umverteilungselemente in die optische Achse zur Detektion des Probenlichtes einschwenkbar oder einschiebbar angeordnet sind,
- wobei durch Zusammenschalten von Einzelpixeln bei der Signalauswertung die Anzahl der Einzelsignale des Detektorarrays verringert wird,
- wobei ein Auslesen der Detektorpixel nur in Bereichen erfolgt die zumindest teilweise von Probenlicht beaufschlagt werden,
- wobei in einem Regelkreis durch Wechsel von Umverteilungselementen und/oder Einstellung einer Zoomoptik/Fokussieroptik zur Anpassung der Bildgrösse und/oder Zusammenschalten von Einzelpixeln des Detektorarrays anhand eines Regelsignals eine Einstellung erfolgt,
- wobei die Einstellung als Regelgröße den Bildkontrast und/oder die Bildschärfe und/oder das Signal/Rauschverhältnis beinhaltet
- wobei in einer dem Detektorarray nachgeschalteten Auswerteschaltung selektiv Kanäle ausgelesen und/oder zur weiteren Verarbeitung zusammengefaßt werden

23. Verfahren nach Anspruch 22, wobei die Auswerteschaltung eine FPGA oder ein Mikrocontroller ist.

Es folgen 10 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

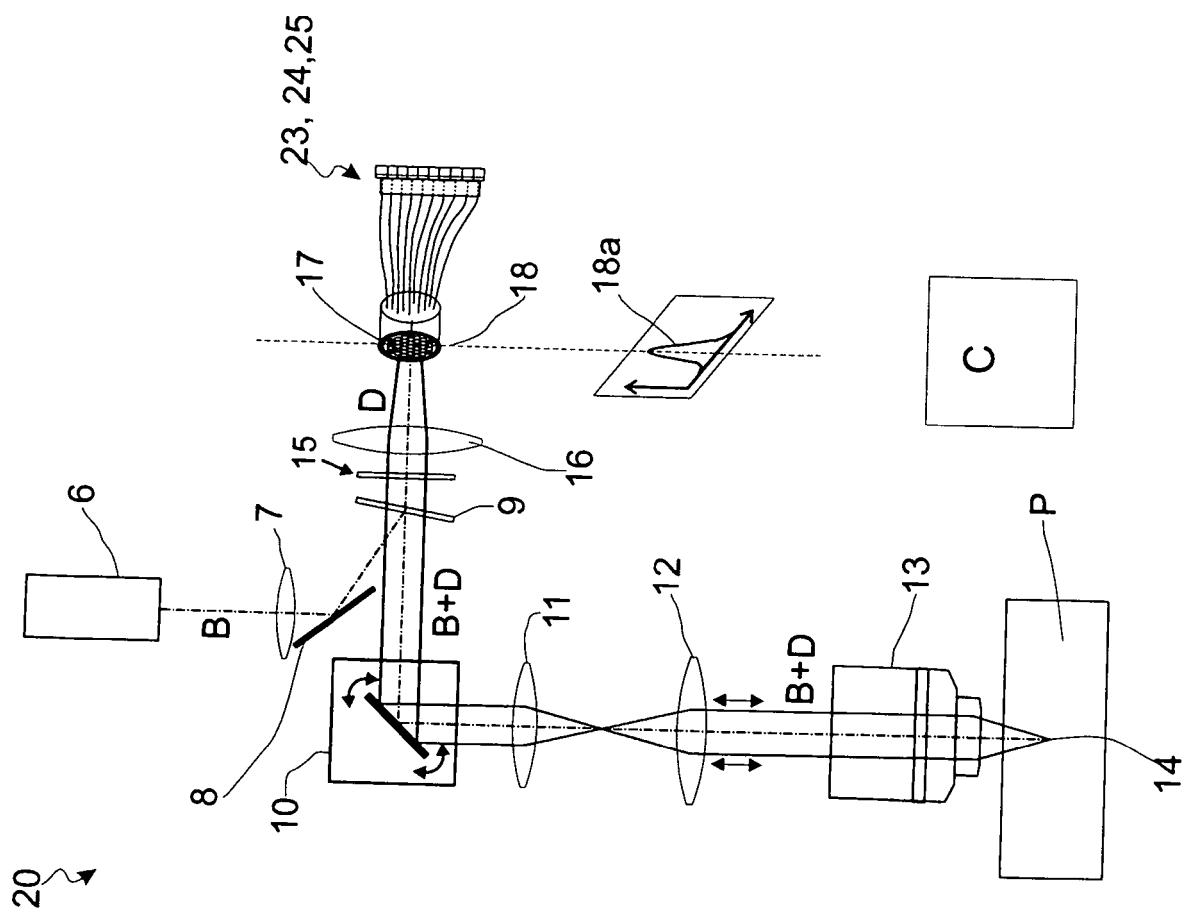
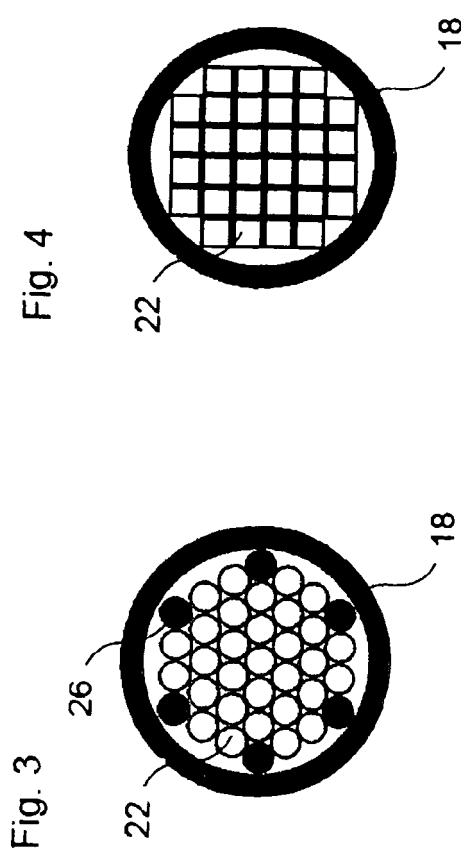
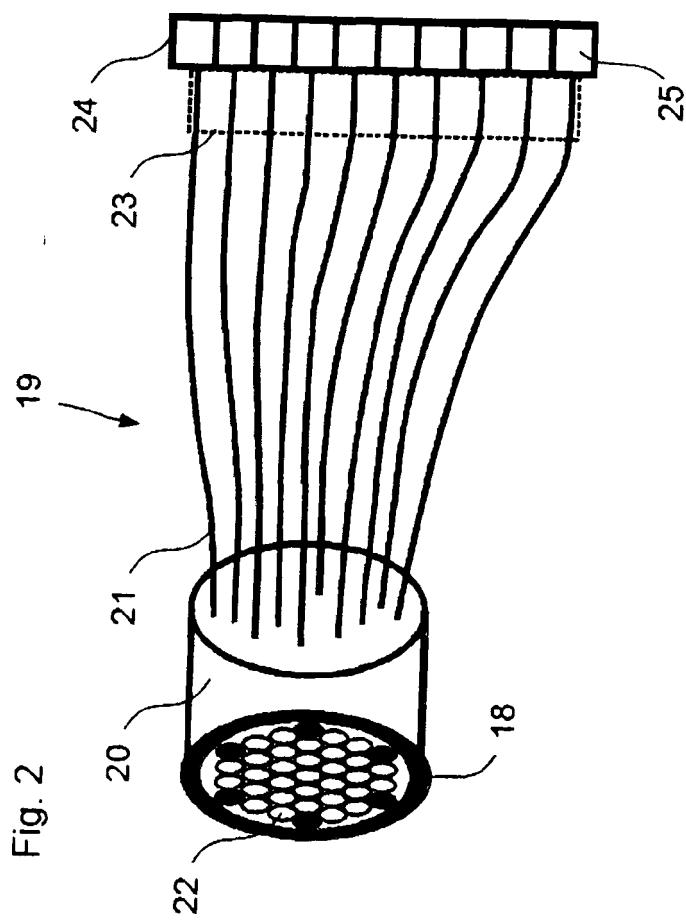
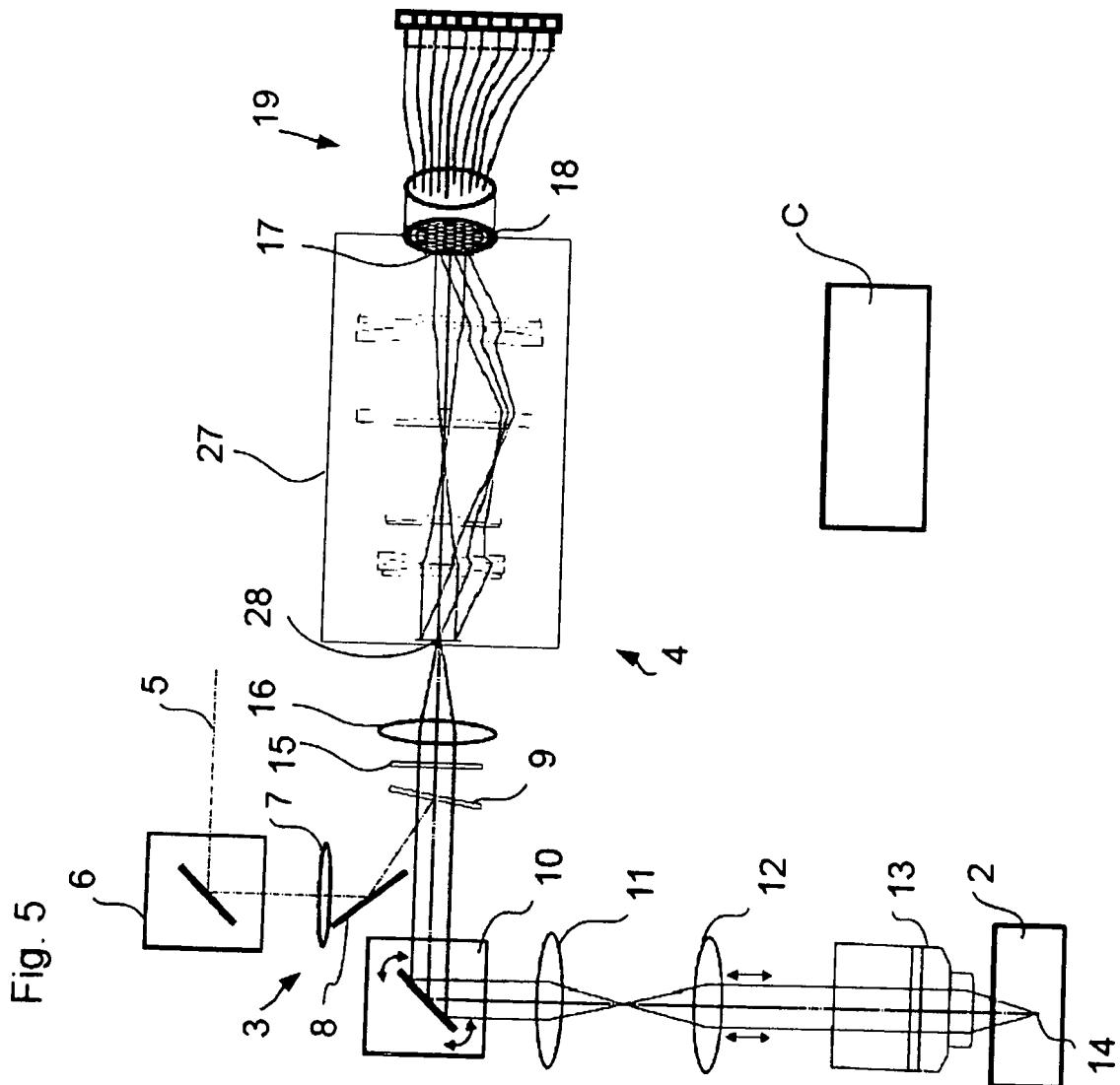


Fig.1





6
Fig.

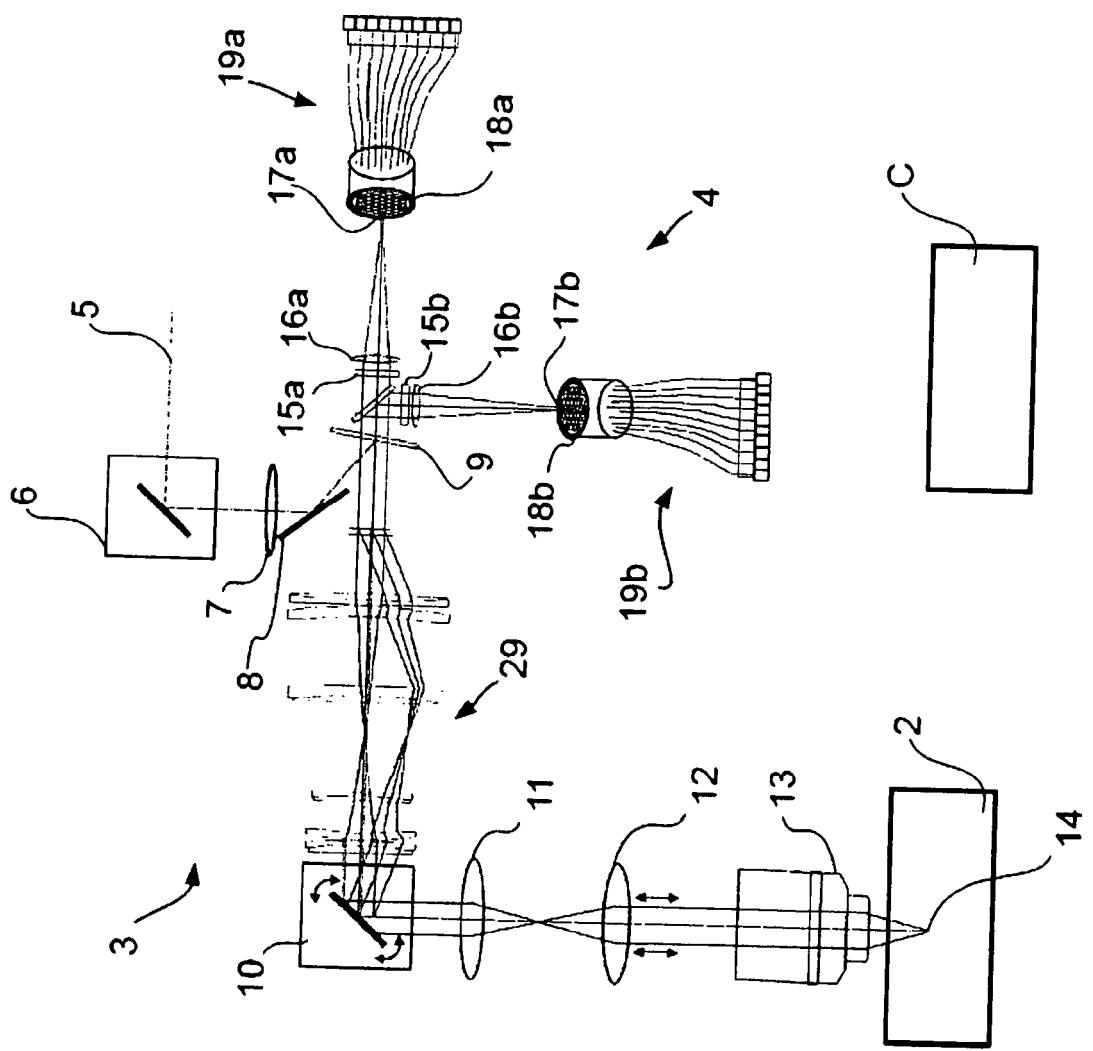


Fig. 7

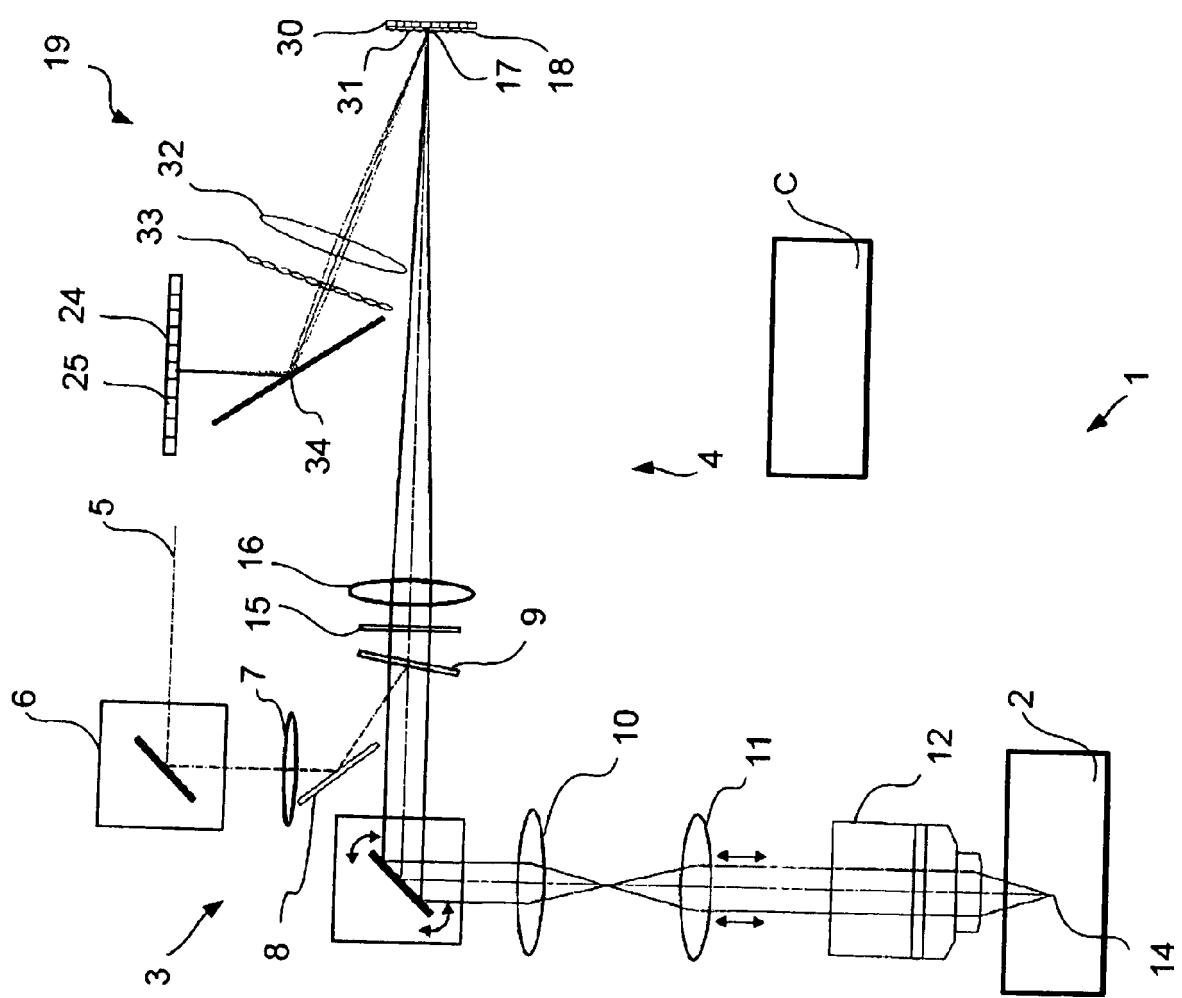
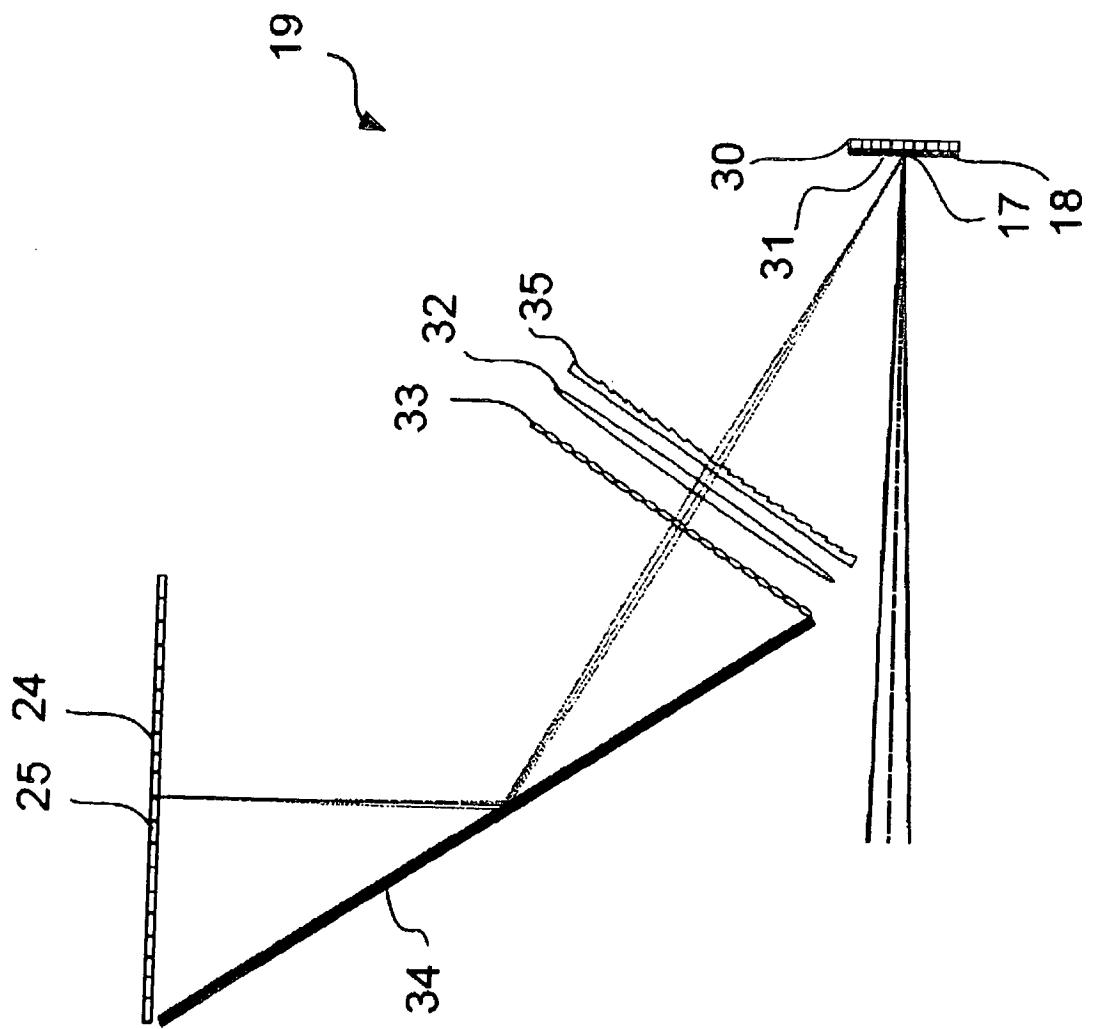


Fig. 8



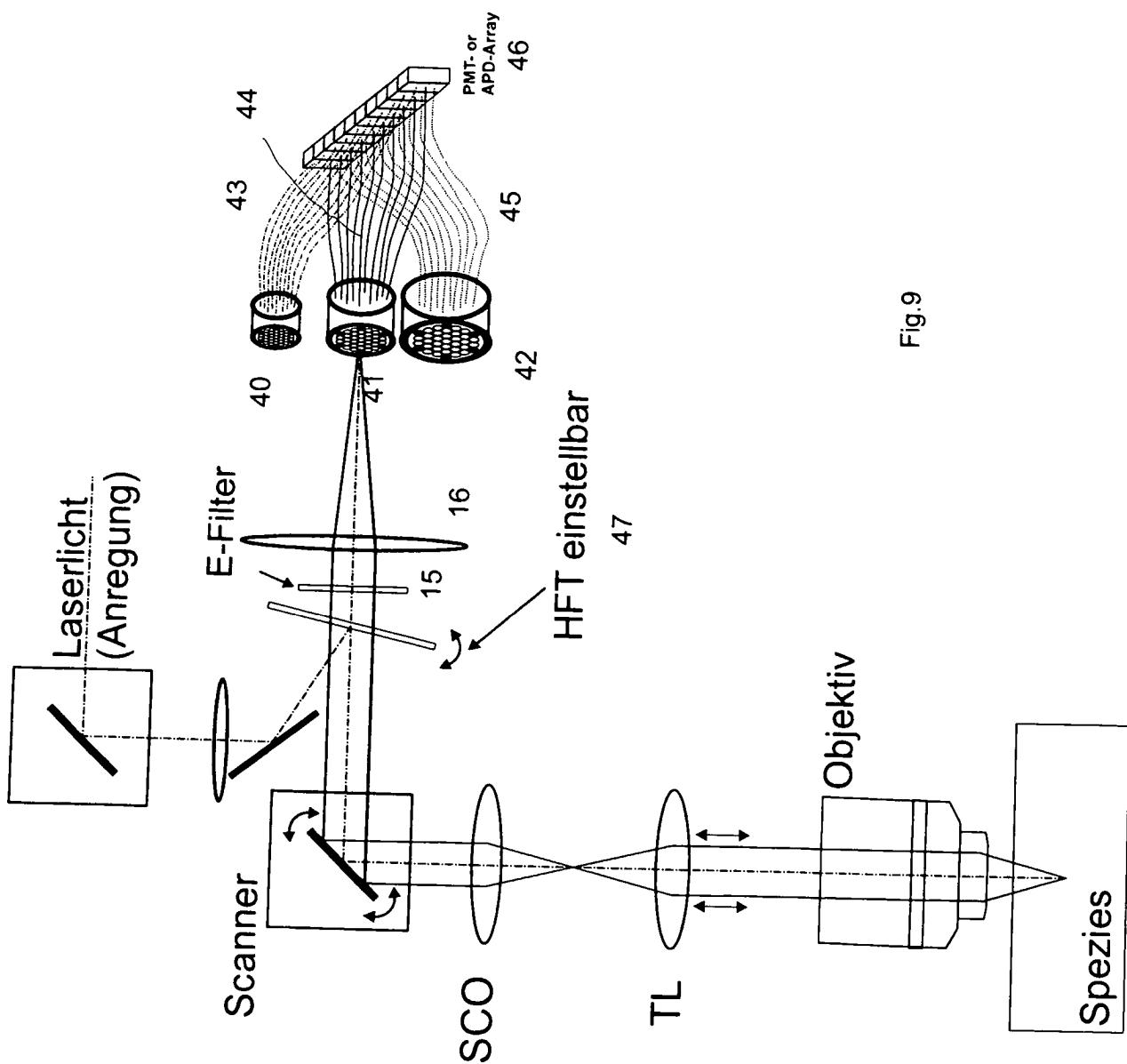


Fig. 9

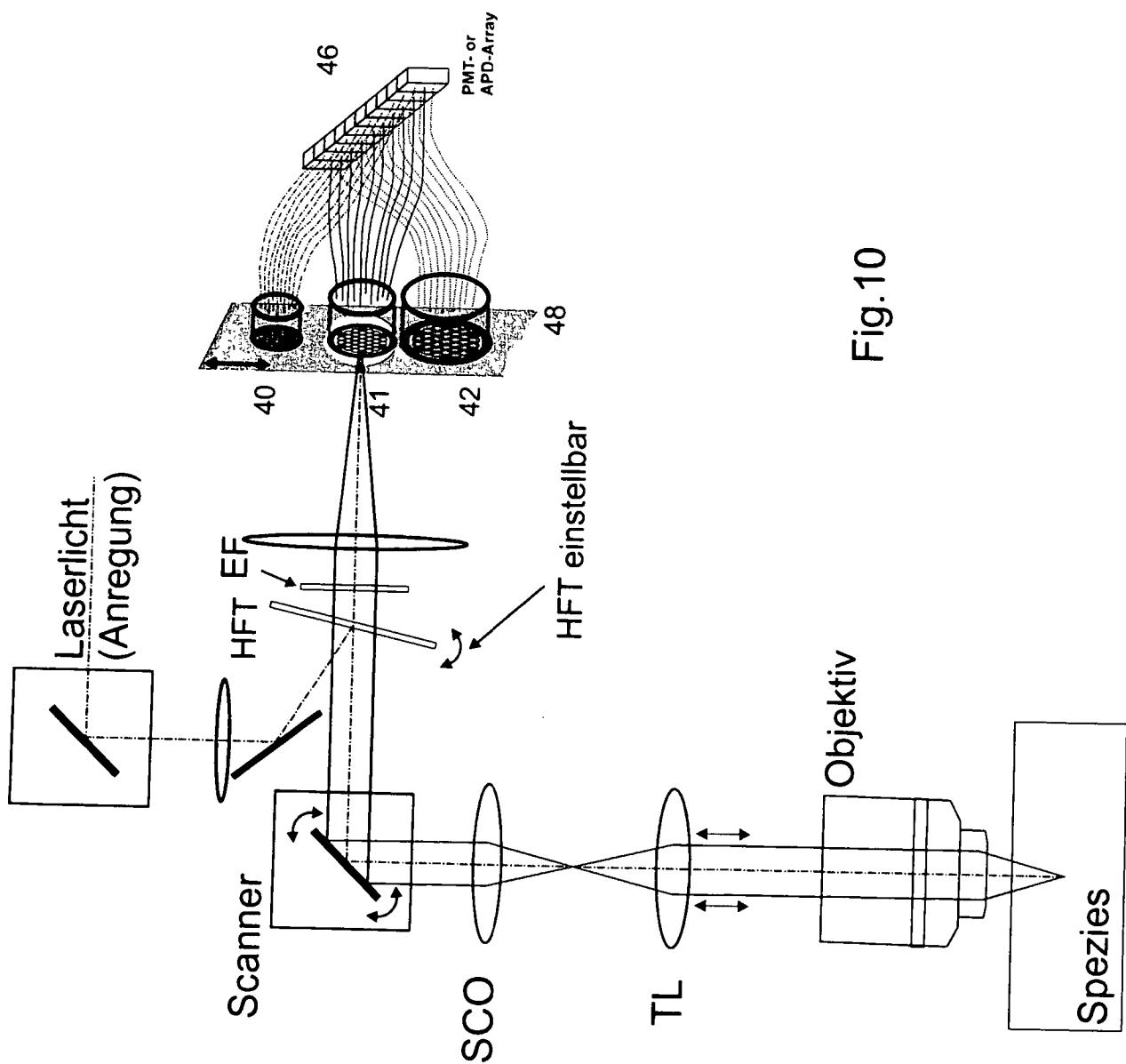
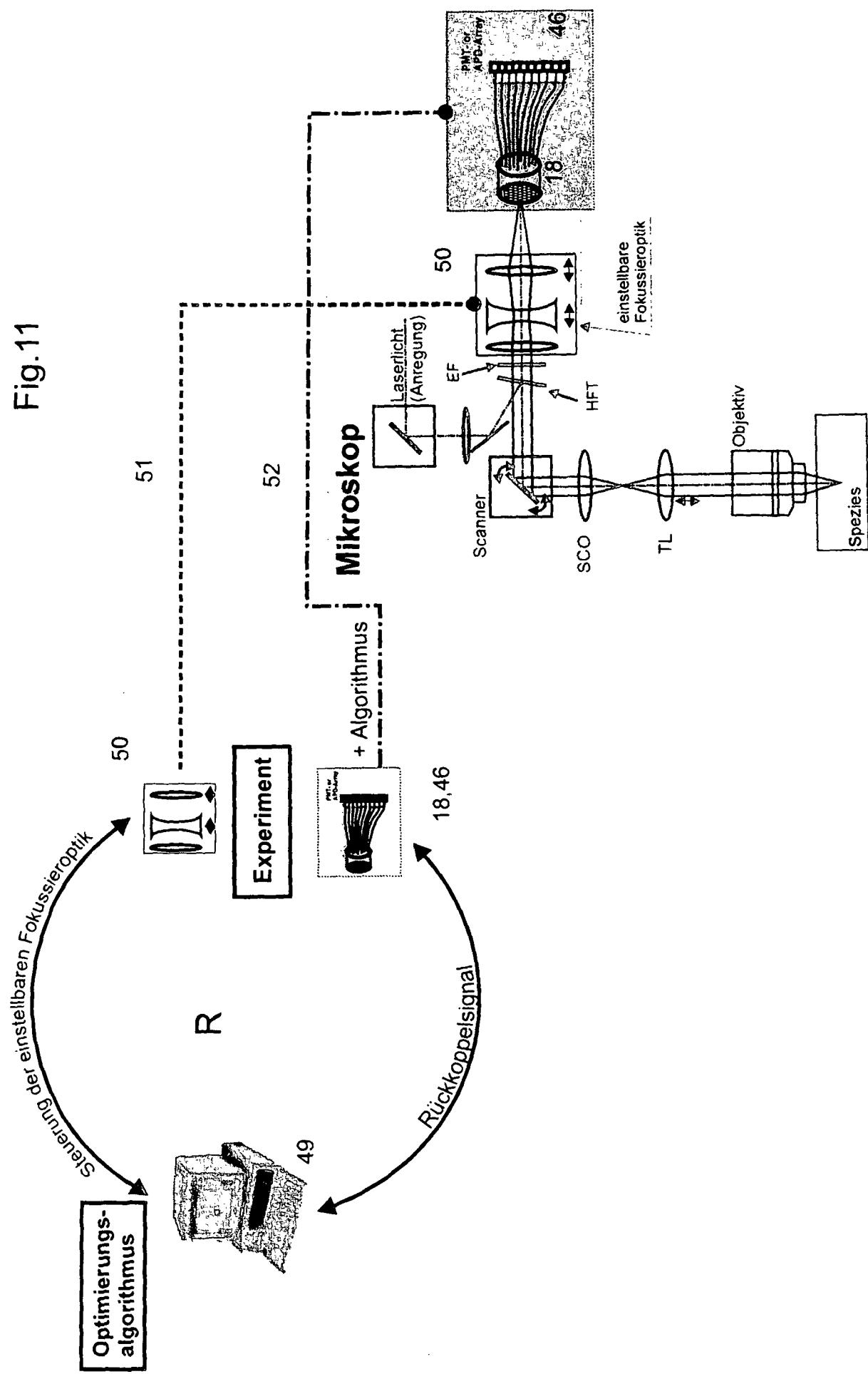


Fig. 10

Fig. 11



SG

Fig.12

