(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
28. Dezember 2017 (28.12.2017)

WIPO | PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2017/220668 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
G02B 21/00 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2017/065268

(22) Internationales Anmeldedatum:
21. Juni 2017 (21.06.2017)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2016 211 374.7
24. Juni 2016 (24.06.2016) DE

(71) Anmelder: **CARL ZEISS MICROSCOPY GMBH** [DE/DE]; Carl-Zeiss-Promenade 10, 07745 Jena (DE).

(72) Erfinder: **NETZ, Ralf**; Ammerbacher Str. 107c, 07745 Jena (DE). **KALKBRENNER, Thomas**; Forstweg 35, 07745 Jena (DE). **ANHUT, Tiemo**; Rothirschweg 1, 07749 Jena (DE).

(74) Anwalt: **LORITZ, Rainer**; Carl Zeiss AG, Patentabteilung, Carl-Zeiss-Promenade 10, 07745 Jena (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,

(54) **Title:** MICROSCOPY METHOD USING TEMPORAL FOCUS MODULATION, AND MICROSCOPE

(54) **Bezeichnung:** MIKROSKOPIEVERFAHREN UNTER NUTZUNG ZEITLICHER FOKUSMODULATION UND MIKROSKOP

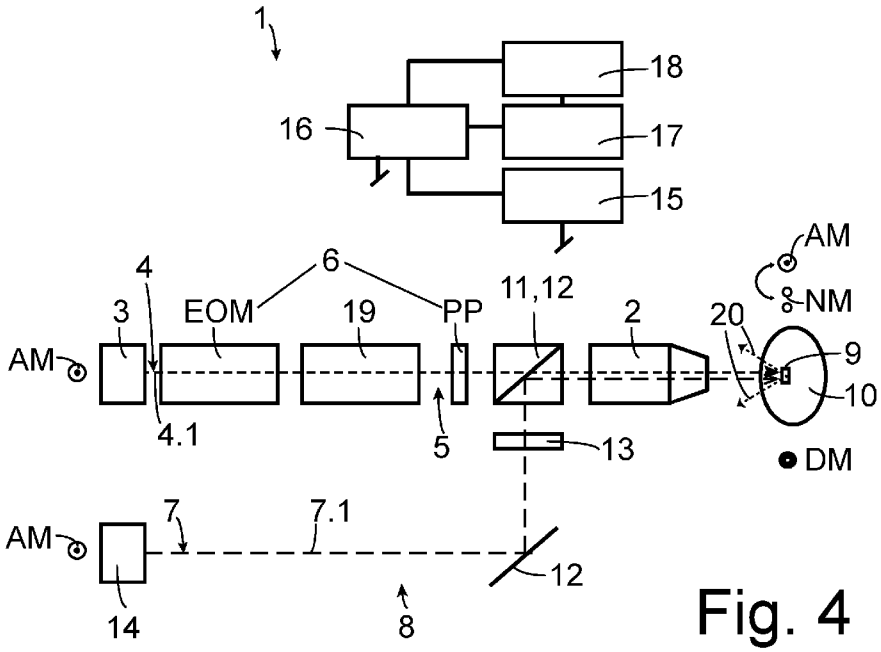


Fig. 4

(57) **Abstract:** The invention relates to a microscopy method in which an illuminating radiation (4) is generated and directed into a focal point (9). The modulated illuminating radiation (4) is temporally switched between at least two modes (AM, NM) such that a focus modulation is produced in which mode fields (AM, NM) of the illuminating radiation (4) are generated in the focal point (9) in a varying manner over time and so as to differ from one another. The invention is characterized in that the focal point (9) is guided at least over regions of a sample (10) to be examined. A detection radiation (20) is produced or can be produced in the sample (10) at at least one originating location by means of the illuminating radiation (4) in the focal point (9), and the detection radiation (20) is detected in an assigned manner to the at least one originating location. In addition to the illuminating radiation (4), at least one deexcitation

WO 2017/220668 A1

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten** *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

— *Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv)*

Veröffentlicht:

— *mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)*

beam bundle (7.1) of a deexcitation radiation (7) is directed into the focal point. The effect of the detection radiation (20) in the region illuminated by the deexcitation radiation (7) is prevented by the deexcitation radiation (7). The invention further relates to a microscope (1) which is suitable for carrying out the microscopy method.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Mikroskopieverfahren, bei dem eine Beleuchtungsstrahlung (4) erzeugt und in einen Fokus (9) gerichtet wird, wobei die modulierte Beleuchtungsstrahlung (4) zeitlich zwischen mindestens zwei Moden(AM, NM) geschaltet wird, so dass eine Fokusmodulation bewirkt wird, bei der in dem Fokus (9) zeitlich variierende und sich voneinander unterscheidende Moden-Felder (AM, NM) der Beleuchtungsstrahlung (4) erzeugt werden, dadurch gekennzeichnet, dass der Fokus (9) mindestens über Bereiche einer zu untersuchenden Probe (10) geführt wird, wobei durch die Beleuchtungsstrahlung (4) in dem Fokus (9) an mindestens einem Ursprungsort eine Detektionsstrahlung (20) in der Probe (10) bewirkt wird oder bewirkbar ist und die Detektionsstrahlung (20) dem mindestens einen Ursprungsort zugeordnet erfasst wird und zusätzlich zur Beleuchtungsstrahlung (4) mindestens ein Abregungsstrahlenbündel (7.1) einer Abregungsstrahlung (7) in den Fokus gerichtet wird, wobei durch die Abregungsstrahlung (7) das Bewirken der Detektionsstrahlung (20) in dem von der Abregungsstrahlung (7) beleuchteten Bereich verhindert wird. Die Erfindung betrifft ferner ein zur Durchführung des Mikroskopieverfahren geeignetes Mikroskop(1).

Mikroskopieverfahren unter Nutzung zeitlicher Fokusmodulation und Mikroskop

Die Erfindung betrifft ein Mikroskopieverfahren unter Nutzung zeitlicher Fokusmodulation gemäß dem Oberbegriff des Anspruchs 1. Die Erfindung betrifft weiterhin ein Mikroskop gemäß dem Oberbegriff des Anspruchs 9.

Die zeitliche Fokusmodulation (FMM) ist durch ein schnelles Schalten verschiedener Fokusfelder charakterisiert. Bei der Fokusmodulation werden beziehungsweise wird die Phasenlage und/oder die Polarisation der Beleuchtungsstrahlung moduliert, beispielsweise verschoben beziehungsweise gedreht.

Die Fokusmodulation ist insbesondere dann anwendbar, wenn die Beleuchtungsstrahlung nur im Fokus eines Objektivs beeinflusst werden soll. Dabei soll zugleich auftretende Hintergrundstrahlung diskriminiert werden.

Aus der DE 10 2011 013 613 A1 sind ein Mikroskop und ein Mikroskopieverfahren bekannt, bei denen wenigstens ein Beleuchtungsstrahl mit einer Modulationsfrequenz phasenmoduliert wird und der Beleuchtungsstrahl mittels eines Objektivs in eine Probe fokussierbar ist beziehungsweise fokussiert wird. Über einen Detektionsstrahlengang und unter Nutzung eines Mittels zur Demodulation wird eine in der Probe bewirkte Detektionsstrahlung erfasst. In dem Strahlengang der Beleuchtungsstrahlung ist mindestens ein polarisationsänderndes Element vorgesehen, dem eine Phasenplatte nachgeordnet ist, welche mindestens zwei Bereiche mit unterschiedlicher Phasenbeeinflussung aufweist. Die Probe wird mit dem Beleuchtungsstrahl beleuchtet, wobei der Beleuchtungsstrahl abwechselnd auf mindestens zwei Strahlengänge aufgeteilt wird. In einem der Strahlengänge wird eine zum anderen Strahlengang unterschiedliche Feldmode erzeugt. Die beiden Strahlengänge werden im Fokus mit den unterschiedlichen Feldmoden überlagert. Die Detektionsstrahlung wird in dem Detektionsstrahlengang demoduliert.

Ein Mikroskop und ein Mikroskopieverfahren unter Nutzung der Fokusmodulation sind auch aus der WO 2013/170940 A1 bekannt. Über die bereits zur DE 10 2011 013 613 A1 angeführten Merkmale hinaus, liegt der Beleuchtungsstrahl als ein gepulster Beleuchtungsstrahl vor und wird im Beleuchtungsstrahlengang vor

dem Objektiv mittels eines ersten Polarisationsstrahlenteilers in mindestens einen ersten und zweiten Teilstrahlengang geteilt, die unterschiedliche Lichtwege aufweisen. Mittels eines zweiten Polteilers sind die Teilstrahlengänge wieder vereint, wobei in einem der Teilstrahlengänge ein Phasenelement vorgesehen ist das mindestens zwei Bereiche mit unterschiedlicher Phasenbeeinflussung aufweist.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein weiterentwickeltes Mikroskopieverfahren mit einer verbesserten Auflösung und ein Mikroskop mit einem gegenüber dem Stand der Technik verbesserten Auflösungsvermögen vorzuschlagen.

Die Aufgabe wird hinsichtlich des Mikroskopieverfahrens durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 1 und hinsichtlich des Mikroskops durch die Merkmale des Anspruchs 9 gelöst.

Vorteilhafte Ausgestaltungen sind in den abhängigen Ansprüchen angegeben.

Bei der Ausführung des Mikroskopieverfahrens wird eine Beleuchtungsstrahlung erzeugt. Die Beleuchtungsstrahlung wird moduliert und in einen Fokus gerichtet. Dabei wird die modulierte Beleuchtungsstrahlung zeitlich zwischen mindestens zwei Moden geschaltet, so dass eine Fokusmodulation bewirkt wird, bei der in dem Fokus zeitlich Felder mit voneinander verschiedenen Moden der Beleuchtungsstrahlung erzeugt werden.

Gekennzeichnet ist das Mikroskopieverfahren dadurch, dass der Fokus punktförmig im Sinne eines beugungsbegrenzten Airy-Scheibchens, auch als Spot bezeichnet, ausgebildet ist und mindestens über Bereiche einer zu untersuchenden Probe geführt wird, wobei durch die Beleuchtungsstrahlung in dem Fokus an mindestens einem Ursprungsort eine Detektionsstrahlung in der Probe bewirkt wird oder bewirkbar ist und die Detektionsstrahlung dem mindestens einen Ursprungsort zugeordnet erfasst wird. Zusätzlich zur Beleuchtungsstrahlung wird mindestens ein Strahlenbündel einer Abregungsstrahlung in den Fokus gerichtet, wobei durch die Abregungsstrahlung das Bewirken der Detektionsstrahlung in dem von der

Abregungsstrahlung beleuchteten Bereich vollständig oder im Wesentlichen verhindert wird.

Der Fokus wird in einer vorteilhaften Ausführung scannend über die Probe geführt, wodurch mindestens Bereiche der Probe vollständig oder in einem vorgesehenen Muster beleuchtet wird.

Von Vorteil ist, wenn die Detektionsstrahlung eine emittierte Strahlung ist, die beispielsweise von Fluorophoren, beispielsweise fluoreszierenden Molekülen, stammen.

Der Ursprungsort der Detektionsstrahlung ist durch die zu einem Erfassungszeitpunkt, zu dem die jeweilige Detektionsstrahlung erfasst wird, vorliegende Fokusposition bestimmt. Zusätzlich ist der Ursprungsort durch die Fokustiefe, also die Tiefe des Fokus in der Probe, bestimmt.

Der Begriff der Detektionsstrahlung wird in dieser Beschreibung auch für Varianten des Mikroskopieverfahrens verwendet, in denen im Fokus durch Wirkung der Beleuchtungsstrahlung eine Detektionsstrahlung in Form reflektierter und/oder emittierter Strahlung unterbunden wird und ein Nichtauftreten der Detektionsstrahlung im Fokus erfasst und dem Ursprungsort zugeordnet wird, wie dies bei einer sogenannten Negativbildgebung beispielsweise unter Nutzung des RESOLFT-Verfahrens (reversible saturable optical fluorescence transitions; reversibel sättigbare optische Fluoreszenzübergänge) erfolgt.

Um eine Fokusmodulation zu erzeugen wird das Auftreten und/oder die Ausprägung einer Eigenschaft, beispielsweise der Emission von Fluoreszenzstrahlung, welche gänzlich oder im Wesentlichen im Fokus generiert wird, zeitlich derart beeinflusst, dass diese Eigenschaft außerhalb des Fokus nicht moduliert wird.

Die Fokusmodulation kann durch schnelles Schalten der optischen Phase in der Pupille eines Objektivs bewirkt werden, wie dies dem Fachmann bekannt ist. Dabei wurde die Phase in zwei Halbpupillen geschaltet. Ähnlich der Halbpupillenschaltung kann vorteilhaft auch die Schaltung zwischen den optischen

Phasen anderer Teilstrahlen in der Pupille zur Erzeugung der Fokusmodulation genutzt werden.

Aus dem Stand der Technik, beispielsweise aus der WO 2013/170940 A1, ist ein zeitliches Schalten zwischen zwei Fokuszuständen (Moden), die eine Modulation der Fluoreszenz lediglich im Fokus bewirken, bekannt.

Beispielhaft ist in der Fig. 1 ein Beispiel gemäß dem Stand der Technik für zwei Moden in einem Fokus im Querschnitt dargestellt, zwischen denen geschaltet werden kann. Eine der Moden besitzt eine Nullstelle auf der optischen Achse. Außerhalb des Fokus verschwindet die Nullstelle.

Neben einer reinen Phasenschaltung in der Pupille ist zudem die Schaltung der Polarisation in Kombination mit einer Phasenplatte bekannt, um die aus dem Fokalvolumen kommende Strahlung zu modulieren. In der Fig. 2 ist ein Beispiel gemäß dem Stand der Technik dargestellt, in dem eine Fokusmodulation auf der Basis eines elektro-optischen Polarisationsdrehers oder eines elektro-optischen Modulators (EOM). Das Fokalvolumen ist dasjenige Volumen, in dem die Beleuchtungsstrahlung fokussiert ist.

Wegen der vorteilhaften hohen Modulationsfrequenzen kommen im Wesentlichen schnell schaltende opto-elektronische Elemente wie zum Beispiel AOMs (akusto-optische Modulatoren) und EOMs in Frage. Mittels dieser Elemente ist die Polarisation zeitlich sehr schnell schaltbar, wodurch polarisationsabhängige Phasenhübe in verschiedenen räumlichen Bereichen, vorzugsweise in einer Objektivpupille, eingeführt werden.

Es ist also möglich, durch eine Schaltung des Polarisationszustandes einer Strahlung, insbesondere einer Beleuchtungsstrahlung, eine Umschaltung der Phasen der Strahlung zu erzielen. Mit diesen Lösungen kann eine Eigenschaft der Strahlung moduliert werden, die sich am Ende im Wesentlichen auf ein (Teil-)Feld im Fokus auswirkt, d.h. moduliert wird, während die wesentlichen außerfokalen Anteile nicht signifikant moduliert werden.

Mögliche und aus dem Stand der Technik bekannte Ausführungen einer Phasenplatte, die zu einer Fokusmodulation führen, sind in der Fig. 3 dargestellt.

Der Erfindung liegt die Überlegung zugrunde, dass die Techniken der FMM Modulationsfrequenzen von mehreren MHz erlauben.

Erfindungsgemäß wird die Fokusmodulation in ein Verfahren integriert, mittels dem vorteilhaft eine Abbildung mit einer hohen Auflösung erreicht wird.

Vorteile des erfindungsgemäßen Mikroskopieverfahrens ist eine Erhöhung der Eindringtiefe, also einer möglichen größeren Tiefe des Fokus.

Bei FMM werden Teile des Anregungslaserstrahls (lateral) gegenüber anderen Teilen des Anregungsstrahls phasenmoduliert. Bei Fokussierung durch ein Mikroskopobjektiv führt diese räumliche Phasenmodulation zu einer Intensitätsmodulation im Fokalvolumen. Diese resultiert aus der Tatsache, dass ein „flacher Phasenverlauf", d.h. eine über die Pupille nahezu konstante laterale Phase dazu führt, dass die PSF (point spread function; Punktverteilungsfunktion) in der Fokusebene eine beugungsbegrenzte laterale Ausdehnung annimmt. Laterale Phasenverläufe dagegen erzeugen eine PSF mit einer größeren räumlichen Ausdehnung. Zum Beispiel führt ein Pi-Phasensprung einer Halbpupille gegenüber der anderen Halbpupille zu einem Streifen mit der Intensität Null im Fokus, sowie im gesamten Lichtkegel zum Fokus hin. Andererseits ist die PSF in der senkrechten Richtung ausgedehnter als die beugungsbegrenzte PSF mit flacher Phase. In der konfokalen Mikroskopie ergibt sich die effektive PSF als Produkt aus Beleuchtungs- und Detektions-PSF. Die Detektions-PSF hängt wiederum von der Pinholegröße ab. Die nun zeitlich und räumlich variierende Intensitätsverteilung der Anregung führt dazu, dass die Intensität nach dem Pinhole mit der Frequenz der Anregungsmodulation variiert. Diese Intensitätsmodulation kann nach dem konfokalen Pinhole beispielsweise durch Lock-In-Detektion erfasst werden.

Der Vorteil des Verfahrens besteht darin, dass nur die ballistischen, also ungestreuten, oder schwach gestreuten Photonen zu diesem Modulationssignal insofern beitragen, als sie eine Modulation der Lichtverteilung im Fokus erzeugen,

die dann zu einer zeitlichen Intensitätsmodulation der Signalphotonen führt; die z.B. in stark streuenden Medien mehrfach gestreuten Photonen verlieren die feste Phasenbeziehung und tragen nicht zur zeitabhängigen Interferenzstruktur im Fokus bei. Dementsprechend tragen die gestreuten Anregungsphotonen nicht zum Lock-In-demodulierten Signal bei (die von der Probe im Fokus emittierten und evtl. gestreuten Signalphotonen können allerdings sehr wohl zum Signal beitragen), dadurch wird der Hintergrund durch gestreutes Licht (sowohl in Anregung als auch in Detektion) stark reduziert und die Tiefe, in welcher mit einem Laser-Konfokalmikroskop eine relativ genaue Abbildung der Probe möglich ist, dadurch erhöht.

Wird das erfindungsgemäße Mikroskopieverfahren durchgeführt, indem der Fokus scannend über die Probe oder wenigstens über Bereiche der Probe geführt wird, sind die erhöhten Eindringtiefen erreichbar, ohne das die Scangeschwindigkeit reduziert werden muss.

In einer weiteren möglichen Ausgestaltung des Verfahrens kann die Scangeschwindigkeit weiter erhöht werden, indem mittels Multispotmikroskopie eine Parallelisierung des Scanvorgangs erreicht wird.

Eine Modulation mit Modulationsfrequenzen unter dem oben genannten MHz-Bereich ist in weiteren Ausgestaltungen des Verfahrens möglich und kann entsprechend ausgewählt und eingestellt werden.

Die Beleuchtungsstrahlung wird als mindestens ein Beleuchtungsstrahlenbündel geführt und fokussiert.

Das Mikroskopieverfahren ist in einer möglichen Variante so ausgestaltet, dass eine Modulation der Beleuchtungsstrahlung über den Querschnitt des Beleuchtungsstrahlenbündels moduliert wird, wodurch eine kleine Querschnittsfläche des Beleuchtungsstrahlenbündels realisiert werden kann.

Die Beleuchtungsstrahlung und die Abregungsstrahlung können mit voneinander abweichenden räumlichen Verteilungen in den Fokus gerichtet werden, wobei sich

die Beleuchtungsstrahlung und die Abregungsstrahlung bereichsweise überlappen können.

Diese Möglichkeit ist beispielsweise dann vorteilhaft, wenn die Fokusmodulation in ein RESOLFT-Verfahren, insbesondere in ein STED-Verfahren (STED = Stimulated Emission Depletion), integriert wird, wobei hier das STED-Verfahren als eine spezifische Variante des RESOLFT-Verfahrens angesehen wird.

STED- und RESOLFT- Verfahren sind hochauflösende punktscannende Verfahren, mittels denen eine Auflösung unterhalb der Abbe´schen Auflösungsgrenze erreicht wird.

Die Fokusmodulation wird in einer möglichen Ausgestaltung des Mikroskopieverfahrens dazu verwendet, um ein mittels der Beleuchtungsstrahlung anregbares Molekül, insbesondere ein Molekül der Probe, aus einem Grundzustand in einen angeregten Zustand zu versetzen.

In einer weiteren möglichen Ausgestaltung des Mikroskopieverfahrens wird mittels der Fokusmodulation ein mittels der Beleuchtungsstrahlung in den angeregten Zustand versetztes Molekül zur Emission der Detektionsstrahlung stimuliert. Es wird eine sogenannte stimulierte Emission hervorgerufen. Die dabei emittierte Fluoreszenzstrahlung kann als Detektionsstrahlung erfasst werden.

Es ist in einer weiteren Ausgestaltung möglich, dass mittels der Fokusmodulation ein mittels der Beleuchtungsstrahlung einstellbarer Aktivierungszustand eines Moleküls der Probe eingestellt wird. Das Molekül kann dabei von einem aktivierten Zustand in einen deaktivierten Zustand überführt werden, und umgekehrt.

Das Molekül ist in einem aktivierten Zustand beispielsweise fluoreszenzfähig. Nach einer erfolgten Anregung ist das derart aktivierte Molekül aus einem Grundzustand in einen angeregten Zustand mit einer höheren Energie als der Grundzustand überführbar. Aus dem angeregten Zustand kann das Molekül unter spontaner Emission oder unter stimulierter Emission wieder in den Grundzustand zurückkehren.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann in einer weiteren Ausgestaltung einen zusätzlichen Beleuchtungsschritt umfassen, bei dem ein weiteres Abregungsstrahlenbündel erzeugt, auf den Probenbereich gerichtet und eventuell vorhandene Detektionsstrahlung erfasst wird. Die Beleuchtung des Probenbereichs mit dem weiteren Abregungsstrahlenbündel erfolgt zeitlich versetzt nach der Beleuchtung mit dem ersten Abregungsstrahlenbündel. Der zeitliche Versatz ist dabei so bemessen, dass die Aussendung von Detektionsstrahlung durch die aktuell angeregten Probenbereiche, beispielsweise durch dort angeregte Fluorophore, bereits abgeklungen ist und nur noch unerwünschte Detektionsstrahlung von unvollständig abgeregten Probenbereichen und/oder spontan (erneut) angeregten Probenbereichen auftritt. Die unerwünschte Detektionsstrahlung wird erfasst und zur Korrektur der mit dem ersten Abregungsstrahlenbündel abgeregten und erfassten Detektionsstrahlung verwendet. So kann ein mittels der erfassten Detektionsstrahlung nach der Beleuchtung mit dem ersten Abregungsstrahlenbündel gewonnenes erstes Bild korrigiert werden, indem ein mittels der erfassten Detektionsstrahlung nach der Beleuchtung mit dem weiteren Abregungsstrahlenbündel gewonnenes weiteres Bild von dem ersten Bild abgezogen wird. Vorteilhaft wird mit diesem Vorgehen ein großer Teil derjenigen Bilddaten eliminiert, die lediglich erfasstes Hintergrundrauschen wiedergeben.

Die Aufgabe wird ferner durch ein Mikroskop mit einer ersten Strahlungsquelle zur Bereitstellung einer Beleuchtungsstrahlung, einem optischen Modenschalter in dem Strahlengang eines Beleuchtungsstrahlenbündels der Beleuchtungsstrahlung zu deren zeitlichen Modulierung und Schaltung zwischen mindestens zwei Moden, einer Fokussieroptik zur Fokussierung des Beleuchtungsstrahlenbündels in einen Fokus und einer Erfassungseinheit zur Erfassung einer aus einem Ursprungsort in dem Fokus stammenden Detektionsstrahlung zu einem Erfassungszeitpunkt die Fokussieroptik zur Fokussierung des Beleuchtungsstrahlenbündels in einen Fokus ausgebildet ist, Mittel zur gesteuerten Führung des Fokus mindestens über Bereiche einer zu untersuchenden Probe vorhanden sind und die Erfassungseinheit zur Zuordnung der zu einem Erfassungszeitpunkt erfassten Detektionsstrahlung zu einem Ursprungsort der Detektionsstrahlung in der Probe ausgebildet ist. Weiterhin ist eine zweite Strahlungsquelle zur Bereitstellung einer Abregungsstrahlung

vorhanden, wobei die Abregungsstrahlung zusammen mit der Beleuchtungsstrahlung in den Fokus gerichtet oder in den Fokus richtbar ist.

Die zweite Strahlungsquelle ist, gegebenenfalls zusammen mit der zweiten Strahlungsquelle nachgeordneten optischen Elementen, zur Bereitstellung zirkular polarisierten Lichts als Abregungsstrahlung ausgebildet.

Der optische Modenschalter ist beispielsweise durch einen optischen Modulator und/oder ein Phasenelement gebildet.

Der optische Modulator ist beispielsweise ein akusto-optischer Modulator (AOM), ein akusto-optisches einstellbares Filter (AOTF) oder ein elektro-optischer Modulator (EOM).

Das Phasenelement ist beispielsweise als eine Phasenplatte ausgebildet, die unterschiedlich polarisationsändernde Bereiche aufweist.

Das Phasenelement ist vorzugsweise in einer Objektivpupille angeordnet.

Das Mikroskop weist in einer weiteren möglichen Ausführung mindestens ein Mittel zur Demodulation der Detektionsstrahlung, insbesondere in einem Strahlengang der Detektionsstrahlung (Detektionsstrahlengang) auf, das beispielsweise in Form eines elektronischen Mittels, insbesondere als eine lock-in Verstärkung ausgebildet ist.

In einer weiteren Ausführung des Mikroskops ist in mindestens einem Abregungsstrahlengang eines Abregungsstrahlenbündels der Abregungsstrahlung wenigstens ein strahllenkendes Mittel angeordnet, mittels dem das Abregungsstrahlenbündel zusammen mit dem Beleuchtungsstrahlenbündel in den Fokus gerichtet oder richtbar ist. Ein strahllenkendes Mittel ist beispielsweise ein Spiegel, eine Anordnung mehrerer Spiegel wie zum Beispiel ein Mikrospiegelarray, eine für wenigstens einen Wellenlängenanteil auftreffender Abregungsstrahlung reflektierende Oberfläche und/oder Kombinationen der genannten strahllenkenden Mittel.

In dem Strahlengang des Abregungsstrahlenbündels ist in weiteren Ausführungen des Mikroskops mindestens ein strahlbeeinflussendes Mittel angeordnet, durch das eine räumliche Verteilung des Abregungsstrahlenbündels im Fokus einstellbar ist. Dabei ist die räumliche Verteilung des Abregungsstrahlenbündels von einer räumlichen Verteilung des Anregungsstrahlenbündels im Fokus abweichend einstellbar.

Das strahlbeeinflussende Mittel ist in einer möglichen Ausführung des Mikroskops ein Spiralphasenelement. Durch dieses ist vorteilhaft eine sogenannte Donut-Mode des Abregungsstrahlenbündels erzeugbar, bei dem um die optische Achse, also im Zentrum des Abregungsstrahlenbündels, eine Nullstelle auftritt (siehe auch Fig. 1). Weitere mögliche strahlbeeinflussende Mittel sind Top-HatPhasenelemente und räumliche Modulatoren für Licht (spatial light modulator, SLM).

Generell kann der Polarisationszustand zeitlich beispielsweise entweder sinusförmig oder rechteckförmig oder in einer anderen vorteilhaften Wellenform variiert werden. Hierdurch wird der Übergang zwischen den räumlichen Feldverteilungen im Fokus des Mikroskops zeitlich verschieden beeinflusst.

Die Vorteile des erfindungsgemäßen Mikroskopieverfahrens und des erfindungsgemäßen Mikroskops bestehen in einer Erhöhung der Eindringtiefe durch Reduzierung des außerfokalen Streulichts, einer Verbesserung des optischen Schneidens (Sectioning) durch Reduzierung des Fluoreszenzvolumens und in einer Erhöhung der optischen Auflösung.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1a ein Ausführungsbeispiel der zeitlichen Fokusmodulation mit einer Donut- beziehungsweise einer Nullstellenmode gemäß dem Stand der Technik;

Fig. 1b ein Ausführungsbeispiel der zeitlichen Fokusmodulation mit einer Airy-Mode gemäß dem Stand der Technik;

Fig. 2 ein Ausführungsbeispiel eines zur Fokusmodulation ausgebildeten Mikroskops gemäß den Stand der Technik;

Fig. 3 Ausführungsbeispiele einer λ/2-Phasenplatte gemäß dem Stand der Technik und

Fig. 4 eine schematische Darstellung eines ersten Ausführungsbeispiels eines erfindungsgemäßen Mikroskops.

In den Fig. 1a und Fig. 1b ist ein aus dem Stand der Technik bekanntes zeitliches Schalten zwischen zwei Fokuszuständen (Moden) dargestellt.

Der in der Fig. 1a dargestellte Querschnitt einer Donut-Mode DM beziehungsweise einer Nullstellen-Mode NM einer Beleuchtungsstrahlung 4 (siehe auch Fig. 2 und 4) weist in seinem Zentrum, das der optischen Achse eines Beleuchtungsstrahlenbündels 5 (siehe Fig. 2 und 4) entspricht, eine Nullstelle auf. Auf der Abszisse ist die jeweilige Position in der Fokusebene abgetragen während die Ordinate die zugehörige Intensität der Beleuchtungsstrahlung 4 angibt.

Die Fig. 1b zeigt eine Airy-Mode AM, die auch als (Beugungs-)Scheibchen-Mode bezeichnet wird.

Bei der Ausführung der Fokusmodulation wird lediglich in einem Fokus 9 (siehe Fig. 2 und 5) eine Modulation der Fluoreszenz bewirkt.

In der Fig. 2 ist ein aus dem Stand der Technik, insbesondere aus der WO 2013/0170940 A1, bekanntes Ausführungsbeispiel eines Mikroskops 1 schematisch dargestellt.

Von einer ersten Strahlungsquelle 3 ist eine Beleuchtungsstrahlung 4 mit einer Airy-Mode AM erzeugt und mittels einer nicht näher dargestellten Optik als ein Beleuchtungsstrahlenbündel 4.1 geformt und entlang einer optischen Achse (beide durch eine unterbrochene Linie symbolisiert) geführt. Das

Beleuchtungsstrahlenbündel 4.1 wird in einen optischen Modenschalter 6, der durch einen im Beleuchtungsstrahlengang 5 des Beleuchtungsstrahlenbündels 4.1 angeordneten elektro-optischen Modulator EOM und einem passiven Phasenelement PP gebildet ist, moduliert. Das Phasenelement PP steht in Wirkverbindung mit dem elektro-optischen Modulator EOM, der durch eine entsprechende Ansteuerung eine schnelle Drehung der Polarisationsrichtung der Beleuchtungsstrahlung 4 des einfallenden Beleuchtungsstrahlenbündel 4.1, meist eines linear polarisierten Laserstrahls, bewirkt.

Zwischen dem elektro-optischen Modulator EOM und dem Phasenelement PP ist optional ein Übertragungselement 19 vorhanden, das beispielsweise als eine polarisationserhaltende Faser ausgebildet ist. Alternativ ist eine Freiraum-Strahlführung realisiert und kein Übertragungselement 19 vorhanden.

Nach dem Durchgang des Beleuchtungsstrahlenbündel 4.1 durch das Phasenelement PP verläuft das Beleuchtungsstrahlenbündel 4.1, über eine nicht dargestellte Scaneinheit 7 (siehe Fig. 4) zu einem Objektiv 2, mittels dem das Beleuchtungsstrahlenbündel 4.1 in einen Fokus 9 in einer Probe 10 fokussiert ist. Infolge einer halbseitigen Phasenänderung durch das Phasenelement PP erfährt die Beleuchtungsstrahlung 4 des Beleuchtungsstrahlenbündels 4.1 eine Fokusmodulation.

In Abhängigkeit der aktuellen Fokusmodulation ist das Beleuchtungsstrahlenbündel 4.1 im Fokus 9 in der Nullstellen-Mode NM oder in der Airy-Mode AM ausgebildet. Aufgrund der räumlichen Verteilung der Beleuchtungsstrahlung 4 im Fokus 9 (Feld) wird auch von einer Feldmodulation gesprochen.

Das Phasenelement PP ist beispielsweise als Phasenplatte ausgebildet, von der in der Fig. 3 beispielhaft vier Phasenelemente PP_1 bis PP_4 dargestellt sind, die in weiteren Ausführungen auch andere Geometrien aufweisen können.

Die Phasenelemente PP_1 bis PP_4 bestehen jeweils aus einer Kombination eines doppelbrechenden Kristalls und einer bezüglich der Phase polarisationsrichtungsunabhängigen Komponente, beispielweise aus Glas.

Dargestellt sind die Phasenelemente PP_1 bis PP_4 in Form geteilter Phasenplatten, insbesondere als λ/2-Platten. Die Phasenplatten sind so ausgerichtet, dass die schnelle Richtung des Kristalls, durch den eine λ/2-Veränderung der Polarisation bewirkt ist, vorteilhaft parallel, senkrecht oder in einem weiteren optimierten Winkel zur Polarisation der auf das Phasenelement PP fallenden Beleuchtungsstrahlung 4 verläuft.

In der Fig. 3 sind verschiedene Modifikationen des Phasenelements PP dargestellt. So ist eine halbseitige Teilung in einen λ/2-Bereich λ/2 und einen Bereich aus Glas G in dem ersten Phasenelement PP_1, eine Viertelteilung in gegenüberliegende λ/2-Bereiche λ/2 in Form von Vierteln und Viertel aus Glas G in dem zweiten Phasenelement PP_2, ein außenliegender ringfömiger λ/2-Bereich λ/2 und ein Kern aus Glas G in dem dritten Phasenelement PP_3 sowie ein außenliegender Bereich aus Glas G und ein innenliegender λ/2-Bereich λ/2 (Kern) in dem vierten Phasenelement PP_4 ausgebildet. Statt Glas können auch amorphes Quarz (Suprasil) oder andere nicht doppelbrechende Materialien verwendet sein.

In dem ersten Phasenelement PP_1 ist beispielhaft die Orientierung der außerordentlichen Achse des jeweiligen λ/2-Bereichs des Phasenelements PP durch einen Pfeil veranschaulicht. Tritt eine parallel zu dieser Pfeilrichtung polarisierte Strahlung, beispielsweise die Beleuchtungsstrahlung 4, durch das erste Phasenelement PP_1, wird im λ/2-Bereich λ/2 eine Phasenverschiebung um eine halbe Wellenlänge relativ zum Bereich aus Glas G erzeugt. Ist die Polarisation der Strahlung hingegen senkrecht zur Pfeilrichtung orientiert, wird keine relative Phasenverzögerung erzeugt.

Es können beispielsweise auch nematische Kristalle oder Aufbauten, die über eine Wegaufteilung eine unterschiedliche Polarisation erzeugen, verwendet werden. Die Wege werden zum Beispiel durch Schalten eines AOM oder eines AOTF (AOTF =

acousto-optic tunable filter; einstellbares akusto-optischer Filter) schnell gewechselt, so dass es zur gewünschten Veränderung der Polarisation kommt.

Die in den Fig. 1 bis 3 dargestellten Elemente und die zu den Fig. 1 bis 3 beschriebenen Ausführungen und Ausgestaltungen können auch für ein erfindungsgemäßes Mikroskop 1 beziehungsweise für ein erfindungsgemäßes Mikroskopieverfahren verwendet sein.

In der Fig. 4 ist schematisch ein Ausführungsbeispiel eines erfindungsgemäßen Mikroskops 1 dargestellt.

Das Mikroskop 1 weist eine erste Strahlungsquelle 3 zur Bereitstellung einer Beleuchtungsstrahlung 4, die mittels einer nicht näher dargestellten Optik, beispielsweise mittels einer Kollimationsoptik und/oder mittels Linsen und/oder Spiegeln, in ein Beleuchtungsstrahlenbündel 4.1 geformt und entlang einer optischen Achse des Mikroskops 1 gerichtet und geführt ist. Entlang der optischen Achse sind ein elektro-optischer Modulator EOM und ein Phasenelement PP in Form einer Phasenplatte angeordnet, durch die ein optischer Modulator 6 gebildet ist.

Zwischen elektro-optischem Modulator EOM und Phasenelement PP ist ein Übertragungselement 19 in Form einer polarisationserhaltenden Faser vorhanden.

In weiteren Ausführungen des Mikroskops 1 ist nur der elektro-optische Modulator EOM oder das Phasenelement PP angeordnet. Das Übertragungselement 19 ist optional und kann in weiteren Ausführungen des Mikroskops 1 anders gestaltet sein oder fehlen.

Der optische Modenschalter 6 beziehungsweise der elektro-optische Modulator EOM oder das Phasenelement PP dienen zur zeitlichen Modulierung der Beleuchtungsstrahlung 4 des Beleuchtungsstrahlungsbündels 4.1 und deren Schaltung zwischen mindestens zwei Moden. Weiterhin ist eine Fokussieroptik, vereinfachend dargestellt durch ein Objektiv 2, zur Fokussierung des Beleuchtungsstrahlenbündels 4.1 in einen Fokus 9 vorhanden. Das Objektiv 2 ist zur

Fokussierung des Beleuchtungsstrahlenbündels 4.1 in einen Fokus 9 beziehungsweise ein sehr kleines Fokusvolumen, ausgebildet.

Weiterhin ist eine zweite Strahlungsquelle 14 zur Bereitstellung einer Abregungsstrahlung 7 vorhanden, wobei die Abregungsstrahlung 7 zusammen mit der Beleuchtungsstrahlung 4 in den Fokus 9 gerichtet oder in den Fokus 9 richtbar ist.

Die Abregungsstrahlung 7 wird mittels der zweiten Strahlungsquelle 14 zirkular polarisiert mit einer Airy-Mode AM bereitgestellt, mittels einer nicht näher dargestellten Optik zu einem Abregungsstrahlenbündel 7.1 geformt und entlang eines Abregungsstrahlengangs 8 gerichtet und geführt. In dem Abregungsstrahlengang 8 ist ein strahllenkendes Element 12 in Form eines gesteuert verstellbaren Spiegels und ein strahlveränderndes Element 13 in Form eines Spiralphasenelements angeordnet. Das Abregungsstrahlenbündel 7.1 ist mittels des dichroitischen Strahlteilers 11 entlang der optischen Achse des Mikroskops 1 reflektiert und zusammen mit dem Beleuchtungsstrahlenbündel 4.1 entlang der optischen Achse des Mikroskops 1 in den Fokus 9 gerichtet oder richtbar.

Durch Wirkung des strahlverändernden Elements 13 wird die Mode der Abregungsstrahlung 7 des Abregungsstrahlenbündels 7.1 verändert, insbesondere aus einer Gauß-Mode oder einer Airy-Mode AM in einer Donut-Mode DM überführt.

Die Abregungsstrahlung 7 wirkt in dem Fokus 9 der Entstehung einer Detektionsstrahlung 20 entgegen. Da die Abregungsstrahlung 7 im Donut-Mode DM in den Fokus 9 gerichtet ist, kann in dem Bereich ihrer ringförmigen Verteilung um die optische Achse keine Detektionsstrahlung 20 durch die Beleuchtungsstrahlung 4 bewirkt werden. Lediglich in einem eng umgrenzten Bereich um die optische Achse, in der keine Abregungsstrahlung 7 in den Fokus 9 gerichtet ist, wird mittels der Beleuchtungsstrahlung 4 die Detektionsstrahlung 20 bewirkt, falls sich zu einem Erfassungszeitpunkt in dem Fokus 9 mindestens ein durch die Beleuchtungsstrahlung 4 anregbares Atom beziehungsweise ein anregbares Molekül und/oder ein Molekül mit einer anregbaren Gruppe, beispielsweise einem Fluorophor, befindet. Durch die Position eines solchen Moleküls in der Probe ist der

Ursprungsort der Detektionsstrahlung 20 gegeben, der durch eine Fokusposition des Objektivs 2 und eine Fokustiefe erfasst und beschrieben wird.

Zur Erfassung der aus einem Ursprungsort in dem Fokus 9 stammenden Detektionsstrahlung 20 zu einem Erfassungszeitpunkt ist eine Erfassungseinheit 18 vorhanden, die als eine CCD-Kamera, eine CMOS-Kamera oder ein Photoelektronenvervielfacher (photomultiplier tube, PMT) ausgebildet ist.

Die Erfassungseinheit 18 ist zur Zuordnung der zu einem Erfassungszeitpunkt erfassten Detektionsstrahlung 20 zu dem Ursprungsort der Detektionsstrahlung 20 in der Probe 10 ausgebildet.

Die Detektionsstrahlung 20 wird über einen nicht näher dargestellten Detektionsstrahlengang erfasst, in dem auch ein Demodulator 17 angeordnet ist.

Zur gesteuerten Führung des Fokus 9 mindestens über Bereiche einer zu untersuchenden Probe 10 ist eine Scaneinheit 15 vorhanden, die ebenso wie der Demodulator 17 mit einer Steuerungseinheit 16 in einer zum Austausch von Daten, insbesondere von Steuerdaten, geeigneten Verbindung steht.

Die Steuerungseinheit 16 steht außerdem mit dem optischen Modulator 6 in Verbindung, um mindestens eines der Elemente des optischen Modulators 6 anzusteuern.

Die mittels der Fokusmodulation, insbesondere unter Verwendung des erfindungsgemäßen Mikroskops 1, erreichte Modulation von Beleuchtungsstrahlung 4 und/oder Abregungsstrahlung 7 ist in hochauflösenden punktscannenden Verfahren beispielsweise zur Anregung eines Moleküls verwendbar, bei dem das Atom aus einem Energieniveau eines Grundzustands S0 auf ein Energieniveau eines angeregten Zustands S1 gehoben wird. Aus dem angeregten Zustand S1 kann das Atom unter spontaner Emission einer Detektionsstrahlung auf ein niedrigeres Energieniveau springen. Die Fokusmodulation kann weiter dazu verwendet werden, um stimulierte Emissionen angeregter Moleküle hervorzurufen.

Liegen Moleküle vor, die durch Strahlung zwischen verschiedenen Zuständen, insbesondere zwischen Zuständen in denen die Moleküle anregbar oder nicht-anregbar beziehungsweise fluoreszenzfähig oder nicht-fluoreszenzfähig sind, geschalten werden können, kann die Fokusmodulation zusätzlich oder alternativ zum Schalten dieser Moleküle verwendet werden.

Bezugszeichen

1	Mikroskop
2	Objektiv
3	erste Strahlungsquelle
4	Beleuchtungsstrahlung
4.1	Beleuchtungsstrahlenbündel
5	Beleuchtungsstrahlengang
6	optischer Modenschalter
7	Abregungsstrahlung
7.1	Abregungsstrahlenbündel
8	Abregungsstrahlengang
9	Fokus
10	Probe
11	Strahlteiler
12	strahllenkendes Element
13	strahlbeeinflussendes Element
14	zweite Strahlungsquelle
15	Scaneinheit
16	Steuerungseinheit
17	Demodulator
18	Erfassungseinheit
19	Übertragungselement
20	Detektionsstrahlung
PP	Phasenelement
PP_1	erstes Phasenelement
PP_2	zweites Phasenelement
PP_3	drittes Phasenelement
PP_4	viertes Phasenelement
EOM	elektro-optischer Modulator
AM	Airy-Mode
DM	Donut-Mode
NM	Nullstellen-Mode
G	Glas
λ/2	λ/2-Bereich

Patentansprüche

1. Mikroskopieverfahren, bei dem eine Beleuchtungsstrahlung (4) erzeugt und in einen Fokus (9) gerichtet wird, wobei die Beleuchtungsstrahlung (4) moduliert und zeitlich zwischen mindestens zwei Moden (AM, NM) geschaltet wird, so dass eine Fokusmodulation bewirkt wird, bei der in dem Fokus (9) zeitlich Felder mit voneinander verschiedenen Moden (AM, NM) der Beleuchtungsstrahlung (4) erzeugt werden, dadurch gekennzeichnet, dass der Fokus (9) mindestens über Bereiche einer zu untersuchenden Probe (10) geführt wird, wobei durch die Beleuchtungsstrahlung (4) in dem Fokus (9) an mindestens einem Ursprungsort eine Detektionsstrahlung (20) in der Probe (10) bewirkt wird oder bewirkbar ist und die Detektionsstrahlung (20) dem mindestens einen Ursprungsort zugeordnet erfasst wird und zusätzlich zur Beleuchtungsstrahlung (4) mindestens ein Abregungsstrahlenbündel (7.1) einer Abregungsstrahlung (7) in den Fokus gerichtet wird, wobei durch die Abregungsstrahlung (7) das Bewirken der Detektionsstrahlung (20) in dem von der Abregungsstrahlung (7) beleuchteten Bereich verhindert wird.

2. Mikroskopieverfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Beleuchtungsstrahlung (4) über den Querschnitt des Beleuchtungsstrahlenbündels (4.1) moduliert wird.

3. Mikroskopieverfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Beleuchtungsstrahlung (4) und die Abregungsstrahlung (7) mit voneinander abweichenden räumlichen Verteilungen in den Fokus (9) gerichtet werden.

4. Mikroskopieverfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Fokusmodulation in ein STED-Verfahren integriert ist.

5. Mikroskopieverfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass ein weiteres Abregungsstrahlenbündel erzeugt, auf Bereiche der zu untersuchenden Probe (10) gerichtet und Detektionsstrahlung erfasst wird, wobei die Beleuchtung des jeweiligen Probenbereichs mit dem weiteren

Abregungsstrahlenbündel zeitlich versetzt nach der Beleuchtung mit dem ersten Abregungsstrahlenbündel erfolgt und der zeitliche Versatz dabei so bemessen ist, dass die Aussendung von Detektionsstrahlung durch die aktuell angeregten Probenbereiche, beispielsweise durch dort angeregte Fluorophore, bereits abgeklungen ist und nur noch unerwünschte Detektionsstrahlung von unvollständig abgeregten Probenbereichen und/oder spontan (erneut) angeregten Probenbereichen auftritt.

6. Mikroskopieverfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Fokusmodulation in ein RESOLFT-Verfahren integriert ist.

7. Mikroskopieverfahren nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, dass mittels der Fokusmodulation ein mittels der Beleuchtungsstrahlung (4) anregbares Molekül aus einem Grundzustand in einen angeregten Zustand versetzt wird.

8. Mikroskopieverfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass mittels der Fokusmodulation ein mittels der Beleuchtungsstrahlung (4) in den angeregten Zustand versetztes Molekül zur Emission der Detektionsstrahlung (20) stimuliert wird.

9. Mikroskopieverfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass mittels der Fokusmodulation ein mittels der Beleuchtungsstrahlung (4) einstellbarer Aktivierungszustand eines Moleküls eingestellt wird.

10. Mikroskop (1) mit einer ersten Strahlungsquelle (3) zur Bereitstellung einer Beleuchtungsstrahlung (4), einem optischen Modenschalter (6) in dem Beleuchtungsstrahlengang (5) eines Beleuchtungsstrahlenbündels (4.1) der Beleuchtungsstrahlung (4) zu deren zeitlichen Modulierung und Schaltung zwischen mindestens zwei Moden (AM, NM), einer Fokussieroptik mit einem Objektiv (2) zur Fokussierung des Beleuchtungsstrahlenbündels (4.1) in einen Fokus (9) und einer Erfassungseinheit (18) zur Erfassung einer aus einem Ursprungsort in dem Fokus (9) stammenden Detektionsstrahlung (20) zu einem Erfassungszeitpunkt, dadurch gekennzeichnet, dass

- das Objektiv (2) zur Fokussierung des Beleuchtungsstrahlenbündels (4.1) in einen Fokus (9) ausgebildet ist,
- Mittel zur gesteuerten Führung des Fokus (9) mindestens über Bereiche einer zu untersuchenden Probe (10) vorhanden sind,
- die Erfassungseinheit (18) zur Zuordnung der zu einem Erfassungszeitpunkt erfassten Detektionsstrahlung (20) zu einem Ursprungsort der Detektionsstrahlung in der Probe (10) ausgebildet ist und
- eine zweite Strahlungsquelle (14) zur Bereitstellung einer Abregungsstrahlung (7) vorhanden ist, wobei die Abregungsstrahlung (7) zusammen mit der Beleuchtungsstrahlung (4) in den Fokus (9) gerichtet oder in den Fokus (9) richtbar ist.

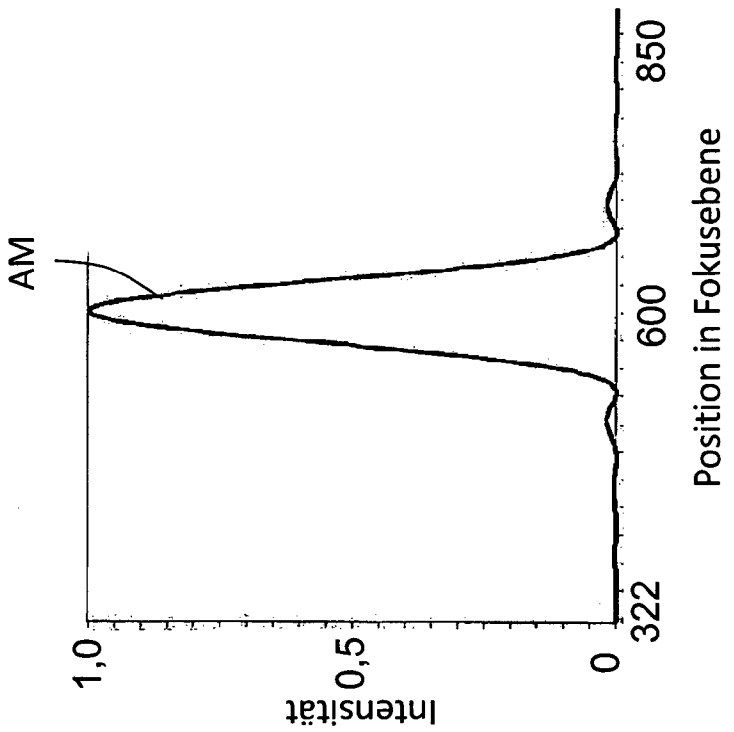
11. Mikroskop (1) nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens in einem Abregungsstrahlengang (8) eines Abregungsstrahlenbündels (7.1) der Abregungsstrahlung (7) strahllenkende Mittel (12) angeordnet sind, mittels denen das Abregungsstrahlenbündel (7.1) in den Fokus (9) gerichtet oder richtbar ist.

12. Mikroskop (1) nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass in dem Abregungsstrahlengang (7.1) mindestens ein strahlbeeinflussendes Mittel (13) angeordnet ist, durch das eine räumliche Verteilung des Abregungsstrahlenbündels (7.1) im Fokus (9) einstellbar ist, wobei die räumliche Verteilung des Abregungsstrahlenbündels (7.1) von einer räumlichen Verteilung des Beleuchtungsstrahlenbündels (4.1) im Fokus (9) abweicht.

13. Mikroskop (1) nach einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die zweite Strahlungsquelle (14) zur Bereitstellung zirkular polarisierten Lichts ausgebildet ist.

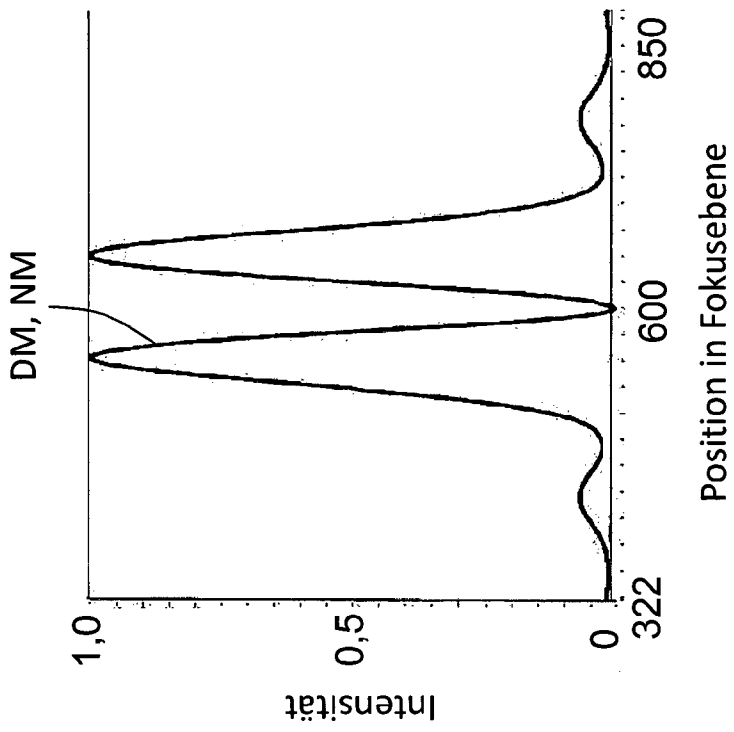
14. Mikroskop (1) nach einem der Ansprüche 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass das strahlbeeinflussende Mittel (13) ein Spiralphasenelement, ein Top-Hat Phasenelement oder ein SLM ist.

15. Mikroskop (1) nach einem der Ansprüche 9 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass der optische Modenschalter (6) ein elektro-optischer Modulator (EOM) und/oder ein Phasenelement (PP) ist.



- Stand der Technik -

Fig. 1b



- Stand der Technik -

Fig. 1a

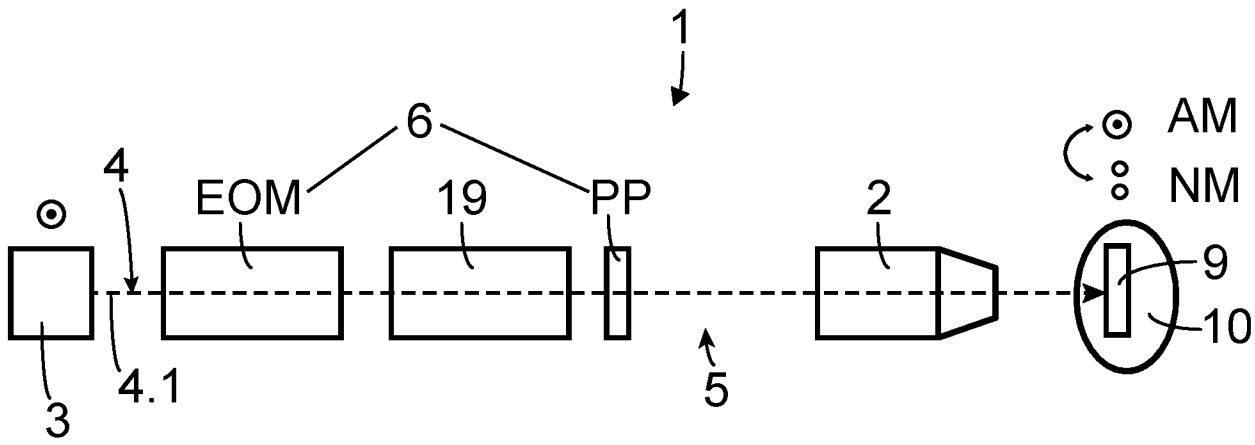


Fig. 2

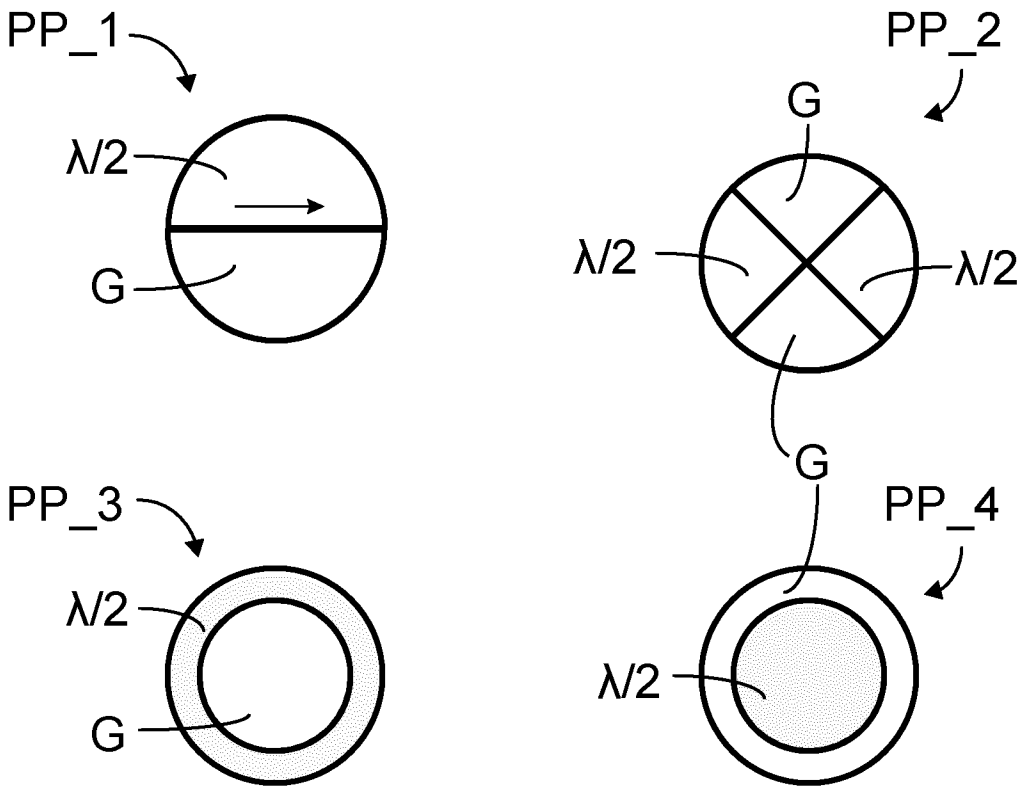


Fig. 3

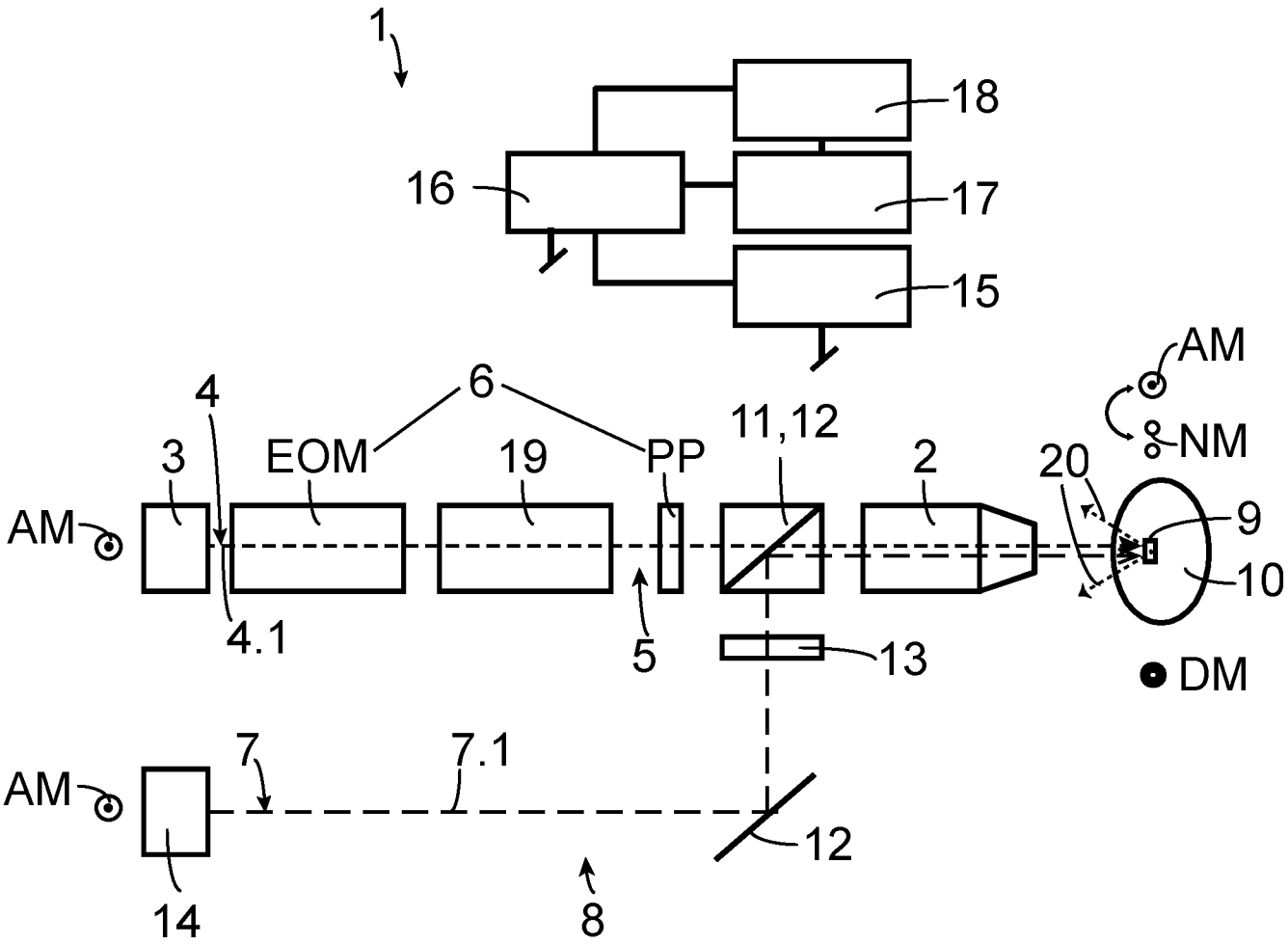

1
18
16
17
15
AM
4
6
11,12
NM
3
EOM
19
PP
2
20
AM
9
10
4.1
5
13
DM
7
7.1
AM
12
14
8

Fig. 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/065268

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G02B21/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G02B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/083665 A1 (UNIV BRAUNSCHWEIG TECH [DE]) 13 June 2013 (2013-06-13)	1-4,6-15
A	the whole document	5

X	WO 2013/170940 A1 (ZEISS CARL MICROSCOPY GMBH [DE]) 21 November 2013 (2013-11-21) cited in the application the whole document	1-4,6,7, 10-12,15

A	EP 2 437 096 A2 (ZEISS CARL MICROIMAGING GMBH [DE]) 4 April 2012 (2012-04-04) abstract; figures	1-15

	-/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
8 September 2017	20/09/2017

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Windecker, Robert

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/065268

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TINA ZÜCHNER ET AL: "Lichtmikroskopie mit Doughnut-Moden: ein Konzept zur Detektion, Charakterisierung und Manipulation einzelner Nanoobjekte", ANGEWANDTE CHEMIE (INTERNATIONAL ED. IN ENGLISH), vol. 123, no. 23, 27 May 2011 (2011-05-27) , pages 5384-5405, XP055052724, ISSN: 0044-8249, DOI: 10.1002/ange.201005845 the whole document -----	1-15

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2017/065268

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013083665 A1	13-06-2013	CA 2858270 A1	13-06-2013
		DE 102011087770 A1	27-06-2013
		EP 2788810 A1	15-10-2014
		US 2014367590 A1	18-12-2014
		WO 2013083665 A1	13-06-2013
WO 2013170940 A1	21-11-2013	DE 102012010207 A1	21-11-2013
		JP 2015517687 A	22-06-2015
		US 2015116807 A1	30-04-2015
		WO 2013170940 A1	21-11-2013
EP 2437096 A2	04-04-2012	DE 102011013613 A1	05-04-2012
		EP 2437096 A2	04-04-2012
		JP 5911683 B2	27-04-2016
		JP 2012078802 A	19-04-2012
		JP 2016118811 A	30-06-2016
		US 2012268812 A1	25-10-2012
		US 2017068082 A1	09-03-2017

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2017/065268

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. G02B21/00
ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
G02B

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 2013/083665 A1 (UNIV BRAUNSCHWEIG TECH [DE]) 13. Juni 2013 (2013-06-13)	1-4,6-15
A	das ganze Dokument	5
X	WO 2013/170940 A1 (ZEISS CARL MICROSCOPY GMBH [DE]) 21. November 2013 (2013-11-21) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-4,6,7, 10-12,15
A	EP 2 437 096 A2 (ZEISS CARL MICROIMAGING GMBH [DE]) 4. April 2012 (2012-04-04) Zusammenfassung; Abbildungen	1-15

-/--

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen [X] Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
8. September 2017	20/09/2017

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Windecker, Robert

1

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2017/065268

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	TINA ZÜCHNER ET AL: "Lichtmikroskopie mit Doughnut-Moden: ein Konzept zur Detektion, Charakterisierung und Manipulation einzelner Nanoobjekte", ANGEWANDTE CHEMIE (INTERNATIONAL ED. IN ENGLISH), Bd. 123, Nr. 23, 27. Mai 2011 (2011-05-27) , Seiten 5384-5405, XP055052724, ISSN: 0044-8249, DOI: 10.1002/ange.201005845 das ganze Dokument -----	1-15

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2017/065268

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2013083665 A1	13-06-2013	CA 2858270 A1	13-06-2013
		DE 102011087770 A1	27-06-2013
		EP 2788810 A1	15-10-2014
		US 2014367590 A1	18-12-2014
		WO 2013083665 A1	13-06-2013
WO 2013170940 A1	21-11-2013	DE 102012010207 A1	21-11-2013
		JP 2015517687 A	22-06-2015
		US 2015116807 A1	30-04-2015
		WO 2013170940 A1	21-11-2013
EP 2437096 A2	04-04-2012	DE 102011013613 A1	05-04-2012
		EP 2437096 A2	04-04-2012
		JP 5911683 B2	27-04-2016
		JP 2012078802 A	19-04-2012
		JP 2016118811 A	30-06-2016
		US 2012268812 A1	25-10-2012
		US 2017068082 A1	09-03-2017