

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7201327号  
(P7201327)

(45)発行日 令和5年1月10日(2023.1.10)

(24)登録日 令和4年12月26日(2022.12.26)

(51)国際特許分類	F I	
G 0 1 N 21/64 (2006.01)	G 0 1 N 21/64	F
G 0 2 B 21/00 (2006.01)	G 0 1 N 21/64	E
B 8 2 Y 35/00 (2011.01)	G 0 2 B 21/00	
B 8 2 Y 15/00 (2011.01)	B 8 2 Y 35/00	
	B 8 2 Y 15/00	

請求項の数 27 外国語出願 (全29頁)

(21)出願番号	特願2018-36857(P2018-36857)	(73)特許権者	508329874
(22)出願日	平成30年3月1日(2018.3.1)		マックス - ブランク - ゲゼルシャフト・
(65)公開番号	特開2018-169387(P2018-169387 A)		ツアー・フェルデルング・デア・ヴィッ
(43)公開日	平成30年11月1日(2018.11.1)		センシャフテン・アインゲトラーゲナー
審査請求日	令和3年2月22日(2021.2.22)		・フェライン
(31)優先権主張番号	10 2017 104 736.0		ドイツ連邦共和国、8 0 5 3 9 ミュン
(32)優先日	平成29年3月7日(2017.3.7)	(74)代理人	100069556
(33)優先権主張国・地域又は機関	ドイツ(DE)		弁理士 江崎 光史
(31)優先権主張番号	17182455.0	(74)代理人	100111486
(32)優先日	平成29年7月20日(2017.7.20)		弁理士 鍛冶澤 實
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)	(74)代理人	100191835
			弁理士 中村 真介
		(74)代理人	100208258
			弁理士 鈴木 友子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ナノスケール構造体の空間的測定方法及び装置

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

試料(13)内の複数のナノスケール構造体(7)の空間的測定方法であって、当該方法が、以下のステップ、すなわち、

- 蛍光マーカ(8、9)によって異なる位置で個々のナノスケール構造体(7)をマークする(1)ステップ、

- 蛍光の光(42)を放出する励起光(25)によって蛍光マーカ(8、9)を励起するステップであって、

蛍光マーカ(8、9)を励起するステップは、

- 励起光(25)の強度分布(24)と、蛍光マーカ(8、9)によって蛍光の光の放出に影響を及ぼす異なる光(49)である蛍光阻害光(46)の強度分布(48)とのどちらか一方が、試料(13)内の異なる位置(20、21、22、23)に配置されている局所的最小値(26)を備える、ステップ、及び

- それぞれの位置決め補助具(12)の位置(19)のまわりの至近距離範囲(18)内で、異なる位置(20、21、22、23)に局所的最小値(26)を配置する(3)ステップを含み、至近距離範囲(18)の寸法が、励起光(25)の波長と蛍光の光(42)の波長での回折限界値よりも大きくない、ステップ、

- 試料(13)から放出された蛍光の光(42)を、個々の蛍光マーカ(8、9)と局所的最小値(26)が配置されている異なる位置(20、21、22、23)とについて両方とも別々に、記録する(4)ステップ、並びに

- 局所的最小値 ( 2 6 ) の異なる位置 ( 2 0 、 2 1 、 2 2 、 2 3 ) に対するそれぞれの蛍光マーカ ( 8 、 9 ) について記録された蛍光の光 ( 4 2 ) の強度から、試料 ( 1 3 ) 内の個々の蛍光マーカ ( 8 、 9 ) の位置を決定する ( 5 ) ステップを含む方法において、当該方法は、

- 個々の位置決め補助具 ( 1 2 ) に個々のナノスケール構造体 ( 7 ) を連結する ( 2 ) 更なるステップを含み、

- 試料 ( 1 3 ) 内の位置決め補助具 ( 1 2 ) の位置 ( 1 9 ) が、既知であるか、または個々の位置決め補助具 ( 1 2 ) によって反射される光から連結する ( 2 ) ステップの後で決定されている、

ことを特徴とする方法。

10

【請求項 2】

至近距離範囲 ( 1 8 ) の寸法が、励起光 ( 2 5 ) の波長および蛍光の光 ( 4 2 ) の波長での回折限界値の半分または四半分より大きくないことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

個々の蛍光マーカ ( 8 、 9 ) の位置は、局所的最小値 ( 2 6 ) の 4 n 個以下、3 n 個以下、又は 2 n 個以下の異なる位置 ( 2 0 、 2 1 、 2 2 、 2 3 ) に対して、記録された蛍光の光 ( 4 2 ) の強度から決定されていて、n は、試料 ( 1 3 ) 内の個々の蛍光マーカ ( 8 、 9 ) の位置が決定されている空間方向の数であることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の方法。

20

【請求項 4】

試料 ( 1 3 ) 内の個々の蛍光マーカ ( 8 、 9 ) の位置を決定する ( 5 ) ステップが、局所的極値を備える空間関数を、局所的最小値 ( 2 6 ) の異なる位置 ( 2 0 、 2 1 、 2 2 、 2 3 ) に対するそれぞれの蛍光マーカ ( 8 、 9 ) について記録された蛍光の光の強度に適合するステップを含むことを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

局所的極値を備える空間関数は、

- 光反射位置決め補助具の少なくとも 1 個でスキャンすることによって、または  
 - 蛍光マーカ ( 8 、 9 ) の少なくとも 1 個でスキャンすることによって、または  
 - 更なる蛍光マーカを、局所的最小値 ( 2 6 ) でスキャンすることによって、かつスキャン中に時間的分解能によって試料 ( 1 3 ) から反射された光、若しくは試料 ( 1 3 ) から放出された蛍光の光 ( 4 2 ) を記録する ( 4 ) ことによって、決定されていることを特徴とする請求項 4 に記載の方法。

30

【請求項 6】

個々のナノスケール構造体 ( 7 ) が異なる位置でマークされている蛍光マーカ ( 8 、 9 ) は、

- 蛍光マーカ ( 8 、 9 ) の励起スペクトルおよび発光スペクトルから選択されたスペクトル特性の異なる蛍光マーカ ( 8 、 9 )、並びに

- 蛍光の光 ( 4 2 ) の放出のために励起光 ( 2 5 ) によって励起可能である活性状態と、少なくとも 同じ励起光 ( 2 5 ) によって、蛍光の光 ( 4 2 ) の放出のために励起可能でない不活性状態とを有し、かつその活性状態とその不活性状態との間をスイッチ光によって移動可能である蛍光マーカ ( 8 、 9 )、

40

から選択されていることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 7】

位置決め補助具 ( 1 2 ) の位置 ( 1 9 ) が、至近距離範囲 ( 1 8 ) 内に局所的最小値 ( 2 6 ) を配置するために使用された手段以外で、試料 ( 1 3 ) に対して局所的最小値 ( 2 6 ) の相対的移動のための他の手段によって局所的最小値 ( 2 6 ) で接近されていることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 8】

位置決め補助具 ( 1 2 ) の位置 ( 1 9 ) が、試料 ( 1 3 ) の固定点 ( 2 9 ) に対して固

50

定され、かつ位置決め補助具(12)の位置(19)、即ち個々の至近距離範囲(18)が、試料(13)の固定点(29)に対して接近されていることを特徴とする請求項7に記載の方法。

【請求項9】

位置決め補助具(12)の位置(19)が、

- 励起光(25)の波長および蛍光の光(42)の波長での回折限界値の二倍より小さくない最小距離で、並びに

- 周期的パターン、六角形パターンおよび正方形パターンから選ばれた試料(13)内の所定のパターンで、

配置されていることを特徴とする請求項1または2に記載の方法。

10

【請求項10】

試料(13)内の位置決め補助具(12)は、ナノスケール構造体(7)が免疫反応経路で連結されている固定連結部位(11)であることを特徴とする請求項1または2に記載の方法。

【請求項11】

位置決め補助具(12)が、金粒子(14)、銀粒子および量子ドットから選択された光反射実体を備えることを特徴とする請求項1または2に記載の方法。

【請求項12】

測定する複数のナノスケール構造体(7)は、同一のナノスケール構造体(7)である複数のナノスケール構造体(7)が少なくとも2つ以上あり、かつ同一のナノスケール構造体(7)が試料(13)の異なる領域内の異なる周囲条件にさらされていることを特徴とする請求項1または2に記載の方法。

20

【請求項13】

試料(13)内の個々の蛍光マーカ(8、9)の位置が、少なくとも2つの時点について、これらの少なくとも2つの時点について記録された蛍光の光(42)の強度から、決定されていて、そして、

- ナノスケール構造体(7)が、少なくとも2つの時点で異なる周囲条件にさらされているか、または

- 少なくとも2つの時点が、ナノスケール構造体(7)がさらされた周囲条件の変更を継承することを特徴とする請求項1または2に記載の方法。

30

【請求項14】

試料(13)内の複数のナノスケール構造体(7)の空間的測定装置であって、ナノスケール構造体(7)の各々は、試料(13)内の位置が既知であるかまたは位置決め補助具(12)によって反射される光から決定された位置決め補助具(12)に連結されている当該装置において、

当該装置が、

- 試料(13)のための試料ホルダ(34)、

- 試料ホルダ(34)上へ向けられた対物レンズ(36)、

- 対物レンズ(36)によって合焦された励起光(25)の強度分布が局所的最小値(26)を備えるように対物レンズ(36)に励起光(25)を連結する光源(37)か、または対物レンズ(36)によって合焦された更なる光の強度分布が局所的最小値(26)を備えるように対物レンズ(36)に蛍光マーカ(8、9)による蛍光の光(42)の放出に影響を及ぼす更なる光と励起光(25)を連結する光源(37)、

40

- 試料ホルダ(34)に対して局所的最小値(26)の位置(20、21、22、23)を移動するように構成されたスキャナ(40)、

- 局所的最小値(26)の異なる位置(20、21、22、23)に対して試料(13)から別々に放出された蛍光の光(42)を記録するように構成された検出器(45)、

- 局所的最小値(26)の異なる位置(20、21、22、23)に対するそれぞれの蛍光マーカ(8、9)について記録された蛍光の光(42)の強度から、試料(13)内の個々の蛍光マーカ(8、9)の位置を決定するように構成された評価ユニット(44)、

50

ならびに

- それぞれの位置決め補助具 ( 1 2 ) の位置 ( 1 9 ) のまわりの至近距離範囲 ( 1 8 ) 内で、異なる位置 ( 2 0 、 2 1 、 2 2 、 2 3 ) に局所的最小値 ( 2 6 ) を配置する ( 3 ) ように構成された制御部であって、至近距離範囲 ( 1 8 ) の寸法が、励起光 ( 2 5 ) の波長と蛍光の光 ( 4 2 ) の波長での回折限界値よりも大きくない、制御部を備えることを特徴とする装置。

【請求項 1 5】

試料 ( 1 3 ) 内の 1 つのナノスケール構造体 ( 7 ) の空間的測定方法であって、当該方法が以下のステップ、すなわち、

- 蛍光マーカ ( 8 、 9 ) によって異なる位置でナノスケール構造体 ( 7 ) をマークする ( 1 ) ステップ、

10

- 蛍光阻害光 ( 4 6 ) の強度分布 ( 4 8 ) の局所的最小値 ( 2 6 ) のそれぞれの位置で蛍光の光 ( 4 2 ) の放出のために励起光 ( 2 5 ) によって蛍光マーカ ( 8 、 9 ) を励起する ( 3 ) ステップであって、試料 ( 1 3 ) の寸法が、励起光 ( 2 5 ) の波長および蛍光の光 ( 4 2 ) の波長での回折限界値より大きくなく、局所的最小値 ( 2 6 ) が試料 ( 1 3 ) 内の至近距離範囲 ( 1 8 ) 内の異なる位置 ( 2 0 、 2 1 、 2 2 、 2 3 ) に配置されている、ステップ、

- 個々の蛍光マーカ ( 8 、 9 ) と局所的最小値 ( 2 6 ) の異なる位置 ( 2 0 、 2 1 、 2 2 、 2 3 ) について、試料 ( 1 3 ) から放出された蛍光の光 ( 4 2 ) を別々に記録する ( 4 ) ステップ、ならびに

20

- 局所的最小値 ( 2 6 ) の異なる位置 ( 2 0 、 2 1 、 2 2 、 2 3 ) に対するそれぞれの蛍光マーカ ( 8 、 9 ) について記録される蛍光の光 ( 4 2 ) の強度から、試料 ( 1 3 ) 内の個々の蛍光マーカ ( 8 、 9 ) の位置を決定する ( 5 ) ステップを含むことを特徴とする方法。

【請求項 1 6】

励起光 ( 2 5 ) の強度分布 ( 2 4 ) は、蛍光阻害光 ( 4 6 ) の強度分布 ( 4 8 ) の局所的最小値 ( 2 6 ) のそれぞれの位置で最大値を有することを特徴とする請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

至近距離範囲 ( 1 8 ) の寸法が、

30

- 励起光 ( 2 5 ) の波長および蛍光の光 ( 4 2 ) の波長での回折限界値の半分または四半分より大きくなく、かつ

- 局所的最小値 ( 2 6 ) までのその距離にわたってそれぞれの蛍光マーカ ( 8 、 9 ) によって放出された蛍光の光 ( 4 2 ) の強度の分布 ( 5 0 ) の半分最大値での全幅、または半分最大値での全幅の半分、または四半分、より大きくないことを特徴とする請求項 1 5 または 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

個々の蛍光マーカ ( 8 、 9 ) の位置が、局所的最小値 ( 2 6 ) の  $4n$  個以下、 $3n$  個以下、又は  $2n$  個以下の異なる位置 ( 2 0 、 2 1 、 2 2 、 2 3 ) に対して記録された蛍光の光 ( 4 2 ) の強度から決定されていて、 $n$  は、試料 ( 1 3 ) 内の個々の蛍光マーカ ( 8 、 9 ) の位置が決定されている空間方向の数であることを特徴とする請求項 1 5 または 1 6 に記載の方法。

40

【請求項 1 9】

試料 ( 1 3 ) 内の個々の蛍光マーカ ( 8 、 9 ) の位置を決定する ( 5 ) ステップは、局所的最大値を備える空間関数を局所的最小値 ( 2 6 ) の異なる位置 ( 2 0 、 2 1 、 2 2 、 2 3 ) に対するそれぞれの蛍光マーカ ( 8 、 9 ) について記録された蛍光の光 ( 4 2 ) の強度に適合するステップを含むことを特徴とする請求項 1 5 または 1 6 に記載の方法。

【請求項 2 0】

局所的最大値を備える空間関数が、

- 蛍光マーカ ( 8 、 9 ) または異なる蛍光マーカの少なくとも 1 個を、局所的最小値 ( 2

50

6)でスキャンし、かつスキャン中に試料(13)から放出された蛍光の光(42)を時間的分解能によって記録する(4)ことで、かつ

- 加えて、励起光(25)の最大値だけで少なくとも1個または更なる蛍光マーカ(8、9)をスキャンし、かつスキャン中に時間的分解能によって試料(13)から放出された蛍光の光(42)を記録する(4)ことで、

決定されていることを特徴とする請求項19に記載の方法。

【請求項21】

励起するステップ、記録する(4)ステップ、および決定する(5)ステップが、蛍光阻害光(46)の増大した強度で少なくとも一回繰り返されていることを特徴とする請求項15または16に記載の方法。

【請求項22】

ナノスケール構造体(7)が異なる位置でマークされている蛍光マーカ(8、9)は、  
- 蛍光マーカ(8、9)の励起スペクトルおよび発光スペクトルから選択されたスペクトル特性の異なる蛍光マーカ(8、9)、並びに

- 蛍光の光(42)の放出のために励起光(25)によって励起可能である活性状態と、少なくとも同じ励起光(25)によって蛍光の光(42)の放出のために励起可能でない不活性状態とを有し、かつその活性状態とその不活性状態との間をスイッチ光によって移動可能である蛍光マーカ(8、9)、

から選択されていることを特徴とする請求項15または16に記載の方法。

【請求項23】

- 蛍光マーカ(8、9)の一部が、蛍光マーカ(8、9)の活性状態から蛍光マーカ(8、9)の不活性状態へスイッチ光によってスイッチされているか、または

- 蛍光マーカ(8、9)の一部が、蛍光マーカ(8、9)の不活性状態から蛍光マーカ(8、9)の活性状態へスイッチ光によってスイッチされている、という点において、  
蛍光マーカ(8、9)は、個々の蛍光マーカ(8、9)に対して試料(13)から放出された蛍光の光(42)を別々に記録する(4)前に個々に区別されていることを特徴とする請求項15または16に記載の方法。

【請求項24】

- 蛍光マーカ(8、9)が、試料(13)内で移動可能であり、かつ異なる位置でナノスケール構造体(7)に個々に付着する蛍光マーカ(8、9)から選択されていて、

- 蛍光マーカ(8、9)が、それらがナノスケール構造体(7)に次々と個々に付着するような濃度で、かつ空間分布で試料(13)に添加されていて、ならびに

- 蛍光マーカ(8、9)が、ナノスケール構造体(7)に付着する際に、励起光(25)によって蛍光の光の放出のために励起可能でない不活性状態から、励起光(25)によって蛍光の光(42)の放出のために励起可能である活性状態に移されるか、または蛍光マーカ(8、9)が、一時的にだけナノスケール構造体(7)に付着するか、または蛍光マーカ(8、9)が、励起光(25)および蛍光阻害光(46)の長期間の影響の下で暗状態に永続的に移されていることを特徴とする請求項15または16に記載の方法。

【請求項25】

請求項15または16に記載の方法であって、更に、次のステップ、すなわち、

- 蛍光の光(42)の放出のために励起光(25)によって蛍光マーカ(8、9)を励起するステップであって、励起光(25)の強度分布(24)が、試料(13)内の異なる位置に配置される他の局所的最小値を有するステップ、

- 個々の蛍光マーカ(8、9)および励起光(25)の強度分布(24)の他の最小値の異なる位置(20、21、22、23)に対して別々に試料(13)から放出された蛍光の光(42)を記録する(4)ステップ、ならびに

- 励起光(25)の強度分布(24)の他の最小値の異なる位置(20、21、22、23)に対するそれぞれの蛍光マーカ(8、9)について記録された蛍光の光(42)の強度から試料(13)内の個々の蛍光マーカ(8、9)の位置を決定する(5)ステップ、を備えることを特徴とする方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 26】

試料(13)から個々の蛍光マーカ(8、9)によって放出された蛍光の光(42)の相補的強度分布が、一方では、蛍光阻害光(46)の強度分布(48)の局所的最小値(26)の異なる位置(20、21、22、23)にわたって生じ、かつ他方では、励起光(25)の強度分布(24)の他の最小値の異なる位置(20、21、22、23)にわたって、試料(13)内の個々の蛍光マーカ(8、9)の位置を決定する(5)際に比較されていることを特徴とする請求項25に記載の方法。

## 【請求項 27】

- 蛍光阻害光(46)の強度分布(48)の局所的最小値(26)の異なる位置(20、21、22、23)に対するそれぞれの蛍光マーカ(8、9)について記録された蛍光の光(42)の強度から決定されている試料(13)内の個々の蛍光マーカ(8、9)の位置が、その後、励起光(25)の強度分布(24)の他の最小値が配置されている位置を定める際に考慮されているか、または

10

- 励起光(25)の強度分布(24)の他の最小値の異なる位置(20、21、22、23)に対するそれぞれの蛍光マーカ(8、9)について記録された蛍光の光(42)の強度から決定されている試料(13)内の個々の蛍光マーカ(8、9)の位置が、その後、蛍光阻害光(46)の強度分布(48)の局所的最小値(26)が配置されている位置を定める際に考慮されていることを特徴とする請求項25に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

20

## 【0001】

本発明は、試料内の少なくとも1個のナノスケール構造体の空間的測定方法及びこの種の方法を実施する装置に関する。

## 【0002】

詳しくは、この方法は、蛍光マーカによって異なる位置で少なくとも1個のナノスケール構造体をマークするステップ、蛍光の光を放出する励起光によって蛍光マーカを励起するステップ、試料から放出される蛍光の光を記録するステップ、および蛍光の光の記録された強度から試料内の個々の蛍光マーカの位置を決定するステップを含む。

## 【0003】

さらに、本発明は、試料内の個々の蛍光マーカの位置の決定が、励起光の波長でのおよび蛍光の光の波長での回折限界値を越えた精度で行われる方法に関する。

30

## 【背景技術】

## 【0004】

試料内の個々に区別された蛍光マーカの位置が、励起光の波長でのおよび蛍光の光の波長での回折限界値を越えた精度で決定される、試料内の少なくとも1個のナノスケール構造体を空間的に測定する方法が、MINFLUX顕微鏡法として既知である、非特許文献1を参照のこと。MINFLUX顕微鏡法では、励起光の強度分布のゼロ点を、個々に区別された蛍光マーカの推定した位置のまわりの測定領域の中央に、かつ測定領域の境界の周囲に均一に分布する3つの位置に配置して、個々に区別された蛍光マーカの位置が決定される。ゼロ点のこれらの全体的な4つの位置で、それぞれの蛍光マーカからの蛍光の光の強度が、別々に測定され、かつ個々に区別された蛍光マーカの位置が、ゼロ点の異なる位置に対して別々に記録されるそれぞれの蛍光マーカからの蛍光の光の強度から決定される。ゼロ点の4つの位置が互いに近くにあり、なおかつそれぞれの蛍光マーカの求める位置にまたがっているほど、ゼロ点の位置ごとに記録された蛍光の光の数個の光子から、蛍光マーカの位置をより正確に決定できる。

40

## 【0005】

いわゆる薬物スクリーニング、および複数の物質が、それらが他の物質または生物体に関して特定の特性を備えた物質を含むかどうか調査される他の方法において、物質が、他の物質とまたは対象物のいくつかの複製と数回、各々接触し、および他の物質または対象物の得られる反応が、監視される。いくつかの同一の対が統計学的に有意の結果を得るの

50

に必要であるので、および他方、物質が異なる他の物質または異なる生物体に関してたいてい所望の特性を示すはすであるので、監視されるべき反応の全体的な数は、一般的に調査されるべき物質の複数の数に達する。通常、この種の大きな数の反応を系統的に確認することは、面倒である。しばしば、分子レベルの反応は、分析反応を用いて確認されてもよい。反応動態力学を監視することは、したがってしばしば全く可能でない。

【0006】

特許文献1が、蛍光マーカによってマークされる試料の構造体を空間的に高分解能画像形成する方法を開示し、そこにおいて試料が、STED蛍光顕微鏡法における様に、試料から放出されてかつ検出される蛍光の光を、刺激光のゼロ点の領域に割り当ててよい、試料の領域の境界を決めるために励起光にかつ蛍光阻害光としての刺激光にさらされる。ゼロ点近傍の強度最大の領域内の刺激光の高強度から蛍光マーカを保護するために、試料は、励起光のゼロ点に一致する局所最小値を持つ強度分布を持つ励起阻害光にさらにさらされる。この励起阻害光は、特に、蛍光の光を出す励起光によって励起できない不活性状態に、最小の励起阻害光をオフに切替可能な蛍光マーカを切り替えるスイッチオフ光であつてもよい。特に、蛍光マーカはそれらが高分解能RESOLFT蛍光顕微鏡法で使用されるので、切り替え可能蛍光染料であつてよい。

10

【0007】

特許文献2が、蛍光マーカによってマークされる試料の構造体を空間的に高分解能画像形成する方法を開示し、それはまたSTED蛍光顕微鏡法の一方法であり、そこにおいて試料から放出されてかつ記録される蛍光の光を割り当ててよい試料の領域を減少する蛍光阻害光が刺激光のゼロ点の領域に限られているので、励起光の他に試料が刺激光にさらされる。ゼロ点近傍の強度最大の領域内の刺激光の高強度および光化学的漂白の結果として生じる危険性から蛍光マーカを保護するために、ゼロ点は、試料の最大強度の距離よりもかなり小さい寸法を持つ試料内の至近距離範囲内にのみ配置される。加えて、至近距離範囲外の試料に、スイッチオフ光を照射し、至近距離範囲外のスイッチング可能な蛍光マーカを、蛍光の光を出す励起光によって励起できない非活性状態に切り替えてもよい。特に、これらの蛍光マーカはそれらが高分解能RESOLFT蛍光顕微鏡法で使用されるので、切り替え可能蛍光マーカであつてよい。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

30

【0008】

【文献】国際公開第2014/108455号

独国特許出願公開第102016117096号明細書

【非特許文献】

【0009】

【文献】Balzarotti F、Eilers Y、Gwosch KC、Gynna AH、Westphal V、Stefani FD、Elf J、Hell SW:「最小光子束による蛍光分子のナノメータ分解能画像形成および追跡」、Science 355; 2016年12月22日オンライン公表

【発明の概要】

40

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

例えば、変えられた周囲条件が、調査されるべき物質の1つを追加することに起因する薬物スクリーニングの状況で要求されるので、ナノスケール構造体の反応を変化した周囲条件に対して記録するために少なくとも1個のナノスケール構造体をすばやく、繰り返しでも測定可能な方法の必要性がある。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、試料内の複数のナノスケール構造体の空間的測定方法に関する。この方法は、次のステップ、すなわち、蛍光マーカによって異なる位置で個々の構造体をマークする

50

ステップ、蛍光の光の放出のために励起光によって蛍光マーカを励起するステップであって、この励起するステップは、励起光の強度分布と、蛍光マーカによって蛍光の光の放出に影響を及ぼす更なる光の強度分布とのいずれか一方が、試料内の異なる位置に配置される局所的な最小値を備えるステップ、試料から放出される蛍光の光を、個々の蛍光マーカと最小値の異なる位置とについて、別々に記録するステップ、並びに最小値の異なる位置に対するそれぞれの蛍光マーカについて記録される蛍光の光の強度から、試料内の個々の蛍光マーカの位置を決定するステップを含む。この方法は、試料内の位置が、既知であるか、または位置決め補助具によって反射される光から、連結するステップの後で決定される、個々の位置決め補助具に個々の構造体が連結する更なるステップを含む。更に、励起するステップが、それぞれの位置決め補助具の位置のまわりの至近距離範囲内で、異なる位置に局所的な最小値を配置するステップを含み、至近距離範囲の寸法が、励起光の波長と蛍光の光の波長での回折限界値より大きくない。

10

## 【0012】

本発明は、また、試料内の複数のナノスケール構造体の空間的測定装置に関し、構造体の各々が、試料内の位置が既知であるかまたは位置決め補助具によって反射される光から決定される位置決め補助具に連結される。この装置が、試料のための試料ホルダ、試料ホルダ上へ向けられる対物レンズ、対物レンズによって合焦される励起光の強度分布が局所的な最小値を備えるように対物レンズに励起光を連結する光源か、または対物レンズによって合焦される更なる光の強度分布が局所的な最小値を備えるように、対物レンズに蛍光マーカによる蛍光の光の放出に影響を及ぼす更なる光と励起光を連結する光源、試料ホルダに関して最小値の位置を移動するように構成されるスキャナ、最小値の異なる位置に対して試料から別々に放出される蛍光の光を記録するように構成される検出器、最小値の異なる位置に対するそれぞれの蛍光マーカに対して記録される蛍光の光の強度から、試料内の個々の蛍光マーカの位置を決定するように構成される評価ユニット、ならびにそれぞれの位置決め補助具の位置のまわりの至近距離範囲内で、異なる位置に局所的な最小値を配置するように構成される制御部であって、至近距離範囲の寸法が、励起光の波長と蛍光の光の波長での回折限界値より大きくない、制御部を備える。

20

## 【0013】

本発明は、また、試料内の1つのナノスケール構造体の空間的測定方法に関する。この方法が、蛍光マーカによって異なる位置で構造体をマークするステップ、蛍光阻害光の強度分布の局所的な最小値のそれぞれの位置で蛍光の光の放出のために励起光によって蛍光マーカを励起するステップであって、試料の寸法が励起光の波長および蛍光の光の波長での回折限界値より大きくなく、局所的な最小値が試料内の至近距離範囲内の異なる位置に配置されている、ステップ、個々の蛍光マーカと最小値の異なる位置について、試料から放出される蛍光の光を別々に記録するステップ、ならびに最小値の異なる位置に対するそれぞれの蛍光マーカについて記録される蛍光の光の強度から、試料内の個々の蛍光マーカの位置を決定するステップを含む。

30

## 【0014】

本発明の他の特徴および利点は、以下の図および詳細な説明の検討の際に当業者に明白になる。全てのこの種の追加特徴および利点が、請求項に記載の、本発明の範囲内で本願明細書に含まれることを意図している。

40

## 【0015】

本発明は、以下の図を参照してよりよく理解されることができる。図内の構成要素が、必ずしも一定の比率であるというわけではなく、その代わりに本発明の原理を明確に例示することに重点が置かれている。図において、同様な参照番号はいくつかの図の全体にわたって対応する部分を指定する。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0016】

【図1】本発明による方法の一実施態様の流れ図である。

【図2】1つのナノスケール構造体を位置決め補助具に連結するステップおよび追加され

50

る物質に対するナノスケール構造体の反応を図式的に示す。

【図3】本発明による方法のMINFLUX実施態様において位置決め補助具に関する励起光の強度分布の最小値の位置決めを説明する。

【図4】平面図でおよび最小値を通しての断面図で本発明による方法のMINFLUX実施態様における励起光の強度分布を例示する。

【図5】正方形パターンで配置される位置決め補助具を備えた試料を示す。

【図6】本発明による方法を実行する装置を図式的に示す。

【図7】最小値を通しての断面図で本発明による方法の更なる一実施態様における励起光のおよび蛍光阻害光の強度分布を例示する。

【図8】図7による強度分布をまた使用して本発明による方法の別の態様の一実施態様の流れ図である。

10

【発明を実施するための形態】

【0017】

試料内の複数のナノスケール構造体を空間的に測定する本発明による方法が、マーク、連結、励起、配置、記録および決定の部分的に重なり合うステップを含む。

【0018】

ナノスケール構造体が発明による方法で測定されることは、これらの構造体が、最大200nmでの、しばしば最大100nmでの、および多くの場合最大50nmまたはわずかに30nmでのナノスケールの寸法を有することを意味する。

【0019】

マークするステップでは、個々の構造体が蛍光マーカによって異なる位置でマークされている。これは、本発明に従って測定される各構造体が、異なる位置で構造体に付着されている少なくとも2個の蛍光マーカによってマークされていることを意味する。特に、すばやく構造体を測定するために、各構造体がマークされている蛍光マーカの数を、意図的に少なくしてよく、かつそれは例えば、10個以下または5個以下に制限してよい。好ましくは、全ての同一の構造体が、同一の数の蛍光マーカによって、同一の位置でマークされている。異なる位置で構造体に付着されている蛍光マーカは、同一であるか、または異なっているもよい。

20

【0020】

連結するステップでは、個々の構造体が、個々の位置決め補助具に連結されている。これは、本発明による方法に従って測定されている各構造体が1個の位置決め補助具に連結されることを意味する。これらの位置決め補助具は、位置決め補助具が試料の製造中、若しくは準備中に意図的にこれらの位置に配置されたため、または試料内のそれらの固定位置が連結するステップの前に、何らかの方法で既に決定されているため、試料内の位置が既知の位置決め補助具である。代替的にまたは付加的に、試料内の位置決め補助具の位置を、連続的に決定してよく、およびしたがって連結するステップの後でも、位置決め補助具によって反射されている光から決定してよい。上述したそれらの最大寸法によって、ナノスケール構造体は、これらの端部の一つに連結される場合、それぞれの位置決め補助具の位置から、基本的に200nm、100nm、50nmまたは30nmを超えて、および好ましい中央の連結によって、基本的に100nm、50nm、25nmまたは15nmを超えて延在しない。

30

【0021】

励起するステップでは、測定されるべき構造体がマークされている蛍光マーカが、蛍光の光の放出のために励起光によって励起されている。ここで、励起光の強度分布、または蛍光マーカによる蛍光の光の放出に影響を及ぼす更なる光の強度分布が、励起するステップにおいて試料内の異なる位置に配置されている局所的な最小値を有する。局所的な最小値は、それぞれの強度分布の真のゼロ点であってもよく、この点では励起光の強度または更なる光の強度が実際にゼロまで下がる。いずれにせよ、励起光のまたは更なる光の低く残っている強度のみが、局所的な最小値において望まれている。本発明による方法で構造体が測定されている全ての空間方向において、局所的な最小値は、それぞれの強度分布の最大値に

40

50

よって区切られている。

【0022】

励起するステップを特別な方法で実行する配置するステップでは、局所的最小値が、それぞれの位置決め補助具の既知の位置のまわりの至近距離範囲内の異なる位置に配置されている。この至近距離範囲の寸法は、励起光の波長および蛍光の光の波長での回折限界値より大きくない。たとえ試料内の個々の位置決め補助具の位置が、固定されていて、かつ一般に既知であるとしても、局所的最小値でこれらの位置またはそれらのまわりに広がる至近距離範囲に接近することは、位置決め補助具によって反射される光を用いて支援されてもよく、または完全に制御されてさえもよい。

【0023】

記録するステップでは、試料から放出される蛍光の光が、個々の蛍光マーカに対して、かつ試料内の最小値の異なる位置に対して別々に記録されている。したがって、記録された蛍光の光は、特定の蛍光マーカに、かつ試料内の最小値の特定の位置にそれぞれ割り当ててよい。

【0024】

したがって、決定するステップでは、それぞれの蛍光マーカからのわずかな数の蛍光の光の光子に基づき、最小値の異なる位置に対するそれぞれの蛍光マーカについて記録される蛍光の光の強度から、試料内の個々の蛍光マーカの位置を決定することが、可能である。

【0025】

少数の蛍光マーカによってだけマークされる構造体を測定することは、構造体での蛍光マーカの位置の間の距離を測定することを、特に意味する。

【0026】

本発明による方法において、位置決め補助具の位置は最初から既知であるか、または蛍光マーカからの蛍光の光の光子の放出を必要とせずに決定されているので、位置決め補助具の位置のまわりの至近距離範囲は、励起光のまたは更なる光の強度分布の最小値で、系統的に接近可能である。したがって、本発明による方法において、個々の構造体が、個々の蛍光マーカの位置についての以前の知識を使用して、蛍光マーカを用いて測定されている。関連する構造体を位置決め補助具に連結することに起因して、各構造体と、それゆえ、構造体に依存する蛍光マーカも、位置決め補助具の直ぐ近傍にある。したがって、この位置決め補助具のまわりの至近距離範囲が、励起光または更なる光の光強度分布の最小値で接近する時、この最小値は既にそれぞれの蛍光マーカに近い。位置決め補助具の位置が、より正確にわかるほど、それぞれの蛍光マーカの位置を決定する励起光または更なる光の光強度分布の最小値が異なる位置に配置される至近距離範囲は、より小さくなる。

【0027】

本発明によれば、至近距離範囲の寸法は、励起光の波長および蛍光の光の波長での回折限界値より小さくなく、および至近距離範囲は局所的最小値を至近距離範囲内の異なる位置に配置することによってスキャンされる、すなわち、蛍光マーカの位置が至近距離範囲の寸法の一部の空間的分解能で決定されることができるように、至近距離範囲が分割される。好ましくは、局所的最小値がそれぞれの位置決め補助具の位置のまわりの異なる位置に配置される至近距離範囲の寸法は、半分より小さくなく、かつ励起光の波長および蛍光の光の波長での回折限界値の四半分より大きくないことが、より好ましくさえある。これは、それぞれの位置決め補助具の位置が既知であるかまたはさらにより高精度で決定されなければならないことを意味する。

【0028】

本発明による方法において、励起するステップ、記録するステップおよび決定するステップは、局所的最小値を備える光の増大した強度で、かつ好ましくは、至近距離範囲に対応するより小さい寸法で、少なくとも一回繰り返してよい。より小さい至近距離範囲は、強度分布が局所的最小値を有する励起光のまたは更なる光の従来の強度によって決定されるそれぞれの蛍光マーカの位置のまわりに配置してよい。このようにして、位置決定の精度を反復して高められてよい。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 2 9 】

励起光の強度分布が局所的最小値を有する本発明による方法の実施態様は、既知の M I N F L U X 顕微鏡法の一実施態様として実現してよい。蛍光マーカによる蛍光の光の放出に影響を及ぼす更なる光の強度分布が局所的最小値を有する本発明による方法の他の実施態様において、励起光の強度分布は、更なる光の強度分布の局所的最小値のそれぞれの位置で最大値を有してよく、および更なる光は、蛍光マーカによる蛍光の光の放出を阻害する蛍光阻害光であり得る。したがって、本発明による方法のこの実施態様では、励起光および蛍光阻害光が、このように、R E S O L F T 顕微鏡法、および特に S T E D 顕微鏡法でも使用されるような強度分布によって重畳される。本発明による方法のこの実施態様では、しかしながら、蛍光の光が、局所的最小値の領域にある蛍光マーカからだけ生じてよいということだけが使用されるのではない。その代わりに、局所的最小値の位置までのその位置の距離へのそれぞれの蛍光マーカに対して記録される蛍光の光の強度の依存性もまた、最小値のいくつかの位置に対して記録される蛍光の光の強度から、特に高精度でその位置を決定するために使用される。それに対応して、更なる光の強度分布が局所的最小値を有する本発明の方法のこの変形例においてさえ、局所的最小値は試料内のこの種の少数の位置に配置してよく、かつ記録された蛍光の光の強度の評価は、M I N F L U X 顕微鏡法におけるものと同じ原理に従ってよい。しかしながら、M I N F L U X 顕微鏡法では、蛍光マーカからの蛍光の光の強度は、局所的最小値の位置までのその位置の距離が増加することによって増大するが、一方、更なる光が蛍光阻害光である本発明による方法の実施態様では、それは距離の増加と共に減少するという相違点が残る。

10

20

## 【 0 0 3 0 】

励起光の強度分布が局所的最小値を有する本発明による方法の実施態様では、個々に区別された蛍光マーカが、最小光量にだけさらされ、かつしたがって最小程度にだけ光化学的に応力を加えられる。強度分布がゼロ点を有する更なる光が蛍光阻害光である実施態様では、ゼロ点近傍の蛍光阻害光の強度最大値は、近傍の他の蛍光マーカによって放出される蛍光の光が位置決定を阻害することを有利には抑制する。

## 【 0 0 3 1 】

本発明による方法を実施する際に、至近距離範囲の寸法と比較して非常に高い空間的分解能でそれぞれの蛍光マーカの位置を決定するために、それぞれの位置決め補助具の位置のまわりの至近距離範囲内の多くの異なる位置に、局所的最小値が配置されることを必要としないことが分かった。これに対応して、本発明による方法では、個々の蛍光マーカの位置は、典型的には、 $4n$  個以下、しばしば  $3n$  個以下、特に好ましくは  $2n$  個以下の異なる位置の最小値に対して記録されている蛍光の光の強度から、一般的に決定される。ここで、 $n$  は試料内の個々の蛍光マーカの位置が決定されている空間方向の数である。

30

## 【 0 0 3 2 】

試料内の個々の蛍光マーカの位置を決定することは、最小値の異なる位置に対するそれぞれの蛍光マーカについて記録される蛍光の光の強度に局所的極値を有する空間関数を適合することを特に備えてよい。励起光の強度分布が局所的最小値を有する本発明による方法の実施態様では、空間関数の局所的極値もまた、局所的最小値である。強度分布がゼロ点を有する更なる光が蛍光阻害光である実施態様では、空間関数の局所的極値は、しかしながら局所的最大値である。

40

## 【 0 0 3 3 】

理想的には局所的極値を有する空間関数は、励起光または更なる光の強度分布の局所的最小値までのその距離にわたって、それぞれの蛍光マーカからの蛍光の光の強度と同じ進路を有する。したがって、光反射位置決め補助具の少なくとも 1 個、または直接蛍光マーカの少なくとも 1 個、または更なる類似の蛍光マーカを、最小値でスキャンしてよく、その上、試料からの反射される光または放出される蛍光の光が、局所的極値を有する空間関数を決定するために、時間的分解能によって記録される。ここで、スキャンとは、局所的最小値がそれぞれの至近距離範囲内の局所的最小値の少数の位置と比較して、多数の小さなステップでシフトされることを意味する。光反射位置決め補助具の少なくとも 1 個をス

50

キャンする際に、試料内のその位置決め補助具の位置、したがってそれぞれの至近距離範囲の中心もまた決定できる。

【0034】

試料から放出される蛍光の光を、それぞれの構造体がマークされている個々の蛍光マーカに対して別々に記録できるようにするためには、異なる蛍光マーカによって放出した蛍光の光が、分離可能でなければならない。ここで、複数の蛍光マーカがそれぞれ同じナノスケール構造体に付着されているので、蛍光の光が試料から放出される場所に基づいて異なる蛍光マーカから分離することは不可能であり、その結果、それらは蛍光の光の波長における回折限界よりも近く、かつ原則として互いにはるかに近い。したがって、個々の蛍光マーカからの蛍光の光に関して、他の差別化オプションが存在するか、または提供されなければならない。

10

【0035】

個々の構造体が異なる位置でマークされている蛍光マーカが、それらのスペクトル特性の異なる蛍光マーカから選ばれる場合、それぞれの構造体での個々の蛍光マーカを異なる波長の励起光によって選択的に励起可能であるか、またはそれらによって放出される蛍光の光が波長選択的方法で検出可能である。更に、蛍光マーカは、それらの蛍光マーカが、蛍光の光の放出のための励起光によって励起できる活性状態を有し、かつ(少なくとも同じ励起光によって)蛍光の光の放出のために励起できない不活性状態を有し、かつその活性状態とその不活性状態との間で移動できる、蛍光マーカから選択できる。次に、(選択的にまたは移動確率に基づいて)1個の蛍光マーカだけをそれぞれその活性状態のままにしたり、またはその活性状態にしたりする、その結果、励起光で励起したあとに記録された蛍光の光が、それだけに由来するようにできる。移動確率に基づく手順では、同じ蛍光マーカが次々と活性状態になることを繰り返す可能性がある。しかしながら、繰り返しの回数が増えるにつれて、その可能性は低くなっていく。

20

【0036】

特に、蛍光マーカは、その励起スペクトルおよびその発光スペクトルの少なくとも1つで異なるか、またはその活性状態からその不活性状態にスイッチ光によって切り替えられる蛍光マーカから選択できる。一般的に、スイッチ光は、励起光または蛍光マーカによる蛍光の光の放出に影響を及ぼす更なる光と同じ波長を有してもよい。

【0037】

本発明による方法の実際の実施において、位置決め補助具の位置、すなわち至近距離範囲は、至近距離範囲内の最小値の位置とは別の、試料に対する最小値の相対的移動のための手段によって接近できる。これにより、試料内の最小値を正確に位置決めするために適切であるが、より大きな距離にわたって最小値をシフトするためには適していない、至近距離範囲内の最小値の高精度な位置決めのための手段を使用することを可能にする。これらのより大きな距離は、位置決め補助具の位置に接近する手段によって対応できる。特に、位置決め補助具の位置に接近する手段は、励起光を試料に合焦する対物レンズに対して試料全体を移動でき、一方、対物レンズに対してビームを偏向させるビーム偏光手段によって、最小値をそれぞれの至近距離範囲内でシフトするようにしてもよい。

30

【0038】

本発明による方法では、位置決め補助具の位置が、好ましくは、試料内で固定され、したがって試料の固定点に関して固定され、かつ位置決め補助具の位置、すなわち個々の至近距離範囲は、試料の固定点に対して接近される。

40

【0039】

有利には、構造体は、位置決め補助具との連結に起因して、既知の位置または蛍光マーカに応力を加えずに決定できる位置にもたらされるだけでなく、構造体は、定められた方法、すなわち例えばそれぞれの試料の主延長部分の平面と平行して配向されている。この配向は特に、蛍光マーカの距離または蛍光マーカによってマークされている構造体の様々な場所が、試料の様々な位置で局所的な最小値が配置されている方向と平行に、又は平面内に配置されているように、試料に対して構造体を配向する目的を有する。したがって、こ

50

これらの距離、更にはこれらの距離の変化が、個々の蛍光マーカの位置を決定することによって特に容易に記録される。たとえ位置決め補助具に連結した構造体のこの種の意図的な配向性が不可能であっても、位置決め補助具に連結した構造体が試料内で一定の配向性を有することがしばしば達成され得る。次いで、蛍光マーカの位置を最初に決定した後、蛍光マーカによってマークされた領域の距離が試料の主延長部分の平面内を走るように、どの構造体が配向しているかをチェックできる。例えば、周囲条件の変化に対する構造体の反応を記録するために、蛍光マーカの位置の決定を繰り返し実行する際に、本発明の方法は、その後、所望の配向性を持つそれらの構造体に制限でき、一方、この配向性を持たない他の構造体はもはや考慮されない。これは、変化した周囲条件に対する構造体の反応に関する有意な情報をすばやく記録するために特に適している。

10

## 【0040】

更に、位置決め補助具の位置が、励起光および蛍光の光の波長での回折限界値の少なくとも二倍長である最小距離に配置されることが好ましい。次に、試料から出る蛍光の光が、光学手段によって個々の至近距離範囲に、したがって測定すべき個々のナノスケール構造体に、別々に割り当てることができる。位置決め補助具の位置が、例えば、試料内に所定のパターンで配置されるという点で任意に定義される場合、励起光の波長および蛍光の光の波長での回折限界値の二倍の前記最小距離は、直接維持されることになる。しかしながら、位置決め補助具が試料内でランダムに分布する場合、位置決め補助具の密度を低くして、その距離が励起光の波長と蛍光の光の波長とにおける回折限界値の二倍より小さくならないように注意しなければならない。原則として、これは励起光の波長および蛍光の光の波長での回折限界値の二倍の逆数より非常に小さい密度が必要である。代替的にまたは追加的に、位置決め補助具は、それら間にある距離をチェックできる。次いで、位置が互いに関してもあまりに近いと認められる位置決め補助具、およびそれに対して連結されるナノスケール構造体は、本発明による方法を更に実行する時に無視できる。

20

## 【0041】

位置決め補助具の位置が試料内に所定のパターンで配置されている場合、所定のパターンは、特に周期的なパターン、およびより具体的には六角形および正方形パターンから選択できる。次に、本発明による方法を実行する時に接近させる至近距離範囲もまた、この種の周期的、六角形または正方形パターンで配置される。六角形のパターンでは、励起光の波長および蛍光の光の波長での回折限界値の二倍の最小距離を維持する位置決め補助具の密度が、最大となる。

30

## 【0042】

蛍光マーカによる蛍光の光の放出に影響を及ぼす更なる光が蛍光阻害光であって、更なる光の強度分布が局所的な最小値を有し、かつ励起光の強度分布が更なる光の強度分布の局所的な最小値のそれぞれの位置で最大値を有する、本発明による方法の実施態様を用いる限りでは、RESOLFT顕微鏡法における、かつ特にSTED顕微鏡法におけることと同様の手順が開示されていて、これは、複数のナノスケール構造体を空間的に測定するステップ、個々の構造体を個々の位置決め補助具に連結するステップ、および局所的な最小値を、異なる位置に配置するステップ、特にそれぞれの位置決め補助具の位置のまわりの至近距離範囲内に配置するステップ、から独立した本発明の別の態様である。

40

## 【0043】

この他の態様において、本発明は、目的によって個々に区別された蛍光マーカの位置が決定され、その目的に対して蛍光マーカが、しばしば最初に個々に区別され、かつ局所的な最小値の少数の異なる位置に対して記録した蛍光の光の強度が、原則として局所的な最大値を含む関数に適合することによって評価されているという点で、RESOLFT顕微鏡法およびSTED顕微鏡法とは異なる。ここで、適合した関数の局所的な最大値の位置を、試料内の蛍光マーカの位置に対して調査されるものとしてとられることができる。MINFLUX顕微鏡法での対応する手順と比較すると、本発明のこの他の態様は、ゼロ点近傍の蛍光阻害光の強度最大値が、周囲に配置した他の蛍光マーカによって放出される蛍光の光が、位置決定を妨げることを有利には阻害する、という利点を有する。更に、本発明のこ

50

の他の態様は、ここで開示した本発明による方法の全ての更なる特徴を備えてもよい、または備えていなくてもよい。

【0044】

本発明のこの他の態様において、励起光の強度分布は、好ましくは、ゼロ点の、または蛍光阻害光の強度分布の局所的最小値のそれぞれの位置で最大値を有する。したがって、励起光は、回折限界に起因して、その最大値が、局所的最小値に対して可能であり、かつそれらが本発明による方法での局所的最小値に対して定期的に実施されるよりも大きな寸法を有していても、蛍光阻害光の強度分布の局所的最小値の領域に集中される。

【0045】

本発明のこの他の態様では、蛍光阻害光は、特にSTED、または刺激光であってもよく、この刺激光は、励起光によって励起した蛍光マーカが、記録できる蛍光の光を放出し得る前に、誘導放出のために刺激することによって、励起光によって励起される蛍光マーカを非励起する。しかしながら、本発明のこの他の態様において、蛍光の光が、蛍光阻害光の局所的最小値の領域にある蛍光マーカからだけ生じ得ることだけが利用されるだけではない。その代わりに、それぞれの蛍光マーカに対して記録されている蛍光の光の強度の、その位置と局所的最小値の位置との距離への依存状態は、最小値のいくつかの位置に対して記録されている蛍光の光の強度から、特に高精度でその位置を決定する際にも使用される。本発明のこの他の態様では、最小値が、試料内のできるだけ少ない位置に配置でき、かつ記録されている蛍光の光の強度の評価は、MINFLUX顕微鏡法におけるものと基本的に同じ原理に従って行うことができる。しかしながら、重要な違いとして、MINFLUX顕微鏡法では、それぞれの蛍光マーカからの蛍光の光の強度は、局所的最小値の位置までのその位置の距離の増加と共に増大するが、それは本発明による方法では減少することが、残る。

【0046】

本発明のこの他の態様が、RESOLFT顕微鏡法、特にSTED顕微鏡法と部分的に一致する限りにおいて、個々に区別した蛍光マーカの位置が意図的に決定され、そのため  
に蛍光マーカを最初に個々に区別しなければならないことが多い点、および局所的最小値の少数の異なる位置に対してのみ記録されている蛍光の光の強度が、位置決定のために評価されている点で、RESOLFT顕微鏡法およびSTED顕微鏡法とは異なる。この位置決定は、原則として、局所的最大値を備える関数に適合することを含む。適合した関数の局所的最大値の位置は、試料内の蛍光マーカの位置でもよい。

【0047】

MINFLUX顕微鏡法における手続きと比較すると、本発明のこの他の態様は、そのゼロ点近傍の蛍光阻害光の強度最大値に起因して、周囲に位置した蛍光マーカによって放出した蛍光の光は、位置決定を妨げないという利点を有する。

【0048】

本発明のこの他の態様の一実施態様では、個々の蛍光マーカの位置は、追加的に、MINFLUX顕微鏡法によって決定されている。これは、追加的に、以下のステップが実行されることを意味する。蛍光の光の放出のために励起光によって蛍光マーカを励起するステップであって、この励起するステップは、励起光の強度分布が、試料内の異なる位置に配置されている局所的最小値を備えるステップ、試料から放出される蛍光の光を、個々の蛍光マーカに対して、かつ励起光の強度分布の最小値の異なる位置に対して別々に記録するステップ、ならびに励起光の強度分布の最小値の異なる位置に対するそれぞれの蛍光マーカについて決定された蛍光の光の強度から、試料内の個々の蛍光マーカの位置を決定するステップ。

【0049】

本発明の他の態様のこの実施態様の追加ステップでは、同じ位置に、以前と同様に励起光の強度分布の最小値で接近してもよく、またはその後、蛍光阻害光の強度分布の最小値で接近することが可能である。しかしながら、これは、一つのオプションである。

【0050】

10

20

30

40

50

本発明の他の態様のこの実施態様の追加ステップでは、個々に区別された蛍光マーカが、最小限の光量しか受けない、したがって最小限の光化学的なストレスしか受けない。

【0051】

更に、本発明の他の態様のこの実施態様では、試料から個々の蛍光マーカによって放出される蛍光の光の相補的強度経過が、一方では、蛍光阻害光の強度分布の最小値の異なる位置にわたる結果となり、他方では、試料内の励起光の強度分布の最小値の異なる位置にわたる結果となる、試料内の個々の蛍光マーカの位置を決定する際に、互いに比較できる。両方の相補的な強度経過を考慮することによって、それらが別々に評価されるだけの場合、試料内のそれぞれの蛍光マーカの位置は、2つの強度経過に基づくよりも、より高精度で決定できる。

10

【0052】

更に、本発明の他の態様のこの実施態様では、蛍光阻害光の強度分布の最小値の異なる位置について記録した蛍光の光の強度から決定される試料内の個々の蛍光マーカの位置が、その後、励起光の強度分布の他の最小値が配置されている位置を定める際に考慮でき、逆もまた同様である。個々の蛍光マーカの位置を高い精度で繰り返して決定する際に、S T E D群とM I N F L U X群との間を段階的に変更できる。

【0053】

蛍光マーカによる蛍光の光の放出に影響を及ぼす更なる光、又は励起光の強度分布が局所的最小値を有する、本発明による方法の全ての態様では、特許文献1から既知の局所的最小値近傍の最大値の領域内の高い強度から現在測定されていない蛍光マーカを保護する概念を、改変形態で適用してもよい。特に、それぞれの至近距離範囲内に局所的最小値を配置する前に、追加スイッチオフ光が、至近距離範囲近傍の試料の部分的領域内で切り替え可能な蛍光マーカを不活性状態にスイッチオフするような強度分布で試料に向けられる。したがって、蛍光マーカは、励起光または更なる光の最大値が現れる場所で不活性状態にスイッチされ、およびここで、この保護手段がなければ、蛍光マーカは、励起光または更なる光の高強度によってストレスを受け、かつそこから現在の測定に影響を及ぼす蛍光の光のみを放出することになる。そして、各ナノスケール構造体の測定が必ずしも隣接するナノスケール構造体に光化学的ストレスを与えることなく、かつナノスケール構造体からの蛍光の光が現在の測定を妨げることなく、試料内のナノスケール構造体の絶対密度を、特に高くできる。

20

30

【0054】

本発明による方法の実際的な適用では、位置決め補助具は、試料内に固定され、かつ試料内に所定のパターンで配置できる構造体のための連結部位でもよい。特に、構造体は、免疫反応を介して連結部位に連結できる。ここで、本発明による方法の適用の前に、まず、追加の蛍光マーカは、蛍光の光が連結部位の位置を決定するために使用でき、連結部位に連結できる。ここで、更なる蛍光マーカからの蛍光の光の非常に多くの光子が、非常に高い精度で連結部位の位置を決定するために使用できる。その後、本発明による方法の次に続く適用において、ナノスケール構造体が連結される時、これらの更なる蛍光マーカは、位置が既知である連結部位から放出できる。

【0055】

しかしながら、ナノスケール構造体が、その位置が判明する前に位置決め補助具に連結される場合、ナノスケール構造体の蛍光マーカからの蛍光の光を使用することなく、位置決め補助具の位置を決定する可能性が、もたらされるべきである。このために、位置決め補助具は、光を反射する金粒子、又は銀粒子、又は量子ドットを備えることができ、これを用いることで、位置決め補助具の位置を高精度で決定できる。

40

【0056】

本発明による方法の一実施態様では、測定するナノスケール構造体が、同一であるか、または複数の同一構造体を少なくとも含む。これらの同一の構造体は、ナノスケール構造体に対する周囲条件の影響を測定するために、試料の異なる領域内で、異なる周囲条件にさらされることがある。特に、ナノスケール構造体の蛍光マーカの結果として生じる空間

50

距離、または相対的配置を、測定できる。

【 0 0 5 7 】

更に、例えば、変えられた周囲条件または、それに加えて、これらの反応の原動力に対する構造体の反応を測定するために、試料内の個々の蛍光マーカの位置が、少なくとも2つの時点において記録された蛍光の光の強度から、少なくとも2つの異なる時点において決定できる。このために、構造体はこれらの少なくとも2つの時点で異なる周囲条件にさらされることができ、またはこの少なくとも2つの時点が周囲条件のこの種の変更によることができる。

【 0 0 5 8 】

最後に特に説明した本発明による方法の実施態様は、変化した周囲条件が、調査すべき物質のうちの1つを添加することによって調整される薬物スクリーニングを実施することを可能にする。それぞれの物質の添加に対する構造体の反応は、本発明による構造体の測定を繰り返すことによって直接記録される。ナノスケール構造体で分析反応を実施する必要はない。更に、本発明によるこの種の薬物スクリーニングで費やされる調査されるべき物質の量は、微量である。理論的には、ナノスケール構造体の1つに、各物質の単一分子を追加することで十分である。これ対応して、少量でしか利用できない物質であっても、本発明による薬物スクリーニングで調べることができる。

【 0 0 5 9 】

既知の P A I N T ( ナノスケールトポグラフィでの画像形成のための点集積 ) 概念に着想を得た本発明による方法の一実施態様では、蛍光マーカが、試料の中で移動可能であり、かつ異なる位置で構造体に個別に付着する蛍光マーカから選択される。これらの蛍光マーカは、構造体に次々と付着するような濃度、および空間分布で試料に添加される。それらが構造体に付着した時、それらの位置が本発明に従って決定される。したがって、本発明のこの実施態様では、蛍光マーカの個別化が、P A I N T 概念と同様に使用される。つまり、これに対応して、P A I N T 概念について知られているこの個別化の全ての変形は、本発明による方法のこの実施態様で使用できる。したがって、蛍光マーカは、蛍光の光の放出のための励起光によって励起可能でない不活性状態から、蛍光の光の放出のための励起光によって励起可能である活性状態に移動できる。この移動は、蛍光マーカが構造体へ付着することに起因する可能性がある。代替的にまたは追加的に、蛍光マーカは、一時的に付着するだけでもよく、または励起光および蛍光阻害光のうち少なくとも一方の長時間の影響に起因して、それぞれのナノスケール構造体の更なる測定を妨げないように、永続的に若しくは少なくともこのように長い時間の間、暗状態で移動される。

【 0 0 6 0 】

試料内の複数のナノスケール構造体を空間的測定する本発明による装置であって、構造体の各々は、試料内の位置が既知であるかまたは位置決め補助具によって反射される光から決定できる位置決め補助具に連結されていて、当該装置は、以下の構成要素を備える。

- 試料のための試料ホルダと、
- 試料ホルダに向けられた対物レンズと、
- 対物レンズを用いてまたは同時に合焦した更なる光を用いて焦点が合わせられている励起光の強度分布が局所的最小値を有するように、励起光および蛍光マーカによる蛍光の光の放出に影響を及ぼす任意選択の更なる光を対物レンズに連結する光源と、
- 試料ホルダに対して最小値の位置をシフトするように構成されているスキャンユニットと、
- 最小値の異なる位置に対して別々に試料から放出される蛍光の光を記録するように構成されている検出器と、
- 最小値の異なる位置に対するそれぞれの蛍光マーカに対して記録した蛍光の光の強度から試料内の個々の蛍光マーカの位置を決定するように構成されている評価ユニットと、
- 本発明による方法を自動的に実行する制御部。

【 0 0 6 1 】

次に図をより詳細に参照すると、流れ図で図 1 内に描かれた本発明による方法が、蛍光

マーカによって異なる位置でナノスケール構造体をマークする 1ステップで始まる。これは、ナノスケール構造体の各々が、少なくとも2個の選択された位置で1個の蛍光マーカによってマークされていて、かつ同一の構造体の場合には、同一の位置でも1個の蛍光マーカによってマークされることを意味する。それぞれの構造体の異なる位置に付着した蛍光マーカは、それら移すことができる活性状態および不活性状態を有していれば同一であってもよく、またはそれらが蛍光の光の放出と励起に続いて放出される蛍光の光に対して励起可能である励起光の少なくとも1つに対してスペクトル特性が異なってもよい。

#### 【0062】

ナノスケール構造体を位置決め補助具に連結する 2ステップが、マークする 1ステップの次のステップとして図1に示されている。しかしながら、構造体を位置決め補助具に連結する 2ステップは、構造体をマークする1ステップを先行してもよい。更に、マークする1ステップ、および連結する2ステップを、同時に実施することも可能である。いずれにせよ、マークする1ステップおよび連結する2ステップの後、各々数回マークされたナノスケール構造体が存在し、かつそれらナノスケール構造体は、個々の位置決め補助具に個別に連結されて存在する。この場合、試料内の位置決め補助具の位置は既知であり、それらが固定されていることを意味するか、またはそれらが例えば金粒子または銀粒子または量子ドットを含むので、位置決め補助具によって反射されている光からそれらが決定可能である。したがって、この位置決め補助具の位置の決定は、蛍光の光の励起および放出によって蛍光マーカにストレスを与えることなく行うことができる。また、それらの実際の位置が常に決定可能であれば、位置決め補助具が試料内で固定されず、試料内で移動することも可能である。しかしながら、試料内の位置決め補助具が固定されていない場合、個々の構造体での蛍光マーカから生じる蛍光の光を特定の位置決め補助具に、したがってそれに対して連結される構造体に確実に割り当てることが可能であるように、試料内の位置決め補助具の距離が励起光および蛍光の光の波長での回折限界値の二倍より小さくならないようにすることがより困難になる。

#### 【0063】

それぞれの位置決め補助具の至近距離範囲内における異なる位置に光の強度分布の局所的最小値を配置する 3ステップでは、光の強度分布が、特に励起光の1つであってもよい。この強度分布の局所的最小値がそれぞれの位置決め補助具の至近距離範囲内に配置される場合、活性状態にあり、かつ励起光を用いて励起できる蛍光マーカが、蛍光の光を放出する。この場合、蛍光の光の強度は、強度分布の局所的最小値までのそれぞれの蛍光マーカの距離に依存する。放出した蛍光の光を記録する4ステップは、異なる蛍光マーカからの蛍光の光が異なる波長に起因して分離できるか、または1個の蛍光マーカのみが一度に活性であるので、蛍光マーカの各々に対して別々に記録するように実行すれば、最小値の異なる位置に対して記録したそれぞれの蛍光マーカからの蛍光の光の強度から、個々の蛍光マーカの位置を決定する5ことが可能である。この場合、決定する5ステップの精度は、記録される蛍光の光の光子の数が同じ場合、局所的最小値の位置が既に蛍光マーカの位置にどれくらい近いかに依存する。配置する 3ステップでの局所的最小値の位置が、連結した構造体とそれに対して付着した蛍光マーカも配置されているそれぞれの位置決め補助具の至近距離範囲内に配置するという点で、蛍光マーカの位置を決定する5ステップの相対的精度は、この至近距離範囲の大きさに依存する。

#### 【0064】

位置決め補助具の位置が、例えば少なくとも  $\pm 40 \text{ nm}$ 、または  $\pm 20 \text{ nm}$ 、または  $\pm 10 \text{ nm}$ 、または  $\pm 5 \text{ nm}$  のように、非常に正確にわかっている場合、およびそれらが同じ程度の位置決め補助具の位置に最大距離を有するように、構造体を位置決め補助具に連結する 2ステップが実行される場合、最小値の位置が配置されているそれぞれの位置決め補助具の至近距離範囲は、相応に小さく維持できる。それぞれの構造体がマークされている全ての蛍光マーカの位置が決定され、蛍光マーカの互いに対する相対的な位置、すなわち、それらの距離が特に注目される場合、それぞれの構造体が測定される。この測定は、構造体の周囲条件を変更する6ステップの後で、または構造体の周囲条件を変更する6ス

10

20

30

40

50

テップの間に、繰り返すことができる。ここで、試料内の全ての構造体の周囲条件が、同じ方法で変更できる。このようにして、例えば、周囲条件の同様の変更に対する異なるナノスケール構造体の反応を、記録できる。代替的には、周囲条件を変更する6ステップは、試料の異なる領域において実行でき、したがって、例えば、同じ構造体に対して異なる方法で実行できる。例えば、物質に対する構造体の異なる反応を記録するために、同じ構造体に対して試料の異なる領域内に異なる物質を添加してもよい。これは、例えば、薬物スクリーニングで実行できる。試料内の構造体が同一であるか、または異なるかにかかわらず独立的に、配置する3ステップ、記録する4ステップ、かつ決定する5ステップを実行することによる構造体の新たな測定が、構造体の周囲条件を変更する6ステップに続く。

【0065】

図2(a)は、それぞれ、蛍光マーカ8または9によってその2つの端部の各々でマークされている1つのナノスケール構造体7の一例を非常に模式的に示す。蛍光マーカ8と9とが、異なる形で表現されている。既に説明したように、活性状態と不活性状態との間で移動可能な場合、同じ蛍光マーカでもよい。これは、例えば、移動確率に従って蛍光マーカ8と9を活性状態または不活性状態に移動する追加のスイッチ光を用いて達成でき、その結果、スイッチ光を繰り返し照射することによって、一度は一方の蛍光マーカ8のみが活性化し、もう一度は他方の蛍光マーカ9のみが活性化するスイッチ状態が達成されている。更に、中心連結点10が構造体7に形成されている。連結点10は、位置決め補助具12の対応する連結部位11への連結のために設計されている。

【0066】

図2(b)は、位置決め補助具12の連結部位11に連結されている連結点10を示している、ここでは、この位置決め補助具が、残りの試料13に対して固定されている連結部位11のみから成る。

【0067】

一方では、図2(c)が、連結部位11の他に、金粒子14を備える位置決め補助具12へ、連結点10経由で連結される構造体7を示す。金粒子14によって反射されている光を用いて、励起光による励起、及び蛍光の光の放出によって蛍光マーカ8と9にストレスを与えることなく、それぞれの試料内の位置決め補助具12の変化する位置まで決定可能である。

【0068】

図2(d)は、図2(c)による位置決め補助具12に連結されている構造体7を示し、この構造体は、構造体7の周囲条件の変化の一例として、物質15の影響に起因して変えられている。特に、構造体7の端部を折り畳み、それに対して付着した蛍光マーカ8および9の距離が短くなるように、変更したものである。したがって、物質15に対する構造体7の反応は、蛍光マーカ8と9との間の距離を測定することによって直接記録できる。

【0069】

図3は、位置決め補助具12を備えた構造体7を、その2つの端部間の距離に対して直交する観察方向で示している、図2(d)による、縮小されている距離16の他に、図2(c)による、引き伸ばされた構造体7による開始距離17も、描かれている。更に、位置決め補助具12の既知のまたは前もって決定されている位置19のまわりの至近距離範囲18が、図3内に描かれている。この至近距離範囲では、それぞれの活性蛍光マーカ8、9を励起する励起光の強度分布の局所的な最小値が、4つの異なる位置20から23に配置されていて、位置20は位置決め補助具12の位置19と一致し、および位置21から23は位置19、20のまわりに円状で等距離に配置されている。各位置20から23に対して、それぞれの蛍光マーカ8、9からの蛍光の光が、別々に記録されている。次に、至近距離範囲内のそれぞれの蛍光マーカ8、9の位置は、記録されている蛍光の光の強度から非常に正確に決定できる。決定の精度は、至近距離範囲の寸法、すなわちその直径に依存し、図3と比較して半分だけの大きさしかない可能性がある。しかしながら、これは、位置決め補助具12の位置19が極めて正確に知らなければならない、かつ実際には構造体7の中心と一致することを必要とする。ここで生じる不正確および変形を補償するた

10

20

30

40

50

めに、至近距離範囲 1 8 は、それが理想的な境界条件の下で必要と思われるよりも大きく選択しなければならない。

【 0 0 7 0 】

図 4 は、図 3 の観察方向による平面図 ( a )、および局所的最小値 2 6 を通りそれに対して直交する断面図 ( b ) において、中央に局所的最小値 2 6 を有する励起光 2 5 の強度分布 2 4 を示す。局所的最小値 2 6 は、強度分布の最大値 2 7 によって四方が囲まれている。局所的最小値 2 6 では、励起光 2 5 の強度が理想的にはゼロまで下がる。最小値 2 6 までの距離が増加すると、強度 I は、最初は二次元的に増加し、その後、それがリング形状の最大値 2 7 でその最大値に到達する。本発明による方法では、それぞれの蛍光マーカによって放出され、かつ記録された蛍光の光の強度が、最小値 2 6 までの蛍光マーカの距離に関する肯定的な結論を可能にするように、強度 I が二次元的に増加する最小値 2 6 のすぐまわりの領域が、この強度分布 2 4 で使用される。それぞれの至近距離範囲内の最小値 2 6 のいくつかの位置に対して決定される複数のこの種の距離から、蛍光マーカの正確な位置は、したがって、例えば三角測量によって、またはさらに良好には局所的最小値を有する関数を、最小値の個々の位置に対して記録された蛍光の光の強度に適合させることによって決定できる。

10

【 0 0 7 1 】

最小値の個々の位置に対して記録された蛍光の光の強度に適合されるべき局所的最小値を有する空間関数は、局所的最小値 2 6 へのそれぞれの蛍光マーカの距離に対する蛍光の光の強度の依存性を記述するものである。これに対応して、この関数は、同じ若しくは類似の蛍光マーカ、または同じ有効断面積の光反射位置決め補助具をスキャンすることによって決定できる。ここで、スキャンするとは、二次元関数の経過を決定するために、例えば少なくとも 5 x 5 ステップ、または 1 0 x 1 0 ステップのように、局所的最小値 2 6 を実際に小さいステップでシフトすることを意味する。

20

【 0 0 7 2 】

図 5 は、本発明による方法の薬物スクリーニング実施態様の実施用試料 1 3 を示す。試料 1 3 は、その外側周囲 2 8 で試料 1 3 を試料ホルダに配置する固定点 2 9 を有する。複数の位置決め補助具 1 2 は、それらの位置 1 9 で、固定点 2 9 に関して正方形状に配置されている。各位置決め補助具 1 2 は、試料 1 3 の凹部またはいわゆる穴部 3 0 内に位置づけられている。それに応じて、線 3 1 および列 3 2 に配置されている穴部 3 0 は、試料 1 3 内のそれぞれの穴部 3 0 内の位置決め補助具 1 2 に連結されている構造体に、物質を選択的に追加することを可能にする。したがって、異なる物質に対する同一または同一ではない構造体の反応を、記録できる。この目的のために、構造体は、物質を追加する前と後、かつ任意選択でさらにその追加する間に、本発明による方法によって測定され、図 4 による強度分布 2 4 の最小値 2 6 の位置が、位置決め補助具のそれぞれの位置 1 9 のまわりの至近距離範囲 1 8 内に各々直接配置される。したがって、それぞれの構造体の反応は、高速で、蛍光マーカあたりの放出される光子の数が少なく、かつそれにもかかわらず高精度で記録できる。

30

【 0 0 7 3 】

図 6 は、本発明による方法を実施する装置 3 3 を示す。装置 3 3 は、試料 1 3 のための試料ホルダ 3 4 を備え、その試料ホルダによって試料 1 3 は、装置 3 3 の更なる基部固定構成要素に対して位置決めするために基部 3 5 に対して移動可能である。この位置決めは、特に、それぞれの位置決め補助具のまわりにそれぞれの至近距離範囲 1 8 を接近させるために役立つ。特に、位置決めは、対物レンズ 3 6 によって試料に合焦できる励起光 2 5 の強度分布に関して実行される。励起光 2 5 は、対物レンズ 3 6 を用いて焦点合せする際に、図 4 による強度分布が試料 1 3 内で調節されるように、光源 3 7 によって提供される。この目的のために、光源 3 7、レーザー 3 8 のほかに、例えばいわゆる e a s y S T E D 波長板の形のようなビーム整形手段 3 9 を備える。スキャナとも称されるスキャニングユニット 4 0 が、それぞれの至近距離範囲 1 8 内で試料内の最小値 2 6 をシフトするために設けられている。光源 3 7 とスキャニングユニット 4 0 との間に配置されている二色性

40

50

ビーム分割器 4 1 は、試料 1 3 から出た蛍光の光 4 2 を共焦点検出器 4 5 に結合させる。制御部 4 3 は、特に薬物スクリーニングにおいて、本発明による方法を自動的に実行する装置 3 3 を制御する。ここで、装置 3 3 は、個々の穴部 3 0 に異なる物質を追加する図 6 では描かれていない追加の装置を備えることもできる。制御部 4 3 は、最小値の異なる位置に対するそれぞれの蛍光マーカに対して記録された蛍光の光の強度から、試料内の個々の蛍光マーカの位置を決定する評価ユニット 4 4 を含む。

#### 【 0 0 7 4 】

図 7 は、励起光 2 5 の強度分布 2 4 が局所的最小値 2 6 を有するのではなく、蛍光阻害光 4 6 の形態での更なる光 4 9 の強度分布 4 8 を有する本発明による方法の更なる一実施態様を示す。ここで、強度最大値 2 7 によって囲まれた強度分布 4 8 の最小値 2 6 は、強度分布 2 4 の局所的最大値 4 7 に対して同心円状に配置されている。この結果、それぞれの蛍光マーカによって放出される蛍光の光 4 2 の強度分布 5 0 は、局所的最小値 2 6 までの距離にわたって空間的に制限される。図 7 に描かれた強度分布 5 0 は、最大値 2 7 での蛍光阻害光 4 6 の極めて高い強度による強度分布 4 8 から生じる。換言すれば、図 7 での強度分布 4 8 は、大幅に縮小したスケールで描かれている。強度分布 5 0 を使用して、局所的最小値 2 6 の異なる位置に対して記録される蛍光の光 4 2 から、蛍光の光 4 2 を放出する個々に区別された蛍光マーカの位置を結論づけることができる。この目的のために、記録された蛍光の光の強度に、強度分布 5 0 を再現する際の局所的最大値を有する空間関数を適合できる。空間関数は、また、それぞれの蛍光マーカ、または類似の蛍光マーカ、または同じ有効断面積の位置決め補助具を局所的最小値 2 6 でスキャンし、かつ試料から放出される蛍光の光 4 2 を記録することによって決定できる。

#### 【 0 0 7 5 】

流れ図で図 8 に描かれている本発明による方法の別の態様では、図 7 内に例示される同じ強度分布 2 4 および 4 8 が、使用される。この他の態様では、本発明による方法が、異なる位置で少なくとも 1 個のナノスケール構造体を、蛍光マーカによってマークする 1 0 1 ステップで始まる。これは、少なくとも 1 個のナノスケール構造体が、少なくとも 2 つの選ばれた位置の各々において、1 個の蛍光マーカによってマークされることを意味する。少なくとも 1 個の構造体の異なる位置に付着した蛍光マーカは、それらが移行できる活性状態および不活性状態を有する場合、同一であってもよく、または、それらは蛍光の光の放出のために励起可能である励起光および励起に続いてそれらによって放出される蛍光の光のうち少なくとも 1 つに関して、それらのスペクトル特性が異なってもよい。

#### 【 0 0 7 6 】

少なくとも 1 個のナノスケール構造体を位置決め補助具に連結する 2 ステップが、マークする 1 0 1 ステップに続くステップとして図 8 内に示される。しかしながら、少なくとも 1 個の構造体を位置決め補助具に連結する 1 0 2 ステップは、構造体をマークする 1 ステップに先行してもよい。更に、マークする 1 0 1 ステップ、および連結する 1 0 2 ステップが、同時に実施できる。更に、本発明による方法のこの別の態様では、連結する 1 0 2 ステップを回避することさえ可能である。連結する 1 0 2 ステップが実行される場合、マークする 1 0 1 ステップ、および連結する 1 0 2 ステップの後、少なくとも 1 個の構造体は、数回マークされ、かつ位置決め補助具に連結される。試料内の位置決め補助具の位置は、それが固定されていることを意味する既知であってもよく、またはそれが、例えば、金粒子または銀粒子または量子ドットから選ばれる光反射粒子を含むため位置決め補助具によって反射される光から決定可能であってもよい。したがって、位置決め補助具の位置の決定は、蛍光の光の励起および放出によって蛍光マーカにストレスを与えることなく行うことができる。

#### 【 0 0 7 7 】

蛍光の光を放出するために励起光によって蛍光マーカを励起する 1 0 3 ステップでは、蛍光阻害光の強度分布の局所的最小値を位置決め補助具の至近距離範囲内の異なる位置に配置すると共に、励起光 2 5 の強度分布 2 4 が、蛍光阻害光 4 6 の強度分布 4 8 の局所的最小値のそれぞれの位置に最大値を有することができる。蛍光阻害光の強度分布の局所的

10

20

30

40

50

最小値と励起光の強度分布の最大値とが、それぞれの位置決め補助具の至近距離範囲内に共に配置される場合、活性状態にあり、かつ励起光によって励起できる蛍光マーカが、蛍光の光を放出するようになる。ここで、蛍光の光の強度は、蛍光阻害光の強度分布の局所的最小値に対するそれぞれの蛍光マーカの距離に依存する。

【0078】

蛍光の光が蛍光マーカの各々に対して別々に記録されているように、放出された蛍光の光を記録する104ステップが実行される場合、異なる蛍光マーカからの蛍光の光が異なる波長に起因して分離できるので、または蛍光マーカの1つだけが活性であるので、最小値の異なる位置に対するそれぞれの蛍光マーカからの蛍光の光の強度から個々の蛍光マーカの位置を決定する105ことが可能である。蛍光の光の同じ数の光子が記録されたこの決定する105ステップの精度は、局所的最小値の位置がそれぞれの蛍光マーカの位置に既にどれくらい近いかに依存する。励起する103ステップでの局所的最小値の位置が、連結された構造体および付着した蛍光マーカがさらに位置づけられる位置決め補助具の至近距離範囲内に配置されるという点において、蛍光マーカの位置を決定する105での相対的な精度は、この至近距離範囲の寸法に依存する。

【0079】

位置決め補助具の位置が非常に正確にわかっている場合、かつ少なくとも1個の構造体を位置決め補助具に連結する102ステップが、同じ程度の位置決め補助具の位置に対して最大距離を有するように実行される場合、最小値の位置が配置されているそれぞれの位置決め補助具の至近距離範囲は、それに対応して小さくてもよい。少なくとも1個の構造体がマークされている全ての蛍光マーカの位置が決定された場合に、それぞれの構造体が測定される。この測定は、本発明による方法のこの他の態様における任意選択のステップである、少なくとも1個の構造体の周囲条件を変更する106ステップの後、またはその変更する106ステップの間に繰り返すことができる。

【0080】

多くの変形例および変更が、本発明の主旨および原則から実質的に逸脱することなく本発明の好ましい実施態様に対してなされてよい。全てのこの種の変更および変形例は、以下の請求項によって定められるように、本発明の範囲内で本願明細書に含まれることが意図されている。

なお、本願は、特許請求の範囲に記載の発明に関するものであるが、他の観点として以下も含む。

1. 試料(13)内の複数のナノスケール構造体の空間的測定方法であって、当該方法が、以下のステップ、すなわち、

- 蛍光マーカ(8、9)によって異なる位置で個々の構造体をマークする(1)ステップ、
- 蛍光の光(42)を放出する励起光(25)によって蛍光マーカ(8、9)を励起するステップであって、励起光(25)の強度分布(24)と、蛍光マーカ(8、9)によって蛍光の光の放出に影響を及ぼす更なる光の強度分布(48)とのどちらか一方が、試料(13)内の異なる位置に配置されている局所的最小値(26)を備える、ステップ、
- 試料(13)から放出された蛍光の光(42)を、個々の蛍光マーカ(8、9)と最小値(26)の異なる位置(20、21、22、23)とについて両方とも別々に、記録する(4)ステップ、並びに

- 最小値(26)の異なる位置(20、21、22、23)に対するそれぞれの蛍光マーカ(8、9)について記録された蛍光の光(42)の強度から、試料(13)内の個々の蛍光マーカ(8、9)の位置を決定する(5)ステップを含む方法において、当該方法は、

- 試料(13)内の位置決め補助具(12)の位置が、既知であるか、または個々の位置決め補助具(12)によって反射される光から連結する(2)ステップの後で決定されている、個々の位置決め補助具(12)に個々の構造体(7)を連結する(2)更なるステップを含み、ならびに、

- 励起するステップが、それぞれの位置決め補助具(19)の位置のまわりの至近距離範

10

20

30

40

50

囲(18)内で、異なる位置(20、21、22、23)に局所的最小値(26)を配置する(3)ステップを含み、至近距離範囲(18)の寸法が、励起光(25)の波長と蛍光の光(42)の波長での回折限界値よりも大きくない、ことを特徴とする方法。

2. 至近距離範囲(18)の寸法が、励起光(25)の波長および蛍光の光(42)の波長での回折限界値の半分または四半分より大きくないことを特徴とする上記1に記載の方法。

3. 個々の蛍光マーカ(8、9)の位置は、最小値(26)の $4n$ 個以下、 $3n$ 個以下、又は $2n$ 個以下の異なる位置(20、21、22、23)に対して、記録された蛍光の光(42)の強度から決定されていて、 $n$ は、試料(13)内の個々の蛍光マーカ(8、9)の位置が決定されている空間方向の数であることを特徴とする上記1または2に記載の方法。

10

4. 試料(13)内の個々の蛍光マーカ(8、9)の位置を決定する(5)ステップが、局所的極値を備える空間関数を、最小値(26)の異なる位置(20、21、22、23)に対するそれぞれの蛍光マーカ(8、9)について記録された蛍光の光の強度に適合するステップを含むことを特徴とする上記3に記載の方法。

5. 局所的極値を備える空間関数は、

- 光反射位置決め補助具(12)の少なくとも1個でスキャンすることによって、または
- 蛍光マーカ(8、9)の少なくとも1個でスキャンすることによって、または
- 異なる蛍光マーカを、最小値(26)でスキャンすることによって、かつスキャン中に時間的分解能によって試料(13)から反射された光、若しくは試料(13)から放出された蛍光の光(42)を記録する(4)ことによって、

決定されていることを特徴とする上記4に記載の方法。

20

6. 個々の構造体(7)が異なる位置でマークされている蛍光マーカ(8、9)は、

- 蛍光マーカ(8、9)の励起スペクトルおよび発光スペクトルから選択されたスペクトル特性の異なる蛍光マーカ(8、9)、並びに
- 蛍光の光(42)の放出のために励起光(25)によって励起可能である活性状態と、少なくとも同じ励起光(25)によって、蛍光の光(42)の放出のために励起可能でない不活性状態とを有し、かつその活性状態とその不活性状態との間をスイッチ光によって移動可能である蛍光マーカ(8、9)、

から選択されていることを特徴とする上記1または2に記載の方法。

30

7. 位置決め補助具(19)の位置が、至近距離範囲(18)内に最小値(26)を配置するために使用された手段以外で、試料(13)に対して最小値(26)の相対的移動のための他の手段によって最小値(26)で接近されていることを特徴とする上記1または2に記載の方法。

8. 位置決め補助具(19)の位置が、試料(13)の固定点(29)に対して固定され、かつ位置決め補助具(19)の位置が、試料(13)の固定点(29)に対して接近されていることを特徴とする上記7に記載の方法。

9. 位置決め補助具(19)の位置が、

- 励起光(25)の波長および蛍光の光(42)の波長での回折限界値の二倍より小さくない最小距離で、並びに
- 周期的パターン、六角形パターンおよび正方形パターンから選ばれた試料(13)内の所定のパターンで、

40

配置されていることを特徴とする上記1または2に記載の方法。

10. 試料(13)内の位置決め補助具(12)は、構造体(7)が免疫反応経路で連結されている固定連結部位(11)であることを特徴とする上記1または2に記載の方法。

11. 位置決め補助具(12)が、金粒子(14)、銀粒子および量子ドットから選択された光反射実体を備えることを特徴とする上記1または2に記載の方法。

12. 構造体(7)が同一の構造体(7)を含み、かつ同一の構造体(7)が試料(13)の異なる領域内の異なる周囲条件にさらされていることを特徴とする上記1または2に記載の方法。

50

13. 試料(13)内の個々の蛍光マーカ(8、9)の位置が、少なくとも2つの時点について、これらの少なくとも2つの時点について記録された蛍光の光(42)の強度から、決定されていて、そして、

- 構造体(7)が、少なくとも2つの時点で異なる周囲条件にさらされているか、または  
- 少なくとも2つの時点が、構造体(7)がさらされた周囲条件の変更を継承することを特徴とする上記1または2に記載の方法。

14. 試料(13)内の複数のナノスケール構造体の空間的測定装置であって、構造体(7)の各々は、試料(13)内の位置が既知であるかまたは位置決め補助具(12)によって反射される光から決定された位置決め補助具(12)に連結されている当該装置において、

当該装置が、

- 試料(13)のための試料ホルダ(34)、

- 試料ホルダ(34)上へ向けられた対物レンズ(36)、

- 対物レンズ(36)によって合焦された励起光(25)の強度分布が局所的最小値(26)を備えるように対物レンズ(36)に励起光(25)を連結する光源(37)か、または対物レンズ(36)によって合焦された更なる光の強度分布が局所的最小値(26)を備えるように対物レンズ(36)に蛍光マーカ(8、9)による蛍光の光(42)の放出に影響を及ぼす更なる光と励起光(25)を連結する光源(37)、

- 試料ホルダ(34)に対して最小値の位置(20、21、22、23)を移動するように構成されたスキャナ(40)、

- 最小値(26)の異なる位置(20、21、22、23)に対して試料(13)から別々に放出された蛍光の光(42)を記録するように構成された検出器(45)、

- 最小値(26)の異なる位置(20、21、22、23)に対するそれぞれの蛍光マーカ(8、9)について記録された蛍光の光(42)の強度から、試料(13)内の個々の蛍光マーカ(8、9)の位置を決定するように構成された評価ユニット(44)、ならびに

- それぞれの位置決め補助具(19)の位置のまわりの至近距離範囲(18)内で、異なる位置(20、21、22、23)に局所的最小値(26)を配置する(3)ように構成された制御部であって、至近距離範囲(18)の寸法が、励起光(25)の波長と蛍光の光(42)の波長での回折限界値よりも大きくない、制御部を備えることを特徴とする装置。

15. 試料(13)内の1つのナノスケール構造体の空間的測定方法であって、当該方法が以下のステップ、すなわち、

- 蛍光マーカ(8、9)によって異なる位置で構造体をマークする(1)ステップ、

- 蛍光阻害光(46)の強度分布(48)の局所的最小値のそれぞれの位置で蛍光の光(42)の放出のために励起光(25)によって蛍光マーカ(8、9)を励起する(3)ステップであって、試料(13)の寸法が、励起光(25)の波長および蛍光の光(42)の波長での回折限界値より大きくなく、局所的最小値(26)が試料(13)内の至近距離範囲(18)内の異なる位置に配置されている、ステップ、

- 個々の蛍光マーカ(8、9)と最小値(26)の異なる位置(20、21、22、23)について、試料(13)から放出された蛍光の光(42)を別々に記録する(4)ステップ、ならびに

- 最小値(26)の異なる位置(20、21、22、23)に対するそれぞれの蛍光マーカ(8、9)について記録される蛍光の光(42)の強度から、試料(13)内の個々の蛍光マーカ(8、9)の位置を決定する(5)ステップを含むことを特徴とする方法。

16. 励起光(25)の強度分布(24)は、蛍光阻害光(46)の強度分布(48)の局所的最小値のそれぞれの位置で最大値を有することを特徴とする上記15に記載の方法。

17. 至近距離範囲(18)の寸法が、

- 励起光(25)の波長および蛍光の光(42)の波長での回折限界値の半分または四半分より大きくなく、かつ

- 局所的最小値(26)までのその距離にわたってそれぞれの蛍光マーカ(8、9)によ

10

20

30

40

50

って放出された蛍光の光(42)の強度の分布(50)の半分最大値での全幅、または半分最大値での全幅の半分、または四半分、より大きくないことを特徴とする上記15または16に記載の方法。

18. 個々の蛍光マーカ(8、9)の位置が、最小値(26)の4n個以下、3n個以下、又は2n個以下の異なる位置(20、21、22、23)に対して記録された蛍光の光(42)の強度から決定されていて、nは、試料(13)内の個々の蛍光マーカ(8、9)の位置が決定されている空間方向の数であることを特徴とする上記15または16に記載の方法。

19. 試料(13)内の個々の蛍光マーカ(8、9)の位置を決定する(5)ステップは、局所的最大値を備える空間関数を最小値(26)の異なる位置(20、21、22、23)に対するそれぞれの蛍光マーカ(8、9)について記録された蛍光の光(42)の強度に適合するステップを含むことを特徴とする上記15または16に記載の方法。

20. 局所的最大値を備える空間関数が、

- 蛍光マーカ(8、9)または異なる蛍光マーカの少なくとも1個を、最小値(26)でスキャンし、かつスキャン中に試料(13)から放出された蛍光の光(42)を時間的分解能によって記録する(4)ことで、かつ

- 加えて、励起光(25)の最大値だけで少なくとも1個または異なる蛍光マーカ(8、9)をスキャンし、かつスキャン中に時間的分解能によって試料(13)から放出された蛍光の光(42)を記録する(4)ことで、

決定されていることを特徴とする上記19に記載の方法。

21. 励起するステップ、記録する(4)ステップ、および決定する(5)ステップが、蛍光阻害光(46)の増大した強度で少なくとも一回繰り返されていることを特徴とする上記15または16に記載の方法。

22. 構造体(7)が異なる位置でマークされている蛍光マーカ(8、9)は、

- 蛍光マーカ(8、9)の励起スペクトルおよび発光スペクトルから選択されたスペクトル特性の異なる蛍光マーカ(8、9)、並びに

- 蛍光の光(42)の放出のために励起光(25)によって励起可能である活性状態と、少なくとも同じ励起光(25)によって蛍光の光(42)の放出のために励起可能でない不活性状態とを有し、かつその活性状態とその不活性状態との間をスイッチ光によって移動可能である蛍光マーカ(8、9)、

から選択されていることを特徴とする上記15または16に記載の方法。

23. - 蛍光マーカ(8、9)の一部が、蛍光マーカ(8、9)の活性状態から蛍光マーカ(8、9)の不活性状態へスイッチ光によってスイッチされているか、または

- 蛍光マーカ(8、9)の一部が、蛍光マーカ(8、9)の不活性状態から蛍光マーカ(8、9)の活性状態へスイッチ光によってスイッチされている、という点において、蛍光マーカ(8、9)は、個々の蛍光マーカ(8、9)に対して試料(13)から放出された蛍光の光(42)を別々に記録する(4)前に個々に区別されていることを特徴とする上記15または16に記載の方法。

24. - 蛍光マーカ(8、9)が、試料(13)内で移動可能であり、かつ異なる位置で構造体(7)に個々に付着する蛍光マーカ(8、9)から選択されていて、

- 蛍光マーカ(8、9)が、それらが構造体(7)に次々と個々に付着するような濃度で、かつ空間分布で試料(13)に添加されていて、ならびに

- 蛍光マーカ(8、9)が、構造体に付着する際に、励起光(25)によって蛍光の光の放出のために励起可能でない不活性状態から、励起光(25)によって蛍光の光(42)の放出のために励起可能である活性状態に移されるか、または蛍光マーカ(8、9)が、一時的にだけ構造体(7)に付着するか、または蛍光マーカ(8、9)が、励起光(25)および蛍光阻害光(46)の長期間の影響の下で暗状態に永続的に移されていることを特徴とする上記15または16に記載の方法。

25. 上記15または16に記載の方法であって、更に、次のステップ、すなわち、

- 蛍光の光(42)の放出のために励起光(25)によって蛍光マーカ(8、9)を励起

10

20

30

40

50

するステップであって、励起光（２５）の強度分布（２４）が、試料（１３）内の異なる位置に配置される他の局所的最小値（２６）を有するステップ、

- 個々の蛍光マーカ（８、９）および励起光（２５）の強度分布（２４）の他の最小値の異なる位置（２０、２１、２２、２３）に対して別々に試料（１３）から放出された蛍光の光（４２）を記録する（４）ステップ、ならびに

- 励起光（２５）の強度分布（２４）の他の最小値（２６）の異なる位置（２０、２１、２２、２３）に対するそれぞれの蛍光マーカ（８、９）について記録された蛍光の光（４２）の強度から試料（１３）内の個々の蛍光マーカ（８、９）の位置を決定する（５）ステップ、

を備えることを特徴とする方法。

10

２６．試料（１３）から個々の蛍光マーカ（８、９）によって放出された蛍光の光（４２）の相補的強度分布が、一方では、蛍光阻害光（４６）の強度分布（４８）の最小値の異なる位置（２０、２１、２２、２３）にわたって生じ、かつ他方では、励起光（２５）の強度分布（２４）の他の最小値（２６）の異なる位置（２０、２１、２２、２３）にわたって、試料（１３）内の個々の蛍光マーカ（８、９）の位置を決定する（５）際に比較されていることを特徴とする上記２５に記載の方法。

２７．- 蛍光阻害光（４６）の強度分布（４８）の最小値（２６）の異なる位置（２０、２１、２２、２３）に対するそれぞれの蛍光マーカ（８、９）について記録された蛍光の光（４２）の強度から決定されている試料（１３）内の個々の蛍光マーカ（８、９）の位置が、その後、励起光（２５）の強度分布（２４）の他の最小値（２６）が配置されている位置を定める際に考慮されているか、または

20

- 励起光（２５）の強度分布（２４）の他の最小値（２６）の異なる位置（２０、２１、２２、２３）に対するそれぞれの蛍光マーカ（８、９）について記録された蛍光の光（４２）の強度から決定されている試料（１３）内の個々の蛍光マーカ（８、９）の位置が、その後、蛍光阻害光（４６）の強度分布（４８）の最小値（２６）が配置されている位置を定める際に考慮されていることを特徴とする上記２５に記載の方法。

【符号の説明】

【 0 0 8 1 】

7 ナノスケール構造体

8 蛍光マーカ

30

9 蛍光マーカ

10 中心連結点

11 連結部位

12 位置決め補助具

13 試料

14 金粒子

15 物質

16 縮小されている距離

17 開始距離

18 至近距離範囲

40

19、20～23 位置

24 強度分布

25 励起光

26 局所的最小値

27 最大値

28 外側周囲

29 固定点

30 穴部

31 線

32 列

50

- 3 3 装置
- 3 4 試料ホルダ
- 3 5 基部
- 3 6 対物レンズ
- 3 7 光源
- 3 8 レーザー
- 3 9 ビーム整形手段
- 4 0 スキャニングユニット
- 4 1 二色性ビーム分割器
- 4 2 蛍光の光
- 4 3 制御部
- 4 4 評価ユニット
- 4 5 共焦点検出器
- 4 6 蛍光阻害光
- 4 7 局所的な最大値
- 4 8 強度分布
- 4 9 異なる光
- 5 0 強度分布

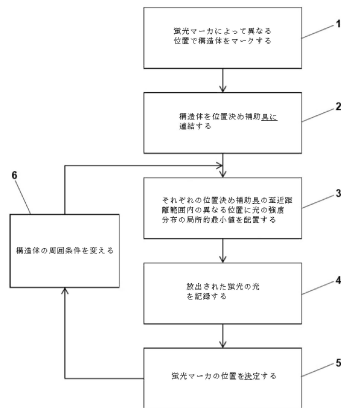
10

I 強度

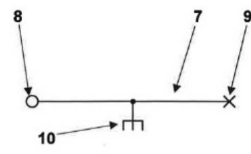
【図面】

20

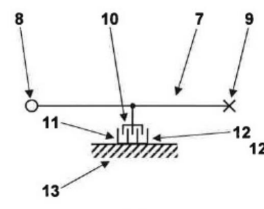
【図 1】



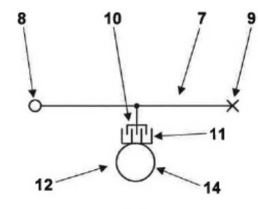
【図 2】



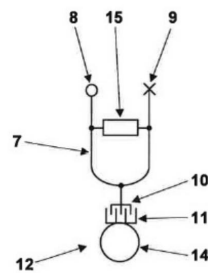
(a)



(b)



(c)



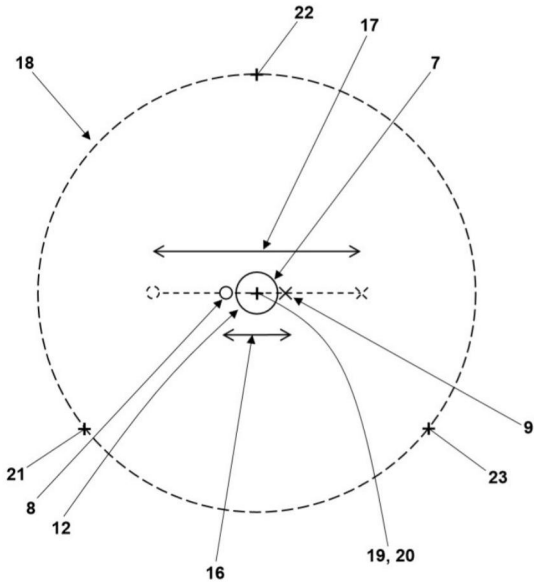
(d)

30

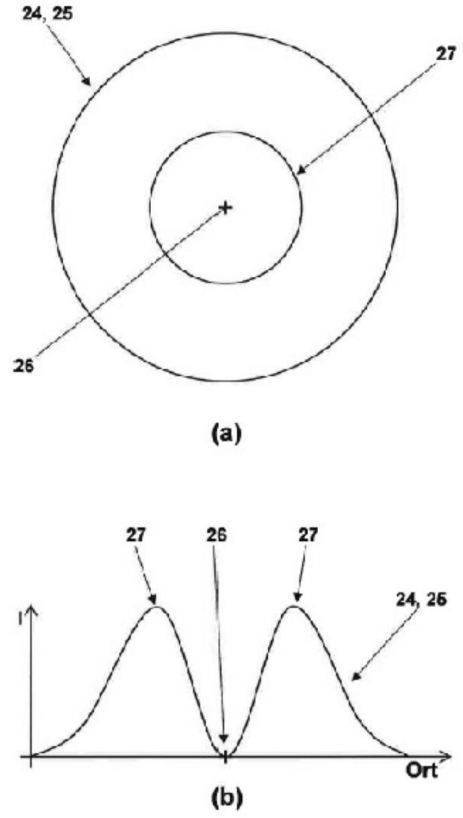
40

50

【 図 3 】



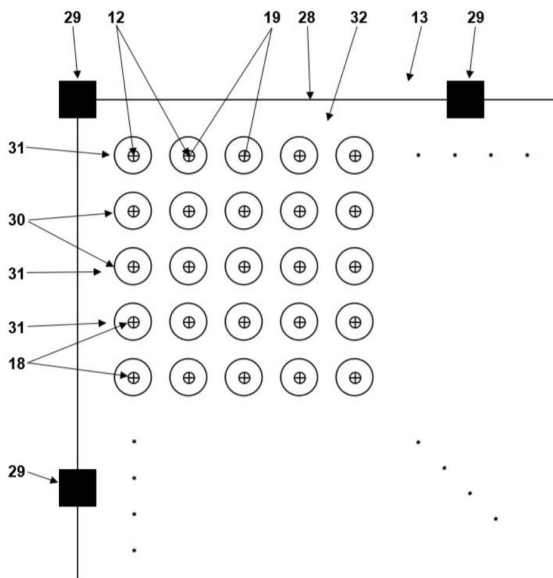
【 図 4 】



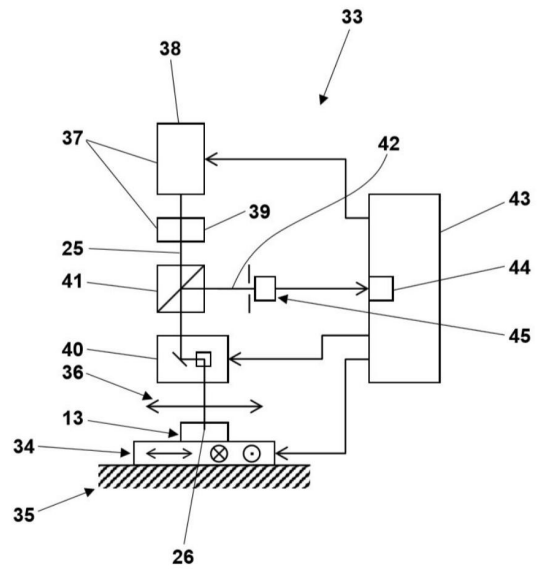
10

20

【 図 5 】



【 図 6 】

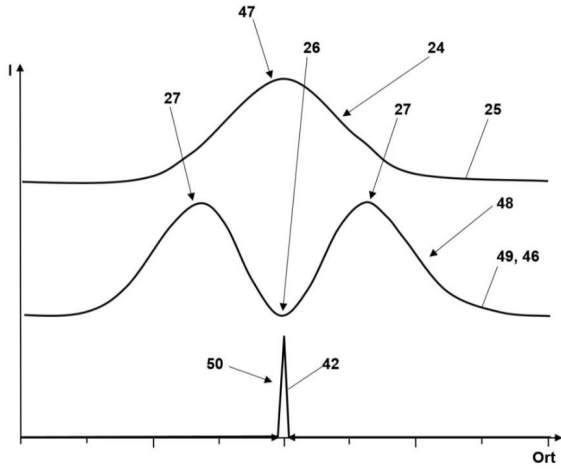


30

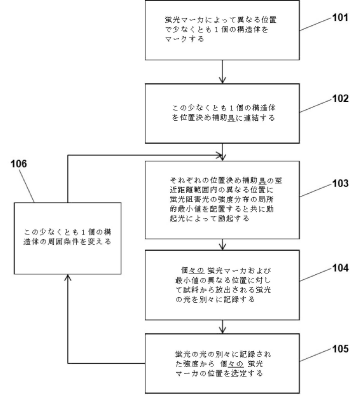
40

50

【 図 7 】



【 図 8 】



10

20

30

40

50

## フロントページの続き

- (74)代理人 100221981  
弁理士 石田 大成
- (74)代理人 100091683  
弁理士 吉 川 俊雄
- (74)代理人 100179316  
弁理士 市川 寛奈
- (72)発明者 ヘル, ステファン ダブリュー .  
ドイツ国 3 7 0 8 5 ゲットィンゲン, ヘルツベルガー ランド通り 3 8
- (72)発明者 アイラース, イヴァン  
ドイツ国 3 7 0 7 3 ゲットィンゲン, パーペンディーク 1 7
- (72)発明者 グウォッシュ, クラウス  
ドイツ国 3 7 0 7 7 ゲットィンゲン, ヴァレンティーンズブライト 9
- (72)発明者 バルザロッチェ, フランシスコ  
ドイツ国 3 7 0 8 3 ゲットィンゲン, イマーヌエル - カント通り 1 3
- 審査官 伊藤 裕美
- (56)参考文献 特表2016 - 532689 (JP, A)  
特表2014 - 535059 (JP, A)  
特表2016 - 503892 (JP, A)  
米国特許出願公開第2016 / 0363751 (US, A1)  
GOTTEFERT, F. et al, Strong signal increase in STED fluorescence microscopy by imaging regions of subdiffraction extent, PNAS, 2017年02月28日, 114 (9), 2125-2130, <https://doi.org/10.1073/pnas.1621495114>  
BALZAROTTI, F. et al, Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxes, SCIENCE, 2017年02月10日, 355, 606-612, (1-19, Supplementary Materials 1-72)
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)  
G 0 1 N 2 1 / 6 2 - G 0 1 N 2 1 / 7 4  
G 0 2 B 2 1 / 0 0 - G 0 2 B 2 1 / 3 6  
B 8 2 Y 3 5 / 0 0  
B 8 2 Y 1 5 / 0 0