



(12) **Offenlegungsschrift**

(21) Aktenzeichen: **10 2016 119 264.3**

(22) Anmeldetag: **10.10.2016**

(43) Offenlegungstag: **12.04.2018**

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

G01N 21/63 (2006.01)

G02B 21/00 (2006.01)

(71) Anmelder:

**Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der
Wissenschaften e.V., 80539 München, DE**

(74) Vertreter:

**REHBERG HÜPPE + PARTNER Patentanwälte
PartG mbB, 37073 Göttingen, DE**

(72) Erfinder:

**Hell, Stefan W., Prof. Dr., 37085 Göttingen, DE;
Gwosch, Klaus, 37077 Göttingen, DE; Eilers,
Yvan, Dr., 37073 Göttingen, DE; Balzarotti,
Francisco, Dr., 37083 Göttingen, DE**

(56) Ermittelter Stand der Technik:

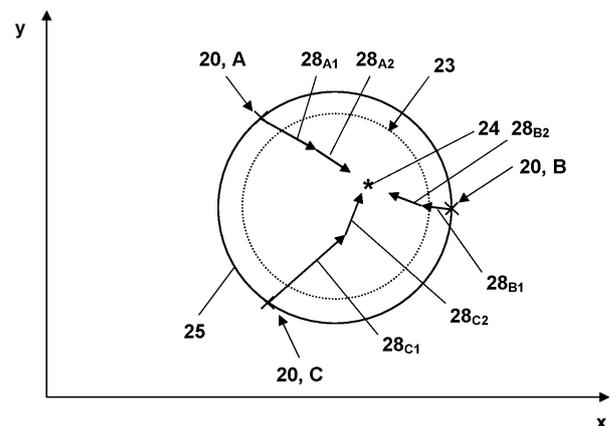
DE	10 2006 009 831	A1
DE	10 2015 105 018	A1
US	2012 / 0 104 279	A1

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen.

(54) Bezeichnung: **Verfahren zum räumlich hochauflösenden Bestimmen des Orts eines vereinzelt, mit Anregungslicht zur Emission von Lumineszenzlicht anregbaren Moleküls in einer Probe**

(57) Zusammenfassung: Bei einem Verfahren zum räumlich hochauflösenden Bestimmen des Orts eines vereinzelt Moleküls (24) in einer oder mehreren Raumrichtungen (x, y) in einer Probe, wobei das Molekül (24) mit Anregungslicht zur Emission von Lumineszenzlicht anregbar ist, wird das Anregungslicht mit einer Intensitätsverteilung auf die Probe gerichtet, die eine Nullstelle (20) und Intensitätsanstiegsbereiche aufweist, welche in jeder der Raumrichtungen beidseitig an die Nullstelle (20) angrenzen. Die Nullstelle wird in jeder der Raumrichtungen in der Probe verschoben, wobei zu jeder Position (A–C) der Nullstelle in der Probe das von dem Molekül (24) emittierte Lumineszenzlicht registriert wird. Dabei wird zunächst ein anfänglicher Ortsbereich (23) in der Probe bestimmt, in dem das Molekül (24) angeordnet ist. Dann wird in jeder der Raumrichtungen mindestens eine anfängliche Position (A–C) der Nullstelle (20) so festgelegt, dass sie in der jeweiligen Raumrichtung auf einer Seite des anfänglichen Ortsbereichs (23) liegt. Das Lumineszenzlicht wird zu den allen Raumrichtungen (x, y) zugeordneten Positionen der Nullstelle quasi gleichzeitig registriert, indem die Nullstelle (20) wiederholt zwischen den Positionen (A–C) verschoben wird. Die Positionen (A–C) der Nullstelle werden abhängig von den zu jeder der Positionen (A–C) registrierten Photonen des Lumineszenzlichts sukzessive in den anfänglichen Ortsbereich (23) hinein verschoben.



Beschreibung

TECHNISCHES GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zum räumlich hochauflösenden Bestimmen des Orts eines vereinzelteten Moleküls in einer oder mehreren Raumrichtungen in einer Probe, wobei das Molekül mit Anregungslicht zur Emission von Lumineszenzlicht anregbar ist. Insbesondere bezieht sich die vorliegende Erfindung auf ein Verfahren mit den Merkmalen des Oberbegriffs des unabhängigen Patentanspruchs 1.

[0002] Unter einem vereinzelteten, mit Anregungslicht zur Emission von Lumineszenzlicht anregbaren Molekül wird hier ein Molekül verstanden, das einen Mindestabstand zu anderen gleichartigen Molekülen aufweist, die mit demselben Anregungslicht zur Emission von Lumineszenzlicht im selben Wellenlängenbereich anregbar sind. Dieser Mindestabstand wird sicher eingehalten, wenn der Abstand des vereinzelteten Moleküls zu derartigen gleichartigen Molekülen mindestens gleich der Beugungsgrenze bei der Wellenlänge des Lumineszenzlichts ist, weil dann das Lumineszenzlicht von den verschiedenen mit Anregungslicht zur Emission von Lumineszenzlicht anregbaren Molekülen getrennt erfasst werden kann. Die Erfindung umfasst aber auch Ausführungsformen, bei denen dieser Mindestabstand kleiner als die Beugungsgrenze bei der Wellenlänge des Lumineszenzlichts ist.

[0003] Das Lumineszenzlicht, zu dessen Emission das Molekül mit dem Anregungslicht anregbar ist, kann insbesondere Fluoreszenzlicht sein. Das Emittieren des Lumineszenzlichts durch das Molekül kann aber auf jedem photophysikalischen Prozess basieren, der durch das Anregungslicht angeregt wird. Hierzu zählen alle Prozesse der Photolumineszenz und beispielsweise auch eine durch das Anregungslicht angeregte Emission von Lumineszenzlicht durch Quantum Dots.

STAND DER TECHNIK

[0004] Das einfachste Verfahren zum Bestimmen des Orts eines vereinzelteten, mit Anregungslicht zur Emission von Lumineszenzlicht anregbaren Moleküls besteht darin, das Molekül mit dem Anregungslicht zur Emission von Lumineszenzlicht anzuregen und das Lumineszenzlicht auf einen Kamera oder allgemeiner auf einen räumlich auflösenden Detektor abzubilden. Für die bei dieser Abbildung erreichbare räumliche Auflösung gilt zwar grundsätzlich die Beugungsgrenze bei der Wellenlänge des Lumineszenzlichts. Wenn jedoch eine Vielzahl von Photonen des Lumineszenzlichts mit dem räumlich auflösenden Detektor detektiert wird, die von einem einzigen Molekül an einem festen Ort in der Probe stammen,

kann aus der räumlichen Verteilung dieser Photonen über den Detektor der Ort des Moleküls mit einer um einen Faktor $1/\sqrt{n}$ verbesserten Präzision bestimmt werden. Dabei ist "n" die Anzahl der registrierten Photonen. Eine deutliche Unterschreitung der Beugungsgrenze bei diesem als Lokalisierung bezeichnet Verfahren setzt daher eine Vielzahl von Photonen des Lumineszenzlichts voraus, die von dem vereinzelteten Molekül emittiert und registriert werden. Damit besteht die Gefahr, dass das vereinzeltete Molekül beim und evtl. schon vor dem Bestimmen seines Orts in der Probe mit der gewünschten Präzision weggeblieben wird. Insbesondere ein wiederholtes Bestimmen des Orts desselben vereinzelteten Moleküls, wie es zum Tracking eines sich in einer Probe bewegenden Moleküls erforderlich ist, ist deshalb oft nicht möglich.

[0005] Wenn ein vereinzeltetes Molekül Lumineszenzlicht mit einer gerichteten räumlichen Verteilung emittiert, wirkt sich dies bei der Bestimmung seines Orts aus der Verteilung der Photonen des Lumineszenzlichts über einen räumlich auflösenden Detektor, d. h. durch Lokalisierung, in Form eines Ortsfehlers aus. Dieser Ortsfehler hängt von der Orientierung des Moleküls in der jeweiligen Probe ab. Eine gerichtete Verteilung des emittierten Lumineszenzlichts zeigt sich beispielsweise bei Molekülen, deren Rotationsdiffusionszeiten länger als ihre Verweildauer in ihrem angeregten Zustand sind, aus dem heraus sie das Lumineszenzlicht emittieren (siehe Engelhardt, J. et al. "Molecular Orientation Affects Localization Accuracy in Superresolution Far-Field Fluorescence Microscopy", NanoLett 2011 Jan. 12; 11 (1):209–13).

[0006] Aus der WO 2006/127692 A2 ist es bekannt, eine interessierende Struktur in einer Probe mit aktivierbaren Molekülen zu markieren, die sich in einem nicht-fluoreszenten Ausgangszustand befinden, aber mit Aktivierungslicht in einen fluoreszenten Zustand überführt werden können, in dem sie mit Anregungslicht zur Emission von Lumineszenzlicht anregbar sind. So kann mit dem Aktivierungslicht ein geringer Anteil der insgesamt vorhandenen Moleküle in den fluoreszenten Zustand gebracht werden, bei dem nächstbenachbarte Moleküle in dem fluoreszenten Zustand einen größeren Abstand als die Beugungsgrenze aufweisen, d. h. vereinzelt sind. Bei einem anschließenden Beaufschlagen der Probe mit Anregungslicht wird Fluoreszenzlicht nur von den in dem fluoreszenten Zustand befindlichen Molekülen emittiert. So kann das Fluoreszenzlicht von den einzelnen vereinzelteten Molekülen in dem fluoreszenten Zustand getrennt registriert werden; und die Orte der einzelnen Moleküle können trotz hoher absoluter Dichte der Moleküle in der Probe durch Lokalisierung mit einer Präzision jenseits der Beugungsgrenze bestimmt werden. Eine Abbildung der Verteilung der Moleküle in der Probe und damit der mit ihnen markierten interessierenden Struktur wird schrittweise erreicht, indem die Schritte des Aktivierens eines

geringen Anteils der Moleküle, des Anregens dieser aktivierten Moleküle zur Emission von Fluoreszenzlicht und des Registrierens des Fluoreszenzlichts mit einem räumlich auflösenden Detektor, bis die jeweiligen aktivierten Moleküle weggeblieben sind, wiederholt und damit für immer mehr der Moleküle durchgeführt werden, die die interessierende Struktur markieren.

[0007] Die WO 2006/127692 A2 beschreibt auch, dass die Aktivierung nur einer Teilmenge der insgesamt vorhandenen Moleküle auf andere Abbildungsverfahren übertragen werden kann. Dabei können durch eine Intensitätsverteilung des Anregungslichts mit durch Minima begrenzten Maxima die vereinzelt Moleküle speziell in bestimmten Ebenen oder anderen räumlichen Untereinheiten der Probe zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt werden.

[0008] Das aus der WO 2006/127692 A2 bekannte Verfahren wird auch als PALM, d. h. als photoaktivierte Lokalisierungsmikroskopie, bezeichnet. Ein sehr ähnliches, als STORM (stochastische optische Rekonstruktionsmikroskopie) bezeichnetes Verfahren weist grundsätzlich dieselben Vor- und Nachteile auf.

[0009] Aus der US 8,174,692 B2 ist es bekannt, dass auch Moleküle eines normale Farbstoffs, die nicht aktivierbar sind, sondern einen fluoreszenten Ausgangszustand aufweisen, und auch nicht zwischen zwei Konformationszuständen geschaltet werden können, von denen nur einer fluoreszent ist, genutzt werden können, um den Ort einzelner Moleküle durch Lokalisierung zu bestimmen. Dazu wird die Probe mit einer so hohen Intensität von Anregungslicht, das die Moleküle zugleich mit einer gewissen Übergangswahrscheinlichkeit in einen relativ langlebigen elektronischen Dunkelzustand überführt, beaufschlagt, dass sich zwischen den aktuell in dem fluoreszenten Zustand befindlichen Molekülen Abstände oberhalb der Beugungsgrenze einstellen.

[0010] Die jeweils in dem fluoreszenten Zustand vorliegenden Moleküle werden von dem Anregungslicht zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt, das mit einer Kamera als räumlich auflösendem Detektor registriert wird. Auf diese Weise werden sukzessive verschiedene Moleküle des Farbstoffs lokalisiert, da die Moleküle, von denen bereits Photonen registriert wurden, in den Dunkelzustand gelangen, aus dem andere Moleküle mit einer gewissen Übergangswahrscheinlichkeit in den fluoreszenten Zustand zurückkehren. Dieses bekannte Verfahren kann kontinuierlich durchgeführt werden, d. h. es können fortlaufend Frames aus der Kamera ausgelesen werden, während die Probe mit der hohen Intensität des Anregungslichts beaufschlagt wird, die den Farbstoff im Wesentlichen in dem Dunkelzustand hält und zu-

gleich die dadurch vereinzelt fluoreszenten Moleküle zur Emission von Lumineszenzlicht anregt.

[0011] Das aus der US 8,174,692 B2 bekannte Verfahren wird auch als GSDIM (Ground State Depletion Individual Molecule Return Microscopy) bezeichnet.

[0012] Ein grundsätzlich anderes Verfahren zum räumlich hochauflösten Bestimmen von Orten von mit Anregungslicht zur Emission von Lumineszenzlicht anregbaren Molekülen in einer Probe wird bei räumlich hochauflösenden Varianten der Rasterfluoreszenzlichtmikroskopie angewandt. Bei der Rasterfluoreszenzlichtmikroskopie basiert die Präzision beim Bestimmen der Orte von fluoreszenten Molekülen in einer Probe auf einer zu jedem Zeitpunkt nur lokalen Anregung der Probe, so dass zu dem jeweiligen Zeitpunkt registriertes Fluoreszenzlicht dem räumlichen Bereich der Anregung zugeordnet werden kann. Wenn die Moleküle in der Probe mit fokussiertem Anregungslicht angeregt werden, setzt die Beugungsgrenze bei der Wellenlänge des Anregungslichts die Untergrenze für die räumlichen Abmessungen des Bereichs der Anregung und damit für die räumliche Auflösung, die bei der Abbildung einer mit den fluoreszenten Molekülen markierten Struktur in der Probe erreichbar ist.

[0013] Bei der STED (Stimulated Emission Depletion)-Fluoreszenzlichtmikroskopie wird die mit fokussiertem Anregungslicht bewirkte Anregung von Molekülen, mit denen eine interessierende Struktur einer Probe markiert ist, im Umfeld jedes Messpunkts durch gerichtete Emission wieder beseitigt. Die gerichtete Emission wird mit STED-Licht stimuliert und verhindert die Emission von Fluoreszenzlicht durch die Moleküle. Danach registriertes Fluoreszenzlicht kann nur noch aus dem Bereich stammen, in dem die Anregung mit dem STED-Licht nicht beseitigt wurde. Dieser Bereich, in dem die Anregung nicht beseitigt wird, kann sehr klein gehalten werden, indem er durch eine Nullstelle der Intensitätsverteilung des STED-Lichts definiert wird und die maximale Intensität des STED-Lichts in der Nullstelle benachbarten Intensitätsmaxima hoch gewählt wird, so dass es die Anregung der Moleküle bereits sehr nahe seiner Nullstelle vollständig beseitigt.

[0014] Statt eine vorher bewirkte Anregung der Moleküle in Teilen der Probe wieder abzuregen, kann Fluoreszenzverhinderungslicht mit einer Nullstelle aufweisenden Intensitätsverteilung auch dazu genutzt werden, fluoreszente Moleküle außerhalb der Nullstelle in einen nicht-fluoreszenten Dunkelzustand zu schalten. Dies erfolgt beispielsweise bei der RESOLFT-Fluoreszenzlichtmikroskopie oder der GSD (Ground State Depletion)-Fluoreszenzlichtmikroskopie.

[0015] Bei den als STED-, RESOLFT- oder GSD-Rasterfluoreszenzlichtmikroskopie bekannten Verfahren wird jedes Molekül, bereits bevor Fluoreszenzlicht von ihm registriert wird, in den an die Nullstelle des Fluoreszenzverhinderungslichts angrenzenden Bereichen neben dem Anregungslicht mit den dort hohen Intensitäten des Fluoreszenzverhinderungslichts beaufschlagt, die mit einer erheblichen Gefahr des Bleichens der Moleküle verbunden sind. Die Gefahr des Bleichens besteht auch, wenn bei diesen bekannten Verfahren ein vereinzelte, mit Anregungslicht zur Emission von Lumineszenzlicht anregbares Molekül in einer Probe mit der Nullstelle des Fluoreszenzverhinderungslichts verfolgt wird, da dazu die Rate der von dem Molekül emittierten Photonen des Lumineszenzlichts fortlaufend zu maximieren ist.

[0016] Aus der WO 2012/171999 A1 ist ein Verfahren bekannt, bei dem eine Probe mit einem Anregungslichtstrahl, der mit einer Intensitätsverteilung von STED-Licht mit einem Minimum am Fokus des Anregungslichtstrahls überlagert ist, so schnell abgetastet wird, dass bei jedem von vielen aufeinanderfolgenden Abtastvorgängen Fluoreszenzlicht nur in Form von einzelnen Photonen registriert wird, die jeweils nur von einem einzelnen Molekül stammen. Die Orte der verschiedenen einzelnen Moleküle, von denen die Photonen stammen, werden den zugehörigen Positionen des Minimums des STED-Lichts in der Probe zugeordnet.

[0017] Bei diesem Verfahren werden zwar nur wenige Photonen, im Extremfall nur ein einziges, von jedem Molekül registriert, dem ein Ort in der Probe zugeordnet wird. Die Moleküle werden aber dennoch typischerweise einigen Zyklen von Anregung und stimulierter Emission unterworfen, so dass ihr Bleichen nicht ausgeschlossen ist. Zudem ist mit diesem bekannten Verfahren ein gezieltes Verfolgen eines bestimmten vereinzelten Moleküls nicht sinnvoll möglich.

[0018] Aus der DE 10 2011 055 367 A1 ist ein Verfahren zum Verfolgen eines einzelnen fluoreszenten Moleküls bekannt. Das Molekül wird mit Anregungslicht zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt und das Fluoreszenzlicht wird registriert. Dabei wird das Anregungslicht mit einer ein lokales Minimum aufweisenden Intensitätsverteilung auf die Probe gerichtet, und das Minimum wird dem sich in der Probe bewegendem Molekül nachgeführt. Zu diesem Zweck wird die Intensitätsverteilung des Anregungslichts fortlaufend so gegenüber der Probe verschoben, dass eine Rate von Photonen des von dem Molekül emittierten Fluoreszenzlichts minimiert wird. Dies bedeutet ein Halten des Moleküls in dem Minimum der Intensitätsverteilung des Anregungslichts, bei dem es sich um eine Nullstelle der Intensitätsverteilung des Anregungslichts handeln kann.

[0019] Aus der WO 2015/097000 A1 ist ein Verfahren zum Bestimmen der Orte vereinzelter Moleküle in einer Probe bekannt, wobei sich die vereinzelter Moleküle in einem fluoreszenten Zustand befinden, in dem sie mit Anregungslicht zur Emission von Fluoreszenzlicht anregbar sind, und wobei Abstände der vereinzelter Moleküle der Substanz einen Mindestwert einhalten. Die vereinzelter Moleküle werden mit dem Anregungslicht zur Emission des Fluoreszenzlichts angeregt, wobei eine Intensitätsverteilung des Anregungslichts eine Nullstelle aufweist. Das Fluoreszenzlicht von den angeregten vereinzelter Molekülen der Substanz wird für verschiedene Positionen der Nullstelle der Intensitätsverteilung des Anregungslichts in der Probe registriert. Dabei sind Abstände zwischen nächstbenachbarten Positionen der Nullstelle nicht größer als der halbe Mindestwert des Abstands der vereinzelter Moleküle. Konkret wird die Probe mit der Nullstelle abgetastet, wobei ein Rastermaß beim Abtasten der Probe nicht größer als der halbe Mindestwert ist. Die Orte der vereinzelter Moleküle in der Probe werden aus einem Verlauf der Intensität des Fluoreszenzlichts von dem jeweiligen vereinzelter Molekül über den Positionen der Nullstelle der Intensitätsverteilung des Anregungslichts abgeleitet. Dabei kann eine Funktion mit Nullstelle an den Verlauf der Intensität des Lumineszenzlichts von dem jeweiligen vereinzelter Molekül angefüttet werden; und der Ort des jeweiligen Moleküls kann der Position der Nullstelle der angefütteten Funktion gleichgesetzt werden. Die Funktion kann eine quadratische Funktion sein. Die angefüttete Funktion kann aber auch individuell an den Intensitätsverlauf des Lumineszenzlichts von einem vereinzelter Molekül der jeweiligen Substanz als Antwort auf den Intensitätsverlauf des Anregungslichts im Umfeld seiner Nullstelle angepasst werden.

[0020] Bei dem aus der WO 2015/097000 A1 bekannten Verfahren wird das jeweilige vereinzelte Molekül, bevor es beim Abtasten der Probe in die Nähe der Nullstelle der Intensitätsverteilung des Anregungslichts gerät, den höheren Intensitäten der angrenzenden Intensitätsmaxima des Anregungslichts ausgesetzt. Diese Intensitäten überschreiten eine Sättigungsintensität des Anregungslichts, oberhalb derer es zu keiner Steigerung der Intensität des Lumineszenzlichts von dem jeweiligen vereinzelter Molekül mehr kommt, so dass dessen Verlauf bei einem Sättigungswert konstant und damit ohne Informationsinhalt ist. Entsprechend werden von jedem vereinzelter Molekül der Substanz sehr viele Photonen emittiert, bevor die Photonen emittiert werden, aus denen der Ort des Moleküls bestimmt wird. Hierdurch besteht eine erhebliche Gefahr des Bleichens des Moleküls, selbst wenn an jeder Position der Nullstelle des Anregungslichts nur eine begrenzte Anzahl von Photonen registriert wird, bevor die Nullstelle weiter verschoben wird.

[0021] Aus der DE 10 2010 028 138 A1 ist ein Verfahren zum Bestimmen der Verteilung einer Substanz in einem Messgebiet durch Abtasten mit einer Messfront bekannt. Über eine Tiefe der Messfront, die kleiner als die Beugungsgrenze bei der Wellenlänge eines optischen Signals ist, steigt die Intensität des optischen Signals derart an, dass ein Anteil der Substanz in einem Messzustand zunächst von nicht vorhanden anwächst und dann wieder auf nicht vorhanden abfällt. Die Messfront wird in Gegenrichtung zu dem Anstieg der Intensität des optischen Signals über das Messgebiet verschoben. Das Messsignal, bei dem es sich um Fluoreszenzlicht handeln kann, wird erfasst und der jeweiligen Position der Messfront in dem Messgebiet zugeordnet.

AUFGABE DER ERFINDUNG

[0022] Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zum räumlich hochauflösenden Bestimmen des Orts eines vereinzelt, mit Anregungslicht zur Emission von Lumineszenzlicht anregbaren Moleküls in einer Probe aufzuzeigen, wobei das Molekül ist, bei dem die Anzahl der Photonen, zu deren Emission das vereinzelt Molekül angeregt werden muss, bezogen auf die erreichte Präzision verglichen mit den bekannten Verfahren zum räumlich hochauflösenden Bestimmen des Orts eines vereinzelt Moleküls deutlich verringert ist.

LÖSUNG

[0023] Die Aufgabe der Erfindung wird durch ein Verfahren mit den Merkmalen des unabhängigen Patentanspruchs 1 gelöst. Die abhängigen Patentansprüche 2 bis 20 betreffen bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens. Die Patentansprüche 21 und 22 betreffen wiederholte Durchführungen des erfindungsgemäßen Verfahrens zum Bestimmen des Orts einer Vielzahl von nacheinander vereinzelt Molekülen bzw. zum Tracken des vereinzelt Moleküls; und Patentanspruch 23 betrifft eine Verwendung eines STED-Rasterfluoreszenzlichtmikroskops zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0024] Die Erfindung geht aus von einem aus der WO 2015/097000 A1 bekannten Verfahren zum räumlich hochauflösenden Bestimmen des Orts eines vereinzelt Moleküls in einer oder mehreren Raumrichtungen in einer Probe, wobei das Molekül mit Anregungslicht zur Emission von Lumineszenzlicht anregbar ist. Wie bei dem Ausgangsverfahren wird das Anregungslicht mit einer Intensitätsverteilung auf die Probe gerichtet, die eine Nullstelle und Intensitätsanstiegsbereiche aufweist, welche in jeder der Raumrichtungen beidseitig an die Nullstelle angrenzen. Diese Nullstelle wird in jeder der Raumrich-

tungen in der Probe verschoben, wobei zu jeder Position der Nullstelle in der Probe das von dem Molekül emittierte Lumineszenzlicht registriert wird.

[0025] Zusätzlich zu dem bekannten Verfahren wird erfindungsgemäß zunächst ein anfänglicher Ortsbereich in der Probe bestimmt, in dem das Molekül angeordnet ist. Dann wird in jeder der Raumrichtungen mindestens eine anfängliche Position der Nullstelle so festgelegt, dass sie in der jeweiligen Raumrichtung auf einer Seite des anfänglichen Ortsbereichs liegt. Das Lumineszenzlicht zu den allen Raumrichtungen zugeordneten Positionen der Nullstelle wird quasi gleichzeitig registriert, indem die Nullstelle wiederholt zwischen ihren jeweiligen Positionen hin und her verschoben wird; und die die Positionen der Nullstelle werden abhängig von den zu jeder der Positionen registrierten Photonen des Lumineszenzlichts sukzessive in den anfänglichen Ortsbereich hinein verschoben.

[0026] Auf diese Weise werden die allen Raumrichtungen zugeordneten Positionen der Nullstelle sehr schnell, d. h. auf Basis einer geringen Anzahl von von dem vereinzelt Molekül emittierten und registrierten Photonen, an den tatsächlichen Ort des Moleküls in der Probe angenähert, und damit auf einen gegenüber dem anfänglichen Ortsbereich stark verkleinerten Ortsbereich eingeschränkt. Die Abmessungen dieses stark verkleinerten Ortsbereichs entsprechen einer Präzision, mit der der Ort des vereinzelt Moleküls bestimmt wird. Sie können problemlos 10 nm und damit die Beugungsgrenze bei der Wellenlänge des Lumineszenzlichts deutlich unterschreiten.

[0027] Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird die Probe auch in dem anfänglichen Ortsbereich des Moleküls nicht räumlich abgetastet, sondern die Positionen des Aufpunkts der Intensitätsverteilung werden aufgrund der zu den bisherigen Positionen des Aufpunkts der Intensitätsverteilung registrierten Photonen des Lumineszenzlichts intelligent, d. h. unter maximaler Ausnutzung aller bislang aus den registrierten Photonen des Lumineszenzlichts verfügbaren Informationen über den tatsächlichen Ort des vereinzelt Moleküls und damit regelmäßig in nur einer Richtung, zu dem tatsächlichen Ort des Moleküls hin verschoben. Das erfindungsgemäße Verschieben der Positionen der Nullstelle erfolgt dementsprechend auch nicht nach einem trial-and-error-Verfahren, sondern immer – wenn auch nicht notwendigerweise auf dem kürzesten Weg – zu dem tatsächlichen Ort des Moleküls in der Probe hin.

[0028] Dass das erfindungsgemäße Verfahren zum räumlich hochauflösenden Bestimmen des Orts des vereinzelt Moleküls dient, bedeutet, wie sich aus der erreichbaren Präzision von 10 nm und deutlich besser ablesen lässt, dass insbesondere eine räumliche Auflösung deutlich unterhalb der Beugungsgren-

ze bei der Wellenlänge des Anregungslichts und auch des Lumineszenzlichts erreicht wird. In diesem Zusammenhang sei angemerkt, dass die Formulierung "räumliche Auflösung" hier als Synonym für die Präzision verwendet wird, mit der der Ort des jeweiligen vereinzelteten Moleküls in der Probe bestimmt wird.

[0029] Dass das erfindungsgemäße Verfahren zum Bestimmen des Ortes eines vereinzelteten Moleküls dient, bedeutet, wie bereits eingangs angesprochen wurde, dass der Ort des vereinzelteten Moleküls einen Mindestabstand zu nächstbenachbarten gleichartigen Molekülen einhält, die mit demselben Anregungslicht zur Emission von Lumineszenzlicht im selben Wellenlängenbereich anregbar sind, so dass das Lumineszenzlicht von den nächstbenachbarten gleichartigen Molekülen nicht aufgrund verschiedener Wellenlängen getrennt werden kann. Dieser Mindestabstand ist bei dem erfindungsgemäßen Verfahren von der Größenordnung der Beugungsgrenze bei der Wellenlänge des Lumineszenzlichts oder kleiner. Tatsächlich kann der Mindestabstand wie bei dem Ausgangsverfahren gemäß der WO 2015/097000 A1 auch erheblich kleiner als die Beugungsgrenze bei der Wellenlänge des Lumineszenzlichts sein, solange er nicht kleiner als eine Ausdehnung jedes der in der jeweiligen Raumrichtung an die Nullstelle angrenzenden Intensitätsanstiegsbereichs der Intensitätsverteilung des Anregungslichts ist, über der die Intensität des Anregungslichts unter einer Sättigungsintensität und damit eine Intensität des Lumineszenzlichts von dem Molekül unterhalb eines Sättigungswerts bleibt. Wenn der Abstand des vereinzelteten Moleküls zu nächstbenachbarten, mit dem Anregungslicht anregbaren Molekülen größer als die Beugungsgrenze bei der Wellenlänge des Lumineszenzlichts ist, kann das von dem vereinzelteten Molekül emittierte Lumineszenzlicht mit einem räumlich auflösenden Detektor räumlich getrennt von dem Lumineszenzlicht registriert werden, das von ihm nächstbenachbarten Molekülen emittiert wird. Wenn der Abstand der vereinzelteten Moleküle zumindest nicht kleiner als der von dem Intensitätsanstiegsbereich in Bezug auf die Intensität des Lumineszenzlichts von den Molekülen beeinflusste Bereich der Intensitätsverteilung des Anregungslichts ist, kann die Differenz der Intensität des Lumineszenzlichts zu dem Sättigungswert bei der Sättigungsintensität des Anregungslichts unmittelbar dem vereinzelteten Molekül zugeordnet werden, weil es sich das Molekül dann allein in diesem von dem Intensitätsanstiegsbereich beeinflussten Bereich befindet.

[0030] Dass das vereinzeltete Molekül mit dem Anregungslicht zur Emission von Lumineszenzlicht anregbar ist, bedeutet, dass das vereinzeltete Molekül photolumineszent ist. Konkret kann das vereinzeltete Molekül fluoreszent, d. h. mit dem Anregungslicht zur Emission von Fluoreszenzlicht anregbar sein. An dieser Stelle sei angemerkt, dass die Angabe "lumines-

zent" oder auch "fluoreszent" hier nur angibt, das das vereinzeltete Molekül mit dem Anregungslicht zur Emission von Lumineszenzlicht bzw. Fluoreszenzlicht anregbar ist, nicht aber, dass es bereits luminesziert bzw. fluoresziert, d. h. angeregt ist.

[0031] Dass das Anregungslicht mit einer Intensitätsverteilung auf die Probe gerichtet wird, die eine Nullstelle und Intensitätsanstiegsbereiche aufweist, welche in jeder der Raumrichtungen beidseitig an die Nullstelle angrenzen, kann bedeuten, dass die Nullstelle mit den angrenzenden Intensitätsanstiegsbereichen durch in unterschiedlichem Abstand zu der Nullstelle unterschiedlich starke destruktive Interferenz ausgeformt wird. Über jeden der an die Nullstelle angrenzenden Intensitätsanstiegsbereich steigt die Intensität des Anregungslichts mit zunehmendem Abstand zu der Nullstelle streng monoton, das heißt kontinuierlich an.

[0032] Die Nullstelle kann eine durch Interferenz gebildete ideale Nullstelle sein, in der die Intensität des Anregungslichts tatsächlich auf null zurückgeht. Eine geringe Restintensität des Anregungslichts in der Nullstelle ist jedoch in der Regel unschädlich, zumal es nicht unbedingt Ziel des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, die Nullstelle so in der Probe zu positionieren, dass ihre Position mit dem Ort des Moleküls in der Probe zusammenfällt. Aus demselben Grund kann die von den Intensitätsanstiegsbereichen begrenzte Nullstelle grundsätzlich auch durch in der jeweiligen Raumrichtung beabstandete gaußförmige Intensitätsverteilungen, konkret durch das zwischen diesen verbleibende Intensitätsminimum, ausgebildet werden.

[0033] Auch mit einer flächenförmigen Nullstelle mit nur in einer einzigen Raumrichtung verlaufenden Intensitätsanstiegsbereichen kann der Ort des Moleküls in der Probe in zwei oder allen drei Raumrichtungen hoch aufgelöst bestimmt werden. Ebenso kann mit einer linienförmigen Nullstelle mit nur in zwei Raumrichtungen verlaufenden Intensitätsanstiegsbereichen der Ort des vereinzelteten Moleküls in der Probe nicht nur in diesen zwei sondern auch in allen drei Raumrichtungen hoch aufgelöst bestimmt werden. Dazu ist das erfindungsgemäße Verfahren unter Ausrichtung des oder der Intensitätsanstiegsbereiche in unterschiedlichen Raumrichtungen durchzuführen.

[0034] Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren kann der anfängliche Ortsbereich, in dem das Molekül angeordnet ist und dem gegenüber die Positionen der Nullstelle festzulegen sind, auf unterschiedliche Weise bestimmt werden. Beispiele hierfür werden weiter unten angegeben.

[0035] Bei dem sukzessiven Verschieben der Nullstelle kann ein Maß für die relative Leuchtstärke des

vereinzelt Moleküls berücksichtigt werden, beispielsweise um die Entfernung festzulegen über die die Nullstelle jeweils verschoben wird. Bei diesem Maß kann es sich konkret um eine Maximalintensität des Lumineszenzlichts von dem Molekül bei Anregung mit dem Anregungslicht oder um einen hiermit unmittelbar korrelierter Intensitätswert handeln. Die Maximalintensität oder der damit korrelierte Intensitätswert kann für das vereinzelt Molekül konkret gemessen oder auch für alle potentiellen vereinzelt Moleküle mit einem bestimmten Wert abgeschätzt werden.

[0036] Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird das Lumineszenzlicht zu den jeweiligen verschiedenen Positionen der Nullstelle in der Probe quasi gleichzeitig registriert, indem der Aufpunkt wiederholt zwischen den jeweiligen Positionen in der Probe verschoben wird. Zu diesem Zweck kann dieselbe Intensitätsverteilung des Anregungslichts mit Hilfe eines Scanners verschoben werden kann. Es ist aber auch möglich, die Intensitätsverteilung für jede der verschiedenen Positionen ihrer Nullstelle in der Probe neu auszubilden, beispielsweise mit Hilfe eines im Strahlengang des Anregungslichts angeordneten Spatial Light Modulators (SLM). Dann kann zumindest insoweit auf einen Scanner verzichtet werden. Weiterhin ist es möglich, die Nullstelle in der Probe zu verschieben, indem das Anregungslicht nacheinander durch ganz oder teilweise verschiedene Lichtquellen bereitgestellt wird. Bei allen diesen Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens kann die Nullstelle sehr schnell zwischen ihren Positionen in der Probe wiederholt hin und her verschoben werden. Es versteht sich, dass dabei das zu den einzelnen Positionen der Nullstelle gehörige Lumineszenzlicht von dem Molekül getrennt registriert wird. Durch das quasi gleichzeitige Registrieren des Lumineszenzlichts zu den verschiedenen Positionen des Aufpunkts der Intensitätsverteilung des Anregungslichts hat den Vorteil, kann das Beaufschlagen der Probe mit dem Anregungslicht und das Registrieren des Lumineszenzlichts von der Probe sofort abgebrochen werden, wenn es die zu den einzelnen Positionen des Aufpunkts der Intensitätsverteilung des Anregungslichts registrierten Photonen des Lumineszenzlichts bereits erlauben, die Positionen näher an den tatsächlichen Ort des Moleküls in der Probe heran zu schieben.

[0037] Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren können die Positionen der Nullstelle konkret abhängig von den Raten oder zeitlichen Abständen der zu jeder der Positionen registrierten Photonen des Lumineszenzlichts sukzessive in den anfänglichen Ortsbereich hinein verschoben werden. Dabei versteht es sich, dass der Mittelwert der zeitlichen Abstände der registrierten Photonen gleich dem Kehrwert der Rate der zu der jeweiligen Position des Aufpunkts der In-

tensitätsverteilung des Anregungslichts registrierten Photonen des Lumineszenzlichts ist.

[0038] Das gezielte Verschieben der Positionen der Nullstelle in den anfänglichen Bereich kann beispielsweise zunächst mit der Maßgabe erfolgen, die Raten der Photonen des zu den einzelnen Positionen registrierten Lumineszenzlichts beziehungsweise die entsprechenden zeitlichen Abstände der Photonen aneinander anzupassen. Dazu kann die Position der Nullstelle mit der größten Rate beziehungsweise den kleinsten zeitlichen Abständen der dazu registrierten Photonen des Lumineszenzlichts in Richtung der Positionen der Nullstelle mit den kleinsten Raten beziehungsweise den größten zeitlichen Abständen verschoben werden. Parallel oder anschließend können alle Positionen der Nullstelle in den anfänglichen Ortsbereich hinein verschoben werden, um die Rate beziehungsweise die zeitlichen Abstände der zu ihnen registrierten Photonen zu minimieren beziehungsweise zu maximieren. Wenn beispielsweise die Raten beziehungsweise die zeitlichen Abstände der zu allen Positionen der Nullstelle registrierten Photonen bereits aneinander angeglichen sind, können diese Positionen in Richtung ihres gemeinsamen Mittelpunkts weiter in den Ortsbereich hinein verschoben werden, um die Raten zu minimieren beziehungsweise die zeitlichen Abstände der Photonen zu maximieren.

[0039] Eine Anzahl der Positionen der Nullstelle, wie sie gegenüber dem anfänglichen Ortsbereich festgelegt und dann erfindungsgemäß verschoben werden, kann zwischen n und $2n$ liegen, wobei n die Anzahl der Raumrichtungen ist, in denen das Molekül lokalisiert wird. D. h., die Anzahl der Positionen der Nullstelle kann sehr klein sein. Mindestens ist eine Position der Nullstelle zu jeder der Raumrichtungen nötig, in denen der Ort des Moleküls in der Probe zu bestimmen ist, um die Gesamtheit der Positionen auf Basis der zu ihnen registrierten Photonen des Lumineszenzlichts gezielt verschieben zu können. Mit zwei Positionen der Nullstelle in jeder Raumrichtung kann der tatsächliche Ort des Moleküls in der Probe eingeschachtelt werden, wie noch näher erläutert werden wird.

[0040] Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren kann der Ort des Moleküls in der Probe in mindestens einer der Raumrichtungen mit der der jeweiligen Raumrichtung zugeordneten Position der Nullstelle gleichgesetzt werden, in der eine Rate der Photonen des von dem Molekül emittierten Lumineszenzlichts minimiert ist. Bei dieser Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die entsprechende Nullstelle mit dem Molekül bestmöglich in der Probe zur Deckung zu bringen.

[0041] Der Ort des Moleküls kann aber auch in mindestens einer der Raumrichtungen aus einer Rate

oder aus zeitlichen Abständen der Photonen des Lumineszenzlichts abgeleitet werden, die zu mindest einer der der jeweiligen Raumrichtung zugeordneten Position der Nullstelle registriert werden.

[0042] Dabei ist die Abhängigkeit der Rate bzw. der zeitlichen Abstände der Photonen des Lumineszenzlichts, von dem räumlichen Abstand des vereinzelteten Moleküls zu der Nullstelle der Intensitätsverteilung des Anregungslichts zu berücksichtigen. Diese Abhängigkeit hängt von dem Verlauf der Intensität des Anregungslichts in den an die Nullstelle angrenzenden Intensitätsanstiegsbereichen und auch von dem photophysikalischen Prozess ab, der der Anregung des Moleküls zur Emission des Lumineszenzlichts zugrunde liegt. So ergibt sich bei einem an eine durch destruktive Interferenz gebildeten Nullstelle angrenzenden Intensitätsanstiegsbereich und einer Photolumineszenz auf Basis eines Einphotonenprozesses näherungsweise eine quadratische Abhängigkeit der Intensität des von dem Molekül emittierten Lumineszenzlichts von dessen Abstand zu der Nullstelle. Bei einer Photolumineszenz auf Basis eines Zweiphotonenprozesses ist die Abhängigkeit noch ausgeprägter und folgt einer Funktion x^4 . Faktisch muss dazu der Verlauf der Intensität des Anregungslichts in dem Intensitätsanstiegsbereich nur insoweit bekannt sein, wie er sich auf die Intensität des Lumineszenzlichts von dem Molekül auswirkt. D. h., die Abhängigkeit der Intensität des Lumineszenzlichts vom Abstand des Moleküls zu der Nullstelle der Intensitätsverteilung des Anregungslichts muss bekannt sein, um sie bei der Bestimmung des tatsächlichen Orts des Moleküls in der Probe berücksichtigen zu können. Diese Abhängigkeit lässt sich aber leicht bestimmen, beispielsweise empirisch durch Abtasten der Umgebung des Moleküls mit der Nullstelle in kleinen Schritten.

[0043] Beim Ableiten des tatsächlichen Ort des Moleküls in der Probe aus der Rate oder den zeitlichen Abständen der Photonen des Lumineszenzlichts, die zu mindestens einer der der jeweiligen Raumrichtung zugeordneten Position der Nullstelle registriert werden, kann eine weitere Rate oder können weitere zeitliche Abstände von Photonen des Lumineszenzlichts berücksichtigt werden. Hierbei kann es sich um eine weitere Rate oder weitere zeitliche Abstände von Photonen des Lumineszenzlichts handeln, die zu einer weiteren der jeweiligen Raumrichtung zugeordneten Position der Nullstelle registriert werden. Dabei ist auch der Abstand der Positionen der Nullstelle in der jeweiligen Raumrichtung zu berücksichtigen. Alternativ oder zusätzlich kann beim Ableiten des Orts des Moleküls in der Probe aus der Rate oder den zeitlichen Abständen der Photonen des zu der mindestens einen Position der Nullstelle registrierten Lumineszenzlichts auch das schon angesprochene Maß für die relative Leuchtstärke des vereinzelteten Moleküls berücksichtigt werden.

[0044] In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens umfassen die anfänglichen Positionen der Nullstelle zu jeder der Raumrichtungen zwei Positionen, die in der jeweiligen Raumrichtung auf beiden Seiten des anfänglichen Ortsbereichs liegen. Durch das sukzessive Verschieben der allen Raumrichtungen zugeordneten Positionen der Nullstelle abhängig von den zu allen Positionen bestimmten Raten oder zeitlichen Abständen der Photonen des Lumineszenzlichts wird dann ein zwischen den Positionen der Nullstelle verbleibender Ortsbereich des Moleküls sukzessive eingeengt. Dabei müssen für jede der Raumrichtungen nicht zwei separate anfängliche Positionen der Nullstelle festgelegt werden. Vielmehr kann eine der anfänglichen Positionen der Nullstelle auch mehreren Raumrichtungen zugeordnet sein. So können zum Beispiel zur Bestimmung des Orts des Moleküls in zwei Raumrichtungen die anfänglichen Positionen der Nullstelle in einer von diesen beiden Raumrichtungen aufgespannten Ebene in den Ecken eines Dreiecks liegen, also insgesamt nur drei Positionen umfassen. Entsprechend können die anfänglichen Positionen der Nullstelle zur Bestimmung des Orts des Moleküls in drei Raumrichtungen in den Ecken eines Tetraeders liegen. Grundsätzlich sind natürlich auch zwei separate Positionen der Nullstelle je Raumrichtung möglich, in der der Ort des Moleküls in der Probe bestimmt wird. Unter dem Gesichtspunkt, den Ort des Moleküls in der Probe mit möglichst wenig Photonen des Lumineszenzlichts zu bestimmen, ist die damit größere Zahl der Positionen der Nullstelle in der Probe, zu denen das Lumineszenzlicht registriert wird, aber nicht unbedingt bevorzugt.

[0045] Insbesondere wenn die anfänglichen Positionen der Nullstelle zu jeder der Raumrichtungen zwei Positionen umfassen, den der jeweiligen Raumrichtung auf beiden Seiten des anfänglichen Ortsbereichs liegen, ist es bevorzugt, wenn die in jeder der Raumrichtungen an die Nullstelle angrenzenden Intensitätsbereiche symmetrisch zu der Nullstelle ausgebildet sind. Noch mehr bevorzugt sind die Intensitätsanstiegsbereiche in allen Raumrichtungen, in denen die Positionen des Moleküls in der Probe bestimmt wird, rotationssymmetrisch um die Nullstelle ausgebildet.

[0046] Der zwischen den Positionen der Nullstelle verbleibende Ortsbereich des Moleküls kann solange sukzessive eingeengt werden, bis seine Abmessungen nicht mehr größer als eine vorgegebene Präzision sind. Diese vorgegebene Präzision kann im Bereich von 20 nm oder kleiner liegen. Sie kann auch kleiner als 10 nm sein. Selbst eine vorgegebene Präzision in der Größenordnung von 1 nm und damit herab bis zu 0,5 nm ist möglich. Grundsätzlich weist das erfindungsgemäße Verfahren keine inhärente Grenze für die bei der Bestimmung des Orts des vereinzelteten Moleküls in der Probe erreichbare Präzision

auf. Im jeweiligen Einzelfall auftretende Verhältnisse, wie beispielsweise ein abnehmendes Signal-zu-Rauschen-Verhältnis können jedoch die praktisch erreichbare Präzision begrenzen.

[0047] So kann als Abbruchkriterium für das weitere Verschieben der Nullstellen bei dem erfindungsgemäßen Verfahren auch das Unterschreiten eines vorgegebenen Signal-zu-Rauschen-Verhältnisses festgelegt werden. Dieses Signal-zu-Rauschen-Verhältnis kann durch ein Verkleinern einer Lochblende vor einem Punktdetektor verbessert werden, mit dem das von dem vereinzelt emittierte Lumineszenzlicht konfokal zu der jeweiligen Position der Nullstelle in der Probe registriert wird. Dieses Verkleinern der Lochblende geht mit einer Verringerung der Ausbeute an registrierten Photonen gegenüber den von dem Molekül emittierten Photonen des Lumineszenzlichts einher. Es kann daher auf die letzten Positionen der Nullstelle in der unmittelbaren Nähe des Orts des Moleküls in der Probe beschränkt werden, an denen das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis typischerweise kritisch wird.

[0048] Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren kann mindestens eine der allen Raumrichtungen, in denen der Ort des Moleküls in der Probe bestimmt wird, zugeordneten Positionen der Nullstelle verschoben werden, sobald an den bisherigen Positionen im Mittel p Photonen des Lumineszenzlichts registriert wurden, wobei p vergleichsweise klein ist oder sogar sehr klein sein kann. Konkret kann p einen Wert haben, der nicht größer als 30, nicht größer als 20, nicht größer 10 oder sogar nicht größer als 5 ist. Es versteht sich, dass von dem Wert von p abhängt, wie weit die mindestens eine der Positionen sinnvoller Weise verschoben werden kann, weil p nach den Grundsätzen der Statistik die Genauigkeit bestimmt, mit der die Raten beziehungsweise die zeitlichen Abstände der Photonen des Lumineszenzlichts zu den einzelnen Positionen bestimmt werden können.

[0049] Alternativ oder zusätzlich kann mindestens eine der allen Raumrichtungen zugeordneten Positionen der Nullstelle verschoben werden, sobald an den bisherigen Positionen insgesamt $n \times q$ Photonen des Lumineszenzlichts registriert wurden, wobei n die Anzahl der Raumrichtung ist, in welchen der Ort des Moleküls in der Probe bestimmt wird. Auch q kann dabei vergleichsweise klein sein. Konkret kann q gleich 50 oder kleiner oder gleich 25 oder kleiner oder sogar gleich 5 oder kleiner sein. Auch hier gilt wieder, dass von dem Wert von q abhängt, wie weit die mindestens eine Position der Nullstelle beim Erreichen von $n \times q$ registrierten Photonen sinnvoller Weise verschoben werden kann.

[0050] In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die Position jeder Nullstelle verschoben, sobald an der bisherigen Posi-

tion dieser Nullstelle m -Photonen des Lumineszenzlichts registriert wurden. Hierbei kann m wieder klein oder sogar sehr klein sein. Konkret kann m 30 oder kleiner, 20 oder kleiner, 10 oder kleiner oder sogar 5 oder kleiner bis hinab zu nur 1 sein.

[0051] Insbesondere bei sehr kleinen Werten von m versteht es sich, dass beim Verschieben der Positionen der Nullstelle möglichst nur signifikante Photonen des Lumineszenzlichts von dem Molekül berücksichtigt werden, das heißt solche Photonen unberücksichtigt bleiben, die zwar registriert werden, aber zum Beispiel einem Rauschen zuzuordnen sind. Wenn die Nullstelle keine ideale Nullstelle ist, in der die Intensität des Anregungslichts auf null zurückgeht, kann auch eine mit der Restintensität des Anregungslichts in der Nullstelle verknüpften Rate von Photonen des Lumineszenzlichts von dem Molekül als ein solches insignifikantes Rauschen betrachtet und zum Abzug gebracht werden, bevor die Rate beziehungsweise die zeitlichen Abstände der Photonen ermittelt wird/werden, auf deren Basis die Positionen der Nullstelle verschoben werden.

[0052] Wie bereits angesprochen wurde, sollte sich der gesamte anfängliche Ortsbereich an jeder Position der Nullstelle in einem Bereich der Intensitätsverteilung des Anregungslichts befinden, in dem die Intensitäten in dem Intensitätsanstiegsbereich unter der Sättigungsintensität des Anregungslichts bleiben, über der eine weitere Erhöhung der Intensität des Anregungslichts keine höhere Intensität des Lumineszenzlichts von dem vereinzelt Molekül mehr zur Folge hat. Bevorzugt ist es bei dem erfindungsgemäßen Verfahren, wenn eine maximale Intensität, d. h. ein absolutes Intensitätsniveau des Anregungslichts jeweils so eingestellt wird, dass sich der anfängliche Ortsbereich bezüglich jeder Position der Nullstelle der Intensitätsverteilung des Anregungslichts in einem Bereich von nicht mehr als 90 % der Sättigungsintensität des Anregungslichts befindet.

[0053] Mit dem sukzessiven Verschieben der Positionen der Nullstelle kann die maximale Intensität des Anregungslichts sukzessive erhöht werden. Mit dem sukzessiven Verschieben der Positionen der Nullstelle verringert sich deren Abstand zu dem tatsächlichen Ort des Moleküls in der Probe. Durch das Erhöhen der maximalen Intensität des Anregungslichts wird der kleiner gewordene Abstand wieder über eine größere Bandbreite unterschiedlicher Intensitäten des Lumineszenzlichts von dem vereinzelt Molekül verteilt.

[0054] Beispielsweise kann die absolute Intensität des Anregungslichts so erhöht werden, dass eine Rate der zu allen jeweiligen Positionen der Nullstelle registrierten Photonen gleich bleibt. Dies ist gleichbedeutend damit, dass die zeitlichen Abstände dieser Photonen gleich bleiben. Das gleich Halten der Rate

bzw. der zeitlichen Abstände durch Erhöhen der absoluten Intensität des Anregungslichts kann zumindest vorübergehend, d. h. für einen Teilzeitraum des Verschiebens der Nullstellen angestrebt werden.

[0055] Konkret kann die maximale Intensität des Anregungslichts über das gesamte Verschieben der Nullstellen hinweg um mindestens 50 % erhöht werden. Sie kann aber auch um mindestens 100 % oder auch auf das 3-fache, 4-fache oder mehrfache ihres Anfangswerts erhöht werden.

[0056] Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren kann zu Beginn des Bestimmens des Orts des vereinzelteten Moleküls ein das vereinzeltete Molekül umfassender Bereich der Probe in jeder der Raumrichtungen mit dem mindestens einen Intensitätsanstiegsbereich abgetastet werden, wobei aus dem Verlauf der Intensität des Lumineszenzlichts während des Ab tastens der erste anfängliche Ortsbereich bestimmt wird. Dieses räumliche Abtasten zumindest eines Bereichs der Probe kann mit vergleichsweise geringer Intensität des Anregungslichts und in vergleichsweise großen räumlichen und kleinen zeitlichen Schritten durchgeführt werden, weil der anfängliche Ortsbereich hieraus nur grob bestimmt werden muss. Statt mit dem mindestens einen Intensitätsanstiegsbereich kann der das vereinzeltete Molekül umfassende Bereich der Probe zu Beginn des Bestimmens des Orts des vereinzelteten Moleküls mit einer gaußförmigen Intensitätsverteilung des Anregungslichts, d. h. mit einem einfachen fokussierten Strahl des Anregungslichts in jeder der Raumrichtungen abgetastet werden. Dies entspricht einer konfokal-mikroskopischen Abbildung des vereinzelteten Moleküls in der Probe.

[0057] In einer anderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird zu Beginn des Bestimmens des Orts des vereinzelteten Moleküls das Anregungslichts mit einer gaußförmigen Intensitätsverteilung nur punktwise oder auf Kreis- oder Spiralbahnen auf einen das vereinzeltete Molekül umfassenden Bereich der Probe gerichtet, wobei der erste anfängliche Ortsbereich aus dem Verlauf der Intensität des Lumineszenzlichts über die Punkte bzw. Bahnen bestimmt wird. Um dabei die Anzahl der von dem vereinzelteten Molekül emittierten Photonen des Lumineszenzlichts zu begrenzen, ist die gaußförmige Intensitätsverteilung sehr schnell zu bewegen und/oder bezüglich der maximalen Intensität des Anregungslichts klein zu halten. Bei dem Verfahren der gaußförmigen Intensitätsverteilung auf Kreis- oder Spiralbahnen kann der Intensitätsanstiegsbereich in der Peripherie der gaußförmigen Intensitätsverteilung des Anregungslichts genutzt werden, um das vereinzeltete Molekül nur mit geringer Intensität des Anregungslichts zu beaufschlagen, die aber ausreichend ist, um den anfänglichen Ortsbereich durch Lokalisierung des Moleküls zu bestimmen.

[0058] Bei noch einer anderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird zu Beginn des Bestimmens des Orts des vereinzelteten Moleküls ein das vereinzeltete Molekül umfassender Bereich der Probe räumlich mit dem Anregungslicht beaufschlagt und auf einen das Lumineszenzlicht mit räumlicher Auflösung registrierenden Detektor, wie beispielsweise eine Kamera, abgebildet. Dann kann der erste anfängliche Ortsbereich aus der mit dem Detektor registrierten räumlichen Verteilung des Lumineszenzlichts bestimmt werden. Da der Ortsbereich bei dieser Bestimmung noch nicht besonders eingengt werden muss, reichen hierfür wenige Photonen von dem vereinzelteten Molekül aus.

[0059] Bei allen hier geschilderten, zu Beginn des Bestimmens des Orts des vereinzelteten Moleküls durchführbaren Schritten, um den ersten anfänglichen Ortsbereich zu bestimmen, kann zugleich eine Maximalintensität des Lumineszenzlichts von dem Molekül bei Anregung mit dem Anregungslicht oder ein damit korrelierter Intensitätswert erfasst werden, die/der ein Maß für die relative Leuchtstärke des vereinzelteten Moleküls ist.

[0060] Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren kann das Lumineszenzlicht auch grundsätzlich mit einem räumlich auflösenden Detektor, wie beispielsweise einer Kamera, aber auch einem kleineren Array von beispielsweise nur 2×2 oder 3×3 Punktsensoren, registriert werden, und zwar auch unabhängig davon, wo der Aufpunkt der Intensitätsverteilung des Anregungslichts aktuell in der Probe positioniert ist. Aus der Summe der über die verschiedenen Positionen des Aufpunkts des Anregungslichts registrierten Photonen des Lumineszenzlichts von dem vereinzelteten Molekül kann dessen Position zusätzlich durch Lokalisierung bestimmt werden. Dabei kann ein sich bei der Lokalisierung ergebender anderer Ort des Moleküls in der Probe auf eine bestimmte Orientierung des Moleküls in der Probe hinweisen, weil zwar die Lokalisierung zur Bestimmung des Orts des Moleküls in der Probe von dessen Orientierung beeinflusst wird, nicht aber die erfindungsgemäße Bestimmung des Orts des Moleküls in der Probe, weil es bei dem erfindungsgemäßen Verfahren nicht darauf ankommt, wo das jeweilige von dem Molekül emittierte Photon registriert wird. Entsprechend kann das Lumineszenzlicht bei dem erfindungsgemäßen Verfahren auch mit einem Punktdetektor registriert werden.

[0061] Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren kann vor dem Bestimmen des Orts des vereinzelteten Moleküls die Probe mit einem Schaltsignal beaufschlagt werden, das das Molekül von benachbarten gleichartigen Molekülen vereinzelt, indem es die benachbarten gleichartigen Moleküle – im Gegensatz zu dem vereinzelteten Molekül – in einen Dunkelzustand schaltet, in dem sie mit dem Anregungslicht nicht zur Emission von Lumineszenzlicht anregbar sind.

Dieser Dunkelzustand kann ein anderer Konformationszustand der Moleküle sein, der nicht lumineszent ist. Es kann sich aber auch um einen elektronischen Dunkelzustand handeln. Alternativ kann das Schaltsignal nur das zu vereinzelnde Molekül in einen lumineszenten Zustand schalten. Das Schaltsignal kann Schalllicht mit einer anderen Wellenlänge und Intensität als das Anregungslicht sein. Es kann aber auch dieselbe Wellenlänge wie und nur eine andere Intensität als das Anregungslicht aufweisen. Grundsätzlich kann das Schaltsignal auch das Anregungslicht selbst sein.

[0062] Eine wiederholte Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens kann zum Bestimmen des Orts einer Vielzahl von nacheinander vereinzelt, mit Anregungslicht zur Emission des Lumineszenzlichts anregbaren Molekülen genutzt werden, die eine interessierende Struktur in der Probe markieren. In einer anderen Ausführungsform dient eine wiederholte Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens zum Verfolgen des sich in der Probe bewegendem vereinzelt Moleküls. Dabei kann der erste anfängliche Ortsbereich bei jeder Wiederholung des erfindungsgemäßen Verfahrens der kleinste zuvor bestimmte weitere Ortsbereich des Moleküls plus ein diesen umgebender Fehlerbereich sein. Die Breite dieses Fehlerbereichs ist auf die maximale Bewegungsgeschwindigkeit des Moleküls in der Probe abzustimmen.

[0063] Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens kann ein STED-Rasterfluoreszenzlichtmikroskop verwendet werden, wobei das durch das STED-Rasterfluoreszenzlichtmikroskop bereitgestellte STED-Licht mit einer von Intensitätsmaxima benachbarten Nullstelle als das Anregungslicht verwendet wird.

[0064] Vorteilhafte Weiterbildungen der Erfindung ergeben sich aus den Patentansprüchen, der Beschreibung und den Zeichnungen. Die in der Beschreibung genannten Vorteile von Merkmalen und von Kombinationen mehrerer Merkmale sind lediglich beispielhaft und können alternativ oder kumulativ zur Wirkung kommen, ohne dass die Vorteile zwingend von erfindungsgemäßen Ausführungsformen erzielt werden müssen. Ohne dass hierdurch der Gegenstand der beigefügten Patentansprüche verändert wird, gilt hinsichtlich des Offenbarungsgehalts der ursprünglichen Anmeldungsunterlagen und des Patents Folgendes: weitere Merkmale sind den Zeichnungen – insbesondere den dargestellten Geometrien und den relativen Abmessungen mehrerer Bauteile zueinander sowie deren relativer Anordnung und Wirkverbindung – zu entnehmen. Die Kombination von Merkmalen unterschiedlicher Ausführungsformen der Erfindung oder von Merkmalen unterschiedlicher Patentansprüche ist ebenfalls abweichend von den gewählten Rückbeziehungen der Patentansprü-

che möglich und wird hiermit angeregt. Dies betrifft auch solche Merkmale, die in separaten Zeichnungen dargestellt sind oder bei deren Beschreibung genannt werden. Diese Merkmale können auch mit Merkmalen unterschiedlicher Patentansprüche kombiniert werden. Ebenso können in den Patentansprüchen aufgeführte Merkmale für weitere Ausführungsformen der Erfindung entfallen.

[0065] Die in den Patentansprüchen und der Beschreibung genannten Merkmale sind bezüglich ihrer Anzahl so zu verstehen, dass genau diese Anzahl oder eine größere Anzahl als die genannte Anzahl vorhanden ist, ohne dass es einer expliziten Verwendung des Adverbs "mindestens" bedarf. Wenn also beispielsweise von einem vereinzelt Molekül die Rede ist, ist dies so zu verstehen, dass genau ein vereinzelt Molekül, zwei vereinzelt Moleküle oder mehr vereinzelt Moleküle vorhanden sind, deren Orte bestimmt werden. Die in den Patentansprüchen angeführten Merkmale können durch andere Merkmale ergänzt werden oder die einzigen Merkmale sein, die der beanspruchte Gegenstand aufweist.

[0066] Die in den Patentansprüchen enthaltenen Bezugszeichen stellen keine Beschränkung des Umfangs der durch die Patentansprüche geschützten Gegenstände dar. Sie dienen lediglich dem Zweck, die Patentansprüche leichter verständlich zu machen.

[0067] Weitere Informationen zu möglichen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung können der WO 2015/097000 A1 entnommen werden. Alles was dort offenbart ist und nicht im Widerspruch zu der vorliegenden Erfindung steht, kann auch bei der Umsetzung der vorliegenden Erfindung realisiert werden.

KURZBESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0068] Im Folgenden wird die Erfindung anhand in den Figuren dargestellter bevorzugter Ausführungsbeispiele weiter erläutert und beschrieben.

[0069] Fig. 1 zeigt schematisch ein STED-Mikroskop, das zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens zum Bestimmen des Orts eines vereinzelt, mit Anregungslicht zur Emission von Lumineszenzlicht anregbaren Moleküls verwendbar ist.

[0070] Fig. 2 zeigt einen Schnitt durch eine Intensitätsverteilung von Anregungslicht mit einer von Intensitätsmaxima benachbarten Nullstelle, das bei der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens mit dem STED-Mikroskop gemäß Fig. 1 auf eine Probe gerichtet wird, und resultierende Intensitäten von Lumineszenzlicht, das von dem an den jeweiligen Ort in der Probe angeordneten lumineszenten Molekül emittiert wird.

[0071] Fig. 3 illustriert eine Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens in Bezug auf einen begrenzten zweidimensionalen Ortsbereich in der Probe, in dem sich das vereinzelte Molekül mutmaßlich befindet.

[0072] Fig. 4 illustriert die Zusammenhänge zwischen unterschiedlichen Intensitäten des bei der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens zu verschiedenen Positionen der Nullstelle der Intensitätsverteilung des Anregungslichts in der Probe registrierten Lumineszenzlichts.

[0073] Fig. 5 ist ein Blockdiagramm einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens.

FIGURENBESCHREIBUNG

[0074] Fig. 1 zeigt schematisch ein STED-Fluoreszenzlicht-Mikroskop **1**, mit dem ein erfindungsgemäßes Verfahren durchführbar ist. Bei der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens werden nicht notwendigerweise alle Bestandteile des STED-Fluoreszenzlichtmikroskops **1** verwendet. Das STED-Fluoreszenzlichtmikroskop **1** umfasst jedoch alle Bestandteile, die zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens notwendig sind. Eine Lichtquelle **2**, die bei der üblichen Verwendung des STED-Fluoreszenzlichtmikroskops **1** STED-Licht bereitstellt, stellt bei der Verwendung des STED-Fluoreszenzlichtmikroskops **1** zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens Anregungslicht **3** bereit. Mit Strahlformungsmitteln **4** wird das Anregungslicht **3** so geformt, dass es im Fokus eines Objektivs **5** eine Intensitätsverteilung mit mindestens einem Intensitätsanstiegsbereich aufweist. In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens weist das Anregungslicht **3** im Fokus des Objektivs **5** eine Intensitätsverteilung mit einer Nullstelle auf, der in allen Raumrichtungen, in denen der Ort eines vereinzelten Moleküls in einer Probe **6** bestimmt werden soll, Intensitätsmaxima auf beiden Seiten benachbart sind. Die Flanken dieser Intensitätsmaxima bilden dann die bei dem erfindungsgemäßen Verfahren genutzten Intensitätsanstiegsbereiche aus. Die Strahlformungsmittel **4** können ausschließlich passive Komponenten oder auch eine aktive Optik, wie beispielsweise einen Spatial Light Modulator (SLM) umfassen. Eine weitere Lichtquelle **7** des STED-Fluoreszenzlichtmikroskops **1**, die bei seiner üblichen Verwendung Anregungslicht bereitstellt, kann bei der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens Schaltlicht **8** bereitstellen, um das Molekül in der Probe **6** zu vereinzeln, dessen Ort in der Probe anschließend bestimmt wird. Das Vereinzeln des Moleküls kann dabei darauf basieren, dass andere gleichartige Moleküle mit dem Schaltlicht **8** in einen Dunkelzustand geschaltet werden, in dem sie nicht mit dem Anregungslicht **3** zur Emission von Lumineszenzlicht anregbar sind. Das Schaltlicht **8** wird in den Strahlen-

gang des Anregungslichts **3** eingekoppelt, wozu hier ein dichroitischer Strahlteiler **9** vorgesehen ist. Mit einem Scanner **10** wird der Anstiegsbereich bzw. die Nullstelle des Anregungslichts **3** in der Probe **6** verschoben. Über einen dichroitischen Strahlteiler **11**, der von der Probe **6** aus vor dem Scanner **10** angeordnet ist, wird Lumineszenzlicht **12** von der Probe **6** aus dem Strahlengang des Anregungslichts **3** ausgekoppelt und mit einer Optik **13** auf eine Kamera **14** abgebildet. Die Kamera **14** ist ein Beispiel für einen räumlich auflösenden Detektor für das Lumineszenzlicht **12**. Alternativ hierzu wird mit einem dichroitischen Strahlteiler **15** das Lumineszenzlicht **12** von der Probe **6** einem Punktdetektor **16** mit einer vorgeschalteten Lochblende **17** zugeführt. Das Lumineszenzlicht **12** aus der Probe **6** stammt von dem vereinzelten Molekül, das mit dem Anregungslicht **3** zur Emission des Lumineszenzlichts angeregt wird. Der dieser Emission von Lumineszenzlicht zugrundeliegende Vorgang ist Photolumineszenz, insbesondere Fluoreszenz. Die Probe **6** ist auf einem Probenhalter **18** angeordnet. Mit dem Probenhalter **18** kann die Probe beispielsweise zusätzlich in z-Richtung, d. h. in Richtung der optischen Achse des Objektivs **5** verlagert werden, um den Intensitätsanstiegsbereich bzw. die Nullstelle der Intensitätsverteilung des Anregungslichts **3** auch in dieser Richtung in der Probe **6** zu verlagern, insbesondere wenn die Nullstelle auch in z-Richtung von Intensitätsmaxima benachbart ist. Auf die Kamera **14** wird die Probe **6** so abgebildet, dass eine Lokalisierung des vereinzelten Moleküls aus der räumlichen Verteilung der Photonen des Lumineszenzlichts **12** von dem Molekül über der Kamera **14** möglich ist. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird jedoch zumindest zusätzlich der Ort des Moleküls in der Probe **6** aufgrund der Intensitäten des Lumineszenzlichts **12** bei unterschiedlicher Anordnung des Intensitätsanstiegsbereichs bzw. der Nullstelle der Intensitätsverteilung des Anregungslichts **3** in der Probe **6** bestimmt.

[0075] In Fig. 2 ist die Intensitätsverteilung **19** des Anregungslichts **3** längs eines Schnitts in x-Richtung quer zur optischen Achse des Objektivs **5** gemäß Fig. 1 gezeigt. Die Intensitätsverteilung umfasst eine zentrale Nullstelle **20**, in der die Intensität I_A des Anregungslichts **3** bis auf null oder zumindest nahe null zurückgeht. Dieser Nullstelle **20** sind auf beiden Seiten Intensitätsmaxima **21** benachbart. Zwischen der Nullstelle **20** und den Intensitätsmaxima **21** sind Intensitätsanstiegsbereiche **22** ausgebildet. In diesen Intensitätsanstiegsbereichen **22** steigt die Intensität I_A des Anregungslichts **3** von null auf eine Sättigungsintensität I_S und darüber hinaus an. Bei der Sättigungsintensität I_S erreicht die Intensität I_L des mit dem Anregungslicht **3** angeregten Lumineszenzlichts **12** einen Sättigungswert I_{SW} , über den hinaus die Intensität I_L nicht weiter ansteigt. Die Intensitätsverteilung **19** des Anregungslichts **3** ist symmetrisch zu der Nullstelle

20 ausgebildet, d. h. die Intensitätsanstiegsbereiche verlaufen symmetrisch zueinander.

[0076] Fig. 3 illustriert einen anfänglichen Ortsbereich **23** in der Probe **6**, in dem sich das Molekül **24** aufgrund früherer Messungen befindet. Dieser Ortsbereich ist hier ein Kreis in der x-y-Ebene. Um den Ort des Moleküls **24** in x- und y-Richtung zu bestimmen, werden drei anfängliche Positionen der Nullstelle **20** der Intensitätsverteilung **19** des Anregungslichts **3** in der x-y-Ebene relativ zu dem anfänglichen Ortsbereich festgelegt. Dabei sind die Positionen A bis C auf einem Kreisbogen **25** angeordnet, der mit Abstand um den anfänglichen Ortsbereich **23** herum verläuft, dass der anfängliche Ortsbereich **23** in allen Raumrichtungen zwischen den Positionen A bis C liegt. Längs des Kreisbogens **25** sind die Positionen A bis C in gleichen Abständen angeordnet. Anders beschrieben liegen die Positionen A bis C in der x-y-Ebene in den Ecken eines gleichseitigen Dreiecks. Zu den Positionen A bis C der Nullstelle **20** in der Probe wird das von dem Molekül **24** aufgrund seiner Anregung mit dem Anregungslicht **3** emittierte Lumineszenzlicht **12** registriert. Bei einer rotationssymmetrischen Ausbildung der Intensitätsanstiegsbereiche **22** um die Nullstelle **20** in der x-y-Ebene hängt die Intensität des zu den verschiedenen Positionen A bis C der Nullstelle **20** registrierten Lumineszenzlichts **12** allein von dem Abstand a des Moleküls **24** zu der jeweiligen Position A bis C und dem Verlauf **26** der Intensität I_L des Lumineszenzlichts über diesem Abstand a ab, wie er in Fig. 4 aufgetragen ist. In Fig. 4 sind die Abstände a_A – a_C des Moleküls **24** von der Nullstelle **20** für die Positionen A bis D sowie die hieraus resultierenden Intensitäten des Lumineszenzlichts I_A bis I_D eingezeichnet. Wenn diese Intensitäten genau erfasst würden, könnte mittels des Verlaufs **26** die zugehörigen Abstände a_A bis a_C ermittelt und hieraus dann kann der Ort des Moleküls **24** gegenüber den bekannten Positionen A bis C bestimmt werden. Die Genauigkeit, mit der die Intensitäten erfasst werden, hängen von der Anzahl der zu den Positionen A bis C registrierten Photonen des Lumineszenzlichts **12** ab. Eine genaue Bestimmung der Intensitäten I_A bis I_C erfordert daher das Registrieren einer großen Anzahl von Photonen zu jeder Positionen A bis C der Nullstelle **20**.

[0077] Die vorliegende Erfindung schlägt einen anderen Weg ein. Erfindungsgemäß werden nur relativ wenige Photonen des Lumineszenzlichts zu den verschiedenen Positionen A bis C der Nullstelle registriert, und zwar nur so viele, dass sich Aussagen darüber treffen lassen, ob die jeweilige Position A bis C der Nullstelle **20** noch relativ weit von dem Molekül **24** entfernt ist, das heißt, ob der Abstand a_A bis a_C noch groß ist und ob die Abstände a_a bis a_c der verschiedenen Positionen A bis C der Nullstelle **20** von dem Molekül **24** etwa gleich oder in bestimmter Weise unterschiedlich sind. Abhängig von dem Ergebnis dieser Bestimmungen, für die an jeder der Positionen

A bis C nur wenige Photonen des Lumineszenzlichts von dem Molekül **24** registriert werden müssen, werden die Positionen A bis C in den anfänglichen Ortsbereich **23** hinein verschoben, wie mit Pfeilen **28_{A1}** bis **28_{C1}** in Fig. 3 illustriert ist. Zu den derart verschobenen Positionen A bis C der Nullstelle **20** wird dann wieder das Lumineszenzlicht **12** von dem Molekül **24** registriert, um die Bestimmungen erneut durchzuführen. Da die in Fig. 3 eingezeichneten Pfeile **28_{A1}** bis **28_{C1}** die Position A bis C der Nullstelle **20** in gleiche Abstände zu dem Molekül **24** führen, würden an den derart verschobenen Positionen A bis C der Nullstelle **20** gleiche Raten beziehungsweise zeitliche Abstände der Photonen des Lumineszenzlichts **12** erfasst. Entsprechend würden die Positionen A bis C anschließend auf ihren gemeinsamen Mittelpunkt hin weiter verschoben, was in Fig. 3 durch Pfeile **28_{A2}** bis **28_{C2}** angedeutet ist. Praktisch können zum Annähern der Positionen A bis C an das Molekül **24** sehr viele Wiederholungen der Schritte des Verschiebens der Positionen A bis C und des Registrierens des Lumineszenzlichts von dem Molekül **24** zu den verschiedenen Position A bis C durchgeführt werden. Dabei erfolgt das Registrieren des Lumineszenzlichts **12** zu den verschiedenen Positionen A bis C quasi gleichzeitig, um möglichst schnell festzustellen, wie sich die Raten der Photonen beziehungsweise deren zeitliche Abstände zueinander verhalten, um möglichst bald, das heißt nach insgesamt möglichst wenigen Photonen die Positionen A bis C in sinnvoller Weise weiter in den anfänglichen Ortsbereich **23** hinein zu verschieben, mit dem Ziel einer Annäherung der Positionen A bis C an das Molekül **24**. Dabei versteht es sich, dass die Anzahl der zu jeder Position A bis C bis zum nächsten Verschieben registrierten Photonen des Lumineszenzlichts mit der Schrittweite korreliert ist, um die die Positionen A bis C anschließend sinnvoll verschoben werden können. Grundsätzlich müssen auch nicht alle Positionen A bis C nach jedem Registrieren von Lumineszenzlicht verschoben werden. Es können auch nur die Positionen A bis C verschoben werden, an denen die Rate der Photonen besonders groß ist beziehungsweise ihre zeitlichen Abstände besonders klein sind. Dies kann so weit getrieben werden, dass jede Position A bis C immer dann verschoben wird, wenn zu ihr eine gewisse Anzahl von Photonen registriert wurde, während die anderen Positionen A bis C, zu denen dies noch nicht der Fall ist, zunächst noch nicht verschoben werden. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren kann der Ortsbereich des Moleküls **24** in der Probe sehr schnell, das heißt konkret mit viel weniger Photonen als bei einer Lokalisierung des Moleküls **24** in der Probe **6** sehr stark eingegrenzt werden. Wenn die Positionen A bis C schon sehr dicht beieinanderliegen, kann der von ihnen umschlossene Ortsbereich als Ort des Moleküls +/- der erreichten Präzision ausgegeben werden. Ausgehend von diesen letzten Positionen A bis C der Nullstelle **20** kann aber auch noch eine genauere Bestimmung des Orts des Moleküls **24**

erfolgen, indem er beispielsweise von den zu diesen Positionen A bis C bestimmten Intensitäten des Lumineszenzlichts **12** anhand des Verlaufs **26** gemäß **Fig. 4** abgeleitet wird.

[0078] Die in **Fig. 5** in Form eines Blockdiagramms dargestellte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens beginnt nach dem Start **29** mit einem Vereinzeln **30** des Moleküls **24**, beispielsweise mit Hilfe des Schaltlichts **8** gemäß **Fig. 1**. Dann erfolgt ein Bestimmen **31** des anfänglichen Ortsbereichs **23**. Beim Festlegen **32** werden die anfänglichen Positionen A bis C der Nullstelle **20** relativ zu dem anfänglichen Ortsbereich **23** festgelegt. Dann wird in einer Prozedur **33** die Nullstelle **20** an den Positionen A bis C angeordnet, und zu den Positionen A bis C wird das von dem Molekül **24** emittierte Lumineszenzlicht **12** registriert. Dabei wird die Nullstelle **20** so zwischen den Positionen A bis C hin und her verschoben, wobei das Lumineszenzlicht **12** zu den verschiedenen Positionen A bis C getrennt registriert wird, dass das Lumineszenzlicht **12** zu den verschiedenen Positionen A bis C quasi gleichzeitig registriert wird. Beim nachfolgenden Verschieben **34** werden die Positionen A bis C der Nullstelle **20** in den anfänglichen Ortsbereich **23** hinein verschoben und zwar abhängig von den Raten beziehungsweise den zeitlichen Abständen der Photonen des zu den verschiedenen Positionen A bis C registrierten Lumineszenzlicht **12**. Die Prozedur **33** und das Verschieben **34** werden in einer Schleife **35** wiederholt, bis sich die Positionen A bis C der Nullstelle **20** auf ein gewünschtes Maß an den Ort des Moleküls **24** in der Probe angenähert haben. Dann wird beim Bestimmen **36** der Ort des Moleküls **24** in der Probe bestimmt, beispielsweise als der von den letzten Positionen A bis C begrenzte Ortsbereich. Die Schritte **32**, **33**, **34** und **36** können einschließlich der Schleife **35** in einer weiteren Schleife **37** wiederholt werden, um das Molekül **24**, wenn es sich in der Probe **6** bewegt, zu verfolgen. Man spricht dann auch von einem Tracken des Moleküls **24**. Dabei können die Positionen A bis C immer um den beim vorherigen Bestimmen **36** bestimmten Ort des Moleküls **24** herum angeordnet werden. Der anschließend von den festgelegten Positionen A bis C überspannte anfängliche Ortsbereich **23** ist so groß zu wählen, dass er das Molekül **24** auch dann noch umfasst, wenn es sich nach der letzten Prozedur **33** maximal weit in der Probe **6** bewegt hat.

[0079] Alternativ können in einer größeren Schleife **38** zusätzlich die Schritte **30** und **31** wiederholt werden, um eine mit einer Vielzahl von gleichartigen Molekülen **24** markierte interessierende Strukturen in der Probe **6** sukzessive abzubilden. Das Ende **39** ist in diesem Fall dann erreicht, wenn die interessierende Struktur mit einer gewünschten Vollständigkeit abgebildet ist.

Bezugszeichenliste

1	STED-Fluoreszenzlichtmikroskop
2	Lichtquelle
3	Anregungslicht
4	Strahlformungsmittel
5	Objektiv
6	Probe
7	Lichtquelle
8	Schaltlicht
9	dichroitischer Strahlteiler
10	Scanner
11	dichroitischer Strahlteiler
12	Lumineszenzlicht
13	Optik
14	Kamera
15	dichroitischer Strahlteiler
16	Punkt-detektor
17	Lochblende
18	Probenhalter
19	Intensitätsverteilung
20	Nullstelle (Aufpunkt) der Intensitätsverteilung 19 des Anregungslichts 3
21	Maximum
22	Intensitätsanstiegsbereich
23	anfänglicher Ortsbereich
24	Molekül
25	Kreisbogen
26	Verlauf
27	Nullstelle
28	Pfeil
29	Start
30	Vereinzeln
31	Bestimmen
32	Festlegen
33	Prozedur
34	Verschieben
35	Schleife
36	Routine
37	Schleife
38	Schleife
39	Ende
I_A	Intensität des Anregungslichts 3
I_L	Intensität des Lumineszenzlichts 12
I_S	Sättigungsintensität des Anregungslichts 3
I_{sw}	Sättigungswert der Intensität I_L des Lumineszenzlichts 12
a	Abstand
A	Position der Nullstelle 20
B	Position der Nullstelle 20
C	Position der Nullstelle 20
a_A	Abstand der Position A der Nullstelle 20 von dem Molekül 24
a_B	Abstand der Position B der Nullstelle 20 von dem Molekül 24
a_C	Abstand der Position C der Nullstelle 20 von dem Molekül 24
I_A	Intensität des Lumineszenzlichts 12 an der Position A Position der Nullstelle 20

I_B Intensität des Lumineszenzlichts **12** an der
Position B Position der Nullstelle **20**

I_C Intensität des Lumineszenzlichts **12** an der
Position C Position der Nullstelle **20**

ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

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

Zitierte Patentliteratur

- WO 2006/127692 A2 [0006, 0007, 0008]
- US 8174692 B2 [0009, 0011]
- WO 2012/171999 A1 [0016]
- DE 102011055367 A1 [0018]
- WO 2015/097000 A1 [0019, 0020, 0024, 0029, 0067]
- DE 102010028138 A1 [0021]

Zitierte Nicht-Patentliteratur

- Engelhardt, J. et al. "Molecular Orientation Affects Localization Accuracy in Superresolution Far-Field Fluorescence Microscopy", NanoLett 2011 Jan. 12; 11 (1):209–13 [0005]

Patentansprüche

1. Verfahren zum räumlich hochauflösenden Bestimmen (31) des Orts eines vereinzelt Moleküls (24) in einer oder mehreren Raumrichtungen in einer Probe (6), wobei das Molekül (24) mit Anregungslicht (3) zur Emission von Lumineszenzlicht (12) anregbar ist,

– wobei das Anregungslichts (3) mit einer Intensitätsverteilung auf die Probe (6) gerichtet wird, die eine Nullstelle (20) und Intensitätsanstiegsbereiche (22) aufweist, welche in jeder der Raumrichtungen beidseitig an die Nullstelle (20) angrenzen,

– wobei die Nullstelle (20) in jeder der Raumrichtungen in der Probe verschoben wird, wobei zu jeder Position (A, B, C) der Nullstelle (20) in der Probe (6) das von dem Molekül (24) emittierte Lumineszenzlichts (12) registriert wird,

dadurch gekennzeichnet,

– dass ein anfänglicher Ortsbereich (23) in der Probe (6) bestimmt wird, in dem das Molekül (24) angeordnet ist,

– dass in jeder der Raumrichtungen mindestens eine anfängliche Position (A, B, C) der Nullstelle (20) so festgelegt wird, dass sie in der jeweiligen Raumrichtung auf einer Seite des anfänglichen Ortsbereichs (23) liegt,

– dass das Lumineszenzlicht (12) zu den allen Raumrichtungen zugeordneten Positionen (A, B, C) der Nullstelle (20) quasi gleichzeitig registriert wird, indem die Nullstelle (20) wiederholt zwischen den Positionen (A, B, C) verschoben wird,

– dass Positionen (A, B, C) der Nullstelle (20) abhängig von den zu jeder der Positionen (A, B, C) registrierten Photonen des Lumineszenzlichts (12) sukzessive in den anfänglichen Ortsbereich (23) hinein verschoben werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet,** dass die Positionen (A, B, C) der Nullstelle (20) abhängig von den Raten oder zeitlichen Abständen der zu jeder der Positionen (A, B, C) registrierten Photonen des Lumineszenzlichts (12) sukzessive in den anfänglichen Ortsbereich (23) hinein verschoben werden.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet,** dass eine Anzahl der Positionen (A, B, C) der Nullstelle (20) zwischen n und $2n$ liegt, wobei n die Anzahl der Raumrichtungen ist, in denen das Molekül (24) lokalisiert wird.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet,** dass in mindestens einer der Raumrichtungen der Ort des Moleküls (24) in der Probe (6)

– mit der der jeweiligen Raumrichtung zugeordneten Position (A, B, C) der Nullstelle (20) gleichgesetzt wird, in der eine Rate der Photonen des Lumines-

zenzlichts (12) minimiert ist, die zu dieser Nullstelle (20) registriert werden, oder

– aus einer Rate oder zeitlichen Abständen der Photonen des Lumineszenzlichts (12) abgeleitet wird, die zu der mindestens einen der jeweiligen Raumrichtung zugeordneten Position (A, B, C) der Nullstelle (20) registriert werden.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet,**

– dass die anfänglichen Positionen (A, B, C) der Nullstelle (20) zu jeder der Raumrichtungen zwei Positionen umfassen, die in der jeweiligen Raumrichtung auf beiden Seiten des anfänglichen Ortsbereichs (23) liegen, und

– dass durch das sukzessive Verschieben (34) der allen Raumrichtungen zugeordneten Positionen (A, B, C) der Nullstelle (20) abhängig von den zu allen Positionen bestimmten Raten oder zeitlichen Abständen der Photonen des Lumineszenzlichts (12) ein zwischen den Positionen (A, B, C) der Nullstelle (20) verbleibender Ortsbereich des Moleküls (24) sukzessive eingeengt wird.

6. Verfahren nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet,** dass der zwischen den Positionen der Nullstelle (A, B, C) verbleibende Ortsbereich des Moleküls (24) sukzessive eingeengt wird, bis seine Abmessungen nicht mehr größer als eine vorgegebene Präzision sind.

7. Verfahren nach Anspruch 6 **dadurch gekennzeichnet,** dass die vorgegebene Präzision im Bereich zwischen 0,5 nm und 20 nm oder im Bereich von 1 nm bis 10 nm liegt.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet,** dass die in jeder der Raumrichtungen an die Nullstelle (20) angrenzenden Intensitätsanstiegsbereiche (22) symmetrisch zu der Nullstelle (20) ausgebildet sind.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet,** dass mindestens eine der allen Raumrichtungen zugeordneten Positionen (A, B, C) der Nullstelle (20) verschoben wird, sobald an den bisherigen Positionen im Mittel p Photonen des Lumineszenzlichts (12) registriert wurden, wobei p nicht größer als 30, 20, 10 oder 5 ist.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet,** dass mindestens eine der allen Raumrichtungen zugeordneten Positionen (A, B, C) der Nullstelle (20) verschoben wird, sobald an den bisherigen Positionen insgesamt $n \times q$ Photonen des Lumineszenzlichts (12) registriert wurden, wobei n die Anzahl der Raumrichtungen ist, in welchen der Ort des Moleküls (24) in der Probe (6) bestimmt wird, und wobei q nicht größer als 50, 25 oder 5 ist.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Position (A, B, C) jeder Nullstelle (20) verschoben wird, sobald an der bisherigen Position m Photonen des Lumineszenzlichts (12) registriert wurden, wobei m nicht größer als 30, 20, 10, 5 oder 3 ist.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass eine maximale Intensität (I_A) des Anregungslichts (3) so eingestellt wird, dass sich der anfängliche Ortsbereich (23) bezüglich jeder Position der Nullstelle (20) in einem Bereich von nicht mehr als 90 % einer Sättigungintensität (I_S) des Anregungslichts (3) befindet.

13. Verfahren nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass die absolute Intensität (I_A) des Anregungslichts (3) mit dem Verschieben (34) der Positionen (A, B, C) der Nullstelle (20) sukzessive erhöht wird.

14. Verfahren nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**, dass die absolute Intensität (I_A) des Anregungslichts (3) so erhöht wird, dass eine Rate der zu allen jeweiligen Positionen (A, B, C) der Nullstelle (20) registrierten Photonen zumindest vorübergehend gleich bleibt.

15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, **dadurch gekennzeichnet**, dass die absolute Intensität (I_A) des Anregungslichts (3) insgesamt um mindestens 50 % erhöht wird

16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein das vereinzelte Molekül (24) umfassender Bereich der Probe (6) zu Beginn des Bestimmens (31) des Orts des vereinzelten Moleküls (24) mit der Nullstelle (20) oder einer gaußförmigen Intensitätsverteilung (19) des Anregungslichts (3) in jeder der Raumrichtungen abgetastet wird, wobei aus dem Verlauf der Intensität (I_L) des Lumineszenzlichts (12) während des Abtastens der anfängliche Ortsbereich (23) bestimmt wird.

17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Anregungslichts (3) zu Beginn des Bestimmens des Orts des vereinzelten Moleküls (24) mit einer gaußförmigen Intensitätsverteilung (19) punktweise oder auf Kreis- oder Spiralbahnen auf einen das vereinzelte Molekül (24) umfassenden Bereich der Probe (6) gerichtet wird, wobei der anfängliche Ortsbereich (23) aus dem Verlauf der Intensität (I_L) des Lumineszenzlichts (12) über den Punkten bzw. Bahnen bestimmt wird.

18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein das vereinzelte Molekül (24) umfassender Bereich der Probe (6) zu Beginn des Bestimmens (31) des Orts

des vereinzelten Moleküls (24) räumlich mit dem Anregungslicht (3) beaufschlagt und auf einen räumlich auflösenden Detektor abgebildet wird, wobei aus einer räumlichen Verteilung des mit dem Detektor registrierten Lumineszenzlichts (12) der anfängliche Ortsbereich (23) bestimmt wird.

19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Lumineszenzlicht (12) mit räumlicher Auflösung registriert wird, wobei zusätzlich eine räumliche Verteilung des insgesamt registrierten Lumineszenzlichts (12) hinsichtlich des Orts des Moleküls (24) in der Probe (6) ausgewertet wird.

20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Probe (6) vor dem Bestimmen (31) des Orts des vereinzelten Moleküls (24) mit einem Schaltsignal (8) beaufschlagt wird, das das Molekül (24) von benachbarten gleichartigen Molekülen vereinzelt, indem die benachbarten gleichartigen Moleküle nach dem Vereinzeln (30) – im Gegensatz zu dem vereinzelten Molekül (24) – mit dem Anregungslicht (3) nicht zur Emission von Lumineszenzlicht (12) anregbar sind.

21. Wiederholte Durchführung des Verfahrens nach einem der vorhergehenden Ansprüche zum Bestimmen (31) des Orts einer Vielzahl von nacheinander vereinzelten, mit Anregungslicht (3) zur Emission des Lumineszenzlichts (12) anregbaren Molekülen (24), die eine interessierende Struktur in der Probe (6) markieren.

22. Wiederholte Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 20 zum Verfolgen des sich in der Probe (6) bewegendem vereinzelten Moleküls (24).

23. Verwendung eines STED-Rasterfluoreszenzlichtmikroskop (1) zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 22, wobei durch das STED-Rasterfluoreszenzlichtmikroskop (1) bereitgestelltes STED-Licht als das Anregungslicht (3) verwendet wird.

Es folgen 4 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

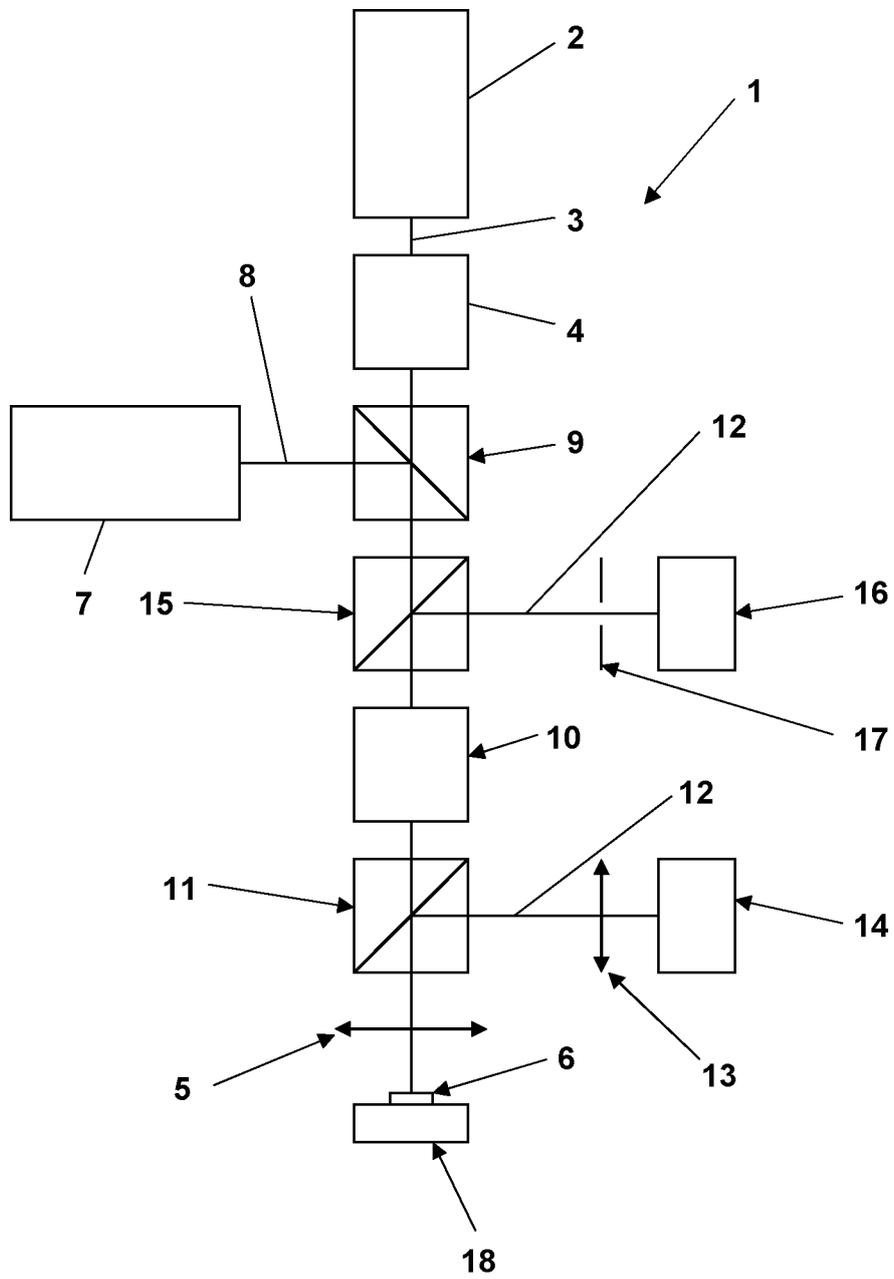


Fig. 1

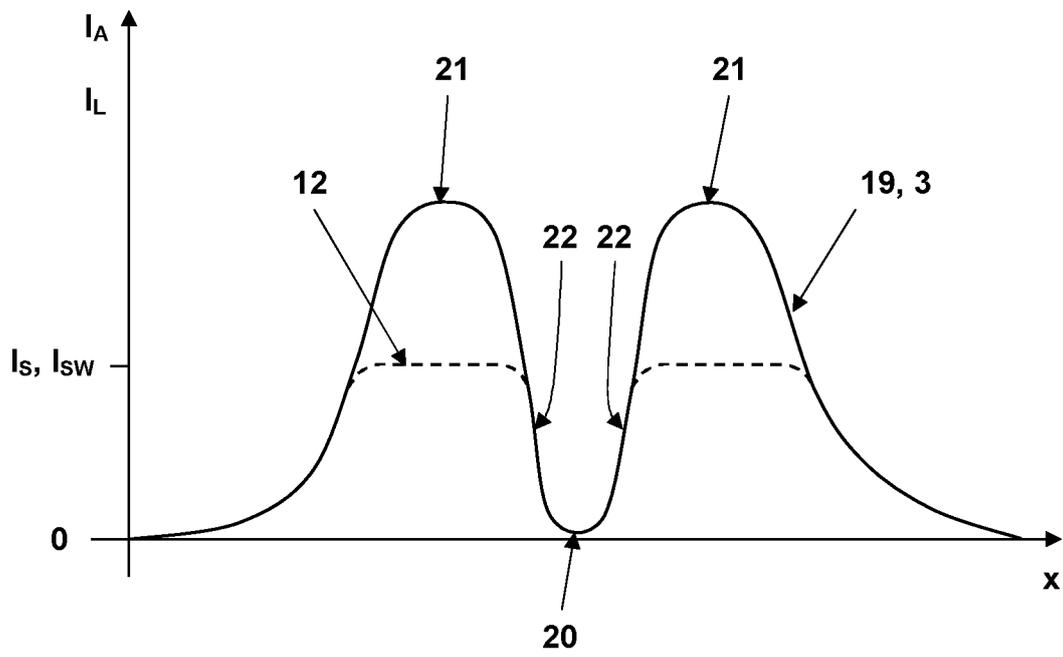


Fig. 2

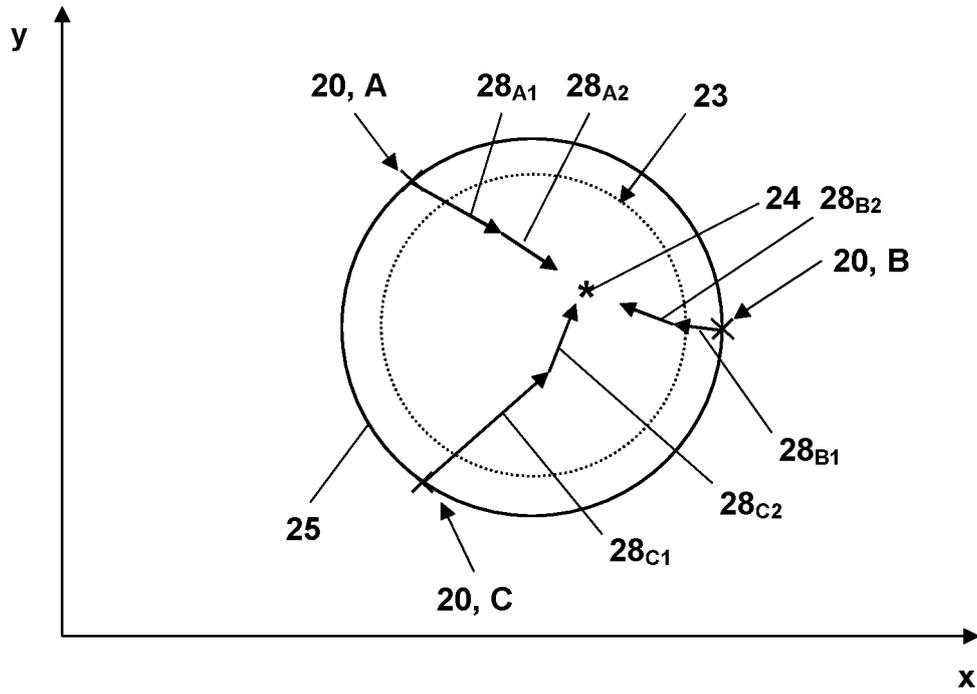


Fig. 3

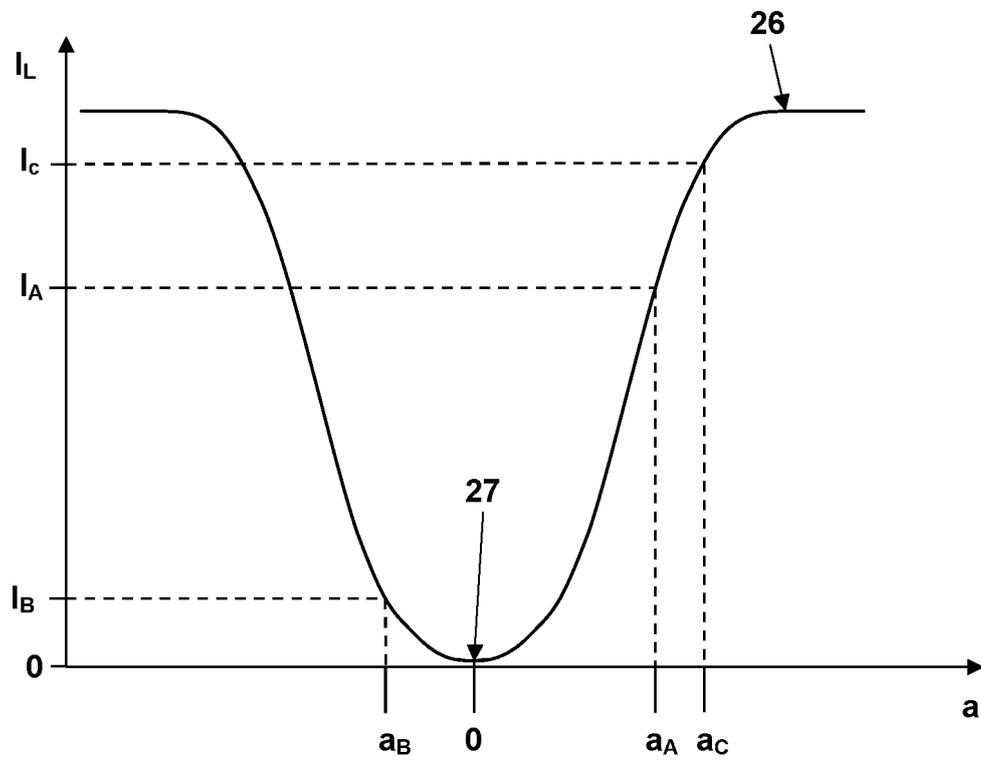
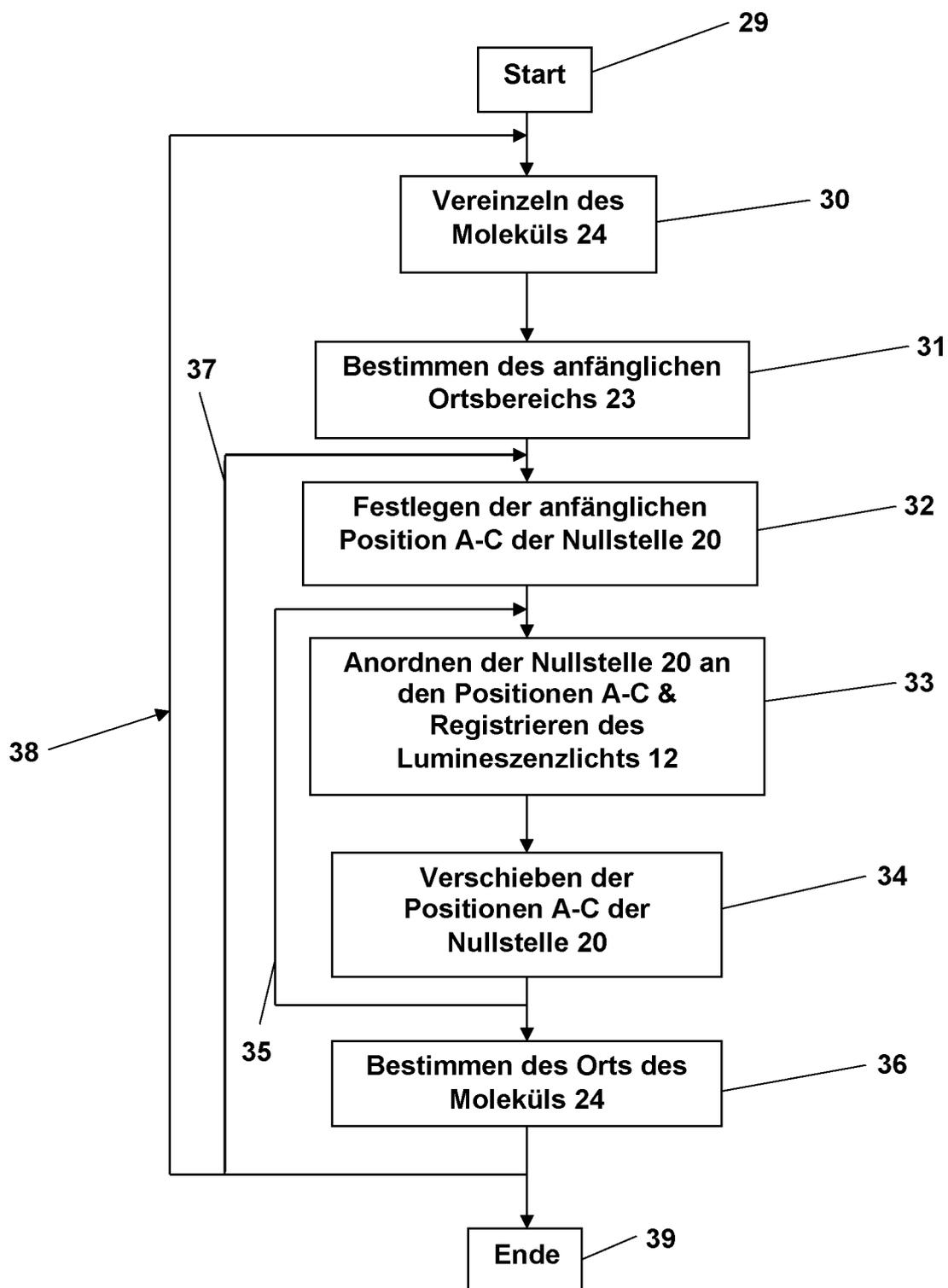


Fig. 4

**Fig. 5**