

Photothermisches Kontrastverfahren erreicht Einzelmolekülempfindlichkeit

Thomas Basché*

Absorption · Einzelmoleküldetektion ·
Photothermische Abbildung

Im Jahr 1989 berichteten Kador and Moerner über die erfolgreiche Messung des optischen Spektrums eines einzelnen Pentazenmoleküls, das in einem *p*-Terphenylkristall eingelagert war.^[1] Bemerkenswerterweise wurde in dieser Arbeit ein Absorptionsexperiment beschrieben. Hochempfindliche Absorptionsmessungen sind inhärent schwierig, da eine kleine Anzahl von fehlenden Photonen vom Photonenrauschen des Lichtstrahls diskriminiert werden muss. Die Messung von Kador und Moerner profitierte von einem ausgefeilten Doppelmodulationsverfahren mit quantenlimitierter Empfindlichkeit sowie von dem sehr großen Absorptionsquerschnitt des Moleküls. Letzterer ergab sich durch Abkühlen der Probe auf 1.4 K, wodurch eine sehr scharfe und intensive Null-Phononenlinie des Pentazens erzeugt wird. Kurze Zeit später verwendeten Orrit und Bernard Fluoreszenzanregungsspektroskopie zur Untersuchung des gleichen Systems und konnten eine deutliche Verbesserung des Signal-zu-Rauschen(SNR)-Verhältnisses verbuchen.^[2] Aufgrund des niedrigen Untergrundes nutzten weitere, frühe Versuche zur Detektion einzelner Moleküle ebenfalls deren Fluoreszenzemission aus.^[3,4] Nach mehr als 20 Jahren Einzelmolekülspektroskopie beruhen die meisten der entwickelten Methoden – einschließlich der neueren hochauflösenden Mikroskopietechniken^[5] – und die meisten der erzielten Resultate auf der Detektion der Fluoreszenz.

Ungeachtet dessen sind nach der Pionierarbeit von Moerner noch einige Verfahren entwickelt worden, um die Absorption einzelner Moleküle zu messen.^[6–8] Da bei diesen bislang auf tiefe Temperaturen und intensive Null-Phononenlinien zurückgegriffen wurde, waren sie in gewisser Weise verbesserte Versionen des ursprünglichen Experiments. Die Messung von Einzelmolekülabsorption bei Raumtemperatur ist noch deutlich anspruchsvoller als bei tiefen Temperaturen, da der Absorptionsquerschnitt (bei einer gegebenen Anregungswellenlänge) gegenüber dem Tieftemperaturwert um mehrere Größenordnungen reduziert ist. Folglich ist das Verhältnis von Raumtemperatur-Absorptionsquerschnitt (ca. 10^{-16} cm²) und der typischen Größe eines beugungslimitierten Anregungsfokus (ca. 10^{-9} cm²) eine kleine Zahl, die die

schwache Wechselwirkung zwischen Molekül und Licht widerspiegelt. Es ist daher eine große Herausforderung – wenn auch nicht unmöglich (siehe unten) –, in einem konventionellen Transmissionsexperiment die wenigen vom Molekül absorbierten Photonen („fehlende Photonen“) überhalb des Rauschpegels des Laserstrahls zu bestimmen. Weitere Erschwernisse sind die Oberflächenrauigkeit und kleine Variationen des Brechungsindex der Probe. An diesen Inhomogenitäten wird Licht gestreut, ein Effekt, der sich schwer von der wahren Absorption durch das Molekül unterscheiden lässt. Es waren primär diese Punkte, die Orrit und Mitarbeiter bewogen, zur Erzielung von Einzelmolekülempfindlichkeit in Absorption ein photothermisches Kontrastverfahren auszuprobieren.^[9]

Zur Erzeugung von photothermischem Kontrast wird das Licht eines Pumpstrahls vom beleuchteten Objekt absorbiert. Die absorbierte Energie wird in Wärme umgewandelt, die sich in der Umgebung ausbreitet und eine thermische Linse erzeugt. Die dabei auftretende lokale Änderung des Brechungsindex ($\delta n/\delta T$) wird mit einem Abfragestrahl innerhalb eines interferometrischen Aufbaus registriert. Unter Verwendung einer ausgeklügelten Version dieses Prinzips war es Orrit und Mitarbeitern zunächst gelungen, kleine Goldnanopartikel mit Durchmessern von 5 nm zu detektieren bzw. in einem Mikroskop abzubilden.^[10] Solche Partikel sind jedoch aufgrund ihres sehr viel größeren Absorptionsquerschnitts wesentlich leichter zu beobachten als einzelne organische Farbstoffmoleküle. Um Einzelmolekülempfindlichkeit zu erreichen, mussten die experimentellen Bedingungen weiter verbessert werden.^[9,11] Eine Reihe von potenziellen Rauschquellen wurde durch Modulation des Pumpstrahls bei einer Frequenz von ca. 1 MHz eliminiert. In einer kürzlich erschienenen Arbeit hatten die Autoren gezeigt, dass sogar die Dissipation von kleinen Leistungen im Bereich von 3 nW (3×10^{-9} W) mit einem SNR von 8 bei einer Bandbreite von 100 Hz detektiert werden konnte.^[11] Um das Maximum an absorbierter Leistung zu thermalisieren, wurden Absorber mit großen nicht-strahlenden Übergangsraten und entsprechend niedriger Fluoreszenzquantenausbeute untersucht, d.h., der strahlende Zerfall ist bei diesen Molekülen vernachlässigbar. Nach der Überprüfung einiger geeigneter Kandidaten wählten Gaiduk et al. einen sogenannten „Black hole quencher“ (ein Azo-Farbstoff) aus, der bei Sättigung des optischen Übergangs eine Leistung von 15 nW als Wärme abgab.^[9] Genauer gesagt wurde ein DNA-basiertes Konstrukt

[*] Prof. Dr. T. Basché
Institut für Physikalische Chemie
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Welderweg 11, 55128 Mainz (Deutschland)
E-Mail: thomas.basche@uni-mainz.de

verwendet, in dem zwei dieser Chromophore gebunden sind. Ein weiteres zu lösendes Problem bestand darin, dass die Brechungsindexänderung, die der Wärmeabgabe nach Lichtabsorption folgt, relativ klein ausfällt. Die hier wichtige Übertragungseffizienz konnte durch Verwendung von Glycerin (anstelle von Wasser), einem Lösungsmittel, in dem die Wärmeleitung gering ist, erhöht werden. Zudem wurden relativ hohe Leistungen des Pumpstrahls eingesetzt, was signifikant zur Reduktion des Photonenrauschens beitrug.

Ein photothermisches Bild einzelner Moleküle ist in Abbildung 1 dargestellt. Die Moleküle wurden auf einem Substrat abgeschieden und mit Glycerin umspült. Die deut-

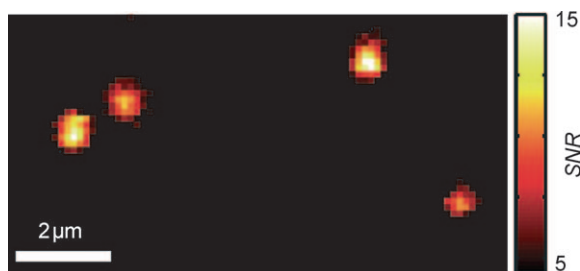


Abbildung 1. Photothermisches Bild von vier einzelnen Molekülen, die jeweils aus zwei Chromophoren bestehen (siehe Text). Heiz-(Pump)-Leistung bei 514 nm: 5.1 mW; Abfrageleistung bei 800 nm: 84 mW. (Übernommen aus Lit. [9].)

lich erkennbaren Signale konnten mit einem guten SNR von 10 (Detektionsbandbreite: 3 Hz) ausgelesen werden. In Abwesenheit von Sauerstoff waren die meisten der Moleküle interessanterweise über viele Stunden stabil. Die mittlere Zahl von absorbierten Photonen bis zum Eintreten des Photobleichens betrug 10^{11} in einer Sauerstoff-gesättigten Atmosphäre bzw. 10^{12} ohne Sauerstoff. Dieses Ergebnis verweist auf eine verglichen mit typischen organischen Fluorophoren hohe Photostabilität, die mit schneller nicht-strahlender Relaxation erklärt wurde. Diese führt zu einer raschen Entvölkerung des angeregten Singulettzustands und wahrscheinlich auch zu einer geringen Wahrscheinlichkeit für Interkombination in den Triplettzustand. Aus diesen Zuständen findet aufgrund ihrer langen Lebenszeit viel eher Photochemie statt. Aus der Änderung des Signals nach Photobleichen konnten die Autoren die damit einhergehende Änderung des Absorptionsquerschnitts abschätzen. Der Mittelwert von $4.1 \times 10^{-16} \text{ cm}^2$ (4.1 Å^2) steht in guter Übereinstimmung mit dem Wert, der aus den Absorptionsspektren in Lösung bestimmt wurde.

In Absatz 2 wurden die größten Hürden für Messungen der Einzelmolekülabsorption bei Raumtemperatur diskutiert. Sehr kurz nach der Veröffentlichung der gerade beschriebenen Arbeit ist es allerdings zwei weiteren Gruppen gelungen, nur durch das Schrotrauschen limitierte Einzelmolekülempfindlichkeit zu erreichen.^[12,13] Aus der Gruppe von Sandoghdar wurde über Einzelmoleküldetektion mit einem „konventionellen“ Transmissionsexperiment berichtet.^[12] Dieses erstaunliche Ergebnis kam zustande, da die Rauschquellen aufgrund von Intensitätsfluktuationen des Laserstrahls und Streuung durch das Substrat weitgehend

unterdrückt werden konnten. Um noch bestehende Rauschbeiträge zu umgehen, wurde mit dieser modulationsfreien Detektionsmethode der Transmissionsunterschied vor und nach Bleichen der organischen Farbstoffmoleküle bestimmt. Die Gruppe von Xie hat eine optisch nicht-lineare Methode – Ground state depletion microscopy – eingesetzt, um den durch einzelne Moleküle hervorgerufenen Absorptionskontrast zu demonstrieren.^[13] Bei diesem Verfahren werden zwei Laserstrahlen mit leicht unterschiedlichen Wellenlängen (Pump- und Abfragestrahl) in die molekulare Absorptionsbande eingestrahlt. Dabei wird der Pumpstrahl mit einer Frequenz von ca. 2 MHz intensitätsmoduliert. Diese Modulation wird auf den Abfragestrahl übertragen, mit dem dann die Transmissionsänderungen durch die Entvölkerung des Grundzustands bei der Modulationsfrequenz aufgezeichnet werden. Wie auch beim photothermischen Kontrast trägt Streuung durch die Probe hier nicht zum Signal bei.

Nachdem nun plötzlich mehrere ausgeklügelte Techniken zur Messung der Einzelmolekülabsorption bei Raumtemperatur zur Verfügung stehen, stellt sich die Frage, was die Perspektiven dieser beeindruckenden Errungenschaften sind. Was bislang publiziert wurde, fällt in erster Linie in den Rahmen von Machbarkeitsstudien. Prinzipiell ist nun die große Zahl von nicht-fluoreszierenden Molekülen (einschließlich Biomolekülen) für Einzelmoleküluntersuchungen verfügbar, wenn denn die Signalstärken ausreichend sind. Daher wird es für zukünftige Anwendungen entscheidend sein, die Verfahren weiter zu verbessern. Dies ist eine anspruchsvolle Aufgabe, da sie bereits am fundamentalen Limit des Schrotrauschens angelangt sind. Selbstverständlich könnten die Integrationszeiten erhöht werden, was jedoch die Zeitauflösung der Experimente einschränkt. Im Falle des photothermischen Verfahrens kann das Signal durch eine bessere thermische Isolation vom Substrat gesteigert werden. Aus stofflicher Sicht kann der Absorptionsquerschnitt durch ausgedehntere π -Systeme vergrößert werden. Dadurch verschiebt sich die Absorption ins Nahinfrarot, ein Bereich, in dem Fluoreszenzquantenausbeuten ohnehin häufig klein sind. Eine andere Option, den Absorptionsquerschnitt zu erhöhen, wäre die Nutzung optischer Antennen, wodurch die Licht-Materie-Wechselwirkung verstärkt werden könnte. Eine faszinierende Perspektive ist die Messung des Absorptionsspektrums eines einzelnen Moleküls. Die Ergebnisse könnten dann mit den zugehörigen Fluoreszenzdaten verglichen werden, womit die gesamte Photophysik eines einzelnen Moleküls zugänglich würde. Der Vergleich von Absorption und Emission würde auch viel zum mechanistischen Verständnis des weitgehend unverstandenen Photobleichens und -bleichens einzelner Moleküle beitragen.^[14] Die Aufnahme des vollständigen Absorptionsspektrums eines einzelnen Moleküls stellt jedoch eine große Herausforderung dar, angefangen von der Bereitstellung einer geeigneten Lichtquelle bis hin zur korrekten Überlagerung der Strahlen in den Zweifarben-Experimenten. Wie von der Orrit-Gruppe bereits gezeigt wurde, stehen zumindest Chromophore zur Verfügung, welche die für Langzeitmessungen notwendige Photostabilität haben. Neben diesen eher grundlegenden photophysikalischen Fragestellungen wird es interessant sein, zu sehen, ob die neuen Techniken auch Einzelmolekül-Ab-

sorptionsdetektion in biologischen Medien ermöglichen, die sich deutlich von den bisherigen, idealen Bedingungen unterscheiden. Letztendlich wird eine entscheidende Frage sein, ob Einzelmolekülabsorption mit fluoreszenzbasierten Techniken ernsthaft konkurrieren kann. Der Autor hat hier noch einige Zweifel, lässt sich aber gerne eines Besseren belehren.

Eingegangen am 17. Januar 2011

Online veröffentlicht am 4. März 2011

-
- [1] L. Kador, W. E. Moerner, *Phys. Rev. Lett.* **1989**, 62, 2535.
 - [2] M. Orrit, J. Bernard, *Phys. Rev. Lett.* **1990**, 65, 2716–2719.
 - [3] B. E. Spera, N. K. Seitzinger, L. M. Davis, R. A. Keller, S. A. Soper, *Chem. Phys. Lett.* **1990**, 174, 553–557.
 - [4] R. Rigler, J. Widengren, *BioScience* **1990**, 3, 180–183.
 - [5] Eine Übersicht hierzu: S. W. Hell, *Nat. Methods* **2009**, 6, 24–32.
 - [6] L. Kador, T. Latychevskaja, A. Renn, U. P. Wild, *J. Chem. Phys.* **1999**, 111, 8755–8758.
 - [7] J. Y. P. Butter, B. Hecht, B. R. Crenshaw, C. Weder, *J. Chem. Phys.* **2006**, 125, 154710.
 - [8] I. Gerhardt, G. Wrigge, P. Bushev, G. Zumofen, M. Agio, R. Pfab, V. Sandoghdar, *Phys. Rev. Lett.* **2007**, 98, 033601.
 - [9] A. Gaiduk, M. Yorulmaz, P. V. Ruijgrok, M. Orrit, *Science* **2010**, 330, 353–356.
 - [10] D. Boyer, P. Tamarat, A. Maali, B. Lounis, M. Orrit, *Science* **2002**, 297, 1160–1163.
 - [11] A. Gaiduk, P. V. Ruijgrok, M. Yorilmaz, M. Orrit, *Chem. Sci.* **2010**, 1, 343.
 - [12] P. Kukura, M. Celebrano, A. Renn, V. Sandoghdar, *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, 1, 3323–3327.
 - [13] S. Chong, W. Min, X. S. Xie, *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, 1, 3316–3322.
 - [14] M. Haase, C. G. Hübner, F. Nolde, K. Müllen, T. Basché, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, 13, 1776–1785.
-