



(12) **Offenlegungsschrift**

(21) Aktenzeichen: **10 2010 028 138.7**

(22) Anmeldetag: **22.04.2010**

(43) Offenlegungstag: **27.10.2011**

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

(71) Anmelder:

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

(74) Vertreter:

Rehberg Hüppe + Partner, 37073, Göttingen, DE

(72) Erfinder:

Hell, Stefan W., Prof. Dr., 37085, Göttingen, DE

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:

DE 10 2009 008646 A1
DE 10 2008 054317 A1
DE 10 2008 049878 A1
DE 10 2008 023438 A1

DE 10 2008 011993 A1
DE 10 2008 009216 A1
DE 10 2007 039111 A1
DE 10 2007 033737 A1
DE 10 2006 047912 A1
DE 10 2006 046369 A1
DE 10 2006 026204 A1
DE 10 2006 011176 A1
DE 10 2006 009831 A1
DE 10 2005 034443 A1
DE 103 25 459 A1
DE 101 05 391 A1
DE 100 56 382 A1
US 2010/00 08 394 A1

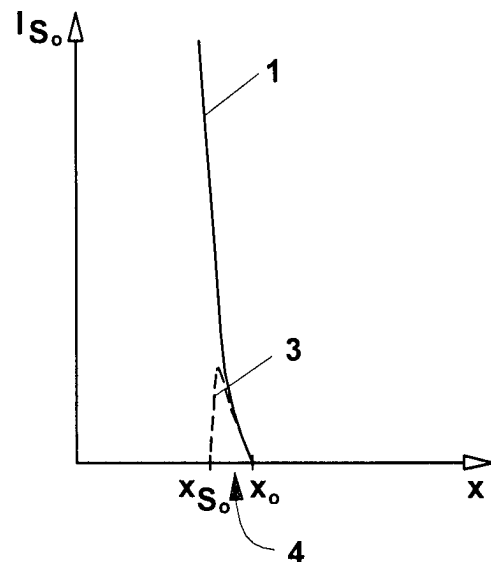
**Hell, S.W., Microscopy and its focal switch. In:
Nature Methods, Vol. 6, No. 1, Jan. 2009, S.24-32**

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Bestimmen der Verteilung einer Substanz durch Abtasten mit einer Messfront**

(57) Zusammenfassung: Zum Bestimmen der Verteilung einer Substanz in einem Messgebiet, wobei die Substanz mittels eines optischen Signals (1) (a) aus einem Zustand, in dem kein Messsignal (3) von ihr erhältlich ist, in einen Messzustand überführbar ist, in dem ein Messsignal (3) von ihr erhältlich ist, und mittels desselben optischen Signals (1) oder eines anderen optischen Signals (5) (b) aus dem Messzustand, in dem das Messsignal (3) von ihr erhältlich ist, in den einen oder einen weiteren Zustand überführbar ist, in dem kein Messsignal von ihr erhältlich ist, wird in dem Messgebiet eine Messfront (4) aus dem optischen Signal (1) und/oder aus dem weiteren optischen Signal (5) ausgebildet, wobei die Intensität des optischen Signals (1) und/oder des weiteren optischen Signals (5) über eine Tiefe der Messfront (4), die kleiner als die Beugungsgrenze bei der Wellenlänge des optischen Signals (1) und/oder des weiteren optischen Signals (5) ist, derart ansteigt, dass der Anteil der Substanz (10) in dem Messzustand durch Überführen der Substanz (a) aus dem einen Zustand in den Messzustand von nicht vorhanden anwächst und durch Überführen der Substanz (b) aus dem Messzustand in den einen oder den weiteren Zustand wieder auf nicht vorhanden anwächst. Die Messfront (4) wird in Gegenrichtung zu dem Anstieg der Intensität des optischen Signals (1) und/oder des weiteren optischen Signals (5) über das Messgebiet verschoben. Das Messsignal (3) wird zumindest aus dem Bereich der Messfront (4) erfasst und zu zugehörigen Positionen der Messfront (4) in dem Messgebiet zugeordnet.



Beschreibung

TECHNISCHES GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zum Bestimmen der Verteilung einer Substanz in einem Messgebiet, wobei die Substanz mittels eines optischen Signals (a) aus einem Zustand, in dem kein Messsignal von ihr erhältlich ist, in einen Messzustand überführbar ist, in dem ein Messsignal von ihr erhältlich ist, und/oder mittels desselben optischen Signals oder eines anderen optischen Signals (5) (b) aus dem Messzustand, in dem das Messsignal von ihr erhältlich ist, in den einen oder einen weiteren Zustand überführbar ist, in dem kein Messsignal von ihr erhältlich ist. Weiterhin bezieht sich die vorliegende Erfindung auf ein Rasterlichtmikroskop zur Durchführung eines solchen Verfahrens. Zudem bezieht sich die vorliegende Erfindung auf ein Verfahren zum lokalisierten Auslösen einer Umwandlung einer Substanz in einem Umwandlungsgebiet, wobei die Substanz mittels eines optischen Signals (a) aus einem nichtreaktiven Zustand, in dem die Umwandlung mit einem physikalischen Signal nicht auslösbar ist, in einen reaktiven Zustand überführbar ist, in dem die Umwandlung mit dem physikalischen Signal auslösbar ist, und mittels desselben optischen Signals oder eines anderen optischen Signals (b) aus dem reaktiven Zustand in den einen oder einen weiteren nichtreaktiven Zustand überführbar ist.

[0002] Bei der interessierenden Verteilung der Substanz in dem Messgebiet kann es sich um eine mit der Substanz markierte Struktur in einer Probe handeln, wobei eine Abbildung der Struktur von Interesse ist. Mittels der Verteilung kann aber beispielsweise auch eine Information in einem Datenträger codiert sein, wobei diese Information ausgelesen werden soll. Generell schließt die Angabe "Verteilung der Substanz" nicht nur die Bedeutung einer Verteilung der Substanz als solche sondern auch die Bedeutung einer Verteilung eines bestimmten dauerhaften Basiszustands der Substanz, beispielsweise einen stabilen Konformationsbasiszustand, ein, der sich während des Bestimmens der Verteilung nicht ändert.

[0003] Der Begriff Gebiet bzw. Messgebiet oder Umwandlungsgebiet bezeichnet ein in einer, zwei oder drei Dimensionen ausgedehntes Gebiet, wobei ein in nur einer oder zwei Dimensionen ausgedehntes Gebiet in der zweiten und dritten bzw. in der dritten Raumrichtung so kleine Abmessungen aufweist oder es andere Gründe gibt, dass die Auflösung der Verteilung in diesen Richtungen/dieser Richtung nicht möglich oder nicht von Interesse ist.

[0004] Bei dem Messzustand der Substanz kann es sich um einen gegenüber dem einen Zustand angeregten elektronischen Zustand der Substanz handeln, aus dem heraus die Substanz spontan Lu-

mineszzenzlicht, wie insbesondere Fluoreszenzlicht, emittiert. Das optische Signal ist dann Anregungslicht, das die Substanz aus dem energetisch tiefer liegenden einen Zustand in den Messzustand überführt. Aus dem elektronisch angeregten lumineszierenden Zustand kann die Substanz zum Beispiel durch das Anregungslicht selbst oder durch ein weiteres optisches Signal in einen Dunkelzustand, beispielsweise einen Triplett-Zustand, überführt oder durch Stimulationslicht in ihren einen oder einen anderen energetisch tiefer liegenden Zustand zurückgeführt werden, aus dem heraus keine spontane Emission von Lumineszenzlicht mehr möglich ist. Zu der Gruppe von Substanzen mit derartigen Eigenschaften zählen insbesondere alle herkömmlichen Fluoreszenzfarbstoffe aber auch andere lumineszente Substanzen.

[0005] Bei dem Messzustand der Substanz kann es sich aber auch um einen Konformationszustand oder einen anderen Zustand der Substanz handeln, aus dem heraus sie überhaupt durch Anregungslicht zur Emission von Lumineszenzlicht oder zur Bereitstellung irgendeines anderen optischen Messsignals anregbar ist, während der eine Zustand ein Konformationszustand oder ein anderer Zustand der Substanz ist, in dem das betrachtete Messsignal auch nach Anregung nicht oder zumindest nicht in nennenswertem Ausmaß zur Verfügung steht. Bei dem weiteren Zustand der Substanz kann es sich in diesem Fall sowohl um einen weiteren Konformationszustand als auch um einen sich von dem Messzustand im Wesentlichen elektronisch unterscheidenden Dunkelzustand handeln. Zu diesen Substanzen zählen insbesondere alle sogenannten schaltbaren Fluoreszenzfarbstoffe, schaltbaren fluoreszierenden Proteine und aktivierbaren Lumineszenzpartikel.

[0006] Entsprechend kann es sich bei dem reaktiven Zustand der Substanz um einen Konformationszustand oder einen elektronischen oder chemischen Zustand der Substanz handeln, aus dem heraus sie durch ein physikalisches Signal zu der gewünschten Umwandlung anregbar ist, während jeder nichtreaktive Zustand der Substanz ein Konformationszustand oder ein elektronischer oder chemischer Zustand ist, aus dem heraus diese Umwandlung nicht oder zumindest nicht in nennenswertem Ausmaß erfolgt, selbst wenn das physikalische Signal vorliegt. Die Umwandlung führt dabei zu einem dauerhaften oder zumindest vorübergehend stabilen, d. h. anhaltenden anderen Zustand der Substanz, der jedoch reversibel, das heißt in den reaktiven oder nichtreaktiven Ausgangszustand der Substanz zurückführbar sein kann.

[0007] Unabhängig von der Substanz und der konkreten Anwendung geht es bei der vorliegenden Erfindung darum, die wellenlängenabhängige Beugungsgrenze mit der räumlichen Auflösung beim Bestimmen der Verteilung der Substanz bzw. beim lo-

kalisierten Auslösen der Umwandlung der Substanz zu überwinden, d. h., eine räumliche Auflösung zu erreichen, die besser als die Beugungsgrenze ist.

STAND DER TECHNIK

[0008] Als Verfahren zum Überwinden der Beugungsgrenze mit der räumlichen Auflösung beim Abbilden einer mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Struktur in einer Probe sind die STED- und GSD-Fluoreszenzlichtmikroskopie bekannt. Bei der STED-Fluoreszenzlichtmikroskopie wird der räumliche Bereich, aus dem Fluoreszenzlicht von einer Probe spontan emittiert wird, gegenüber den beugungsbegrenzten Abmessungen eines fokussierten Anregungslichtstrahls dadurch reduziert, dass die Intensitätsverteilung des Anregungslichtstrahls in der Probe mit einer Intensitätsverteilung von Stimulationslicht überlagert wird, die an einem Messpunkt eine Nullstelle und hieran angrenzend eine so hohe Intensität aufweist, dass der Fluoreszenzfarbstoff aus seinem elektronisch angeregten fluoreszierenden Zustand durch stimulierte Emission in einen energetisch tiefer liegenden, nicht fluoreszierenden elektronischen Zustand überführt wird. Der Messpunkt wird so durch einen Bereich eingerahmt, aus dem aufgrund der Intensität des Stimulationslichts kein spontan emittiertes Fluoreszenzlicht mehr stammen kann. Bei der GSD-Fluoreszenzlichtmikroskopie wird die räumliche Einengung des Bereichs der Probe, aus dem das spontan emittierte Fluoreszenzlicht stammen kann, dadurch erreicht, dass der Fluoreszenzfarbstoff außerhalb des Messpunkts entweder direkt aus seinem Grundzustand oder aus seinem elektronisch angeregten fluoreszierenden Zustand mit einem optischen Signal in einen Dunkelzustand überführt wird, aus dem der Fluoreszenzfarbstoff zumindest für die Dauer der Messung des Messpunkts nicht mehr heraus gelangt, so dass durch Entvölkerung seines Grundzustands keine Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs zur spontanen Emission von Fluoreszenzlicht mehr möglich ist. Dabei ist die Intensitätsverteilung des den Grundzustand des Fluoreszenzfarbstoffs entvölkernden optischen Signals grundsätzlich dieselbe wie diejenige des Stimulationslichts bei der STED-Fluoreszenzlichtmikroskopie. Das bedeutet, dass beim Abtasten einer Probe mit dem eigentlichen Messpunkt jedes Molekül des Fluoreszenzfarbstoffs, bevor es von dem Messpunkt erreicht wird, ganz erheblichen Intensitäten des Anregungslichts und des Stimulationslichts bzw. des den Grundzustand des Fluoreszenzfarbstoffs entvölkernden optischen Signals ausgesetzt war und entsprechend eine große Anzahl von Überführungszyklen durchlaufen hat. Dies ist mit einer erheblichen Gefahr des zumindest vorübergehenden Bleichens des Fluoreszenzfarbstoffs verbunden. Dieser Gefahr kann zwar durch Unterbrechungen des jeweiligen optischen Signals reduziert werden. Hierdurch wird aber die Messdauer verlängert. Obwohl viele auch sehr empfindliche

Fluoreszenzfarbstoffe zumindest einige wenige Male aus einem Dunkelzustand in ihren zur Fluoreszenz anregbaren Grundzustand zurückkehren, sind sie aus den voranstehenden Gründen für die hochauflösende STED- und GSD-Fluoreszenzlichtmikroskopie nicht geeignet.

[0009] Um bei der Anwendung der Prinzipien der STED- und GSD-Fluoreszenzlichtmikroskopie mit weniger hohen Lichtintensitäten auszukommen und dadurch die Gefahr des Bleichens des Fluoreszenzfarbstoffs zu reduzieren, werden in der sogenannten RESOLFT-Fluoreszenzlichtmikroskopie schaltbare Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, die zwischen Konformationszuständen mit unterschiedlichen Fluoreszenzeigenschaften überführbar sind. Diese Konformationszustände weisen eine größere Lebensdauer als die bei einfachen Fluoreszenzfarbstoffen in der STED- und GSD-Fluoreszenzlichtmikroskopie allein nutzbaren elektronischen Zustände auf. Die grundsätzliche Problematik, dass ein einzelnes Molekül des Fluoreszenzfarbstoffs bereits mit erheblichen Lichtintensitäten beaufschlagt wurde und entsprechend vielen Zustandsänderungen in kurzer Zeit unterworfen wurde, bevor es von dem eigentlichen Messpunkt erreicht wird, ist aber auch hier gegeben. Hinzu kommt, dass die Auswahl an schaltbaren Fluoreszenzfarbstoffen trotz erheblicher Entwicklungsanstrengungen immer noch begrenzt ist, und selbst viele der verfügbaren schaltbaren Fluoreszenzfarbstoffe nicht so häufig beschädigungsfrei schaltbar sind, wie es in der STED- oder GSD-Fluoreszenzlichtmikroskopie bei der Annäherung des Messpunkts an ein einzelnes Farbstoffmolekül nötig ist. So ist die begrenzte Anzahl der möglichen Zustandsänderungen der Fluoreszenzfarbstoffe in kurzer Zeit der limitierende Faktor bei allen bisher bekannten hochauflösenden Lichttrastermikroskopieverfahren (vergl. Hell, SW, "Microscopy and its focal switch", Nature Methods, Vol. 6 (2009), Seite 28, rechts, § 4).

[0010] Neben den bis hierher beschriebenen Verfahren zum Überwinden der Beugungsgrenze mit der räumlichen Auflösung beim Abbilden einer mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Struktur in einer Probe, bei denen der räumliche Bereich einer Probe, aus dem das Messsignal stammen kann, eingeschränkt wird, gibt es Verfahren, die unter den Stichworten PALM und STORM bekannt sind und bei denen gezielt immer nur ein so kleiner Anteil der Moleküle der die Struktur markierenden Substanz in einen fluoreszenzfähigen Zustand aktiviert und in diesem Zustand mit Anregungslicht zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt wird, dass das Fluoreszenzlicht von der Probe einzelnen Molekülen des Fluoreszenzfarbstoffs zugeordnet werden kann. So ist über die relative Intensitätsverteilung des Fluoreszenzlichts über mehrere Pixel eines das Fluoreszenzlicht erfassenden zweidimensionalen Detektorarrays die Lage jedes fluoreszierenden Moleküls in der Probe mit einer

räumlichen Auflösung unterhalb der Beugungsgrenze bestimmbar. Voraussetzung hierfür ist jedoch, dass eine unter statistischen Gesichtspunkten ausreichende Anzahl von Fluoreszenzlichtphotonen den Detektor erreicht. Dies verlängert nicht nur die Messdauer, sondern setzt auch voraus, dass die Fluoreszenzfarbstoffmoleküle überhaupt geeignet sind, eine größere Anzahl von Fluoreszenzlichtphotonen auszusenden, bevor sie in ihren nichtaktivierten Zustand zurückkehren oder in einen weiteren Zustand überführt werden. Hierdurch wird die Anzahl der praktisch verfügbaren aktivierbaren Fluoreszenzfarbstoffe, die grundsätzlich dieselben sein können wie die bei der RESOLFT-Technik eingesetzten schaltbaren Fluoreszenzfarbstoffe, stark eingeschränkt.

[0011] Unter dem Stichwort GSDIM ist eine zu PALM inverse Technik bekannt, die mit herkömmlichen Fluoreszenzfarbstoffen auskommt, wobei die Invertierung darin besteht, dass so viele Moleküle des Fluoreszenzfarbstoffs vorübergehend in einen Dunkelzustand deaktiviert werden, dass die verbleibenden fluoreszierenden Fluoreszenzfarbstoffmoleküle einzeln detektierbar sind. Bei dieser Technik werden die Moleküle des Fluoreszenzfarbstoffs jedoch sämtlich vor ihrer eigentlichen Messung hohen Lichtintensitäten ausgesetzt und entsprechend vielen Zustandsänderungen unterworfen, um sie in ihren Dunkelzustand zu überführen und zu ihrem weit überwiegenden Anteil darin zu halten.

[0012] Aus der DE 103 25 459 A1 ist ein Verfahren zum Ausbilden einer räumlichen Struktur mit Auflösung jenseits der Beugungsgrenze bekannt, bei dem eine Substanz nur in einem Schreibbereich, der einem Intensitätsminimum eines optischen Signals entspricht, in einem reaktiven Zustand belassen wird und überall außerhalb des Schreibbereichs mit dem optischen Signal in einen nicht reaktiven Zustand überführt und dann in dem Schreibbereich mit einem physikalischen Signal umgewandelt wird. Auch hierbei wird die Substanz bereits bei der Annäherung des Schreibbereichs an einen bestimmten Punkt eines Gebiets sehr hohen Lichtintensitäten ausgesetzt und entsprechend vielen Zustandsänderungen in kurzer Zeit unterworfen.

AUFGABE DER ERFINDUNG

[0013] Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren und ein Rasterlichtmikroskop zum räumlich hoch auflösenden Bestimmen der Verteilung einer Substanz in einem Messgebiet aufzuzeigen, bei denen die Substanz vor ihrem Messen durch Abfragen des Messsignals möglichst wenigen Zustandsänderungen unterworfen wird und dadurch bezüglich der Substanzen möglichst wenig Einschränkungen bestehen. Bei einem Verfahren zum lokalisierten Auslösen einer Umwandlung einer Substanz in einem Umwandlungsgebiet soll die Substanz vor dem Aus-

lösen ihrer Umwandlung mit dem physikalischen Signal ebenfalls möglichst wenigen Zustandsänderungen unterworfen werden.

LÖSUNG

[0014] Die Aufgabe der Erfindung wird durch ein Verfahren zum Bestimmen der Verteilung einer Substanz in einem Messgebiet mit den Merkmalen des unabhängigen Patentanspruchs 1, durch ein Rasterlichtmikroskop mit den Merkmalen des unabhängigen Patentanspruchs 19 und durch ein Verfahren zum lokalisierten Auslösen einer Umwandlung einer Substanz in einem Umwandlungsgebiet mit den Merkmalen des unabhängigen Patentanspruchs 21 gelöst. Bevorzugte Ausführungsformen der neuen Verfahren und des neuen Rasterlichtmikroskops sind in den abhängigen Patentansprüchen definiert.

BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0015] Bei dem neuen Verfahren wird zum Bestimmen der Verteilung einer Substanz in einem Messgebiet eine Messfront aus dem jeweiligen optischen Signal und/oder dem jeweiligen weiteren optischen Signal in der Probe ausgebildet, wobei die Intensität des optischen Signals und/oder des weiteren optischen Signals über eine Tiefe der Messfront, die kleiner als die Beugungsgrenze bei der Wellenlänge des optischen Signals und/oder des weiteren optischen Signals ist, derart ansteigt, dass (i) der Anteil der Substanz in dem Messzustand durch Überführen der Substanz (a) aus dem einen Zustand in den Messzustand von zumindest im Wesentlichen nicht vorhanden auf einen Sättigungswert anwächst oder (ii) der Anteil der Substanz in dem Messzustand durch Überführen der Substanz (b) aus dem Messzustand in den einen oder den weiteren Zustand von einem Ausgangswert vor der Messfront auf zumindest im Wesentlichen nicht vorhanden abfällt oder (iii) der Anteil der Substanz in dem Messzustand durch Überführen der Substanz (a) aus dem einen Zustand in den Messzustand von zumindest im Wesentlichen nicht vorhanden anwächst und durch Überführen der Substanz (b) aus dem Messzustand in den einen oder den weiteren Zustand wieder auf zumindest im Wesentlichen nicht vorhanden abfällt. Wenn der Anteil der Substanz in dem Messzustand in idealer Form nicht vorhanden ist, beträgt er null. Für das neue Verfahren reicht es aber aus, wenn der Anteil der Substanz in dem Messzustand, der als "nicht vorhanden" bezeichnet wird, nahe bei null liegt oder jedenfalls klein verglichen mit dem maximalen Anteil der Substanz in dem Messzustand innerhalb der Messfront ist.

[0016] Im ersten Fall (i) ist die Substanz vor der Messfront noch nicht in dem Messzustand, sondern in dem einen Zustand, aus dem kein Messsignal von der Substanz erhältlich ist. Nach der Messfront ist die

Substanz zu einem Anteil in Höhe eines Sättigungswerts, d. h. eines Werts, der durch eine weitere Steigerung der Intensität des optischen Signals zumindest nicht mehr signifikant zu erhöhen wäre und der durch eine auftretende weitere Steigerung der Intensität des optischen Signals hinter der Messfront auch nicht mehr signifikant erhöht wird, in dem Messzustand. Im zweiten Fall (ii) ist die Substanz vor der Messfront zu einem gewissen Teil in dem Messzustand. Nach der Messfront ist sie nicht mehr in dem Messzustand, sondern in dem einen oder dem weiteren Zustand ist, aus dem kein Messsignal von der Substanz erhältlich ist; und in dem bevorzugten dritten Fall ist die Substanz weder vor noch nach der Messfront, d. h. ausschließlich im Bereich der Messfront, in dem Messzustand. Auch in den Fällen (ii) und (iii) wächst durch Überführen der Substanz über der Messfront ein Anteil der Substanz in einem bestimmten Zustand bis auf einen Sättigungswert an. Hier ist dies der Anteil der Substanz in dem einen oder dem weiteren Zustand. Soweit dieser Sättigungswert unter 100% bleibt und das Messsignal von der Substanz hinter der Messfront, die sich noch in dem Messzustand befindet, nicht vernachlässigt wird, kann es bei der Auswertung des erfassten Messsignals leicht separiert werden, da seine relative Stärke durch den Sättigungswert bzw. sein Komplement vorgegeben ist. Das Erreichen eines Sättigungsgrenzwerts hängt neben der Intensität des jeweiligen optischen Signals von den Wirkungsquerschnitten bei der Anregung der beteiligten Übergänge ab, welche wiederum von den Umgebungsbedingungen der Substanz abhängig sein können. In jedem Fall wird der Sättigungsgrenzwert erreicht, wenn eine berechenbare Sättigungsintensität für den jeweiligen Übergang in der Messfront von der Intensität des jeweiligen optischen Signals um mindestens einen Faktor fünf, besser um eine oder mehrere Größenordnungen überschritten wird.

[0017] Die Messfront wird bei dem neuen Verfahren in Gegenrichtung zu dem Anstieg der Intensität des optischen Signals und/oder des weiteren optischen Signals über das Messgebiet verschoben, um dieses mit der Messfront abzutasten. Dabei wird das Messsignal oder seine Änderung zumindest aus dem Bereich der Messfront, vorzugsweise eine Verteilung des Messsignals oder seiner Änderung mit Ortsauflösung längs der quer zu dem Anstieg der Intensität des optischen Signals und/oder des weiteren optischen Signals verlaufenden Breitenrichtung der Messfront, erfasst und den jeweils zugehörigen Positionen der Messfront in dem Messgebiet zugeordnet. Das heißt, vorzugsweise wird zu jeder Position der Messfront in dem Messgebiet mindestens eine Verteilung des Messsignals oder seiner Änderung längs der Messfront registriert. Zum Beispiel bei einem Messgebiet mit nur eindimensionaler Ausdehnung kann es aber auch ausreichen, statt einer Verteilung des Messsignals oder seiner Änderung nur eine Intensität des

Messsignals oder eine seiner Änderung aus dem Bereich oder aus einzelnen Teilbereichen der Messfront zu erfassen.

[0018] Bei dem neuen Verfahren wird die Ortsauflösung beim Bestimmen der Verteilung der Substanz in Richtung des Verschiebens der Messfront insbesondere durch Kenntnis der jeweiligen Lage der Messfront in der Probe erzielt, weil das Messsignal in dem bevorzugten Fall (iii) nur aus dem Bereich der Messfront stammen kann und weil das Messsignal in den beiden anderen Fällen (i) und (ii) nur durch die in die Messfront eintretende Substanz eine nicht vorhersagbare und damit separierbare Änderung erfährt, während eine Ortsauflösung längs der Messfront aus der Analyse der Verteilung des Messsignals erreicht wird. Letztere ist dabei grundsätzlich durch die Beugungsgrenze (bei der Wellenlänge des Messsignals) beschränkt. Die Messfront kann hingegen mit sehr geringer räumlicher Tiefe ausgebildet werden, die die Beugungsgrenze weit unterschreitet, so dass die Ortsauflösung in Richtung des Verschiebens der Messfront bis weit unter die Beugungsgrenze verbessert wird. Durch unterschiedliches Ausrichten der Messfront gegenüber dem Messgebiet und Verschieben der Messfront über das Messgebiet in verschiedenen Richtungen kann die interessierende Verteilung der Substanz in dem Messgebiet in allen Richtungen mit einer Ortsauflösung unterhalb der Beugungsgrenze abgebildet werden.

[0019] Bei dem neuen Verfahren weisen zumindest alle optischen Signale, deren Intensität über der Messfront stark ansteigt, vor der Messfront im Wesentlichen keine Intensität auf, die zu irgendwelchen Zustandsänderungen ausreichend wäre. Die Messfront, in der die Substanz erstmalig gemessen wird, nähert sich also an einen Ort des Messgebiets an, ohne die Substanz an diesem Ort bereits vorher durch vielfache Zustandsänderungen zu beanspruchen. Im Idealfall durchläuft die Substanz erstmalig dann Zustandsänderungen, wenn sie von der Messfront erreicht wird.

[0020] Zur Ausbildung der Messfront kann das jeweilige optische Signal und/oder das weitere optische Signal senkrecht zum gewünschten Verlauf der Messfront auf eine Linie fokussiert werden. Grundsätzlich kann als Messfront auch der Rand des Fokusbereichs eines oder mehrerer auf einen Punkt fokussierter optischer Signale Verwendung finden. D. h., die Messfront muss keinen geraden Verlauf haben; vorzugsweise ist sie aber gerade. Zum Ausbilden einer geraden Messfront kann beispielsweise eine Zylinderlinse Verwendung finden, die ein in einer Richtung aufgeweitetes Bündel aus parallelen Lichtstrahlen auf eine Gerade fokussiert. Die Verteilung der Intensität des derart fokussierten optischen Signals weist Abmessungen in Querrichtung auf, die die Beugungsgrenze nicht überwinden können. Bei

hoher Intensität des optischen Signals weisen jedoch die Ränder der Verteilung der Intensität des Signals eine solche Steilheit auf, dass ein zur Ausbildung einer erfindungsgemäßen Messfront erforderlicher Anstieg der Intensität über eine Strecke weit unterhalb der Beugungsgrenze erfolgt. Dabei sind die sehr hohen Intensitäten des optischen Signals oder des weiteren optischen Signals im an die Messfront angrenzenden Maximum seiner Intensitätsverteilung im Wesentlichen unschädlich, weil die Substanz in dem Messgebiet diesen Intensitäten erst dann ausgesetzt wird und den resultierenden vielfachen Zustandsänderungen erst dann unterworfen wird, nachdem sie von der Messfront überfahren und dabei gemessen wurde.

[0021] Eine weitere konkrete Möglichkeit insbesondere eine gerade Messfront auszubilden, ist die Abbildung einer Kante in das Messgebiet. Dabei der Messfront vorlaufende Nebenmaxima der Intensitätsverteilung des bzw. der optischen Signale sind in der Regel unschädlich, da sie entweder nur schwach ausgeprägt und/oder ausreichend weit von dem Intensitätssprung über der Kante entfernt sind, um sie bezüglich ihrer Auswirkungen auf das Messsignal einfach diskriminieren zu können. Die Abbildung einer Kante, längs der das Messgebiet in zwei Teilgebiete unterteilt ist, ist die bevorzugte Form der Ausbildung der Messfront in den Fällen (i) und (ii) des neuen Verfahrens.

[0022] Wenn für die beiden Überführungen der Substanz (a) aus dem einen Zustand in den Messzustand und (b) aus dem Messzustand in den einen oder den weiteren Zustand neben dem optischen Signal auch ein weiteres optisches Signal benötigt wird, können diese beiden Signale zur Ausbildung der Messfront gemeinsam geformt werden. Sie können auch einen leichten Versatz senkrecht zum Verlauf der Messfront, d. h. in Richtung der Tiefe der Messfront, aufweisen, wenn beispielsweise keine vollständige Überlappung sinnvoll ist.

[0023] Bei dem neuen Verfahren zum Bestimmen der Verteilung der Substanz in dem Messgebiet kann neben der Tatsache, dass die Tiefe der Messfront, aus der das Messsignal stammen kann, auch die relative Intensitätsverteilung des Messsignals von der Substanz zur Ortsauflösung genutzt werden. Die relative Intensitätsverteilung des Messsignals von der Substanz hängt von der Position der Substanz in Tiefenrichtung innerhalb der Messfront ab und steigt typischerweise stetig mit der Intensität des optischen Signals über die Tiefe der Messfront an, bis sie steil abfällt. Hierin ist eine Auflösungsverbesserung zweiter Ordnung zu sehen, während bei dem neuen Verfahren eine Auflösungsverbesserung erster Ordnung dadurch erreicht wird, dass das Messsignal bzw. die Änderung des Messsignals von der Substanz überhaupt nur über die Tiefe der Messfront auftritt.

[0024] Besonders bevorzugt ist es bei dem neuen Verfahren, wenn die Substanz mittels des optischen Signals (a) aus dem Zustand, in dem kein Messsignal von ihr erhältlich ist, in den Messzustand und (b) aus dem Messzustand in einen weiteren Zustand überführbar ist. In diesem Fall reicht es zur Ausbildung einer Messfront mit einer Tiefe unterhalb der Beugungsgrenze, wobei allein von der Substanz im Bereich der Messfront das Messsignal erhältlich ist, aus, dass die Intensität des optischen Signals über die Tiefe der Messfront, die kleiner als die Beugungsgrenze bei der Wellenlänge des optischen Signals ist, so ansteigt, dass der Anteil der Substanz in dem Messzustand durch Überführen der Substanz (a) aus dem einen Zustand in den Messzustand zunächst anwächst und dann durch Überhand nehmendes Überführen der Substanz (b) aus dem Messzustand in den weiteren Zustand wieder bis gegen null abfällt.

[0025] In konkreten Ausführungsformen dieser zuletzt beschriebenen Variante des neuen Verfahrens ist die Substanz ein Lumineszenzfarbstoff, insbesondere ein Fluoreszenzfarbstoff, wobei der Messzustand ein angeregter elektronischer Zustand ist, aus dem heraus die Substanz spontan Lumineszenzlicht, d. h. insbesondere Fluoreszenzlicht, als Messsignal emittiert, und wobei der weitere Zustand ein Dunkelzustand ist, der eine Lebensdauer aufweist, die länger als eine Messdauer ist, über die hinweg das Messsignal von derselben Position der Messfront in der Probe erfasst wird. Das heißt, die Substanz kehrt zwar aus dem Dunkelzustand in ihren Grundzustand zurück, aus dem heraus sie erneut zur Lumineszenz anregbar ist, aber erst dann, wenn sie sich nicht mehr in dem Bereich des Messgebiets befindet, aus dem heraus das Messsignal erfasst wird, das der aktuellen Position der Messfront in der Probe zugeordnet wird. Derartige Dunkelzustände sind für nahezu alle herkömmlichen Fluoreszenzfarbstoffe und viele andere Lumineszenzfarbstoffe typisch. Häufig handelt es sich um Triplett-Zustände, während der Messzustand ein angeregter Singlett-Zustand ist. Es kann sich auch um einen ionisierten Zustand handeln. Aus derartigen Dunkelzuständen kehren Fluoreszenz- und andere Lumineszenzfarbstoffe in der Regel zumindest einige Male zurück, bevor sie infolge der Lichteinwirkung endgültig, d. h. photochemisch gebleicht werden. Bei dem neuen Verfahren sind nur wenige Bewegungen der Messfront über die Probe aus unterschiedlichen Richtungen, meistens nur zwei Bewegungen aus zueinander senkrechten Richtungen, erforderlich, um die interessierende Struktur in der Probe vollständig mit hoher Ortsauflösung abzubilden. Hierfür muss die Substanz nur ein oder wenige Male aus ihrem Dunkelzustand in ihren Grundzustand zurückkehren.

[0026] Wenn die Substanz hinter dem Einflussbereich des Ihre Überführung bewirkenden optischen Signals sehr schnell wieder in ihren Zustand zurück-

kehrt, in dem Sie vor der Messfront vorliegt, oder wenn die Substanz durch das optische Signal sowie so wieder in diesen Zustand zurück gebracht wird, kann das Messgebiet auch mit mehreren schnell aufeinander folgenden parallelen oder zueinander angewinkelten Messfronten überfahren werden. Wenn die Substanz eine längere Erholungszeit braucht, bevor Sie in ihren Ausgangszustand zurückkehrt, ist diese Erholungszeit vor einem erneuten Überfahren des Messgebiets mit der Messfront abzuwarten, oder eine noch nicht vollständige Erholung der Substanz ist bei der Auswertung des beim erneuten Überfahren der Substanz mit der Messfront erfassten Messsignals zur berücksichtigen. Häufig ist es auch vorteilhaft, wenn die Substanz in dem Messgebiet, über das die Messfront verschoben wurde, mit einem zurücksetzenden oder auffrischenden optischen Signal, insbesondere aus dem blauen oder ultravioletten Wellenlängenbereich, beaufschlagt wird, bevor die Messfront erneut über das Messgebiet verschoben wird. Auf diese Weise kann der Anteil der Substanz in dem einem Zustand, den sie vor dem erstmaligen Überfahren mit der Messfront hatte, oftmals deutlich erhöht werden.

[0027] Es ist zu betonen, dass die vorliegende Erfindung nicht nur unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen oder anderen Lumineszenzfarbstoffen durchgeführt werden kann. Es reicht vielmehr aus, dass die Substanz irgendwelche Leuchtzentren bereitstellt, die in der erfindungsgemäßen Art und Weise in bzw. aus einem Messzustand überführbar sind, wobei nur in dem Messzustand das Messsignal von der Substanz erhältlich ist. Dies bedeutet nicht zwingend, dass in anderen Zuständen der Substanz kein Messsignal von der Probe erhältlich sein darf, solange es nicht dieselbe Intensität hat und/oder dasselbe Messsignal ist wie dasjenige, das von der Substanz innerhalb der erfindungsgemäßen Messfront erhalten wird.

[0028] Bei der vorliegenden Erfindung können auch sogenannte schaltbare Fluoreszenzfarbstoffe, schaltbare fluoreszierende Proteine und aktivierbare Lumineszenzpartikel, die mittels eines Schaltsignals von einem Konformationszustand in einen anderen Konformationszustand schaltbar sind, verwendet werden. Dabei können diese beiden Konformationszustände der eine Zustand, d. h. der Ausgangszustand der Substanz vor der Messfront, und Messzustand der Substanz in der Messfront sein, wobei es sich bei dem Messzustand um einen lumineszenzfähigen Konformationszustand handeln kann. Es kann sich bei den beiden Konformationszuständen aber auch um den einen Zustand, d. h. den Ausgangszustand der Substanz vor der Messfront, wobei der Messzustand ein elektronisch angeregter Zustand dieses Konformationszustands ist, und den weiteren Zustand, d. h. einen Dunkelzustand der Substanz hinter der Messfront handeln. In diesen beiden Fällen

wird mit einer aufgesteilten Intensitätsverteilung des Schaltsignals die Messfront ausgebildet. Schaltbare Substanzen können aber auch so eingesetzt werden, dass mit einem Einschaltsignal eine relative Grundkonzentration der Substanz in einem zur Lumineszenz anregbaren Zustand in der Probe eingestellt wird, wobei dieses Einschaltsignal von vergleichsweise geringer Intensität der Messfront vorgelagert oder dieser auch überlagert sein kann und an der Ausbildung der Messfront zumindest primär nicht beteiligt ist.

[0029] Die Messfront kann bei dem neuen Verfahren in Breitenrichtung einen geraden Verlauf aufweisen. Dies ist bevorzugt, aber nicht zwingend. So kann es sich bei der Messfront auch um einen Teil einer Peripherie irgendeiner anderen Intensitätsverteilung als einer solchen mit maximaler Intensität längs einer Geraden handeln.

[0030] Vorzugsweise weist die Messfront in Breitenrichtung eine Ausdehnung von einem großen Vielfachen der Beugungsgrenze bei der Wellenlänge des optischen Signals und/oder des weiteren optischen Signals auf. Idealerweise überspannt die Messfront die gesamte Breite des Messgebiets.

[0031] Die Messfront kann schrittweise oder kontinuierlich über das Messgebiet verschoben werden, wobei der Übergang zwischen einem schrittweisen und einem kontinuierlichen Verschieben fließend ist. Insbesondere entspricht ein kontinuierlicher Vorschub der Messfront bei gepulsten optischen Signalen unmittelbar einem schrittweisen Vorschub der Messfront.

[0032] Vorzugsweise wird das Messsignal aus dem Bereich der Messfront, auch wenn diese kontinuierlich verschoben wird, mit zeitlicher Auflösung erfasst. Dies kann bedeuten, dass zu jeder Position der Messfront in dem Messgebiet mehrere Verteilungen des Messsignals aus dem Bereich der Messfront hintereinander aufgenommen werden. Auch aus dem zeitlichen Verlauf der Verteilung des Messsignals kann auf die Relativlage der das Messsignal bereitstellenden Substanz beispielsweise in Bezug auf eine mittlere Tiefe der Messfront geschlossen werden. Hierdurch wird eine weitere Steigerung der räumlichen Auflösung, mit der die Verteilung der Substanz in der Probe mit dem neuen Verfahren abgebildet wird, realisierbar. Vor allem aber variiert das Signal zu Rauschen-Verhältnis des Messsignals typischerweise mit der Zeit und kann durch Abstimmung des Zeitpunkts der Erfassung der Verteilung des Messsignals optimiert werden. Dazu müssen aber nicht notwendigerweise mehrere Verteilungen des Messsignals aus dem Bereich der Messfront für eine Position der Messfront in dem Messgebiet hintereinander aufgenommen werden, sondern es reicht aus, das Zeitfenster zu optimieren, in dem eine einzige

Verteilung des Messsignals nach dem Verschieben der Messfront aufgenommen wird. Man spricht in diesem Zusammenhang auch im Deutschen häufig vom Gaten des Messsignals. Das optimale Gate kann auch in einem automatisierten Prozess gesetzt werden, in dem das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis optimiert wird.

[0033] Konkret kann die Verteilung des Messsignals aus dem Bereich der Messfront mit einem in Breitenrichtung der Messfront ausgerichteten Zeilendetektor erfasst werden. Ein flächiger Detektor ist für den Fall (iii) des neuen Verfahrens nicht erforderlich, wenn auch das Vorhandensein von mindestens zwei in Richtung senkrecht zu der Messfront gestaffelten Messzeilen zusätzliche Vorteile bringen kann. Die Verwendung eines Zeilendetektors statt eines flächigen Detektors bei dem neuen Verfahren ermöglicht ein sehr schnelleres Auslesen der einzelnen Pixel, was im Hinblick auf die gewünschte zeitliche Auflösung der Verteilung der Intensität des Messsignals längs der Messfront günstig ist.

[0034] Der Zeilendetektor kann auch mindestens eine gegenüber der Messfront parallel versetzte Messzeile aufweisen. So kann sein zwar grundsätzlich beugungsbegrenzter Empfindlichkeitsbereich beispielsweise so relativ zu der Messfront in dem Messgebiet angeordnet sein, dass er sich überwiegend hinter der Messfront befindet, wo die Substanz in dem Messgebiet kein Messsignal mehr liefert. Dies ist insbesondere dann von Vorteil, wenn die Substanz vor der Messfront ein Nebenmaximum der Intensitätsverteilung des optischen Signals durchläuft. In jedem Fall ist die Lage des Zeilendetektors sinnvoller Weise relativ zu der Lage der Messfront in dem Messgebiet nicht fest sondern justierbar, weil z. B. die Lage der Messfront zu einer Optik zum Ausbilden der Messfront mit der absoluten Intensität der optischen Signale variiert. Die optimale Justage der Relativlage des Zeilendetektors kann auch in einem automatisierten Prozess erfolgen, in dem bspw. das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis optimiert wird.

[0035] Mit Hilfe einer Schlitzblende vor dem Zeilendetektor oder unter entsprechender Ausnutzung der geringen Abmessungen der Pixel des Zeilendetektors kann die Verteilung des Messsignals aus dem Bereich der Messfront konfokal zu der Messfront erfasst werden, wobei sich die Konfokalität hier auf alle Richtungen senkrecht zu der Messfront bezieht. Hierdurch kann die Auflösung des neuen Verfahrens in z-Richtung, das heißt in Richtung der optischen Achse des Messsignals verbessert werden. Aber auch der Zeilendetektor selbst kann zur konfokalen Erfassung des Messsignals aus dem Messgebiet genutzt werden. Die Schlitzblende kann dann immer noch zum Ausblenden von Streulicht sinnvoll sein.

[0036] Zur Verbesserung der Auflösung in z-Richtung sind auch andere grundsätzlich bekannte Techniken bei dem neuen Verfahren anwendbar, wie beispielsweise eine Mehrphotonenanregung eines Fluoreszenzfarbstoffs, das Registrieren des Messsignals über mehrere Objektive, wie beispielsweise in der 4Pi-Fluoreszenzlichtmikroskopie, und dergleichen.

[0037] Eine Mehrphotonenanregung eines oder beider im Bereich der Messfront gewünschten Übergänge hat auch den Vorteil einer effektiven Aufsteilung der Übergangswahrscheinlichkeiten in Richtung der Tiefe der Messfront und damit einer Reduzierung der Tiefe der Messfront.

[0038] Für die Fälle (i) und (ii) des neuen Verfahrens ist hingegen vorzugsweise ein das gesamte Messgebiet erfassendes flächiges Detektorarray vorgesehen, um die Änderung des Messsignals mit dem Fortschreiten der Messfront über das Messgebiet mit Ortsauflösung quer zum Verlauf der Messfront, d. h. in Richtung der Tiefe der Messfront zu erfassen. Die Messfront überführt im Fall (i) mit ihrem Fortschreiten in dem aktuell von der Messfront überstrichenen Bereich sukzessiv weitere Anteile der Substanz in den Messzustand, in dem die Substanz dann verbleibt, so dass die Messfront das Messgebiet in ein Teilgebiet, in dem die Substanz in dem Messzustand ist, und in ein Teilgebiet unterteilt, in dem die Substanz nicht mehr in dem Messzustand ist. Der Fall (ii) unterscheidet sich hiervon im Wesentlichen nur dadurch, dass die Lage dieser beiden Teilgebiete in Bezug auf die Bewegungsrichtung der Messfront invertiert ist. In beiden Fällen (i) und (ii) ist nicht unmittelbar das von dem Detektorarray erfasste Messsignal, sondern die Änderung dieses Messsignals beim Fortschreiten der Messfront entscheidend. Grundsätzlich ist ein flächiger Detektor auch in dem Fall (iii) des neuen Verfahrens einsetzbar.

[0039] Es versteht sich, dass die Tiefe der Messfront bei dem neuen Verfahren möglichst nur einen kleinen Bruchteil der Beugungsgrenze bei der Wellenlänge des optischen Signals und/oder des weiteren optischen Signals ausmacht. Ihre Ausdehnung kann sich auf ein Sechzehntel der Beugungsgrenze oder weniger beschränken. Mit kleiner werdender Tiefe der Messfront verbessert sich die Auflösung der erfindungsgemäß erhaltenen Abbildung der interessierenden Struktur.

[0040] Da die Substanz bei den neuen Verfahren nur sehr wenige Male mit dem optischen Signal bzw. weiteren optischen Signal beaufschlagt wird, können einerseits sehr empfindliche Substanzen zum Einsatz kommen und andererseits kann das optische Signal bzw. das weitere optische Signal vergleichsweise energiereich, d. h. die Wellenlänge des optischen Signals bzw. des weiteren optischen Signals, die die absolute Höhe der Beugungsgrenze linear be-

einflusst, vergleichsweise kurz sein. So kann die Wellenlänge z. B. kürzer als 450 nm oder sogar nicht länger als 400 nm sein und konkret in einem Bereich von 350–400 nm, d. h. am unteren Ende des Bereichs des sichtbaren Lichts, liegen. Licht mit derartigen Wellenlängen ist von leistungsstarken Puls- und Dauerstrichlasern verfügbar. Das neue Verfahren ist aber neben diesen optischen Signalen aus dem UV-Bereich auch mit optischen Signalen aus dem gesamten sichtbaren Bereich bis in den IR-Bereich hinein durchführbar.

[0041] Sowohl Puls- als auch Dauerstrichlaser können als Lichtquellen für das optische Signal und das weitere optische Signal bei den neuen Verfahren eingesetzt werden. Das heißt, bei den neuen Verfahren können alle optischen Signale in Form von Pulsen oder mit konstanter Intensität eingesetzt werden. Im Falle von Pulsen sollten diese jedoch verglichen mit der Geschwindigkeit des Verschiebens der Messfront sehr schnell aufeinander abfolgen, um das Messgebiet lückenlos zu erfassen.

[0042] Das erfindungsgemäße Verfahren zum Bestimmen der Verteilung der Substanz in dem Messgebiet kann nicht nur dazu genutzt werden, eine mit der Substanz markierte Struktur in einer Probe abzubilden, sondern auch zum Auslesen von Information aus einem Datenträger, die in der Verteilung der Substanz codiert ist. Dabei kann die Substanz insbesondere in einer oder mehreren um mindestens die Beugungsgrenze bei der Wellenlänge des Messsignals voneinander beabstandeten Spuren verteilt, zu denen die Messfront quer ausgerichtet wird.

[0043] Das erfindungsgemäße Rasterlichtmikroskop weist eine Optik zur Ausbildung einer Messfront aus dem von einer Lichtquelle kommenden optischen Signal und/oder weiteren optischen Signalen auf. Weiterhin ist ein Detektor zur Erfassung der Verteilung des aus dem Bereich der Messfront von der Probe kommenden Messsignals vorgesehen, bei dem es sich vorzugsweise um einen Zeilendetektor handelt.

[0044] Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zum lokalisierten Auslösen einer Umwandlung einer Substanz in einem Umwandlungsgebiet wird in dem Umwandlungsgebiet eine Umwandlungsfront aus dem optischen Signal und/oder aus dem weiteren optischen Signal ausgebildet, wobei die Intensität des optischen Signals und/oder des weiteren optischen Signals über eine Tiefe der Umwandlungsfront, die kleiner als die Beugungsgrenze bei der Wellenlänge des optischen Signals und/oder des weiteren optischen Signals ist, von keiner Überführung der Substanz von dem einen nichtreaktiven Zustand in den reaktiven Zustand bis zur vollständigen Überführung von dem reaktiven Zustand in den einen oder den weiteren nichtreaktiven Zustand ansteigt. Diese Umwandlungsfront wird in Gegenrichtung zu dem An-

stieg der Intensität des optischen Signals und/oder des weiteren optischen Signals über das Umwandlungsgebiet verschoben; und das physikalische Signal zum Auslösen der Umwandlung in dem reaktiven Zustand wird zumindest auf einen Teilbereich der Umwandlungsfront aufgebracht, wenn sich die Messfront in ausgewählten Positionen in dem Umwandlungsgebiet befindet.

[0045] Das physikalische Signal wird vorzugsweise mit Ortsauflösung längs der quer zu dem Anstieg der Intensität des optischen Signals und/oder des weiteren optischen Signals verlaufenden Umwandlungsfront aufgebracht.

[0046] Das neue Verfahren zum lokalisierten Auslösen einer Umwandlung einer Substanz in einem Umwandlungsgebiet kann beispielsweise in der Mikrolithographie oder zum lokalisierten Freisetzen von Effektormolekülen verwendet werden. Es kann auch zum Speichern von Informationen genutzt werden, wobei die Umwandlung reversibel oder nichtreversibel sein kann. Zum Speichern von Informationen kann die Substanz in einer oder mehreren um mindestens die Beugungsgrenze bei der Wellenlänge des Messsignals voneinander beabstandeten Spuren verteilt, wobei die Messfront quer zu den Spuren ausgerichtet und das physikalische Signal mit Auflösung zwischen den Spuren aufgebracht wird. Konkret können zum Beispiel 8 Spuren nebeneinander angeordnet sein, um an jeder Position der Messfront ein Byte speichern zu können. In einer oder mehreren zusätzlichen Spuren können Synchronisationssignale für das Wiederauslesen der Informationen beschrieben werden.

[0047] Bis auf die hier beschriebenen Besonderheiten kann das neue Verfahren dem entsprechen, was dem Fachmann in der DE 103 25 459 A1, den Mitgliedern der zugehörigen Patentfamilie und in den Dokumenten offenbart ist, die in den Prüfungsverfahren dieser Patentfamilie zitiert wurden, und was auf einem dieser Dokumente aufbauend weiterentwickelt und veröffentlicht wurde. Zu den reaktiven Zuständen der bei dem neuen Verfahren zum lokalisierten Auslösen einer Umwandlung einsetzbaren Substanzen zählen neben Konformationszuständen auch elektronische und chemische Zustände, wobei in dieser gesamten Beschreibung der Begriff "elektronischer Zustand" so weit auszulegen ist, dass er auch einen ionisierten Zustand bezeichnen kann.

[0048] Vorteilhafte Weiterbildungen der Erfindung ergeben sich aus den Patentansprüchen, der Beschreibung und den Zeichnungen. Die in der Beschreibungseinleitung 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 Ausführ-

rungsformen erzielt werden müssen. 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 Patentansprüche möglich und wird hiermit ange-regt. Dies betrifft auch solche Merkmale, die in sepa-raten Zeichnungen dargestellt sind oder bei deren Beschreibung genannt werden. Diese Merkmale kön-nen auch mit Merkmalen unterschiedlicher Patentan-sprüche kombiniert werden. Ebenso können in den Patentansprüchen aufgeführte Merkmale für weitere Ausführungsformen der Erfindung entfallen.

KURZBESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0049] Die Erfindung wird im Folgenden anhand von Ausführungsbeispielen unter Bezugnahme auf die beigefügten Zeichnungen näher erläutert und be-schrieben.

[0050] **Fig. 1** zeigt ein beugungsbegrenztes Intensi-tätsprofil eines optischen Signals.

[0051] **Fig. 2** zeigt einen Randbereich des Intensi-tätsprofils gemäß **Fig. 1** bei sehr hoher absoluter In-tensität des optischen Signals und eine aus dieser In-tensitätsverteilung des optischen Signals resultieren-de Intensitätsverteilung eines Messsignals.

[0052] **Fig. 3** ist eine **Fig. 2** entsprechende Darstel-lung für einen Fall, in dem das Messsignal neben dem optischen Signal von einem weiteren optischen Si-gnal abhängt, das ebenfalls eine beugungsbegrenzte Intensitätsverteilung aufweist.

[0053] **Fig. 4** ist eine **Fig. 2** entsprechende Darstel-lung für einen Fall, dass das Messsignal neben dem optischen Signal und dem weiteren optischen Signal mit beugungsbegrenzter Intensitätsverteilung mit Hil-fe noch eines weiteren optisches Signal generiert wird, das eine homogene Intensitätsverteilung auf-weist.

[0054] **Fig. 5** und **Fig. 6** skizzieren das Abtasten ei-ner Probe und einer darin enthaltenen interes sieren-den Struktur mit einer die Intensitätsverteilung gemäß einer der **Fig. 1** bis **Fig. 4** aufweisenden Messfront in zwei zueinander orthogonalen Richtungen.

[0055] **Fig. 7** und **Fig. 8** skizzieren ein Lichtrastermi-kroskop zum Abtasten der Probe mit der Messfront gemäß den **Fig. 5** und **Fig. 6** und zum gleichzeiti-gen Erfassen des Messsignals aus dem Bereich der Messfront; und

[0056] **Fig. 9** skizziert die bei der Durchführung des neuen Verfahrens zum Bestimmen der Verteilung eines Fluoreszenzfarbstoffs ausgenutzten elektroni-schen Zustände des Fluoreszenzfarbstoffs.

FIGURENBESCHREIBUNG

[0057] **Fig. 1** ist ein Intensitätsprofil eines beugungs-begrenzten optischen Signals **1**. Die Intensitätsver-teilung ist Gauß-förmig und über einen Bereich **2** ver-teilt, dessen minimale Abmessungen durch die Abbe-sche Beugungsgrenze limitiert sind, welche hier bei etwa der halben Wellenlänge des optischen Signals **1** liegt.

[0058] **Fig. 2** skizziert den Fall, dass die Intensität des optischen Signals **1** sehr groß ist. Sie steigt damit bereits in der Peripherie der Intensitätsverteilung ge-mäß **Fig. 1**, die in **Fig. 2** dargestellt ist, sehr schnell an. So wird beispielsweise, wenn das optische Si-gnal **1** Anregungslicht für die Anregung eines Fluo-reszenzfarbstoffs zur spontanen Emission von Fluo-reszenzlicht ist, sehr schnell nach dem Überschrei-ten der Intensität von 0 bei x_0 eine Intensität S_D bei x_{SD} überschritten, bei der bereits eine Sättigung des vorübergehenden Überführens des Fluoreszenzfar-bstoffs in einen Dunkelzustand erreicht ist. Das heißt, nur in dem Bereich zwischen x_0 und x_{SD} wird von dem Fluoreszenzfarbstoff ein Messsignal **3**, das heißt im vorliegenden Beispiel Fluoreszenzlicht, erhalten. Dieser Bereich zwischen x_0 und x_{SD} wird hier als Messfront **4** bezeichnet. Die Tiefe der Messfront **4** in Richtung des Intensitätsprofils zwischen x_0 und x_{SD} ist angesichts der sehr hohen Intensitäten des opti-schen Signals **1** zeitabhängig, das heißt unmittelbar nach dem Aufbringen des optischen Signals **1** kann die Tiefe der Messfront größer sein, weil der Fluo-reszenzfarbstoff selbst in Bereichen höherer Intensi-tät des optischen Signals **1** nicht instantan in seinen Dunkelzustand überführt wird, sondern zuvor Fluo-reszenzlicht emittiert. Mit der Zeit wird die Tiefe der Messfront schmaler. Dabei geht aber auch die Inten-sität des Messsignals **3** zurück. Das Messsignal **3** wird daher idealerweise mit zeitlicher Auflösung nach dem Aufbringen des optischen Signals **1** erfasst und dann daraufhin analysiert, zu welchem Zeitpunkt es das beste Signal zu Rauschen-Verhältnis bei gleich-zeitig hoher räumlicher Eingrenzung über eine gerin-ge Tiefe der Messfront **4** aufweist.

[0059] **Fig. 3** skizziert einen Fall, in dem nicht nur ein optisches Signal **1**, sondern auch ein weiteres optisches Signal **5** aufgebracht wird, das im Prinzip dieselbe Intensitätsverteilung wie das optische Signal **1** aufweist, aber eine noch höhere absolute Intensi-tät. Konkret kann es sich bei dem weiteren optischen Signal **5** um ein solches handeln, das einen Fluo-reszenzfarbstoff gezielt in einen Dunkelzustand über-führt, während das optische Signal **1** im Wesentlichen nur zur Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs zur Flu-

reszenz dient. In diesem Fall bestimmt das Einsetzen des optischen Signals **1** die eine Grenze x_0 der Messfront **4**, während die Sättigungsintensität S_D des optischen Signals **5**, bei der der Fluoreszenzfarbstoff im Wesentlichen vollständig in den Dunkelzustand überführt wird, die andere Grenze x_{SD} der Messfront **4** bestimmt. Dabei gilt in Bezug auf die Dynamik der Breite der Messfront **4** dasselbe, was bereits zu [Fig. 2](#) angemerkt wurde.

[0060] [Fig. 4](#) skizziert einen Fall, in dem das optische Signal **1** einen schaltbaren Fluoreszenzfarbstoff in einen zur Fluoreszenz anregbaren Zustand einschaltet, während das weitere optische Signal **5** den Fluoreszenzfarbstoff wieder in seinen ursprünglichen oder einen anderen nicht zur Fluoreszenz anregbaren Zustand ausschaltet. Zusätzlich zu den optischen Signalen **1** und **5** wird hier noch ein weiteres optisches Signal **6** in Form von Anregungslicht mit homogener Intensitätsverteilung aufgebracht, das den im eingeschalteten Zustand befindlichen Fluoreszenzfarbstoff zur Fluoreszenz anregt. Auch hieraus ergibt sich eine Verteilung des Messsignals **3** über die Messfront **4**, die viel kleinere Abmessungen als die Beugungsgrenze aufweist. Häufig kann jedoch das weitere optische Signal **5** bei schaltbaren Fluoreszenzfarbstoffen sowohl zur Anregung als auch zum Zurückschalten in den ursprünglichen Zustand genutzt werden, so dass auf Anregungslicht in Form des noch weiteren optischen Signals **6** verzichtet werden kann.

[0061] [Fig. 4](#) kann auch zur Erläuterung eines Falls dienen, in dem die optischen Signale **1** und **5** grundsätzlich dieselbe Funktion wie in [Fig. 3](#) haben, das heißt dass das optische Signal **1** einen Fluoreszenzfarbstoff zur Fluoreszenz anregt und das optische Signal **5** den Fluoreszenzfarbstoff in einen Dunkelzustand schaltet. In diesem Fall ist dann das optische Signal **6** mit homogener Intensitätsverteilung kein Anregungslicht, sondern ein Einschaltsignal, das einen gewissen Anteil eines in höherer Konzentration vorliegenden einschaltbaren Fluoreszenzfarbstoffs in seinen überhaupt erst fluoreszenzfähigen Zustand überführt. Auch in diesem Fall ergibt sich eine Verteilung des Messsignals **3** nur über die Messfront **4** von gegenüber der Beugungsgrenze deutlich reduzierten Abmessungen.

[0062] Die [Fig. 5](#) und [Fig. 6](#) skizzieren das Abscannen einer Probe **7** als Beispiel für eine Messgebiet in zwei verschiedenen Richtungen x und y mit einer hier geradlinig ausgebildeten Messfront **4**, wobei auch die gesamte Intensitätsverteilung des hier verwendeten optischen Signals **1** gemäß [Fig. 1](#) wiedergegeben ist. Eine gestrichelte Linie **8** deutet das Maximum dieser Intensitätsverteilung an. Eine in der Probe **7** enthaltene interessierende Struktur **9**, die mit einer Substanz **10** in Form von Molekülen eines Fluoreszenzfarbstoffs markiert wird, wird durch Registrie-

ren des Fluoreszenzlichts von dem Fluoreszenzfarbstoff als Messsignal abgebildet. Dabei erfolgt das Registrieren des Messsignals mit Ortsauflösung zumindest längs der Messfront **4**. Die räumliche Auflösung bei dieser Registrierung ist grundsätzlich beugungsbegrenzt, soweit das Messsignal nicht jeweils nur von einzelnen Molekülen der Substanz **10** über mehrere Pixel erfasst und bezüglich des Schwerpunkts seiner Intensitätsverteilung ausgewertet wird, was grundsätzlich auch bei dem neuen Verfahren möglich ist und hier auch nur in der Richtung längs der Messfront **4** praktiziert werden kann. In Richtung senkrecht zu der Messfront **4**, in der diese über die Probe **7** verfahren wird, was durch Pfeile **11** angedeutet ist, erfolgt die Zuordnung des Messsignals zu einem bestimmten Ort der Probe nämlich über die Position der Messfront **4** in der Probe. Da die Ausdehnung der Messfront **4** weit unter die Beugungsgrenze fällt, ist die Auflösung der Abbildung in dieser Richtung viel besser als die Beugungsgrenze. Indem die Probe, wie in den [Fig. 5](#) und [Fig. 6](#) angedeutet ist, in zueinander orthogonalen Richtungen x und y mit der Messfront **4** abgetastet wird, kann die interessierende Struktur **9** in beiden Richtungen mit der die Beugungsgrenzen überwindenden Auflösung senkrecht zu der Messfront **4** abgebildet werden.

[0063] Das in den [Fig. 7](#) und [Fig. 8](#) skizzierte Fluoreszenzlichtmikroskop **12** zum Messen der Probe **9** gemäß den [Fig. 5](#) und [Fig. 6](#) weist eine Lichtquelle **13** auf, die das optische Signal **1** in Form eines Strahlenbündels mit einem nahezu linienförmigen Querschnitt bereitstellt. Dieses Strahlenbündel wird von einem Objektiv **14** senkrecht zu der Hauptstreckungsrichtung seines Querschnitts in den Bereich **2** fokussiert in dem sich die Intensitätsverteilung des optischen Signals **1** gemäß [Fig. 1](#) einstellt. Das in umgekehrter Richtung von der Probe **9** kommende Messsignal **3** wird von einem dichroitischen Spiegel **15** zu einem Zeilendetektor **16** umgelenkt, wobei vor dem Zeilendetektor **16** eine (nur in [Fig. 7](#) eingezeichnete) Schlitzeblende **17** angeordnet sein kann, um die Zuordnung des Messsignals in z -Richtung und damit die Auflösung der interessierenden Struktur in z -Richtung zu verbessern. Eine Optik **18** fokussiert das Messsignal **3** in Richtung senkrecht zum Verlauf der Messfront auf die Schlitzeblende **17** bzw. den Zeilendetektor **16**. Der Zeilendetektor **16** weist mindestens eine Messzeile aus nebeneinander angeordneten Pixeln **19** auf. Es versteht sich, dass deren Wiedergabe in [Fig. 8](#) nicht der Realität entspricht, weil eine viel größere Anzahl von Pixeln **19** in viel dichter Anordnung in der Messzeile **20** vorgesehen ist. Der Zeilendetektor **16** ist mit hoher Frequenz auslesbar und erlaubt es damit, die bereits im Zusammenhang mit [Fig. 2](#) angesprochene zeitliche Dynamik hinsichtlich der Tiefe der Messfront **4** aufzulösen. Auch die Vorschubgeschwindigkeit der Messfront **4** über die Probe **9** ist ein Parameter, der variiert werden kann, um das Signal zu Rauschen-Verhältnis und die räum-

liche Auflösung beim Abbilden der Struktur **9** zu optimieren.

19	Pixel
20	Messzeile
21	Übergang
22	Übergang

[0064] **Fig. 9** skizziert schematisch, d. h. z. B. ohne Berücksichtigung irgendwelcher Unterzustände, die elektronischen Zustände eines Fluoreszenzfarbstoffs der als Substanz bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zum Bestimmen der Verteilung der Substanz in einem Messgebiet genutzt werden kann, wenn die Substanz mittels desselben optischen Signals **1** (a) aus einem Zustand, in dem kein Messsignal von ihr erhältlich ist, in einen Messzustand und (b) aus dem Messzustand in einen weiteren Zustand überführbar ist, in dem kein Messsignal mehr von ihr erhältlich ist. Der eine Zustand der Substanz ist der Singlett-Grundzustand S_0 , aus dem heraus mit dem optischen Signal **1** eine Anregung in einen angeregten elektronischen Singlett-Zustand S_1 als Messzustand erfolgen kann. Aus dem Messzustand S_1 emittiert der Fluoreszenzfarbstoff entweder Fluoreszenzlicht als Messsignal **3**, oder er wird mit dem optischen Signal **1** weiter in einen energetisch höher liegenden elektronischen Zustand angeregt. Dies kann wie hier angedeutet ein Singlett-Zustand S_i , aber auch ein angeregter Triplett-Zustand T_i sein. Von dort gelangt der Fluoreszenzfarbstoff durch einen Übergang **21** in einen Dunkelzustand in Form des langlebigen Triplett-Grundzustands T_0 , der nur langsam mit einem Übergang **22** wieder in den Singlett-Grundzustand S_0 zerfällt. Bei steigender Intensität des optischen Signals **1** steigt die Wahrscheinlichkeit stark an, dass der Fluoreszenzfarbstoff in den Dunkelzustand T_0 gelangt und darin solange verbleibt, d. h. kein Fluoreszenzlicht als Messsignal mehr emittieren kann, bis sich die Messfront sich längst wieder von dem betrachteten Fluoreszenzfarbstoffmolekül entfernt hat.

Bezugszeichenliste

1	optisches Signal
2	Bereich
3	Messsignal
4	Messfront
5	weiteres optisches Signal
6	optisches Signal
7	Probe
8	gestrichelte Linie
9	Struktur
10	Substanz
11	Pfeil
12	Rasterlichtmikroskop
13	Lichtquelle
14	Objektiv
15	dichroitischer Spiegel
16	Zeilendetektor
17	Schlitzeblende
18	Optik

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

- DE 10325459 A1 [[0012](#), [0047](#)]

Zitierte Nicht-Patentliteratur

- Hell, SW, "Microscopy and its focal switch", Nature Methods, Vol. 6 (2009), Seite 28, rechts, § 4 [[0009](#)]

Patentansprüche

1. Verfahren zum Bestimmen der Verteilung einer Substanz (10) in einem Messgebiet, wobei die Substanz (10) mittels eines optischen Signals (1) (a) aus einem Zustand, in dem kein Messsignal (3) von ihr erhältlich ist, in einen Messzustand überführbar ist, in dem ein Messsignal (3) von ihr erhältlich ist, und/oder mittels desselben optischen Signals (1) oder eines anderen optischen Signals (5) (b) aus dem Messzustand, in dem das Messsignal (3) von ihr erhältlich ist, in den einen oder einen weiteren Zustand überführbar ist, in dem kein Messsignal von ihr erhältlich ist, und wobei das Verfahren die Schritte aufweist:

- Ausbilden einer Messfront (4) aus dem optischen Signal (1) und/oder aus dem weiteren optischen Signal (5) in dem Messgebiet, wobei die Intensität des optischen Signals (1) und/oder des weiteren optischen Signals (5) über eine Tiefe der Messfront (4), die kleiner als die Beugungsgrenze bei der Wellenlänge des optischen Signals (1) und/oder des weiteren optischen Signals (5) ist, derart ansteigt, dass
 - (i) der Anteil der Substanz (10) in dem Messzustand durch Überführen der Substanz (10) (a) aus dem einen Zustand in den Messzustand von nicht vorhanden auf einen Sättigungswert anwächst oder
 - (ii) der Anteil der Substanz (10) in dem Messzustand durch Überführen der Substanz (10) (b) aus dem Messzustand in den einen oder den weiteren Zustand von einem Ausgangswert vor der Messfront auf nicht vorhanden abfällt oder
 - (iii) der Anteil der Substanz (10) in dem Messzustand durch Überführen der Substanz (10) (a) aus dem einen Zustand in den Messzustand von nicht vorhanden anwächst und durch Überführen der Substanz (10) (b) aus dem Messzustand in den einen oder den weiteren Zustand wieder auf nicht vorhanden abfällt;
- Verschieben der Messfront (4) in Gegenrichtung zu dem Anstieg der Intensität des optischen Signals (1) und/oder des weiteren optischen Signals (5) über das Messgebiet;
- Erfassen des Messsignals (3) zumindest aus dem Bereich der Messfront (4); und
- Zuordnen des erfassten Messsignals (3) zu zugehörigen Positionen der Messfront (4) in dem Messgebiet.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass eine Verteilung des Messsignals (3) aus dem Bereich der Messfront (4) mit Ortsauflösung längs der quer zu dem Anstieg der Intensität des optischen Signals (1) und/oder des weiteren optischen Signals (5) verlaufenden Messfront (4) erfasst und zu zugehörigen Positionen der Messfront (4) in dem Messgebiet zugeordnet wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Substanz (10) mittels des optischen Signals (1) sowohl (a) aus dem Zustand, in dem kein Messsignal

(3) von ihr erhältlich ist, in den Messzustand als auch (b) aus dem Messzustand in den weiteren Zustand überführbar ist, in dem kein Messsignal (3) von ihr erhältlich ist, dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität des optischen Signals (1) über die Tiefe der Messfront (4), die kleiner als die Beugungsgrenze bei der Wellenlänge des optischen Signals (1) ist, derart ansteigt, dass der Anteil der Substanz (10) in dem Messzustand durch Überführen der Substanz (10) (a) aus dem einen Zustand in den Messzustand von nicht vorhanden anwächst und durch Überführen der Substanz (10) (b) aus dem Messzustand in den weiteren Zustand wieder auf nicht vorhanden abfällt.

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei der Messzustand ein angeregter elektronischer Zustand ist, aus dem heraus die Substanz (10) spontan Lumineszenzlicht emittiert, und wobei der weitere Zustand ein Dunkelzustand ist, der eine Lebensdauer länger als eine Messdauer aufweist, über die hinweg das Messsignal von einer Position der Messfront (4) in dem Messgebiet erfasst wird.

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei der Dunkelzustand durch Anregung aus dem angeregten elektronischen Zustand erreicht wird.

6. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Substanz (10) mittels eines Einschaltsignals aus einem nicht in den Messzustand anregbaren Auszustand in den in den Messzustand anregbaren Zustand schaltbar ist, dadurch gekennzeichnet, dass mit dem Einschaltsignal eine relative Grundkonzentration der Substanz in dem anregbaren Zustand in dem Messgebiet eingestellt wird.

7. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Substanz (10) mittels eines Einschaltsignals aus einem nicht in den Messzustand anregbaren Auszustand in den in den Messzustand anregbaren Zustand schaltbar ist, dadurch gekennzeichnet, dass das Einschaltsignal als das optische Signal (1) verwendet wird und dass das Messgebiet zusätzlich mit einem Anregungssignal beaufschlagt wird, das die Substanz aus dem anregbaren Zustand in den Messzustand anregt.

8. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Messfront (4) einen geraden Verlauf aufweist.

9. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Messfront (4) mindestens das Hundertfache der Beugungsgrenze bei der Wellenlänge des optischen Signals (1) und/oder des weiteren optischen Signals (5) überspannt.

10. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet,

dass die Messfront (4) ein zweidimensionales Messgebiet in Breitenrichtung überspannt.

11. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Messsignals (3) zu jeder Position der Messfront (4) in dem Messgebiet mit zeitlicher Auflösung erfasst wird.

12. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Verteilung des Messsignals (3) aus dem Bereich der Messfront (4) mit einem in Breitenrichtung der Messfront (4) ausgerichteten Zeilendetektor (16) erfasst wird.

13. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Verteilung des Messsignals (3) aus dem Bereich des gesamten Messgebiets (4) mit einem Detektorarray erfasst wird.

14. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität des optischen Signals (1) und/oder des weiteren optischen Signals (5) über eine Tiefe der Messfront (4), die kleiner als die Hälfte, insbesondere kleiner oder gleich eines Viertels, noch mehr bevorzugt kleiner oder gleich eines Achtels und am Meisten bevorzugt kleiner oder gleich eines Sechzehntels der Beugungsgrenze bei der Wellenlänge des optischen Signals (1) und/oder des weiteren optischen Signals (5) ist, von keiner Überführung der Substanz (10) von dem einen Zustand in den Messzustand bis zur vollständigen Überführung von dem Messzustand in den einen oder den weiteren Zustand ansteigt.

15. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Messfront (4) mindestens zwei Richtungen über das Messgebiet verschoben und dabei die Verteilung des Messsignals (3) aus dem Bereich der Messfront (4) mit Ortsauflösung längs der Messfront (4) erfasst wird.

16. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanz (10) in dem Messgebiet, über das die Messfront (4) verschoben wurde, mit einem rücksetzenden optischen Signal, insbesondere aus dem blauen oder ultravioletten (UV) Wellenlängenbereich, beaufschlagt wird, bevor die Messfront (4) erneut über das Messgebiet verschoben wird.

17. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mit der Bestimmung der Verteilung der Substanz eine Information aus einem Datenträger ausgelesen wird.

18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei die Substanz in einer oder mehreren um mindestens die Beugungsgrenze bei der Wellenlänge des Messsignals voneinander beabstandeten Spuren verteilt ist, dadurch gekennzeichnet, dass die Messfront quer zu den Spuren ausgerichtet wird.

19. Rasterlichtmikroskop zur Durchführung des Verfahrens nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche 1 bis 16 mit einer Optik zum Ausbilden der Messfront, mit Mitteln zum Verschieben der Messfront relativ zu dem Messgebiet und mit Mitteln zum Erfassen der Verteilung des Messsignals zumindest aus dem Bereich der Messfront mit Ortsauflösung längs der Messfront.

20. Rasterlichtmikroskop nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Mittel zum Erfassen der Verteilungen des Messsignals aus dem Bereich der Messfront (4) einen Zeilendetektor (16) aufweisen.

21. Verfahren zum lokalisierten Auslösen einer Umwandlung einer Substanz in einem Umwandlungsgebiet, wobei die Substanz (10) mittels eines optischen Signals (1) (a) aus einem nichtreaktiven Zustand, in dem die Umwandlung mit einem physikalischen Signal nicht auslösbar ist, in einen reaktiven Zustand überführbar ist, in dem die Umwandlung mit dem physikalischen Signal auslösbar ist, und mittels desselben optischen Signals (1) oder eines anderen optischen Signals (5) (b) aus dem reaktiven Zustand in den einen oder einen weiteren nichtreaktiven Zustand überführbar ist, und wobei das Verfahren die Schritte aufweist:

- Ausbilden einer Umwandlungsfront (4) aus dem optischen Signal (1) und/oder aus dem weiteren optischen Signal (5) in dem Umwandlungsgebiet, wobei die Intensität des optischen Signals (1) und/oder des weiteren optischen Signals (5) über eine Tiefe der Umwandlungsfront (4), die kleiner als die Beugungsgrenze bei der Wellenlänge des optischen Signals (1) und/oder des weiteren optischen Signals (5) ist, derart ansteigt, dass der Anteil der Substanz in dem reaktiven Zustand durch Überführen der Substanz (10) (a) aus dem einen nichtreaktiven Zustand in den reaktiven Zustand von nicht vorhanden anwächst und durch Überführen der Substanz (10) (b) aus dem reaktiven Zustand in den einen oder den weiteren nichtreaktiven Zustand wieder auf nicht vorhanden abfällt;
- Verschieben der Umwandlungsfront (4) in Gegenrichtung zu dem Anstieg der Intensität des optischen Signals (1) und/oder des weiteren optischen Signals (5) über das Umwandlungsgebiet;
- Aufbringen des physikalischen Signals (3) zumindest auf einen Teilbereich der Umwandlungsfront (4), wenn sich die Messfront in ausgewählten Positionen in dem Umwandlungsgebiet befindet.

22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass das physikalische Signals (3) mit Ortsauflösung längs der quer zu dem Anstieg der Intensität des optischen Signals (1) und/oder des weiteren optischen Signals (5) verlaufenden Umwandlungsfront (4); aufgebracht wird.

23. Verfahren nach Anspruch 21 oder 22 zur Anwendung in der Mikrolithographie oder zum lokalisierten Freisetzen von Effektormolekülen.

24. Verfahren nach Anspruch 21 oder 22 zum Speichern von Informationen, wobei die Umwandlung reversibel oder nichtreversibel ist.

25. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche 21, 22 und 24 zum Speichern von Informationen, wobei die Substanz in einer oder mehreren um mindestens die Beugungsgrenze bei der Wellenlänge des Messsignals voneinander beabstandeten Spuren verteilt ist, dadurch gekennzeichnet, dass die Messfront quer zu den Spuren ausgerichtet und das physikalische Signal mit Auflösung zwischen den Spuren aufgebracht wird.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

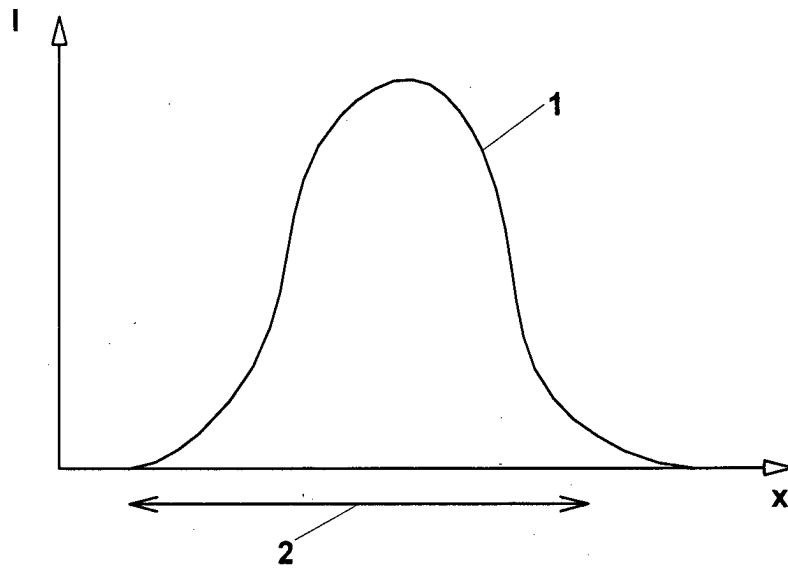


Fig. 1

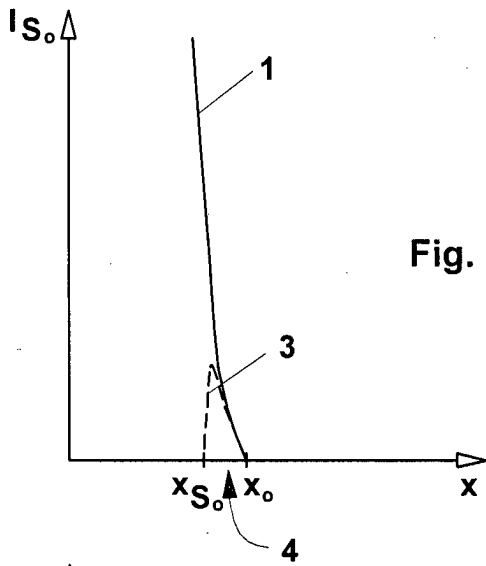


Fig. 2

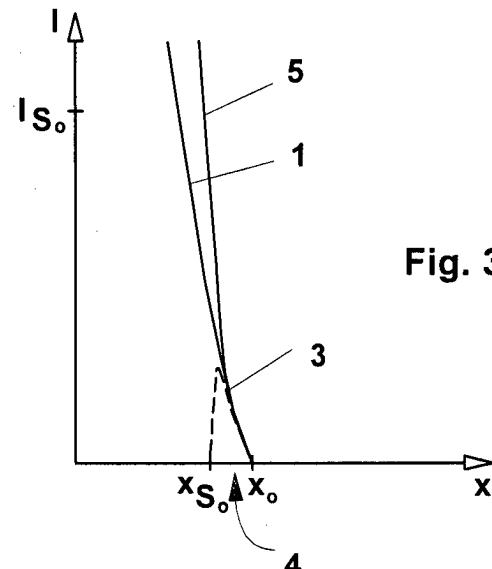


Fig. 3

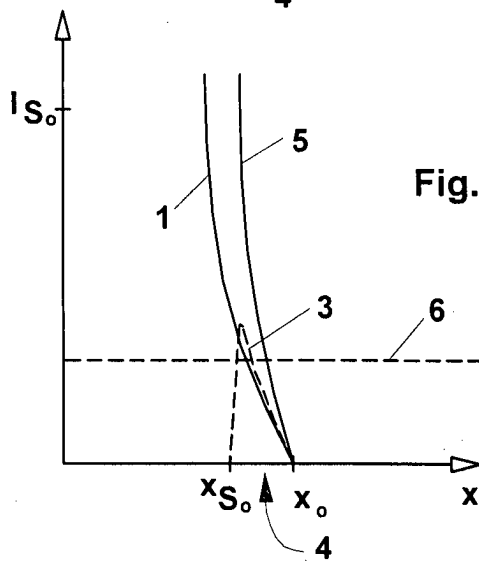


Fig. 4

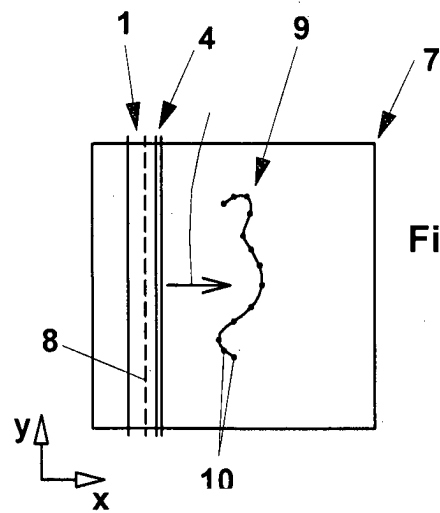


Fig. 5

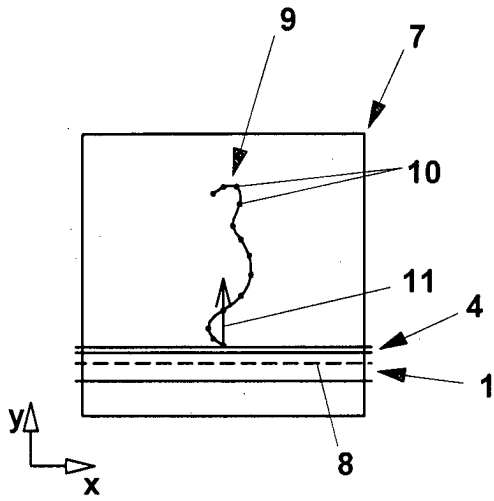


Fig. 6

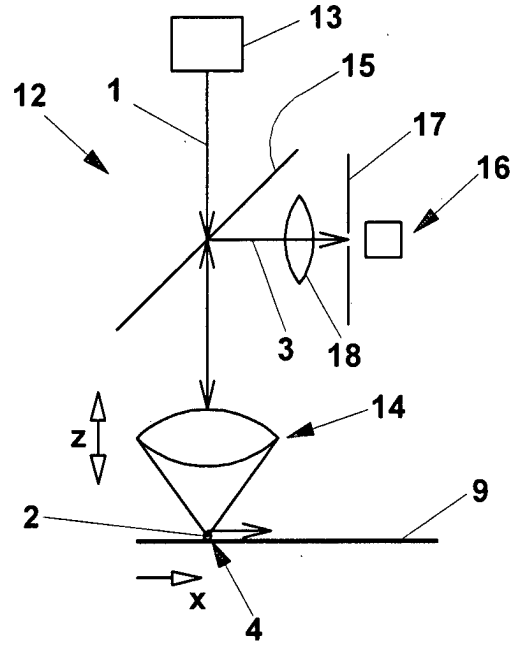


Fig. 7

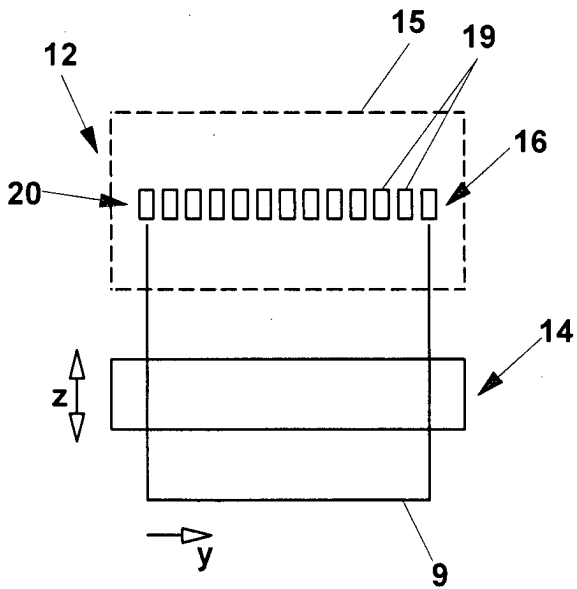


Fig. 8

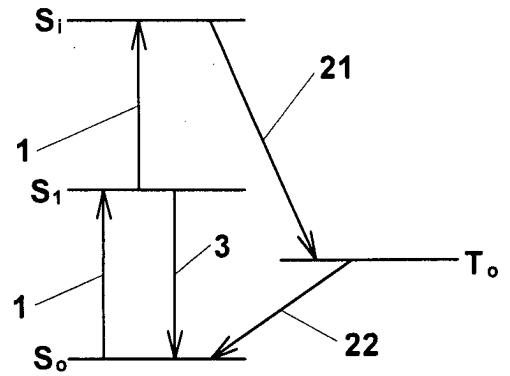


Fig. 9