



(19)
 Bundesrepublik Deutschland
 Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2005 034 443 A1** 2007.02.22

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2005 034 443.7**

(22) Anmeldetag: **22.07.2005**

(43) Offenlegungstag: **22.02.2007**

(51) Int Cl.⁸: **G02B 21/00** (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)

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

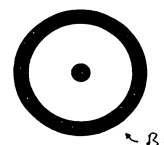
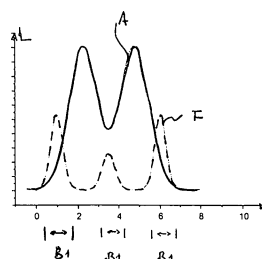
(74) Vertreter:
GEYER, FEHNERS & PARTNER (G.b.R.), 80687 München

(72) Erfinder:
Wolleschensky, Ralf, Dipl.-Phys., 99510 Apolda, DE; Kempe, Michael, Dr., 07751 Jena, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Auflösungsgesteigerte Lumineszenz-Mikroskopie**

(57) Zusammenfassung: Es wird ein auflösungsgesteigertes Lumineszenz-Mikroskopieverfahren beschrieben, bei dem eine Probe (24) durch Einstrahlung von Anregungsstrahlung (A) zur Lumineszenz und damit zur Emission von bestimmter Lumineszenzstrahlung (F) angeregt wird und ein Bild der lumineszierenden Probe (24) gewonnen wird, wobei die lumineszierende Probe (24) aus einem ersten Lumineszenz-Zustand (5), in dem die Anregbarkeit zur Emission der bestimmten Lumineszenzstrahlung (F) mit steigender Anregungsstrahlungsleistung bis zu einem Maximalwert (18), welcher einem Anregungsstrahlungsleistungs-Schwellwert (19) zugeordnet ist, steigt, in einen zweiten Lumineszenz-Zustand (6) überführbar ist, in dem die Probe (24) gegenüber dem ersten Zustand (5) verminderte Anregbarkeit zur Emission der bestimmten Lumineszenzstrahlung (F) aufweist, wobei die Probe (24) durch Einstrahlung von Anregungsstrahlungsleistung oberhalb des Schwellwertes (19) in den zweiten Zustand (6) bringbar ist, die Probe (24) in Teil-Bereichen in den ersten Zustand (5) und in angrenzenden Teil-Bereichen in den zweiten Zustand (6) versetzt wird, indem die Einstrahlung von Anregungsstrahlung (A) mit einer Anregungsstrahlungsverteilung erfolgt, die zumindest ein örtliches Leistungsmaximum über dem Schwellwert (19) aufweist, das Bild der lumineszierenden Probe (24) Proben-Bereiche im ersten Zustand (5) und Proben-Bereiche im zweiten Zustand (6) umfaßt, wobei zum Bild der lumineszierenden Probe (24) überwiegend Proben-Bereiche im ersten ...



Beschreibung

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf die auflösungsgesteigerte Lumineszenzmikroskopie und insbesondere auf ein Verfahren, bei dem eine zu untersuchende lumineszierende Probe mit Anregungsstrahlung beleuchtet wird und ein Bild der zur Lumineszenz angeregten Probe gewonnen wird. Die Erfindung bezieht sich weiter auf ein Mikroskop zur auflösungsgesteigerten Lumineszenzmikroskopie einer Probe, das Mittel zur Anregung von Lumineszenz, die in der Probe Anregungsstrahlung einstrahlen und Mittel zur Gewinnung eines Bildes der angeregten Probe aufweist.

[0002] Ein klassisches Anwendungsgebiet der Lichtmikroskopie zur Untersuchung von biologischen Präparaten ist die Lumineszenzmikroskopie. Hierbei werden bestimmte Farbstoffe (sogenannte Phosphore oder Fluorophore) zur spezifischen Markierung von Proben, z.B. von Zellteilen, verwendet. Die Probe wird, wie erwähnt, mit Anregungsstrahlung beleuchtet und das dadurch angeregte Lumineszenzlicht mit geeigneten Detektoren erfaßt. Üblicherweise ist dazu im Lichtmikroskop ein dichroitischer Strahlteiler in Kombination mit Blockfiltern vorgesehen, die die Fluoreszenzstrahlung von der Anregungsstrahlung abspalten und eine getrennte Beobachtung ermöglichen. Durch dieses Vorgehen ist die Darstellung einzelner, verschieden gefärbter Zellteile im Lichtmikroskop möglich. Natürlich können auch mehrere Teile eines Präparates gleichzeitig mit verschiedenen, sich spezifisch an unterschiedliche Strukturen des Präparates anlagernden Farbstoffen eingefärbt werden. Dieses Verfahren bezeichnet man als Mehrfachlumineszenz. Auch kann man Proben vermessen, die per se, also ohne Farbstoffzugabe lumineszieren.

[0003] Lumineszenz wird hier, wie allgemein üblich, als Oberbegriff für Phosphoreszenz und Fluoreszenz verstanden, erfaßt also beide Prozesse.

[0004] Weiter ist es zur Probenuntersuchung bekannt, Laser-Scanning-Mikroskope (auch LSM abgekürzt) zu verwenden, die aus einem dreidimensional ausgeleuchteten Bild mittels einer konfokalen Detektionsanordnung (dann spricht man von einem konfokalen LSM) oder einer nichtlinearen Probenwechselwirkung (sogenannte Multiphotonenmikroskopie) nur diejenige Ebene wiedergeben, die sich in der Fokusebene des Objektivs befindet. Es wird ein optischer Schnitt gewonnen, und die Aufzeichnung mehrerer optischer Schnitte in verschiedenen Tiefen der Probe erlaubt es anschließend, mit Hilfe eines geeigneten Datenverarbeitungsgerätes ein dreidimensionales Bild der Probe zu generieren, das aus den verschiedenen optischen Schnitten zusammengesetzt ist. Die Laser-Scanning-Mikroskopie ist somit zur Untersuchung von dicken Präparaten geeignet.

[0005] Natürlich wird auch eine Kombination von Lumineszenzmikroskopie und Laser-Scanning-Mikroskopie verwendet, bei der eine lumineszierende Probe in verschiedenen Tiefenebenen mit Hilfe eines LSM abgebildet wird.

[0006] Prinzipiell ist die optische Auflösung eines Lichtmikroskopes, auch eines LSM, durch die physikalischen Gesetze beugungsbegrenzt. Zur optimalen Auflösung innerhalb dieser Grenzen sind spezielle Beleuchtungskonfigurationen bekannt, wie beispielsweise 4Pi-Anordnung oder Anordnungen mit Stehwellenfeldern. Damit kann die Auflösung, insbesondere in axialer Richtung gegenüber einem klassischen LSM deutlich verbessert werden. Mit Hilfe nicht-linearer Entvölkerungsprozesse kann weiter die Auflösung auf einen Faktor von bis zu 10 gegenüber einem beugungsbegrenzten konfokalen LSM angehoben werden.

Stand der Technik

[0007] Die **Fig. 1a/b** zeigen ein solches Verfahren, wie es z.B. in US 5866911 beschrieben ist. Dabei wird zur Auflösungssteigerung mit einer zwei Wellenlängen aufweisenden Lichtstrahlung gearbeitet. Die Lichtstrahlung der einen Wellenlänge wird als Anregungslichtstrahl **1** auf die zu messende Probe mittels eines Objektivs fokussiert und regt dort Lumineszenz, hier Fluoreszenz, an. Die Darstellung in den **Fig. 1a/b** zeigt zur Vereinfachung nur den eindimensionalen Fall. Die Erhöhung der Ortsauflösung erfolgt nun dadurch, daß ein Lichtstrahl **2** mit der anderen Wellenlänge in Teilbereichen den durch den Anregungslichtstrahl angeregten fluoreszierenden Zustand entvölkert. Man bezeichnet diesen Lichtstrahl deshalb auch als „Entvölkerungs-Strahlung“. Nun erfolgt die Einstrahlung z.B. so, daß sich das Hauptmaximum des Entvölkerungs-Lichtstrahls **2** und das Hauptmaximum des Anregungslichtstrahls **1** teilweise überdecken, wie es in **Fig. 1a** gut zu erkennen ist. Durch diese „Abregung“ der Probe an den Rändern des mit Anregungsstrahlung **1** beleuchteten Bereiches, sendet nur noch ein reduziertes Volumen **3** Fluoreszenz aus, wie in **Fig. 1b** gut zu sehen ist. Die Auflösung ist durch diese Volumenreduktion folglich gesteigert.

[0008] **Fig. 2a-c** zeigen drei mögliche Mechanismen, mit denen eine solche Entvölkerung erfolgen kann. In **Fig. 2a** ist der Prozeß der Abregung durch stimulierte Emission (STED) dargestellt. Die Anregungsstrahlung liegt im Fluorophor des Niveaus S1 an (Pfeil A). Die Entvölkerung des derart angeregten Niveaus S1 wird in Richtung des Grundniveaus S0 durch Lichtstrahlung mit einer Wellenlänge im Bereich der Fluoreszenzwellenlänge bewerkstelligt. Pfeil SE zeigt diese stimulierte Emission, deren Wellenlänge der der Lumineszenz (Pfeil F) fast identisch entspricht. Somit ist die Anregungswellenlänge um

den Betrag des Stokesshiftes kurzwelliger als die der Entvölkerungs-Strahlung. Die Auflösungssteigerung gemäß dieses Ansatzes benötigt also zwei unterschiedliche Lichtquellen, wie auch der Stand der Technik in Form der DE 4416558 C2 belegt.

[0009] Fig. 2b veranschaulicht einen weiteren möglichen Prozeß der Entvölkerung für das angeregte Niveau S1 (Pfeil A), indem eine Anregung in ein noch höheres Niveau S2 (Pfeil A+) erfolgt, das keine Lumineszenz mehr aussenden kann. Dieses Anheben wird im Englischen als Excited State Absorption bezeichnet, weshalb dieses Vorgehen auch mit dem Kürzel ESA belegt ist. Eine entsprechende Schilderung dieses Prozesses findet sich beispielsweise in der US 6633432. Da der Abstand der Energieniveaus in einer Probe bzw. einem Farbstoff zu höheren Niveaus hin abnimmt, verwendet man zur Entvölkerung bei dem ESA-Prozeß eine Lichtquelle mit einer geringeren Energie und damit längeren Wellenlänge, als zur Anregung. Man braucht also wiederum zwei verschiedene Lichtquellen.

[0010] Ein weiteres Verfahren zur Entvölkerung stellt für die Fluoreszenz die sogenannte Reversible Saturable Optical Fluorescence Transition dar, die z.B. in DE 10325460 A1 beschrieben und in Fig. 2c veranschaulicht ist. Dieser Ansatz verwendet zum räumlich hochauflösenden Abbilden einen Farbstoff, der mit Hilfe eines Umschaltstrahls 4 wiederholt aus einem ersten Zustand 5, in dem Fluoreszenz stattfindet, in einen zweiten Zustand 6, in dem der Farbstoff nicht fluoresziert, überführbar ist, wobei der Farbstoff aus dem zweiten Zustand 6 in den ersten Zustand 5 zurückkehren kann, wie Fig. 2c veranschaulicht. Die Probe mit dem Farbstoff wird in Teilbereichen mit dem Umschaltstrahl 4 in den zweiten Zustand 6 überführt, wobei ein definierter Bereich der Probe ausgelassen wird. Mit einem Anregungsstrahl 1 wird dann Fluoreszenzlicht 7 angeregt und anschließend registriert. Das Fluoreszenzlicht 7 stammt dann nur aus Probenvolumina, die zuvor nicht mit dem Umschaltstrahl 7 beaufschlagt wurden. Durch geeignete Überlappung von Anregungsstrahl 1 und Umschaltstrahl 4 ist das Volumen, aus dem Fluoreszenzlicht 7 emittiert wird, kleiner, als es die Auflösung des Anregungsstrahls 1 und die Schärfe der Nullstelle des Umschaltstrahls 4a priori erlaubten.

[0011] In allen drei genannten Verfahren gemäß Fig. 2a bis 2c erfolgt also die Verhinderung von Fluoreszenz durch den Einsatz von Lichtstrahlung mit einer Wellenlänge, die ungleich der Wellenlänge zur Anregung ist. Zugleich muß diese Lichtstrahlung mindestens eine scharf begrenzte örtliche Nullstelle der Strahlungsleistung aufweisen, die die endgültige Auflösung der detektierten Fluoreszenzstrahlung bestimmt. Sobald die Nullstelle nur mehr als Minimum ausgebildet ist und nicht völlig auf Null zurückgeht, verringert sich weiter die Fluoreszenzleistung und

damit die Effizienz des Verfahrens. Dies liegt z.B. bei Aberrationen der optischen Anordnung bzw. im Präparat vor.

[0012] Fig. 3 zeigt eine bekannte Vorrichtung, die eines der drei genannten Verfahren zur Auflösungssteigerung verwendet, im Beispiel der Fig. 3 den STED-Prozeß. Eine Anregungsstrahlquelle 8 erzeugt eine Airy-Verteilung in der Probe 10, mit der die Probe aus dem Grundniveau S0 in den angeregten Zustand S1 überführt wird. Die Entvölkerung des Zustands S1 erfolgt mittels einer Entvölkerungslichtquelle 11, die unter die Verwendung einer Phasenplatte 12 eine donut- oder torus-förmigen Strahlverteilung 13 in der Probe 10 hat. Die Lumineszenzstrahlung der nicht-entvölkerten d.h. nicht-abgeregten Farbstoffmoleküle wird mit Hilfe eines Detektors 14 erfaßt. Durch die Entvölkerung wird die Auflösung des Mikroskops über die Beugungsbegrenzung, die sich aus der Airy-Verteilung ergibt, hinaus gesteigert. Dies kommt durch eine verkleinerte Punktverwaschungsverteilung 15 des hochauflösenden Mikroskops im Vergleich zum konventionellen Mikroskop 16 zum Ausdruck.

[0013] Ein weiteres Verfahren zur Auflösungssteigerung wird in der EP 1157297 B1 angesprochen. Dabei sollen mittels strukturierter Beleuchtung nicht-lineare Prozesse ausgenutzt werden. Als Nichtlinearität erwähnt die Druckschrift dabei die Sättigung der Fluoreszenz. Das geschilderte Verfahren nimmt in Anspruch, durch eine strukturierte Beleuchtung eine Verschiebung des Objektraumpektrums relativ zur Übertragungsfunktion des optischen Systems zu realisieren. Konkret bedeutet die Verschiebung des Spektrums, daß Objektraumfrequenzen V_0 bei einer Raumfrequenz $V_0 - V_m$, wobei V_m die Frequenz der strukturierten Beleuchtung ist, übertragen werden. Bei gegebener durch das System maximal übertragbarer Raumfrequenz ermöglicht dies den Transfer von um die Verschiebefrequenz V_m über der maximalen Frequenz der Übertragungsfunktion liegender Raumfrequenzen des Objektes. Dieser Ansatz erfordert einen Rekonstruktionsalgorithmus zur Bilderzeugung und die Verwertung mehrerer Aufnahmen für ein Bild.

Aufgabenstellung

[0014] Der Erfindung liegt deshalb die Aufgabe zugrunde, ein Lumineszenzmikroskopieverfahren bzw. ein Lumineszenzmikroskop anzugeben, das eine Auflösungssteigerung ohne Rückgriff auf mehrere Wellenlängen bzw. ohne aufwendige Bildrekonstruktionsalgorithmen erreicht.

[0015] Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst mit einem auflösungsgesteigerten Lumineszenz-Mikroskopieverfahren, bei dem eine Probe durch Einstrahlung von Anregungsstrahlung zur Emission von

bestimmter Lumineszenzstrahlung angeregt wird und ein Bild der lumineszierenden Probe gewonnen wird, wobei die lumineszierende Probe aus einem ersten Lumineszenz-Zustand, in dem die Anregbarkeit zur Emission der bestimmten Lumineszenzstrahlung mit steigender Anregungsstrahlungsleistung bis zu einem Maximalwert, welcher einem Anregungsstrahlungsleistungs-Schwellwert zugeordnet ist, steigt, in einen zweiten Lumineszenz-Zustand überführbar ist, in dem die Probe gegenüber dem ersten Zustand verminderte Anregbarkeit zur Emission der bestimmten Lumineszenzstrahlung aufweist, wobei die Probe durch Einstrahlung von Anregungsstrahlungsleistung oberhalb des Schwellwertes in den zweiten Zustand bringbar ist, die Probe in Teil-Bereichen in den ersten Zustand und in angrenzenden Teil-Bereichen in den zweiten Zustand versetzt wird, indem die Einstrahlung von Anregungsstrahlung mit einer Anregungsstrahlungsverteilung erfolgt, die zumindest ein örtliches Leistungsmaximum über dem Schwellwert und zumindest ein örtliches, lokales Leistungsminimum unter dem Schwellwert aufweist, das Bild der lumineszierenden Probe Proben-Bereiche im ersten Zustand und Proben-Bereiche im zweiten Zustand umfaßt, wobei zum Bild der lumineszierenden Probe überwiegend Proben-Bereiche im ersten Zustand beitragen und dadurch das Bild eine gegenüber der Anregungsstrahlungsverteilung gesteigerte Ortsauflösung hat.

[0016] Die Aufgabe wird weiter gelöst mit einem Mikroskop zur auflösungsgesteigerten Lumineszenz-Mikroskopie, das Mittel aufweist zur Anregung von Lumineszenz, die Anregungsstrahlung auf die Probe einstrahlen und damit die Emission bestimmter Lumineszenzstrahlung in der Probe anregen, Mittel zur Gewinnung eines Bildes der lumineszierenden Probe, wobei die Mittel zur Anregung die Anregungsstrahlung mit einer bestimmten Anregungsstrahlungsverteilung einstrahlen, die zumindest ein örtliches Leistungsmaximum aufweist, das über einem Schwellwert liegt, und zumindest ein örtliches, lokales Leistungsminimum aufweist, das unter dem Schwellwert liegt, wobei der Schwellwert zwei Lumineszenz-Regionen der Probe trennt, eine erste, bei Anregungsstrahlungsleistungen unterhalb des Schwellwertes vorliegende Zustands-Region, in der die Anregbarkeit zur Emission der bestimmten Lumineszenzstrahlung mit steigender Anregungsstrahlungsleistung bis zu einem Maximalwert, welcher am Schwellwert erreicht wird, steigt, und einer zweiten bei und/oder nach Anregungsstrahlungsleistungen oberhalb des Schwellwertes vorliegende Zustands-Region, in der die Probe eine gegenüber der ersten Region verminderte Anregbarkeit zur Emission der bestimmten Lumineszenzstrahlung aufweist, und wobei die Mittel zur Bildgewinnung Proben-Bereiche in der ersten Region, die mit Anregungsstrahlungsleistung unterhalb des Schwellwertes bestrahlt wurden, und Proben-Bereiche in der zweiten Region,

die mit Anregungsstrahlungsleistung oberhalb des Schwellwertes bestrahlt wurden, erfassen, wobei zum Bild der Probe überwiegend Proben-Bereiche in der ersten Region beitragen und dadurch das Bild eine gegenüber der Anregungsstrahlungsverteilung gesteigerte Ortsauflösung hat.

[0017] Es wird also eine Probe verwendet bzw. das Mikroskop ist für eine entsprechende Probe ausgelegt, deren lumineszierendes Material sich im wesentlichen in zwei Zuständen befinden kann. In einem ersten Zustand, der sich bei der Einstrahlung von Anregungsstrahlungsleistung unterhalb des Schwellwertes einstellt und der mittels der Mittel zur Anregung erreicht wird, strahlt das Material Lumineszenzstrahlung ab, deren Leistung in der Regel mit der Anregungsstrahlungsleistung zunimmt. In einem zweiten Zustand, der bei Einstrahlung von Anregungsstrahlungsleistung oberhalb des Schwellwertes vorliegt, erfolgt entweder gar keine oder verminderte Lumineszenz. Auch können gegenüber dem ersten Zustand geänderte Absorptionseigenschaften und/oder Lumineszenzstrahlungsemission mit anderen optischen Eigenschaften als im ersten Zustand, beispielsweise mit anderer spektraler Zusammensetzung, Polarisierung oder Lebensdauer, erfolgen. Bezogen auf die Probe, die sich natürlich aus einer Vielzahl von fluoreszierenden oder auto-fluoreszierenden Molekülen zusammensetzt, ergeben sich zwei Zustandsregionen. In einer ersten Zustandsregion ist die Mehrzahl der Moleküle im ersten Zustand, in einer zweiten Zustandsregion ist die Mehrzahl im zweiten Zustand. Erfindungsgemäß werden nun Proben-Bereiche in die erste Zustandsregion (oder kurz Zustand) und andere Proben-Bereiche in die zweite Zustandsregion (oder kurz Zustand) verbracht. Die örtliche Nähe der Bereiche, die in den ersten Zustand gebracht wurden, also auf die Anregungsstrahlungsleistung unterhalb des Schwellwertes fällt, und Bereichen im zweiten Zustand, d.h. Bereiche, die mit Anregungsstrahlungsleistung oberhalb des Schwellwertes bestrahlt werden, erlaubt eine signifikante Steigerung der Auflösung gegenüber der Anregungsstrahlungsverteilung.

[0018] Die erfindungsgemäße Lösung erreicht also die Auflösungssteigerung durch eine nichtlineare Lumineszenzkennlinie, die die emittierte Lumineszenzleistung als Funktion der Anregungsstrahlungsleistung beschreibt und ein lokales Maximum hat. Es ist dabei vorteilhaft, aber nicht zwingend erforderlich, wenn die Kennlinie beiderseits dieses Maximums relativ steile Flanken aufweist. Auch kann zur Anregung ein Multiphotonenprozeß zum Einsatz kommen.

[0019] Da beim erfindungsgemäßen Ansatz möglichst ausschließlich Proben-Bereiche im ersten Zustand zum Bild Lumineszenzstrahlung beitragen und Proben-Bereiche im zweiten Zustand zumindest in einem geringeren Maße lumineszieren, ist eine Auf-

lösungssteigerung erreicht, da das Probenbild eine über die Anregungsstrahlungsverteilung hinausgehende Struktur zeigt. Diese Intensitätsstruktur ist um so ausgeprägter, je deutlicher die Emissionsleistung sich zwischen erstem und zweitem Zustand unterscheidet.

[0020] Durch Einstrahlung der Anregungsleistung oberhalb des Schwellwertes, der dem Maximum der Fluoreszenzkenlinie entspricht, wird weniger Fluoreszenz angeregt als im ersten Zustand. Im Mikroskop ist dazu die Anregungsstrahlungsverteilung mit Leistungen über dem Schwellwert versehen. Strahlung anderer Wellenlänge, wie sie im Stand der Technik bislang erforderlich war, ist nicht mehr nötig. Das erfindungsgemäße Mikroskop bzw. eine Vorrichtung zur Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens sind deshalb sehr viel einfacher, benötigen insbesondere nur eine einzige Lichtquelle, deren Auflösung sich auf die Bildqualität auswirkt. Auch sind die chromatischen Anforderungen hinsichtlich der Einkopplung der Anregungsstrahlung gegenüber dem Stand der Technik deutlich vereinfacht, da nicht mehr ein relativ breiter Wellenlängenbereich abgedeckt werden muß.

[0021] Das Mikroskop ist auf die Probe abgestimmt, da die eingestrahlte Anregungsstrahlungsverteilung den Schwellwert für die Leitung berücksichtigt.

[0022] Für den erfindungsgemäßen Ansatz ist es darüber hinaus nicht zwingend erforderlich, daß die Probenbereiche, die mit Anregungsstrahlungsleistung oberhalb des Schwellwertes beleuchtet werden, zuvor „normal“ angeregt wurden (wie dies beispielsweise beim STED- oder beim ESA-Ansatz erforderlich ist), wenn eine Probe verwendet wird, die nach Bestrahlung mit über dem Schwellwert liegender Anregungsstrahlungsleistung dauerhaft oder zumindest für eine gewisse Zeitdauer eine deutlich herabgesetzte oder gar verschwindende Anregbarkeit zeigt.

[0023] Es ist bevorzugt, daß eine Probe bzw. ein Farbstoff verwendet wird, die/der bei einer Anregungsstrahlungsleistung über dem Schwellwert nicht luminesziert, Lumineszenzstrahlung mit anderen Eigenschaften als die bestimmte Lumineszenzstrahlung abstrahlt und/oder geänderte, zu verminderter Lumineszenz führende Absorptionseigenschaften für Anregungsstrahlung aufweist.

[0024] Die Auflösungssteigerung wird also erfindungsgemäß dadurch erreicht, daß aus Proben-Bereichen, die mit über dem Schwellwert liegender Anregungsstrahlungsintensität beleuchtet werden, keine oder nur mehr wenig Lumineszenzstrahlung zur Bilderzeugung beiträgt. Je nach Lumineszenzeigenschaft, die die Probe im zweiten Zustand, d.h. bei und/oder nach oberhalb dem Schwellwert liegender Anregungsstrahlungsleistung zeigt, erfolgt dieser

verminderte Beitrag zum Bild auf unterschiedliche Weise. Zeigt die Probe überhaupt keine Lumineszenz mehr, wird aus Proben-Bereichen, die im zweiten Zustand sind, auch keine Lumineszenzstrahlung mehr detektiert. Zeigt die Probe im zweiten Zustand hingegen Lumineszenzstrahlung mit geänderten optischen Eigenschaften, wird man eine entsprechend optische Filterung, beispielsweise hinsichtlich spektraler Zusammensetzung oder Polarisierung zum Ausblenden vornehmen. Zeigen sich veränderte Lebensdauern der angeregten Lumineszenzzustände, erreicht eine zeitliche Filterung eine Ausblendung.

[0025] Um die Proben-Bereichen im ersten Zustand weiter einzugrenzen bzw. einige dieser Proben-Bereiche auszuwählen, ist es bevorzugt eine konfokale Detektion vorzunehmen. Durch die erfindungsgemäße Reduktion des zur Lumineszenz angeregten Volumens unterhalb der Beugungsgrenze wird dabei eine Ortsauflösung erreicht, die diejenige bei normaler konfokaler Detektion übertrifft.

[0026] Wesentlich ist, daß nicht alle mit Anregungsstrahlung beleuchteten Bereiche zum Lumineszenzbild beitragen, sondern daß mit über dem Schwellwert liegender Anregungsstrahlungsleistung beleuchtete Proben-Bereiche im Bild nicht oder nur vermindert enthalten sind, wodurch sich automatisch die Auflösungssteigerung gegenüber der Einstrahlung der Anregungsstrahlung ergibt, da eine räumliche Reduktion des lumineszierenden Probenvolumens gegenüber dem angeregten Probenvolumen erreicht ist. Es finden sich im Bild optische Strukturen, die in der Anregungsstrahlungsverteilung nicht vorhanden waren. Die Auflösung des Bildes ist also über die Auflösung der Anregungsstrahlungseinkopplung hinaus gesteigert.

[0027] In besonders vorteilhafter Weise verwendet man eine Probe bzw. Farbstoffe bzw. stimmt das erfindungsgemäße Mikroskop darauf ab, die vom zweiten Zustand durch Einstrahlung einer Rücksetzstrahlung, die andere optische Eigenschaften als die Anregungsstrahlung hat, wieder in den (ursprünglichen) ersten Zustand zurückgesetzt werden können. Das Mikroskop weist dazu geeignete Mittel auf. Dies bedeutet, daß der zweite Zustand ein zumindest weitgehend reversibler Zustand ist. Durch Einstrahlung von Anregungsstrahlungsleistung oberhalb des Schwellwertes aus dem Lumineszenzbild ausgeblendete Bereiche können dann nach Einstrahlung der Rücksetzstrahlung wieder zur normalen Lumineszenz im ersten Zustand angeregt werden. Ein derart weitergebildetes Verfahren bzw. ein derart ausgestaltetes Mikroskop eignet sich dann für Anwendungen, bei denen verschiedene Bereiche einer Probe mehrfach abgebildet werden sollen. Es wird für solche Anwendungen deshalb bevorzugt, daß eine Probe bzw. ein Farbstoff verwendet wird, die bzw. der im zweiten Zustand, also nach Beleuchtung mit Anregungsstrah-

lung über dem Schwellwert, verminderte Empfindlichkeit für Anregungsstrahlung zeigt, wobei durch Einstrahlung einer Rücksetzstrahlung, die andere optische Eigenschaften als die Anregungsstrahlung hat, die Empfindlichkeitsverminderung zumindest teilweise reversiert wird (und der erste Zustand wiederhergestellt wird). Zumindest die mit über dem Schwellwert liegender Anregungsstrahlungsleistung beleuchteten Proben-Bereiche werden mit Rücksetzstrahlung bestrahlt. Es ist dabei bedeutsam, daß die Rücksetzstrahlung, die die Probe wieder in den ersten Zustand überführt, zur Bewerkstellung der Auflösungssteigerung nichts beiträgt, also auch nur sehr grob oder überhaupt nicht strukturiert in die Probe eingekoppelt werden kann.

[0028] In einer besonders vorteilhaften Weiterbildung der Erfindung erlaubt die hinsichtlich ihrer Lumineszenzeigenschaften wieder in den ersten Zustand rückführbare Probe eine Bilderzeugung durch Abscannen. Dabei kann die Probe beispielsweise mit einem Spot-, Zeilen- oder Multispotbereich abgerastert werden, z.B. durch eine Scannereinrichtung. Zwischen zwei Scanschritten wird dann jeweils Rücksetzstrahlung eingestrahlt, um beim neuen Scanschritt jeweils erneut Anregungsstrahlung unter und über dem Schwellwert einstrahlen zu können. Dadurch wird in jedem Scanschritt eine gesteigerte Auflösung erzielt, was insgesamt ein deutlich auflösungsverbessertes Bild liefert.

[0029] Die Einstrahlung der Anregungsstrahlungsverteilung erzeugt also eine örtliche Struktur der Fluoreszenzstrahlung. Diese ist meist symmetrisch bezüglich der Anregungsstrahlungsverteilung. Möchte man eine bestimmte fluoreszierende Flächenform, z.B. einen Punkt, so werden vorteilhafterweise Teile der fluoreszierenden Probe ausgeblendet. Dies ist ohne Auswirkung auf die Auflösung der erwünschten Flächenform möglich, da man für ausreichende Abstände zwischen benachbarten fluoreszierenden Bereichen sorgen kann.

[0030] Für die Anregung der Probe über bzw. unter dem Schwellwert sind prinzipiell zwei Varianten möglich. In einer ersten Variante erfolgt eine prinzipiell beugungsbegrenzte Beleuchtung, wobei diese punktförmig sein kann, radial symmetrisch sein kann oder ein zentrales Maximum, wie die bekannte Airy-Funktion aufweisen kann, jedoch nicht muß. In dieser Form der Anregungsverteilung ist es bevorzugt, daß die Anregungsstrahlungsverteilung beugungsbegrenzt ist.

[0031] Bei der beugungsbegrenzten Anregungsstrahlungsverteilung kann man besonders vorteilhaft eine torusförmige Verteilung verwenden, die im Kernbereich der torusförmigen Verteilung eine Anregungsstrahlungsleistung über dem Schwellwert, in Randbereichen unter dem Schwellwert hat. Im vom

Torus umschriebenen Zentrum erhält man dann eine punktförmige Lumineszenzverteilung, die deutlich kleiner ist, als es ein beugungsbegrenzt Airy-Scheibchen wäre. Da natürlich aus den erwähnten Symmetriegründen auch am Außenrand des Torus liegende Proben-Bereiche mit unter dem Schwellwert liegender Anregungsstrahlungsleistung beleuchtet werden, wird auch dort Lumineszenzstrahlung angeregt. Um ein punktförmiges Fluoreszenzbild zu erzeugen, ist es zweckmäßig, diese Bereiche auszublenken, beispielsweise mit Hilfe einer konfokalen Detektion, die lediglich im vom Torus umschriebenen Zentrum entstehende Lumineszenzstrahlung passieren läßt. Das lumineszierende Zentrum ist dabei dennoch kleiner, als es die (beugungsbegrenzte) Auflösung der konfokalen Detektion per se erlaubt. Das Ausblenden kann natürlich auch anders bewerkstelligt werden. Z.B. können die Außenbereiche bezüglich der Lumineszenzanregbarkeit gezielt ausgeschaltet bzw. das umschriebene Zentrum gezielt eingeschaltet werden. Das erfindungsgemäße Verfahren bzw. Mikroskop erlaubt damit eine Auflösung über die physikalische Beugungsgrenze hinaus bei gleichzeitiger Beeinflussung der fluoreszierenden Bereichsform.

[0032] In einer zweiten Variante wird eine flächige, strukturierte Beleuchtung eingesetzt, wobei die Fläche auch als eine oder mehrere, in einer Richtung beugungsbegrenzte Linie(n) ausgebildet werden kann. Teilbereiche der beleuchteten Fläche weisen eine Anregungsstrahlungsleistung über und andere Teilbereiche eine Anregungsstrahlungsleistung unter dem Schwellwert auf. Eine solche flächige Beleuchtung erlaubt es, eine größere Probe besonders schnell abzurastern. Gleiches gilt natürlich auch für eine Multispot-Anordnung, bei der mehrere beugungsbegrenzte Beleuchtungsspotspots auf die Probe fallen, die so weit voneinander räumlich getrennt sind, daß sie eindeutig voneinander getrennt detektiert werden können. Als flächige strukturierte Probenbeleuchtung kommt insbesondere ein Streifen- oder Kreuzgitter in Frage.

[0033] Je nach Probe können Proben-Bereiche im zweiten Zustand noch eine gewisse Restlumineszenz zeigen. Dies kann entweder durch die Probe selbst bedingt sein, oder durch Wanderungen von lumineszierendem Material zwischen den unterschiedlich beleuchteten Proben-Bereichen, beispielsweise durch Diffusion. Die Probe selbst kann z.B. störend autofluoreszieren oder andere Farbstoffe enthalten, die nicht in einen zweiten, reversiblen Zustand überführbar sind. Im Ergebnis hat man eine Restlumineszenzstrahlung in Bereichen, die mit über dem Schwellwert liegender Anregungsstrahlungsleistung beleuchtet wurden. Prinzipiell kann diese Restlumineszenz durch einen geeigneten Schwellwert bei der Detektion unterdrückt werden.

[0034] Die Verwendung einer an und für sich bekannten Lock-In-Technik unterdrückt diese Hintergrundstrahlung bei verbessertem Bildsignal. Dazu wird man entweder in Proben-Bereiche, die in den zweiten Zustand versetzt werden oder in Proben-Bereiche, die im ersten Zustand verbleiben, die Anregungsstrahlung gemäß einer Referenzfrequenz intensitätsmodulieren und diese Referenzfrequenz bei der Detektion der Lumineszenzstrahlung im Wege der Lock-In-Technik verwerten. Das Mikroskop weist dazu einen Modulator und einen dem Lumineszenzdetektor nachgeschalteten Lock-In-Verstärker auf. Dieser separiert dann die modulierten Signale und unterdrückt die unmodulierten Signale, was eine hochaufgelöste Detektion auch bei der genannten Restlumineszenz ermöglicht, ohne daß der Spitzenpegel des Nutzsignals sinkt. Dadurch tragen die modulierten Signale voll zum hochaufgelösten Bild bei.

[0035] Eine alternative Möglichkeit zur Unterdrückung einer Restlumineszenz ist ein Differenzverfahren, bei dem zwei Bilder voneinander substrahiert werden. Ein erstes Bild wird mit Anregungsstrahlungsleistung unter dem Schwellwert, ein zweites Bild mit Anregungsstrahlungsleistung oberhalb des Schwellwertes aufgezeichnet. Die Differenz zwischen den beiden Bildern bewirkt die Abseparierung der Restlumineszenz. Andere mögliche Ansätze zur Unterdrückung der Restlumineszenz nutzen weitere Eigenschaften von in Varianten der Erfindung verwendeten Proben bzw. Farbstoffen, beispielsweise die Auswertung unterschiedlicher Lumineszenzlebensdauern im ersten bzw. zweiten Zustand, die Nutzung unterschiedlicher optischer Eigenschaften der Lumineszenzstrahlung im ersten oder zweiten Zustand o.ä.

[0036] Weiter werden in vorteilhaften Ausgestaltungen Probenteile, die außerhalb der zu detektierenden Fokusebene liegen, ausgeblendet, um die Tiefenschärfe zu steigern. Dadurch wird gleichzeitig die axiale von der lateralen Auflösung entkoppelt. Dazu wird zuerst die Probe unstrukturiert in den zweiten Zustand überführt und dann nur in der Fokusebene rückgesetzt. Gleiches erreicht eine entsprechende Tiefenstrukturierung der Anregungsstrahlungsintensität, mit einem Minimum in der Fokusebene. Hierzu kann man eine Anordnung gemäß den Prinzipien der DE 102 57 423 A1 geeignet abwandeln.

[0037] Das eingangs genannte erfindungsgemäße Mikroskop verwirklicht in vorteilhaften Ausgestaltungen eine oder mehrere der oben genannten Weiterbildungen. Da die Anregungsstrahlung sowohl zur Anregung der Lumineszenz als auch zur Verhinderung bzw. Minderung von Lumineszenz verwendet wird, ist es vorteilhafterweise möglich, eine einzige Anregungsstrahlungsquelle vorzusehen, welche die Anregungsstrahlung abgibt und der eine Einrichtung nachgeordnet ist, welche dem Strahlprofil ein Mini-

mum, vorzugsweise mit variabler Tiefe, aufprägt, wobei im Minimum die Leistung unter dem Schwellwert liegt.

Ausführungsbeispiel

[0038] Die Erfindung wird nachfolgend unter Bezugnahme auf die Zeichnungen beispielshalber noch näher erläutert. In den Zeichnungen zeigt:

[0039] [Fig. 1a](#) und [Fig. 1b](#) ortsabhängige Leistungsverteilungen für Verfahren des Standes der Technik,

[0040] [Fig. 2a–Fig. 2c](#) Schemazeichnungen für verschiedene Verfahren zur Auflösungssteigerung gemäß dem Stand der Technik,

[0041] [Fig. 3](#) ein auflösungsgesteigertes Fluoreszenzmikroskop nach dem Stand der Technik,

[0042] [Fig. 4](#) eine Fluoreszenzkennlinie einer Probe,

[0043] [Fig. 5](#) eine Schemazeichnung zur erfindungsgemäßen Auflösungssteigerung,

[0044] [Fig. 6a/b](#) ein- bzw. zweidimensionale Leistungsverteilungen, wie sie bei der Auflösungssteigerung nach einer ersten und zweiten Verfahrensform anfallen,

[0045] [Fig. 7](#) eine Darstellung ähnlich der [Fig. 6a/b](#) für eine dritte Verfahrensform,

[0046] [Fig. 8a/b](#) Darstellungen ähnlich der [Fig. 6a/b](#) für eine vierte und fünfte Verfahrensform,

[0047] [Fig. 9a/b](#) eine Schemazeichnung für ein erstes auflösungsgesteigertes Mikroskop,

[0048] [Fig. 10](#) eine Leistungsverteilung ähnlich der [Fig. 6a](#) zur Verdeutlichung der Wirkungsweise des Mikroskops der [Fig. 9](#),

[0049] [Fig. 11a/b](#) eine Kennlinie ähnlich der [Fig. 4](#) sowie eine Leistungsverteilung zur Verdeutlichung eines zweiten auflösungsgesteigerten Mikroskops,

[0050] [Fig. 12](#) eine Schemadarstellung des zweiten Mikroskops,

[0051] [Fig. 13](#) eine Schemadarstellung eines dritten auflösungsgesteigerten Mikroskops,

[0052] [Fig. 14](#) eine Schemadarstellung zur Funktionsweise des dritten Mikroskops,

[0053] [Fig. 15a/b](#) Schemadarstellungen von Teilen eines vierten Mikroskops,

[0054] [Fig. 16a](#) eine Verteilung der Anregungs- bzw. Rücksetzstrahlung in einer Pupille des vierten Mikroskops,

[0055] [Fig. 16b](#) eine mit dem vierten Mikroskop realisierte Multispotverteilung,

[0056] [Fig. 17](#) eine Fluoreszenzverteilung beim vierten Mikroskop und

[0057] [Fig. 18](#) eine Verteilung der Anregungs- bzw. Rücksetzstrahlung in einer Pupille einer Variante des vierten Mikroskops.

[0058] Nachfolgend werden in verfahrenstechnischer Erläuterung sowie in Mikroskopbeschreibungen verschiedene Ausführungsformen zur auflösungsgesteigerten Lumineszenzmikroskopie dargestellt. Dies geschieht rein exemplarisch anhand verschiedener Fluoreszenzmikroskope bzw. Fluoreszenzmikroskopieverfahren. Natürlich sind die nachfolgend geschilderten Ausführungsbeispiele, d. h. Verfahrensformen und Mikroskope, auch für andersartig lumineszierende Substanzen einsetzbar, beispielsweise für phosphorisierende Proben oder Farbstoffe. Soweit nachfolgend von einem Farbstoff gesprochen wird, so ist auch dies nur beispielshalber aufzufassen. Anstelle eines Farbstoffes, der zur Präparation einer Probe eingesetzt werden kann, kann natürlich auch eine direkt fluoreszierende (oder phosphorisierende) Substanz als Probe treten, wodurch eine Farbstoffzugabe entbehrlich ist. Auch können zusätzliche Farbstoffe verwendet werden, die andere Eigenschaften zeigen und nicht in einen zweiten Zustand bringbar sind. Weiter können für einzelne Verfahrensformen oder Mikroskope geschilderte Merkmale auch für andere beschriebene Verfahrensformen oder Mikroskope eingesetzt werden, so daß auch hier nicht geschilderte Kombinationen möglich sind.

[0059] [Fig. 4](#) zeigt beispielshalber eine Fluoreszenz-Kennlinie **17** für einen Farbstoff, der erfindungsgemäß verwendet wird. Diese Fluoreszenz-Kennlinie **17** gibt die Leistung L der abgegebenen Fluoreszenzstrahlung F als Funktion der Leistung L der Anregungsstrahlung A wieder. Wie zu sehen ist, steigt die Kennlinie **17** weitgehend linear, jedenfalls monoton, bis zu einem Maximum **18** und fällt dann oberhalb eines Schwellwerts **19** für die Anregungsstrahlungsleistung wieder ab. Erkennbar sind zwei Zustands-Regionen, die jeweils links und rechts vom Schwellwert **19** bzw. dem Maximum **18** liegen. Wird eine Anregungsstrahlungsleistung unterhalb des Schwellwerts **19** eingestrahlt, befindet sich der Farbstoff vorrangig in einem ersten Zustand **5**. In diesem kann er Fluoreszenzstrahlung abstrahlen. Wird die Anregungsstrahlungsleistung über den Schwellwert **19** erhöht, findet eine Umschichtung der Farbstoffmoleküle in einen zweiten Zustand **6** statt. Farbstoffmo-

leküle im zweiten Zustand **6** können entweder nicht fluoreszieren, strahlen eine Fluoreszenzstrahlung mit geänderten optischen Eigenschaften ab und/oder besitzen eine gegenüber dem ersten Zustand **5** geänderte Absorptionseigenschaft. Die geänderten optischen Eigenschaften für Fluoreszenzemission oder Absorption können die spektrale Zusammensetzung, die Polarisierung und/oder die Lebensdauer der Fluoreszenzstrahlung betreffen. Im Ergebnis fällt in der zweiten Zustands-Region die Leistung der Fluoreszenzstrahlung F , wenn man sich auf die Art der Fluoreszenzstrahlung, die im ersten Zustand **5** abgegeben wird, bezieht, wieder ab.

[0060] Die Erfindung setzt nun die Kennlinie **17** dahingehend ein, daß die Einstrahlung der Anregungsstrahlung A nur einen Teil der Probe in die erste Zustands-Region (oder kurz ersten Zustand) **5**, einen anderen Teil der Probe jedoch in die zweite Zustands-Region (oder kurz zweiten Zustand) **6** bringt. Bereiche, die mit Anregungsstrahlungsleistung oberhalb des Schwellwertes **19** beleuchtet wurden/werden, emittieren somit die bestimmte Fluoreszenzstrahlung nur vermindert. Dabei ist es vorteilhaft, wenn der zweite Zustand **6** ein reversibler Zustand ist. Dies bedeutet, daß zumindest nach einer gewissen Zeit oder nach aktiver Einwirkung ein einmal mit Anregungsstrahlungsleistung oberhalb des Schwellwertes **19** bestrahlter Farbstoff wieder die Eigenschaften des ersten Zustandes **5** zeigt. Ein Beispiel für einen Farbstoff, für den die Erfinder eine Kennlinie gemäß der [Fig. 4](#) erkannten, ist die als Dronpa bezeichnete Substanz, die in der Veröffentlichung R. Ando et al., „Regulated fast nucleocytoplasmic shuttling observed by reversible protein highlighting“, Science, 19. November 2004, Vol. 306, S. 1370-1373, beschrieben ist. Der Farbstoff ist von der Firma Amalgaam, Woburn, Massachusetts, USA, unter der Bezeichnung Dronpa-Green, Code-Nr. AM-V0071, verfügbar und bislang im Zusammenhang mit der Fluoreszenzmarkierung von Molekülen, deren Transporteigenschaften durch Zellmembranen untersucht werden sollen, bekannt. Der Farbstoff Dronpa kann bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt werden, und nach Anregung in den zweiten Zustand **6** durch Strahlung bei einer Wellenlänge von 405 nm wieder in den ersten Zustand **5** zurückgeführt werden.

[0061] In Kombination mit einer geeigneten Anregungsstrahlungsverteilung beim Beleuchten der Probe führt die Verwendung des Farbstoffes mit der Kennlinie der [Fig. 4](#) oder einer entsprechenden Kennlinie zu einer deutlichen Steigerung der Auflösung. Dabei wird im Gegensatz zum Stand der Technik nur Strahlung mit einer Wellenlänge eingestrahlt, und nur diese Strahlung trägt zur Auflösung bei. Das Rückschalten kann den Ausführungsformen, bei denen der Farbstoff nicht spontan in den ersten Zustand **5** zurückkehrt, durch Einstrahlung einer Rücksetzstrahlung R erreicht werden, die jedoch zur Auflö-

sungssteigerung unbeachtlich ist.

[0062] Mit der Anregungsstrahlung A wird neben der Anregung der Farbstoffmoleküle aus dem Grundniveau heraus in das erste angeregte Niveau (erster Zustand **5**) auch die Verhinderung von Fluoreszenz oder auch eine Entvölkerung (zweiter Zustand **6**) bewerkstelligt. Bei der Entvölkerung erfolgt eine Umlagerung der Farbstoffmoleküle aus dem ersten Zustand in den zweiten Zustand. Die beiden Zustände haben voneinander verschiedene optische Fluoreszenzeigenschaften. Nach der Anregung mit der Anregungsstrahlung A kann sofort das hochaufgelöste Fluoreszenzbild gewonnen werden, wobei hochaufgelöst sich auf die optische Auflösung der Anregungsstrahlung A bezieht. Falls der Farbstoff aus dem zweiten Zustand nicht spontan in den ersten Zustand zurückkehrt, wird aktiv eine Rücksetzung, beispielsweise mittels einer Rücksetzstrahlung R, die von der Anregungsstrahlung A verschiedene optische Eigenschaften aufweist, bewerkstelligt. Das entsprechende Schema zeigt [Fig. 5](#).

[0063] Ursprünglich befindet sich z.B. die zu untersuchende Probe P im ersten Zustand **5**, in dem die Leistung der Fluoreszenzstrahlung F mit der Leistung der Anregungsstrahlung A steigt. Die Einstrahlung der Anregungsstrahlung A erfolgt nun so, daß in einzelnen Proben-Bereichen B2 die Anregungsstrahlungsleistung über dem Schwellwert **19** liegt. In anderen Bereichen B1 liegt sie darunter. Somit sind einige Probenbereiche im ersten Zustand **5**, andere im zweiten Zustand **6**, je nach dem ob die Leistung der Anregungsstrahlung über oder unter dem Schwellwert **19** liegt. [Fig. 5](#) zeigt schematisch die Überführung der Probe durch Einstrahlung von Anregungsstrahlung A in Probenbereiche B1 im ersten Zustand **5** (rechter Teil der unteren Hälfte der [Fig. 5](#)) sowie Probenbereiche B2 im zweiten Zustand **6** (linker Teil). Probenbereiche B2 im zweiten Zustand **6** können nicht mehr effizient fluoreszieren, vor allem wenn eine Anregungsstrahlungsleistung deutlich über dem Schwellwert **19** verwendet wurde. Der Begriff „fluoreszieren“ bezieht sich dabei auf Fluoreszenzstrahlung mit bestimmten Eigenschaften. Es ist also durchaus möglich, daß auch im zweiten Zustand **6** Fluoreszenzstrahlung abgegeben wird, jedoch mit anderen Eigenschaften als im ersten Zustand **5**. Entweder ändern sich im zweiten Zustand also die Absorptionseigenschaften oder/und die Fluoreszenzeigenschaften der Probe.

[0064] Bereiche B1 der Probe, die im ersten Zustand **5** bleiben, emittieren nach Einstrahlung von Anregungsstrahlung A weiterhin dieselbe Fluoreszenzstrahlung F. Einstrahlung von Rücksetzstrahlung R (in [Fig. 5](#) ist dieser Vorgang durch einen entsprechenden Pfeil veranschaulicht) bringt die gesamte Probe P wieder in den ersten Zustand **5**, reversiert also die Aufteilung in zwei verschiedenen fluoreszieren-

de Probenbereiche B1 und B2.

[0065] Die Aufteilung der Probe in Probenbereiche B1, die sich im ersten Zustand **5** befinden, und Probenbereiche B2, die sich im zweiten Zustand **6** befinden, ermöglicht es nun, die Emission von Fluoreszenzstrahlung F auf ein Volumen der Probe P zu beschränken, das kleiner ist, als das ursprüngliche mit Anregungsstrahlung A beleuchtete Volumen. Es läßt sich somit also eine Struktur im fluoreszierenden Bild erreichen, die ursprünglich in der Anregungsstrahlungsverteilung nicht vorhanden war. Ursache dafür ist die geschickt eingesetzte Nichtlinearität der Kennlinie **17**.

[0066] Die [Fig. 6a](#) und [Fig. 6b](#) zeigen zwei Verfahrensformen, wie die Anregungsstrahlungsverteilung zur Auflösungssteigerung aussehen kann. Beide Figuren zeigen links einen eindimensionalen Schnitt durch die Anregungsstrahlungsverteilung bzw. Fluoreszenzstrahlungsverteilung. Jeweils rechts ist das zweidimensionale Bild der Fluoreszenzstrahlungsverteilung in Draufsicht zu sehen.

[0067] In [Fig. 6a](#) wird eine punktförmige verteilte Anregungsstrahlung A eingestrahlt. Die Verteilung ist hier eine beugungsbegrenzte Airy-Verteilung. Hierdurch wird im Farbstoff Fluoreszenzstrahlung F mit einer ellipsoidförmigen Donut-Verteilung angeregt, die sich im zweidimensionalen Bild als lateral fluoreszierender, kreisförmiger Ring darstellt. Es fluoreszieren nur die Proben-Bereiche B1. Axial liegt ein fluoreszierender ellipsenförmiger Ring dar. Dieser Probenbereich B1 ist kleiner als die Beugungsgrenze der Anregungsstrahlung erlaubt.

[0068] Strahlt man dagegen, wie in [Fig. 6b](#) gezeigt, eine ebenfalls beugungsbegrenzte Donut-förmige Verteilung der Anregungsstrahlung A ein, ergibt sich ein abstrahlender Proben-Bereich B1, der einer verkleinerten Airy-Verteilung entspricht, welche von einem ringförmigen fluoreszierenden Bereich umgeben ist. In der Schnittdarstellung zeigen sich in der Verteilung der Fluoreszenzstrahlung F deshalb drei Peaks als Proben-Bereiche B1. Auch hier ist die Punktverwaschungsverteilung **16** kleiner als die Beugungsgrenze zuläßt. Die Verbesserung der Auflösung über die normale Punktverwaschungsverteilung hängt wesentlich von der Kombination aus Kennlinie **17** und Leistungsverteilung der Anregungsstrahlung A ab.

[0069] Zur Ausblendung des ringförmigen Außenbereichs ist es zusätzlich möglich, eine konfokale Detektion durchzuführen, die den mittleren Peak durch geeignete Einstellung eines konfokalen Detektionsvolumens D auswählt. Dies ist schematisch als dritte Verfahrensform in [Fig. 7](#) dargestellt. Der nun noch detektierte fluoreszierende Proben-Bereich B1 besteht dann aus dem mittleren Peak. Insgesamt ist

z.B. ein bildgebendes Volumen B (punktierte Linie in der rechten Darstellung der [Fig. 7](#)) erreicht, das zweieinhalb mal schmaler ist, als die konventionelle Punktverwaschungsverteilung, und sogar 1,7-mal schmaler, als eine konfokale Punktverwaschungsverteilung. Bei einer Donut-förmigen Anregungsverteilung, wie sie die durchgezogene Kurve in der rechten Darstellung der [Fig. 6b](#) bzw. [Fig. 7](#) zeigt, ist die resultierende Verteilung des bildgebenden Volumens B bzw. der mittlere Peak der Punktverwaschungsverteilung der [Fig. 6b](#) radialsymmetrisch. Verwendet man zwei Beleuchtungsspots, erreicht man eine maximale Auflösungssteigerung entlang der Verbindungslinie der Spotmaxima.

[0070] Alternativ wird der äußere fluoreszierende Ring in [Fig. 6b](#) durch ein gezieltes Rückschalten des Farbstoffs aus dem zweiten Zustand **6** in den ersten Zustand **5** im Bereich des konfokalen Detektionsvolumens D ausgeblendet. Das Vorgehen/Prinzip ist dann wie folgt: Zuerst wird mit Anregungsstrahlung so angeregt, daß der zu untersuchende Probenabschnitt vollständig in den zweiten Zustand gelangt. Anschließend wird Rücksetzstrahlung R mit einer Verteilung entsprechend dem konfokalen Detektionsvolumen D eingestrahlt und damit ein Teil der Probe zurückgeschaltet. Bei nochmaliger Anregung mit der Anregungsstrahlungsverteilung A gemäß [Fig. 7](#) gelangt dann nur der in diesem Probenanteil liegende bildgebende Bereich B in den ersten Zustand und emittiert Fluoreszenzstrahlung F in Form des mittleren Peaks, wie er auch in der Variante der [Fig. 7](#) verbleibt. Der ringförmige Außenbereich verbleibt im zweiten Zustand und fluoresziert nicht.

[0071] In einer vierten Verfahrensform erfolgt eine strukturierte flächige Beleuchtung, wie sie beispielsweise in [Fig. 8a](#) gezeigt ist. Eine in x-Richtung sinusförmig verteilte Anregungsstrahlung A führt in den Tälern der sinusförmigen Leistungsverteilung zu Fluoreszenzstrahlung F. Die fluoreszierenden Proben-Bereiche B1 sind streifenförmig. Die Streifen sind jedoch deutlich schmaler als die Streifen der sinusförmigen Verteilung der Anregungsstrahlung A. Vorteilhaft ist hierbei, daß die sinusförmige Verteilung der Anregungsstrahlung A als Minima keine Nullstellen aufweist bzw. aufweisen muß. Die resultierende Verteilung der Fluoreszenzstrahlung F hängt zwar in ihrer Höhe, nicht jedoch in der Breite von der Leistung der Anregungsminima ab. Die Tiefe der Minima der sinusförmigen Anregungsstrahlungsverteilung ist also unkritisch für die Breite der Streifen und somit für die Auflösung. Im Beispielfall ist die Periode der sinusförmigen Streifenverteilung der Anregungsstrahlung A an der Grenzfrequenz der Auflösung eingestellt. Als Detektor wird z.B. ein Matrixdetektor verwendet. Die Streifenbreite und mithin die Auflösung ist um Faktor 6 gegenüber der Grenzfrequenz der Auflösung verbessert. Ein hochaufgelöstes Bild wird nun durch Verschiebung des Streifenmusters gewon-

nen.

[0072] Alternativ kann statt einer streifenförmigen Weitefeldbeleuchtung auch eine brennlinienförmige Beleuchtung verwendet werden, wobei die Linie entlang ihrer Längsachse (z.B. sinusförmig) moduliert ist, so daß die Leistung in Linienabschnitten über dem Schwellwert und in Linienabschnitten unter dem Schwellwert liegt. Die Scanbewegung erfolgt senkrecht zur Linie und entlang der Linie. Der Detektor ist ein geeignet hochauflösender Zeilendetektor.

[0073] [Fig. 8b](#) zeigt eine Weiterbildung der vierten Verfahrensform der [Fig. 8a](#). In dieser fünften Verfahrensform erfolgt die Strukturierung der Verteilung der Auflösungsstrahlung A in beiden lateralen Achsen, d. h. in der Probenebene, so daß eine matrixförmige Beleuchtungsspotverteilung gegeben ist. Dies ist in der Schnittdarstellung der linken Hälfte der [Fig. 8b](#) eindimensional dargestellt. Senkrecht zur optischen Achse ist eine Matrix aus hellen Anregungsspots auf die Probe abgebildet. Jedem Beleuchtungsspot wird nun ein Detektor zugeordnet. Eine Verschiebung des Spotmusters relativ zur Probe erlaubt es, die Zwischenräume zwischen den Punkten ebenfalls zu vermessen. Der Bereich in dem die Verschiebung des matrixförmigen Musters zu erfolgen hat, ist in [Fig. 8b](#) als Gebiet G1 dargestellt. Durch eine Abrasterung der Spotmatrix, beispielsweise wie mit einem konventionellen Laserscanningmikroskop bekannt, wird insgesamt das gesamte Gebiet G2 aus Einzelgebieten G1 zusammengesetzt. Durch diese Parallelisierung ist eine sehr hohe Scangeschwindigkeit erreicht. Zugleich ist die Auflösung, wie die schmalen Peaks der Fluoreszenzstrahlung F in der Schnittdarstellung zeigen, über die Auflösung der Anregungsstrahlungsverteilung hinaus gesteigert.

[0074] Obwohl bislang nur die laterale Auflösung erwähnt wurde, ist auch die axiale Auflösung für die Ausführungsformen verbessert.

[0075] [Fig. 9a](#) zeigt ein Laserscanningmikroskop, das jede der erläuterten Verfahrensformen realisieren kann. Für die Verfahrensformen **1** bis **3** ist das Laserscanningmikroskop **20** z. B. als einzelpunktscannendes Mikroskop ausgebildet. Es weist ein Anregungsmodul **21**, ein Mikroskopmodul **22** sowie ein Detektormodul **23** auf. Im Mikroskopmodul **22** befindet sich eine Probe **24** im Fokus eines Objektivs **25**, dem in Beleuchtungsrichtung eine Tubuslinse **26** vorgeschaltet ist. Vor dieser Optik liegt eine Scanoptik **27**, die zusammen mit einem Scanner **28** ein Abscannen der Probe **24** durch Verschieben des Fokuspunktes auf der Probe ermöglicht. Ein Hauptfarbteiler **29** koppelt die Strahlung aus dem Anregungsstrahlungsmodul **21** in das Mikroskopmodul **22** ein und trennt aus dem Mikroskopmodul **22** von der Probe **24** aufgenommene Strahlung zum Detektormodul **23** ab.

[0076] Das Anregungsmodul **21** verfügt über eine Lichtquelle **30**, deren Strahlung über den Hauptfarbteiler **29** zum Fokuspunkt in der Probe **24** gebündelt wird. Die im Fokuspunkt der Probe **24** angeregte Fluoreszenzstrahlung **F** wird vom Objektiv **25** gesammelt und am Hauptfarbteiler **29** aufgrund der im Vergleich zur Anregungsstrahlung **A** geänderten Spektraleigenschaften zu einer Pinholeoptik **31** ausgekoppelt, der ein Pinhole **32** sowie ein (optionaler) Blockfilter **33** nachgeschaltet sind. Ein Punkt-Detektor **34** erfaßt die Leistung der Fluoreszenzstrahlung **F** am Fokuspunkt. Die Erfassung kann zusätzlich spektral aufgelöst, polarisationsaufgelöst und/oder zeitaufgelöst erfolgen. Die Signale des Detektors **34** werden von einem Steuergerät **35** ausgelesen, das insgesamt den Betrieb des Laserscanningmikroskops **20** steuert.

[0077] Zur Auflösungssteigerung erfolgt die Einstrahlung der Anregungsstrahlung **A** in den Fokuspunkt **24** mit einer bestimmten Leistungsverteilung. Um diese vorzugeben und einzustellen, ist ein geeigneter Aufbau im Anregungsmodul **21** vorgesehen. Die Bauweise der [Fig. 9a](#) weist einen Strahlteiler **36** auf, der 50% der Strahlleistung der Lichtquelle **30** auskoppelt. In der Ausführungsform handelt es sich bei dem Strahlteiler **36** um einen Polarisationsstrahlteiler. Die derart aufgespaltenen Teilstrahlen werden nachher über einen weiteren Strahlteiler **40** wieder zu einem gemeinsamen Strahl überlagert, wobei die Intensitäten und Phasen der Teilstrahlen zuvor geeignet eingestellt werden. Zusätzlich ist in einem Teilstrahl ein Phasenelement **39** gestellt, das entweder als festes Phasenelement oder als variabel einstellbares Phasenelement ausgebildet werden kann. Das Phasenelement **39** hat z. B. einen phasenverändernden Bereich **44** sowie einen phasenneutralen Bereich **49**, so daß eine donutförmige Leistungsverteilung im Strahl erzeugt wird. Nach Überlagerung der beiden Teilstrahlen nach dem Strahlteiler **40** erhält man Anregungsstrahlung **A** gemäß [Fig. 10](#). Der Aufbau des Phasenelementes **39** ist exemplarisch in [Fig. 9b](#) gezeigt. Zur Einstellung der Leistungsanteile der beiden Teilstrahlen vor der Überlagerung sind in jeden Teilstrahl noch variable Abschwächer **37** bzw. **38** gestellt.

[0078] Im Ergebnis erhält man eine Verteilung der Leistung der Anregungsstrahlung **A**, wie sie in [Fig. 10](#) als Schnittdarstellung entlang einer senkrecht zur optischen Achse verlaufende **x**-Achse gezeigt ist. Die Verteilung weist ein Minimum **45** auf, dessen Tiefe durch Einstellung der Abschwächer **38** bzw. **37**, d.h. durch Änderung der relativen Leistung der beiden Teilstrahlen variabel einstellbar ist, z. B. durch das Steuergerät **35**. Die Anpassung des Minimums **45** erlaubt es, die Intensität der ebenfalls in [Fig. 10](#) eingezeichneten Fluoreszenzstrahlung **F** optimal einzustellen.

[0079] Das hinsichtlich der Tiefe einstellbare Minimum **45** kann auch durch den Einsatz eines variabel einstellbaren Phasenelementes ohne Bildung von Teilstrahlen erzeugt werden. Für ein solches Phasenelement kommt eine Matrix aus Flüssigkristallen in Frage, bei der die Phase jedes einzelnen Pixels einstellbar ist. Natürlich sind noch andere Einrichtungen zur Erzeugung einer donutförmigen Strahlverteilung mit einstellbarem Minimum **45** möglich.

[0080] Für ein optionales Rückschalten der Proben-Bereiche **B2** vom zweiten Zustand **6** in den ersten Zustand **5** kann eine Rücksetzstrahlungsquelle **41** vorgesehen werden, die über einen dritten Teiler **42** in den Anregungsstrahlengang des Anregungsmoduls **21** eingebunden ist. Diese Bauweise ist jedoch optional, weshalb die Darstellung der [Fig. 9a](#) auch eine gestrichelte Darstellung für diese Elemente zeigt. Die Rücksetzstrahlungsquelle **41** ist nur dann erforderlich, wenn der Farbstoff der Probe **24** nicht spontan wieder in den ersten Zustand zurückkehrt, sondern eines aktiven Rücksetzens durch optische Rücksetzstrahlung **R** bedarf. Rücksetzstrahlung kann jedoch auch anderweitig auf die Probe **24** aufgebracht werden, beispielsweise durch eine Einstrahlung schräg zur optischen Achse des Objektivs **25** mit Hilfe einer seitlich vom Laserscanningmikroskop angebrachten Rücksetzstrahlquelle.

[0081] Das Mikroskop der [Fig. 9a](#) kann die eingangs geschilderten Verfahrensformen ausführen. Die dritte Verfahrensform erfordert dabei die Verwendung des Pinholes **32** und der Pinholeoptik **31** im Detektormodul **23**. Immer dann, wenn man keine konfokale Detektion benötigt, können die dafür nötigen Bauteile (**31**, **32**) entfallen.

[0082] [Fig. 11a](#) zeigt eine weitere Verbesserungsmöglichkeit des erfindungsgemäßen Vorgehens auf. Der Übergang der Probe im Teil-Bereich **B2** aus dem ersten Zustand in den zweiten Zustand **6** kann unvollständig stattfinden. Dies ist beispielsweise dann der Fall, wenn die Fluoreszenzkennlinie **17** nach dem Maximalwert **18**, d. h. für Leistungen der Anregungsstrahlung **A** oberhalb des Schwellwertes **19**, nicht steil genug abfällt. Im Beispiel der [Fig. 11a](#) geht die Kennlinie **17** auch bei hohen Anregungsstrahlungsleistungen nicht auf Null zurück. Dies führt zu einer Restfluoreszenz **47** in den Proben-Bereichen **B2**, die im zweiten Zustand **6** sind, da der geminderte Anteil **46** nicht dem Maximalwert **18** entspricht. Würde man die Fluoreszenzstrahlung **F** dann mit dem Mikroskop gemäß [Fig. 9a](#) beispielsweise in Realisierung der dritten Verfahrensform vermessen, so würde sich das bildgebende Volumen **B** aus einem niedrig aufgelösten Sockel **S** und einer hochaufgelösten Verteilung **V** zusammensetzen. Dies ist in [Fig. 11b](#) schematisch dargestellt, die den Sockel **S** schraffiert und die hochaufgelöste Verteilung **V** schwarz zeigt.

[0083] Der gleiche Effekt kann auftreten, wenn in der Probe eine starke Diffusion des fluoreszierenden Materials, beispielsweise der Farbstoffmoleküle, herrscht. Auch dann ergibt sich eine Restfluoreszenz **47** in den Proben-Bereichen B2, jedoch nicht aufgrund einer vergleichsweise schwach abfallenden Kennlinie **17**, sondern durch Diffusion des fluoreszierenden Materials.

[0084] Der Sockel S läßt sich durch geeignete Bildaufnahme unterdrücken. Eine dies realisierende zweite Ausführungsform eines Laserscanningmikroskops **20** ist exemplarisch in [Fig. 12](#) dargestellt. Mit der Bauweise gemäß [Fig. 9a](#) übereinstimmende Komponenten sind mit denselben Bezugszeichen versehen, so daß auf ihre nochmalige Erläuterung verzichtet werden kann.

[0085] Im Unterschied der Bauweise der [Fig. 9a](#) ist nun der Detektor **34** mit einem Lock-In-Verstärker **48** verbunden, wobei diese Verbindung in [Fig. 12](#) lediglich exemplarisch über das Steuergerät **35** realisiert ist. Natürlich ist auch eine direkte Verbindung möglich. Auch kann der Lock-In-Verstärker **48** in das Steuergerät **35** integriert werden. Der Lock-In-Verstärker **48** ist mit einem Frequenzgenerator **49** verbunden, der das Minimum **45** in seiner Amplitude moduliert. Hierzu wird die Leistung einer der beiden Teilstrahlen im Anregungsmodul **21** geeignet moduliert, was z. B. durch eine Ansteuerung einer der beiden Abschwächer **37** oder **38** geschieht. In der Darstellung der [Fig. 12](#) ist die Ansteuerleitung für den Abschwächer **38** gestrichelt dargestellt, um diese Option anzudeuten. Natürlich kann die Ansteuerung der Abschwächer auch durch das Steuergerät **35** erfolgen, das das Signal des Frequenzgenerators **49** entsprechend auswertet. Wie bereits erwähnt, können der Lock-In-Verstärker **48** und/oder der Frequenzgenerator **49** Bestandteile des Steuergerätes **35** sein.

[0086] Die vom Frequenzgenerator **49** zur Modulation des Minimums bereitgestellten Frequenz wird auch dem Lock-In-Verstärker **48** zugeführt. Durch die Modulation des Minimums **45** verändert sich das Signal aus den Proben-Bereichen im ersten Zustand **5**, wohingegen Signale aus dem Sockel S konstant bleiben. Der Lock-In-Verstärker **48** separiert die modulierten Signale heraus und unterdrückt Signale aus dem Sockel S. Im Ergebnis erfolgt eine Trennung der Verteilung V vom Sockel S, und die hochaufgelöste Detektion ist auch bei einem unvollständigem Übergang in den zweiten Zustand **6** erreicht.

[0087] Verwertet man gezielt den Gleichanteil des Signals, erreicht man eine zusätzliche Bildinformation, die nicht hochaufgelöst ist. Diese Bildinformation kann sich z.B. auf andersartig fluoreszierende Proben-Bereiche/-Eigenschaften beziehen. Die hoch und niedrig aufgelösten können beliebig codiert (z.B. farbcodiert) überlagert dargestellt werden.

[0088] Alternativ oder zusätzlich zu dieser Lock-In-Detektion können auch zwei Bilder aufgezeichnet werden. Ein erstes Bild wird mit Anregungsstrahlungsverteilung mit Minimum **45**, das zweite ohne Minimum **45** aufgezeichnet. Zur Separierung der hochaufgelösten Verteilung V vom Sockel S werden dann nur noch die Bilder voneinander subtrahiert (erstes Bild minus zweites Bild). Das Ergebnisbild enthält nur noch die Informationen mit der hochaufgelösten Verteilung V. Weitere Möglichkeiten zur Unterdrückung eines niedrig aufgelösten Sockels können die Nutzung der unterschiedlichen optischen Eigenschaften des ersten Zustands **5** und des zweiten Zustands **6** sein, beispielsweise wenn sich die Lebensdauer der beiden Zustände unterscheiden. Auch kann man eine unterschiedliche Charakteristik des Emissionsspektrums verwenden, bzw. eine unterschiedliche Charakteristik des Absorptionsspektrums zwischen erstem Zustand **5** und zweiten Zustand **6**.

[0089] [Fig. 13](#) zeigt eine nochmalige Abwandlung des Laserscanningmikroskops **20** der [Fig. 9a](#) zur Realisierung einer der Verfahrensformen mit linienförmiger Beleuchtung. Auch hier sind mit der [Fig. 9a](#) übereinstimmende Elemente mit denselben Bezugszeichen gekennzeichnet, so daß auf deren Beschreibung wiederum verzichtet werden kann. Weiter sind nur die Mittelstrahlen eingezeichnet.

[0090] Die nun kohärente Lichtquelle **30** strahlt ihre Strahlung durch ein Gitter **50**, das zwei 1. Beugungsordnungen, o+ und o-, sowie eine 0.-Beugungsordnung erzeugt. Dem Gitter ist eine Zylinderlinse **50a** nachgeordnet, die hier ein Beispiel für ein anamorphotisches Element ist. Auf die Probe wird eine senkrecht zur optischen Achse liegende Linie fokussiert.

[0091] Die Beugungsordnungen fallen beim Fokussieren streifend zueinander ein und gelangen so in der Probe zur Interferenz. Durch den Talbot-Effekt entsteht ein sogenanntes Talbotgitter entlang der optischen Achse OA. Dies ist schematisch in der oberen Hälfte der [Fig. 14](#) gezeigt. Die +1., die 0. sowie die -1. Ordnung fallen in der Probe **24** unter verschiedenen Winkeln ein und die Interferenzen erzeugen die dem Fachmann bekannte Talbotstruktur.

[0092] Die Wirkung innerhalb der Probe zeigt sich in der unteren Hälfte [Fig. 14](#), die einen Tiefenschnitt (x,z-Ebene) durch die Probe zeigt. An den Stellen hoher Intensität (schwarze Bereiche B2) gelangt die Probe in den zweiten Zustand **6**, d. h. es wird eine Entvölkerung der angeregten Zustände durch Umschalten der Farbstoffmoleküle erreicht. In den Bereichen B1 geringer Intensität verbleibt die Probe im ersten Zustand **5** (schraffierte und weiße Bereiche).

[0093] Die Detektion erfolgt mit einem Zeilendetektor **34**, der in der Bauweise der [Fig. 13](#) exemplarisch als mit dem Steuergerät **35** vereinigt dargestellt ist.

Dem Zeilendetektor **34** ist wieder (optional) ein Blockfilter **33** vorgestellt. Weiter ist dem Zeilendetektor **34** eine (in [Fig. 13](#) nicht dargestellte, da direkt auf den Zeilendetektor **34** aufgebrachte) entlang der x-Achse liegende Schlitzblende vorgeordnet, um die erforderliche konfokale Selektion einer Tiefenebene zu bewirken und dadurch nur die schraffierten Bereiche zu detektieren.

[0094] Der Scanner **28** ermöglicht die Bewegung der Anregungsstrahlungsverteilung über die Probe **24** senkrecht zur optischen Achse, also entlang der x- und y-Achse. Optional kann mit der Rücksetzstrahlungsquelle **41** beispielsweise eine homogene Linie entlang der x-Achse in der Probe **24** erzeugt werden, die ein Umschalten der Farbstoffe aus dem zweiten Zustand **6** in den ersten Zustand **5** ermöglicht, wie dies [Fig. 5](#) veranschaulicht. Diese Linie kann auch ein Beleuchtungsmuster aufweisen, daß passend zu den Proben-Bereichen B2 im zweiten Zustand **6** liegt, da nur diese Bereiche zurückgesetzt werden müssen.

[0095] Das Laserscanningmikroskop gemäß [Fig. 13](#) realisiert also die Verfahrensform gemäß [Fig. 8a](#). Die Tiefe der Minima **45** kann durch die Güte des Gitters bzw. die individuelle Abschwächung der einzelnen Ordnungen erfolgen.

[0096] [Fig. 15a](#) zeigt eine Anordnung zur Realisierung der Verfahrensform gemäß [Fig. 8b](#), wobei vom Laserscanningmikroskop **20** hier nur das Anregungsmodul **21** gezeigt ist, da das Mikroskopmodul **22** ansonsten den bereits geschilderten Aufbau hat. Aus der Lichtquelle **30** werden mittels eines ersten Strahlteilers **53** zwei Teilstrahlen erzeugt, hier senkrecht zur Zeichenebene beabstandet. Ein zweiter Strahlteiler **52** erzeugt insgesamt vier parallel laufende Teilstrahlen. [Fig. 15b](#) zeigt die Anordnung in einem um 90° Grad gedrehten Schnitt. Insgesamt liegen vier Teilstrahlen **54**, **55** gleicher Intensität (gezeichnet sind die Mittelstrahlen) vor. In der Zeichnung nehmen jeweils zwei Teilstrahlen den gleichen Weg, so daß sie verdeckt sind.

[0097] Die Teilstrahlen werden durch Linsen in eine Pupille des Mikroskopmoduls **22** fokussiert, so daß sich innerhalb einer Berandung **56** der Pupille die in [Fig. 16a](#) dargestellte Punktverteilung ergibt. Die vier Teilstrahlen **55**, **54** nehmen die Ecken eines Quadrates ein. In der Probe **24** gelangen die Teilstrahlen zur Interferenz, wodurch senkrecht zur optischen Achse ein Multispotmuster **58** gemäß [Fig. 16b](#) auf der Probe **24** entsteht. Die Tiefe der Nullstellen dieses Multispotmusters **58** kann beispielsweise durch die Änderung der Intensitäten der jeweils diagonal gegenüberliegenden Strahlen **54**, **55** variiert werden. Hierzu sind geeignete einstellbare Abschwächer (nicht gezeigt) für die Teilstrahlen vorgesehen.

[0098] An den Stellen hoher Intensität (helle Bereiche B2) im Multispotmuster **58** der [Fig. 16b](#) gelangt die Probe **24** in den zweiten Zustand **6**. Fluoreszenzstrahlung F entsteht in den Bereichen B1 geringer Intensität (dunkle Bereiche). Die Fluoreszenzstrahlung F wird dann wie üblich am Hauptfarbteiler **29** abgeteilt. Der Detektor **54** ist ein auf das Spotmuster angepaßter Matrixdetektor, optional mit vorgeschalteter Pinholemaske. Die Detektorelemente sind auf die Bereiche B1 ausgerichtet. Der Scanner **28** ermöglicht wiederum die Verschiebung der Anregungsstrahlungsverteilung über die Probe **24** in x- und/oder y-Richtung. [Fig. 17](#) zeigt im unteren Bild das Multispotmuster **58** und darüber das damit angeregte Fluoreszenzmuster **59**.

[0099] Von der Rücksetzlichtquelle **41** kann ein weiterer Strahl **57** in die Pupille fokussiert werden, der damit eine homogene Fläche in der Probe **24** ausleuchtet. Dadurch erfolgt ein Rückschalten der Fluoreszenzmoleküle aus dem zweiten Zustand **6** in den ersten Zustand **5**, wie bereits erläutert zwischen zwei Scanschritten und gegebenenfalls auch innerhalb eines Schanschrittes.

[0100] Der Rücksetzstrahl **47** kann aber auch ein Beleuchtungsmuster aufweisen, das den Bereichen B2 entspricht, da nur diese rückgesetzt werden müssen. Hierzu wird der Strahl **47** analog zu den Teilstrahlen **54**, **55** ebenfalls in vier Teilstrahlen zerlegt und in die Pupille abgebildet, so daß sich innerhalb der Berandung **56** der Pupille beispielsweise die in [Fig. 18](#) gezeigte Verteilung ergibt. Zusätzlich ist die optische Achse der Teilstrahlen **57** der Rücksetzstrahlung R gegenüber der optischen Achse der Anregungsstrahlung A derart verkippt, daß die in der Probe entstehenden Minima des Multispotmusters **58** der Anregungsstrahlung A mit den Maxima des Multispotrücksetzmusters zusammenfallen. Die Ausführungsform gemäß [Fig. 15a](#) in der Variante von [Fig. 18](#) ist ein exemplarisches Beispiel dafür, daß durch geeignete Strukturierung der Rücksetzstrahlung eine proben- bzw. farbstoffschonende Rücksetzung nur in den Bereichen B2 erfolgt.

[0101] Es kommt darauf an, daß die Probe durch geeignete Einstrahlung von Anregungsstrahlung A in Bereiche B1 im ersten Zustand und in Bereiche B2 im zweiten Zustand aufgeteilt wird. Die Überführung von Proben-Bereichen in den zweiten Zustand kann deshalb auch durch zur Auswahl einer Tiefenebene der Probe (vgl. [Fig. 14](#)) eingesetzt werden, so daß Proben-Bereiche B1 nicht zu einem Übersprechen benachbarter Detektorelemente/-regionen beitragen können.

[0102] Für das vorstehend in verschiedenen Varianten geschilderte Verfahren bzw. Mikroskop ist die Einstellung der Leistung der Anregungsstrahlung A abhängig von der Fluoreszenzcharakteristik der Probe

unter besonderer Berücksichtigung der örtlichen Verteilung der Anregungsstrahlung A von Bedeutung. Insbesondere bestimmt die Tiefe eines oder mehrerer Minima **45** und die Höhe der entsprechenden Maxima der Anregungsstrahlung die Verteilung die erreichbare Auflösungssteigerung. Eine Optimierung der Einstellung der örtlichen Leistungsverteilung der Anregungsstrahlung A kann auf zwei Wegen realisiert werden: Bei Kenntnis der Kennlinie **17**, die dazu beispielsweise dem Steuergerät **35** entsprechend zur Verfügung gestellt ist/wird, wird für eine gegebene örtliche Anregungsverteilung der optimale Leistungspegel errechnet und entsprechend eingestellt, beispielsweise durch Ausgabe eines Sollwertes oder sogar direkte Ansteuerung des Anregungsmoduls **21**.

[0103] Alternativ oder zusätzlich kann an einem Testpräparat oder einer Referenzstelle der zu untersuchenden Probe die tatsächliche Auflösung ermittelt und der optimale Leistungspegel bei gegebener Anregungsverteilung in einem iterativen Prozeß ermittelt und dann zur Abbildung der Probe **24** verwendet werden.

[0104] Anstelle einer reinen Leistungsskalierung kann natürlich auch die Verteilung verändert werden, beispielsweise durch entsprechende Einstellung des Phasenelements **39**.

[0105] Die Fluoreszenzcharakteristik der Probe **24**, beispielsweise die Fluoreszenzcharakteristik eines Farbstoffs, kann durch Untersuchung an einem Testpräparat oder einer Referenzstelle der Probe bereits unter späteren Bildgewinnungsbedingungen ermittelt werden. Dazu wird die Leistung der detektierten Fluoreszenzstrahlung F als Funktion der Leistung der Anregungsstrahlung A an einen Punkt oder einem Gebiet der Probe ermittelt. Für eine besonders gute Einstellung ist es günstig, wenn die Fluoreszenzcharakteristik, d. h. die Kennlinie **17** nicht von der Konzentration des fluoreszierenden Materials, beispielsweise des Farbstoffs abhängt (im Gegensatz zur emittierten Leistung der Fluoreszenzstrahlung F). Das Steuergerät **35** des Scanningmikroskops **20** kann dazu aus der ermittelten Kurve **17** oder einer zugeführten bzw. in einem Speicher abgelegten Kurve **17** automatisch die optimale Leistung ermitteln und entsprechend einstellen.

[0106] Die iterative Bestimmung ist immer dann vorteilhaft, wenn die Fluoreszenzeigenschaften stark probenabhängig sind und eine Referenzstelle an der Probe für die Ermittlung der Fluoreszenzcharakteristik vorhanden ist oder nicht gefunden werden kann. In diesem Fall kann man entweder an einem begrenzten Gebiet innerhalb oder außerhalb des interessierenden Probenfeldes oder anhand einer Bildgebung im gesamten abzubildenden Probenfeld eine Leistungsoptimierung vornehmen bzw. durch das Steuergerät **35** ausführen lassen. Anhand eines Gütekriteri-

ums der Auflösung (z. B. der Kontrast in einer ausgewählten Stelle oder die Ausdehnung des im Bild übertragenen Frequenzbereichs im Fourierraum) wird die Anregungsleistung optimiert. Dabei ist es im allgemeinen ausreichend, die Leistung im Minimum der Anregungsverteilung bzw. eine räumlich breit verteilte Untergrundleistung anzupassen.

[0107] Die Anregungsstrahlung A und die Rücksetzungsstrahlung R können aus einer einzigen Strahlungsquelle erzeugt werden. Die Strahlungsquelle kann entweder direkt umschaltbar oder mit einer nachgeordneten Selektionsanordnung versehen sein.

Patentansprüche

1. Auflösungssteigertes Lumineszenz-Mikroskopieverfahren, bei dem

– eine Probe (P, **24**) durch Einstrahlung von Anregungsstrahlung (A) zur Emission von bestimmter Lumineszenzstrahlung (F) angeregt wird und ein Bild der lumineszierenden Probe (P, **24**) gewonnen wird, wobei

– die lumineszierende Probe (P, **24**) aus einem ersten Lumineszenz-Zustand (**5**), in dem die Anregbarkeit zur Emission der bestimmten Lumineszenzstrahlung (F) mit steigender Anregungsstrahlungsleistung bis zu einem Maximalwert (**18**), welcher einem Anregungsstrahlungsleistungs-Schwellwert (**19**) zugeordnet ist, steigt, in einen zweiten Lumineszenz-Zustand (**6**) überführbar ist, in dem die Probe (P, **24**) gegenüber dem ersten Zustand (**5**) verminderte Anregbarkeit zur Emission der bestimmten Lumineszenzstrahlung (F) aufweist, wobei die Probe (P, **24**) durch Einstrahlung von Anregungsstrahlungsleistung oberhalb des Schwellwertes (**19**) in den zweiten Zustand (**6**) bringbar ist,

– die Probe (P, **24**) in Teil-Bereichen (B1) in den ersten Zustand (**5**) und in angrenzenden Teil-Bereichen (B2) in den zweiten Zustand (**6**) versetzt wird, indem die Einstrahlung von Anregungsstrahlung (A) mit einer Anregungsstrahlungsverteilung erfolgt, die zumindest ein örtliches Leistungsmaximum über dem Schwellwert (**19**) und zumindest ein örtliches, lokales Leistungsminimum (**45**) unter dem Schwellwert aufweist,

– das Bild der lumineszierenden Probe (P, **24**) Proben-Bereiche (B1) im ersten Zustand (**5**) und Proben-Bereiche (B2) im zweiten Zustand (**6**) umfaßt, wobei zum Bild der lumineszierenden Probe (P, **24**) überwiegend Proben-Bereiche (B1) im ersten Zustand (**5**) beitragen und dadurch das Bild eine gegenüber der Anregungsstrahlungsverteilung gesteigerte Ortsauflösung hat.

2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem eine Probe (P, **24**) verwendet wird, die nach Überführung in den zweiten Zustand (**6**) wieder in den ersten Zustand (**5**) zurückkehrt, entweder durch aktive Einwir-

kung oder spontan.

3. Verfahren nach Anspruch 2, bei dem eine Rücksetzstrahlung (R) eingestrahlt wird, die die Probe (P, **24**) aus dem zweiten Zustand (**6**) in den ersten Zustand (**5**) zurücksetzt und die von der Anregungsstrahlung (A) verschiedene optische Eigenschaften hat.

4. Verfahren nach einem der obigen Ansprüche, bei dem das Bild durch Abscannen der Probe (P, **24**) mit einem Spot-, Zeilen- oder Multispotmuster (**58**) gewonnen wird und insbesondere zwischen zwei Scanschritten Rücksetzstrahlung (R) eingestellt wird.

5. Verfahren nach einem der obigen Ansprüche, bei dem eine Probe (P, **24**) verwendet wird, die bei einer Anregungsstrahlungsleistung über dem Schwellwert (**19**) nicht luminesziert, Lumineszenzstrahlung mit anderen Eigenschaften als die bestimmte Lumineszenzstrahlung (F) abstrahlt und/oder geänderte, zu verminderter Lumineszenz führende Eigenschaften aufweist.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, bei dem die Anregungsstrahlungsverteilung beugungsbegrenzt ist.

7. Verfahren nach Anspruch 6, bei dem eine torusförmig verteilte Anregungsstrahlung (A) verwendet wird und vorzugsweise zusätzlich bei der Detektion der Lumineszenzstrahlung (F) außerhalb des Torus liegende Proben-Bereiche ausgeblendet werden.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, bei dem die Anregungsstrahlungsverteilung (A) eine linienförmige oder flächige strukturierte Probenbeleuchtung, insbesondere gemäß eines Streifen- oder Kreuzgitters, aufweist sowie bei dem eine ortsauflöste Detektion zur Bildgewinnung verwendet wird.

9. Verfahren nach einem der obigen Ansprüche, bei dem eine konfokale Detektion (D) von im ersten Zustand (**5**) befindlichen Proben-Bereichen (B1) durchgeführt wird.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, bei dem eine Tiefenauflösungssteigerung entlang der optischen Achse (OA) erfolgt, indem das Leistungsminimum (**45**) unter dem Schwellwert (**19**) und das Leistungsmaximum über dem Schwellwert (**19**) entlang der optischen Achse (OA) benachbart sind.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, bei dem eine Tiefenauflösungssteigerung entlang der optischen Achse erfolgt, indem zuerst in einem die Fokusebene enthaltenden Tiefenbereich Anregungsstrahlung (A) mit einer Leistung über dem Schwellwert eingestrahlt wird, in die Fokusebene Rücksetzstrahlung (R) eingestrahlt wird und anschließend die

Anregungsstrahlung (A) mit der Anregungsstrahlungsverteilung eingestrahlt wird, wobei das Leistungsminimum (**45**) im Fokusbereich liegt.

12. Verfahren nach einem der obigen Ansprüche, bei dem entweder in Proben-Bereichen (B1), die den ersten Zustand (**5**), oder in Proben-Bereichen (B2), die den zweiten Zustand (**6**) aufweisen, die Anregungsstrahlungsleistung gemäß einer Referenzfrequenz moduliert wird, und diese Referenzfrequenz bei der Detektion der Lumineszenzstrahlung im Wege der Lock-In-Technik verwendet wird.

13. Verfahren nach Anspruch 12, bei dem zusätzliche aus einem Gleichsignalanteil (S) ein niedrig aufgelöstes Bild gewonnen wird.

14. Verfahren nach einem der obigen Ansprüche, bei dem eine fluoreszierende Probe (P, **24**) verwendet wird, insbesondere eine mit mindestens einem Fluorophor versehene Probe (P, **24**).

15. Verfahren nach einem der obigen Ansprüche, bei dem zusätzlich ein Bild mit Anregungsstrahlungsverteilung ohne Leistungsminimum (**45**) unter dem Schwellwert aufgenommen und zur Differenzbildung verwendet wird.

16. Verfahren nach einem der obigen Ansprüche, bei dem eine Lumineszenzkennlinie (**17**), die emittierte Lumineszenzleistung als Funktion der Anregungsstrahlungsleistung angibt, ausgewertet, daraus der Schwellwert (**19**) ermittelt und/oder die Anregungsstrahlungsverteilung kennlinienabhängig gewählt wird.

17. Verfahren nach einem der obigen Ansprüche, bei dem die Anregungsstrahlungsverteilung iterativ unter Auswertung der Bildauflösung optimiert wird.

18. Mikroskop zur auflösungsgesteigerten Lumineszenz-Mikroskopie, das aufweist:

- Mittel (**21**, **22**) zur Anregung von Lumineszenz, die Anregungsstrahlung (A) auf die Probe (P, **24**) einstrahlen und damit die Emission bestimmter Lumineszenzstrahlung (F) in der Probe (P, **24**) anregen,
- Mittel (**22**, **23**) zur Gewinnung eines Bildes der lumineszierenden Probe (P, **24**),
- wobei die Mittel zur Anregung die Anregungsstrahlung (A) mit einer bestimmten Anregungsstrahlungsverteilung einstrahlen, die zumindest ein örtliches Leistungsmaximum aufweist, das über einem Schwellwert (**19**) liegt, und zumindest ein örtliches, lokales Leistungsminimum (**45**) aufweist, das unter dem Schwellwert (**19**) liegt,
- wobei der Schwellwert (**19**) zwei Lumineszenz-Regionen (**5**, **6**) der Probe (P, **24**) trennt, eine erste, bei Anregungsstrahlungsleistungen unterhalb des Schwellwertes (**19**) vorliegende Zustands-Region (**5**), in der die Anregbarkeit zur Emission der be-

stimmten Lumineszenzstrahlung (F) mit steigender Anregungsstrahlungsleistung bis zu einem Maximalwert (18), welcher am Schwellwert (19) erreicht wird, steigt, und einer zweiten bei und/oder nach Anregungsstrahlungsleistungen oberhalb des Schwellwertes (19) vorliegende Zustands-Region (6), in der die Probe (P, 24) eine gegenüber der ersten Region (5) verminderte Anregbarkeit zur Emission der bestimmten Lumineszenzstrahlung (F) aufweist, und – wobei die Mittel zur Bildgewinnung Proben-Bereiche (B1) in der ersten Region (5), die mit Anregungsstrahlungsleistung unterhalb des Schwellwertes (19) bestrahlt wurden, und Proben-Bereiche (B2) in der zweiten Region (6), die mit Anregungsstrahlungsleistung oberhalb des Schwellwertes (19) bestrahlt wurden, erfassen, wobei zum Bild der Probe überwiegend Proben-Bereiche (B1) in der ersten Region (5) beitragen und dadurch das Bild eine gegenüber der Anregungsstrahlungsverteilung gesteigerte Ortsauflösung hat.

19. Mikroskop nach Anspruch 18, mit einer Anregungsstrahlungsquelle (30), welche die Anregungsstrahlung (A) abgibt, und einer der Anregungsstrahlungsquelle nachgeordneten Einrichtung (36–40), welche einen Anregungsstrahl abgibt, der ein Strahlprofil mit dem Leistungsminimum (45) hat, das eine unter dem Schwellwert (19) liegende Anregungsstrahlungsleistung hat.

20. Mikroskop nach Anspruch 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, daß eine Scannereinrichtung (28) die Probe (P, 24) mit Anregungsstrahlung (A) abrastert.

21. Mikroskop nach Anspruch 20, wobei die Anregungsstrahlungsverteilung mindestens ein beugungsbegrenztes Punktbild aufweist.

22. Mikroskop nach Anspruch 21, wobei die Anregungsstrahlungsverteilung mindestens einen linienförmigen oder streifen- oder gitterförmigen Proben-Bereich mit Anregungsstrahlung (A) beleuchtet, wobei die Anregungsstrahlungsleistung in Teilen des Streifens bzw. Gitters über dem Schwellwert (19) und in Teilen des Streifen bzw. Gitters unter dem Schwellwert (19) liegt.

23. Mikroskop nach einem der Ansprüche 18 bis 22, wobei die Anregungsstrahlungsverteilung das örtliche Leistungsminimum (45) und das örtliche Leistungsminimum entlang der optischen Achse (OA) benachbart sind.

24. Mikroskop nach einem der Ansprüche 18 bis 23, gekennzeichnet durch Mittel (41, 42) zum Rücksetzen der Probe (24) aus der zweiten (6) in die erste Zustands-Region (5), die eine Strahlquelle (41), welche Rücksetzstrahlung (R) mit von der Anregungsstrahlung (A) verschiedenen optischen Eigenschaf-

ten aussendet, und eine Optik (42) zum Einkoppeln der Rücksetzstrahlung (R) aufweisen.

25. Mikroskop nach einem der Ansprüche 18 bis 24, gekennzeichnet durch einen Intensitätsmodulator (37, 38, 49, 35), der die Verteilung der Anregungsstrahlung (A) mit einer Referenzfrequenz moduliert, und einen in den Mitteln zur Bildgewinnung vorgesehenen oder damit verbundenen Lock-In-Verstärker (48), der die Referenzfrequenz auswertet und Hintergrundstrahlung (S) reduziert.

26. Mikroskop nach Anspruch 25, mit einem Gleichsignalausgang zur Gewinnung eines zusätzlichen niedrig aufgelösten Bildes.

27. Mikroskop nach einem der Ansprüche 18 bis 26 mit einem Steuergerät (35), das das Mikroskop zur Ausführung eines der Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 17 ansteuert.

28. Mikroskop nach einem der Ansprüche 18 bis 27, mit einem Steuergerät (35), das die Mittel zur Anregung und die Mittel zur Bildgewinnung ansteuert bzw. ausliest und die Anregungsstrahlungsverteilung zur Optimierung der Bildauflösung einstellt.

29. Mikroskop nach Anspruch 28, bei dem das Steuergerät (35) eine Speicher- oder Dateneingabe-einrichtung aufweist, über die dem Steuergerät eine Lumineszenzkennlinie (17) verfügbar ist, wobei die Lumineszenzkennlinie (17) die emittierte Lumineszenzleistung als Funktion der Anregungsstrahlungsleistung wiedergibt und wobei das Steuergerät (35) aus der Lumineszenzkennlinie (17) den Schwellwert (19) ermittelt und/oder die Anregungsstrahlungsverteilung kennlinienabhängig einstellt.

30. Mikroskop nach Anspruch 28, bei dem das Steuergerät (35) aus dem Bild der Probe (P, 24) die Auflösung ermittelt und die Anregungsstrahlungsverteilung iterativ zur Optimierung der Bildauflösung einstellt.

Es folgen 15 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

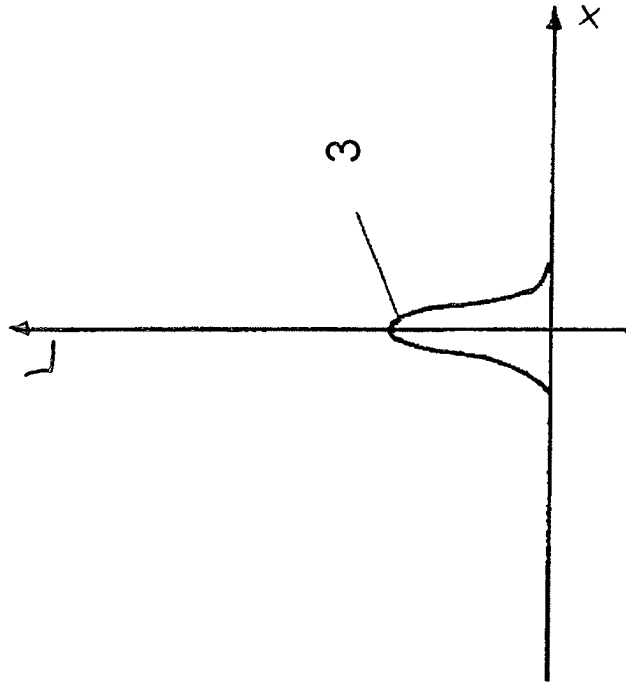


Fig. 1b

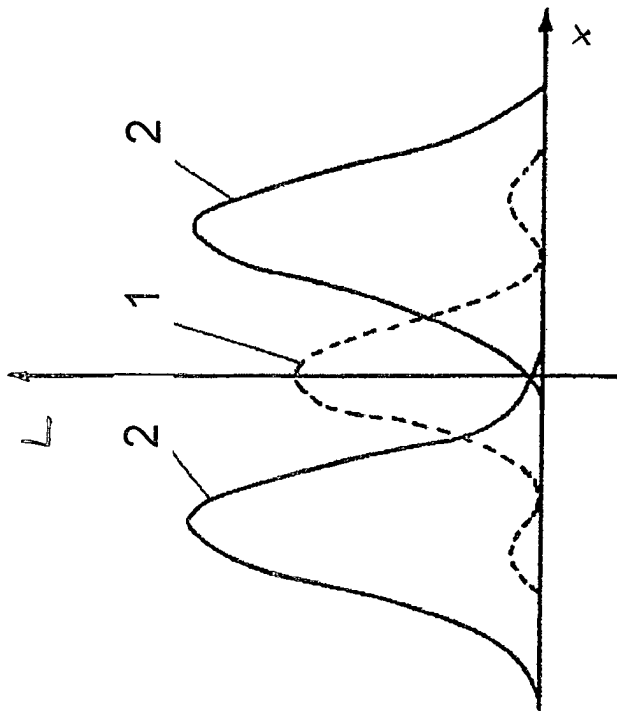


Fig. 1a

Stand der
Technik

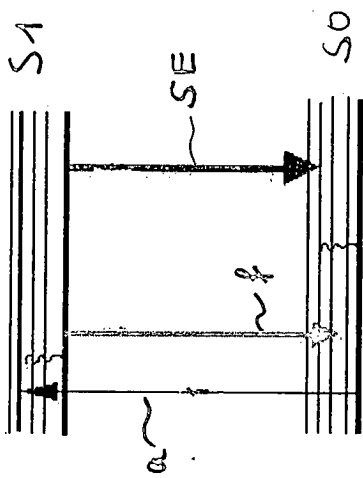


Fig. 2a

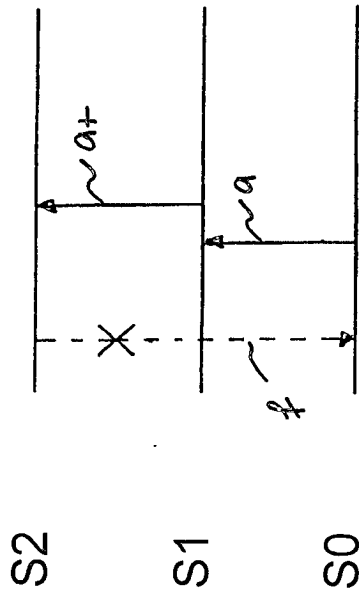


Fig. 2b

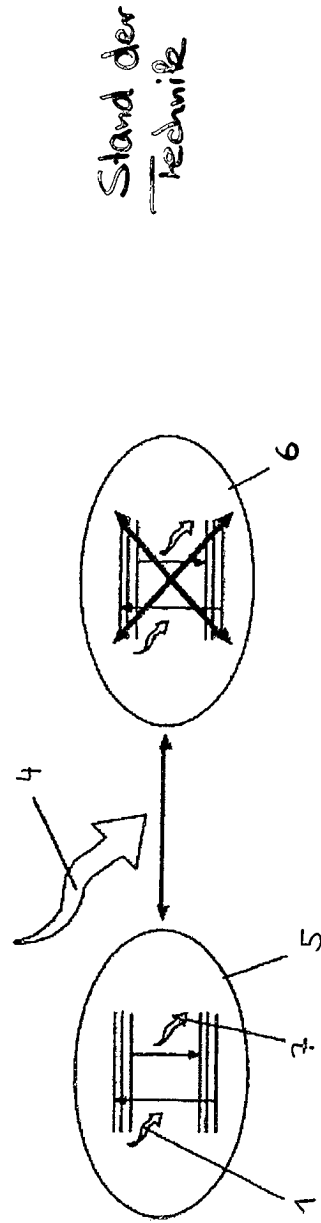


Fig. 2c

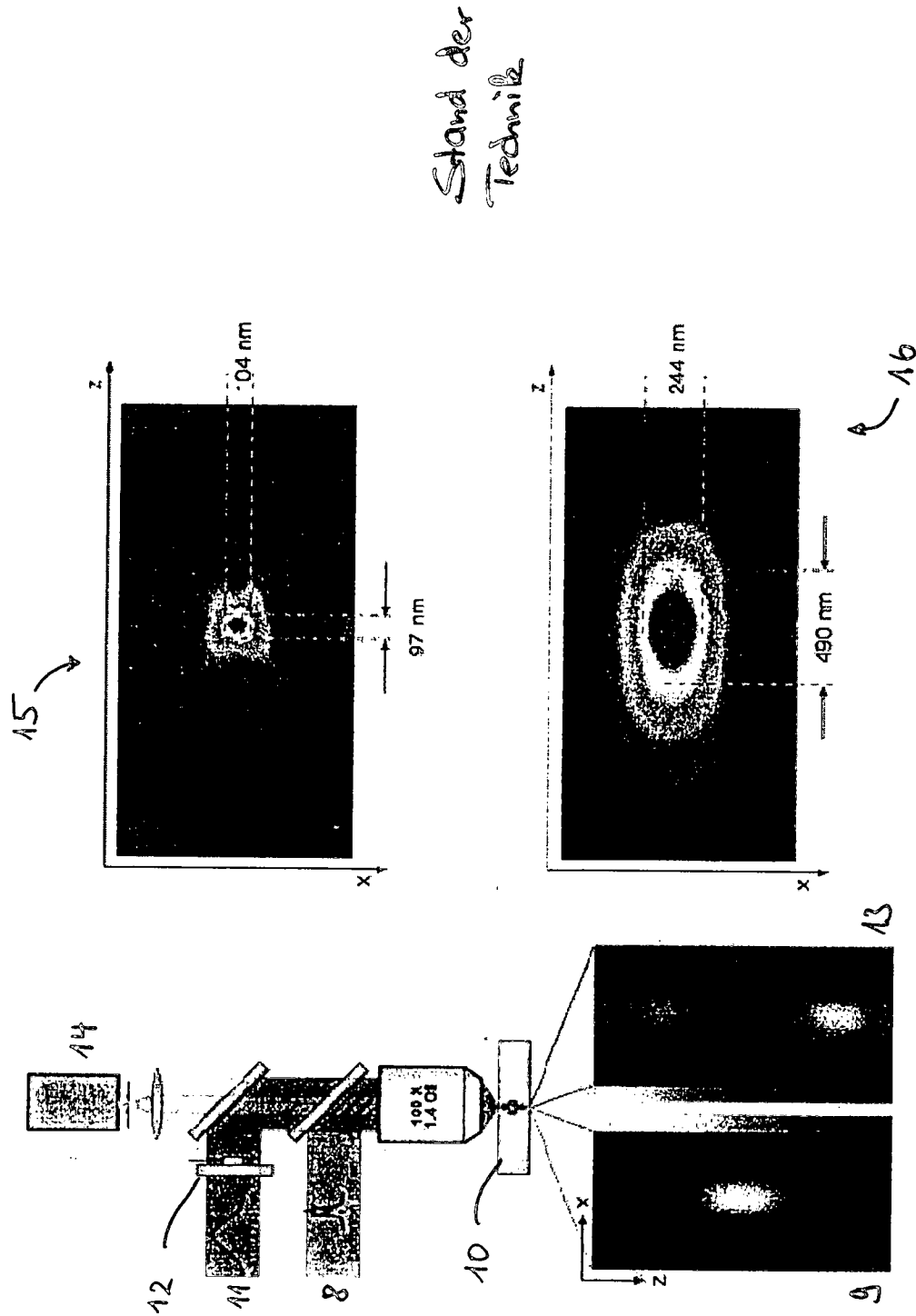
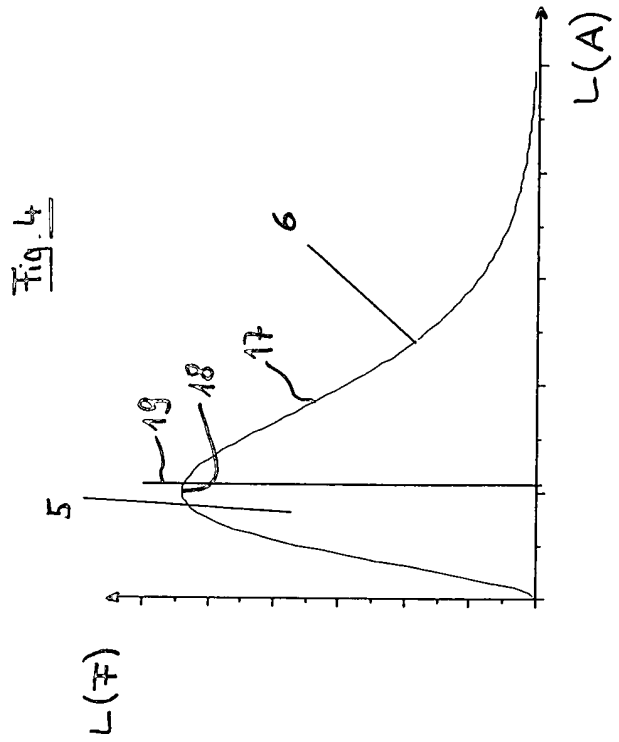
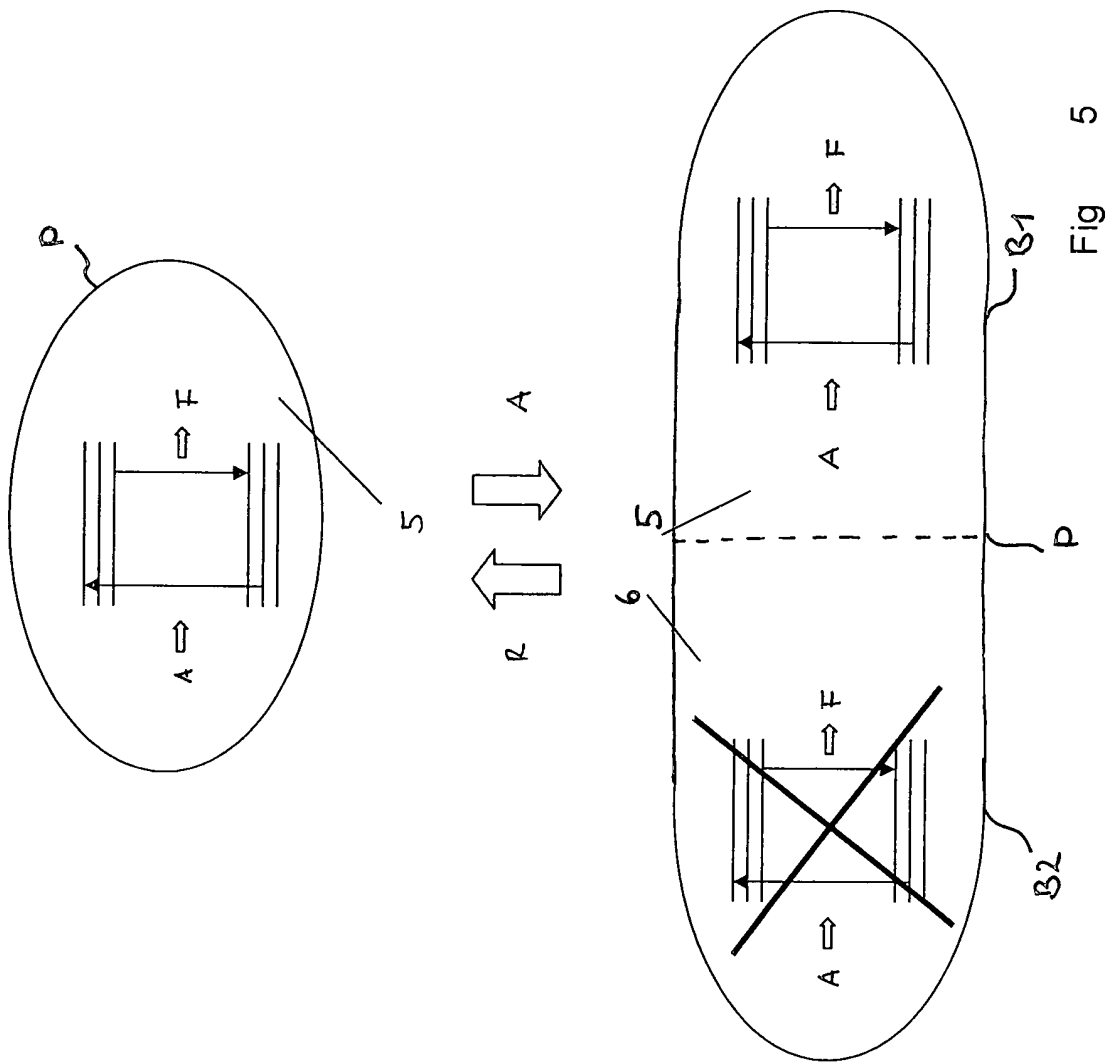


Fig 3



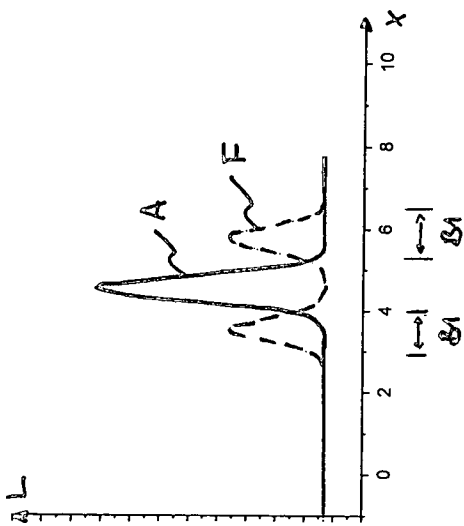


Fig. 6a

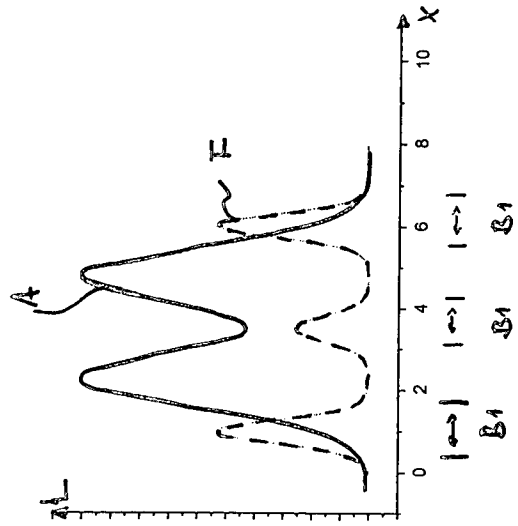
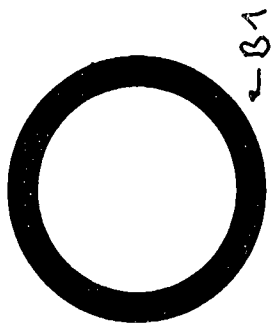
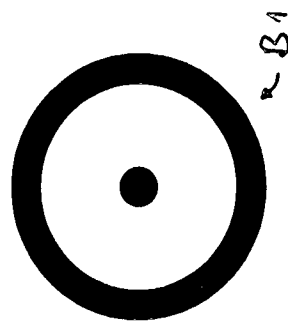


Fig. 6b



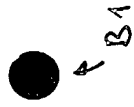
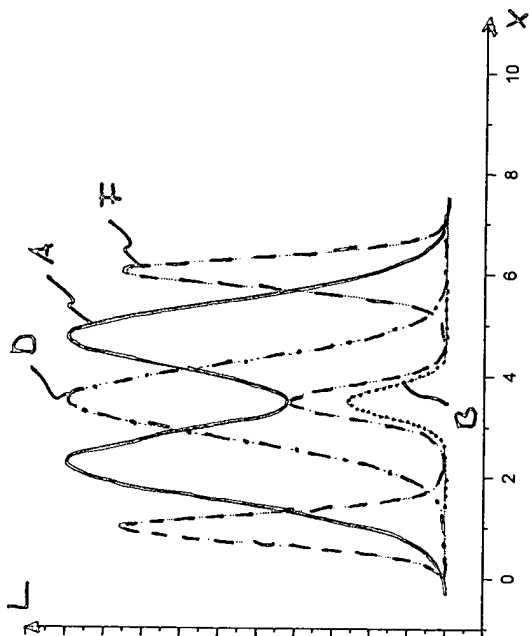


Fig 7

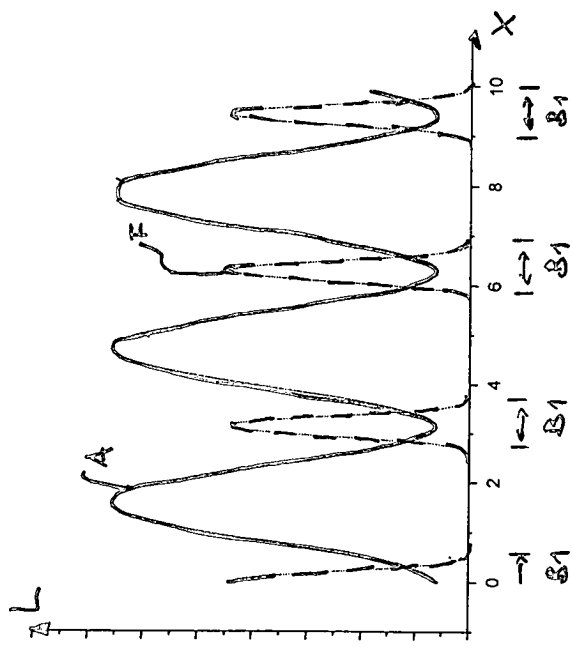


Fig. 8a

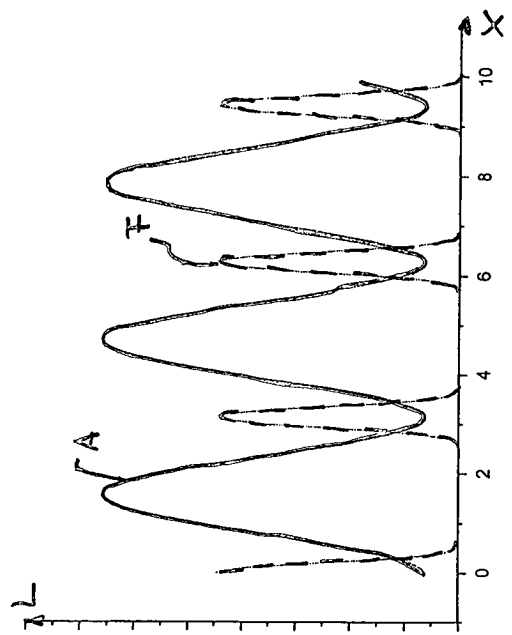
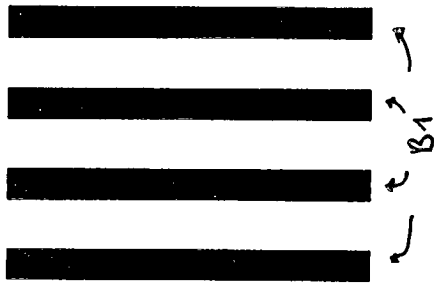
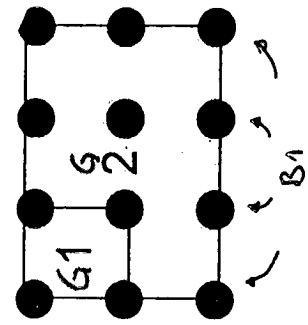


Fig. 8b



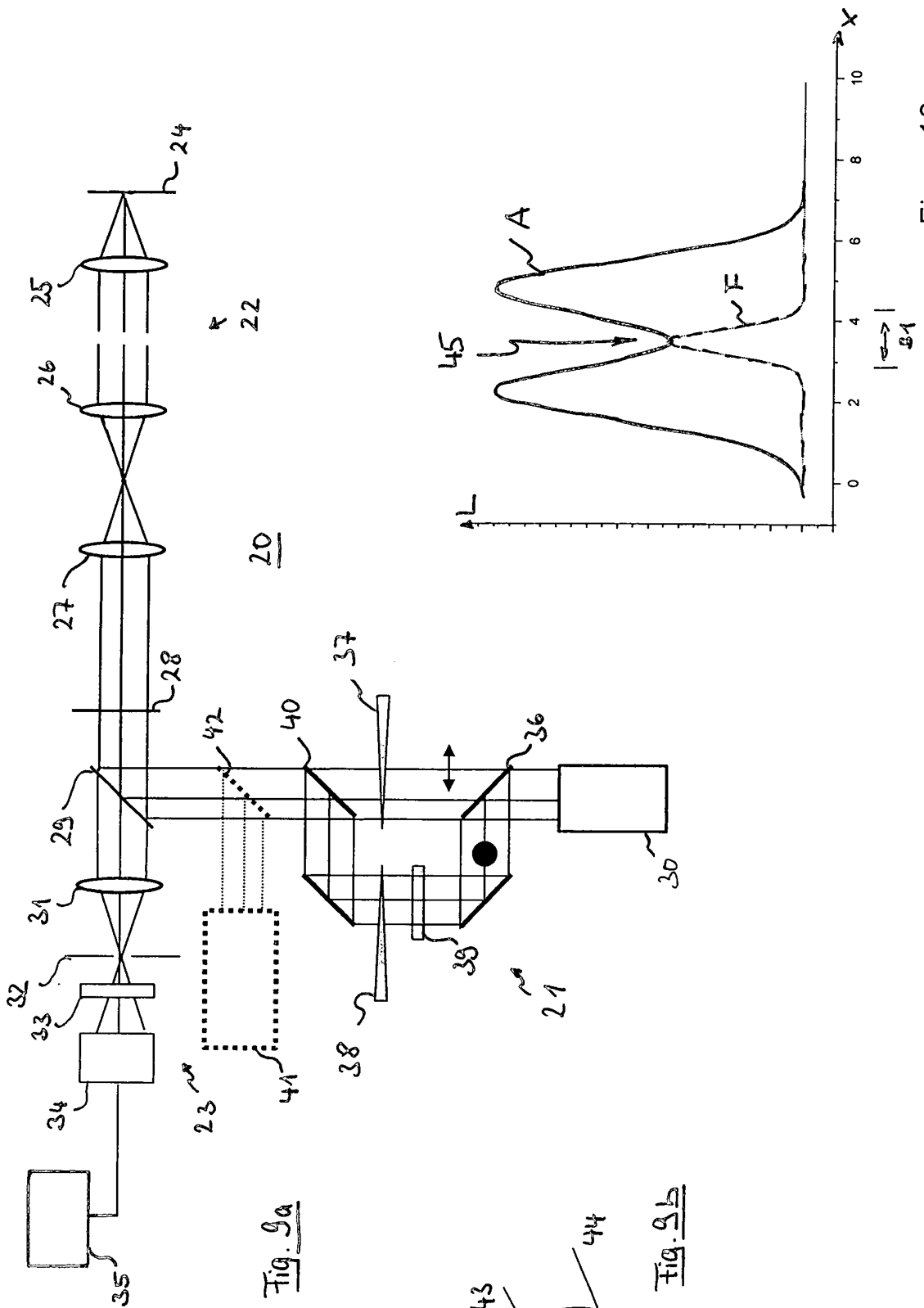
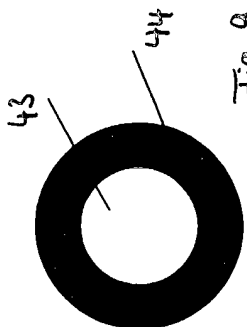


Fig. 9a

Fig. 9b



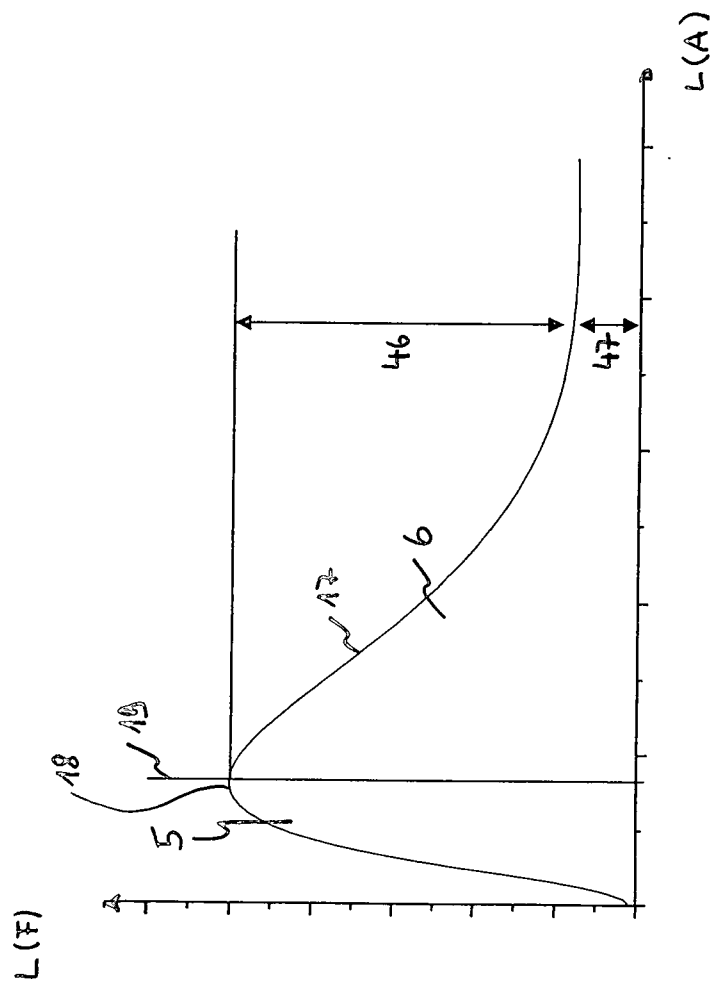


Fig. 11a

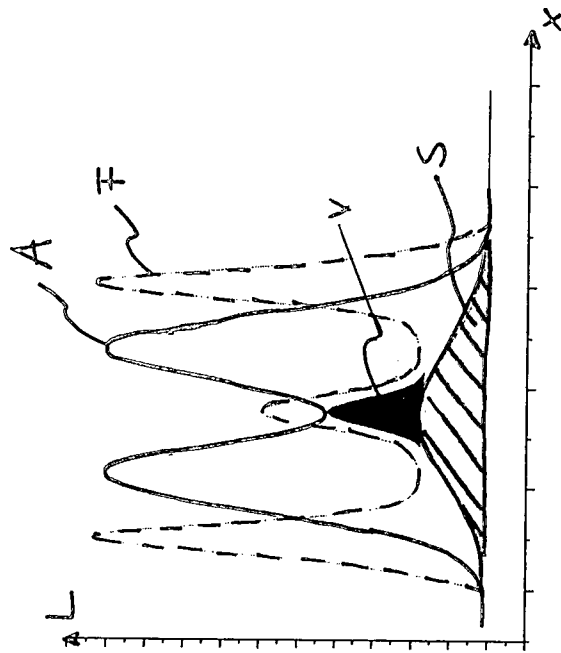


Fig. 11b

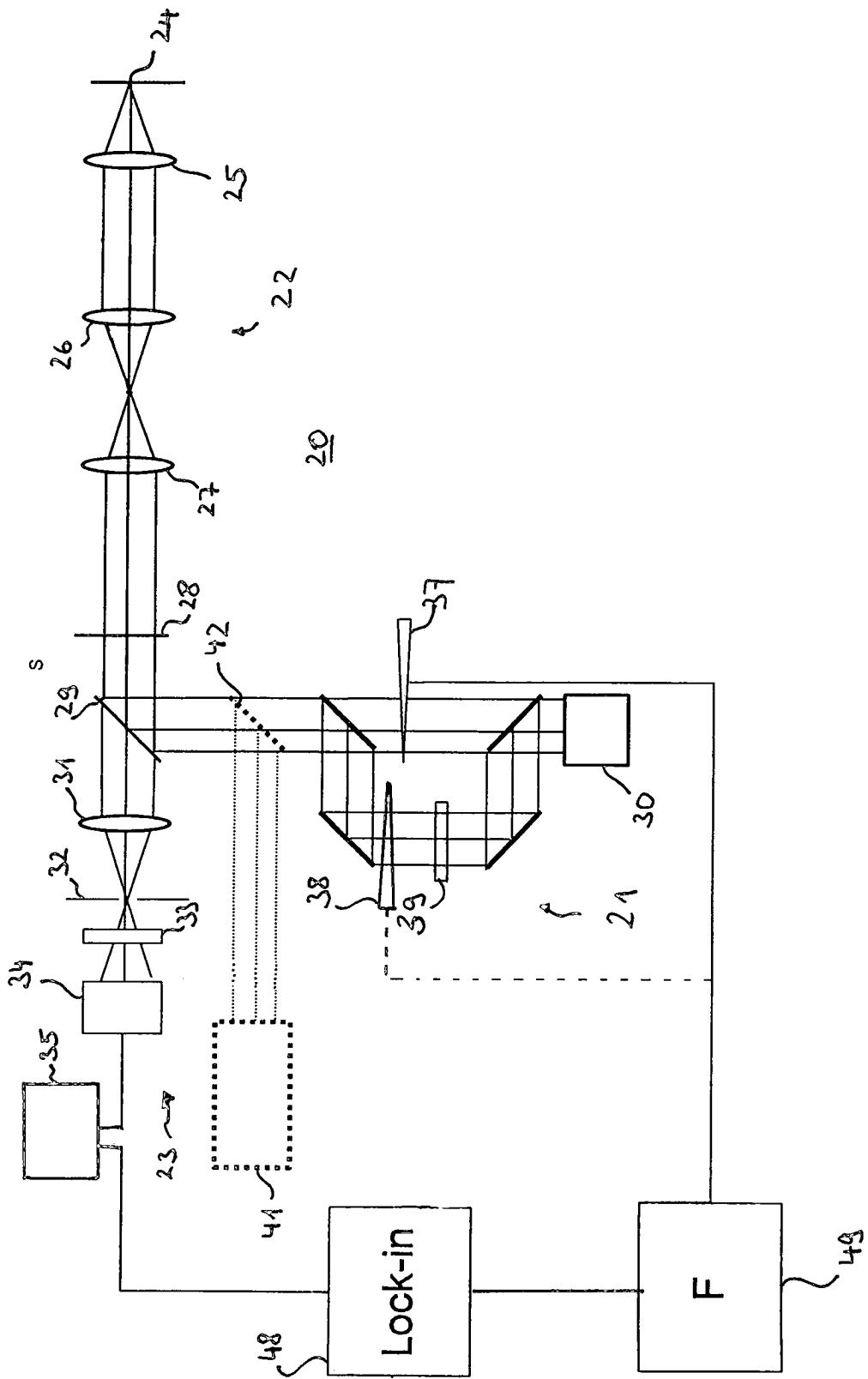


Fig 12

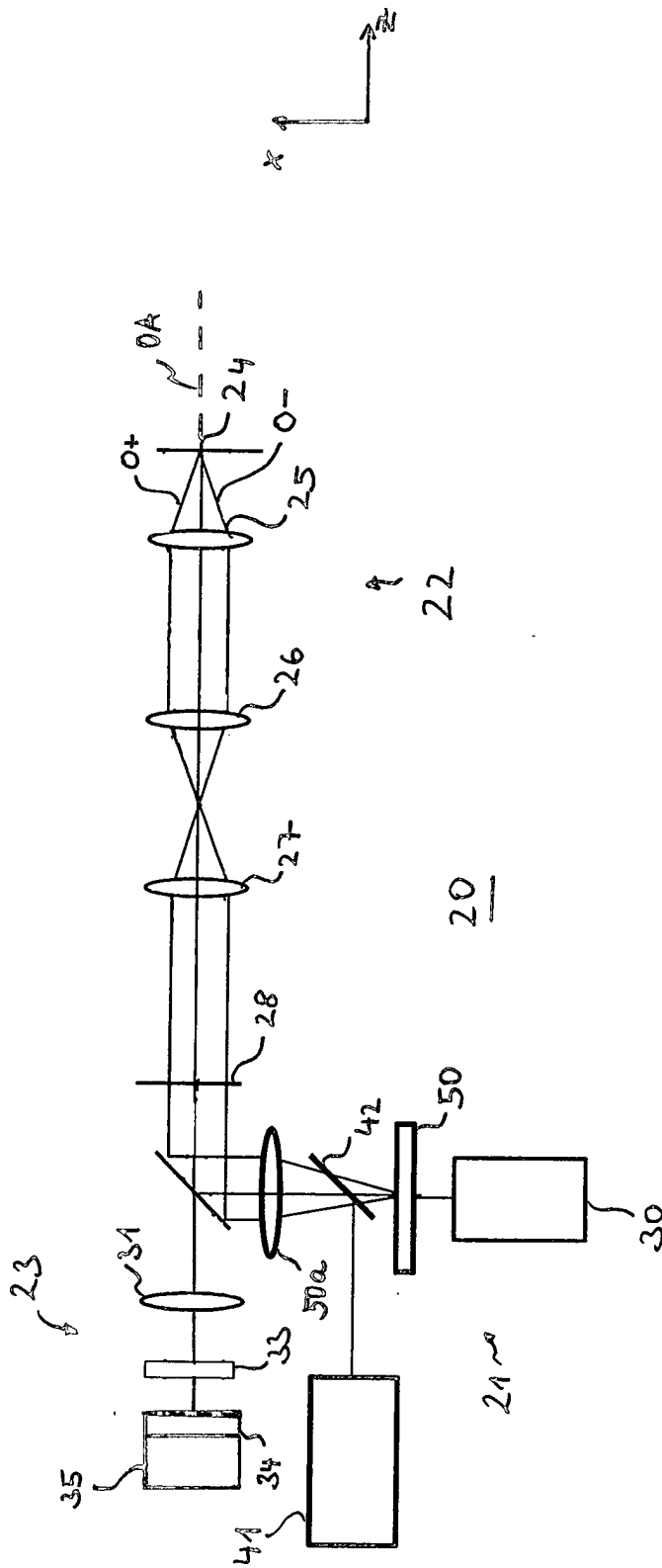


Fig 13

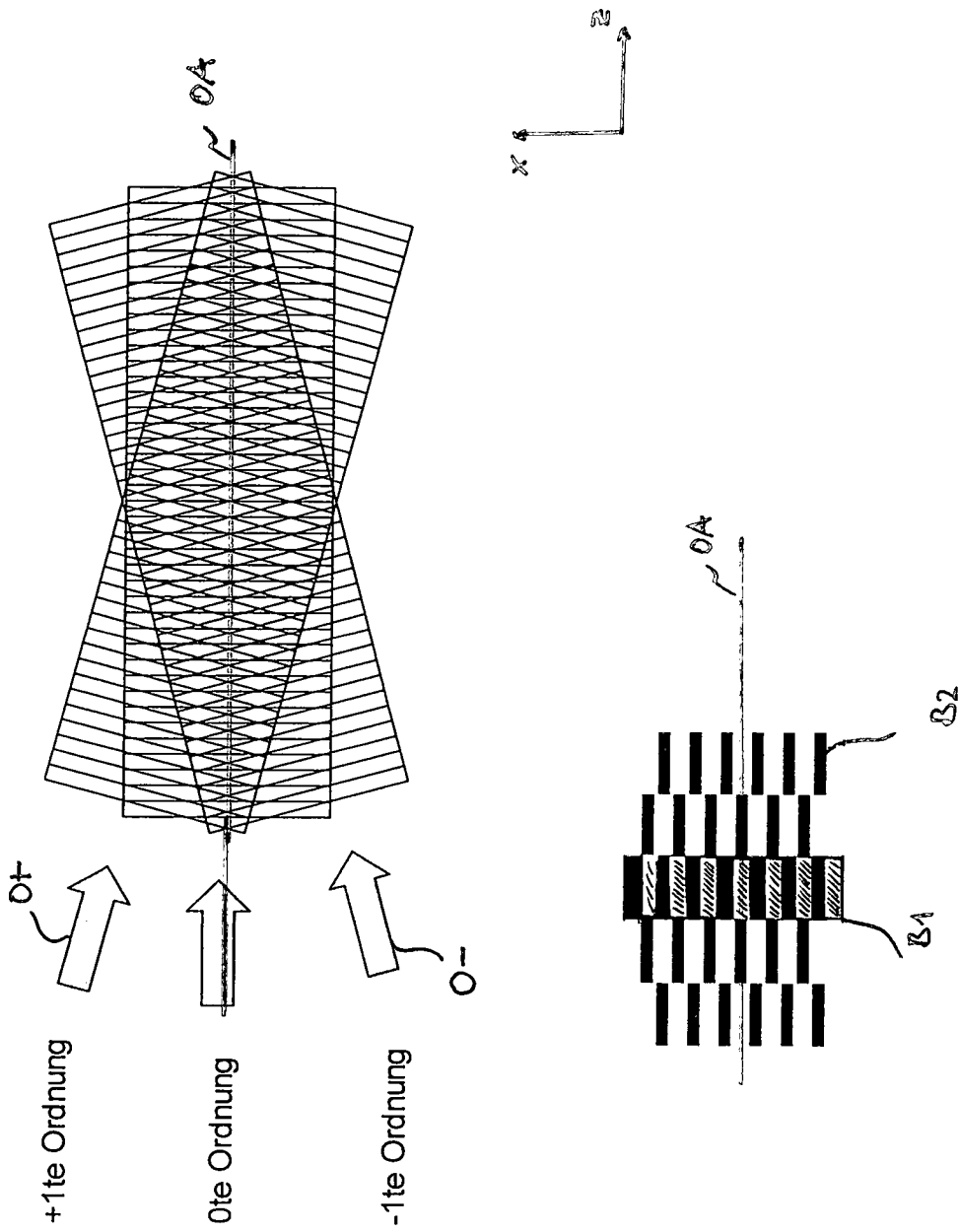
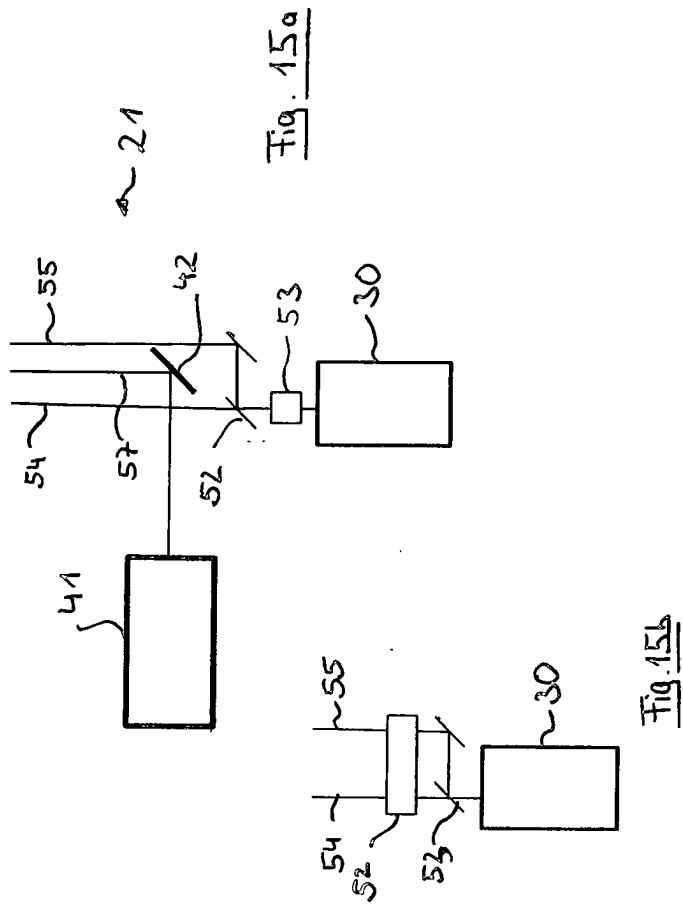


Fig 14



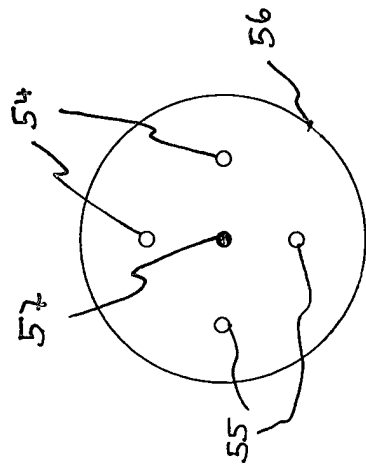


Fig. 16a

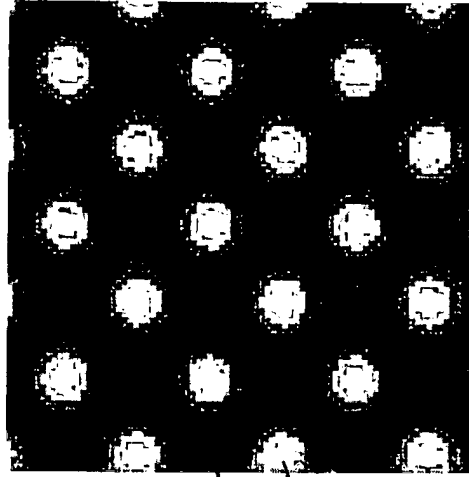
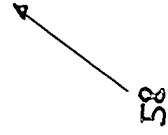


Fig. 16b



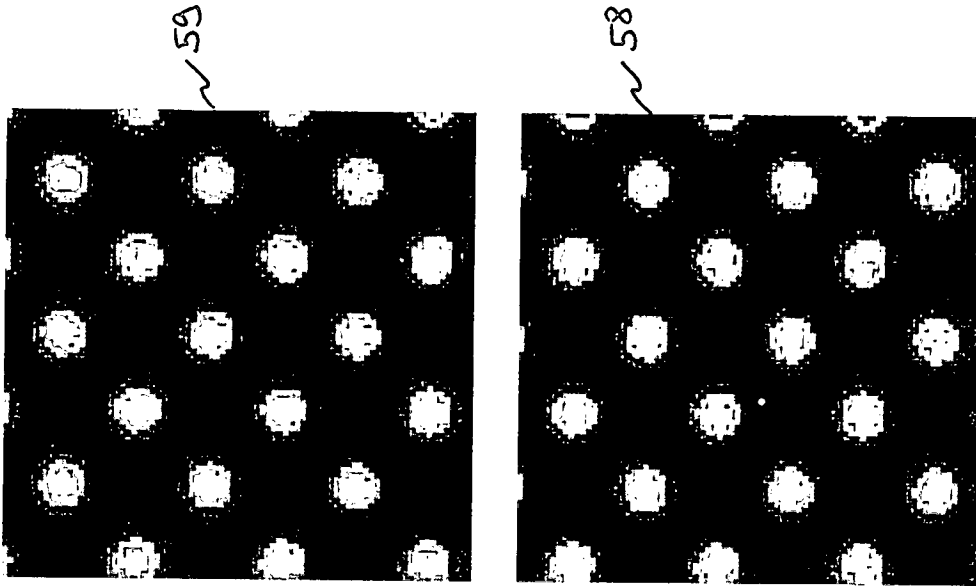


Fig. 17

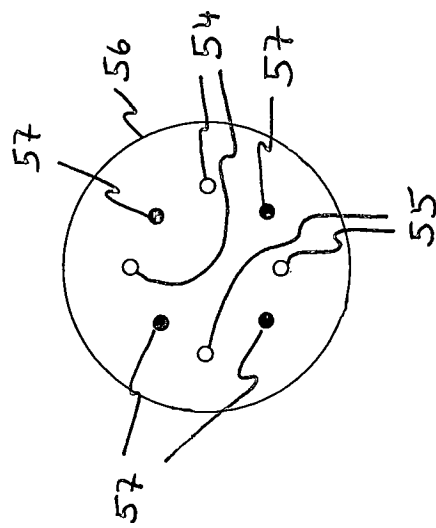


Fig. 18