

Absolute optische Wirkungsquerschnitte fluoreszierender Einzmoleküle**

Lars Kastrup und Stefan W. Hell*

Optische Spektroskopie an Einzmolekülen ermöglicht die Beobachtung von Quantenereignissen wie der Absorption und Emission einzelner Photonen^[3–6] sowie weiterer Moleküleigenschaften, die sich von Molekül zu Molekül unterscheiden und deshalb in einem Molekülenensemble nicht beobachtet werden können.^[1,2] Optische Übergänge, die durch ein einzelnes Photon verursacht werden, also optisch lineare Übergänge, werden durch einen Wirkungsquerschnitt quantifiziert, der der Photonen-Einfangfläche des Moleküls entspricht. Im Ensemble können diese Wirkungsquerschnitte absolut bestimmt werden, indem man die Abnahme (durch Absorption) oder Zunahme (durch stimuliertes Emission) der Intensität eines Lichtstrahls quantifiziert.^[7] Leider versagt diese Methode bei der Bestimmung an Einzmolekülen, weil die entsprechenden Intensitätsänderungen vernachlässigbar klein sind. Bei Kenntnis der Fluoreszenzquantenausbeute Q_{em} lässt sich der Wirkungsquerschnitt zwar aus der insgesamt vom Molekül emittierten Fluoreszenz berechnen, allerdings wird dadurch die Mittelung über das Ensemble wieder eingeführt,^[8] weil Q_{em} normalerweise nur aus Ensemble-Messungen bekannt ist. Aus diesem Grunde konnte der absolute Wirkungsquerschnitt eines Einzmoleküls bislang nicht bestimmt werden.

Wir berichten hier über die Messung absoluter Wirkungsquerschnitte der stimulierten Emission bei Raumtemperatur, für die keine Vorabinformationen erforderlich sind. Außerdem zeigen wir, dass sich der angeregte Zustand eines einzelnen Moleküls mit Licht manipulieren lässt, was (in Ergänzung zu bisher veröffentlichten Tief temperatur-Versuchen)^[9] die Möglichkeit von Einzmolekül-Pump-Probe-Experimenten bei Raumtemperatur aufzeigt.

Optische Absorption erfolgt in der Regel aus dem relaxierten Grundzustand S_0 in ein schwingungsangeregtes Franck-Condon-Niveau S_1^* des ersten angeregten Singulettzustandes (Abbildung 1a). Innerhalb einer Pikosekunde nach der Anregung erfolgt eine Relaxation der angeregten Schwingungen, und mit einer durch die Fluoreszenzquantenausbeute gegebenen Wahrscheinlichkeit erfolgt innerhalb der nachfolgenden Nanosekunden die spontane Emission eines Photons.

[*] L. Kastrup, Prof. S. W. Hell
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie
Abteilung NanoBiophotonik
37077 Göttingen (Deutschland)
Fax: (+49) 551-201-1085
E-mail: shell@gwdg.de

[**] Wir danken Karl-Heinz Drexhage und Jutta Arden-Jacob (Universität Siegen, Deutschland) für die Bereitstellung des Farbstoffes JA 26 und der Volkswagen-Stiftung für die Finanzierung dieses Projektes.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

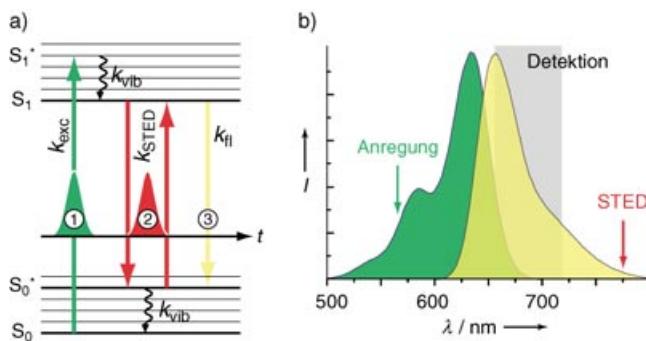
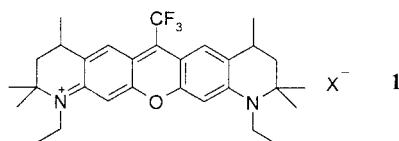


Abbildung 1. a) Jablonski-Diagramm der elektronischen Übergänge eines organischen Fluorophors: 1) Anregung durch einen kurzweligen Puls, 2) stimuliertes Emission und Wiederanregung durch den STED-Puls und 3) Fluoreszenz. Die Zeitachse deutet die Abfolge der Pulse an. b) Anregungs- und Fluoresenzspektrum von JA 26. Die Anregungs- und STED-Wellenlängen sowie der Detektionsbereich sind ebenfalls gekennzeichnet.

Dieser $S_1 \rightarrow S_0$ -Übergang kann alternativ auch durch eingestrahltes Licht ausgelöst werden, also durch stimuliertes Emission.^[10] In Lösungen organischer Fluorophore ist stimuliertes Emission bereits zur zeitaufgelösten Vermessung der Besetzung des angeregten Zustandes, zur Veränderung der Fluoreszenzlebensdauer und -anisotropie organischer Fluorophore^[11,12] und jüngst auch zur Bestimmung von Wirkungsquerschnitten verwendet worden.^[17] Darüber hinaus wurde mithilfe der Entvölkerung des angeregten Zustandes durch stimuliertes Emission (stimulated emission depletion, STED) in der Fluoreszenzmikroskopie^[13,14] die Abbesche Beugungsgrenze überwunden.^[15,16]

Für unsere Experimente verwendeten wir ein konfokales, einzelmolekülempfindliches Scannmikroskop. Es wurden zwei gepulste Laserstrahlen eingekoppelt, die auf das Spektrum (Abbildung 1b) des verwendeten Xanthen-Farbstoffes JA 26 (**1**) abgestimmt waren: Mit dem ersten Puls bei einer Wel-



lenlänge von $\lambda = 565$ nm wurde das Molekül angeregt, während mit dem nachfolgenden, rotverschobenen Puls bei $\lambda = 778$ nm die stimuliertes Emission ausgelöst wurde. Wie für eine effiziente Abregung erforderlich, wurden STED-Puls-längen von etwa 15 ps verwendet,^[13,15] was einerseits kürzer als die Lebensdauer des S_1 -Zustandes (einige Nanosekunden), aber andererseits sehr viel länger als die Dauer der S_0^* -Schwingungsrelaxation (<1 ps) ist. Daher wird das $S_1-S_0^*$ -System effizient entvölkert.

Abbildung 2 demonstriert, wie fluoreszierende Moleküle, die in einen Polyvinylalkohol-Film eingebettet sind, mithilfe von STED gezielt ein- und ausgeschaltet werden können. Das Bild wurde bei konstanter Anregungsintensität aufgenommen, während der STED-Strahl periodisch mit einer Frequenz von 250 Hz unterbrochen wurde. Die „ein“- und „aus“-

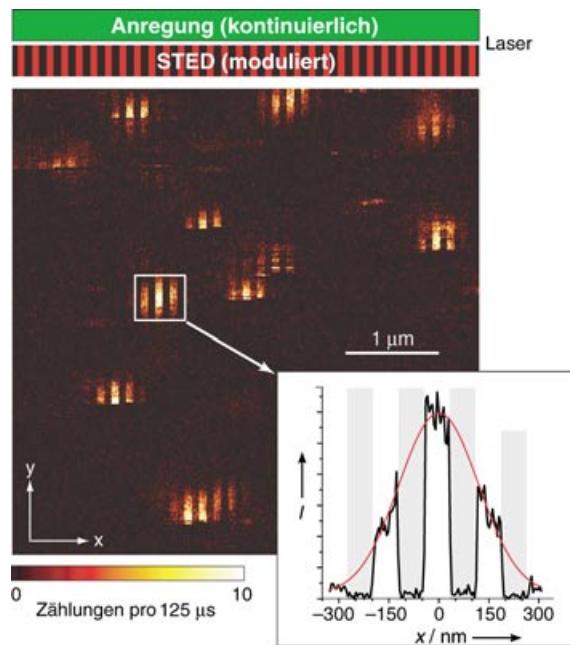


Abbildung 2. Stimulierte Emission an einzelnen JA-26-Molekülen. Ein $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ großer Ausschnitt in der Fokalebene (xy) wurde bei kontinuierlicher Anregung zeilenweise gerastert, während der STED-Strahl, wie durch den rotschwarzen Balken oberhalb des Bildes angedeutet, periodisch unterbrochen wurde. Die Wirkung der stimulierten Emission äußert sich in Form vertikaler Streifen, welche die beugungsbegrenzten Lichtflecke der emittierenden Moleküle unterbrechen. Während der STED-Strahl offen ist, wird die Fluoreszenz unterdrückt, und umgekehrt kehrt die Fluoreszenz sofort (d.h. innerhalb der Pixel-Integrationszeit von 125 μs) zurück, sobald der STED-Strahl unterbrochen ist. Dies verdeutlicht auch die Kurve im Einschub, der die vertikal (y) aufsummierte Fluoreszenzintensität I eines ausgewählten Moleküls zeigt. Die Eihüllende der Fluoreszenzkurve spiegelt die räumliche Ausdehnung des Anregungsfokus entlang der x-Achse wider.

Zeiten von 4 ms waren etwa dreimal kürzer als die Verweildauer eines Moleküls beim Rastern durch den Laser-Fokus in x-Richtung. Daher erscheinen die Moleküle als helle (beugungsbegrenzte) Flecken, die von dunklen, vertikalen (y) Streifen unterbrochen sind, die durch Fluoreszenzlösung durch stimuliertes Emission zustande kommen. Es sei angehakt, dass die Fluoreszenz bei Unterbrechung des STED-Strahls sofort zurückkehrt. Außer dem STED-Effekt zeigt das Bild auch das für Einzelmoleküle charakteristische Blinken und ein abruptes Photobleichen.^[18] Obwohl die Fluoreszenzlösung sehr viel höhere Laserleistungen erfordert als die Anregung (es werden Pulsspitzenintensitäten von 1–2 GW cm^{-2} erreicht), tritt in Gegenwart des STED-Strahls nur leicht verstärktes Photobleichen auf. Generell hängt das Photobleichen von einer höheren Ordnung der eingestrahlten Lichtintensität ab,^[19] weswegen die Bleichrate mit zunehmender Spitzenintensität stark ansteigt. Die Bleichrate nimmt aber nur unwesentlich zu, sofern die durchschnittliche optische Leistung vor allem durch Verlängern der Pulse erhöht wird.

Wenn STED über die konkurrierenden Fluoreszenzaktivierungswege dominiert, ist die normierte Wahrscheinlichkeit, dass ein Molekül nach einem Anregungs-/STED-

Pulspaar fluoresziert, nur durch die Zahl der Photonen pro Flächeneinheit sowie den $S_1 \rightarrow S_0^*$ -Wirkungsquerschnitt σ_{xy} bestimmt. Daher liefert die Messung der Fluoreszenzwahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der STED-Laserleistung den $S_1 \rightarrow S_0^*$ -Wirkungsquerschnitt in absoluten Zahlen. Die Auswertung der Messung basiert auf einem photokinetischen Dreiniveau-Modell (Abbildung 1a, fett dargestellte Niveaus), das die Prozesse nach der Anregung beschreibt. Beginnend zum Zeitpunkt $t=0$ wirkt der STED-Puls mit einer konstanten Intensität von I_{STED} für eine Dauer τ von ca. 15 ps. Außer der spontanen und der stimulierten Emission aus dem S_1 -Zustand berücksichtigt das Modell auch die Wiederanregung aus dem S_0^* -Niveau sowie dessen Schwingungsrelaxation. Auch eine Anregung in höhere S_n -Zustände durch den STED-Puls ist denkbar, allerdings findet die Rückkehr in den S_1 -Zustand auf einer sehr viel schnelleren Zeitskala als τ statt (Kashas-Regel), sodass kein nennenswerter Einfluss auf die STED-Kinetik zu erwarten ist. Daher wird unser Modell durch zwei gekoppelte Differentialgleichungen beschrieben, die unter der Annahme zeitlich rechteckiger Pulse analytisch gelöst werden können (siehe Hintergrundinformationen).

Weitere Vereinfachungen des Modells sind möglich, wenn man berücksichtigt, dass die Geschwindigkeitskonstante k_{fl} des Fluoreszenzprozesses erheblich kleiner als die STED-Geschwindigkeitskonstante $k_{\text{STED}}(t) = \sigma_{\text{STED}} I_{\text{STED}}(t)$ ist, die wiederum kleiner als die Geschwindigkeitskonstante der Schwingungsrelaxation k_{vib} ($> 10^{12} \text{s}^{-1}$) ist. Das heißt: $k_{\text{fl}} \ll k_{\text{STED}} \ll k_{\text{vib}}$. Unter diesen Annahmen ist das Niveau S_0^* praktisch unbesetzt. Außerdem hängt die Wahrscheinlichkeit $P_1(t)$, ein Molekül nach Wirken des STED-Pulses noch im S_1 -Niveau anzutreffen, nur von der Zahl der Photonen pro Puls ab, nicht aber von der zeitlichen Verteilung der Photonen. Die zeitliche Form des STED-Pulses ist daher belanglos. Unter diesen Bedingungen folgt die Fluoreszenz einer mit der Laserintensität exponentiell abklingenden Kurve [Gl. (1)].

$$F(I_{\text{STED}}; \tau) = \Delta t Q_{\text{em}} Q_{\text{det}} P_1(0) \exp(-\sigma_{xy} I_{\text{STED}} \tau) \quad (1)$$

Hier bezeichnet Δt die Integrationszeit, Q_{em} ist die Fluoreszenzquantenausbeute und Q_{det} ist die Detektionseffizienz des Instruments. Zur Bestimmung des absoluten Wirkungsquerschnitts müssen Q_{em} und Q_{det} nicht notwendigerweise bekannt sein, denn σ_{xy} kann aus einem einfachen Verhältnis gemäß Gleichung (2) ermittelt werden. Für eine höhere Genauigkeit

$$\sigma_{xy} = \frac{1}{I_{\text{STED}} \tau} \ln \left[\frac{F(0; \tau)}{F(I_{\text{STED}}; \tau)} \right] \quad (2)$$

haben wir die vollständige analytische Lösung der Geschwindigkeitsgleichungen (siehe Hintergrundinformationen) an die gemessenen Kurven angepasst.

Für jede Messung wurde ein Einzelmolekül in die überlappenden Foki der beiden Laserstrahlen positioniert. Während das Molekül wiederholt in einer Richtung gerastert wurde, wurde die mittlere optische Leistung des STED-Strahls linear von null auf $\bar{P}_{\text{STED}} = 3-10 \text{ mW}$ erhöht (Abbildungen 3a und b). Nach dem Durchfahren der Rampe wurde der STED-Strahl wieder unterbrochen, um die Rückkehr der Fluoreszenzintensität auf das Anfangsniveau sicherzustellen.

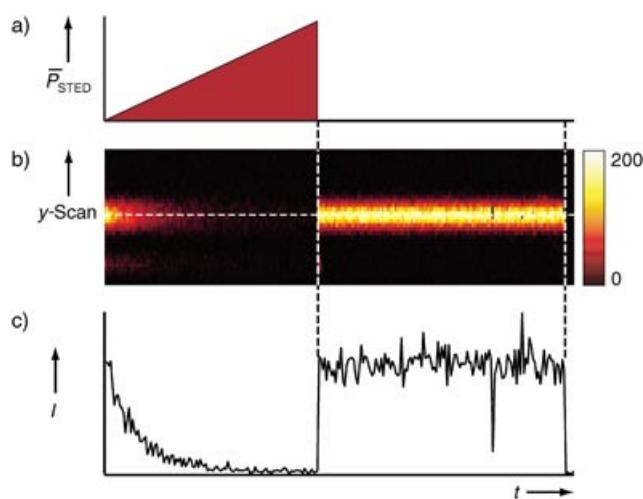


Abbildung 3. Sättigung der Fluoreszenzlöschung durch gestimulierte Emission an einem Einzelmolekül. a) Lineare Rampe der gemittelten STED-Leistung \bar{P}_{STED} . b) Fluoreszenz eines Einzelmoleküls, das bei gleichzeitiger Erhöhung der STED-Laserleistung wiederholt in y-Richtung gerastert wurde. Die Rückkehr der Fluoreszenzintensität I auf ihren Anfangswert bei Unterbrechung des STED-Strahls zeigt, dass zwischenzeitlich kein irreversibles Photobleichen eingetreten ist. c) Das Fluoreszenzprofil entlang der in (b) eingezeichneten gestrichelten Linie zeigt den exponentiellen Abfall der Fluoreszenzintensität I , die Rückkehr auf die anfängliche Intensität nach Unterbrechung des STED-Lasers und das abrupte Photobleichen des Moleküls.

Abbildung 3c zeigt die Fluoreszenz entlang der gestrichelten Linie in Abbildung 3b, die im wesentlichen einer abklingenden Exponentialfunktion folgt. Insgesamt wurden 65 Kurven dieser Art aufgenommen, von denen drei repräsentative Beispiele in Abbildung 4a–c gezeigt sind. Durch Anpassen der Modellfunktion (1) findet man Wirkungsquerschnitte σ_{xy} von 0.44×10^{-16} , 0.23×10^{-16} bzw. $0.99 \times 10^{-16} \text{ cm}^2$. Die Anwendung der exakten Lösung der Geschwindigkeitsgleichungen liefert dagegen 0.53×10^{-16} , 0.26×10^{-16} und $1.20 \times 10^{-16} \text{ cm}^2$. Durch Variation der Parameter, die in unser Modell eingehen, können wir den Fehler unserer Messungen auf ca. 10% schätzen; die Genauigkeit ist also mindestens so hoch wie bei bisherigen Messungen in Lösung, zum Teil sogar höher.

Für ein Molekül, das einen Winkel θ mit der Brennebene einschließt, ist wegen der Photoselektion nur der Anteil $\sigma_{xy} = \sigma \cos^2 \theta$ des Betrages σ des Wirkungsquerschnittes wirksam. Abbildung 4d zeigt die Verteilung dieser Werte aus unseren Messungen. Vermutlich führt die Herstellung der Einzelmolekülpräparate durch Schleuderbeschichtung eine Vorzugsrichtung bezüglich der Molekülorientierung ein, sodass keine Analyse des Histogramms auf Grundlage einer gleichförmig verteilten Orientierung möglich ist. Auf jeden Fall entspricht aber der größte gefundene Wert von $\sigma = 1.7 \times 10^{-16} \text{ cm}^2$ der unteren Grenze für den maximal möglichen Wirkungsquerschnitt dieser Verbindung. Zuletzt sei noch angemerkt, dass die Orientierungsverteilung auch zur Bestimmung des Betrages von σ aus Ensemblemessungen erforderlich ist (meist ist allerdings die Annahme einer Gleichverteilung in Lösung gerechtfertigt).

Zur Ermittlung der Wirkungsquerschnitte für andere Wellenlängen als 778 nm sind die Messwerte lediglich mit

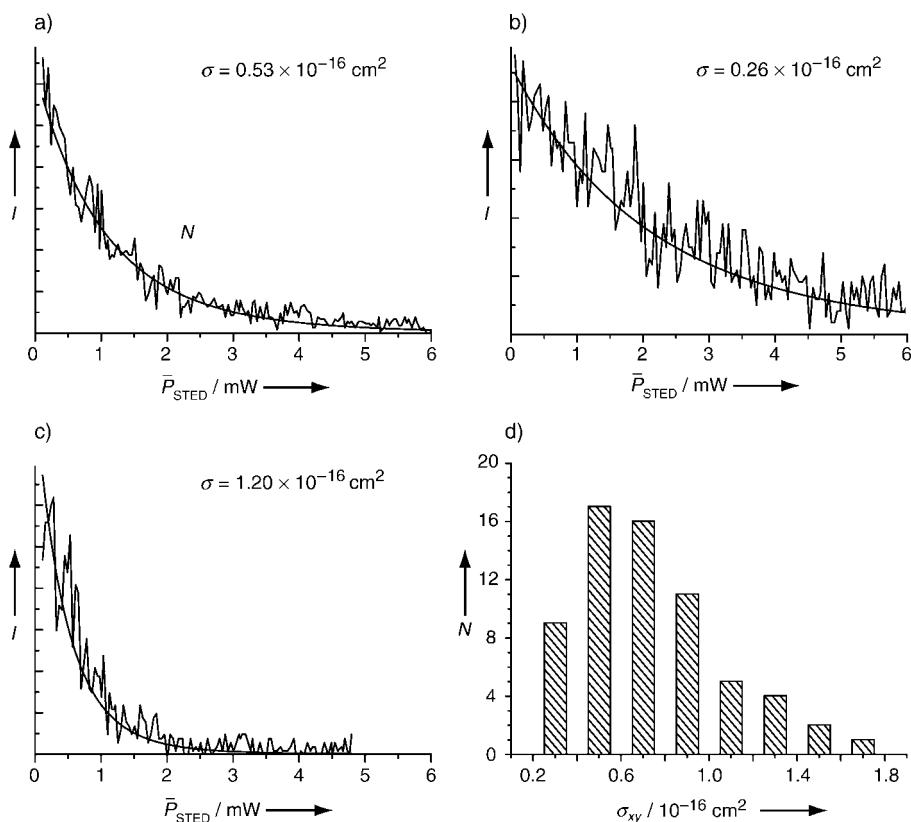


Abbildung 4. a–c) Typische Beispiele der Fluoreszenzintensität I als Funktion der gemittelten STED-Laserleistung \bar{P}_{STED} , die das exponentielle Abklingverhalten zeigen. Die an die experimentellen Daten angepassten Ausgleichskurven entsprechen den jeweils angegebenen Wirkungsquerschnitten. d) Histogramm der Wirkungsquerschnitte σ_{xy} von 65 der in eine PVA-Matrix eingebetteten JA-26-Moleküle. Die größten gefundenen Werte stammen von Molekülen, deren Übergangsdipolmoment in der Fokalebene liegt. N: Häufigkeit des Auftretens.

dem Emissionsspektrum (Abbildung 1b) zu gewichten, das im Idealfall ebenso auf Einzelmolekülbasis gemessen werden sollte. Bei spiegelbildlichen Absorptions- und Fluoresenzspektren ermöglichen die gemessenen σ_{xy} -Werte auch die Abschätzung der Absorptionsquerschnitte.^[20] Dieser Ansatz ist interessant, da die vorgestellte Methode nicht direkt auf den Absorptionsmodus übertragen werden kann. Sofern Q_{em} und Q_{det} nicht bekannt sind, müssen die Absorptionsquerschnitte aus dem Sättigungsverhalten der Anregung ermittelt werden (siehe Hintergrundinformationen), was durch zunehmendes Photobleichen erschwert wird.^[21]

Lichtinduzierte Fluoreszenzlösung (und die sofortige Rückkehr zum Ausgangszustand) bei Einzelmolekülen ist also möglich und wurde hier demonstriert. Die wiederholte und gezielte Beeinflussung des elektronischen Zustandes eines Moleküls eröffnet die Möglichkeit neuer Pump-Probe-Experimente. Die Messung absoluter Einzelmolekül-Wirkungsquerschnitte für stimuliertes Emission ist nur ein erstes Beispiel dafür.

Kürzlich wurden neue Methoden zur Bestimmung der dreidimensionalen räumlichen Orientierung des Übergangsdipolmoments einzelner Moleküle vorgeschlagen. Die synergistische Kombination mit unserer Methode könnte die Bestimmung der Lebensdauer des reinen Strahlungsüber-

gangs einzelner Moleküle ermöglichen. Zusammen mit Messungen der S_1 -Lebensdauer durch zeitkorreliertes Photonenzählen wären auch die Geschwindigkeitskonstanten der strahlungsfreien Deaktivierung zugänglich, was erheblich zur vollständigen spektroskopischen Charakterisierung einzelner Moleküle bei Raumtemperatur beitragen könnte.

Experimentelles

Der JA-26-Farbstoff wurde bei $\lambda = 565 \text{ nm}$ mithilfe eines frequenzverdoppelten optisch-parametrischen Oszillators (APE) angeregt, der von einem modengekoppelten Femtosekunden-Titan-Saphir-Laser (Coherent) mit einer Wiederholrate von ca. 76 MHz gepumpt wurde. Die Fundamentalmode dieses Lasers wurde weiterhin für die stimulierte Emission bei einer Wellenlänge von $\lambda = 778 \text{ nm}$ verwendet. Die Laserleistung wurde mit zwei Flüssigkristall-Reglern (Cambridge Research & Instrumentation) eingestellt und stabilisiert. Die Pulse beider Laserquellen wurden mithilfe optischer Gitter auf 12 ps (Anregung) bzw. 15 ps (STED) Dauer gestreckt und so synchronisiert, dass maximale STED-Effizienz erzielt wurde. Beide Laserstrahlen wurden mit $\lambda/4$ -Verzögerungssplatten zirkular polarisiert und mit zwei speziell angefertigten dichroitischen Strahlenteilern (628dcpxr, 720drspxr,

Chroma Technology) in ein objektrasterndes, konfokales Mikroskop eingefädelt. Die Fluoreszenz wurde mit einem Bandpass-Filter (D680/60, Chroma Technology) vom Laserrestlicht getrennt und mit einem Photonenzähler (SPCM-AQR-13-FC, PerkinElmer) detektiert. Die Präparate wurden durch Schleuderbeschichtung angesäuerte wässrige Lösungen von JA 26 (ca. 1 nm) auf Mikroskop-Deckgläsern hergestellt, denen zusätzlich 0.1% Polyvinylalkohol zugesetzt wurde. Während der Messungen wurde das Präparat mit Argon gespült.

Eingegangen am 16. Juli 2004

Online veröffentlicht am 18. November 2004

Stichwörter: Einzelmolekül-Untersuchungen ·

Fluoreszenzspektroskopie · Photophysik · Stimulierte Emission

- [1] R. M. Dickson, A. B. Cubitt, R. Y. Tsien, W. E. Moerner, *Nature* **1997**, 388, 355.
- [2] M. Orrit, *J. Chem. Phys.* **2002**, 117, 10938.
- [3] W. E. Moerner, L. Kador, *Phys. Rev. Lett.* **1989**, 62, 2535.
- [4] M. Orrit, J. Bernard, *Phys. Rev. Lett.* **1990**, 65, 2716.
- [5] E. B. Shera, N. K. Seitzinger, L. M. Davis, R. A. Keller, S. A. Soper, *Chem. Phys. Lett.* **1990**, 174, 553.

- [6] T. Basché, W. E. Moerner, M. Orrit, U. P. Wild, *Single-Molecule Optical Detection, Imaging and Spectroscopy*, VCH, Weinheim, 1997.
- [7] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum, New York, 1983.
- [8] M. F. Garcia-Parajo, G. M. J. Segers-Nolten, J.-A. Veerman, J. Greve, N. F. van Hulst, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 7237.
- [9] P. Tamarat, F. Jelezko, C. Brunel, A. Maali, B. Lounis, M. Orrit, *Chem. Phys.* **1999**, 245, 121.
- [10] A. Einstein, *Phys. Z.* **1917**, 18, 121.
- [11] J. R. Lakowicz, I. Gryczynski, V. Bogdanov, J. Kusba, *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 334.
- [12] C. Y. Dong, P. T. C. So, T. French, E. Gratton, *Biophys. J.* **1995**, 69, 2234.
- [13] S. W. Hell, J. Wichmann, *Opt. Lett.* **1994**, 19, 780.
- [14] S. W. Hell, M. Schrader, K. Bahlmann, F. Meinecke, J. R. Lakowicz, I. Gryczynski, *J. Microsc.* **1995**, 180, RP1.
- [15] T. A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A. Egner, S. W. Hell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 8206.
- [16] V. Westphal, L. Kastrup, S. W. Hell, *Appl. Phys. B* **2003**, 77, 377.
- [17] R. J. Marsh, D. A. Armoogum, A. J. Bain, *Chem. Phys. Lett.* **2002**, 366, 398.
- [18] E. Betzig, R. J. Chichester, *Science* **1993**, 262, 1422.
- [19] M. Dyba, S. W. Hell, *Appl. Opt.* **2003**, 42, 5123.
- [20] M. D. Rotter, B. Dane, *Opt. Commun.* **2001**, 198, 155.
- [21] C. Eggeling, J. Widengren, R. Rigler, C. A. M. Seidel, *Anal. Chem.* **1998**, 70, 2651.