



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 103 25 460 A1 2004.11.11**

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **103 25 460.9**
 (22) Anmeldetag: **05.06.2003**
 (43) Offenlegungstag: **11.11.2004**

(51) Int Cl.7: **G01N 21/63**

(30) Unionspriorität:
10/420896 22.04.2003 US

(66) Innere Priorität:
103 17 613.6 13.04.2003

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

(74) Vertreter:
Rehberg und Kollegen, 37073 Göttingen

(72) Erfinder:
Hell, Stefan, Dr., 37073 Göttingen, DE

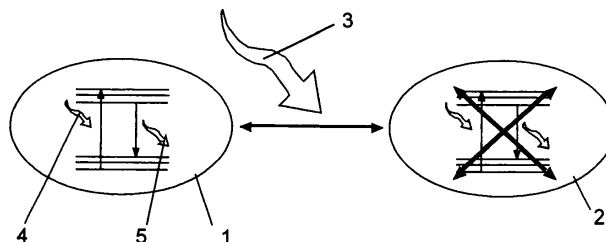
(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
 gezogene Druckschriften:
DE 100 12 462 A1
WO 95/21 393 A2
Physical Review Letters, Vol. 88, 2002,
S. 163901-1 bis 163901-4;
Topics in Fluorescence Spectroscopy, Vol. 5,
:Nonlinear and Two-Photon-Induced
Fluorescence,
ed. by J. Lakowicz, Plenum Press New York, 1977,
S. 361-426;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

(54) Bezeichnung: **Räumlich hochauflösendes Abbilden**

(57) Zusammenfassung: Bei einem Verfahren zum räumlich hochauflösenden Abbilden einer mit einer Substanz markierten Struktur einer Probe, mit den Schritten: Auswählen der Substanz aus einer Gruppe von Substanzen, die mit einem optischen Umschaltsignal (3) wiederholt aus einem ersten Zustand (1) mit ersten optischen Eigenschaften in einen zweiten Zustand (2) mit zweiten optischen Eigenschaften überführbar sind und die aus dem zweiten Zustand (2) in den ersten Zustand (1) zurückkehren können, Überführen der Substanz in Bereichen der Probe (7) mit dem Umschaltsignal (3) in den zweiten Zustand (2), wobei ein definierter Bereich gezielt ausgelassen wird, und Registrieren eines optischen Messsignals (5), das der Substanz in dem ersten Zustand (1) zuzuordnen ist, für einen Registrierbereich, der neben Bereichen, in denen die Substanz in den zweiten Zustand überführt ist, den gezielt ausgelassenen Bereich umfasst, wird die Substanz aus einer Untergruppe von Substanzen ausgewählt, bei denen sich die folgenden Zustände (1, 2) mindestens hinsichtlich eines der folgenden Kriterien unterscheiden: Konformationszustand eines Moleküls, Strukturformel eines Moleküls, räumliche Anordnung von Atomen innerhalb eines Moleküls, räumliche Anordnung von Bindungen innerhalb eines Moleküls, Anlagerung weiterer Atome oder Moleküle an ein Molekül, Gruppierung von Atomen und/oder Molekülen, räumliche Orientierung eines Moleküls, Orientierung benachbarter Moleküle zueinander und von einer Vielzahl von Molekülen und/oder ...



Beschreibung**Stand der Technik**

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum räumlich hochauflösenden Abbilden einer mit einer Substanz markierten Struktur einer Probe mit den Merkmalen des Oberbegriffs des Patentanspruchs 1.

[0002] Die Substanz kann natürlich in der abzubildenden Struktur der Probe vorkommen. Anderenfalls muss die Struktur der Probe künstlich mit der Substanz markiert werden.

STAND DER TECHNIK

[0003] Die räumliche Auflösung abbildender optischer Verfahren wird grundsätzlich durch die Beugungsgrenze (Abbe'sche Grenze) bei der Wellenlänge des relevanten optischen Signals gesetzt.

[0004] Es sind aber bereits Verfahren auf dem Gebiet der Fluoreszenzmikroskopie bekannt, bei denen durch Ausnutzung von nichtlinearen Zusammenhängen zwischen der Schärfe des effektiven fokalen Spots und der eingestrahnten Intensität eines optischen Anregungssignals die Beugungsgrenze bei der Abbildung einer Struktur einer Probe effektiv unterschritten wird. Beispiele sind die Multiphotonenabsorption in der Probe oder die Erzeugung höherer Harmonischer des optischen Anregungssignals. Auch eine Sättigung eines optisch induzierten Übergangs kann als nichtlinearen Zusammenhang ausgenutzt werden, wie beispielsweise bei einer Entvölkerung des fluoreszierenden Zustands durch stimulierte Emission (englisch: stimulated emission depletion = STED) oder einer Entvölkerung des Grundzustands (englisch: ground state depletion = GSD). Bei diesen beiden Verfahren, die prinzipiell molekulare Auflösungen erreichen können, wird ein Fluoreszenzfarbstoff, mit dem die interessierende Struktur einer Probe markiert ist, überall dort, wo ein optisches Umschaltsignal einen charakteristischen Grenzwert, der in dieser Beschreibung als Sättigungsgrenzwert bezeichnet wird, überschreitet, in einen Energiezustand versetzt, aus dem heraus keine Fluoreszenz (mehr) erfolgt. Wenn dabei der räumliche Bereich, aus dem dann noch ein Messsignal registriert wird, durch ein lokales Intensitätsminimum des optischen Umschaltsignals festgelegt wird, das eine Nullstelle aufweist und beispielsweise durch Interferenz erzeugt wird, sind seine Abmessungen und damit die erreichte Ortsauflösung kleiner als die Beugungsgrenze. Der Grund ist, dass der räumliche begrenzte Teilbereich, aus dem das Messsignal registriert wird, mit zunehmendem Sättigungsgrad der Entvölkerung des an der Fluoreszenz beteiligten Zustands eingeengt wird. Genauso wird die Kante eines fokalen Spots oder Streifens steiler, was ebenfalls zu einer erhöhten Ortsauflösung führt.

[0005] Ein STED-Verfahren mit den Merkmalen des Oberbegriffs des Patentanspruchs 1 ist aus der WO 95/21393 A1 bekannt. Bei diesem Verfahren wird eine Probe bzw. ein Fluoreszenzfarbstoff in der Probe durch ein optisches Anregungssignal zur Fluoreszenz angeregt. Der räumliche Bereich der Anregung, für den die Beugungsgrenze gilt, wird dann verkleinert, indem er mit einem Intensitätsminimum eines Interferenzmusters eines Abregungslichtstrahls als Umschaltsignal überlagert wird. Überall dort, wo das Umschaltsignal einen Sättigungsgrenzwert übersteigt, wird der Fluoreszenzfarbstoff vollständig durch stimulierte Emission ausgeschaltet, d.h. aus dem zuvor angeregten Energiezustand wieder abgeregt. Der verbleibende räumliche Bereich, aus dem anschließend noch Fluoreszenzlicht spontan emittiert wird, entspricht nur noch einem verkleinerten Gebiet um die Nullstelle des Intensitätsminimums, in dem das Umschaltsignal nicht oder nicht mit ausreichender Intensität vorlag. Obwohl dieses Verfahren der Fluoreszenzmikroskopie nachvollziehbar eine Ortsauflösung unterhalb der Beugungsgrenze liefert, ist es auch mit Nachteilen verbunden. Die Lebensdauer des Energiezustands des Fluoreszenzfarbstoffs, der mit dem Anregungsstrahl angeregt wird, ist nur kurz. Damit das Umschalten effektiv innerhalb einer noch kürzeren Zeitspanne komplettiert ist, muss daher eine vergleichsweise hohe Intensität des Umschaltsignals angewandt werden. Damit bei der Abregung durch das Umschaltsignal ein nichtlinearer Zusammenhang zwischen der verbleibenden Fluoreszenz und der Intensität des Umschaltsignals hergestellt wird, d.h. Sättigung erreicht wird, muss die Intensität des Abregungsstrahls zusätzlich sehr hoch sein. So wird in der Regel ein gepulster Hochleistungslaser für den Abregungslichtstrahl benötigt, der die Durchführung des bekannten Verfahrens recht kostspielig macht.

[0006] Dieselben Nachteile gelten auch für bekannte GSD-Verfahren, da auch hier Zeitbeschränkungen und Leistungsanforderungen durch kurze Lebensdauern der beteiligten Energiezustände gesetzt werden.

[0007] Aus The Journal of Biological Chemistry, Vol. 275, No. 84, Seiten 25879–25882 (2000), ist ein Protein bekannt, das durch grünes Licht in zunehmendem Maße zur Fluoreszenz im roten Bereich anregbar ist, das aber bei Bestrahlung mit blauem Licht seine Fluoreszenzeigenschaften verliert. Dieser Prozess ist umkehrbar. Offenbar schaltet das grüne Licht das Protein in einen Konformationszustand, in dem es die Fluoreszenzeigenschaft hat, und regt gleichzeitig die Fluoreszenz an, während das blaue Licht das Protein in einen Konformationszustand ohne die Fluoreszenzeigenschaften umschaltet. Das Protein ist ein in der Seeanemone *Anemonia sulcata* vorkom-

mendes natürliches Protein, dessen hier beschriebenen Funktionen durch gezielten Austausch einer Aminosäure verstärkt werden können.

[0008] Weiterhin ist es aus der Zeitschrift Nature Vol. 388, Seiten 355–358, (1997) bekannt, dass das Grün-Fluoreszierende-Protein (englisch: green-fluorescent protein, GFP) und Mutanten davon zwischen zwei Zuständen geschaltet werden können, wobei der eine sich von dem anderen spektral unterscheidet. Beide Proteine können als Fluoreszenzmarker in lebenden Zellen eingesetzt werden.

[0009] Aus der Publikation Nature, Vol. 420, Seiten 759–760, (2002) sind fluoreszierende Moleküle aus der Familie der Diarylethene bekannt, die sich zwischen einem fluoreszierenden und einem nichtfluoreszierenden Zustand beliebig hin- und herschalten lassen. Beide Zustände sind thermisch stabil, so dass der Schaltprozess, bei dem es sich um eine Photoisomerisierung oder Photocyclisierung handelt, mit vergleichsweise niedrigen Intensitäten eines optischen Signals erzwungen werden kann. Moleküle, die unter Lichteinfluss ihre Farbe verändern, werden allgemein als photochromen Moleküle bezeichnet.

Aufgabenstellung

[0010] Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zum räumlich hochauflösenden Abbilden einer Struktur einer Probe mit den Merkmalen des Oberbegriffs des Patentanspruchs 1 aufzuzeigen, das mit vergleichsweise geringem apparativem Aufwand durchführbar ist.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0011] Die Aufgabe der Erfindung wird durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Patentanspruchs 1 gelöst.

[0012] Vorteilhafte Ausführungsformen des neuen Verfahrens sind in den Unteransprüchen beschrieben.

BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0013] Die Verwendung von Substanzen, die zwei Zustände mit unterschiedlichen optischen Eigenschaften aufweisen, ist ein zentraler Aspekt der Erfindung. Dabei kann mit einem Umschaltsignal die Substanz gezielt von dem ersten in den zweiten Zustand geschaltet werden. Dieser Vorgang ist umkehrbar. D.h., die Substanz kann auch wieder zurück in den ersten Zustand gebracht werden. Die optischen Eigenschaften der Substanz in dem ersten Zustand unterscheiden sich von denjenigen in dem zweiten Zustand dadurch, dass nur sie das Messsignal unterstützen. Es ist jedoch nicht zwingend, dass die relevanten optischen Eigenschaften „binär“ sind, d.h. in

dem einen Zustand zu 100 % und in dem anderen Zustand zu 0% vorliegen. Es ist vielmehr ausreichend, wenn bei den relevanten optischen Eigenschaften so große Unterschiede gegeben sind, dass sie eine zumindest überwiegende Zuordnung des Messsignals zu dem ersten Zustand erlauben.

[0014] Im Gegensatz zum Stand der Technik auf dem Gebiet der Fluoreszenzmikroskopie macht die Erfindung keinen Gebrauch von zwei einfachen Energiezuständen eines Moleküls zwischen denen das Molekül durch einfache energetische Anregung überführbar ist. Vielmehr unterscheiden sich die beiden Zustände mindestens hinsichtlich eines der folgenden Kriterien:

- Konformationszustand eines Moleküls,
- Strukturformel eines Moleküls,
- räumliche Anordnung von Atomen innerhalb eines Moleküls,
- räumliche Anordnung von Bindungen innerhalb eines Moleküls,
- Anlagerung weiterer Atome oder Moleküle an ein Molekül,
- Gruppierung von Atomen und/oder Molekülen,
- räumliche Orientierung eines Moleküls,
- Orientierung benachbarter Moleküle zueinander,
- von einer Vielzahl von Molekülen und/oder Atomen ausgebildete Ordnung.

[0015] Zum Überführen der entsprechenden Substanzen von ihrem ersten in ihren zweiten Zustand bewirkt das optische Umschaltsignal also beispielsweise eine Umlagerungen von Atomgruppen, eine Photoisomerisierung, insbesondere eine cis-trans Isomerisierung, eine Photozyklisierung, eine Protonierung oder De-Protonierungen, eine Spin-Umklappung, einen Elektronentransfer und/oder Energietransfer zwischen verbundenen Molekülen oder Moleküluntereinheiten.

[0016] Ein Vorteil der Erfindung gegenüber dem Stand der Technik auf dem Gebiet der Fluoreszenzmikroskopie besteht darin, dass die Zustände der in Frage kommenden Substanzen in der Regel eine um ein Vielfaches längere Lebensdauer als die an der Fluoreszenz beteiligten Energiezustände aufweisen. Die Lebensdauer des zweiten Zustands beträgt daher in der Regel mindestens 1 ns. Bevorzugt ist eine Lebensdauer von mindestens 10 ns. Besonders bevorzugt sind thermisch stabile Zustände. Zudem sind die Intensitäten, die zum Erreichen der Zustandsänderung mit dem Umschaltsignal erforderlich sind, relativ gering. Zahlreiche Umschaltprozesse, bei denen der Ausgangs- und/oder Endzustand relativ langlebig (> 10 ns) ist, können mit vergleichsweise niedrigen Intensitäten ausgelöst und in die Sättigung gebracht werden, weil es nur verhältnismäßig langsame oder manchmal sogar keine Prozesse gibt, die mit dem Umschaltprozess konkurrieren.

[0017] Die unterschiedlichen optischen Eigenschaften der beiden Zustände der Substanz können unterschiedliche spektrale Eigenschaften sein. Beispielsweise können die ersten optischen Eigenschaften gegenüber den zweiten optischen Eigenschaften unterschiedliche Absorptionen für ein optisches Testsignal aufweisen, wobei das Messsignal in Transmission oder auch in Reflektion beobachtet werden kann. Als unterschiedliche spektrale Eigenschaften bevorzugt sind unterschiedliche Lumineszenzen aus der Fluoreszenz, Phosphoreszenz, Elektrolumineszenz und Chemolumineszenz umfassenden Gruppe. Moleküle, die ihre spektralen Eigenschaften, insbesondere ihre Farbe verändern und die ebenfalls als Substanz zur Markierung der interessierenden Struktur im Rahmen der Erfindung geeignet sind, werden auch als photochrom bezeichnet.

[0018] Statt unterschiedlicher spektraler Eigenschaften können die beiden Zustände der Substanz auch unterschiedliche Polarisierungseigenschaften, beispielsweise in Bezug auf ein optisches Testsignal oder ein von der Probe selbst emittiertes Messsignal, aufweisen.

[0019] Um bei dem neuen Verfahren die Beugungsgrenze bei der Ortsauflösung zu unterschreiten, sind die Substanz und das Umschaltsignal so aufeinander abzustimmen, dass das Überführen von dem ersten Zustand mit dem Umschaltsignal in den zweiten Zustand nichtlinear von der Intensität des Umschaltsignals abhängt. Dies wird erreicht, wenn die Überführung der Substanz in den zweiten Zustand überall dort vollständig bzw. im Wesentlichen vollständig erfolgt, wo das Umschaltsignal einen Sättigungsgrenzwert überschreitet. Konkret muss die Intensität des Umschaltsignals in dem gesamten Registrierbereich außerhalb des gezielt ausgelassenen räumlichen Bereichs den Sättigungsgrenzwert überschreiten, und gleichzeitig muss der gezielt ausgelassene räumliche Bereich ein lokales Intensitätsminimum des Umschaltsignals sein. Ein solches lokales Intensitätsminimum mit Nullstelle der Intensität kann durch ein Interferenzmuster bereitgestellt werden. Grundsätzlich können hierzu aber auch Projektionen eingesetzt werden; man kann das Umschaltsignal weiterhin unter einem spitzen oder stumpfen Winkel von der Seite einstrahlen. Darüber hinaus sind Hologramme zur Erzeugung lokaler Intensitätsminima des Umschaltsignals möglich. Mit den Intensitätsminima einfacher Interferenzmustern sind aber besonders leicht kleinste räumliche Bereiche definierbar, die von dem Umschaltsignal ausgelassen werden.

[0020] Bevorzugt werden bei den neuen Verfahren Substanzen eingesetzt, die mit einem anderen Schaltsignal von dem zweiten in den ersten Zustand überführbar sind. Bei dem andern Schaltsignal kann es sich wie bei dem Umschaltsignal um ein optisches Signal handeln. Es kann beispielsweise aber auch

eine elektrisches oder thermisches Signal sein. Es ist weiterhin möglich, dass die Rückschaltung in den ersten Zustand spontan, d.h. bereits bei Umgebungstemperatur thermisch getrieben, erfolgt. So ist es bekannt, dass Moleküle die eine photoinduzierte cis-trans-Isomerisierung durchlaufen, rein thermisch in den ersten Zustand zurück kommen können. Mit dem anderen Schaltsignal kann die Substanz aber gezielt in den ersten Zustand zurück gebracht werden, was vorteilhaft sein kann, um das Verfahren insgesamt zu beschleunigen.

[0021] Das andere Schaltsignal wird bevorzugt vor dem Umschaltsignal bzw. nach dem Registrieren des Messsignals angewandt. Sofern das Umschalten mit dem Umschaltsignal durch das andere Schaltsignal nicht wesentlich beeinträchtigt wird, kann das andere Schaltsignal auch noch während des Aufbringens des Umschaltsignals auf die Probe aufgebracht werden. Es ist weiterhin nicht erforderlich, das andere Schaltsignal auf den interessierenden räumlichen Bereich einzugrenzen, was den Aufwand für das Aufbringen bei optischen Schaltsignalen reduziert und andere Arten von anderen Schaltsignalen überhaupt erst ermöglicht.

[0022] Wenn ein Testsignal auf die Probe gerichtet wird, um das zu registrierende Messsignal zu erzeugen, wird dies nach dem Umschaltsignal auf die Probe aufgebracht. Dabei kann auch das Testsignal über einen den gezielt ausgelassenen räumlichen Bereich einschließenden größeren Bereich auf die Probe aufgebracht werden. Die für die Erhöhung der Ortsauflösung des neuen Verfahrens erforderliche räumliche Eingrenzung wird von dem optischen Umschaltsignal geleistet.

[0023] Wenn es sich bei dem Messsignal um von der Probe emittiertes Licht handelt, kann ein entsprechendes Anregungssignal, das als Testsignal eingesetzt wird, auch gleichzeitig mit dem Umschaltsignal auf die Probe aufgebracht werden. Es sollte aber in jedem Fall später oder frühestens gleichzeitig mit dem anderen Schaltsignal auf die Probe aufgebracht werden, soweit das Anregungssignal und das andere Schaltsignal nicht sowieso identisch sind.

[0024] Um eine Probe vollständig abzubilden, ist es erforderlich, dass die Probe mit dem von dem Umschaltsignal gezielt ausgelassenen Bereich abgerastert, d.h. an allen Punkten abgetastet, wird. Dabei kann die Probe zu einem Zeitpunkt auch in mehreren voneinander beabstandeten Punkten, d.h. definierten Bereichen, gleichzeitig gemessen werden. Dabei werden mehrere optische Messsignale, die der Substanz in dem ersten Zustand zuzuordnen sind, für mehrere Registrierbereiche, die jeweils neben Bereichen, in denen die Substanz in den zweiten Zustand überführt ist, einen gezielt ausgelassenen Bereich umfassen, zwar gleichzeitig aber getrennt voneinander

der registriert. Die Rasterung kann jeweils durch eine räumliche Verschiebung der verwendeten Schaltsignale, insbesondere des Umschaltsignals, gegenüber den Koordinaten der Probe erfolgen. Da alle von dem Umschaltsignal gezielt ausgelassenen räumlichen Bereiche vorzugsweise Intensitätsminima eines Interferenzmusters sind, kann die Rasterung durch die Verschiebung einer oder mehrerer Interferenzminima des Umschaltsignals erfolgen. Dabei kann diese Verschiebung durch eine reine Phasenverschiebung der interferierenden Strahlen bewerkstelligt werden.

[0025] Beim Abrastern einer Probe nach dem neuen Verfahren ergibt sich eine zyklische Abfolge der Schritte: Überführen der Substanz in Bereichen der Probe mit dem Umschaltsignal in den zweiten Zustand, wobei ein definierter Bereich gezielt ausgelassen wird; Registrieren des optischen Messsignals, das der Substanz in dem ersten Zustand zuzuordnen ist, für einen den jeweils gezielt ausgelassenen Bereich umfassenden Registrierbereich; und Überführen der Substanz in den ersten Zustand. Dabei reicht es, wie bereits angedeutet wurde, aus, wenn nur das Umschaltsignal mit seinem Intensitätsminimum genau auf den jeweils interessierenden definierten Bereich der Probe ausgerichtet wird.

[0026] Vorzugsweise wird die Substanz mit den unterschiedlichen optischen Eigenschaften aus der Gruppe der Proteine ausgewählt. Hierzu gehören insbesondere die bekannten Proteine asCP (asF595) und T70a/A148S/S165V, welche über zwei Konformationszustände mit geeigneten spektralen Eigenschaften verfügen, oder auch das Green-Fluorescent-Protein (GFP) und davon abgeleitete Mutanten.

[0027] Proteine als markierende Substanzen können auch auf gentechnischem Wege in eine biologische Probe eingebracht werden, so dass keine nachträgliche Markierung der Struktur der Probe mit der Substanz erforderlich ist, die die Probe negativ beeinträchtigen oder zumindest durch den Schritt des Markierens verändern kann. Wenn ein gentechnisches Markieren der interessierenden Strukturen der Probe nicht möglich ist, kann die Struktur der Probe in an sich bekannter Weise mit der Substanz markiert werden. Beispielsweise können dabei Hilfssubstanzen verwendet werden, die an die interessierende Struktur selektiv anbinden und an die wiederum die Substanz angebunden ist oder wird. Aus dem Bereich des Einfärbens von Proben für die Fluoreszenzmikroskopie sind dem Fachmann hier viele Vorgehensweisen bekannt. Die Probe kann auch von Natur aus über Moleküle mit geeigneten optischen Zuständen, die die Anforderungen an die Substanz für das neue Verfahren erfüllen.

[0028] Das neue Abbildungsverfahren kann nach dem Markieren der Strukturen mit der fluoreszierenden Substanz auf einem üblichen Fluoreszenzmikro-

skop durchgeführt werden, wobei der zusätzliche Aufwand für die Auflösungsverbesserung unter die Beugungsgrenze vergleichsweise gering ist und sich auf zusätzliche Mittel zum Bereitstellen des optischen Umschaltsignals beschränken kann. Diese Mittel könne beispielsweise einen einfachen Laser oder auch eine konventionelle Lampe umfassen. In einer bevorzugten Ausführung, bei der zur Beschleunigung des Verfahrens in mehreren Bereichen gleichzeitig gemessen wird, werden die Messsignale aus den einzelnen Bereichen gleichzeitig mit einer (CCD-) Kamera ausgelesen. Das Gesamtbild der Probe ergibt sich dann aus der Zusammenfügung mehrerer Bilder mit unterschiedlichen Positionen der vermessenen Bereiche in der Probe.

Ausführungsbeispiel

KURZBESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0029] Im Folgenden wird die Erfindung anhand von in den Figuren dargestellten Details weiter erläutert und beschrieben.

[0030] Fig. 1 zeigt symbolisch zwei Konformationszustände eines Moleküls oder Molekülkomplexes, und

[0031] Fig. 2 zeigt schematisch eine Anordnung zur Durchführung des neuen Verfahrens.

FIGURENBESCHREIBUNG

[0032] Fig. 1 zeigt symbolisch ein Molekül oder einen Molekülkomplex, das bzw. der sich in zwei verschiedenen Zuständen **1** und **2** befinden kann. Der erste Zustand **1** ist dabei fluoreszenztauglich, der zweite Zustand **2** dagegen nicht. Durch Beleuchtung mit einem Umschaltsignal **3** mit einer bestimmten Wellenlänge kann ein gezielter Wechsel von dem ersten Zustand **1** in den zweiten Zustand **2** induziert werden. Aus dem zweiten Zustand **2** kann das Molekül beispielsweise spontan in den ersten Zustand **1** zurückkehren. Bevorzugt ist es aber, wenn beide Zustände **1** und **2** thermisch stabil sind und zum Zurückschalten in den ersten Zustand **1** ein weiteres optisches Schaltsignal verwendet wird.

[0033] Fig. 2 zeigt schematisch eine mögliche Anordnung zur Durchführung der Erfindung mit zwei Strahlteilern **11** und **12** sowie einem Objektiv **13**. Eine Probe **7** wird hier einerseits durch ein Anregungssignal, das als Testsignal **4** verwendet wird, von einer Fluoreszenzanregung **6** zur Fluoreszenz angeregt, andererseits aber durch das Umschaltsignal **3** von einem Fluoreszenzverhinderungsmittel **8** an definierbaren Orten an der Fluoreszenz gehindert, indem Moleküle reversibel ortsabhängig in den nicht fluoreszenzfähigen zweiten Zustand versetzt werden. Im gezeigten Beispiel geschieht dies durch gekreuzte in-

terferenzfähige Strahlen **14**. Fluoreszenz kann in diesem Fall nur noch in schmalen räumlichen Bereichen **9** erzeugt werden, die bei geeigneten Bedingungen, wie der Sättigung des Umschaltens, schmaler sind als die Beugungsgrenze. Durch rasterndes Verschieben des Interferenzmusters **15** und das sequentielle Erfassen und Auslesen der Fluoreszenz als Messsignal **5** mit einer Kamera **10** kann die ganze Probe **7** mit Hochoauflösung erfasst werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zum räumlich hochauflösenden Abbilden einer mit einer Substanz markierten Struktur einer Probe, mit den Schritten:

- Auswählen der Substanz aus einer Gruppe von Substanzen, die mit einem optischen Umschaltsignal wiederholt aus einem ersten Zustand mit ersten optischen Eigenschaften in einen zweiten Zustand mit zweiten optischen Eigenschaften überführbar sind und die aus dem zweiten Zustand in den ersten Zustand zurückkehren können,
- Überführen der Substanz in Bereichen der Probe mit dem Umschaltsignal in den zweiten Zustand, wobei ein definierter Bereich gezielt ausgelassen wird, und
- Registrieren eines optischen Messsignals, das der Substanz in dem ersten Zustand zuzuordnen ist, für einen Registrierbereich, der neben Bereichen, in denen die Substanz in den zweiten Zustand überführt ist, den gezielt ausgelassenen Bereich umfasst, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Substanz aus einer Untergruppe von Substanzen ausgewählt wird, bei denen sich die beiden Zustände **(1, 2)** mindestens hinsichtlich eines der folgenden Kriterien unterscheiden:
 - Konformationszustand eines Moleküls,
 - Strukturformel eines Moleküls,
 - räumliche Anordnung von Atomen innerhalb eines Moleküls,
 - räumliche Anordnung von Bindungen innerhalb eines Moleküls,
 - Anlagerung weiterer Atome oder Moleküle an ein Molekül,
 - Gruppierung von Atomen und/oder Molekülen,
 - räumliche Orientierung eines Moleküls,
 - Orientierung benachbarter Moleküle zueinander,
 - von einer Vielzahl von Molekülen und/oder Atomen ausgebildete Ordnung.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Lebensdauer des zweiten Zustands **(2)** länger als 1 ns ist.

3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass die unterschiedlichen optischen Eigenschaften der beiden Zustände **(1, 2)** der Substanz unterschiedliche spektrale Eigenschaften sind.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die ersten optischen Eigenschaften gegenüber den zweiten optischen Eigenschaften unterschiedliche Absorptionen für ein Testsignal aufweisen.

5. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die ersten optischen Eigenschaften gegenüber den zweiten optischen Eigenschaften unterschiedliche Lumineszenzen aus der Fluoreszenz, Phosphoreszenz, Elektrolumineszenz und Chemolumineszenz umfassenden Gruppe aufweisen.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass die unterschiedlichen optischen Eigenschaften der Zustände der Substanz unterschiedliche Polarisations-eigenschaften sind.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanz und das Umschaltsignal **(3)** so aufeinander abgestimmt werden, dass sich überall dort, wo die Intensität des Umschaltsignals **(3)** einen Sättigungsgrenzwert überschreitet, vollständig der zweite Zustand **(2)** der Substanz einstellt.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität des Umschaltsignals **(3)** in dem gesamten Registrierbereich außerhalb des gezielt ausgelassenen Bereichs **(9)** den Sättigungsgrenzwert überschreitet und dass der gezielt ausgelassene räumliche Bereich **(9)** ein lokales Intensitätsminimum des Umschaltsignals **(3)** ist.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass das lokale Intensitätsminimum des Umschaltsignals **(3)** eine Intensitätsminimum mit Nullstelle eines Interferenzmusters **(15)** ist.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanz aus der Gruppe von Substanzen ausgewählt wird, die mit einem anderen Schaltsignal von dem zweiten Zustand **(2)** in den ersten Zustand **(1)** überführbar sind.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass das andere Schaltsignal vor oder gleichzeitig mit dem Umschaltsignal **(3)** auf die Probe **(7)** aufgebracht wird.

12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, dass das andere Schaltsignal über einen den Registrierbereich einschließendes größeren Bereich auf die Probe **(7)** aufgebracht wird.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass nach dem Umschaltsignal **(3)** ein Testsignal auf die Probe **(7)** aufgebracht wird.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass das Testsignal über einen den gezielt ausgelassenen Bereich (9) einschließendes größeren Bereich auf die Probe (7) aufgebracht wird.

15. Verfahren nach Anspruch 5 und Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Lumineszenz durch das andere Schaltsignal angeregt wird, wobei das andere Schaltsignal während des Aufbringens des Umschaltsignals (3) auf die Probe (7) aufgebracht wird.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe (7) mit dem gezielt ausgelassenen Bereich (9) abgerastert wird.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass gleichzeitig mehrere optische Messsignale, die der Substanz in dem ersten Zustand (1) zuzuordnen sind, für mehrere Registrierbereiche, die jeweils neben Bereichen, in denen die Substanz in den zweiten Zustand überführt ist, einen gezielt ausgelassenen Bereich (9) umfassen, getrennt voneinander registriert werden.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass in zyklischer Abfolge die Schritte

- Überführen der Substanz in Bereichen der Probe (7) mit dem Umschaltsignal (3) in den zweiten Zustand (2), wobei ein definierter Bereich (9) gezielt ausgelassen wird,
- Registrieren des optischen Messsignals (5), das der Substanz in dem ersten Zustand zuzuordnen ist, für einen den jeweils gezielt ausgelassenen definierten Bereich (9) umfassenden Registrierbereich,
- Überführen der Substanz in den ersten Zustand, für verschiedene definierte Bereiche der Probe (7) nacheinander ausgeführt werden.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanz aus der Untergruppe von Substanzen ausgewählt wird, die Proteine umfassen.

20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanz aus der Untergruppe von Substanzen ausgewählt wird, die fluoreszierende Proteine umfassen.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass zum Markieren deren Strukturen die Substanz auf gentechnischem Wege in eine biologische Probe (7) eingebracht wird.

22. Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops bei der Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 20.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

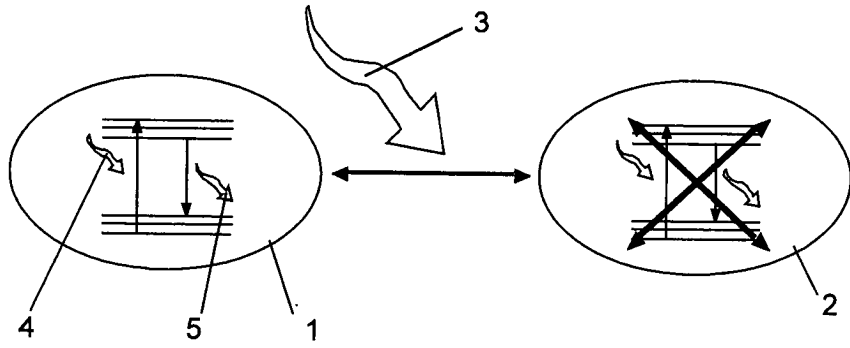


Fig.1

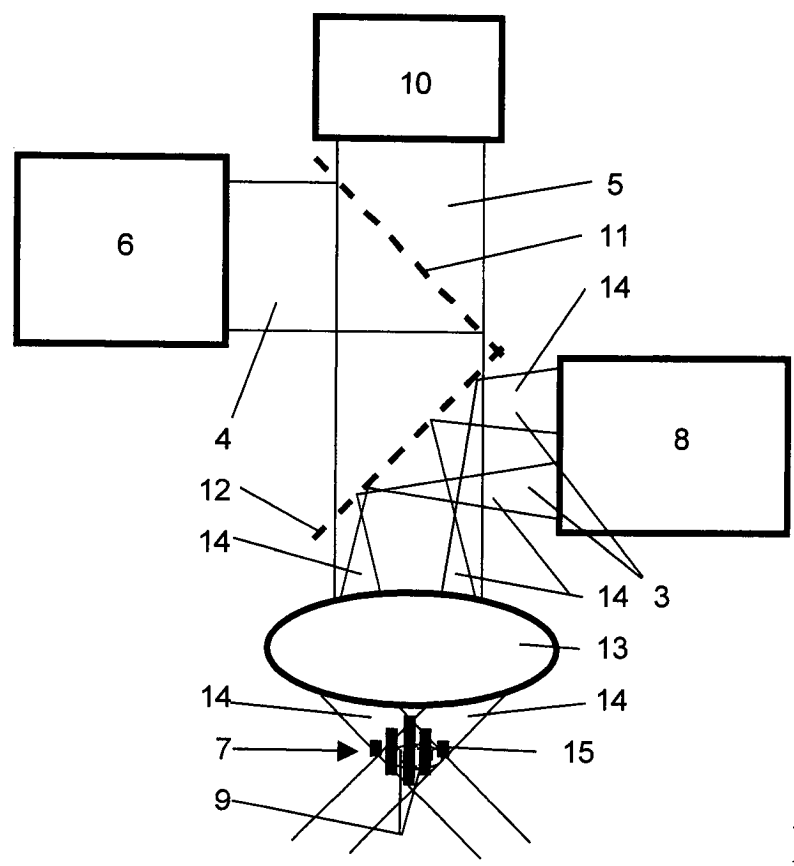


Fig. 2