



(10) **DE 10 2015 121 920 A1** 2017.06.22

(12) **Offenlegungsschrift**

(21) Aktenzeichen: **10 2015 121 920.4**
(22) Anmeldetag: **16.12.2015**
(43) Offenlegungstag: **22.06.2017**

(51) Int Cl.: **G01N 21/64** (2006.01)
G02B 21/06 (2006.01)
G02B 21/36 (2006.01)

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

(74) Vertreter:
**Patentanwälte GEYER, FEHNERS & PARTNER
mbB, 80687 München, DE**

(72) Erfinder:
Kalkbrenner, Thomas, Dr., 07743 Jena, DE

(56) Ermittelte Stand der Technik:

DE 21 2009 000 043 U1
DE 11 2009 000 698 T5
US 2011 / 0 025 831 A1
US 2012 / 0 313 012 A1

US 2014 / 0 184 777 A1
US 2014 / 0 198 198 A1
WO 2015/ 022 146 A1
WO 2016/ 049 544 A1

**Lemmer, P.; Gunkel, M.; Baddeley, D.;
Kaufmann, R.; Urich, A.; Weiland, Y.; Reymann,
J.; Müller, P.; Hausmann, M.; Cremer, C.: SPDM:
light microscopy with single-molecule resolution
at the nanoscale. In: Appl. Phys. B., Lasers and
Optics, 2008, DOI 10.1007/s00340-008-3152-x**

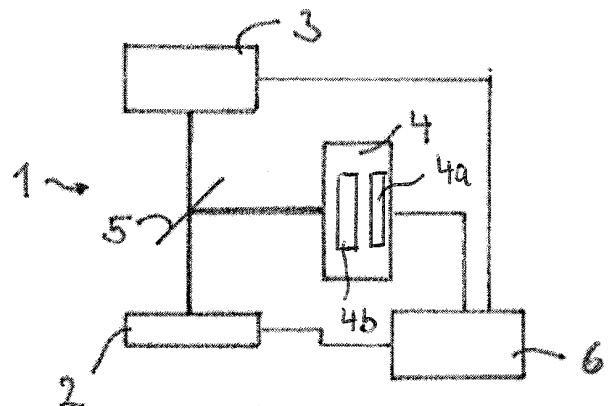
Rechercheantrag gemäß § 43 Abs. 1 Satz 1 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Hochauflösendes Kurzzeit-Mikroskopieverfahren und hochauflösendes Kurzzeit-Mikroskop**

(57) Zusammenfassung: Es wird beschrieben ein hochauflösendes Kurzzeit-Mikroskopieverfahren einer Fluoreszenz-emitter (11) enthaltenden Probe (2), bei dem Fluoreszenz-emitter verwendet werden, die einen ersten und einen zweiten Zustand aufweisen, wobei der erste Zustand ein Hellzustand (H) ist, in dem die Fluoreszenz-emitter (11) auf Einstrahlung von Anregungsstrahlung (a) hin Fluoreszenzstrahlung (f) abgeben, und der zweite Zustand ein Dunkelzustand (D) ist, in dem die Fluoreszenz-emitter (11) auf Einstrahlung von Anregungsstrahlung (a) hin die Fluoreszenzstrahlung (f) nicht abgeben, wobei die Fluoreszenz-emitter (11) durch Einstrahlung von Anregungsstrahlung (a) aus dem Hellzustand (H) in den Dunkelzustand (D) gebracht werden können und der Dunkelzustand (D) eine bestimmte Lebensdauer (td) hat, nach der die Fluoreszenz-emitter (11) von alleine in den Hellzustand (H) zurückkehren, die Probe (2) und damit die Fluoreszenz-emitter (11) im Weitfeld mit Anregungsstrahlung (a) einer Intensität beleuchtet wird/ werden und dadurch die Fluoreszenz-emitter (11) zu einem Blinken (B) angeregt werden, in dem sie mit einer Blinkfrequenz (fB) zwischen Hellzustand (H) und Dunkelzustand (D) hin- und herwechseln, die blinkende Probe (2) mit einer Ortsauflösung im Weitfeld abgebildet und mit einer Kamera (4) detektiert wird, die Intensität der Anregungsstrahlung (a) so eingestellt wird, dass bezogen auf die Ortsauflösung in den Einzelbildern (14) mindestens einige Fluoreszenz-emitter (11) isoliert sind, und die Intensität der Anregungsstrahlung (a) und eine Bildwiederholfrequenz der Kamera (4) so aufeinander abgestimmt werden, dass die Bildwiederholfrequenz, mit der die Einzelbilder (14) erzeugt wer-

den, nicht geringer ist als die Blinkfrequenz (fB), und die Einzelbilder einer Lokalisierungsanalyse (S4) unterzogen werden, wobei Ortsangaben für isolierte Fluoreszenz-emitter (11) in den Einzelbildern (14) mit einer Genauigkeit bestimmt werden, die über die Ortsauflösung hinausgeht.



Beschreibung

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur hochauflösenden Kurzzeit-Lokalisierungsmikroskopie einer Fluoreszenzmitter enthaltenden Probe, bei dem die Fluoreszenzmitter in der Probe zur Abgabe von Fluoreszenzstrahlung angeregt werden und die Probe mit einer Ortsauflösung im Weitfeld abgebildet wird, die Anregung so bewirkt wird, dass bezogen auf die Ortsauflösung mindestens einige Fluoreszenzmitter isoliert sind, und in einer Lokalisierungsanalyse Ortsangaben für die isolierten Fluoreszenzmitter mit einer Genauigkeit bestimmt wird, die über die Ortsauflösung hinausgeht.

[0002] Die Erfindung bezieht sich weiter auf ein hochauflösendes Mikroskop zur Kurzzeit-Lokalisierungsmikroskopie einer Fluoreszenzmitter enthaltenden Probe, das eine Anregungseinrichtung, die ausgebildet ist, die Fluoreszenzmitter in der Probe zur Abgabe von Fluoreszenzstrahlung anzuregen, und eine Abbildungseinrichtung aufweist, die ausgebildet ist, die Probe mit einer Ortsauflösung abzubilden, wobei die Anregungseinrichtung so ausgebildet ist, dass bezogen auf die Ortsauflösung mindestens einige Fluoreszenzmitter in der Abbildung isoliert sind, und das Mikroskop eine Lokalisierungsanalyseeinrichtung aufweist, die ausgebildet ist, eine Ortsangabe für die isolierten Fluoreszenzmitter mit einer Genauigkeit zu bestimmen, die über die Ortsauflösung hinausgeht.

[0003] Im Stand der Technik sind verschiedene Verfahren zur Überwindung der Beugungsgrenze in der Mikroskopie entwickelt worden. Aus der WO 2006/127692 oder der DE 102006021317 A1 ist ein mit PALM abgekürztes Verfahren (photo activated localization microscopy) bekannt, das eine Markierungssubstanz zur Abbildung einer Probe verwendet, welche z.B. mittels optischer Strahlung aktiviert werden kann. Nur im aktivierten Zustand kann die Markierungssubstanz bestimmte Fluoreszenzstrahlung abgeben. Nicht aktivierte Moleküle der Markierungssubstanz senden auch nach Einstrahlung von Anregungsstrahlung keine oder zumindest keine merkliche Fluoreszenzstrahlung ab. Man bezeichnet deshalb die Aktivierungsstrahlung allgemein als Umschaltsignal und die Moleküle als Fotoschalter. Im PALM-Verfahren wird nun das Umschaltsignal so aufgebracht, dass zumindest ein gewisser Anteil der aktivierten Markierungsmoleküle von benachbarten aktivierten Molekülen so beabstandet ist, dass diese Markierungsmoleküle gemessen an der optischen Auflösung der Mikroskopie getrennt oder nachträglich durch Bildverarbeitungsverfahren trennbar sind. Man spricht davon, dass eine Teilmenge der Fluoreszenzmitter isoliert wird. Für die derart präparierte Probe wird ein Einzelbild aufgenommen. Darin wird für die isolierten Emitter das Zentrum deren auflösungsbegrenzt bedingter Strahlungsverteilung ermit-

telt. Daraus kann man rechnerisch die Lage der Moleküle mit höherer Genauigkeit bestimmen, als es die optische Auflösung eigentlich zulässt. Dieser Vorgang wird als Lokalisierung bezeichnet. Die gesteigerte Auflösung wird in der englischen Fachliteratur auch als „super resolution“ bezeichnet. Sie erfordert, dass in der Probe zumindest eine Teilmenge der aktivierten Markierungsmoleküle mit der optischen Auflösung unterscheidbar, also isoliert sind. Dann kann ihre Ortslage mit höherer Genauigkeit bestimmt werden, sie können lokalisiert werden.

[0004] Zum Isolieren einzelner Markierungsmoleküle nutzt das PALM-Prinzip statistische Effekte aus. Bei einem Markierungsmolekül, das nach Empfang des Umschaltsignals gegebener Intensität zur Fluoreszenzstrahlung anregbar ist, kann durch Einstellen der Intensität des Umschaltsignals dafür gesorgt werden, dass die Wahrscheinlichkeit in einem gegebenen Flächenbereich der Probe vorhandene Markierungsmoleküle zu aktivieren, so gering ist, dass es ausreichend Teilbereiche gibt, in denen innerhalb der optischen Auflösung nur unterscheidbare Markierungsmoleküle Fluoreszenzstrahlung emittieren.

[0005] Die Abfolge von Isolierung und Lokalisierung wird oft wiederholt, wobei jedes Mal eine anders zusammengesetzte Teilmenge zu einem Einzelbild beiträgt. Die Lokalisierungsangaben aus den verschiedenen Einzelbildern werden schließlich zu einem hochaufgelösten Gesamtbild zusammengefügt.

[0006] Das PALM-Prinzip wurde z.B. in der DE 102008024568 A1 hinsichtlich der Aktivierung der zu erfassenden Moleküle weitergebildet. Dazu werden Fluoreszenzmoleküle verwendet, die bestimmte elektronische Zustände haben. Sie werden durch Beleuchtungsstrahlung hoher Intensität so aktiviert, dass der weit überwiegende Anteil der Moleküle in einen elektronischen, nicht fluoreszierenden Dunkelzustand gebracht wird. Die verbleibenden, dann fluoreszierenden Moleküle können so hinsichtlich der optischen Auflösung isoliert werden. Die Abbildung und Aufnahme der Einzelbilder erfolgt synchronisiert zur Anregung, sobald ein ausreichender Anteil der Moleküle in den Dunkelzustand gebracht wurde. Die Belichtungszeit für ein Einzelbild richtet sich nach der mittleren Dauer bis ein Molekül wieder durch die Anregungsstrahlung in den Dunkelzustand gelangt. Zur Realisierung benötigt die DE 102008024568 A1 eine Manipulation der Moleküle in der Probe dahingehend, dass durch Zugabe chemischer Substanzen die Lebensdauer des Dunkelzustands verlängert wird.

[0007] Es sei auch noch angemerkt, dass für das PALM-Prinzip in der Fachliteratur mittlerweile Abwandlungen beschrieben wurden, die andere Abkürzungen erhalten haben, wie beispielsweise STORM, dSTORM etc. In dieser Beschreibung wird deshalb der Begriff „Lokalisierungsmikroskopie“ als Be-

zeigung für alle Mikroskopiemethoden verwendet, die eine Ortsauflösung über die optische Auflösung der verwendeten Apparatur hinaus erreichen, indem Fluoreszenzmoleküle zuerst isoliert und dann lokalisiert werden.

[0008] Die Lokalisierungsmikroskopie benötigt i.d.R. für die Beleuchtung keine hohe Ortsauflösung. Eine einfache Weitfeldbeleuchtung ist vielfach möglich. Sie erfordert es jedoch, dass viele Einzelbilder der Probe aufgenommen werden, die jeweils Teilmengen aus isolierten Molekülen enthalten. Um die Probe zur Gänze abzubilden, muss die Menge aller Einzelbilder sicherstellen, dass möglichst alle Moleküle mindestens einmal in einer Teilmenge enthalten waren. Zur Lokalisierungsmikroskopie muss man deshalb regelmäßig die genannte Vielzahl von Einzelbildern aufnehmen, was eine gewisse Dauer für die Aufnahme eines Gesamtbildes bedingt.

[0009] Die Problematik bei der Aufnahmedauer stellt sich bei der Lokalisierungsmikroskopie auch deshalb, weil die zwar an und für sich vorteilhafte Weitfelddetektion zwangsläufig auch einen Flächendetektor benötigt, der eine Empfindlichkeit zur Einzelmoleküldetektion aufweist. Die Empfindlichkeit, üblicherweise über die Quanten-Effizienz angegeben, und das Ausleserauschen müssen so sein, dass idealerweise einzelne, isolierte Moleküle detektiert werden können. Diese Anforderung setzt bei den im Stand der Technik die Lokalisierungsmikroskopie eingesetzten Kameras eine Untergrenze für die Integrationsdauer bei der Aufnahme eines Einzelbildes und damit eine Obergrenze für die Bildwiederholfrequenz.

[0010] Die Zeitanforderungen sind besonders störend, wenn Lebendzell-Mikroskopie betrieben werden soll. Um die Lokalisierungsmikroskopie in ein dafür taugliches Zeitregime zu bringen, könnte man daran denken, mehrere Moleküle pro beugungsbegrenztem Spot in der Auswertung zuzulassen, den Begriff „isoliert“ also auszuweiten dahingehend, dass auch eine Molekülgruppe von benachbarten Molekülgruppen im Rahmen der Auflösungsbegrenzung der Abbildung, also des beugungsbegrenzten Spots, isoliert sind. Dann könnte bereits während der Datenaufnahme die Dichte der aktivierten Moleküle erhöht werden und eine gegebene Anzahl von Molekülen schneller erfasst werden. Dies ginge aber bei gegenwärtigen Mikroskopieverfahren zu stark auf Kosten der Lokalisierungsgenauigkeit.

[0011] Die bereits genannte DE 102008024568 A1 versucht die Problematik der Integrationsdauer zu umgehen, indem durch eine chemische Manipulation die Lebensdauer des Dunkelzustandes gesteigert wird. Ähnliches findet sich in Heilemann et al., "Super resolution imaging with small organic fluorophores.", *Angewandte Chemie International Edition*, 48.37, (2009): 6903–6908. Dann kann man die In-

tegrationsdauer geeignet zur Trennung von Einzelmolekülereignissen einstellen. Man muss dann allerdings die Probe chemisch manipulieren.

[0012] Einen anderen Weg zur Hochauflösung stellt die sogenannte Fluktuationsanalyse dar, die auch mit der Abkürzung SOFI versehen wird. Hier werden einzelne Fluorophore zum Blinken gebracht, und die blinkende Probe wird in einer Weitfelddetektion abgebildet. Die Auflösungssteigerung erfolgt dann nicht durch eine Lokalisierung sondern durch eine Korrelation der unterschiedlichen Blinkzustände. Man kann sich den Ansatz der SOFI-Mikroskopie in etwa in Analogie zur Erkennung eines Leuchtturms bei der Schifffahrt vorstellen. Dort wird ein bestimmter Leuchtturm an seinem Blinkverhalten von anderen Leuchttürmen unterschieden. Wenn an ein und derselben Stelle ein Blinken auftritt, das sich vom Blinken benachbarter Stellen unterscheidet, ist klar, dass sich an dieser Stelle ein Emitter (Leuchtturm in der Seefahrt – Floreszenzmolekül in der Mikroskopie) befinden muss. Die SOFI-Mikroskopie erfordert es jedoch, dass die korrelierten Fluktuationen auf einer Zeitskala ablaufen müssen, die der Kamera zugänglich ist. Man ist hier letztlich auf ganz bestimmte Farbstoffe bzw. Markierungsstoffe, z.B. sog. Quantenpunkte, angewiesen, die langsam genug blinken. Diese Farbstoffe sind für lebende Proben schlecht bis gar nicht geeignet. Zudem ergibt sich auch hier das Problem einer langen Messdauer, da für eine relevante Auflösungssteigerung eine gewisse Mindestanzahl an Einzelbildern benötigt wird. Auch ist, wie in der DE 102008024568 A1, die Integrationszeit der Kamera auf die Dauer des Hellzustandes der blinkenden Emitter angepasst. Da die SOFI-Mikroskopie Korrelationen auswertet und ohne die Schritte des Isolierens und des Lokalisierens arbeitet, zählt sie nicht zur Lokalisierungsmikroskopie. Zudem ist die mögliche Auflösungssteigerung im Vergleich zur Lokalisierungsmikroskopie eingeschränkt. Ein weiterer Aspekt bei der Lebendzell-Mikroskopie ist die Photoschädigung; Wäldchen et al., *Scientific Reports*, 5: 15348, DOI: 10.1038/srep15348, Oktober 2015, zeigen, dass die Bestrahlung mit kurzen Wellenlängen um Größenordnungen schädlicher ist, als mit längerwelligem Licht. Die für PALM/dSTORM etc. verwendet Schaltwellenlänge liegt bei 405nm, ein weiterer Grund, auf Fotoschalter zu verzichten.

[0013] Es besteht deshalb Bedarf für ein hochauflösendes Mikroskopieverfahren, dass hinsichtlich der Wahl der Fluoreszenzemitter nicht eingeschränkt ist, und insbesondere keine chemische Manipulation von Fluoreszenzemittern benötigt. Ein solches Verfahren wird insbesondere für die Lebendzellen-Mikroskopie verlangt.

[0014] Der Erfindung liegt deshalb die Aufgabe zugrunde, ein Lokalisierungsmikroskopieverfahren anzugeben sowie ein dazu ausgebildetes Mikroskop be-

reitzustellen, mit dem herkömmliche Farbstoffe ohne chemische Manipulation eine schnelle Bildaufnahme ermöglichen.

[0015] Diese Aufgabe wird gelöst durch ein hochauflösendes Kurzzeit-Mikroskopieverfahren einer Fluoreszenzemitter enthaltenden Probe, bei dem Fluoreszenzemitter verwendet werden, die einen ersten und einen zweiten Zustand aufweisen, wobei der erste Zustand ein Hellzustand ist, in dem die Fluoreszenzemitter auf Einstrahlung von Anregungsstrahlung hin Fluoreszenzstrahlung abgeben, und der zweite Zustand ein Dunkelzustand ist, in dem die Fluoreszenzemitter auf Einstrahlung von Anregungsstrahlung hin die Fluoreszenzstrahlung nicht abgeben, wobei die Fluoreszenzemitter durch Einstrahlung von Anregungsstrahlung aus dem Hellzustand in den Dunkelzustand gebracht werden können und der Dunkelzustand eine bestimmte Lebensdauer hat, nach der die Fluoreszenzemitter von alleine in den Hellzustand zurückkehren, die Probe und damit die Fluoreszenzemitter im Weitfeld mit Anregungsstrahlung einer Intensität beleuchtet wird/werden und dadurch die Fluoreszenzemitter zu einem Blinken angeregt werden, in dem sie mit einer Blinkfrequenz zwischen einem natürlichen, d.h. chemischen unmodifizierten Hell- und Dunkelzustand hin- und herwechseln, die blinkende Probe mit einer Ortsauflösung im Weitfeld abgebildet und mit einer Kamera detektiert wird, die Intensität der Anregungsstrahlung so eingestellt wird, dass bezogen auf die Ortsauflösung in den Einzelbildern mindestens einige Fluoreszenzemitter isoliert sind, und die Intensität der Anregungsstrahlung und eine Bildwiederholfrequenz der Kamera so aufeinander abgestimmt werden, dass die Bildwiederholfrequenz, mit der die Einzelbilder erzeugt werden, nicht geringer ist als die mittlere Blinkfrequenz, und die Einzelbilder einer Lokalisierungsanalyse unterzogen werden, wobei Ortsangaben für isolierte Fluoreszenzemitter in den Einzelbildern mit einer Genauigkeit bestimmt werden, die über die Ortsauflösung hinausgeht.

[0016] Die Aufgabe wird weiter gelöst durch ein hochauflösendes Mikroskop zur Kurzzeit-Mikroskopie einer Fluoreszenzemitter enthaltenden Probe, das aufweist eine Anregungseinrichtung, die ausgebildet ist, die Probe im Weitfeld mit Anregungsstrahlung zur Abgabe von Fluoreszenzstrahlung zu bestrahlen, eine Abbildungseinrichtung, die ausgebildet ist, die Probe im Weitfeld mit einer Ortsauflösung abzubilden, wobei die Anregungseinrichtung so ausgebildet ist, dass bezogen auf die Ortsauflösung mindestens einige Fluoreszenzemitter in der Abbildung isoliert sind, eine Lokalisierungsanalyseeinrichtung, die ausgebildet ist, Ortsangaben für die isolierten Fluoreszenzemitter mit einer Genauigkeit zu bestimmen, die über die Ortsauflösung hinausgeht, und eine Steuerungseinrichtung, die ausgebildet ist, die Anregungseinrichtung und die Abbildungseinrichtung ge-

mäß dem genannten Mikroskopieverfahren zu steuern.

[0017] Die Erfindung verwendet für die Lokalisierungsmikroskopie Fluoreszenzemitter, die durch Beleuchtung mit Anregungsstrahlung, d.h. Licht einer bestimmten Wellenlänge, zur Abgabe von Fluoreszenzstrahlung angeregt werden können und dann auf die Anregung hin Fluoreszenzstrahlung abgeben. Unter Beleuchtung mit Anregungsstrahlung durchlaufen die Fluoreszenzemitter ständig einen Zyklus zwischen einem nicht angeregten Grundniveau und einem angeregten Niveau und wieder zurück in das Grundniveau. Die Überführung vom Grundniveau in das angeregte Niveau wird durch die Anregungsstrahlung bewirkt. Auf molekularer Ebene erklärt man dies durch die Absorption eines Photons der Anregungsstrahlung. Aus dem angeregten Niveau kehrt der Fluoreszenzemitter in das Grundniveau zurück und gibt dabei Fluoreszenzstrahlung ab. Auf molekularer Ebene ist dieser Wechsel vom angeregten Niveau in das Grundniveau mit der Abgabe eines Fluoreszenzphotons verbunden. Die Zeitdauer, die der Fluoreszenzemitter im angeregten Niveau verbleibt, liegt auf der Nanosekunderskala, d.h. der Fluoreszenzemitter verbleibt nach Absorption eines Anregungsphotons so gut wie gar nicht im angeregten Niveau, sondern gibt mehr oder weniger sofort das Fluoreszenzphoton ab. Dieser Umstand hat zur Folge, dass ein Fluoreszenzemitter, der mit Anregungsstrahlung beleuchtet wird, kontinuierlich Fluoreszenzstrahlung emittiert. Dieser Zustand des Fluoreszenzemitters, indem er jederzeit mit Anregungsstrahlung angeregt werden kann und Fluoreszenzstrahlung abgibt, solange er beleuchtet wird, wird in dieser Beschreibung und auch in weiten Teilen der Fachliteratur als „Hellzustand“ bezeichnet. Ihm gegenübergestellt ist ein Dunkelzustand, in dem der Fluoreszenzemitter trotz Einstrahlung von Anregungsstrahlung keine Fluoreszenzstrahlung abgibt, also für Anregungsstrahlung quasi unempfindlich ist. Dieser Dunkelzustand kann beispielsweise ein sog. Triplett-Zustand des Moleküls sein. Solche Dunkelzustände und insbesondere Triplett-Zustände haben eine gewisse Lebensdauer, d.h. es dauert eine gewisse Zeit, bis ein Fluoreszenzemitter aus dem Dunkelzustand wieder in das Grundniveau zurückkehrt und damit im Hellzustand ist, da aus dem Grundniveau wiederum jederzeit eine Anregung mit Anregungsstrahlung und eine Abgabe von Fluoreszenzstrahlung möglich ist. Mit anderen Worten, der Hellzustand im Verständnis dieser Erfindung umfasst das Grundniveau und das angeregte Niveau eines Fluoreszenzemitter, aus dem heraus Fluoreszenzstrahlung abgegeben wird. Der Dunkelzustand ist hingegen ein Zustand, in dem kein Verbringen des Fluoreszenzemitter in das angeregte Niveau und damit auch keine Abgabe von Fluoreszenzstrahlung möglich ist.

[0018] Die Fluoreszenzemitter verbleiben bei Einstrahlung von Anregungsstrahlung mit einer ersten Wahrscheinlichkeit im Hellzustand. Mit einer zweiten Wahrscheinlichkeit, die geringer ist als die erste Wahrscheinlichkeit, gelangen sie in den Dunkelzustand. Da jedoch die Lebensdauer des Dunkelzustandes sehr viel größer ist als die Lebensdauer des angeregten Niveaus, nimmt mit steigender Intensität der Anregungsstrahlung die Wahrscheinlichkeit zu, dass innerhalb einer bestimmten Zeitspanne ein Fluoreszenzemitter in den Dunkelzustand gelangt. Dann verbleibt er für dessen Lebensdauer im Dunkelzustand, ist also für diese Lebensdauer quasi ausgeschaltet, da für die Anregungsstrahlung unempfindlich.

[0019] Anders als der Dunkelzustand kann dem Hellzustand selbst keine eindeutige Lebensdauer zugemessen werden. Nur dem angeregten Niveau des Hellzustandes kann eine Lebensdauer zugemessen werden. Diese ist jedoch, wie bereits ausgeführt, um Größenordnungen kürzer, als die Lebensdauer des Dunkelzustandes. In einem theoretischen 2-Niveau-System, könnte ein mit Anregungsstrahlung bestimmter Intensität angeregter Fluoreszenzemitter quasi unbegrenzt Fluoreszenzstrahlung abgeben.

[0020] Die Erfindung verwendet nun die Eigenschaft so gut wie aller Fluoreszenzemitter, dass bei Einstrahlung von Anregungsstrahlung ein bestimmter Anteil der Fluoreszenzemitter in den Dunkelzustand beispielsweise den Triplett-Zustand, gelangt. Die Größe dieses Anteils der Fluoreszenzemitter, der in den Dunkelzustand kommt, hängt jedoch von der Intensität der Anregungsstrahlung ab. Er nimmt mit steigender Anregungsstrahlungsintensität zu.

[0021] Für jeden Fluoreszenzemitter besteht eine gewisse Wahrscheinlichkeit, dass er durch ein Anregungsphoton aus dem Grundniveau in das normale angeregte Niveau gelangt und von dort strahlungslos in den Dunkelzustand. Der Begriff „strahlungslos“ ist dabei auf die Wellenlänge der Fluoreszenzstrahlung bezogen. Die Wahrscheinlichkeit für den Dunkelzustand steigt mit zunehmender Intensität der Anregungsstrahlung in der Regel an. Ist ein Fluoreszenzemitter im Dunkelzustand, emittiert er für die Lebensdauer des Dunkelzustandes keine Fluoreszenzstrahlung. Erst wenn er wieder aus dem Dunkelzustand in den Hellzustand zurückgekehrt ist, gibt er Fluoreszenzstrahlung ab, wenn weiter angeregt wird. Dadurch stellt sich für den Fluoreszenzemitter ein Blinken ein, dessen Dunkeldauer durch die Lebensdauer des Dunkelzustandes bestimmt ist. Die Helldauer hängt davon ab, wie lange es dauert, bis der Fluoreszenzemitter aus dem Hellzustand in den Dunkelzustand gelangte – letztlich hängt die mittlere Helldauer damit von der Intensität der Anregungsstrahlung ab. Die Periode und damit die Blinkfrequenz des Blinkens,

wird durch die Summe aus Helldauer und mittlerer Lebensdauer des Dunkelzustandes gebildet.

[0022] Es zeigt damit, dass durch die Wahl der Anregungsintensität die Blinkfrequenz eingestellt wird, wobei die Dunkeldauer, d.h. die mittlere Lebensdauer des Dunkelzustandes für alle Blinkfrequenzen molekulspezifisch vorgegeben ist und bevorzugt hier nicht chemisch manipuliert wird. Es handelt sich dann um die Lebensdauer des natürlichen Dunkelzustandes. Mit anderen Worten, das Blinken wird dadurch erzeugt, dass durch geeignete Wahl der Anregungsstrahlungsintensität das Dauerleuchten jedes Fluoreszenzemitters, der sich im Hellzustand befindet, durch einen vorübergehenden Wechsel des Fluoreszenzemitter in den Dunkelzustand unterbrochen wird.

[0023] Die Erfindung versetzt Farbstoffe in ein Blinken, führt Lokalisierungsmikroskopie aus und stellt die Integrationsdauer bzw. Bildfrequenz der Kamera auf die Blinkfrequenz ab. Dies stellt aus mehreren Gründen eine systematische Abkehr vom Stand der Technik dar:

1. Die Erfindung führt bewusst ein Blinken der Fluoreszenzemitter herbei und verwendet dieses Blinken für die Lokalisierungsmikroskopie. Dabei wird die Bildaufnahme so gestaltet, dass die Bildwiederholfrequenz nicht geringer ist als die Blinkfrequenz. Für die Lokalisierungsmikroskopie wird dabei ein Fluoreszenzemitter durchaus mehrfach erfasst, da er blinkt. Herkömmliche PALM-Ansätze und deren Abwandlungen zielen hingegen darauf, ein Molekül möglichst nur einmal in einen Leuchtzustand zu bringen, ein Blinken also geradezu vermeiden.

2. Die Übergangswahrscheinlichkeit in den Dunkelzustand ist für herkömmliche Fluorophore und damit für die große Mehrheit der üblichen Anwendungen der Fluoreszenzmikroskopie, wie erwähnt, von der Intensität der Anregungsstrahlung abhängig; die Helldauer und damit die Blinkfrequenz ändern sich gegenläufig. Je intensiver die Anregungsstrahlung ist, desto mehr Fluorophore gelangen in den Dunkelzustand und desto kürzer ist die Helldauer. Die Blinkfrequenz kann also mit einfachen optischen Mitteln geeignet eingestellt werden und auf die Kameras für die Bildaufnahme abgestimmt werden. Durch das Steigern der Blinkfrequenz sinkt die Zeitdauer, die ein Molekül im Hellzustand ist. Obwohl der Dunkelzustand in seiner Länge unverändert bleibt, da es sich bevorzugt um den natürlichen Dunkelzustand handelt, der eine molekulspezifisch feste Lebensdauer hat, wird damit das Verhältnis zwischen Helldauer und Dunkeldauer dahingehend beeinflusst, dass der Dunkelzustand relativ gegenüber der Helldauer länger wird. Somit wird auf relativer Skala ein Ergebnis erreicht, das im Stand der Technik nur mit chemischer Manipulation, d.h. absoluter Verlängerung des Dunkelzustandes möglich war.

3. Die Erfindung erreicht mit dem Bezug auf die Blinkfrequenz eine vorteilhafte Ausnutzung der Wechselwirkung von Integrationsdauer/Bildfrequenz der Kamera und Intensität der Anregungsstrahlung, so dass herkömmliche Fluorophore ohne chemische Beeinflussung für die Lokalisierungsmikroskopie verwendet werden können.

4. Eine Bildwiederholffrequenz der Kamera, die nicht geringer ist als die Blinkfrequenz, kann durch geeignete, gegenseitige Abstimmung von Intensität der Anregungsstrahlung und Einstellung der Kamera, beispielsweise einer Integrationsdauer bei der Bilderzeugung, erhalten werden. Es wird somit eine wechselweise Beziehung zwischen Blinkfrequenz aufgrund der Intensität der Anregungsstrahlung und Nachweisempfindlichkeit der Kamera aufgrund der Integrationszeit/Bildwiederholffrequenz ausgenutzt. Dabei ist es insbesondere möglich, für Einzelfälle auch eine Multi-Emitter-Analyse bei der Lokalisierungsanalyse zuzulassen, d.h. den Begriff „isoliert“ bzw. die Definition, dass bezogen auf die Ortsauflösung in den Einzelbildern mindestens einige Fluoreszenzemitter isoliert sind, dahingehend zu verstehen, dass Gruppen von Fluoreszenzemittern von anderen Gruppen von Fluoreszenzemittern isoliert sind. Da die Kamera dennoch in einem günstigen Leistungsbereich arbeitet, ist – verglichen mit dem Stand der Technik – die Auflösung nicht so stark reduziert, wie zu erwarten wäre.

5. Der Bezug auf die Blinkfrequenz stellt sicher, dass in jedem Einzelbild genau ein Dunkelzustand eines blinkenden Moleküls enthalten ist, da die Bildwiederholffrequenz der Einzelbilder nicht geringer ist als die Blinkfrequenz, die ihrerseits durch eine Periode definiert ist, welche aus einer Abfolge von Hellzustand und Dunkelzustand besteht. Damit ist die Lokalisierung des entsprechenden Moleküls mit den herkömmlichen Methoden weiterhin möglich. Die Lokalisierungsanalyse des erfindungsgemäßen Mikroskopieverfahrens entscheidet sich also im Grundsatz nicht von der des PALM-Verfahrens oder dessen Abwandlungen. Es wird nun jedoch, da die Fluoreszenzemitter der Probe in ein Blinken versetzt werden, während dessen Helldauer jedes Molekül mehrere Photonen abgibt, jedes Molekül mehrfach erfasst. Dies schafft einen vorteilhaften Ausgleich für die gegenüber dem Stand der Technik vergleichsweise geringer Integrationsdauer, welche an die Blinkfrequenz angepasst ist. Die relativ schnelle Bildaufnahme führt deshalb nicht zu einem schlechteren Signal/Raschverhältnis bei der Lokalisierungsanalyse.

[0024] Um die Intensität der Anregungsstrahlung und die Bildwiederholffrequenz aufeinander abstimmen zu können, ist es bevorzugt, in einer Testmessung Lebensdauer des Dunkelzustandes zu mes-

sen und dann die Bildwiederholffrequenz entsprechend einzustellen. Zur Lebensdauermessung kann die Anregungsstrahlung gepulst eingestrahlt und die Fluoreszenzstrahlung dazu synchronisiert getaktet erfasst werden. Auch ist es möglich, im Dauerstrichbetrieb anzuregen und eine Autokorrelationsanalyse auszuführen, wie es z.B. aus der Fluoreszenz-Korrelationspektroskopie bekannt ist. Bevorzugt beträgt die Integrationsdauer 90 Prozent, besonders bevorzugt 50 Prozent und ganz besonders bevorzugt 10 Prozent der Lebensdauer des Dunkelzustandes.

[0025] Die Erfindung arbeitet in einem Zeitregime der Größenordnung der Dunkellebensdauer der meisten Standard-Fluorophore. Dieser Bereich liegt zwischen 1 und 300 μs . Die Anregungsintensität wird so eingestellt, dass das Blinkverhalten durch die Lebensdauer des nicht-fluoreszierenden Triplett-Zustands bestimmt wird. Dies ist der Dunkelzustand in den meisten Fällen. Es ist deshalb bevorzugt, dass die Intensität der Anregungsstrahlung so eingestellt wird, dass die Bildfrequenz einen Wert von $1/(300 \mu\text{s})$ nicht unterschreitet.

[0026] In einer Ausgestaltung des Mikroskopieverfahrens ist bevorzugt vorgesehen, dass eine Intensität der Anregungsstrahlung einen Wert von 1 MW/cm², bevorzugt von 50 kW/cm², besonders bevorzugt von 2 kW/cm² nicht überschreitet.

[0027] Bevorzugt ist die Bildwiederholffrequenz so gewählt, dass sie zwischen 150 %, weiter bevorzugt 130 %, besonders bevorzugt 110 % und ganz besonders bevorzugt 105 %, und 100 % der Blinkfrequenz beträgt, wobei 100 % nicht erreicht wird.

[0028] Besonders bevorzugt ist es, dass die Fluoreszenzemitter in einem bezüglich der Lebensdauer des Dunkelzustandes chemisch unbeeinflussten Zustand sind. Diese Eigenschaft ist für die Lebendzellmikroskopie von besonderem Vorteil, da eine chemische Beeinflussung lebender Zellen in der Regel sehr nachteilig ist. Erfindungsgemäß wird die Leistung der Anregungsstrahlung mit der Bildwiederholffrequenz gegeneinander abgeglichen. Dies ist insbesondere für die Lebendzell-Mikroskopie von Vorteil, da mit einer schnelleren Bildwiederholffrequenz die Photonenbelastung der Probe reduziert werden kann.

[0029] Der mikroskopische Aufbau entspricht dem eines typischen Weitfeld-Fluoreszenzmikroskops, wobei nun die Steuereinrichtung geeignet ausgebildet ist, die Anregungseinrichtung und die Abbildungseinrichtung zur gegenseitigen Abstimmung von Anregungsintensität und Bildwiederholffrequenz anzusteuern. Die Anregungsstrahlung kann dabei als Dauer-Strahlung (cw-Strahlung) eingestrahlt werden. Zur Fluoreszenzmessung ist eine gepulste Anregung und ein dazu synchronisiert getakteter Betrieb der Ka-

mera vorteilhaft. Dieser synchronisierte Betrieb kann auch dazu verwendet werden, um ein Verhältnis von Signal – zur Hintergrundstrahlung für Einzelmolekülstrahler zu verbessern, nämlich dann, wenn in der Probe eine Hintergrundautofluoreszenz mit deutlich unterschiedlicher Lebensdauer des Dunkelzustandes und/oder des Hellzustandes vorliegt, beispielsweise mit deutlich längerer oder deutlich kürzerer Lebensdauer.

[0030] Die Erfindung bringt Bildwiederholffrequenz der Kamera und Blinkfrequenz der Probe gegeneinander in Abgleich. Dabei bestehen gewisse Vorteile, die Blinkfrequenz und damit die Bildwiederholffrequenz relativ hoch einzustellen. In Konsequenz ist die Integrationszeit der Kamera dann vergleichsweise gering. Im Hinblick auf eine hohe Bildwiederholffrequenz ist es zu bevorzugen, für die Kamera ein SPAD-Detektorarray zu verwenden. Es ist deshalb in einer Weiterbildung bevorzugt, dass die Kamera als SPAD-Array ausgebildet wird.

[0031] SPAD-Arrays sind in großen Pixelzahlen vergleichsweise schwer verfügbar und kostenträchtig. In einer bevorzugten Weiterbildung wird deshalb ein SPAD-Array verwendet, dessen Pixelzahl eine beugungsbegrenzte Abbildung im Weitfeld noch nicht erlauben. Es ist deshalb in einer Weiterbildung bevorzugt, das aus der DE 102012205032 A1 der Carl Zeiss Microscopy GmbH bekannte Prinzip einzusetzen, demgemäß die Probe in einem Bildfeld abgebildet wird, und die Lage des Bildfeldes auf der Probe mehrmals verschoben wird, wobei pro Lage des Bildfeldes ein Einzelteilbild erhalten wird und die erhaltenen Einzelteilbilder zu einem Einzelbild zusammengefügt werden.

[0032] Soweit nachfolgend Verfahrensschritte erläutert werden, können diese durch einen entsprechenden Betrieb eines Mikroskops, das ein geeignet ausgebildetes Steuergerät aufweist, realisiert werden. Soweit also Verfahrensmerkmale geschildert werden, betreffen diese die geeignete Ausbildung eines Steuergerätes, beispielsweise durch ein geeignetes Betriebsprogramm. Umgekehrt gilt natürlich auch, dass Merkmale eines Steuergerätes, die beispielsweise durch entsprechende Programmiermittel erreicht sind, gleichermaßen Verfahrensmerkmale eines entsprechenden Betriebsverfahrens betreffen und offenbaren sollen.

[0033] Es versteht sich, dass die vorstehend genannten und die nachstehend noch zu erläuternden Merkmale nicht nur in den angegebenen Kombinationen, sondern auch in anderen Kombinationen oder in Alleinstellung einsetzbar sind, ohne den Rahmen der vorliegenden Erfindung zu verlassen.

[0034] Nachfolgend wird die Erfindung beispielsweise anhand der beigefügten Zeichnungen, die auch er-

findungswesentliche Merkmale offenbaren, noch näher erläutert. Dabei wird die Lokalisierungsmikroskopie am Beispiel einer Variante des PALM-Verfahrens erläutert. Dies ist jedoch, wie oben erläutert, nicht einschränkend für die Erfindung. Es zeigen:

[0035] Fig. 1 eine Schemadarstellung eines Mikroskops zur Durchführung eine Variante des PALM-Verfahrens

[0036] Fig. 2 einen Ablaufplan zur Erzeugung hochauflösender Bilder mit dem Mikroskop der Fig. 1 im PALM-Verfahren,

[0037] Fig. 3 eine Schemadarstellung eines Termdiagrammes zur Erläuterung des Hell- und des Dunkelzustandes eines Fluoreszenzemitters,

[0038] Fig. 4 ein Zeitablaufdiagramm zur Erläuterung des Blinkzustandes eines Fluoreszenzemitters,

[0039] Fig. 5 eine Draufsicht auf ein Einzelbild, das im PALM-Verfahren erzeugt wird,

[0040] Fig. 6 eine Schemadarstellung eines Mikroskops zum Ausführen eines hochauflösenden Mikroskopieverfahrens,

[0041] Fig. 7 eine Draufsicht auf eine Oberfläche einer Probe mit verschiedenen Lagen eines Bildfeldes des Mikroskops der Fig. 1

[0042] Fig. 8 eine Darstellung ähnlich der Fig. 2 zur Veranschaulichung eines Überlapps zwischen benachbarten Bildfeldlagen,

[0043] Fig. 9 zwei fluoreszenzmikroskopische Bilder, wobei das obere Bild einer normalen Weitfeldaufnahme entspricht und das untere Bild ein hochauflöstes Gesamtbild derselben Probe ist, und

[0044] Fig. 10 zwei Schnittdarstellungen durch Schnitte „1“ und „2“ der Bilder der Fig. 9.

[0045] Fig. 1 zeigt schematisch ein Mikroskop **1**, das eine Probe **2** hochauflösend abbildet. Der Begriff hochauflösend wird hier, wie im Stand der Technik üblich, für ein Abbildungsverfahren verwendet, das eine Ortsauflösung aufweist, die über die Beugungsgrenze der Abbildung hinaus gesteigert ist. Das Mikroskop **1** dient zur Abbildung einer Probe **2**, die Fluoreszenzemitter enthält. Mittels Strahlung aus einer Beleuchtungsquelle **3** werden die Fluoreszenzemitter zur Abgabe von Fluoreszenzstrahlung angeregt. Über einen Strahlteiler **5** wird die fluoreszierende Probe **2** auf eine Weitfeldkamera **4** abgebildet. Der Betrieb des Mikroskops **1** wird von einem Steuergerät **6** gesteuert, das über entsprechende (nicht weiter identifizierte) Steuerleitungen mit der Weitfeldkamera **4**, der Beleuchtungsquelle **3** und optional einem Tisch,

auf dem sich die Probe **2** befindet, verbunden ist und das diese Elemente ansteuert bzw. Daten von ihnen aufnimmt, insbesondere Bilddaten der Weitfeldkamera **4**.

[0046] Die Weitfeldkamera **4** weist in einer Ausführungsform eine Kombination aus einer CMOS-Kamera und einem Bildverstärker auf und ist beispielsweise in Form der „intensified fast CMOS camera“ der Firma Gige-Vision realisiert, oder eine CMOS-Kamera mit vorgeschaltetem Bildverstärker, beispielsweise dem Bildverstärker „HiCATT, high-speed camera attachment“ von Lambert Instruments. In dieser oder anderen Ausführungsformen ist die Weitfeldkamera **4** hinsichtlich ihrer Bildwiederholfrequenz, d. h. der Belichtungsdauer oder Integrationsdauer einstellbar. Das Steuergerät **6** nimmt über die Steuerleitungen die entsprechende Einstellung vor. Weiter stellt das Steuergerät **6** in bevorzugten Ausführungsformen eine Synchronisation zur Bildwiederholfrequenz ein.

[0047] Die Beleuchtungsquelle **3** strahlt Anregungsstrahlung in die Probe ein. Die Intensität dieser Einstrahlung, entweder in Form von cw-Strahlung oder in Form von gepulster Strahlung, wird vom Steuergerät **6** über die Steuerleitungen eingestellt. Das Steuergerät **6** führt weiter optional auch die Lokalisierungsanalyse in den Einzelbildern, die aufgenommen wurden, aus und erzeugt das hochauflösende Gesamtbild aus den bearbeiteten Einzelbildern.

[0048] Fig. 3 zeigt schematisch ein Termschema für einen Fluoreszenzemitter, der im Mikroskop **1** verwendet wird. Der Fluoreszenzemitter weist ein Grundniveau S_0 auf. Durch Einstrahlung von Anregungsstrahlung a gelangt der Fluoreszenzemitter in ein angeregtes Niveau S_1 , aus dem er unter Abgabe von Fluoreszenzstrahlung wieder in das Grundniveau zurückkehrt. Das Grundniveau S_0 und das angeregte Niveau S_1 bilden einen Hellzustand H des Fluoreszenzemitters, in dem er jederzeit auf Einstrahlung von Anregungsstrahlung a Fluoreszenzstrahlung f abgibt. Da die Lebensdauer des angeregten Niveaus S_1 wenige Nanosekunden beträgt, emittiert ein mit Anregungsstrahlung a beleuchteter Fluoreszenzemitter im Hellzustand H fortwährend Fluoreszenzstrahlung f . Dass die Abgabe der einzelnen Photonen der Anregungsstrahlung f im Nanosekundenabstand erfolgt, ist hier nicht relevant und wäre messtechnisch mit den hier beschriebenen Einrichtungen auch nicht nachweisbar.

[0049] Die Anregungsstrahlung a vermag es auch, den Fluoreszenzemitter über das angeregte Niveau S_1 in einen Triplett-Zustand T_1 zu bringen. Dieser hat eine Lebensdauer im Bereich mehrerer μs , beispielsweise zwischen 1 und 300 μs . Während der Fluoreszenzemitter im Triplett-Zustand T_1 ist, reagiert er auf die weitere Einstrahlung von Anregungsstrahlung a nicht. Die Übergänge in den und aus dem Triplett-

Zustand sind strahlungslos (zumindest bezogen auf die Wellenlänge der Fluoreszenzstrahlung f) und deshalb in Fig. 3 gestrichelt gezeichnet. Der Triplett-Zustand T_1 ist damit ein Dunkelzustand D , da der Fluoreszenzemitter dann trotz Beleuchtung mit Anregungsstrahlung a keine Fluoreszenzstrahlung f abgibt. Erst wenn er wieder in das Grundniveau S_0 zurückgekehrt ist, also den Dunkelzustand D verlassen hat und wieder im Hellzustand H ist, gibt der Fluoreszenzemitter unter Beleuchtung mit Anregungsstrahlung a fortwährend Fluoreszenzstrahlung f ab.

[0050] Die Übergangswahrscheinlichkeit vom angeregten Niveau S_1 in das Grundniveau S_0 ist sehr viel größer, als die Übergangswahrscheinlichkeit vom angeregten Niveau S_1 in den Triplett-Zustand T_1 . Es ist also bei Einstrahlung von Photonen der Anregungsstrahlung a sehr viel wahrscheinlicher, dass der Fluoreszenzemitter im Hellzustand H bleibt, als dass er in den Dunkelzustand D wechselt. Die Wahrscheinlichkeit ist jedoch nicht Null. Mit ansteigender Intensität der Anregungsstrahlung a , d.h. mit quasi zunehmendem Bombardement mit Photonen der Anregungsstrahlung, steigt die Wahrscheinlichkeit, dass ein Fluoreszenzemitter innerhalb einer gewissen Zeitdauer in den Dunkelzustand D gelangt.

[0051] Das in Fig. 3 gezeigte Termschema ist lediglich exemplarisch zu verstehen und soll die hier als Fluoreszenzemitter verwendete Substanz lediglich dahingehend charakterisieren, dass es einen Hellzustand H und einen Dunkelzustand D gibt, die beide durch Einstrahlung von Anregungsstrahlung a erreicht werden. Beim Dunkelzustand D muss dabei nicht zwingend ein einziges Niveau in Form des Triplett-Zustandes T_1 vorliegen, es sind auch Mehrniveausysteme möglich. Wesentlich ist allerdings, dass der Fluoreszenzemitter durch Einfall der Anregungsstrahlung a mit einer nicht verschwindenden Übergangswahrscheinlichkeit in den Dunkelzustand D gelangt.

[0052] Hier liegt auch ein wesentlicher Unterschied zu PALM-Varianten, die Strahlung einer Wellenlänge verwenden, die sich von der der Anregungsstrahlung a unterscheidet. Exemplarisch sei die als dSTORM bekannte PALM-Variante genannt, welche mit einer speziellen Umschaltstrahlung arbeitet.

[0053] Eine solche separate Umschaltstrahlung wird in den Ausführungsformen der Erfindung nicht verwendet. Vielmehr gelangen die Fluoreszenzemitter ausschließlich durch Einstrahlung von Anregungsstrahlung a (mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit) in den Dunkelzustand.

[0054] Die Auswirkung dieses Umstandes ist in Fig. 4 gezeigt. Die Figur stellt den zeitlichen Ablauf der Lichtemission eines Fluoreszenzemitters dar, wobei ein unterer Pegel **8** einen dunklen Fluoreszenze-

mitter und ein oberer Pegel **9** einen fluoreszierenden Fluoreszenzemitter anzeigt. Durch Einstrahlung der Anregungsstrahlung a gelangt der Fluoreszenzemitter aus dem Hellzustand, in dem er leuchtet, (oberer Pegel **9**) früher oder später in den Dunkelzustand (unterer Pegel **8**), da er mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit von der Anregungsstrahlung a , wie erläutert, in den Dunkelzustand D gebracht wird. Während dieses Dunkelzustandes D bleibt der Emitter dunkel. Die Dauer dieses Dunkelzustands ist für den Fluoreszenzemitter im beschriebenen Fall nicht optisch beeinflussbar. Die Dunkeldauer (unterer Pegel **8** der Kurve der **Fig. 4**) ist gleichbedeutend mit der Lebensdauer t_d des Dunkelzustandes D . Danach verlässt der Fluoreszenzemitter den Dunkelzustand D wieder und leuchtet (oberer Pegel **9** in **Fig. 4**). Nach einer gewissen Zeitspanne wird er rein statistisch wieder in den Dunkelzustand D gelangen. Die Zeitdauer, die er bis dahin leuchtet stellt eine Helldauer t_h dar. Sie hängt von der Übergangswahrscheinlichkeit in den Dunkelzustand D und damit von der Intensität der Anregungsstrahlung a ab. Im Ergebnis führt der Fluoreszenzemitter ein Blinken **7** aus, das aus der Abfolge von Nichtleuchten (unterer Pegel **8**) und Leuchten (oberer Pegel **9**) gebildet ist. Eine Periode PB dieses Blinkens, deren Inverse einer Blinkfrequenz f_B ist, ist durch die Summe aus Lebensdauer t_d des Dunkelzustandes D und Helldauer t_h gebildet.

[0055] Erhöht man die Intensität der Anregungsstrahlung a , steigt die Wahrscheinlichkeit, dass ein Emitter in den Dunkelzustand D gelangt, wodurch die Helldauer t_h sinkt. Dieser Umstand ist in **Fig. 4** durch eine gestrichelte Linie eingezeichnet. Durch eine Erhöhung der Intensität der Anregungsstrahlung a wird die mittlere Helldauer t_h verkürzt, da im statistischen Mittel der Dunkelzustand D früher erreicht wird. In **Fig. 4** ist dies durch eine Vorwärtsverlagerung **10** des von links gesehenen zweiten Dunkelzustandes gestrichelt eingetragen. Man sieht sofort, dass die Blinkfrequenz f_B steigt (die Blinkperiode PB sinkt), wobei die Lebensdauer t_d des Dunkelzustandes D unverändert bleibt. Sie entspricht bevorzugt der natürlichen Lebensdauer des Dunkelzustandes D , beispielsweise des Triplett-Zustandes T_1 .

[0056] Das Steuergerät **6** ist insgesamt so ausgebildet, dass das Mikroskop **1** ein lokalisierungsbasierendes Mikroskopieverfahren, beispielsweise das PALM-Verfahren ausführt.

[0057] Der durchgeführte Verfahrensablauf ist in **Fig. 2** als Flussdiagramm dargestellt. Nach dem Start des Verfahrens in einen Schritt S_1 wird in einem Anregungsschritt S_2 die Probe **2** mit Anregungsstrahlung a aus der Beleuchtungsquelle **3** beleuchtet, wobei dies so erfolgt, dass einzelne Fluoreszenzemitter bezogen auf die Ortsauflösung der Abbildung isoliert sind. Die Abbildung erfolgt in einem nachfolgenden Bildaufnahmeschritt S_3 , der im Weitfeld ein Einzelbild

der Probe liefert, in dem zumindest einzelne Fluoreszenzemitter einen Abstand zu benachbarten Fluoreszenzemittern haben, der größer ist, als die Ortsauflösung der Weitfeldabbildung. Dieser Zustand ist in **Fig. 5** schematisch gezeigt, der ein Einzelbild **14** der Probe **2** zeigt. Im Einzelbild sind einzelne Fluoreszenzemitter **11** isoliert. Sie sind als Sterne eingetragen. Nicht leuchtende Fluoreszenzemitter, die sich derzeit in einem Dunkelzustand D befinden, sind in **Fig. 5** durch Ringe symbolisiert. Ein Großteil der Fluoreszenzemitter, insbesondere die Fluoreszenzemitter im Bereich **13** sind so beabstandet, dass sie voneinander getrennt werden können. Einzelne Fluoreszenzemitter, beispielsweise im Bereich **12**, liegen jedoch so dicht beieinander, dass sie optisch und in der Lokalisierungsanalyse nicht unterschieden werden können. Dass keine 100%ige Isolierung erreicht werden kann – und diese auch gar nicht nötig ist – ist dem Fachmann für die Lokalisierungsanalyse bekannt.

[0058] Ein anschließender Lokalisierungsschritt S_4 bestimmt für diese isolierten Fluoreszenzemitter die Ortsangabe im Bild mit einer Ortsauflösung, die größer ist, als die Beugungsgrenze es eigentlich erlaubt. Fluoreszenzemitter wie im Bereich **12**, die nicht getrennt werden können, werden im Lokalisierungsschritt S_4 verworfen. Dies kann dadurch erfolgen, dass im Lokalisierungsschritt S_4 verwertet wird, dass die von einem isolierten Fluoreszenzemitter aufgenommene Strahlung eben nur von einem oder wenigen Fluoreszenzemitter(n) stammt. Durch diese Kenntnis kann man den Ort, an dem sich der Fluoreszenzemitter befindet, mit einer größeren Genauigkeit ermitteln, als die Beugungsgrenze es zulässt. Vereinfacht kann man sich die im Lokalisierungsschritt S_4 stattfindende Lokalisierungsanalyse so vorstellen, dass für das Beugungsscheibchen eines isolierten Fluoreszenzemitters der Schwerpunkt ermittelt wird, der dann die Ortsangabe darstellt. Für eine genauere Ortsbestimmung des Fluoreszenzemitters über die einfache Schwerpunktsbestimmung hinaus kann durch Anpassen einer Punktbildfunktion erfolgen; diese kann z.B. durch eine 2D-Gaussverteilung angenähert werden oder aber es wird eine experimentell ermittelte Punktbildfunktion des optischen Systems verwendet, die Lokalisierungsanalyse sind im Stand der Technik verschiedenste Ansätze bekannt, z. B. auch die im einleitenden Teil der Beschreibung genannten Veröffentlichungen.

[0059] Die einmalige Ausführung des Lokalisierungsschrittes S_4 an einem Einzelbild **14** liefert nur für diejenigen Fluoreszenzemitter eine Ortsangabe, die im Weitfeldbild leuchteten, also nicht im Dunkelzustand D sind. Weiter sind nur isolierte Fluoreszenzemitter lokalisiert (also z.B. nicht im Bereich **12**). Um die Probe hinsichtlich möglichst aller Fluoreszenzemitter abzutasten, werden die Schritte S_2 bis S_4 deshalb mehrmals wiederholt, um möglichst alle Fluoreszenzemitter **11** einmal in der Teilmenge der iso-

lierten Fluoreszenzemitter zu haben. Es schließt sich deshalb an den Lokalisierungsschritt S4 ein Abfrage-schritt S5 an, in dem überprüft wird, ob die Probe **2** zu einem ausreichenden Grad abgebildet wurde. Hierzu kann beispielsweise auf die Fülle der Ortsangaben, die aus allen vorherigen Durchläufen des Lokalisierungsschrittes S4 erhalten wurden, zugegriffen werden. Eine derartige Abfrage ist für den Fachmann im Stand der Technik bekannt, da sie auch bei PALM-Verfahren oder anderen lokalisierungs-basierten Hochauflösungsverfahren, die ohne Ermittlung einer Ortsungenaugigkeit arbeiten, stattfindet. Wurde die Probe hinreichend umfassend erfasst (J-Verzweigung), erfolgt in einem Schritt S6 die Erzeugung eines Gesamtbildes und die Bildausgabe. Andernfalls (N-Verzweigung) werden die Schritte S2 bis S4 erneut durchgeführt, wobei dafür gesorgt wird, dass beim nochmaligen Durchlauf möglichst andere Fluoreszenzemitter isoliert sind.

[0060] Die gängigste (da einfachste) Variante besteht darin, zuerst alle Einzelbilder **14** aufzunehmen und abzuspeichern und dann die Lokalisierungsanalyse für jedes Einzelbild **14** durchzuführen. Alternativ ist bei ausreichender Rechenleistung auch eine online-Analyse möglich. Nach Erzeugung und Ausgabe des Gesamtbildes im Bildausgabeschritt S6 ist in einem Schritt S7 das Verfahren beendet, und die Probe **2** wurde mit einer Ortsauflösung abgebildet, welche über der optischen Abbildungsgrenze liegt.

[0061] Die Anregungsstrahlung regt die Fluoreszenzemitter in der Probe zu einem Blinken **7** an, indem sie mit einer Blinkfrequenz f_B zwischen Hellzustand H und Dunkelzustand D hin- und herwechseln. Der Anregungsschritt S2 erzeugt die blinkende Probe durch geeignete Intensität der Anregungsstrahlung a . Die blinkende Probe **2** wird im Bildaufnahmeschritt S3 in Weitfeldkonfiguration abgebildet und mit der Weitfeldkamera **4** detektiert. Die Kamera hat dabei eine Bildwiederholfrequenz, also eine Bildaufnahmedauer für jedes Einzelbild **14**, die durch eine Integrationsdauer der Einzelbilderzeugung bestimmt ist. Das Steuergerät **6** stellt diese Integrationsdauer an der Weitfeldkamera **4** ein. Weiter stellt das Steuergerät **6** an der Beleuchtungsquelle **3** die Intensität der Anregungsstrahlung a ein.

[0062] Die Intensität der Anregungsstrahlung a und die Blinkfrequenz f_B , mit welcher die Fluorophore **11** blinken, sind miteinander verknüpft. Mit stark steigender Anregungsintensität a steigt die Blinkfrequenz f_B . Gleichzeitig sinkt mit steigender Bildwiederholfrequenz die Nachweisempfindlichkeit der Weitfeldkamera **4**. Eine entsprechende Empfindlichkeitskurve oder andere, die Empfindlichkeitsabhängigkeit beschreibende Daten, ist/sind im Steuergerät **6** abgespeichert. Gleichermaßen ist im Steuergerät **6** der Zusammenhang zwischen Anregungsintensität a und Blinkfrequenz f_B oder ersatzweise zwischen Anre-

gungsintensität und mittlerer Helldauer t_h abgespeichert. Dieser Zusammenhang kann als Kurve oder in Datenform (z. B. als Tabelle) hinterlegt sein. Er ist für die Fluorophore entweder vorher bekannt oder wird in einem speziellen Testmessungsmodus des Mikroskops ermittelt, der vom Steuergerät **6** auf Anforderung oder automatisch durchgeführt wird. In diesem Testmessungsmodus erfasst das Steuergerät **6** durch synchronisierten, gepulsten Betrieb von Beleuchtungsquelle **3** und Weitfeldkamera **4** die Lebensdauer t_d des Dunkelzustandes D und/oder die Helldauer t_h und/oder die Blinkfrequenz f_B . Alternativ kann auch eine Lebensdauerermessung mittels cw-Anregungsstrahlung erfolgen (s.o.).

[0063] Das Steuergerät **6** stellt die Intensität der Anregungsstrahlung a an der Beleuchtungsquelle **3** und die Bildwiederholfrequenz an der Weitfeldkamera **4** gemäß im Steuergerät **6** abgelegten oder dort eingegebenen Vorgaben ein.

[0064] Die Vorgaben können beispielsweise dahingehend lauten, dass eine möglichst schnelle Bildaufnahme gefordert ist. Das Steuergerät **6** ermittelt dann aus dem abgespeicherten Zusammenhang zwischen Bildwiederholfrequenz und optischer Nachweisgrenze der Weitfeldkamera **4** die Mindestbildwiederholfrequenz, die zum Abbilden der Probe **2** erforderlich ist, und stellt die Intensität der Anregungsstrahlung a an der Beleuchtungsquelle **3** derart ein, dass die Blinkfrequenz f_B unterhalb der Bildwiederholfrequenz liegt. Dieser Betriebsmodus kann als Hochgeschwindigkeitsbetriebsmodus aufgefasst werden, da die gegenseitige Wechselwirkung von Intensität der Anregungsstrahlung a und Bildwiederholfrequenz der Einzelbildaufnahme so abgestimmt sind, dass die Erzeugung des Gesamtbildes möglichst schnell erfolgt. Bei der Ermittlung der zulässigen maximalen Bildwiederholfrequenz der Einzelbildaufnahme kann zusätzlich die Anforderung an die Isolierung der einigen Fluoreszenzemitter **11** gesenkt werden, indem die Lokalisierungsanalyse im Schritt S4 als Multi-Emitter-Analyse ausgeführt wird, also mehrere Moleküle pro beugungsbegrenztem Spot in der Auswertung zugelassen werden. Dann sind die Leistungsanforderungen an die Weitfeldkamera **4** herabgesetzt, und die mögliche Bildwiederholfrequenz steigt – dies allerdings auf Kosten der Auflösung.

[0065] Das andere Extrem zu einer möglichst schnellen Bildaufnahme stellt eine gegenseitige Abstimmung von Intensität der Anregungsstrahlung a und Bildwiederholfrequenz dar, bei der eine möglichst hohe Isolierung der Fluoreszenzemitter **11** angestrebt wird. Dann steigert das Steuergerät **6** die Intensität der Anregungsstrahlung an der Beleuchtungsquelle **3**, wodurch die Blinkfrequenz steigt. Gleichzeitig wird auch die Bildwiederholfrequenz auf einen möglichst hohen Wert eingestellt, wodurch letztlich auch der Isolierungsgrad steigt. Je kürzer die

Belichtungszeit verglichen mit der Lebensdauer des Dunkelzustand ist, desto höher kann die Isolierung werden. Auf diese Weise wird die Lokalisierungs-genauigkeit und damit die Hochauflösung gesteigert – allerdings auf Kosten der Photonenbelastung der Probe.

[0066] In einer bevorzugten Ausführungsform verfügt das Steuergerät **6** über eine Eingabeschnittstelle, an der Vorgaben hinsichtlich der gegenseitigen Abstimmung von Bildwiederholfrequenz und Anregungsstrahlungsintensität gemacht werden. Die Schnittstelle kann beispielsweise eine Eingabeschnittstelle für einen Benutzer oder eine Datenschnittstelle zum Zuführen entsprechender Vorgabedaten sein. In einer Ausführungsform können die Vorgabedaten bzw. die Eingabe durch einen Benutzer einen Wert umfassen, der eine Bildaufnahme-geschwindigkeit vorgibt, bevorzugt auf einer Relativskala, z. B. von 0 bis 100. In einer anderen Ausführungsform kann alternativ oder zusätzlich eine Vorgabe der Lokalisierungs-genauigkeit und/oder der Strahlungsbelastung der Probe erfolgen, wiederum bevorzugt auf einer dimensionslosen Skala. Das Steuergerät **6** ermittelt aus dem Vorgabewert oder den mehreren Vorgabewerten gemäß den abgespeicherten Zusammenhängen oder Tabellen die an der Weitfeldkamera **4** einzustellende Bildwiederholfrequenz oder Integrationsdauer oder Belichtungsdauer und an der Beleuchtungsquelle **3** die Intensität der Anregungsstrahlung als cw- oder gepulste Strahlung.

[0067] Wie im allgemeinen Teil der Beschreibung erläutert, kann in Ausführungsformen das Steuergerät **6** zusätzlich eine Messung der charakteristischen Größen der Emitter ausführen. Dies kann beispielsweise eine Messung der Blinkfrequenz f_B oder der Lebensdauer t_d des Dunkelzustandes D sein. Das Mikroskop **1** verwendet eine Weitfeldkamera **4** deren Bildwiederholfrequenz eingestellt wird, bzw. auf die Blinkfrequenz f_B abgestimmt wird. Um hohe Bildwiederholfrequenzen realisieren zu können, ist es in einer Ausführungsform bevorzugt, als Weitfeldkamera **4** ein SPAD-Array zu verwenden.

[0068] In einer Weiterbildung dieses Ansatzes wird ein SPAD-Array verwendet, das a priori für die erforderliche Auflösung in einem gewünschten Probenfeld nicht genügen würde. **Fig. 6** zeigt schematisch diese weitere Ausführungsform des Mikroskops **1**. Das Mikroskop **1** bildet die Probe **2** ab, die flächig ausgebildet ist. Es wird eine Probenfläche P der Probe **2** abgebildet. Dazu weist das Mikroskop **1** ein Objektiv **23** sowie eine weitere Linse **24** auf, welche das Probenfeld P erfassen. Ein Teil des Probenfelds P wird auf einen ortsauflösenden, also i.d.R. pixelierten Detektor **25** abgebildet, wodurch im Unterschied zur Bauweise der **Fig. 1** nun ein Bildfeld in der Probe **2** auf den Detektor **25** abgebildet wird, das kleiner ist als die insgesamt zu erfassende Probenfläche.

[0069] Die Probe **2** wird mit einem Laser, der ein Beispiel für eine Beleuchtungsquelle **3** ist, mit der Anregungsstrahlung a beaufschlagt. Die Anregungsstrahlung a regt in der Probe **2** die Fluoreszenz-emitter **11** zur Abgabe der Fluoreszenzstrahlung f an. Sie wird über eine nicht näher bezeichnete Optik und den Strahlteiler **5** in den Strahlengang zum Objektiv **23** eingekoppelt. Dabei fällt die Strahlung vom Strahlteiler **5** über einen Umlenkspiegel **29** und einen adaptiven Spiegel **30**. Der Umlenkspiegel **29** dient zur Kompakthaltung des Strahlengangs und ist ansonsten nicht weiter wesentlich. Der adaptive Spiegel **30** verfügt über Spiegelsegmente, die individuell angesteuert werden können. Er ist in einer Zwischenbildebene ZB des Abbildungs- wie auch des Beleuchtungsstrahlenganges angeordnet. Der adaptive Spiegel **30** ist ein Beispiel für eine Bildfeldverschiebeeinrichtung zum Verschieben des Bildfeldes, das auf den Detektor **25** abgebildet wird, über die Probenfläche P . Alternativen wären ein Spiegelscanner oder eine Probenverschiebung per Proben-tisch.

[0070] An der Bildfeldauswahl wirkt weiter eine Blende **32** mit, die ebenfalls in einer Zwischenbildebene ZB angeordnet ist. Über eine Linse **33** und einen Klappspiegel **34** gelangt das Bild der Probe **2** dann auf den Detektor **25**, der ebenfalls in einer Zwischenbildebene ZB liegt.

[0071] Der Klappspiegel **34** erlaubt es, alternativ die Probe mit einer üblichen Weitfeldkamera **35** zu betrachten. Schwenkspiegel **34** und Kamera **35** sind optional. Beim Betrieb der Kamera **35** wird zweckmäßigerweise die Blende **32** auf weit gestellt oder aus dem Strahlengang herausgenommen, so dass das ganze Probenfeld der Probe **2** beleuchtet wird.

[0072] Weiter im Abbildungsstrahlengang ist noch eine Linse **31** vorgesehen, die gleichermaßen wie die Linse **33** eine Zwischenabbildung bewirkt. Die Linse **31** sorgt für die Zwischenbildebene ZB , in der die Blende **32** liegt, die Linse **33** für die Zwischenbildebene ZB , in der der Detektor **25** angeordnet ist.

[0073] Die Funktion der Bildfeldverschiebeeinrichtung, im Beispiel der **Fig. 6** realisiert durch den adaptiven Spiegel **30**, wird aus **Fig. 7** deutlich, welche eine Draufsicht auf das zu erfassende Probenfeld P der Probe **2** zeigt. Mit **37** ist das Bildfeld bezeichnet, das deutlich kleiner ist als das Probenfeld P . Das Bildfeld **37** wird über das Probenfeld P verschoben. Die entsprechenden Verschiebestellungen und daraus resultierenden Lagen des Bildfeldes **37** sind in **Fig. 7** schematisch angedeutet.

[0074] **Fig. 8** zeigt, dass die Bildverschiebeeinrichtung das Bildfeld **37** derart in verschiedene Lagen **38** bringt, dass zwischen benachbarten Lagen **38** ein Überlappungsbereich **39** besteht. Dies ist optional, erleichtert aber das spätere Zusammensetzen einzel-

ner Teilbilder zu einem Bild, welches das Probenfeld P wiedergibt.

[0075] In der Ausführungsform mit adaptivem Spiegel **30** umfasst dieser eines oder mehrere gruppierte Elemente, welche das Bildfeld **37** im Probenfeld P verstellen. Die Größe des Bildfeldes **37**, welches auf den Detektor **25** abgebildet ist, ist dabei zum einen durch die Fläche des Detektors **25** selbst, zum anderen durch die Größe der Blende **32** vorgegeben. Diese Blende **32** verbessert die Abbildung, ist jedoch nicht zwingend erforderlich. Lässt man sie weg, kann auf die entsprechende Zwischenbildebene ZB und die optischen Mittel zu deren Erzeugung verzichtet werden.

[0076] Der Detektor **25** ist ein Detektorarray mit einer Pixelzahl, die die optische Auflösungsgrenze, welche letztlich durch das Objektiv **3** begrenzt ist, bei weitem nicht ausschöpfen würde, würde man das gesamte Probenfeld P abbilden. Der Detektor **25** wäre für sich deshalb zur Lokalisierungsmikroskopie ungeeignet. Die Größe des Bildfeldes **37** und das Abbildungsverhältnis des Mikroskops **1** sind deshalb so gewählt, dass eine der Auflösungsgrenze entsprechende Strukturlänge in der Probe **2** der Größe eines Pixels am Detektor entspricht oder sogar größer ist. Durch die Verschiebung des Bildfeldes **37** kann dennoch das Probenfeld P abgetastet werden. Zugleich kann mit einem Detektor gearbeitet werden, der eine hohe Messgeschwindigkeit aufweist. Bei elektronischen Detektoren ist die Einzelbildwiederholfrequenz durch die Integrationszeit sowie die Auslesedauer des Detektors begrenzt. Der Detektor **25** des Mikroskops **1** kann beispielsweise eine Array-Anordnung von Avalanche-Fotodioden, Fotomultipliern oder GaAsP-Hybrid-Detektoren sein, die sehr viel schneller sind, als vergleichsweise größere herkömmliche CMOS- oder CCD-basierte Flächendetektoren.

[0077] Das Probenfeld P wird somit auf einen ortsauflösenden Detektor **25** abgebildet, wobei die optische Abbildung derart erfolgt, dass die Strukturlänge, welche beugungsbedingt maximal auflösbar ist, auf dem Detektor in ihrer Größenordnung einem Detektorpixel entspricht. Das erfasste Bildfeld **37** ist dabei sehr viel kleiner als das Probenfeld P. Das Bildfeld wird zur Erfassung des gesamten Probenfeldes P in verschiedene Lagen **38** gebracht. Für jede Lage wird ein Sub-Einzelbild **14** der Probe **2** entsprechend der aktuellen Lage **38** aufgenommen. Die Sub-Einzelbilder werden dann zu einem Einzelbild **14** des Probenfeldes P zusammengefügt.

[0078] Diese Weiterbildung kann schnelle Detektoren verwenden, die in Pixelzahlen vorliegen, welche für die Abbildung im normalen Weitfeld nicht genügen würden. Verwendet man beispielsweise ein SPAD-Array mit 128×128 Pixeln, wie es aus der Veröffentlichung Niclass et al., IEEE Journal of Solid State Cir-

cuits 43, Seite 2977, 2008, bekannt ist, benötigt man für ein typisches 50 µm großes Probenfeld insgesamt 5×5 verschiedene Bildfeldlagen.

[0079] Fig. 9 zeigt zwei Bilder, die mit einer Ausführungsform des beschriebenen Mikroskops erzeugt wurden. Verwendet wurde ein Mikroskop vom Typ Elyra der Carl Zeiss Microscopy GmbH. Als Detektor für die Bildaufnahme kann die Ultracam 7 der Firma Video Scope International, Ltd., Dulles, USA, verwendet werden. Bei den Fluorophoren handelt es sich um den Farbstoff Alexa 488, der Phalloidin markiert, was zur Anfärbung von Teilen des Zytoskeletts (Aktin) der Zelle führt. Die Intensität der Anregungsstrahlung betrug 0,1 kW/cm² bei einer Wellenlänge von 488 nm.

[0080] Fig. 9 zeigt im oberen Bild eine Weitfeldaufnahme **41**, wohingegen das untere Bild das hochaufgelöste Gesamtbild **42** derselben Probe zeigt. Es wurde aus 30.000 Einzelbildern erzeugt, die mit einer Bildrate von 32 kHz entsprechend einer Belichtungsdauer von 31,25 µs inklusive Reset-Zeit aufgenommen wurden. Die Gesamtmessdauer betrug 1s. Herkömmliche PALM-Mikroskopie mit einem EMCCD-Detektor würde für dieselbe Messung eine Zeitdauer zwischen 10 und 17 min. benötigen. Die Weitfeldaufnahmen **41** wurden durch Aufsummieren der 30.000 Einzelframes erhalten, gleicht also einer Aufnahme mit einer Belichtungsdauer von einer Sekunde. Für die Lokalisierungsanalyse wurde eine 2D-Gauss-Funktion angefitet.

[0081] Fig. 10 zeigt zwei Schnitte „1“ und „2“, die in der Weitfeldaufnahme **41** bzw. dem Gesamtbild **42** der Fig. 9 eingetragen sind. Die obere Darstellung der Fig. 10 zeigt für den Schnitt „1“ zwei Kurven, nämlich eine Schnittkurve **43** der Weitfeldaufnahme **41** und einer Schnittkurve **44** des hochaufgelösten Gesamtbildes **42**. Wie zu sehen ist, ist die Ortsauflösung im hochaufgelösten Gesamtbild **42** sehr viel besser.

[0082] Die untere Darstellung der Fig. 10 belegt anhand des Schnittes „2“, dass im Weitfeld durchaus bei einem gegebenen Schnitt Fehlinformationen auftreten können, die z.B. dadurch herrühren, dass benachbarte helle Bereiche in die Schnittlinie überstrahlen. Dies wird im hochaufgelösten Gesamtbild **42** vermieden. Die untere Darstellung der Fig. 10 lässt diesen Unterschied klar erkennen, da die Schnittkurve **45** der Weitfeldaufnahme **41** Maxima an Stellen zeigt, an denen ausweislich der Schnittkurve **46** des hochaufgelösten Gesamtbildes **42** keine oder weniger Probenstruktur ist (vgl. beispielsweise im Bereich zwischen 0,8 und 0,9 µm).

[0083] Soweit vorstehend als Beispiel für den Dunkelzustand der Triplet-Zustand beschrieben wurde, ist dies nur exemplarisch zu verstehen. Es gibt Fluoreszenzfarbstoffe, die für die Fluoreszenzmikroskopie dem Fachmann bekannt sind, welchen einen

Dunkelzustand aufweisen, der kein Triplet-Zustand ist.

[0084] Die Ausführung des Mikroskopieverfahrens bzw. die entsprechende Gestaltung des Mikroskops **1** ist insbesondere in folgenden Zeitregimen vorteilhaft: Die Dunkellebensdauer t_d liegt im Bereich zwischen 3 und 320 μs . Die Integrationszeit der Kamera ist bevorzugt kürzer als diese Lebensdauer. Mögliche Extremwerte betragen also $t_h = 0,1 t_d$, $t_d = 3 \mu\text{s}$, $PB = 3,3 \mu\text{s}$ und $f_B = \text{ca. } 300 \text{ kHz}$. In einem anderen Extrem ist t_h in etwa gleich $t_d = 300 \mu\text{s}$, $PB = 600 \mu\text{s}$ und $f_B = 1,6 \text{ kHz}$.

ZITATE ENHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

Zitierte Patentliteratur

- WO 2006/127692 [0003]
- DE 102006021317 A1 [0003]
- DE 102008024568 A1 [0006, 0006, 0011, 0012]
- DE 102012205032 A1 [0031]

Zitierte Nicht-Patentliteratur

- Heilemann et al., "Super resolution imaging with small organic fluorophores.", *Angewandte Chemie International Edition*, 48.37, (2009) : 6903–6908 [0011]
- Wäldchen et al., *Scientific Reports*, 5:15348, DOI: 10.1038/srep15348, Oktober 2015 [0012]
- Niclass et al., *IEEE Journal of Solid State Circuits* 43, Seite 2977, 2008 [0078]

Patentansprüche

1. Hochauflösendes Kurzzeit-Mikroskopieverfahren einer Fluoreszenzmitter (11) enthaltenden Probe (2), bei dem

- Fluoreszenzmitter (11) verwendet werden, die einen ersten und einen zweiten Zustand aufweisen, wobei der erste Zustand ein Hellzustand (H) ist, in dem die Fluoreszenzmitter (11) auf Einstrahlung von Anregungsstrahlung (a) hin Fluoreszenzstrahlung (f) abgeben, und der zweite Zustand ein Dunkelzustand (D) ist, in dem die Fluoreszenzmitter (11) auf Einstrahlung von Anregungsstrahlung (a) hin die Fluoreszenzstrahlung (f) nicht abgeben, wobei die Fluoreszenzmitter (11) durch Einstrahlung von Anregungsstrahlung (a) aus dem Hellzustand (H) in den Dunkelzustand (D) gebracht werden können und der Dunkelzustand (D) eine bestimmte Lebensdauer (td) hat, nach der die Fluoreszenzmitter(11) von alleine in den Hellzustand (H) zurückkehren,
- die Probe (2) und damit die Fluoreszenzmitter (11) im Weitfeld mit Anregungsstrahlung (a) einer Intensität beleuchtet wird/werden und dadurch die Fluoreszenzmitter (11) zu einem Blinken (B) angeregt werden, in dem sie mit einer Blinkfrequenz (fB) zwischen Hellzustand (H) und Dunkelzustand (D) hin- und herwechseln,
- die blinkende Probe (2) mit einer Ortsauflösung im Weitfeld abgebildet und mit einer Kamera (4) detektiert wird,
- die Intensität der Anregungsstrahlung (a) so eingestellt wird, dass bezogen auf die Ortsauflösung in den Einzelbildern (14) mindestens einige Fluoreszenzmitter (11) isoliert sind, und die Intensität der Anregungsstrahlung (a) und eine Bildwiederholfrequenz der Kamera (4) so aufeinander abgestimmt werden, dass die Bildwiederholfrequenz, mit der die Einzelbilder (14) erzeugt werden, nicht geringer ist als die Blinkfrequenz (fB), und
- die Einzelbilder (14) einer Lokalisierungsanalyse (S4) unterzogen werden, wobei Ortsangaben für isolierte Fluoreszenzmitter (11) in den Einzelbildern (14) mit einer Genauigkeit bestimmt werden, die über die Ortsauflösung hinausgeht.

2. Mikroskopieverfahren nach Anspruch 1, wobei eine Integrationsdauer der Einzelbilderzeugung nicht länger ist die Lebensdauer (td) des Dunkelzustandes (D).

3. Mikroskopieverfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei in einer Testmessung die Anregungsstrahlung (a) gepulst eingestrahlt wird, die Lebensdauer (td) des Dunkelzustandes (D) gemessen und die Bildwiederholfrequenz entsprechend eingestellt wird, bevorzugt so dass die Integrationsdauer 90 %, besonders bevorzugt 50%, ganz besonders bevorzugt 10% der Lebensdauer (td) des Dunkelzustandes (D) beträgt.

4. Mikroskopieverfahren nach einem der obigen Ansprüche, wobei die Integrationsdauer nicht über 300 μs beträgt, bevorzugt nicht über 100 μs , besonders bevorzugt nicht über 50 μs , ganz besonders bevorzugt zwischen 1 μs und 30 μs beträgt.

5. Mikroskopieverfahren nach einem der obigen Ansprüche, wobei die Fluoreszenzmitter (11) in einem bezüglich der Lebensdauer (td) des Dunkelzustandes (D) chemisch unbeeinflussten Zustand sind.

6. Mikroskopieverfahren nach einem der obigen Ansprüche, wobei eine Intensität der Anregungsstrahlung (a) einen Wert von 1 MW/cm², bevorzugt von 50 kW/cm², besonders bevorzugt von 2 kW/cm² nicht überschreitet.

7. Mikroskopieverfahren nach einem der obigen Ansprüche, wobei die Intensität der Anregungsstrahlung (a) so eingestellt wird, dass die Blinkfrequenz (fB) einen Wert nicht unter 1/(300 μs), besonders bevorzugt nicht unter 1/(50 μs) und ganz besonders bevorzugt zwischen 1/(30 μs) und 1/(1 μs) hat.

8. Mikroskopieverfahren nach einem der obigen Ansprüche, wobei bei der Erzeugung der Einzelbilder (14) die Anregungsstrahlung (a) als cw-Strahlung eingestrahlt wird.

9. Hochauflösendes Mikroskop zur Kurzzeit-Mikroskopie einer Fluoreszenzmitter (11) enthaltenden Probe (2), das aufweist

- eine Anregungseinrichtung (3), die ausgebildet ist, die Probe (2) im Weitfeld mit Anregungsstrahlung (a) zur Abgabe von Fluoreszenzstrahlung (f) anzuregen, eine Abbildungseinrichtung (4), die ausgebildet ist, die Probe (2) im Weitfeld mit einer Ortsauflösung abzubilden, wobei die Anregungseinrichtung (3) so ausgebildet ist, dass bezogen auf die Ortsauflösung mindestens einige Fluoreszenzmitter (11) in der Abbildung isoliert sind,
- eine Lokalisierungsanalyseeinrichtung (6), die ausgebildet ist, Ortsangaben für die isolierten Fluoreszenzmitter (11) mit einer Genauigkeit zu bestimmen, die über die Ortsauflösung hinausgeht, und
- eine Steuerungseinrichtung (6), die ausgebildet ist, die Anregungseinrichtung (3) und die Abbildungseinrichtung (4) gemäß einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7 zu steuern.

10. Mikroskop nach Anspruch 9, wobei die Abbildungseinrichtung (4) einen CMOS-Flächendetektor (4a) mit im Strahlengang vorgeschaltetem Bildverstärker (4b) aufweist.

11. Mikroskop nach Anspruch 9 oder 10, wobei die Bildwiederholfrequenz einen Wert nicht unter 1/(300 μs) hat, bevorzugt nicht unter 1/(100 μs), besonders bevorzugt nicht unter 1/(50 μs) und ganz besonders bevorzugt zwischen 1/(30 μs) und 1/(1 μs) hat.

12. Mikroskop nach einem der Ansprüche 9 bis 11 wobei die Abbildungseinrichtung (4) ein SPAD-Array (25) als Flächendetektor aufweist.

13. Mikroskop nach Anspruch 13, das eine Bildfeldverschiebeeinrichtung (30) aufweist, um ein Probenfeld (P) durch Verschiebung eines Bildfeldes (37) auf das SPAD-Array (25) abzubilden und so jedes Einzelbild (14) durch mehrere Einzelteilbilder zusammenzufügen.

Es folgen 4 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

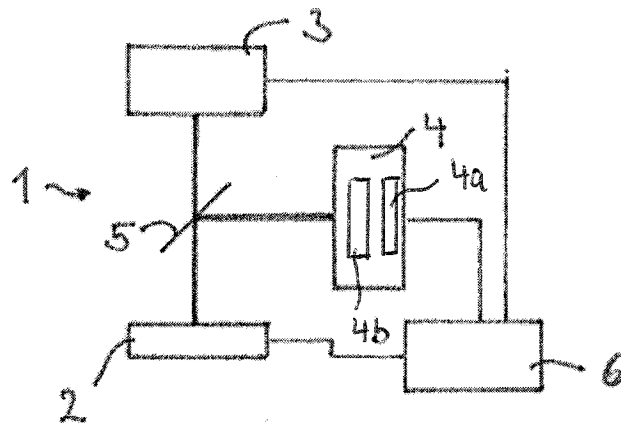


Fig. 1

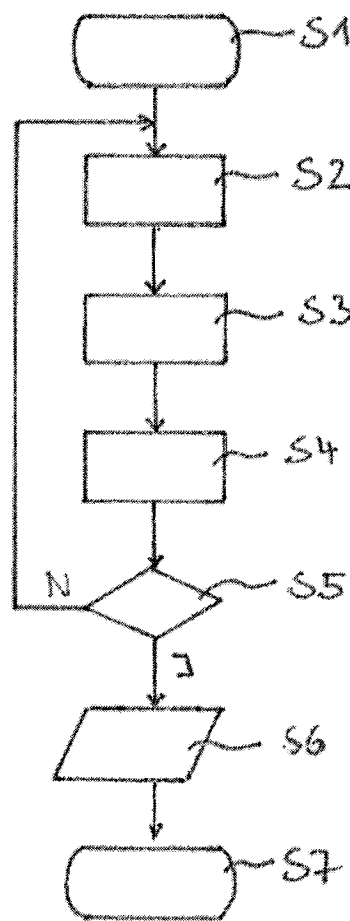


Fig. 2

Fig. 3

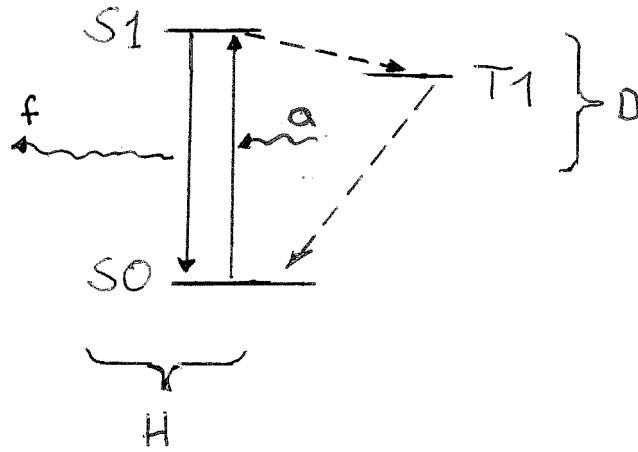


Fig. 4

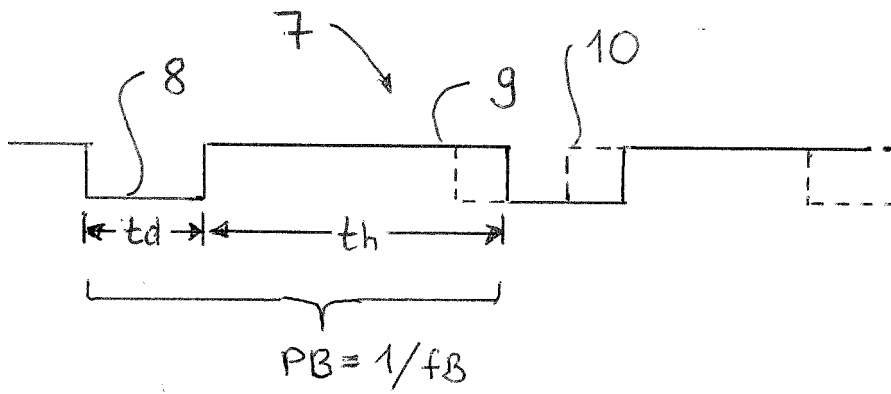
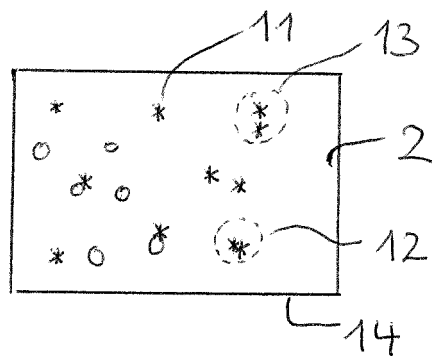
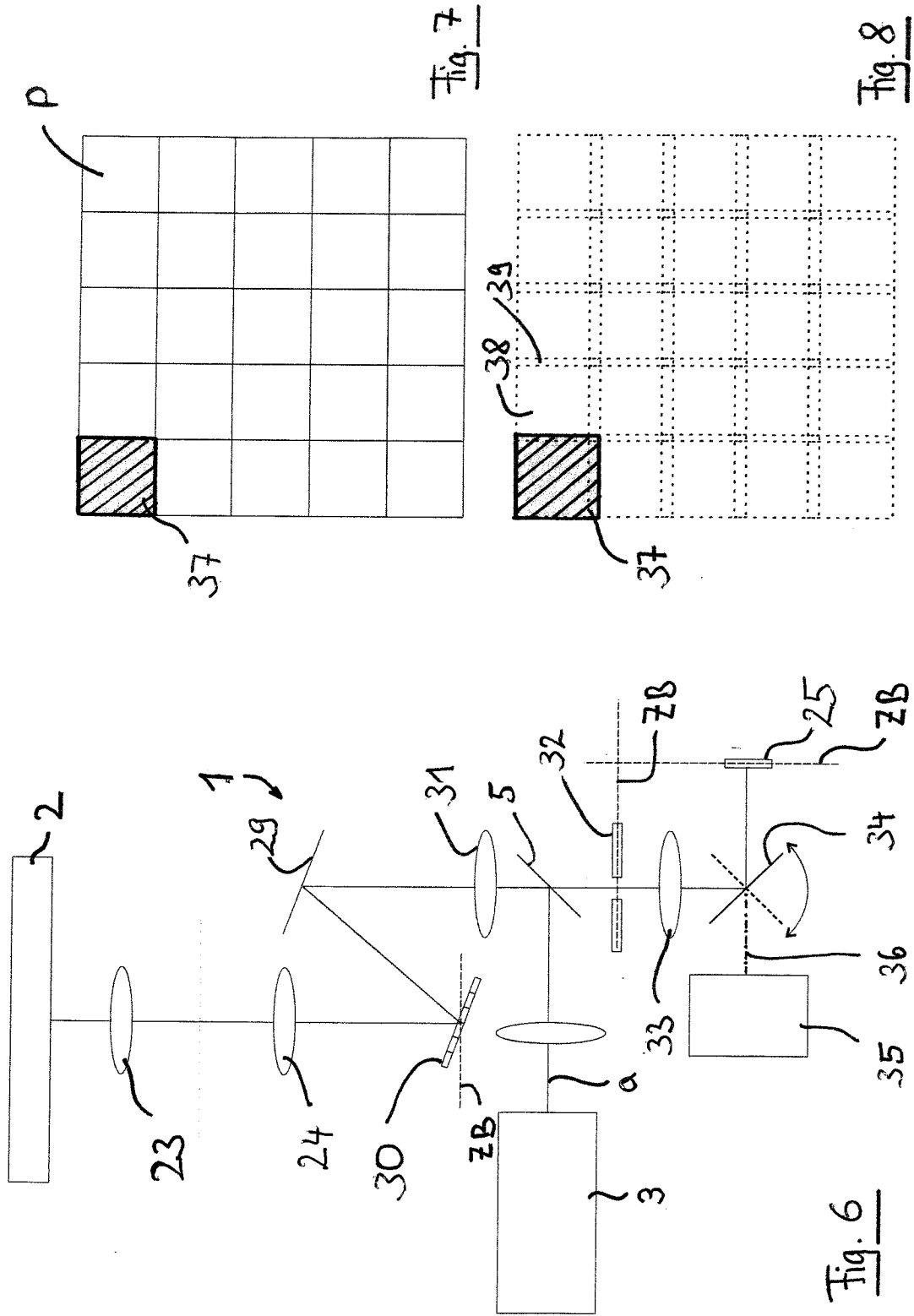


Fig. 5





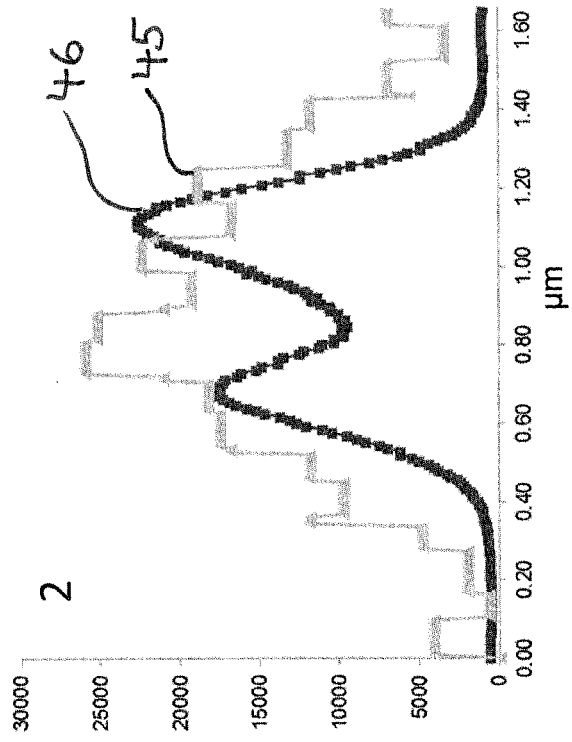
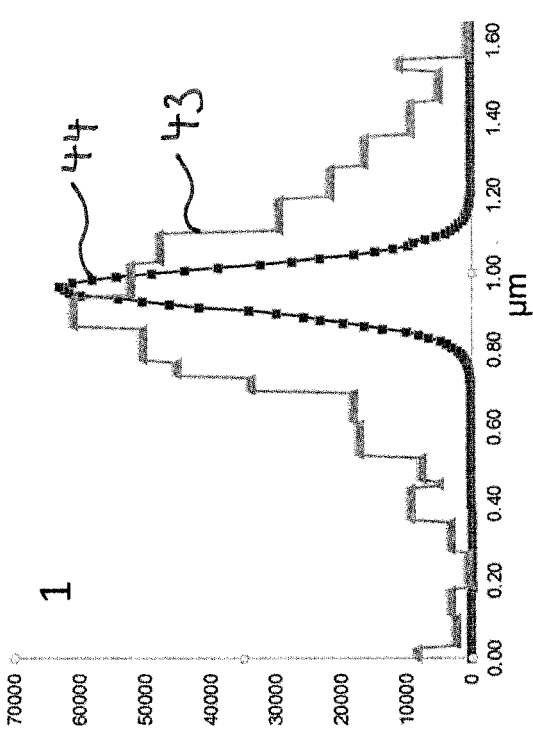


Fig. 10

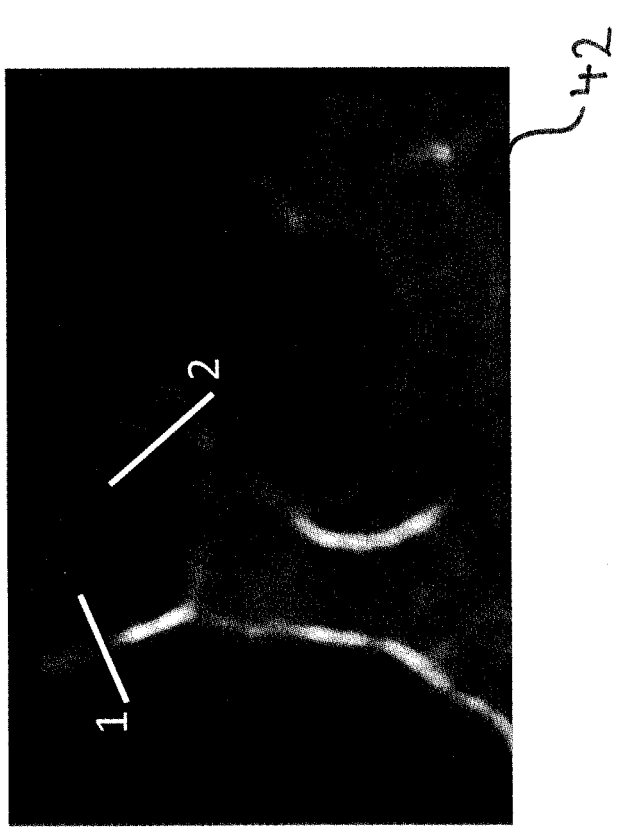
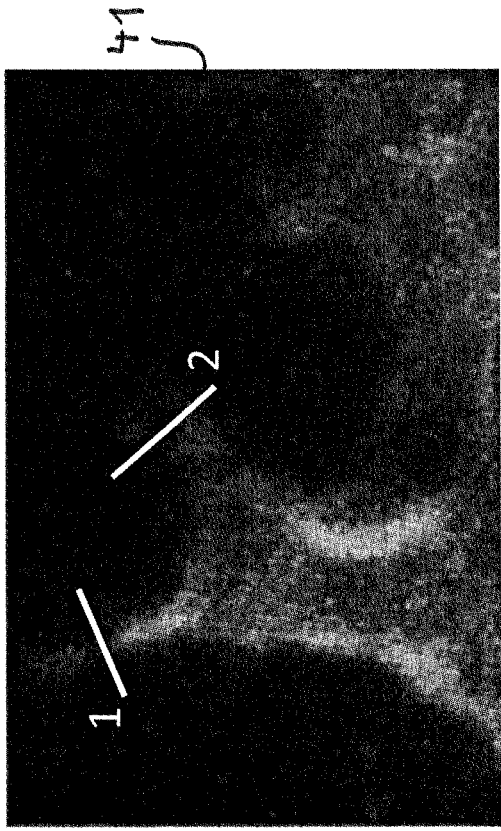


Fig. 9