



(10) **DE 10 2007 039 111 B4** 2014.11.20

(12) **Patentschrift**

(21) Aktenzeichen: **10 2007 039 111.2**
(22) Anmeldetag: **18.08.2007**
(43) Offenlegungstag: **26.02.2009**
(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: **20.11.2014**

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

Innerhalb von neun Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:
**Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der
Wissenschaften e.V., 80539 München, DE**

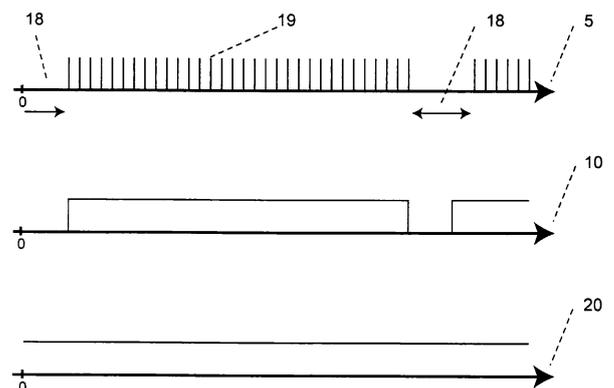
(72) Erfinder:
**Hell, Stefan W., Prof. Dr., 37085 Göttingen, DE;
Willig, Katrin, Dr., 37085 Göttingen, DE**

(74) Vertreter:
**REHBERG HÜPPE + PARTNER Patentanwälte
PartG mbB, 37073 Göttingen, DE**

(56) Ermittelter Stand der Technik:
siehe Folgeseiten

(54) Bezeichnung: **STED-Fluoreszenzmikroskopie mit Zweiphotonen-Anregung**

(57) Hauptanspruch: Verfahren zum räumlich hochauflösenden Abbilden einer mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Struktur in einer Probe, wobei gepulstes Anregungslicht in die Probe fokussiert wird, um den in einem Fokusbereich befindlichen Fluoreszenzfarbstoff zur spontanen Emission von Fluoreszenzlicht anzuregen, wobei die Wellenlänge des Anregungslichts (5) so ausgewählt wird, dass das Anregungslicht (5) den Fluoreszenzfarbstoff über einen Mehrphotonenprozess anregt, wobei Abregungslicht, das eine andere Wellenlänge als das Anregungslicht aufweist, auf die Probe gerichtet wird, um angeregten Fluoreszenzfarbstoff außerhalb eines gegenüber dem Fokusbereich verkleinerten Messbereichs vor seiner spontanen Emission abzuregen, und wobei von dem Fluoreszenzfarbstoff spontan emittiertes Fluoreszenzlicht registriert wird, dadurch gekennzeichnet, dass das Abregungslicht (10), das eine kürzere Wellenlänge als das Anregungslicht (5) aufweist, über eine Vielzahl von Pulsen (19) des Anregungslichts (10) hinweg kontinuierlich auf die Probe (2) gerichtet wird.



(56) Ermittelter Stand der Technik:

DE 10 2005 012 739 A1
DE 10 2005 013 969 A1
DE 10 2005 027 896 A1
US 6 958 470 B2
US 2002 / 0 104 961 A1
US 5 731 588 A
US 5 952 668 A
WO 2007/ 030 835 A2

Willig, K. I.; Keller, J.; Bossi, M.; Hell, S.
W.: STED microscopy resolves nanoparticle
assemblies. In: New J. Phys., Vol. 8, 2006, 106, S.
1 - 8

Armoogum, D.A., Marsh, R.J., Bain, A.J.:
Polarised Stimulated Emission Depletion Studies
of Two-Photon Excited States. In: Proc. of SPIE
Conf. Nanocrystals and Organic and Hybrid
Nanomaterials, edited by David L. Andrews, Vol.
5222, 2003, S. 34-44

Bain, A.J., Marsh, R.J., Armoogum, D.A.,
Mongin, O., Porrès, L., Blanchard-Desce, M.:
Time-resolved stimulated emission depletion
of two-photon excited states. In: Intermolecular
Associations in 2D and 3D, 2003, S. 1047-1051

Engel, E.; Huse, N.; Klar, T. A.; Hell, S. W.:
Creating $\lambda/3$ focal holes with a Mach-
Zehnder interferometer. In: Appl. Phys. B., Vol. 77,
2003, S. 11 - 17

Klar, T. A.; Engel, E.; Hell, S. W.: Breaking Abbe
's diffraction resolution limit in fluorescence
microscopy with stimulated emission depletion
beams of various shapes. In: Phys. Rev. E, Vol.
64, 066613

Klar, T. A.; Jakobs, St.; Dyba, M.; Egner,
A.; Hell, S. W.: Fluorescence microscopy with
diffraction resolution barrier broken by stimulated
emission. In: Proc. Natl. Acad. Sc., Vol. 97, No. 15,
July 2000, S. 8206 - 8210

Marsh, R.J., Armoogum, D.A., Bain, A.J.:
Stimulated emission depletion following two-
photon excitation. In: Proc. of SPIE Conf.
Nonlinear Spectroscopy, edited by David L.
Andrews, Vol. 4812, 2002, S. 45-54

Marsh, R.J., Armoogum, D.A., Bain, A.J.:
Stimulated emission depletion of two-photon
excited states. In: Chem. Phys. Lett., Vol. 366,
2002, S. 398-405

Marsh, R.J., Leonczek, N.D., Armoogum, D.A.,
Porres, L., Mongin, O., Blanchard-Desce, M., Bain,
A.J.: Stimulated Emission Depletion Dynamics
in Push-Push Polenes. In: Proc. of SPIE Conf.
Nanophotonic Materials, edited by David L.
Andrews, Vol. 5510, 2004, S. 117-128

So, P.T.C., Kwon, H.-S., Dong, C.Y.: Resolution
enhancement in standing-wave total internal
reflection microscopy: a point-spread-function
engineering approach. In: J. Opt. Soc. Am. A
(Optics, Image Science and Vision), Vol. 18, No.
11, Nov. 2001, S. 2833-2845

Beschreibung

TECHNISCHES GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren mit den Merkmalen des Oberbegriffs des unabhängigen Patentanspruchs 1 und eine Vorrichtung mit den Merkmalen des Oberbegriffs des unabhängigen Patentanspruchs 11 zum räumlich hochaufgelösten Abbilden einer mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Struktur in einer Probe.

STAND DER TECHNIK

[0002] Ein Verfahren zum räumlich hochaufgelösten Abbilden einer mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Struktur in einer Probe, bei dem Anregungslicht in die Probe fokussiert wird, um den in einem Fokusbereich befindlichen Fluoreszenzfarbstoff zur spontanen Emission von Fluoreszenzlicht anzuregen, wobei Abregungslicht, das eine andere Wellenlänge als das Anregungslicht aufweist, auf die Probe gerichtet wird, um angeregten Fluoreszenzfarbstoff außerhalb eines gegenüber dem Fokusbereich verkleinerten Messbereichs vor seiner spontanen Emission abzuregen, und wobei von dem Fluoreszenzfarbstoff spontan emittiertes Fluoreszenzlicht registriert wird, wird auch als STED(Stimulated Emission Depletion)-Fluoreszenzlichtmikroskopie bezeichnet. Mit dem Verfahren wird die Beugungsgrenze, die normalerweise die Auflösungsgrenze bei fernfeldlichtmikroskopischen Verfahren darstellt, unterschritten. Dabei wird der beugungsbegrenzte Fokusbereich, in dem das Anregungslicht den Fluoreszenzfarbstoff in der Probe grundsätzlich zur spontanen Emission von Fluoreszenzlicht anregt, zu Ausdehnungen unterhalb der Beugungsgrenze reduziert, indem Teile des Fokusbereichs mit Abregungslicht überlagert werden, das angeregten Fluoreszenzfarbstoff vor der Fluoreszenzemission wieder abregt. Damit verbleibt nur ein gegenüber dem Fokusbereich verkleinerter Messbereich, aus dem das von dem Fluoreszenzfarbstoff spontan emittierte Fluoreszenzlicht stammen kann. Durch Registrierung dieses Fluoreszenzlichts kann die mit dem Fluoreszenzfarbstoff in der Probe markierte Struktur mit einer die Beugungsgrenze überschreitenden Ortsauflösung abgebildet werden. Besonders gut ist die Ortsauflösung dann, wenn das Abregungslicht in Form eines Interferenzmusters auf die Probe gerichtet wird, das am Ort des Messbereichs eine Nullstelle aufweist und ansonsten eine Sättigung bei der Abregung des mit dem Anregungslicht angeregten Zustands des Fluoreszenzfarbstoffs erreicht.

[0003] Ein STED-Verfahren und ein STED-Fluoreszenzlichtmikroskop sind aus der US 5,731,588 bekannt. Hier ist erwähnt, dass die Anregungslichtquelle ein Dauerstrichlaser (engl.: continuous wave Laser = cw-Laser) sein kann, während die Abregungslichtquelle ein Puls laser sein kann, der mit dem Detektor

synchronisiert ist, um das Fluoreszenzlicht von der Probe erst nach dem Abklingen jeweils eines Pulses des Abregungslichts zu registrieren. Auf diese Weise wird vermieden, dass der Detektor von der Probe reflektiertes Abregungslicht oder auch Fluoreszenzlicht erfasst, dessen Emission von dem Abregungslicht stimuliert wurde und so nicht aus dem interessierenden Messbereich stammt. Als alternative Möglichkeit des Extrahierens des spontan emittierten Fluoreszenzlichts ist die Polarisierung des Anregungslichts und die Polarisationsfilterung des von der Probe auf den Detektor fallenden Lichts in orthogonaler Richtung zu der Polarisierung des Anregungslichts beschrieben.

[0004] Um bei einem Verfahren der STED-Fluoreszenzlichtmikroskopie die gewünschte Sättigung bei der Wiederabregung des Fluoreszenzfarbstoffs außerhalb des Messbereichs nach jedem Puls des Anregungslichts zu erreichen, ist es sinnvoll, die mittlere Lichtintensität, die für das Abregungslicht zur Verfügung steht, ebenfalls auf Pulse zu konzentrieren, die möglichst zeitnah zu den Pulsen des Anregungslichts auf die Probe aufgebracht werden, um den Fluoreszenzfarbstoff außerhalb des Messbereichs möglichst wenig Gelegenheit zu geben, Fluoreszenzlicht spontan zu emittieren. Diese Zeitnähe kann durch eine unmittelbare Abfolge oder auch eine teilweise oder gar vollständige zeitliche Überdeckung erreicht werden. Voraussetzung für diese Abfolge ist aber eine Synchronisation der Pulse des Abregungslichts mit den Pulsen des Anregungslichts ggf. zusätzlich zu einer Synchronisation des Detektors mit den Pulsen des Abregungslichts.

[0005] Der Aufwand für die praktische Realisierung eines STED-Fluoreszenzlichtmikroskops oder auch die Umrüstung eines herkömmlichen Fluoreszenzlichtmikroskops für die STED-Fluoreszenzlichtmikroskopie ist daher allein deshalb hoch, weil synchronisierbare Puls laser für das Anregungslicht und das Abregungslicht teuer sind. Hinzu kommt, dass die Laserpulse nicht vornherein die für die STED-Fluoreszenzmikroskopie erforderliche Pulsdauer haben. Neben der Synchronisation führt das erforderliche zeitliche Strecken und Präparieren von Pulsen über dispersive optische Elemente wie Gitter- oder Glasfaseranordnungen zu hohem technisch-finanziellem Aufwand und zu Funktionsanfälligkeiten.

[0006] Im Bereich der cw-Laser sind grundsätzlich kostengünstigere Laser verfügbar, beispielsweise in Form so genannter Diodenlaser, die eine oder mehrere elektrisch gepumpte Laserdioden aufweisen. Pulspräparation und Synchronisierung entfallen damit automatisch. Wenn Diodenlaser zur Abstrahlung von Pulsen modifiziert werden, entfällt jedoch der durch sie erbrachte grundsätzliche technisch-finanzielle Vorteil.

[0007] Bei den bekannten Formen der STED-Fluoreszenzlichtmikroskopie erweist es sich als schwierig, den Messbereich entlang der optischen Achse einzuengen, weil es mit einer Einphotonen-Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes grundsätzlich nicht möglich ist, die Anregung auf die Fokalebene oder das Fokalvolumen zu beschränken. Genauso ist es nicht möglich, das Abregungslicht auf die Fokalebene zu beschränken. Das bedeutet, dass Fluoreszenzfarbstoffe unter- und oberhalb der Fokalebene angeregt werden und somit auch durch das Abregungslicht abgeregt werden oder abgeregt werden müssen. Obwohl man durch Verwendung einer konfokalen Lochblende vor dem Detektor den Messbereich entlang der optischen Achse auf die Fokalebene reduzieren kann, so bedeutet es doch, dass der Fluoreszenzfarbstoff außerhalb der Fokalebene unnütz an- und abgeregt wird, was zu erheblichem Bleichen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den Abregungsstrahl führt und somit das Aufnehmen von 3D Bildern bei vielen Farbstoffen verhindert.

[0008] Als Möglichkeit, die fluoreszenzmikroskopische Abbildung einer Probe auf die Fokalebene zu beschränken und eine Selektivität entlang der optischen Achse zu erreichen, ist es bekannt, den Fluoreszenzfarbstoff mit dem Anregungslicht über einen Mehrphotonenprozess anzuregen. Grundsätzlich kann dabei das Anregungslicht Anteile verschiedener Wellenlängen aufweisen, und an dem Mehrphotonenprozess können drei oder sogar noch mehr einzelne Photonen beteiligt sein. In der Praxis der Mehrphotonenanregung eines Fluoreszenzfarbstoffs erfolgt jedoch in aller Regel eine Zweiphotonenanregung mit Anregungslicht nur einer Wellenlänge, bei der die Photonen jeweils die Hälfte der für den Mehrphotonenprozess insgesamt benötigten Photonenenergie beitragen. Die Selektivität der Anregung auf die Fokalebene beruht hier auf der Nichtlinearität zwischen der Intensität des Anregungslichts und der Anregungswahrscheinlichkeit des Fluoreszenzfarbstoffs in seinen fluoreszierenden Zustand über den Mehrphotonenprozess. Bei einer Zweiphotonenanregung ist diese Anregungswahrscheinlichkeit vom Quadrat der Intensität des Anregungslichts abhängig und konzentriert sich damit auf das Beugungshauptmaximum des Fokusbereichs des Anregungslichts in der Probe. Um angesichts der grundsätzlich geringeren Übergangswahrscheinlichkeit des Fluoreszenzfarbstoffs aufgrund eines Mehrphotonenprozesses eine ausreichende Ausbeute an Fluoreszenzlicht von der Probe zu erhalten, ohne die Probe mit extremen Intensitäten des Anregungslichts zu beaufschlagen, ist es bekannt, das Anregungslicht zeitlich zu einzelnen Pulsen zusammenzuziehen. Allein aufgrund dieser zeitlichen Konzentration des Anregungslichts und der damit einhergehenden erhöhten Photonenkonzentrationen in jedem einzelnen Puls des Anregungslichts kommt es zu einer deutlich gesteigerten Ausbeute an Fluoreszenzlicht gegenüber

kontinuierlich, d. h. mit zeitlich konstanter Intensität auf die Probe einfallendem Anregungslicht. Beispielsweise sorgt im Falle einer Zweiphotonenanregung die zeitliche Konzentration des Anregungslichts auf ein Zehntel der Zeit für eine in dem Zehntel der Zeit auf das Zehnfache erhöhte Intensität des Anregungslichts und damit für eine auf $10^2 = 100$ -fach erhöhte Ausbeute an Fluoreszenzlicht während dieses Zehntels der Zeit. Im Mittel über die Zeit resultiert hieraus immer noch ein $100/10 = 10$ -facher Anstieg der Intensität des Fluoreszenzlichts bei gleicher Durchschnittsleistung.

[0009] Aus der DE 10 2005 027 896.5 A1 ist es z. B. bei der STED-Fluoreszenzlichtmikroskopie aber auch bei der Fluoreszenzlichtmikroskopie unter Mehrphotonenanregung des Fluoreszenzfarbstoffs bekannt, einen zeitlichen Wiederholungsabstand eines auf die Probe fallenden optischen Signals in einem Bereich von mindestens $0,1 \mu\text{s}$ bis $2 \mu\text{s}$ zu variieren, um die Fluoreszenzlichtausbeute zu maximieren. Dabei kann das optische Signal von einem Dauerstrichlaser kommen, wenn eine Abtasteinrichtung zum räumlichen Abtasten der Probe mit dem optischen Signal vorgesehen ist, die eine solche Abtastgeschwindigkeit aufweist, dass sich der gewünschte Wiederholungsabstand einstellt. Die durch den Wiederholungsabstand bereitgestellten Pausen erlauben es dem Fluoreszenzfarbstoff aus einem Dunkelzustand, insbesondere einem Triplettzustand, in den er zu einem gewissen Anteil bei jeder Beaufschlagung mit dem optischen Signal gelangt, zurück in seinen fluoreszenzfähigen Singulettzustand zu relaxieren.

[0010] Aus der WO 2007/030835 A2 sind ein Verfahren zum räumlich hochaufgelösten Abbilden einer mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Struktur in einer Probe und eine dafür geeignete Vorrichtung bekannt. Bei dem Fluoreszenzfarbstoff handelt es sich um eine Verbindung, die einen Dunkelzustand, in dem sie nicht zur Fluoreszenz anregbar ist, und einen fluoreszenten Zustand aufweist, in dem sie mit Anregungslicht zur Fluoreszenz anregbar ist. Aus dem Dunkelzustand ist die Verbindung mit Einschaltlicht in den fluoreszenten Zustand einschaltbar, wobei der Übergang in den fluoreszenten Zustand über einen Zwischenzustand erfolgen soll, aus dem die Verbindung nach einem Puls des Einschaltlichts mit einem Puls aus Rückschaltlicht zurück in den Dunkelzustand überführbar sein soll. Mit diesem Rückschaltlicht wird der eingeschaltete Zustand gegenüber dem Fokusbereich des Einschaltlichts auf einen Messbereich verkleinert. Die eigentliche Messung erfolgt dann mit Anregungslicht, das die Verbindung in den fluoreszenten Zustand zur Fluoreszenz anregt. Dieses Anregungslicht kann dieselbe Wellenlänge haben wie das Rückschaltlicht hat aber eine andere räumlich Verteilung und wirkt in jedem Fall gleichzeitig als Ausschaltlicht, das die in den fluoreszenten Zustand eingeschaltete Verbindungs-

nung zurück in ihren Dunkelzustand ausschaltet. Um danach weiter messen zu können, muss ein weiterer Puls des Einschaltlichts mit einem nachfolgenden Puls des Rückschaltlichts auf die Probe fallen. Das gepulste Einschaltlicht kann eine solche Wellenlänge haben, dass es die Verbindung über einen Mehrphotonenprozess in ihren fluoreszenten Zustand einschaltet. Das zugleich als Ausschaltlicht wirkende Anregungslicht kann mit einem Dauerstrichlaser, beispielsweise einem Diodenlaser bereitgestellt werden, der nach Bedarf ein- und ausgeschaltet werden kann. Abregungslicht, das die zur Fluoreszenz angeregte Verbindung vor der Spontanemission von Fluoreszenzlicht wieder abregt, wird gemäß der WO 2007/030 835 A2 nicht eingesetzt. Der Aufwand für das aus dieser Druckschrift bekannte Verfahren und die hierzu eingesetzte Vorrichtung sind groß, weil Licht mit mindestens drei unterschiedlichen Wellenlängen und/oder räumlichen Verteilungen, nämlich das Einschaltlicht, das Rückschaltlicht und das auch als Ausschaltlicht wirkende Anregungslicht bereitgestellt werden müssen. Zudem müssen das Einschaltlicht und das Rückschaltlicht in genau miteinander synchronisierten Pulsen bereitgestellt werden, da der Zwischenzustand der schaltbaren Verbindung, auf die das Rückschaltlicht einwirken kann, nur von kurzer Lebensdauer ist. Dabei stellt bereits die Verwendung von schaltbaren Fluorophoren einen Grundaufwand dar, der weit über den Aufwand für einfache Fluoreszenzfarbstoffe hinausgeht.

[0011] Aus der US 2002/0104961 A1 sind ein STED-Verfahren mit den Merkmalen des Oberbegriffs des unabhängigen Patentanspruchs 1 und ein STED-Fluoreszenzlichtmikroskop mit den Merkmalen des Oberbegriffs des unabhängigen Patentanspruchs 11 bekannt, bei denen die Wellenlänge des Anregungslichts so ausgewählt wird, dass es den Fluoreszenzfarbstoff über einen Zweiphotonenprozess anregt. Das Anregungslicht und das Abregungslicht werden dabei durch zwei miteinander synchronisierte gepulste Laser mit einer Repetitionsrate von ungefähr 80 MHz bereitgestellt.

[0012] In Marsh, R. J. Armoogum, D. A.; Bain, A. J.: Stimulated emission depletion of two-photon excited states. In: Chem. Phys. Lett., Vol. 366, 2002, S. 398–405, sind Experiments zum Zeitverhalten eines Fluoreszenzfarbstoffs bei Entvölkerung seines zuvor durch einen Zweiphotonenprozess angeregten Zustands durch stimulierte Emission beschrieben. Das Stimulations- oder Abregungslicht wird ebenso wie das Anregungslicht in Pulsen auf eine Probe aufgebracht und das aus der Probe emittierte Fluoreszenzlicht wird zeitaufgelöst registriert. Die Länge der Pulse des Abregungslichts wird in einem Bereich von 250 fs bis zu 2,5 ps variiert. Die Pulse des Anregungslichts für die Zweiphotonenanregung des Fluoreszenzfarbstoffs haben eine Wiederholungsrate von 250 kHz.

AUFGABE DER ERFINDUNG

[0013] Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren und eine Vorrichtung zum räumlich hochaufgelösten dreidimensionalen (3D) Abbilden einer mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Struktur in einer Probe aufzuzeigen, die mit vergleichsweise geringem Aufwand realisierbar sind, das vorzeitige Bleichen der Probe durch den Abregungsstrahl vermieden und dennoch eine erhebliche Steigerung der Ortsauflösung über die Beugungsgrenze in allen Raumrichtungen ermöglichen.

LÖSUNG

[0014] Die Aufgabe der Erfindung wird durch ein Verfahren mit den Merkmalen des unabhängigen Patentanspruchs 1 und durch eine Vorrichtung mit den Merkmalen des unabhängigen Patentanspruchs 11 gelöst. Bevorzugte Ausführungsform des neuen Verfahrens sind in den abhängigen Patentansprüchen 2 bis 10 definiert, während die abhängigen Patentansprüche 12 bis 20 bevorzugte Ausführungsformen der neuen Vorrichtung beschreiben.

BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0015] Bei dem neuen Verfahren wird die Wellenlänge des Anregungslichts so ausgewählt, dass das Anregungslicht den Fluoreszenzfarbstoff über einen Mehrphotonenprozess anregt. In aller Regel handelt es sich hierbei um einen Zweiphotonenprozess. Während das Anregungslicht für die Mehrphotonenanregung gepulst ist, was sich in bekannter Weise günstig auf die Fluoreszenzlichtausbeute aufgrund der Mehrphotonenanregung auswirkt, wird das Abregungslicht, das eine kürzere Wellenlänge als das Anregungslicht aufweist, über eine Vielzahl von Pulsen des Anregungslichts hinweg kontinuierlich oder quasi kontinuierlich auf die Probe gerichtet. Durch die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs mit dem Anregungslicht über einen Mehrphotonenprozess ist der Fokusbereich, indem eine effektive Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs erfolgt, im Vergleich zu einer möglichen Anregung über einen Einphotonenprozess deutlich räumlich eingegrenzt. Insbesondere ist diese nichtlineare Anregung auf eine Fokustiefe von typischerweise $\sim 1 \mu\text{m}$ bei hochaperturigen Objektiven, die der Ausdehnung dessen Beugungshauptmaximums entlang der optischen Achse entspricht, beschränkt. Dadurch dass die Anregung räumlich in 3D eingegrenzt ist, müssen auch weniger oder gar keine Fluoreszenzfarbstoffe abgeregt werden, die sich ober- und unterhalb der Fokalebene befinden. Insbesondere müssen Fluoreszenzfarbstoffe, die sich außerhalb des fokalen Hauptmaximums befinden, und andernfalls durch einen Einphotonenprozess angeregt werden würden, nicht durch das Abregungslicht abgeregt werden.

[0016] Die Wellenlänge des Abregungslichts ist bevorzugt so gewählt, dass sie in das rote Ende des Emissionsspektrums des Farbstoffes fällt. Grundsätzlich gilt daher, dass das Beaufschlagen einer nicht angeregten Probe mit Abregungslicht nicht zu Bleichen führt, weil seine Photonenenergie zu gering ist, um den Fluoreszenzfarbstoff anzuregen. Das Abregungslicht kann aber Fluoreszenzfarbstoffe, die bereits angeregt sind, nicht nur wie erwünscht abregen, sondern auch bleichen. Bleichen durch das Abregungslicht erfolgt nur an bereits angeregten Fluoreszenzfarbstoffen.

[0017] Da also die Anregung durch die Mehrphotonenanregung von vornherein dreidimensional auf das Beugungshauptmaximum eingeengt ist, reduziert sich auch der Bereich in welchem Fluoreszenzfarbstoffe abgeregt werden müssen. Weil sich die Zahl der unnötigen Abregungen pro Fluoreszenzfarbstoffmolekül reduziert, reduziert sich auch das Bleichen, was die nanoskalige 3D-Abbildung durch die STED-Fluoreszenzmikroskopie erheblich vereinfacht und bei vielen Farbstoffen sogar erst ermöglicht. Wenn die Multiphotonenanregung nur in einer 1 µm dicken Schicht erfolgt, wird bei einer 10 µm dicken Probe die Zahl der unnötigen Abregungen um das 10-fache reduziert. Wenn also der Bereich der Probe, in dem das Abregungslicht benötigt wird, gegenüber dem Messbereich deutlich verkleinert werden kann, reduziert sich entsprechend das Bleichen durch das Abregungslicht entsprechend. Dies wird durch die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs über einen Mehrphotonenprozess zu Fluoreszenz erreicht.

[0018] Damit wird es ermöglicht, das Abregungslicht in kontinuierlicher Form, d. h. auf besonders kostengünstige Weise auf die Probe aufzubringen, ohne den Fluoreszenzfarbstoff dabei zu überbeanspruchen. Kostenvorteile entstehen in diesem Zusammenhang nicht nur durch den Verzicht auf ein Pulsen des Abregungslichts, sondern auch durch die damit entfallende Notwendigkeit, eine Synchronisation zwischen den Pulsen des Anregungslichts und den Pulsen des Abregungslichts herzustellen. So ist insbesondere der Aufwand zur Durchführung des neuen Verfahrens mit einem Fluoreszenzlichtmikroskop, das sowieso bereits zur Mehrphotonenanregung des Fluoreszenzfarbstoffs ausgerüstet ist, mit nur minimalem zusätzlichem Aufwand verbunden. Es muss nur noch das Abregungslicht mit einem einfachen Dauerstrichlaser bereitgestellt und in geeigneter Weise in das Objektiv des Fluoreszenzlichtmikroskops eingekoppelt werden.

[0019] Auch jegliche Synchronisation des Detektors für das von dem Fluoreszenzfarbstoff spontan emittierte Fluoreszenzlicht mit irgendwelchen Pulsen des An- oder Abregungslichts kann vollständig entfallen. So kann der Detektor das von dem Fluoreszenzfar-

stoff spontan emittierte Fluoreszenzlicht über eine Vielzahl von Pulsen des Anregungslichts hinweg kontinuierlich registrieren. Dabei kann der Detektor das Fluoreszenzlicht z. B. durch einen Kantenfilter oder ein schmalbandigen Bandpassfilter von dem Abregungslicht extrahieren oder aber durch einen Polarisationsfilter, wozu dann auch das Abregungslicht gezielt zu polarisieren ist.

[0020] Besonders bevorzugt ist es bei dem neuen Verfahren, wenn das Abregungslicht mit einem Diodenlaser bereitgestellt wird. Derartige Diodenlaser können zu etwa einem Zehntel der Kosten eines sonst üblichen PulsLasers für die Bereitstellung des Abregungslichts bei der STED-Fluoreszenzlichtmikroskopie als Dauerstrichlaser bereitgestellt werden.

[0021] Bei dem neuen Verfahren macht sich auch positiv bemerkbar, dass die effektive Mehrphotonenanregung der Probe durch das Anregungslicht zu jedem Zeitpunkt ebenfalls auf einen kleineren räumlichen Bereich beschränkt ist und auch dadurch die Gesamtbelastung mit dem Anregungslicht, die der Gefahr eines Bleichens des Fluoreszenzfarbstoff entspricht, verglichen mit der Fluoreszenzausbeute reduziert ist.

[0022] Das Anregungslicht kann bei dem neuen Verfahren mit einer vergleichsweise hohen Frequenz von mindestens 80 MHz, vorzugsweise mindestens 100 MHz, mehr bevorzugt mindestens 120 MHz und am meisten bevorzugt von mindestens 150 MHz gepulst werden. Zumindest mit den beiden letzten Zahlenangaben wird der übliche Frequenzbereich von PulsLasern überschritten, die üblicherweise bei der STED-Fluoreszenzlichtmikroskopie eingesetzt werden. Dieser Bereich liegt bei 80 bis 100 MHz. Durch die sehr hohe Frequenz der Pulse des Anregungslichts sind die Pausen zwischen den Pulsen des Anregungslichts sehr kurz. So wird verhindert, dass sehr große Anteile des Abregungslichts auf die Probe fallen, ohne dass sich dort sehr große Anteile des Fluoreszenzfarbstoffs in dem Grundzustand befinden.

[0023] Die einzelnen Pulse des Anregungslichts sind wie bei der Fluoreszenzlichtmikroskopie unter Mehrphotonenanregung des Fluoreszenzfarbstoffs verglichen mit ihrem Pulsabstand vorzugsweise relativ kurz. So können die einzelnen Pulse des Anregungslichts eine Dauer von höchstens ein Zehntel, vorzugsweise von höchstens ein Hundertstel, mehr bevorzugt von höchstens ein Tausendstel und am meisten bevorzugt von höchstens ein Zehntausendstel ihres Pulsabstands aufweisen. Wie bereits einleitend dargelegt wurde, wird hierdurch die relative Ausbeute an Fluoreszenzlicht von der Probe gesteigert, bei gleichbleibender Durchschnittsleistung des Anregungsstrahls.

[0024] Mit dem neuen Verfahren ist es insbesondere möglich, die Probe mit dem Messbereich oder einer Mehrzahl gleichartiger Messbereiche, aus denen das von dem Fluoreszenzfarbstoff spontan emittierte Fluoreszenzlicht räumlich getrennt registriert wird, dreidimensional abzutasten, wobei die mit dem Fluoreszenzfarbstoff in der Probe markierte Struktur dreidimensional aufgelöst wird.

[0025] Um diese Auflösung insbesondere in z-Richtung, d. h. der Richtung der optischen Achse des Anregungslichts, zu erreichen, ist es sinnvoll, das Abregungslicht gerade in dieser Richtung vor und hinter dem Messbereich auf die Probe zu richten, wie es aus der Druckschrift Proc. Natl. Acad. Sc. USA, 97, 8206 (2000) bekannt ist. Dabei reicht jeweils ein Maximum neben einer Intensitätsnullstelle des Abregungslichts am Ort des Messbereichs aus, um den in dem Fokusbereich durch Mehrphotonenanregung zur Fluoreszenz angeregten Fluoreszenzfarbstoff wieder abzuregen. Generell sind mehrere Verfahren und Vorrichtungen zur Modifikation des Abregestrahls bekannt, die dazu führen, dass der fokale Messbereich vorteilhaft einengt wird: Phys. Rev. E, 64, 066613 (2001); Appl. Phys. B 77: 11 (2003); New J. Phys. 8: 106 (2006).

[0026] Auch ist es vorteilhaft vor dem Detektor eine konfokale Lochblende, und im Falle von mehreren fokalen Messbereichen ein konfokales Array von Lochblenden, anzuordnen. Lochblenden unterdrücken Streulicht sowohl von dem Abregungs- als auch von dem Anregungsstrahl. In einer weiteren speziellen Ausführungsform wird das Fluoreszenzlicht nicht über die optische Abtasteinrichtung zurückgeführt, sondern auf einem vereinfachten optischen Wege registriert, d. h. einer „non-descanned detection“, wie sie dem Fachmann bekannt ist.

[0027] In einer speziellen Ausführungsform des neuen Verfahrens werden das Anregungslicht und das Abregungslicht jeweils nach einer Vielzahl von Pulsen des Anregungslichts für einen begrenzten Zeitraum unterbrochen. Diese Unterbrechungen haben ihren Zweck darin, das Relaxieren des Fluoreszenzfarbstoffs aus einem Dunkelzustand, insbesondere seinem Tripletzustand, zurück in den fluoreszenten Singulettzustand abzuwarten, nachdem dieser Dunkelzustand während der vorherigen Pulse des Anregungslichts durch das Anregungslicht bereits auf ein erhebliches Maß bevölkert wurde. Diese Bevölkering des Dunkelzustands hat eine reduzierte Ausbeute von Fluoreszenzlicht von der Probe zur Folge und kann zudem mit einer erhöhten Gefahr des Bleichens des Fluoreszenzfarbstoffs verbunden sein. Über einen vergleichsweise kurzen Zeitraum im Bereich von 0,5 bis 3 μ s, typischerweise 1 bis 2 μ s, klingt der Dunkelzustand jedoch wieder ab, so dass entsprechende Unterbrechungen der Anregung zu einer insgesamt erhöhten Ausbeute des Fluoreszenzlichts

von der Probe führen. Sinnvollerweise wird parallel zu der Zufuhr des Anregungslichts auch das Abregungslichts für die genannten Zeiträume unterbrochen, um die Probe nicht unnötig mit dem Abregungslicht zu beaufschlagen. Der Zeitraum der Vielzahl von Pulsen des Anregungslichts zwischen den Pausen des Anregungslichts über den das Abregungslicht kontinuierlich auf die Probe aufgebracht wird, beträgt demgegenüber typischerweise von 100 ns bis 50 μ s und vorzugsweise 0,5 bis 2 μ s. Die genaue Dauer dieses Zeitraums hängt davon ab, wie schnell sich der Tripletzustand oder der Dunkelzustand praktisch bevölkert.

[0028] Bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung strahlt die Anregungslichtquelle das Anregungslicht mit einer solchen Wellenlänge ab, dass das Anregungslicht den Fluoreszenzfarbstoff über einen Mehrphotonenprozess anregt, und die Abregungslichtquelle richtet das Abregungslicht, das eine kürzere Wellenlänge als das Anregungslicht aufweist, über eine Vielzahl von Pulsen des Anregungslichts hinweg kontinuierlich auf die Probe.

[0029] Der Detektor der Vorrichtung wird das von dem Fluoreszenzfarbstoff spontan emittierte Fluoreszenzlicht ebenfalls über eine Vielzahl von Pulsen des Anregungslichts hinweg kontinuierlich registrieren.

[0030] Besonders günstig ist die Realisation der neuen Vorrichtung dann, wenn die Abregungslichtquelle einen kontinuierlich emittierenden Diodenlaser aufweist. Die Anregungslichtquelle weist hingegen einen Pulslaser auf, der das Anregungslicht in Pulsen mit der oben erläuterten Frequenz und der relativen Dauer bezogen auf ihren Abstand abgibt. Eine Abtasteinrichtung, die bei der neuen Vorrichtung vorgesehen ist, um die Probe mit dem Messbereich oder einer Mehrzahl gleichartiger Messbereiche, aus denen der Detektor das von dem Fluoreszenzfarbstoff spontan emittierte Fluoreszenzlicht räumlich getrennt registriert, dreidimensional abzutasten, kann grundsätzlich die Probe gegenüber dem Rest des Fluoreszenzlichtmikroskops bewegen. Vorzugsweise erfolgt das Abtasten aber durch Verschieben eines optischen Elements, das sowohl zu der das Anregungslicht in die Probe fokussierenden Optik als auch zu der das Abregungslicht in die Probe richtenden Optik zählt. Verschiedene Vorrichtungen zur Rasterung eines fokussierten Strahls über die Probe sind dem Fachmann hinreichend aus der Literatur der Laser-rastermikroskopie bekannt.

[0031] Um das Einfallen des Anregungslichts und des Abregungslichts jeweils nach einer Vielzahl von Pulsen des Anregungslichts für einen begrenzten Zeitraum zu unterbrechen, kann die neue Vorrichtung eine Steuerungseinrichtung aufweisen, die vorzugsweise einstellbar ist, um den begrenzten Zeitraum sowie einen Zeitraum der Vielzahl von Pulsen,

der zwischen zwei solchen begrenzten Zeiträumen liegt, einzustellen. Solche Steuerungseinrichtungen enthalten vorzugsweise akustooptische oder elektrooptische Strahlmodulatoren. Der Detektor der neuen Vorrichtung muss im Übrigen auch nicht mit den begrenzten Zeiträumen synchronisiert werden, in denen das Anregungslicht und das Abregungslicht unterbrochen werden, sondern er kann das von dem Fluoreszenzfarbstoff spontan emittierte Fluoreszenzlicht auch über diese Zeiträume hinweg kontinuierlich registrieren, was aber nicht anfällt.

[0032] 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 Ausführungsformen 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 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.

KURZBESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0033] Die Erfindung wird im Folgenden anhand eines Ausführungsbeispiels unter Bezugnahme auf die beigefügten Figuren näher erläutert und beschrieben.

[0034] Fig. 1 zeigt den schematischen Aufbau einer Ausführungsform der neuen Vorrichtung.

[0035] Fig. 2 zeigt oben den schematischen Zeitverlauf der Intensität des Anregungslichts, in der Mitte den schematischen Zeitverlauf der Intensität des Abregungslichts und unten den schematischen Zeitverlauf der Empfindlichkeit des Detektors zum Registrieren von Fluoreszenzlicht von einer Probe bei einer Ausführungsform des neuen Verfahrens.

FIGURENBESCHREIBUNG

[0036] Die in Fig. 1 skizzierte Vorrichtung 1 dient zum räumlich hochaufgelösten Abbilden einer mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Struktur in ei-

ner Probe 2. Hierzu wird mit einer Anregungslichtquelle 3 in Form eines Pulslasers 4 gepulstes Anregungslicht 5 durch eine Optik 6 in einen Fokusbereich eines Objektivs 7 in die Probe gerichtet. In diesem Fokusbereich wird der Fluoreszenzfarbstoff in der Probe 2 durch einen Zweiprotonenprozess zur Fluoreszenz, d. h. zur spontanen Emission von Fluoreszenzlicht angeregt. Der Fokusbereich ist hier als der Bereich definiert, in dem eine effektive Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs über den Zweiphotonenprozess zur Spontanemission von Fluoreszenzlicht erfolgt. Über einen Teilbereich des Fokusbereichs, und zwar außerhalb eines gegenüber dem Fokusbereich verkleinerten Messbereichs wird der Fluoreszenzfarbstoff sofort wieder abgeregt, indem mit einer Abregungslichtquelle 8 in Form eines Diodenlasers 9 Abregungslicht 10 kontinuierlich auf die Probe gerichtet wird. Dabei werden mit einem Phasenmodulator 11 die ebenen Wellen des Anregungslichts 10 so deformiert, dass sich in dem Fokusbereich eine Intensitätsverteilung des Anregungslichts 10 mit einer zentralen Nullstelle und daran angrenzenden, den Rest des Fokusbereichs abdeckenden Intensitätsmaxima einstellt. So erfasst ein Detektor 12, der von dem Fluoreszenzfarbstoff der Probe 2 spontan emittiertes Fluoreszenzlicht registriert, nur noch Fluoreszenzlicht aus dem Messbereich, der Abmessungen unterhalb der Beugungsgrenze des Lichts mit den eingesetzten Wellenlängen aufweist. Das Anregungslicht 5 wird von dem Detektor 12 durch einen dichroitischen Spiegel 14 ferngehalten, der die Strahlengänge des Anregungslichts 5 und des Fluoreszenzlichts 13 trennt. Das Abregungslicht 10 wird von dem Detektor 12 durch einen dichroitischen Spiegel 15 ferngehalten, der die Strahlengänge des Abregungslichts 10 und des Fluoreszenzlichts 13 trennt. Eine Abtasteinrichtung 16 kann dazu vorgesehen sein, ein optisches Element 17 der Optik 6, durch das Anregungslicht 5 als auch das Abregungslicht 10 als auch das Fluoreszenzlicht 13 von der Probe hindurch treten, so bewegt, dass die mit dem Fluoreszenzfarbstoff in der Probe zwei markierte Strukturen dreidimensional abgetastet wird.

[0037] Fig. 2 zeigt oben den zeitlichen Verlauf der Intensität des Anregungslichts 5. Zwischen begrenzten Zeiträumen 18, in denen die Intensität des Anregungslichts null ist, besteht das Anregungslicht aus einzelnen Pulsen mit einer Pulsdauer kürzer als ihr Abstand. Die begrenzten Zeiträume 18 weisen eine typische Dauer von 1 µs auf. Die Frequenz der Pulse 19 des Anregungslichts 5 liegt bei über 120 MHz, wobei ihr Abstand mindestens 10 Mal größer ist als ihre Dauer. Diese Zahlenverhältnisse werden in Fig. 2 nicht vollständig widerspiegelt. In der Mitte zeigt Fig. 2 den Intensitätsverlauf des Abregungslichts 10 über der Zeit. Das Abregungslicht 10 wird kontinuierlich, d. h. mit konstanter Intensität, auf die Probe 2 aufgebracht, außer in den begrenzten Zeiträumen 18, in dem seine Intensität ebenfalls null ist. Unten zeigt

Fig. 2 die Empfindlichkeit **20** des Detektors **12** gemäß **Fig. 1** über der Zeit. Diese ist kontinuierlich, d. h. auch über die begrenzten Zeiträume **18** hinweg gegeben.

Bezugszeichenliste

1	Vorrichtung
2	Probe
3	Anregungslichtquelle
4	Pulslaser
5	Anregungslicht
6	Optik
7	Objektiv
8	Abregungslichtquelle
9	Diodenlaser
10	Abregungslicht
11	Phasenmodulator
12	Detektor
13	Spontan emittiertes Fluoreszenzlicht
14	Dichroitischer Spiegel
15	Dichroitischer Spiegel
16	Abtasteinrichtung
17	Optisches Element
18	Begrenzter Zeitraum
19	Puls
20	Empfindlichkeit

Patentansprüche

1. Verfahren zum räumlich hochaufgelösten Abbilden einer mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Struktur in einer Probe, wobei gepulstes Anregungslicht in die Probe fokussiert wird, um den in einem Fokusbereich befindlichen Fluoreszenzfarbstoff zur spontanen Emission von Fluoreszenzlicht anzuregen, wobei die Wellenlänge des Anregungslichts (**5**) so ausgewählt wird, dass das Anregungslicht (**5**) den Fluoreszenzfarbstoff über einen Mehrphotonenprozess anregt, wobei Abregungslicht, das eine andere Wellenlänge als das Anregungslicht aufweist, auf die Probe gerichtet wird, um angeregten Fluoreszenzfarbstoff außerhalb eines gegenüber dem Fokusbereich verkleinerten Messbereichs vor seiner spontanen Emission abzuregen, und wobei von dem Fluoreszenzfarbstoff spontan emittiertes Fluoreszenzlicht registriert wird, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Abregungslicht (**10**), das eine kürzere Wellenlänge als das Anregungslicht (**5**) aufweist, über eine Vielzahl von Pulsen (**19**) des Anregungslichts (**10**) hinweg kontinuierlich auf die Probe (**2**) gerichtet wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass das von dem Fluoreszenzfarbstoff spontan emittierte Fluoreszenzlicht (**13**) über eine Vielzahl von Pulsen (**19**) des Anregungslichts (**5**) hinweg kontinuierlich registriert wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Abregungslicht (**10**) mit einem Diodenlaser (**9**) bereitgestellt wird.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Anregungslicht (**5**) mit einer Frequenz von mindestens 80 MHz, vorzugsweise mindestens 100 MHz, mehr bevorzugt mindestens 120 MHz und am meisten bevorzugt mindestens 150 MHz gepulst wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass die einzelnen Pulse (**19**) des Anregungslichts (**5**) eine Dauer von höchstens 1 Zehntel, vorzugsweise von höchstens 1 Hundertstel, mehr bevorzugt von höchstens 1 Tausendstel und am meisten bevorzugt von höchstens 1 Zehntausendstel ihres Pulsabstands aufweisen.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Probe (**2**) mit dem Messbereich oder einer Mehrzahl gleichartiger Messbereiche, aus denen das von dem Fluoreszenzfarbstoff spontan emittierte Fluoreszenzlicht (**13**) räumlich getrennt registriert wird, dreidimensional abgetastet wird.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Abregungslicht (**10**) in Richtung der optischen Achse des Anregungslichts (**5**) vor und hinter dem Messbereich auf die Probe (**2**) gerichtet wird.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Anregungslicht (**5**) und das Abregungslicht (**10**) jeweils nach der Vielzahl von Pulsen (**19**) des Anregungslichts (**5**) für einen begrenzten Zeitraum (**18**) unterbrochen werden.

9. Verfahren nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass der begrenzte Zeitraum der Unterbrechung (**18**) eine Dauer von 0,5 bis 50 μ s, vorzugsweise von 1 bis 2 μ s, aufweist.

10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein Zeitraum der Vielzahl von Pulsen (**19**) des Anregungslichts (**5**) 100 ns bis 50 μ s, vorzugsweise 0,5 bis 2 μ s, ausmacht.

11. Vorrichtung zum räumlich hochaufgelösten Abbilden einer mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Struktur in einer Probe, mit einer Anregungslichtquelle für gepulstes Anregungslicht, mit einer das Anregungslicht in die Probe fokussierenden Optik, um den in einem Fokusbereich befindlichen Fluoreszenzfarbstoff zur spontanen Emission von Fluoreszenzlicht anzuregen, wobei die Anregungslichtquelle (**3**) das Anregungslicht (**5**) mit einer solchen Wellenlänge abstrahlt, dass das Anregungslicht (**5**) den Fluoreszenzfarbstoff über einen Mehrphotonenprozess anregt, mit einer Abregungslichtquelle für Abregungslicht, das eine andere Wellenlänge als das Anregungslicht aufweist, mit einer das Abregungslicht auf die Probe richtenden Optik, um den Fluoreszenz-

farbstoff außerhalb eines gegenüber dem Fokusbereich verkleinerten Messbereichs abzuregen, und mit einem Detektor, der von dem Fluoreszenzfarbstoff spontan emittiertes Fluoreszenzlicht registriert, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Abregungslichtquelle (8) das Abregungslicht (10), das eine kürzere Wellenlänge als das Anregungslicht (5) aufweist, über eine Vielzahl von Pulsen (19) des Anregungslichts (5) hinweg kontinuierlich auf die Probe (2) richtet.

12. Vorrichtung nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Detektor (12) das von dem Fluoreszenzfarbstoff spontan emittierte Fluoreszenzlicht (13) über eine Vielzahl von Pulsen (19) des Anregungslichts (5) hinweg kontinuierlich registriert.

13. Vorrichtung nach Anspruch 11 oder 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Abregungslichtquelle (8) einen Diodenlaser (9) aufweist.

14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 11 bis 13, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Anregungslichtquelle (5) einen Pulslaser (6) aufweist, der das Anregungslicht (5) in Pulsen (19) mit einer Frequenz von mindestens 80 MHz, vorzugsweise mindestens 100 MHz, mehr bevorzugt mindestens 120 MHz und am meisten bevorzugt mindestens 150 MHz abgibt.

15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 11 bis 14, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Anregungslichtquelle (3) einen Pulslaser (4) aufweist, der das Anregungslicht (5) in einzelnen Pulsen (19) abgibt, die eine Dauer von höchstens 1 Zehntel, vorzugsweise von höchstens 1 Hundertstel, mehr bevorzugt von höchstens 1 Tausendstel und am meisten bevorzugt von höchstens 1 Zehntausendstel ihres Abstands aufweisen.

16. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 11 bis 15, **dadurch gekennzeichnet**, dass eine Abtasteinrichtung (16) vorhanden ist, die die Probe (2) mit dem Messbereich oder einer Mehrzahl gleichartiger Messbereiche, aus denen der Detektor (12) das von dem Fluoreszenzfarbstoff spontan emittierte Fluoreszenzlicht (13) räumlich getrennt registriert, dreidimensional abtastet.

17. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 11 bis 16, **dadurch gekennzeichnet**, dass die das Abregungslicht (10) auf die Probe richtende Optik (6) ebene Wellenfronten des Abregungslichts so modifiziert, dass das Abregungslicht (10) in Richtung der optischen Achse des Anregungslichts (5) Intensitätsmaxima vor und hinter dem Messbereich aufweist.

18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 11 bis 17, **dadurch gekennzeichnet**, dass eine Steuerungseinrichtung vorhanden ist, die das Einfallen des Anregungslichts (5) und des Abregungslichts (10) je-

weils nach der Vielzahl von Pulsen (19) des Anregungslichts (5) für einen begrenzten Zeitraum (18) unterbricht.

19. Vorrichtung nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass der begrenzte Zeitraum (18) mindestens in einem Bereich von einer Dauer von 1 bis 2 μs , vorzugsweise von 0,5 bis 3 μs einstellbar ist.

20. Vorrichtung nach Anspruch 8 oder 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein Zeitraum der Vielzahl von Pulsen (19) des Anregungslichts (5) mindestens in einem Bereich von 100 ns bis 50 μs , vorzugsweise von 0,5 bis 2 μs einstellbar ist.

Es folgt eine Seite Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

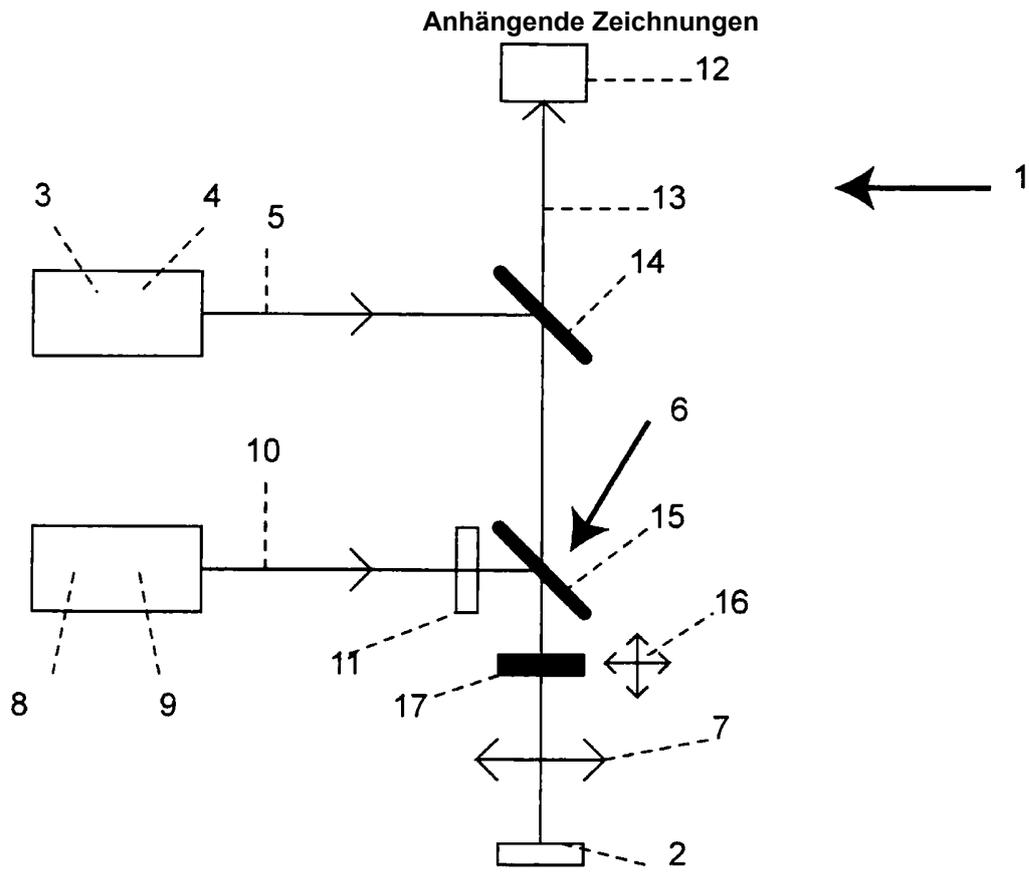


Fig. 1

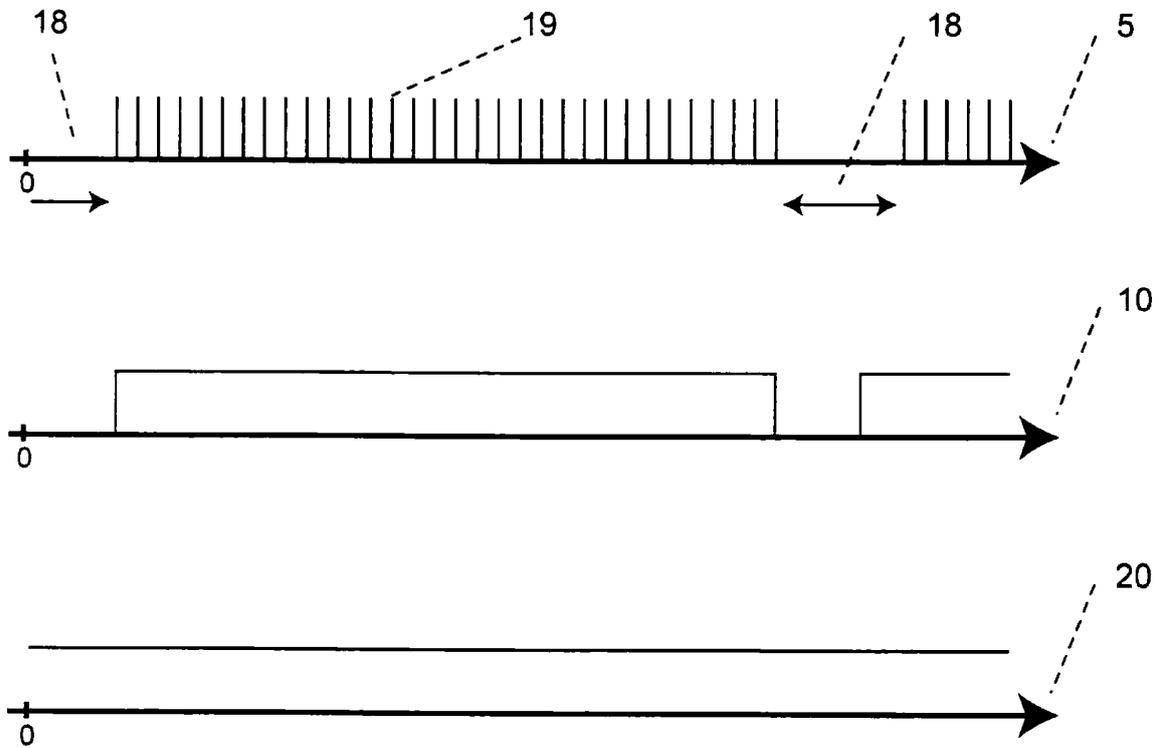


Fig. 2