

Festkörper-Nanodiagnostik mit optischer Fernfeldmikroskopie durch spektral aufgelöste Abbildung von Einzelmolekülen**

Andrei V. Naumov,* Alexey A. Gorshelev, Yuri G. Vainer, Lothar Kador und Jürgen Köhler*

Die räumliche Auflösung eines Mikroskops, das mit herkömmlicher Fernfeldoptik arbeitet, ist infolge der Beugungseffekte auf einen Wert von etwa der halben Lichtwellenlänge begrenzt, wie von Abbe gezeigt wurde.^[1] Durch die Abbildung von Fluoreszenzsignalen ist es jedoch gelungen, diese Grenze im Bereich der Fernfeldmikroskopie zu überwinden. Die entsprechenden ultrahochauflösenden Methoden können in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die eine Gruppe basiert darauf, dass das Anregungslicht räumlich strukturiert wird und das zu untersuchende Material in nichtlinearer Weise auf die Anregung reagiert, wodurch die Punktverteilungsfunktion des Mikroskops erheblich verkleinert wird. Hierzu zählen das Verfahren der stimulierten Fluoreszenzlöschung (STED)^[2,3] und die nichtlineare strukturierte Anregungsmikroskopie (SIM).^[4] Die Verfahren der zweiten Gruppe verwenden die Abbildung fluoreszierender Einzelmoleküle.^[5–18]

Die Fluoreszenzphotonen eines Einzelmoleküls liefern das Bild einer Punktlichtquelle, d. h., sie repräsentieren die Punktverteilungsfunktion des Mikroskops. Durch Bestimmen ihres Schwerpunkts kann die räumliche Lage des Emitters mit einer Genauigkeit ermittelt werden, die nur vom Signal-Rausch-Verhältnis begrenzt wird und erheblich besser als die Beugungsgrenze sein kann. Um die für die Abbildung ausgedehnter Strukturen erforderliche Dichte der Dotierungsmoleküle zu ermöglichen und gleichzeitig die Überlagerung

ihrer Signale zu vermeiden, muss man sequentielle Aufnahmetechniken anwenden. Deren generelle Idee besteht darin, die Einzelmoleküle innerhalb eines beugungsbegrenzten Volumens durch eine zusätzliche Eigenschaft zu unterscheiden.^[19,20] In den Biowissenschaften ist das die veränderliche Fluoreszenzemission, die sich im Verlauf zufälliger Übergänge zwischen fluoreszierenden und dunklen Eigenzuständen eines Moleküls ergibt.^[5–8] Es ist bemerkenswert, dass solche Methoden im Bereich der Materialwissenschaften noch keine vergleichbare Verbreitung gefunden haben.^[21,22] Wir berichten hier über die sequentielle Abbildung von nahezu 300 000 einzelnen Terrylen-Molekülen (Tr) in einer Matrix aus gefrorenem *o*-Dichlorbenzol (*o*-DCB) bei tiefen Temperaturen. Einzelne Chromophore werden dadurch gezielt angeregt, dass man die Laserfrequenz über ihre schmalen elektronischen Anregungslinien schiebt (vgl. das allgemeine Konzept unserer Methode in Abbildung 1).

Das Absorptionsspektrum eines Moleküls beim Übergang in den ersten elektronischen Anregungszustand umfasst die Nullphononen-Linie (ZPL) und die erheblich breitere Phononen-Seitenbande (PSB).^[23] In vielen Fällen ist die ZPL bei tiefen Temperaturen äußerst schmal und bildet damit die Grundlage für die erreichbare hohe spektrale Empfindlichkeit und Selektivität.

Jedes Farbstoffmolekül befindet sich aufgrund der unvermeidlichen Inhomogenitäten des Festkörpers in einer etwas anderen lokalen Umgebung, was spektrale Verschiebungen der Absorptionsfrequenzen zur Folge hat. Der Bereich, über den sich diese erstrecken (die so genannte inhomogene Verteilung der Absorptionslinien) kann – je nach Ordnungsgrad der Matrix – um bis zu sechs Größenordnungen breiter als eine einzelne ZPL sein. Die Einhüllende aller Einzellinien bildet die inhomogen verbreiterte Absorptionsbande der Probe. Wenn man einen schmalbandigen Laser in Resonanz mit einer einzelnen Absorptionslinie des Ensembles bringt, so fluoresziert nur dieses eine Molekül. Mehrere Moleküle innerhalb eines beugungsbegrenzten Volumenelements kann man folglich dadurch getrennt anregen und detektieren, dass man die Laserfrequenz nacheinander auf ihre unterschiedlichen Absorptionslinien einstellt. Da der Schwerpunkt jedes einzelnen Fluoreszenzbildes mit einer Genauigkeit im Nanometerbereich bestimmt werden kann, ergibt sich dadurch eine sehr hohe Ortsauflösung. In ersten Messungen^[11,24–26] ist eine laterale Genauigkeit der Schwerpunktsbestimmung von ca. 4 nm erreicht worden, die nur vom Signal-Rausch-Verhältnis der Fluoreszenzsignale abhing. Bei den hier vorgestellten Arbeiten lag die Genauigkeit zwischen ca. 5 und einigen 10 nm.

Die Abbildung ausgedehnter Objekte erfordert eine hinreichende Markierungsdichte. In den folgenden Untersu-

[*] Prof. Dr. A. V. Naumov, A. A. Gorshelev, Prof. Dr. Yu. G. Vainer
Department of Molecular Spectroscopy, Institute for Spectroscopy,
Russian Academy of Sciences, 142190 Troitsk (Russland)
Fax: (+7) 496-751-0886

E-Mail: naumov@isan.troitsk.ru

Homepage: <http://www.single-molecule.ru>

Prof. Dr. L. Kador, Prof. Dr. J. Köhler

Lehrstuhl Experimentalphysik IV

und

Bayreuther Institut für Makromolekülforschung (BIMF)

Universität Bayreuth, 95440 Bayreuth (Germany)

Fax: (+49) 921-55-4002

E-Mail: juergen.koehler@uni-bayreuth.de

Homepage: <http://www.ep4.phy.uni-bayreuth.de>

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) (Sonderforschungsbereich 481 sowie Ko 1359/14 und 436 RUS 17/102/06), der Russischen Stiftung für Grundlagenforschung (07-02-00206, 08-02-00147), dem Verbundprojekt (BRHE) des US CRDF und des russischen Ministeriums für Wissenschaft und Bildung (A.N.) und einem President of Russia Grant (MD-3191.2009.2) (an A.N.) gefördert. Wir danken Ya. I. Sobolev und L. L. Nesterenko für Hilfe bei der Anfertigung von Abbildung 1 und des Innentitelbildes.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200905101> zu finden.

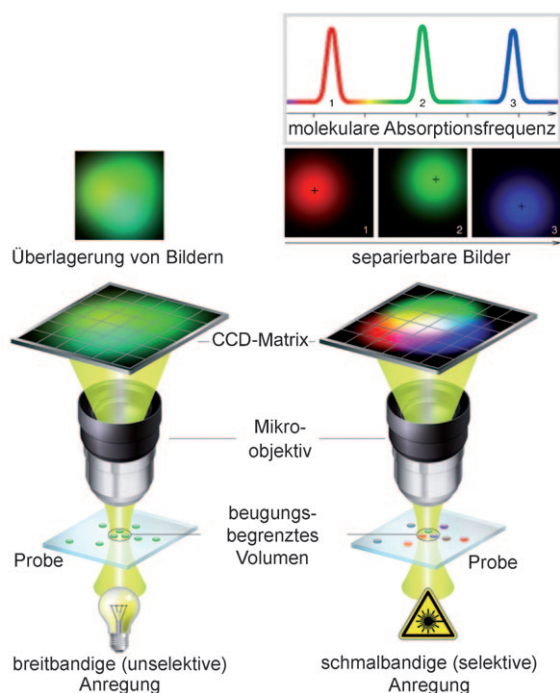


Abbildung 1. Prinzip unserer Messtechnik, mit der eine räumliche Genauigkeit jenseits der Beugungsgrenze durch spektral selektive Abbildung erreicht werden kann. Links: Bei breitbandiger (d. h. unselektiver) Anregung werden alle Chromophore gleichzeitig zur Fluoreszenz angeregt und emittieren ununterscheidbare Signale, aus denen sich ein beugungsbegrenztes Bild der Probe ergibt. Rechts: Selektive Anregung wird dadurch erreicht, dass man einen schmalbandigen Ein-Moden-Laser nacheinander in Resonanz mit den einzelnen Chromophoren bringt. Um das Bild einer makroskopischen Probe in vertretbarer Zeit (ein paar Minuten) zu erhalten, müssen zahlreiche Fluoreszenzsignale gleichzeitig mit einer CCD-Kamera aufgenommen werden, aber dennoch darf sich pro beugungsbegrenztem Volumenelement stets höchstens ein einziges Molekül in Resonanz mit der Laserlinie befinden.

chungen wurde eine riesige Zahl von Dotierungsmolekülen in einem Kristall detektiert und auf die Kamera abgebildet, um seine Strukturen auf der Nanometerskala sichtbar zu machen. In einem kristallinen Film (eine gefrorene Lösung zwischen zwei Mikroskop-Deckplättchen) mit den Abmessungen $70 \times 70 \times 0.5 \mu\text{m}$ wurden ca. 300 000 einzelne Chromophore separat detektiert, was einer räumlichen Dichte von etwa 35 Molekülen pro Volumenelement der Größe λ^3 entspricht.

Abbildung 2a zeigt eine Mikroskopaufnahme unserer Tr/DCB-Probe unter rückseitiger Beleuchtung mit Weißlicht. Ihre polykristalline Struktur ist gut zu sehen. Man erkennt mindestens zwei unterschiedliche Arten von Defektlinien (Rissen), die in der Zeichnung in Abbildung 2b skizziert sind. Die Risse der ersten Art (C_α , C_β) erscheinen als gerade Linien und werden in Abbildung 2b durch die dicken blauen Linien angedeutet. Sie sind wahrscheinlich längs der kristallographischen Achsen von o-DCB angeordnet, denn der Winkel zwischen ihnen ($\approx 90^\circ$) liegt in der Nähe des berechneten Wertes^[17] (Abbildung 2e). Die Risse der zweiten Art bilden dagegen ein komplexes Netzwerk gebogener Strukturen (schwarze Linien in Abbildung 2b). Ihre Hauptrichtung ist parallel zu derjenigen der C_β -Risse.

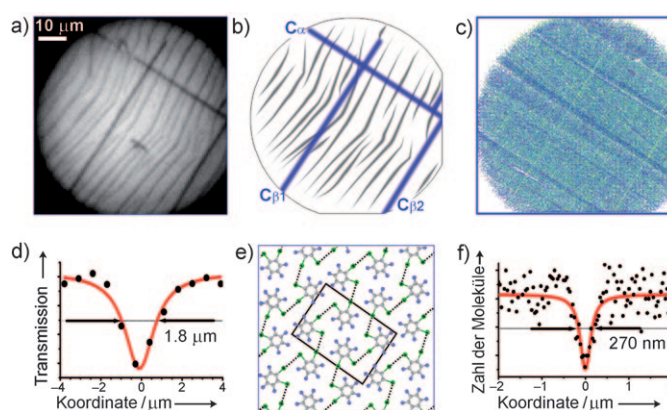


Abbildung 2. a) Mikroskopbild einer Probe von Tr/o-DCB unter rückseitiger Beleuchtung mit weißem Licht. b) Zeichnung der sichtbaren Strukturen (z. B. Risse). c) Räumliche Anordnung der Fluoreszenzbilder von 286 931 einzelnen Farbstoffmolekülen in der Probe. Jedes Molekül ist als farbiger Punkt dargestellt, dessen Farbe seine spektrale Position innerhalb der inhomogenen Bande repräsentiert (vgl. die Regenbogenskala in Abbildung 3 a (unten)). d) Bestimmung der Breite des Risses $C_{\beta 1}$ durch Lorentz-Angleich an das Mikroskopbild in Teil (a). e) Kristallstruktur von o-DCB gemäß kristallographischen Rechnungen.^[27] Die Elementarzelle ist durch ein schwarzes Parallelogramm gekennzeichnet. f) Bestimmung der Breite des Risses $C_{\beta 1}$ durch Lorentz-Angleich an die Verteilung der Einzelmoleküllinien (Teil c) längs einer Linie senkrecht zum Riss.

Das zweidimensionale Abbild der Positionen aller 286 931 aufgenommenen Chromophore in der Probenebene ist in Abbildung 2c gezeigt. Jedes Einzelmolekül wird durch einen farbigen Punkt dargestellt, dessen Lage sich aus dem berechneten Schwerpunkt des entsprechenden Fluoreszenzbildes auf dem CCD-Chip ergibt und dessen Farbe die spektrale Position seiner Absorptionslinie gemäß der Regenbogenskala in Abbildung 3a (unten) bezeichnet. Abbildung 2c zeigt sehr schön die heterogene räumliche Verteilung der Einzelmoleküle in der Umgebung der geraden C-Risse. Die hellen geraden Linien zeigen die geringe Dichte der Moleküle im Innern der Risse an. Zu Einzelheiten der experimentellen Technik siehe frühere Veröffentlichungen.^[28–31]

Da der Schwerpunkt des Fluoreszenzbildes eines Einzelmoleküls mit sehr hoher Genauigkeit bestimmt werden kann, sind wir in der Lage, feine Strukturen mit Fernfeldtechniken abzubilden und dabei dennoch durch sorgfältige Analyse der Fluoreszenzsignale eine räumliche Auflösung von deutlich unter einem halben Mikrometer zu erreichen. Ein Beispiel stellt der Riss $C_{\beta 1}$ dar. Die Weißlichtfotografie in Abbildung 2a liefert für ihn eine Breite von etwa $1.8 \mu\text{m}$ (Abbildung 2d). Diese ist größer als die theoretische Auflösung des Mikroskops von $\Delta x = \Delta y = 0.61 \lambda / \text{NA} \approx 390 \text{ nm}$ für $\lambda = 580 \text{ nm}$ und $\text{NA} = 0.9$ (NA = numerische Apertur des Objektivs) wahrscheinlich aufgrund von Abbildungsfehlern des Mikroskopobjektivs, das im Kryostaten eingebaut war und daher aufgrund der tiefen Temperatur unter starken mechanischen Spannungen stand. Das Einzelmolekülbild in Abbildung 2c liefert demgegenüber eine Breite des Risses von $270 \pm 50 \text{ nm}$, deutlich schmäler als die beugungsbegrenzte Auflösung (Abbildung 2f).

Die fluoreszierenden Farbstoffmoleküle liegen auf einer Seite des Risses C_α deutlich dichter als auf der anderen (dunkelblaue Linie in Abbildung 2c). Wahrscheinlich bewirken lokale Inhomogenitäten (z.B. Spannungsfelder) eine anisotrope Verschiebung der Chromophore während des Einfriervorgangs zum Riss hin. In der Umgebung der C_β -Risse oder der gekrümmten Linien liegt keine solche erhöhte Farbstoffdichte vor. Indessen sind Linien höherer Dichte parallel zum C_α -Riss an mindestens drei weiteren Orten in Abbildung 2c zu sehen, an denen das Weißlichtfoto keine Risse zeigt. Wahrscheinlich deuten sie Bereiche hoher mechanischer Spannungen im Kristall an, an denen sich beim Einfrieren bevorzugt – aber nicht notwendigerweise – Risse bilden. In der Umgebung der C_α - und C_β -Risse sind die Inhomogenitäten der Einzelmolekülanordnungen unterschiedlich, was mit der Anisotropie des *o*-DCB-Kristalls in Einklang ist.^[27]

Die Einzelmolekülspektroskopie liefert erheblich mehr Informationen als nur die räumliche Anordnung der Moleküle. Aus unseren Messdaten konnten wir die Verteilungsfunktionen mehrerer spektroskopischer Parameter als Funktion der spektralen Position ν der einzelnen Nullphononen-Linien innerhalb der inhomogenen Bande berechnen.

Abbildung 3 zeigt die Verteilungen $N_{SM}(\nu)$, $A_{sum}(\nu)$, $\bar{\gamma}(\nu)$ und $\bar{I}_{max}(\nu)$. $N_{SM}(\nu)$ (Abbildung 3a) bezeichnet die Zahl fluoreszierender Einzelmoleküle (SM) in einem definierten schmalen Frequenzintervall $\Delta\nu$, das man als Scan-Segment bezeichnen kann. (In unserer Arbeit haben wir $\Delta\nu = 10$ GHz gewählt.) $N_{SM}(\nu)$ repräsentiert folglich die Verteilung der Absorptionsfrequenzen der Farbstoffmoleküle in der inhomogenen Bande und ist verwandt – aber nicht identisch! – mit dem hoch aufgelösten Fluoreszenzanregungsspektrum einer makroskopischen Probe. Der Unterschied besteht darin, dass die Breiten, die integrierten Flächen und sogar die Formen verschiedener SM-Linien in der Probe sehr unterschiedlich und ungleich verteilt sein können.^[32] Im Folgenden nennen wir $N_{SM}(\nu)$ die „spektrale Dichte“ der Einzelmoleküllinien.

Die Verteilung $A_{sum}(\nu)$ (Abbildung 3b) beschreibt die Summe der Flächen aller innerhalb eines Scan-Segments $\Delta\nu$ detektierten Einzelmoleküllinien als Funktion der spektralen Position. Auch $A_{sum}(\nu)$ ist verwandt – aber nicht identisch – mit dem Fluoreszenzanregungsspektrum einer makroskopischen Probe; es enthält im Unterschied zu diesem keine Beiträge von Molekülen, die nicht-resonant (d.h. über ihre Phononen-Seitenbanden) angeregt worden sind. Man kann $A_{sum}(\nu)$ daher als „phononenlose Absorptionsbande“ bezeichnen. Zum Vergleich ist in Abbildung 3b das gewöhnliche Fluoreszenzanregungsspektrum $F(\nu)$ des selben Proben-ausschnitts als rote Kurve mit eingezeichnet. Aufgrund der Beiträge nicht-resonanter Moleküle ist es wesentlich schwächer strukturiert.

$\bar{\gamma}(\nu)$ (Abbildung 3c) ist schließlich die innerhalb eines Scan-Segments gemittelte spektrale Breite der Einzelmoleküllinien, und entsprechend $\bar{I}_{max}(\nu)$ (Abbildung 3d) das über $\Delta\nu$ gemittelte Fluoreszenzsignal am Maximum der Linien.

Die inhomogene Absorptionsbande der untersuchten Probe weist eine Quasi-Linien-Struktur auf, die am besten in der spektralen Dichte $N_{SM}(\nu)$ (Abbildung 3a) aufgelöst ist. Mindestens sechs bevorzugte spektrale Positionen – so ge-

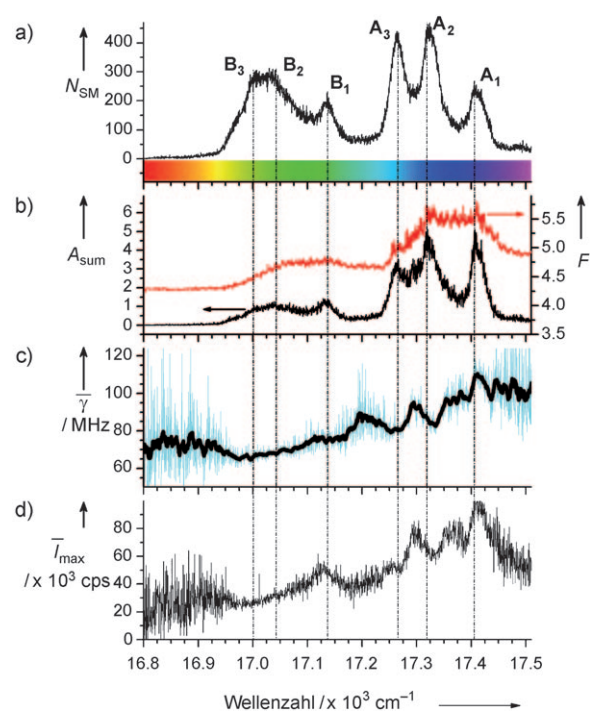


Abbildung 3. Spektrale Verteilung aller 286 931 Einzelmoleküllinien innerhalb der inhomogenen Absorptionsbande (Tr in *o*-DCB bei 1,5 K). Es wurde ein spektrales Mittelungsintervall (Scan-Segment) von $\Delta\nu = 10$ GHz gewählt. a) Spektrale Dichte $N_{SM}(\nu)$; b) phononenlose Absorptionsbande $A_{sum}(\nu)$ (schwarze Linie, linke Skala) sowie Fluoreszenzanregungsspektrum $F(\nu)$ (rote Linie, rechte Skala); c) über ein Scan-Segment (blaue Linie) und 20 Segmente (dicke schwarze Linie) gemittelte Einzel-molekül-Linienbreite $\bar{\gamma}(\nu)$; d) mittlere Photonen-Zählrate $\bar{I}_{max}(\nu)$ am Maximum der Linien innerhalb eines Scan-Segments. Die senkrechten unterbrochenen Linien deuten die Lage der spektralen Position A_1 – A_3 und B_1 – B_3 an. Die Regenbogenskala am unteren Rand von Teil (a) entspricht der Farbkodierung der Einzelmoleküle in Abbildung 2c.

nannte Sites – von Einzelmolekülen sind zu erkennen (im Folgenden A_1 – A_3 und B_1 – B_3 genannt).

Die Verteilungen $\bar{\gamma}(\nu)$ und $\bar{I}_{max}(\nu)$ (Abbildung 3c und d) zeigen eine langsam vom roten zum blauen Band der inhomogenen Bande ansteigende Tendenz, die für den Unterschied zwischen $N_{SM}(\nu)$ und $A_{sum}(\nu)$ verantwortlich ist. Sowohl $\bar{\gamma}(\nu)$ als auch $\bar{I}_{max}(\nu)$ weisen ausgeprägte feine Strukturen auf, die wiederum auf entsprechende Mikro-Sites in der Bande hindeuten. An Abbildung 3c ist außerdem zu erkennen, dass die mittlere Linienbreite außerhalb und weit in den Flanken der Hauptlinien tendenziell größer ist als an deren Maxima (am stärksten ausgeprägt an A_2 , A_3 , B_1 und B_3 , nicht jedoch an A_1 und B_2). Die gemittelte Fluoreszenzzählrate $\bar{I}_{max}(\nu)$ zeigt ebenfalls starke Schwankungen innerhalb der inhomogenen Bande (Abbildung 3d). Sie erreicht hohe Werte an den Linien A_1 und B_1 , aber auch in den Bereichen zwischen A_1 und A_2 sowie zwischen A_2 und A_3 .

Die parallele Messung der Spektren und der räumlichen Koordinaten einer sehr großen Zahl von Einzelmolekülen liefert zusätzliche Erkenntnisse über die Art der strukturellen Defekte in der Probe.^[14] Die farbkodierte räumliche Verteilung in Abbildung 2c zeigt deutliche Korrelationen zwischen

der räumlichen Lage der Moleküle und der spektralen Position ν ihrer Nullphononen-Linien auf (vgl. auch die Video-clips in den Hintergrundinformationen). Anstelle der Absorptionsfrequenz ν könnte man auch andere spektroskopische Parameter wie etwa die Linienbreite untersuchen. Die Korrelationen sind besonders deutlich für Absorptionslinien im spektralen Intervall $17255\text{--}17425\text{ cm}^{-1}$ ausgeprägt, das die Linien $A_1\text{--}A_3$ umfasst (Abbildung 4a).

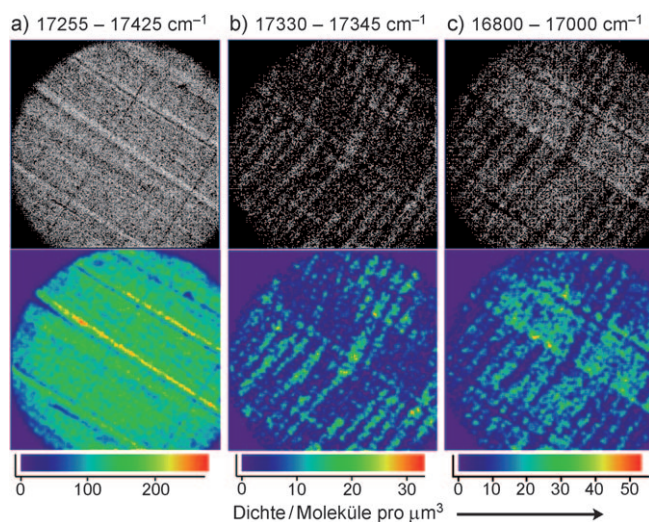


Abbildung 4. Räumliche Anordnung der Einzelmoleküle mit Nullphononen-Linien in den spektralen Intervallen a) $17255\text{--}17425\text{ cm}^{-1}$; b) $17330\text{--}17345\text{ cm}^{-1}$; c) $16800\text{--}17000\text{ cm}^{-1}$. In den oberen Teilbildern ist jedes Molekül durch einen weißen Punkt dargestellt, in den unteren ist die Flächendichte der Moleküle farbkodiert.

Beim Vergleich der räumlichen und der spektralen Lage der Einzelmoleküle fallen zwei Besonderheiten auf: Die Anordnungen der Einzelmoleküle nahe dem Maximum von Linie A_2 ($17.330\text{--}17.345\text{ cm}^{-1}$; Abbildung 4b) und auf der langwelligen Seite von B_3 ($16800\text{--}17000\text{ cm}^{-1}$; Abbildung 4c) sind deutlich mit den gebogenen Strukturen im Kristall korreliert, miteinander jedoch antikorreliert (vgl. Abbildung 4b und c). Während die Moleküle mit den langwelligen Absorptionslinien ($16800\text{--}17000\text{ cm}^{-1}$; Abbildung 4c) hauptsächlich in der Nähe dieser Strukturen liegen, sind diejenigen im kurzwelligeren Intervall ($17330\text{--}17345\text{ cm}^{-1}$; Abbildung 4b) dazwischen konzentriert. Eine Erklärung könnte sein, dass die gebogenen Strukturen stark verspannte oder ungeordnete Bereiche des *o*-DCB-Kristalles andeuten, sodass die dort eingelagerten Einzelmoleküle ihre Absorptionsfrequenzen außerhalb der Hauptlinien $A_1\text{--}A_3$ und $B_1\text{--}B_3$ haben. Die spektralen Positionen der Moleküle in den Zwischenbereichen würden dann eine stärker geordnete Kristallumgebung anzeigen.

Wir haben ein neues Verfahren der Einzelmolekülspektroskopie vorgestellt, das sich dadurch auszeichnet, dass die Fluoreszenzanregungsspektren eines makroskopischen Ensembles (mindestens einige hunderttausend) einzelner Farbstoffmoleküle in einem Festkörper aufgenommen werden. Ein entscheidender Punkt dabei ist, dass der vollständige Messdatensatz (d. h. die Spektren und räumlichen Positionen

aller Moleküle) für die weitere Auswertung gespeichert wird. Das Abbild ihrer Fluoreszenzsignale liefert eine räumliche Auflösung jenseits der klassischen Beugungsgrenze, weil bei tiefen Temperaturen die einzelnen Nullphononen-Linien meist um mehrere Größenordnungen schmäler als die gesamte inhomogene Bande sind und daher mit einem schmalbandigen Laser getrennt voneinander angeregt werden können. Die sequentielle Aufnahme kleiner Sub-Ensembles von Molekülen ist dadurch möglich. Der räumliche Schwerpunkt eines einzelnen Fluoreszenzabbildes kann mit einer Genauigkeit bestimmt werden, die nur von seinem Signal-Rausch-Verhältnis und der Stabilität des Versuchsaufbaus begrenzt wird und im Bereich weniger Nanometer liegen kann.

Eingegangen am 11. September 2009

Online veröffentlicht am 20. November 2009

Stichwörter: Einzelmolekülstudien · Farbstoffe/Pigmente · Festkörperstrukturen · Imaging · Spektroskopische Methoden

- [1] E. Abbe, *Arch. Mikroskop. Anat.* **1873**, 9, 413.
- [2] S. W. Hell, *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 1347.
- [3] S. W. Hell, *Science* **2007**, 316, 1153.
- [4] M. G. L. Gustafsson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 13081.
- [5] M. J. Rust, M. Bates, X. Zhuang, *Nat. Methods* **2006**, 3, 793.
- [6] M. Bates, B. Huang, G. T. Dempsey, X. Zhuang, *Science* **2007**, 317, 1749.
- [7] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H. F. Hess, *Science* **2006**, 313, 1642.
- [8] S. T. Hess, T. P. K. Girirajan, M. D. Mason, *Biophys. J.* **2006**, 91, 4258.
- [9] G. Shtengel, J. A. Galbraith, C. G. Galbraith, J. Lippincott-Schwartz, J. M. Gillette, S. Manley, R. Sougrat, C. M. Waterman, P. Kanchanawong, M. W. Davidson, R. D. Fetter, H. F. Hess, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, 106, 3125.
- [10] F. Güttler, T. Irngartinger, T. Plakhotnik, A. Renn, U. P. Wild, *Chem. Phys. Lett.* **1994**, 217, 393.
- [11] A. M. van Oijen, J. Köhler, J. Schmidt, M. Müller, G. Brakenhoff, *Chem. Phys. Lett.* **1998**, 292, 183.
- [12] J. Michaelis, C. Hettich, J. Mlynek, V. Sandoghdar, *Nature* **2000**, 405, 325.
- [13] W. E. Moerner, *Nat. Methods* **2006**, 3, 781.
- [14] A. Sharonov, R. M. Hochstrasser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 18911.
- [15] A. Egner, C. Geisler, C. v. Middendorff, H. Bock, D. Wenzel, R. Medda, M. Andresen, A. C. Stiel, S. Jakobs, C. Eggeling, A. Schönle, S. W. Hell, *Biophys. J.* **2007**, 93, 3285.
- [16] H. Bock, C. Geisler, C. A. Wurm, C. V. Middendorff, S. Jakobs, A. Schönle, A. Egner, S. W. Hell, C. Eggeling, *Appl. Phys. B* **2007**, 88, 161.
- [17] A. Yildiz, J. N. Forkey, S. A. McKinney, T. Ha, Y. E. Goldman, P. R. Selvin, *Science* **2003**, 300, 2061.
- [18] J. S. Biteen, M. A. Thompson, N. K. Tselentis, G. R. Bowman, L. Shapiro, W. E. Moerner, *Nat. Methods* **2008**, 5, 947.
- [19] D. H. Burns, J. B. Callis, G. D. Christian, E. R. Davidson, *Appl. Opt.* **1985**, 24, 154.
- [20] E. Betzig, *Opt. Lett.* **1995**, 20, 237.
- [21] J. Kirstein, B. Platschek, C. Jung, R. Brown, T. Bein, C. Bräuchle, *Nat. Mater.* **2007**, 6, 303.

- [22] P. Dedecker, B. Muls, A. Deres, H. Uji-i, J. Hotta, M. Sliwa, J. P. Soumillion, K. Müllen, J. Enderlein, J. Hofkens, *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 1079.
 - [23] K. K. Rebane, *J. Lumin.* **2002**, *100*, 219.
 - [24] A. M. van Oijen, J. Köhler, J. Schmidt, M. Müller, G. Brakenhoff, *J. Opt. Soc. Am. A* **1999**, *16*, 909.
 - [25] A. Bloëß, Y. Durand, M. Matsushita, R. Verberk, E. J. J. Groenen, J. Schmidt, *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 3016.
 - [26] A. Bloëß, Y. Durand, M. Matsushita, H. van der Meer, G. J. Brakenhoff, J. Schmidt, *J. Microsc.* **2002**, *205*, 76.
 - [27] R. Boese, M. T. Kirchner, J. D. Dunitz, G. Filippini, A. Gavezotti, *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 1561.
 - [28] E. Lang, J. Baier, J. Köhler, *J. Microsc.* **2006**, *222*, 118.
 - [29] A. V. Naumov, Yu. G. Vainer, L. Kador, *Phys. Rev. Lett.* **2007**, *98*, 145501.
 - [30] Yu. G. Vainer, A. V. Naumov, M. Bauer, L. Kador, *J. Lumin.* **2007**, *127*, 213.
 - [31] Yu. G. Vainer, A. V. Naumov, L. Kador, *Phys. Rev. B* **2008**, *77*, 224202.
 - [32] A. L. Nicolet, C. Hofmann, M. A. Kol'chenko, B. Kozankiewicz, M. Orrit, *ChemPhysChem* **2007**, *8*, 1215.
 - [33] N. L. Naumova, I. A. Vasil'eva, I. S. Osad'ko, A. V. Naumov, *J. Lumin.* **2005**, *111*, 37.
 - [34] T. Yu. Latychevskaia, A. Renn, U. P. Wild, *J. Lumin.* **2006**, *118*, 111.
-