

# Lichtmikroskopie mit Doughnut-Moden: ein Konzept zur Detektion, Charakterisierung und Manipulation einzelner Nanoobjekte

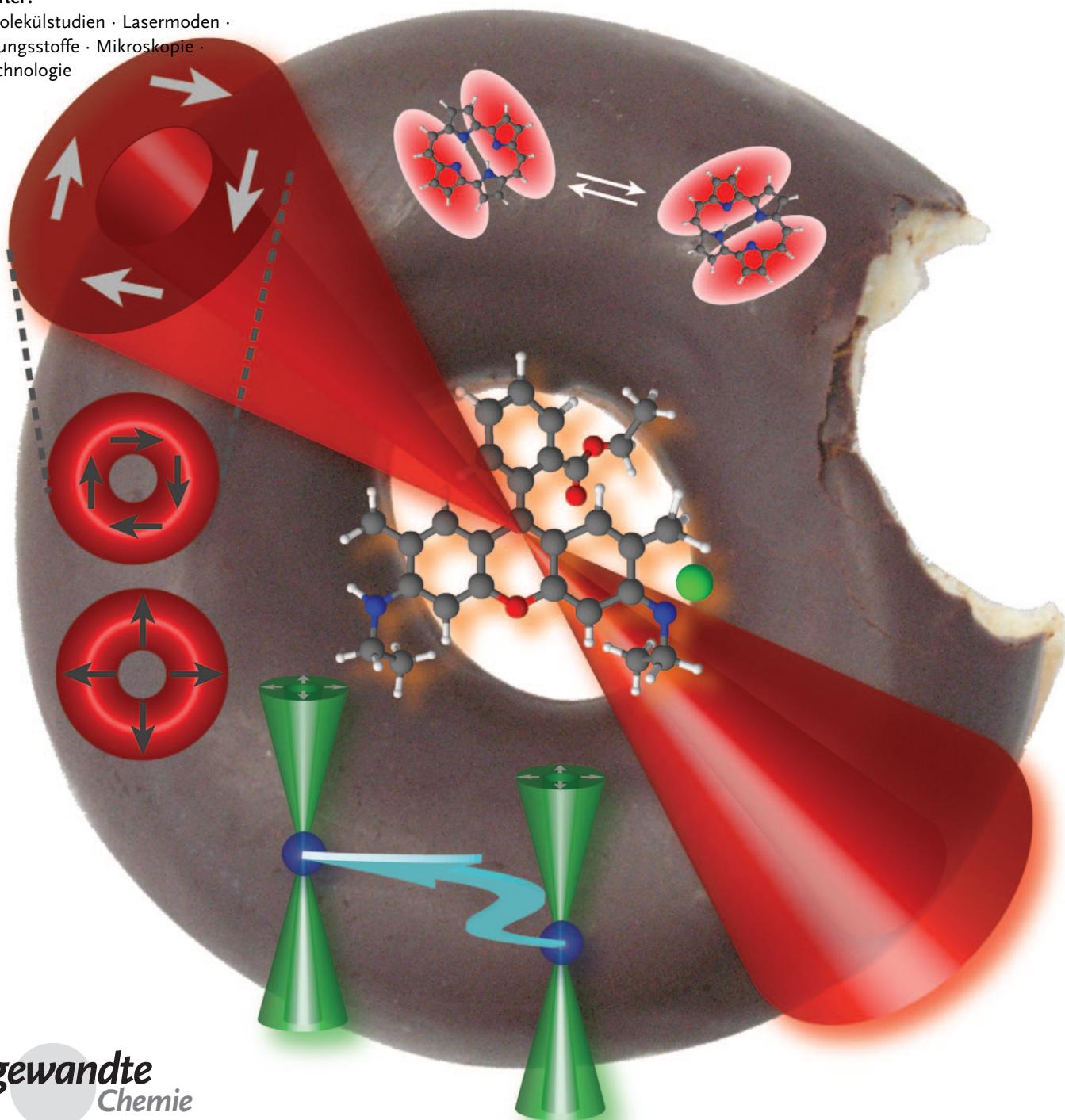
Tina Züchner, Antonio Virgilio Failla und Alfred J. Meixner\*

**Stichwörter:**

Einzmolekülstudien · Lasermoden ·

Markierungsstoffe · Mikroskopie ·

Nanotechnologie



**L**asermoden mit ringförmigem Strahlprofil, die zumeist als Doughnut-Moden (DMs) bezeichnet werden, finden Anwendung in unterschiedlichen Forschungsbereichen wie den Bio- und Materialwissenschaften oder der Einzelmolekülmikroskopie und -spektroskopie. Der Hauptgrund für die wachsende Bedeutung der DMs liegt darin, dass in letzter Zeit die Techniken zur Herstellung dieser Moden mit hoher Präzision verfeinert oder wiederentdeckt wurden. Obwohl ihr Potential bisher noch nicht vollkommen ausgeschöpft wird, ermöglichen die speziellen Polarisationseigenschaften der DMs eine Vielzahl von Anwendungen. So tragen sie dazu bei, unser grundlegendes Verständnis der optischen Eigenschaften einzelner emittierender Spezies wie Moleküle, Nanopartikel oder Quantenpunkte zu vervollständigen und erlauben Einblick in die dreidimensionale Dipol- oder Partikelorientierung im Raum. Durch ihre vollständig verschwindende Intensität im Zentrum des Fokus eignen sich einige DMs auch für die stimulierte Emissionslöschung in der Fluoreszenzmikroskopie. Aus demselben Grund hat man sie auch für die Verwendung in optischen Fallen und Pinzetten vorgeschlagen.

## 1. Einleitung

Die Einzelmolekülmikroskopie und -spektroskopie ist zu einer wichtigen Säule der Forschung in vielen Bereichen der Wissenschaft geworden. Zusammen mit anderen innovativen Techniken zur Detektion einzelner Nanopartikel, Quantenpunkte oder Zellkompartimente oder zur Untersuchung ihrer gegenseitigen Wechselwirkungen bildet sie die Grundlage eines weiten interdisziplinären Forschungsbereichs: der Nanotechnologie.

Bahnbrechende Techniken wie die stimulierte Emissionslöschung in der Fluoreszenzmikroskopie (stimulated emission depletion, STED microscopy),<sup>[1]</sup> die photoaktivierbare Lokalisationsmikroskopie (PALM), die stochastische optische Rekonstruktionsmikroskopie (STORM)<sup>[2]</sup> und die optische Nahfeldmikroskopie (near-field scanning optical microscopy, NSOM)<sup>[3]</sup> ermöglichen heutzutage, eine optische Auflösung weit unterhalb der Beugungsgrenze zu erreichen. Diese optischen Ansätze sind notwendige Untersuchungswerzeuge, weil sie die hochauflösende 3D-Mikroskopie biologischer Proben ermöglichen, oder wie im Fall von NSOM die Möglichkeit bieten, neben der hohen Auflösung auch chemische Strukturinformationen zu erhalten, die mit höchstauflösenden nicht-optischen Techniken unzugänglich sind. Beispielsweise können mit NSOM gleichzeitig hochauflösende Bilder und die Raman-Spektren einer Probe aufgenommen werden, was z. B. mit der Kraftmikroskopie (AFM) nicht möglich ist.<sup>[4]</sup> Obwohl diese Methoden jetzt und auch in Zukunft äußerst wichtig und nützlich sind und bleiben werden, können in einigen Fällen auch mit beugungsbegrenzten Techniken Infor-

## Aus dem Inhalt

<b>1. Einleitung</b>	5385
<b>2. Erzeugung von Doughnut-Moden und ihre optischen Eigenschaften</b>	5386
<b>3. Verbesserung der optischen Auflösung mit Doughnut-Moden in der Lichtmikroskopie</b>	5390
<b>4. Mikroskopietechniken zur Bestimmung der Orientierung einzelner Moleküle</b>	5392
<b>5. Doughnut-Moden und einzelne Metallnanopartikel</b>	5395
<b>6. Doughnut-Moden und <math>\text{SiO}_2</math>-Nanopartikel</b>	5396
<b>7. Mikroresonatoren</b>	5397
<b>8. Optische Fallen und Pinzetten</b>	5398
<b>9. Nahfeldmikroskopie</b>	5399
<b>10. Oberflächenplasmonenresonanzabbildung</b>	5400
<b>11. Nichtlineare optische Mikroskopie</b>	5400
<b>12. Mikromechanische Anwendungen</b>	5401
<b>13. Zusammenfassung und Ausblick</b>	5402

mationen erhalten werden, die unterhalb der Auflösungsgrenze liegen. Zum Beispiel wurden verschiedene Methoden entwickelt, um die Dipolorientierung einzelner Moleküle zu bestimmen. In vielen Fällen beinhaltet dies die Manipulation oder Bestimmung der Polarisation von Licht. Hauptsächlich war dabei bisher linear polarisiertes Licht von Interesse. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass komplexere Polarisationsarten, wie radiale und azimutale Polarisation, häufig besser geeignet sind.

In diesem Aufsatz konzentrieren wir uns auf eine spezielle Familie von Lasermoden höherer Ordnung mit einem typischen ringförmigen Intensitätsprofil, den sogenannten Doughnut-Moden (DMs) mit z. B. linearer, azimutaler oder radialer Polarisation. In den letzten Jahren wurden DMs unterschiedlicher Polarisationseigenschaften sowohl theoretisch

[\*] T. Züchner, Dr. A. V. Failla, Prof. Dr. A. J. Meixner  
Institut für Physikalische und Theoretische Chemie  
Eberhard Karls Universität Tübingen  
Auf der Morgenstelle 18, 72076 Tübingen (Deutschland)  
Fax: (+49) 7071-5490  
E-Mail: alfred.meixner@uni-tuebingen.de  
Dr. A. V. Failla  
Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen  
Spemannstraße 35, 72076 Tübingen (Deutschland)

als auch experimentell eingehend untersucht. Zuerst zeigen wir, dass viele verschiedene Methoden entwickelt wurden, um diese Moden in hoher Qualität herzustellen. Zusätzlich wird ein kurzer Überblick über ihre physikalischen und optischen Eigenschaften gegeben, wobei besonderer Wert auf ihre Eigenschaften beim scharfen Fokussieren gelegt wird.

Zweitens beschreiben wir, wie die Feldverteilung von DMs genutzt wurde, um die Größe sowohl eines beugungsbegrenzten Punkts in der konventionellen Mikroskopie<sup>[5]</sup> wie auch die eines nicht beugungsbegrenzten Punkts in der STED-Mikroskopie<sup>[1]</sup> zu verkleinern. Anschließend stellen wir die Kombination von DMs und konfokaler Mikroskopie als leistungsstarke und vielseitige Technik für die Einzelmolekülmikroskopie und -spektroskopie vor. Neben einer außerordentlichen Präzision bietet dies auch Zugang zu ergänzenden Informationen, so kann etwa die molekulare Orientierung<sup>[6]</sup> bestimmt oder die Tautomerisierung einzelner Moleküle<sup>[7]</sup> verfolgt werden. Um die Möglichkeiten, die DMs bei der Bildgebung in der konfokalen Mikroskopie bieten, weiter zu verdeutlichen, geben wir zum Vergleich einen Überblick über andere Mikroskopiemethoden, die es erlauben, die Orientierung einzelner Moleküle zu bestimmen, wie z.B. die defokussierte Abbildung,<sup>[8]</sup> die polarisationsempfindliche Mikroskopie<sup>[9]</sup> und die annulare Beleuchtung.<sup>[10]</sup>

Wir führen unsere Untersuchungen der Abbildungsmöglichkeiten von DMs weiter und beschäftigen uns mit metallischen Nanopartikeln, wobei wir zeigen, dass nicht nur Orientierungsinformationen zugänglich sind, sondern gleichzeitig auch die Partikelform erkannt werden kann.<sup>[11]</sup> Darüber hinaus beschreiben wir die Bedeutung von azimutal und radial polarisiertem Licht in verschiedenen Bereichen der Wissenschaft. Beispielsweise haben DMs eine entscheidende Rolle bei der Charakterisierung einzelner Siliciumnanopartikel<sup>[12]</sup> und in Einzmolekülstudien in optischen Mikroresonatoren<sup>[13]</sup> gespielt. Darüber hinaus wurden diese Moden wegen ihrer herausragenden Eigenschaften beim scharfen Fokussieren auch für Experimente mit optischen Fallen und Pinzetten verwendet.<sup>[14]</sup> Wir geben einen Überblick über jüngste erfolgreiche Experimente mit Partikeln, die mit den herkömmlich verwendeten Gauß-Strahlen optisch nicht gefangen werden konnten.<sup>[14b-e,15]</sup> Auch die Bedeutung der DMs in anderen Bereichen der Nanotechnologie wie den Materialwissenschaften, der Oberflächenoptik, der Nahfeldoptik, der Frequenzverdopplung (second harmonic generation, SHG) und der Zweiphotonenmikroskopie wird angesprochen. Beispielsweise erwähnen wir die Verwendung von

radial polarisiertem Licht in der spitzenverstärkten Nahfeldmikroskopie (tip-enhanced near-field optical microscopy, TENOM) und stellen interessante Ergebnisse vor, die durch die Kombination von radial polarisiertem Licht mit der Oberflächenplasmonenresonanzabbildung (surface plasmon resonance, SPR imaging)<sup>[16]</sup> oder der SHG-Mikroskopie<sup>[17]</sup> entstanden sind. Schließlich zeigen wir, wie DMs in der Industrie Verwendung finden und z.B. das Schneiden und Bohren von Metallen mit fokussierten Laserstrahlen verbessern können.<sup>[18]</sup>

Obwohl die Anwendungen von DMs, wie in diesem Aufsatz gezeigt wird, noch mehr oder weniger gestreut sind, bieten sie dennoch schon eine Verbindung zwischen den unterschiedlichsten Wissenschaftsbereichen, angefangen von der reinen Optik und theoretischen Optik zu biomedizinischen Anwendungen oder dem Schneiden von Metallen. In den letzten Jahren haben sich die Herstellungstechniken für DMs sehr lebhaft entwickelt. In ähnlicher Weise wird ihre Einführung in die Mikroskopie sicherlich zu einer regelrechten Lawine faszinierender neuer Anwendungen führen. Wir sind zuversichtlich, dass die herausragenden Eigenschaften dieser Moden ein vielseitiges Werkzeug bieten, das ein neues Tor zum Nanokosmos aufstoßen kann.

## 2. Erzeugung von Doughnut-Moden und ihre optischen Eigenschaften

### 2.1. Formale Beschreibung einer Doughnut-Mode

In diesem Abschnitt stellen wir eine einfache theoretische Beschreibung von Doughnut-Moden (DMs) vor. Hauptsächlich wollen wir dabei zeigen, was DMs sind und warum sie so genannt werden. Wie bereits erwähnt, wurden DMs von Wissenschaftlern aus völlig unterschiedlichen Bereichen verwendet, weshalb die Definitionen und Abkürzungen in der Literatur oftmals nicht übereinstimmen. Diese Unterschiede sind jedoch nur formal, nicht konzeptionell.

Diese Moden und jede Linearkombination von ihnen kann in einer Laserkavität oszillieren, weshalb sie auch Lasermoden höherer Ordnung (higher order laser modes, HOLMs) genannt werden können.

Da sich HOLMs jedoch auch außerhalb einer Laserkavität ausbreiten können, werden sie auch Laserstrahlen genannt. Sie lassen sich auch in Ringform herstellen: mit einem kreisförmigen Intensitätsprofil und einer zentralen dunklen



Tina Züchner studierte Chemie an der Eberhard Karls Universität Tübingen und erwarb dort 2006 ihr Diplom. Im Moment arbeitet sie mit hochentwickelten Mikroskopietechniken an einzelnen Goldnanopartikeln in der Arbeitsgruppe von Prof. A. J. Meixner. In ihren Experimenten beschäftigt sie sich vor allem mit azimutal und radial polarisiertem Licht.



Antonio Virgilio Failla schloss im Jahr 2000 sein Physikstudium an der Universität Rom la Sapienza ab. Er promovierte 2002 an der Universität Heidelberg. Momentan leitet er die Abteilung für Lichtmikroskopie am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbioologie in Tübingen, wo er sich auf die Weiterentwicklung fortgeschrittener Lichtmikroskopietechniken und deren Anwendung zur Abbildung biologischer Proben konzentriert.

Zone. Daher werden diese Strahlen Doughnut-Moden (DMs),<sup>[5a, 11a, 18b, 19]</sup> Doughnut-Strahlen (doughnut beams, DBs),<sup>[13a, 18b, 20]</sup> HOLMs<sup>[21]</sup> oder (zylindrische oder optische) Vektorstrahlen<sup>[22]</sup> genannt. Der Einfachheit halber werden wir sie im Folgenden als DMs bezeichnen.

DMs sind elektromagnetische Felder und müssen daher, wie alle elektromagnetischen Felder, die Maxwell-Gleichungen erfüllen. Genauer gesagt muss die räumliche Beschreibung für jedes elektromagnetische Feld, das sich in einem homogenen Medium ohne den Einfluss einer Feldquelle (wie elektrischer Ladungen oder Ströme) ausbreitet, eine Lösung der Helmholtz-Gleichungen sein:

$$\begin{aligned} \left(\frac{\partial^2}{\partial x^2} + K^2\right) E(x, y, z) &= 0 \\ \left(\frac{\partial^2}{\partial y^2} + K^2\right) E(x, y, z) &= 0 \\ \left(\frac{\partial^2}{\partial z^2} + K^2\right) E(x, y, z) &= 0, \end{aligned} \quad (1)$$

wobei  $E$  das elektrische Feld und  $K$  die Wellenzahl ist.

Die Lösung  $E_g$  der Helmholtz-Gleichung stellt die allgemeinere räumliche Feldverteilung, die in einer Laserkavität generiert wird, dar:

$$E_g(x, y, z) = E_0 \frac{w_0}{w(z)} \exp\left(-\frac{x^2 + y^2}{w(z)^2}\right) \exp\left[i\left(kz - \eta(z) + \frac{k(x^2 + y^2)}{2R(z)}\right)\right], \quad (2)$$

wobei  $w(z) = w_0 \sqrt{1 + \frac{z^2}{z_0^2}}$  der Strahlquerschnitt,  $R(z) = z \left(1 + \frac{z_0^2}{z^2}\right)$  der Strahlradius,  $\eta(z) = \arctan \frac{z}{z_0}$  die Phasenkorrektur und  $E_0$  die Feldamplitude bei  $z = z_0$  ist.

Diese Lösung wird Gauß-Mode genannt wegen ihres Profils oder fundamentale Mode wegen ihrer räumlichen Ableitung. Es lassen sich zwei voneinander unabhängige Lösungsfamilien erhalten, die Hermite-Gauß(HG)-Moden  $E_{mn}^{\text{HG}}$ :

$$E_{mn}^{\text{HG}}(x, y, z) = w_0^{n+m} \frac{\partial^n}{\partial x^n} \frac{\partial^m}{\partial y^m} E_g(x, y, z) \quad (3)$$

und die Laguerre-Gauß(LG)-Moden  $E_{mn}^{\text{LG}}$ :

$$E_{mn}^{\text{LG}}(x, y, z) = k^n w_0^{m+2n} e^{ikz} \frac{\partial^n}{\partial z^n} \left(\frac{\partial}{\partial x} + i \frac{\partial}{\partial y}\right)^m [E_g(x, y, z) e^{-ikz}]. \quad (4)$$



Alfred J. Meixner erhielt sein Chemiediplom 1984 und promovierte 1988 an der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich. Er habilitierte in Physik an der Universität Basel und ist zurzeit Professor für physikalische Chemie und Direktor des Instituts für Physikalische und Theoretische Chemie an der Eberhard Karls Universität Tübingen. Sein Forschungsinteresse gilt der optischen Einzelmolekülspektroskopie und der Nahfeldmikroskopie.

DMs können generell als Linearkombination von HG- oder LG-Moden ausgedrückt werden:

$$E_{\text{DM}} = E_{10}^{\text{HG}} + E_{01}^{\text{HG}} = E_{01}^{\text{LG}}. \quad (5)$$

Sie können alle konventionellen Polarisationszustände annehmen, z. B. linear, zirkular oder elliptisch, jedoch können sie wegen ihrer Doughnutform auch in komplexeren Polarisationszuständen wie radialer oder azimuthaler Polarisierung vorliegen. Die Polarisationsvektoren der radial polarisierten DM (RPDM) sind wie die Speichen eines Rads angeordnet. Im Fall der azimuthal polarisierten DM (APDM) folgen die Vektoren dem Rand des Rades (Abbildung 1, rechts). Das gleichzeitige Auftreten von verschiedenen Ausrichtungen der Polarisierung macht diese DMs besonders attraktiv für mikroskopische Anwendungen, wie in diesem Aufsatz gezeigt werden soll.

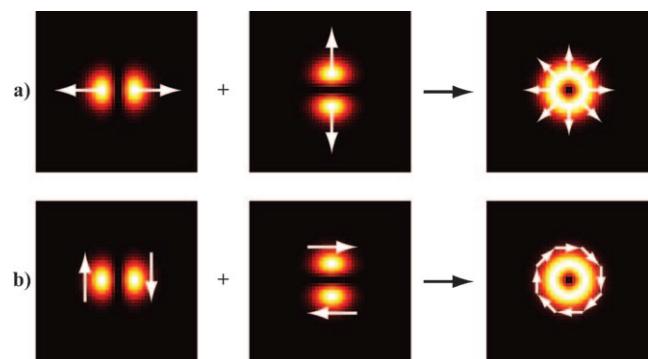


Abbildung 1. a) Addition einer radial polarisierten Doughnut-Mode (RPDM)  $E_{\text{RPDM}} = E_{10}^{\text{HG}} n_x + E_{01}^{\text{HG}} n_y$  und b) einer azimuthal polarisierten Doughnut-Mode (APDM)  $E_{\text{APDM}} = -E_{10}^{\text{HG}} n_y + E_{01}^{\text{HG}} n_x$  aus zwei entsprechenden Hermite-Gauß(HG)-Moden. Die radiale und azimuthale Polarisationsverteilung ist rechts angegeben.

Die Felder einer RPDM oder APDM ( $E_{\text{RPDM}}/E_{\text{APDM}}$ ) können auch in Form von HG-Moden ausgedrückt werden:

$$\begin{aligned} E_{\text{RPDM}} &= E_{10}^{\text{HG}} n_x + E_{01}^{\text{HG}} n_y \\ E_{\text{APDM}} &= -E_{10}^{\text{HG}} n_y + E_{01}^{\text{HG}} n_x, \end{aligned} \quad (6)$$

wobei  $n_{x,y}$  die Polarisationsvektoren entlang der  $x$ - und  $y$ -Achse sind.

Abbildung 1 zeigt die Intensitätsverteilungen für die RPDM bzw. APDM, die sich aus der Addition der entsprechenden HG-Moden erster Ordnung ergeben.

## 2.2. Erzeugung einer Doughnut-Mode: die Modenumwandlung

Doughnut-Moden werden durch Addition von HG-Moden erster Ordnung generiert (Abbildung 1). Diese Moden können in einer Laserkavität oszillieren, weshalb eine DM auch direkt in einem Laser erzeugt werden kann.<sup>[23]</sup> Besondere Aufmerksamkeit wurde der Erzeugung von RPDMs und APDMs in der Kavität geschenkt.<sup>[10a, 23d, 24]</sup> Aus

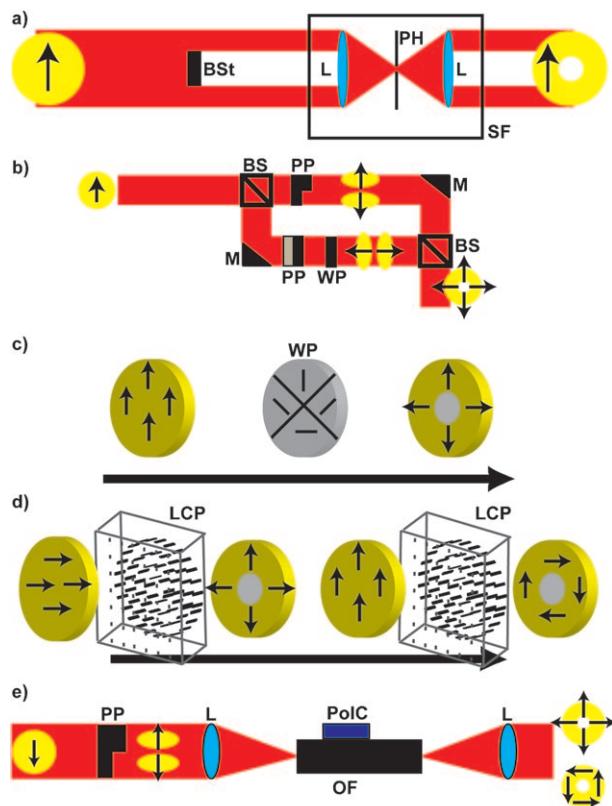
Gründen der experimentellen Flexibilität wurden aber auch verschiedene Methoden entwickelt, um DMs außerhalb der Laserkavität herzustellen, da in vielen Experimenten DMs zusammen mit normalen Gauß-Strahlen verwendet werden. Das optische Element, mit dem eine DM erzeugt wird, wird Modenumwandler (mode converter, MC) genannt, da es die Gauß- oder HG-Mode erster Ordnung, die ihn durchläuft, in eine DM umwandelt. Häufig führt der MC nicht nur zu einer DM, sondern bestimmt auch ihren Polarisationszustand. In den letzten 20 Jahren wurde eine Vielzahl von MCs entwickelt.

In Abbildung 2a–g, sind einige MCs schematisch dargestellt. Abbildung 2a, zeigt einen MC, der linear polarisierte DMs erzeugt. Er besteht einfach aus einer kreisförmigen Strahlblende auf der optischen Achse, die den zentralen Teil eines kollinierten Gauß-Strahls ausblendet, bevor er das Mikroskopobjektiv erreicht.<sup>[10a]</sup> Alternativ wurde eine optische Phasenplatte verwendet, bei der auf die zentrale kreisförmige Region eines planaren Glassubstrats ein dünner Film aus MgF<sub>2</sub> aufgedampft wird.<sup>[25]</sup> Diese Schicht verursacht eine  $\lambda/2$ -Verzögerung und kehrt das Vorzeichen der Wellenamplitude im Vergleich zur umgebenden ringförmigen Region um.

RPDMs und APDMs können z. B. auch interferometrisch erhalten werden (Abbildung 2b). In einem der Arme wird die Polarisierung um 90° gedreht und vor der Rekombination wird ein geeigneter Phasensprung hinzugefügt. Auf diese Weise können monochromatische Strahlen von hoher Qualität hergestellt werden, wobei häufig ein Fabri-Perot(FP)-Interferometer zur Modenreinigung verwendet wird. Die Technik eignet sich sowohl um eine HG<sub>01</sub>-Mode<sup>[26]</sup> als auch um zirkular<sup>[26]</sup> oder linear<sup>[27]</sup> polarisierte Gauß-Moden in eine RPDM umzuwandeln. Eine APDM kann auch in eine RPDM umgewandelt werden (oder umgekehrt).<sup>[18a]</sup> Ebenso kann eine linear polarisierte DM interferometrisch erhalten werden.<sup>[28]</sup>

Abbildung 2c zeigt die Verwendung von Verzögerungsplatten zur Umwandlung eines Gauß-Strahls in DMs unterschiedlicher Polarisierung, z. B. mit radialer oder azimuthaler Polarisierung. Es werden verschiedene Arten von Verzögerungsplatten verwendet, die aus mehreren Segmenten bestehen. Der einfallende linear polarisierte Strahl durchläuft die segmentierte Verzögerungsplatte, wodurch die Polarisierung lokal gedreht wird. Die Umstellung zwischen einer RPDM und einer APDM erfolgt durch Drehen der Verzögerungsplatte um 90°. Der einfachste dieser MCs besteht aus einem  $\lambda/2$ -Wellenplättchen mit vier Quadranten.<sup>[5b, 19b]</sup> Andere, ähnliche Systeme verwenden z. B. segmentierte Wellenplättchen aus photonischen Kristallen,<sup>[29]</sup>  $\lambda/2$ -Plättchen mit acht Segmenten<sup>[30]</sup> oder spiralartige Verzögerungsplatten.<sup>[31]</sup> Die Strahlqualität kann durch anschließende Verwendung eines FP-Interferometers oder eines Raumfilters<sup>[11a]</sup> verbessert werden. Alle bisher vorgestellten MC sind mehr oder weniger monochromatisch, d. h. für jede Wellenlänge muss eine andere Verzögerungsplatte verwendet werden.

Um dieses Problem zu umgehen und z. B. mit einem MC bei mehreren Wellenlängen zu arbeiten oder eine polychromatische DM herzustellen, werden Flüssigkristallzellen (LC) oder optische Fasern (OF) verwendet. LCMCs können auf



**Abbildung 2.** Schematische Beschreibung von fünf Modenumwandlern (MCs): a) Zur Erzeugung einer linear polarisierten Doughnut-Mode wird eine Strahlblende verwendet, um den zentralen Teil eines linear polarisierten Gauß-Strahls auszublenden. Der Strahl wird durch einen Raumfilter (SF) geleitet, um die Strahlqualität zu erhöhen. Der SF besteht aus einer Lochblende (PH) zwischen zwei Linsen (L). b) Interferometrischer Aufbau zur Erzeugung einer RPDM. Ein linear polarisierter Gauß-Strahl wird von einem Strahlteiler (BS) gleichmäßig auf die beiden Arme eines Interferometers geteilt. In jedem Arm wird der Gauß-Strahl in eine HG-Mode erster Ordnung umgewandelt, indem er eine Phasenplatte (PP) durchläuft. In einem der beiden Arme durchläuft der Strahl ein Halbwellenplättchen (WP), um die Polarisierung um 90° zu drehen. Schließlich werden die Strahlen durch einen zweiten BS rekombiniert, und es ergibt sich eine RPDM. c) Ein Halbwellenplättchen (WP) mit vier geeignet ausgerichteten Quadranten kann einen Gauß-Strahl in eine RPDM umwandeln. Durch Drehen des WP um 90° kann eine APDM erzeugt werden (hier nicht gezeigt). d) Eine Flüssigkristallplatte (LCP) nutzt den „twisted nematic effect“ aus, um einen linear polarisierten Gauß-Strahl entweder in eine RPDM oder eine APDM umzuwandeln. Die schwarzen Linien geben die Orientierung der LC-Domänen an. e) Herstellung einer RPDM/APDM über eine optische Multimode-Faser (OF). Ein linear polarisierter Gauß-Strahl wird in eine HG-Mode erster Ordnung umgewandelt und mit einer Linse (L) in die OF fokussiert. Der Polarisationskonverter (PolC), ein Element, das die OF verdreht und drückt, generiert am Ende der OF entweder eine RPDM oder eine APDM. Der resultierende Strahl wird von einer Linse kollimiert. Es gilt zu beachten, dass die OF mehr als eine RPDM/APDM gleichzeitig bei mehreren Wellenlängen erzeugen kann.

verschiedene Wellenlängen eingestellt werden. Ein LCMC kann aus einer zweilagigen LC-Zelle bestehen. In einer Lage sind die LC-Moleküle alle in einer vorgegebenen Richtung orientiert, während die Moleküle in der zweiten Lage in verschiedenen Sektoren unterschiedliche Orientierungen

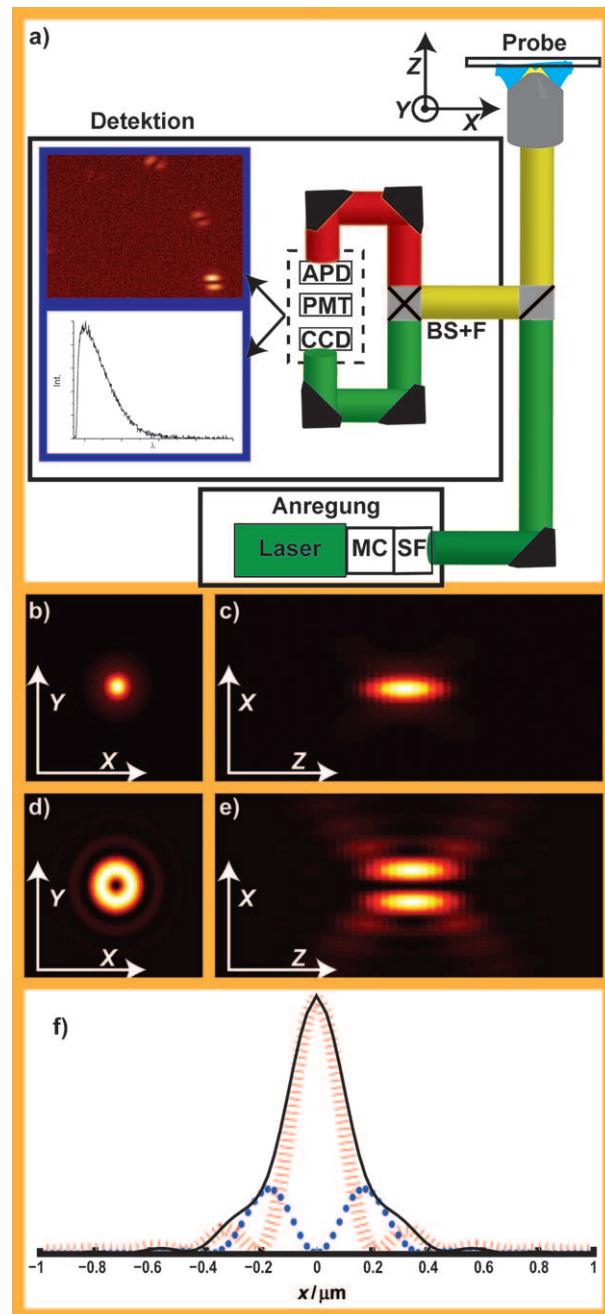
haben, die alle zusammen einen Ring ergeben.<sup>[32]</sup> Eine schematische Darstellung eines LCMC zeigt Abbildung 2d. Ein LCMC nutzt den „twisted nematic effect“ in Kombination mit dem  $\lambda/2$ -Wellenplatteneffekt in LC-Bauteilen aus, die räumlich variable Anpassungsschichten haben. Der LCMC kann als räumlicher Lichtmodulator (spatial light modulator, SLM) angesehen werden. Es ist wichtig zu erwähnen, dass diese Art von MCs, und generell SLMs, kommerziell erhältlich sind. LC-Elemente wurden auch verwendet, um hologrammbasierte MCs<sup>[34]</sup> herzustellen, wobei eine vorher bekannte Technik weiterentwickelt wurde, die es erlaubt, komplexe Felder unterschiedlicher Geometrien zu produzieren.<sup>[35]</sup>

Potentiell interessanter zur Herstellung von wellenlängenunabhängigen oder polychromatischen DMs in einem kommerziellen Mikroskop sind MCs, die auf Multimode-Fasern basieren.<sup>[22b, 24f, 36]</sup> In einer solchen Faser kann sich eine ganze Reihe unterschiedlich polarisierter Moden frei ausbreiten. Die MC-Strategie kann in zwei Stufen zusammengefasst werden. Im ersten Schritt wird die Zahl der sich in der Faser fortpflanzenden Moden begrenzt, indem ein passender Cut-Off gewählt wird und der Strahl auf entsprechende Weise in die Faser eingekoppelt wird, z.B. durch Fokussierung des Strahls nachdem er eine  $\lambda/2$ -Verzögerungsplatte mit zwei Segmenten durchlaufen hat. Im zweiten Schritt wird die geeignete Mode ausgewählt, z.B. durch Verdrehen und Drücken der Faser an einem bestimmten Punkt.<sup>[36b,c]</sup> Eine schematische Darstellung eines solchen MC gibt Abbildung 2e. Natürlich ist es nicht möglich, in diesem Aufsatz alle MCs vorzustellen, die zur Herstellung einer DM entworfen wurden; siehe dazu z.B. Lit. [37].

### 2.3. Fokussieren von Doughnut-Moden unterschiedlicher Polarisation

Die experimentelle Anwendung von DMs in der Mikroskopie ist einfach und unkompliziert. Als praktisches Beispiel dafür, wie die Erzeugung und Verwendung von DMs kombiniert werden kann, zeigt Abbildung 3a ein herkömmliches konfokales Mikroskop. Sowohl der Fluoreszenz- als auch der Reflexionsstrahlengang sind schematisch dargestellt. Die MC ist dabei das einzige Element, das benötigt wird, um DMs in ein normales konfokales Mikroskop einzukoppeln. Mehrere MCs erfordern nur wenig Platz, insbesondere, wenn sie auf Flüssigkristallen oder auf Verzögerungsplatten mit mehreren Bereichen basieren. Die Anwendung von DMs erfordert jedoch auch Kenntnis ihrer optischen Eigenschaften im Fokus einer Linse mit hoher numerischer Apertur (NA). Die elektromagnetischen Felder, die beim Fokussieren von DMs mit Linsen hoher NA erhalten werden, wurden sowohl theoretisch als auch experimentell (z.B. Lit. [5a, 22a, 23c, 38]) untersucht. Daraus resultiert eine Reihe experimenteller und theoretischer Studien, die sich gegenseitig zu immer ausgefeilteren theoretischen<sup>[22d, 39]</sup> und ausgeklügelten experimentellen<sup>[22c, 40]</sup> Arbeiten inspirieren.

Der allgemeine Ansatz zur Berechnung der Feldverteilung in der Nähe des fokalen Punktes eines kollimierten Strahls, der von einer aplanatischen Linse fokussiert wird, ist



**Abbildung 3.** a) Schematische Darstellung eines konfokalen Mikroskops: Das Licht eines Lasers durchläuft einen Modenumwandler (MC) und einen Raumfilter (SF) und wird auf die Probe fokussiert. Das vollständige Signal, das von der Probe kommt, wird von derselben Optik gesammelt und durch einen Strahltreiber (BS) in den Detektionsstrahlengang geführt. Durch Kombination eines BS mit geeigneten Filtern kann das elastisch gestreute Licht (grüner Strahl) vom Fluoreszenz-/Lumineszenz- und nicht-elastisch gestreuten Licht (roter Strahl) getrennt werden. Schließlich kann das Signal der Probe in Form von Spektren oder optischen Bildern durch jegliche Detektorkombination von CCD-Kamera, Avalanche-Photodiode (APD) und Photondetektor (PMT) aufgenommen werden. b, d) XY-Projektion der berechneten fokalen Intensitätsverteilung einer RPDM bzw. einer APDM. Die Bildgröße ist jeweils  $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ . c, e) ZX-Projektion der berechneten fokalen Intensitätsverteilung einer RPDM bzw. einer APDM. Die Bildgröße ist jeweils  $4.5 \times 2 \mu\text{m}^2$ . f) Normalisierte Querschnitte der Intensitätsverteilung einer RPDM mit der Gesamtintensität (schwarze durchgezogene Linie), der longitudinal polarisierten Komponente (rote gestrichelte Linie) und der transversal polarisierten Komponente (blaue gepunktete Linie). Alle in dieser Abbildung gezeigten Simulationen wurden für  $\text{NA} = 1.4$  berechnet.

in Lit. [41] beschrieben. Richards und Wolf gingen von der allgemeinen Annahme aus,<sup>[42]</sup> dass die elektrische (und ebenso die magnetische) Feldverteilung eines kollimierten Strahls, der von einer allgemeinen aplanatischen Linse fokussiert wird, als gewichtete Integralsumme ebener Wellen beschrieben werden kann, die unter einem gegebenen Winkel aus auf den Fokus zulaufen.

Eine genaue Beschreibung dieser Berechnungen geht über das Ziel dieses Aufsatzes hinaus und ist z.B. in Lit. [41, 42] zu finden. Der spezielle Fall der Fokussierung von DMs durch ein Objektiv mit hoher *NA* kann ebenso in der Literatur gefunden werden.<sup>[6a, 19a, 22a]</sup> Die quantitativen Ergebnisse, die wir hier zur Fokussierung von RPDMs und APDMs vorstellen, wurden durch kritische Auseinandersetzung mit der Theorie nach Lit. [19a] erhalten.

Die berechneten Intensitätsprofile einer RPDM und einer APDM nach Fokussierung mit einem Objektiv hoher *NA* (*NA* = 1.4) sind in Abbildung 3b–e gezeigt. Bei der Fokussierung einer RPDM mit einer Linse hoher *NA* ändert sich die Intensitätsverteilung in der Fokusebene, wobei die klassische doughnutförmige Intensitätsverteilung (siehe Abbildung 1a) zu einer „Gauß-artigen“ wird, wie in Abbildung 3b dargestellt. Dieses Profil ist schärfer als das eines konventionellen Gauß-Strahls, wodurch eine kleine Verbesserung der optischen Auflösung erreicht wird (siehe Abbildung 3f und Abschnitt 3).<sup>[5a–c]</sup> Dieser Formänderung liegt eine Aufspaltung in zwei Polarisationskomponenten zugrunde. Die erste Komponente ist entlang der optischen Achse polarisiert (longitudinale Komponente), während die zweite in der Bildebene polarisiert ist (laterale Komponente). Die relative Intensität der beiden Komponenten zueinander hängt stark von der *NA* der fokussierenden Linse ab, wobei gilt, je größer die *NA*, desto stärker ist die longitudinale Komponente. Ein weiterer Parameter ist die Größe der zentralen dunklen Zone der DM vor der Fokussierung, die z.B. durch eine kreisförmige Strahlblende beeinflusst werden kann.

Die Kombination einer großen zentralen dunklen Zone mit einer hohen *NA* führt zu besonders starken longitudinal polarisierten Feldern, weshalb die RPDM für Anwendungen wie die aperturlose Nahfeldmikroskopie besonders geeignet ist, wo ein starkes Anregungsfeld parallel zur optischen Achse benötigt wird. Bei einer hohen *NA* wird die laterale Komponente einer RPDM von der longitudinalen zwar dominiert, aber nicht vollständig unterdrückt, weshalb eine RPDM auch zur Untersuchung von 3D-Strukturen im Lichtmikroskop eingesetzt werden kann.

Die APDM erscheint weniger flexibel in ihrer Form zu sein, und ihre Feldverteilung ändert sich beim Fokussieren nicht dramatisch. Ihr Feld bleibt parallel zur Fokusebene, und das Intensitätsprofil behält die Ringform stets bei, unabhängig von der *NA* der Linse oder der Größe der zentralen dunklen Zone des kollimierten Strahls. Eine APDM eignet sich auch nicht so gut wie eine RPDM zur Abbildung von 3D-Strukturen, weil ihr eine longitudinale Komponente fehlt. Sie ist aber hervorragend dazu geeignet, Vorgänge an speziellen planaren Grenzflächen, wie z.B. zwischen zwei Dielektrika, zu untersuchen.<sup>[43]</sup>

### 3. Verbesserung der optischen Auflösung mit Doughnut-Moden in der Lichtmikroskopie

Die Lichtmikroskopie und -spektroskopie ist ein einzigartiges Werkzeug, um die physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften einer Probe zu untersuchen. Darüber hinaus ist es eine der am wenigsten invasiven Abbildungsmethoden und die einzige, die für die Abbildung lebender Zellen geeignet ist. Trotz all dieser Vorteile bietet die Lichtmikroskopie jedoch ein geringeres Auflösungsvermögen als z.B. die Kraftmikroskopie (AFM) oder die Elektronenmikroskopie (EM). Daher wurden verschiedene Ansätze entwickelt, um die optische Auflösung der Lichtmikroskopie mithilfe von DMs zu verbessern.

In der Lichtmikroskopie wird die optische Auflösung teilweise durch die Größe des Anregungsstrahls im Fokus bestimmt, d.h. seine Punktbildfunktion (point spread function, PSF). Der wichtige Einfluss des Detektionssystems auf die Auflösung würde den Rahmen dieses Aufsatzes übersteigen und wird darum hier vernachlässigt. Die Größe  $\delta_{x,y,z}$  des fokalen Punkts, der für einen Gauß-Strahl mit einer Linse hoher *NA* erhalten wird, ist beugungsbegrenzt und kann durch das Gesetz von Abbe beschrieben werden:

$$\delta_x, \delta_y = \frac{\lambda}{2NA}; \delta_z = \frac{2n\lambda}{NA^2}, \quad (7)$$

wobei  $\lambda$  die Wellenlänge des Anregungsstrahls, *NA* die numerische Apertur der fokussierenden Linse und *n* der Brechungsindex des umgebenden Mediums ist.  $\delta_{x,y,z}$  sind proportional zu den Halbwertsbreiten (full widths at half maximum, FWHMs) der Intensitätsprofile des Strahls entlang der lateralen und longitudinalen Richtung, die ein direktes Maß für die optische Auflösung sind. Für Anwendungen mit 3D-Bildstapeln ist die longitudinale Auflösung  $\delta_z$  besonders wichtig. Für die meisten hier diskutierten Anwendungen ist jedoch hauptsächlich die laterale Auflösung  $\delta_{x,y}$  von Interesse. Um einen Vergleich unabhängig von der Wellenlänge zu ermöglichen, kann alternativ auch die Fläche des fokalen Punkts *A* in Einheiten des willkürlichen Faktors *f* der quadrierten Wellenlänge  $\lambda^2$  angegeben werden, wie es teilweise in der hier zitierten Literatur üblich ist:<sup>[5a–c]</sup>

$$A = \frac{(\text{FWHM})^2 \pi}{4} = f\lambda^2. \quad (8)$$

Zum besseren Vergleich geben wir im Folgenden sowohl den Wert für die FWHMs als auch für die Fläche in Einheiten von  $\lambda^2$  an. DMs in verschiedenen Polarisationszuständen tragen zur Verbesserung der lateralen Auflösung in der Lichtmikroskopie bei. Linear polarisierte DMs wurden in der STED-Mikroskopie verwendet. Diese nicht beugungsbegrenzte Lichtmikroskopietechnik nutzt die physikalisch-chemischen Eigenschaften von Farbstoffen (z.B. fluoreszierenden Proteinen), mit denen eine Probe markiert wurde, und kann nur in der Punktrastermikroskopie (Strahl- oder Proben scanning) eingesetzt werden. Mit STED kann eine Auflösung von etwa 20 nm ( $8 \times 10^{-4} \lambda^2$  bei 633 nm) sogar für biologische Proben erreicht werden.<sup>[44]</sup> Das Prinzip der Methode soll hier kurz beschrieben werden, wobei wir für wei-

tere Details auf die Literatur verweisen.<sup>[2,44]</sup> Zuerst wird ein Gauß-förmiger Anregungsstrahl auf die Probe fokussiert, und alle Farbstoffmoleküle werden in den angeregten Zustand überführt. Kurz darauf wird ein zweiter gepulster Strahl, der STED-Puls, auf denselben Punkt fokussiert. Die Wellenlänge dieses zweiten Strahls ist so gewählt, dass er ein Feld erzeugt, das genau der Energiedifferenz zwischen einem Schwingungsniveau im angeregten Zustand und einem im Grundzustand entspricht. In der Folge kommt es zu stimulierter Emission, und die Besetzungsdichte im angeregten Zustand nimmt ab. Im Detektionsstrahlengang wird das Licht, das bei der Frequenz des STED-Pulses emittiert wird, herausgefiltert, sodass nur das Fluoreszenzlicht detektiert wird. Mit anderen Worten wird ein nicht-lineares System erzeugt, bei dem eine kleine Anzahl von Molekülen in der limitierten (kleinen) Region des beugungsbegrenzten fokalen Punkts hell (aktiv) bleibt, während alle anderen dunkel (inaktiv) sind.<sup>[2]</sup>

Die Intensität, die Form,<sup>[45]</sup> die Pulsfrequenz und die Dauer des STED-Pulses sind Parameter, die in Betracht gezogen und angepasst werden müssen. Die Form des STED-Pulses wird so gewählt, dass er mit dem Anregungsstrahl, abgesehen von einer kleinen Region in seinem Zentrum, vollständig überlappt. Hierfür sind insbesondere linear polarisierte DMs geeignet<sup>[45]</sup> und wurden auch tatsächlich als STED-Puls verwendet, z.B. in Lit. [46].<sup>[46]</sup> Eine höhere Intensität des STED-Pulses führt zu einer effektiveren Entvölkering des angeregten Zustands über stimulierte Emission und verkleinert gleichzeitig die zentrale dunkle Zone der fokussierten DM. Damit lässt sich über die Intensität des STED-Pulses prinzipiell die Auflösung einstellen, da Fluoreszenz nur im zentralen Punkt der DM auftritt, der auf eine Größe von wenigen Nanometern reduziert werden kann. Solange praktische Probleme wie molekulares Photobleichen, das durch die hohe Intensität des STED-Pulses verursacht werden kann, sowie die Detektionsempfindlichkeit keine Rolle spielen, ist der Nachweis einzelner Moleküle mit Nanometergenauigkeit im Prinzip möglich. Um die Beugungsgrenze auch entlang der optischen Achse zu umgehen, wurde vorgeschlagen, eine zirkular polarisierte DM als STED-Puls<sup>[45]</sup> zu verwenden oder STED und die 4pi-Mikroskopie<sup>[47,48]</sup> zu kombinieren. In einem besonderen Fall wurde eine mit einem paraboloiden Spiegel fokussierte RPDM als STED-Puls vorgeschlagen, da so ein scharfer und fast kugelförmiger zentraler dunkler Bereich im Fokus generiert werden kann.<sup>[49]</sup> Auf ähnliche Weise wurden DMs in Lit. [50] angewendet. In diesem Fall regt der STED-Puls zeitweise ein photoschaltbares Protein in ein nicht-fluoreszierendes Energieniveau an.<sup>[50]</sup>

Für Anwendungen in der konventionellen Lichtmikroskopie ist radial polarisiertes Licht von besonderem Interesse. Für  $NA \geq 1$  ist die longitudinale Komponente einer fokussierten RPDM intensiver als die transversale. Darum sprechen wir hier bei  $\geq 1$  von einer hohen  $NA$ , unterhalb dieses Wertes dagegen von einer niedrigen  $NA$ , obwohl dies nicht als generelle Definition missverstanden werden sollte. Das scharfe Fokussieren einer RPDM mit einem fokussierenden Element hoher  $NA$  erzeugt einen kleineren fokalen Punkt<sup>[5a-c]</sup> als im Fall von linear polarisiertem Licht<sup>[5a]</sup> ( $0.311\lambda^2$  vgl. mit  $0.26\lambda^2$  oder 400 vgl. mit 360 nm bei 633 nm und  $NA = 1.0$ ).

Die longitudinale Komponente wird dabei sogar auf eine noch kleinere Fläche von  $0.16\lambda^2$  (290 nm bei 633 nm und  $NA = 1.0$ ) fokussiert, wie sowohl theoretisch als auch experimentell gezeigt werden konnte.<sup>[5a,b]</sup> Die größte Verbesserung in der Auflösung wird mit einer Ringblende in der hinteren Fokalebene der Linse erreicht ( $0.11\lambda^2/210$  nm bei 633 nm und  $NA = 1.0$ ).<sup>[5a,b]</sup> Verglichen mit der Auflösung, die bei konventioneller Beleuchtung erreicht werden kann, entsprechen diese Werte einer Verbesserung um einen Faktor 2. Wird ein Parabolspiegel als fokussierendes Element verwendet (mit einer besonders hohen  $NA = 1$  für ein an Luft fokussierendes Element), findet man eine etwas andere Feldverteilung im Fokus. Es wurde gezeigt, dass der fokale Punkt  $0.134\lambda^2$  (260 nm bei 633 nm) misst.<sup>[5c]</sup> Unseres Wissens nach ist dies der kleinste Fokus, der bisher mit einem an Luft fokussierenden Element erreicht werden konnte. Ein weiterer Vorteil des Parabolspiegels ist, dass nach Berechnungen die longitudinale Komponente etwa 14-mal stärker ist als die transversale,<sup>[6b]</sup> während für ein Objektiv hoher  $NA$  lediglich ein Faktor von 2–3 erreicht wird.<sup>[5b,6a]</sup> Es konnte gezeigt werden, dass eine kreisförmige symmetrische plasmonische Linse als fokussierendes Element die Auflösung weiter verbessert.<sup>[5d,e]</sup> Obwohl die experimentellen Werte die theoretisch vorhergesagte Grenze noch nicht erreicht haben, sind die Ergebnisse sehr vielversprechend.

Das schärfere Fokussieren von Licht radialer Polarisation hat in letzter Zeit einige Anwendungen zur Verbesserung der lateralen Auflösung in verschiedenen Bereichen der Mikroskopie gefunden. In der Fluoreszenzmikroskopie mit interner Totalreflexion (total internal reflection, TIRF microscopy) spielt nur die longitudinale Komponente des fokussierten Feldes eine Rolle. Darum sind die kleinere fokale Fläche, die höhere Feldstärke und die Punktformigkeit der longitudinalen Komponente der RPDM von Vorteil, im Vergleich zu der relativ schwachen und zweiflügeligen  $z$ -Komponente eines linear polarisierten Strahls. Diese Vorteile wurden sowohl in der Theorie als auch im Experiment für die TIRF-Mikroskopie untersucht.<sup>[51]</sup> Auch in der kohärenten Anti-Stokes-Raman-Streuung (coherent anti Stokes Raman scattering, CARS) wurde eine erhöhte laterale Auflösung zusammen mit einer Sensitivität für unterschiedliche Molekülorientierungen festgestellt.<sup>[52]</sup> Daher sollte die Kombination von linearer und radialer Polarisation ermöglichen, die 3D-Orientierung von Molekülen mit CARS vollständig zu bestimmen.<sup>[52]</sup>

Wie oben bereits diskutiert, kann die optische Auflösung mit radial polarisiertem Licht verbessert werden, wenn ein fokussierendes Element hoher  $NA$  verwendet wird. Erstaunlicherweise haben Tang et al. gezeigt, dass dies auch mit einer niedrigeren  $NA$  von 0.9 möglich ist.<sup>[53]</sup> In diesem Fall ist die PSF der RPDM im Fokus doughnutförmig und sogar größer als die eines Gauß-Strahls. Folglich wäre die optische Auflösung bei konventioneller Detektion sogar geringer. Die Autoren führten jedoch im Detektionsstrahlengang eine Modenumwandlung zu linearer Polarisation durch, was ihnen die Verwendung einer sehr viel kleineren Lochblende ermöglichte. Damit wurde sowohl die Konfokalität des Systems als auch die laterale Auflösung erhöht, letztere sogar soweit, dass sie die einer rein linearen Polarisation übertraf.<sup>[53]</sup>

Weiter unten stellen wir in diesem Aufsatz einige Anwendungen von DMs vor, die es ermöglichen, Informationen zu erhalten, die mit herkömmlichen Mikroskopiemethoden nicht zugänglich sind, weil sie unterhalb der Beugungsgrenze liegen. Dabei ist es nicht einmal nötig, die klassische Beugungsgrenze zu brechen oder zu verbessern (siehe Abschnitte 5–7).

## 4. Mikroskopietechniken zur Bestimmung der Orientierung einzelner Moleküle

In den letzten Jahrzehnten hat die Einzelmolekülmikroskopie und -spektroskopie eine Vielzahl von Anwendungen in der (physikalischen) Chemie, Physik und Biologie gefunden. Eine wichtige Rolle spielt dabei die Bestimmung der Orientierung des molekularen Dipols und damit des Moleküls selbst. Die Kenntnis hiervon ist wichtig z. B. für exakte Abstandsmessungen über die Effizienz des resonanten Förster-Energietransfers (FRET). Darüber hinaus verändern sich die Lebenszeit und die Emissionsintensität mit der Molekülorientierung z. B. an einer Grenzfläche.<sup>[54]</sup> Bei Molekülen, die in Polymere eingebettet sind, lassen Orientierungsveränderungen Dynamiken der Umgebungsmatrix erkennen. Die Ausrichtung von Markierungsfarbstoffen kann Veränderungen in Proteinen und Peptiden abbilden und so Einsicht in die biologische Funktionsweise molekularer Maschinen gewähren. Natürlich kann die Orientierung nur auf der Ebene einzelner Moleküle bestimmt werden oder wenn eine Gruppe von Molekülen nicht willkürlich orientiert ist (entgegengesetzte Übergangsdipolmomente würden sich gegenseitig aufheben). Darum ist für die meisten Anwendungen höchste Sensitivität nötig.

In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedene Techniken zur Orientierungsbestimmung einzelner Dipole entwickelt. Wir sind überzeugt, dass DMs große Verbesserungsmöglichkeiten für die Einzelmolekülmikroskopie und -spektroskopie bieten. Um dies zu betonen, geben wir einen allgemeinen Überblick über alternative Methoden zur Orientierungsbestimmung, mit ihren Vor- und Nachteilen, sowie ihren Grenzen. Zuerst fassen wir die etablierten Techniken wie die defokussierte Abbildung und polarisationsempfindliche Techniken zusammen. Anschließend beschäftigen wir uns mit dem Einfluss der DMs.

Um die Diskussion über die Orientierung eines Dipolmoments zu erleichtern, sollen die für die genaue Bestimmung der Orientierung notwendigen Winkel eingeführt werden. Generell muss man zwei Winkel unterscheiden, wenn man die 3D-Orientierung eines Nanoobjekts definieren will. Zum einen tritt die Komponente  $\phi$  in der Probenebene auf, zum anderen der Winkel  $\theta$  zwischen dem Objekt und der optischen Achse (Abbildung 4). Auf diese Weise lassen sich sowohl

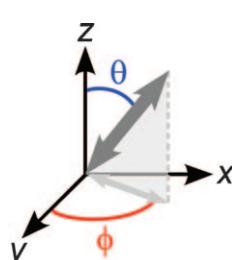


Abbildung 4. Schematische Darstellung für die Bestimmung der 3D-Orientierung eines Dipols mit dem Winkel  $\phi$  in der Ebene und  $\theta$  senkrecht dazu.

die Orientierung des Absorptions- als auch des Emissionsdipolmoments beschreiben, die beide als Maß für die molekulare Orientierung dienen können. Es sollte an dieser Stelle vielleicht noch darauf hingewiesen werden, dass für die Absorption von Licht die Polarisationsrichtung mit der Orientierung des Absorptionsdipolmoments übereinstimmen muss. In ähnlicher Weise ist das emittierte Licht in der Richtung der Emissionsdipolorientierung polarisiert.

### 4.1. Defokussierte Abbildung

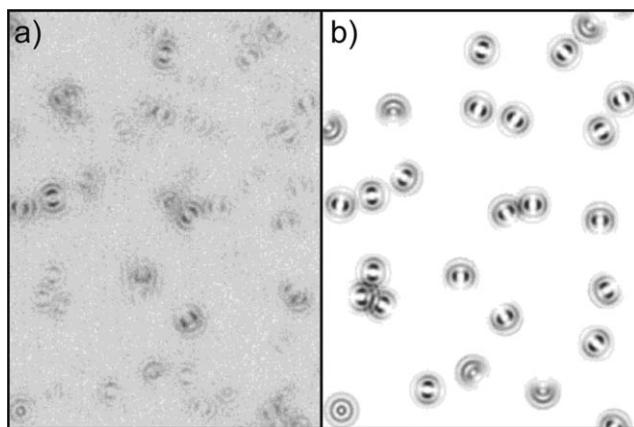
Die Aufnahme leicht defokussierter Bilder ermöglicht es in vielen Fällen, zusätzliche Informationen zu erhalten, die unter scharfer Fokussierung nicht direkt zugänglich sind, wie z. B. die Orientierung einzelner Dipole. Vor der Einführung in die Weitfeldmikroskopie wurde das Konzept mit Spiegelobjektiven in der TIRF-Mikroskopie verwendet. Ein genereller Nachteil von defokussierten Methoden ist jedoch das schlechtere Signal-Rausch-Verhältnis, das generell zu einer geringeren Empfindlichkeit führt. Hinzu kommt, dass durch die Defokussierung größere Muster als bei fokussierten Techniken entstehen und darum die einzelnen Objekte für eine saubere Abbildung weiter voneinander entfernt sein müssen. Trotzdem kann, solange das Signal intensiv genug ist, die Lokalisierung deutlich präziser bestimmt werden als mit fokussierten Techniken.<sup>[8c,55]</sup>

Es wurden unterschiedliche defokussierte Methoden entwickelt. In der ersten wurde ein Spiegelobjektiv zur Untersuchung der Orientierung einzelner Terrylenmoleküle bei tiefen Temperaturen verwendet.<sup>[8a,b]</sup> Die ersten Orientierungsinformationen bei Raumtemperatur wurden mittels TIRF-Mikroskopie erhalten, wobei leichte Aberrationen, verursacht durch einen dünnen Wasserfilm auf der Probe, ausgenutzt wurden. So konnte die 3D-Molekülorientierung mit einer großen Genauigkeit von 1–2° auf einer Zeitskala von 100 ms bestimmt werden.<sup>[8c,d]</sup> Die Weiterentwicklung der Technik führte zur Kombination von fokussierter und leicht defokussierter Abbildung und Bestimmung der 3D-Orientierung.<sup>[8e]</sup>

In einer biologischen Anwendung der defokussierten TIRF-Mikroskopie wurden Ligand-Protein-Wechselwirkungen mit Video-Raten abgebildet.<sup>[56]</sup> Außerdem weist die Technik, trotz der geschilderten Einschränkungen, eine erstaunliche Empfindlichkeit auf, die sogar die Detektion der Lumineszenz einzelner Ionen erlaubt.<sup>[57]</sup>

Später wurde das vorgestellte Konzept des Defokussierens auch in der Epifluoreszenzmikroskopie angewendet.<sup>[8f,g]</sup> Im Zweidimensionalen bilden die erhaltenen zweiflügeligen Muster dabei direkt die Dipolorientierung ab. Ein experimentelles defokussiertes Weitfeldbild einzelner Cy5-Moleküle zeigt Abbildung 5, zusammen mit den angepassten berechneten Mustern. Ein Nachteil der Technik ist ihre relativ geringe Genauigkeit von 15° für den Winkel in der Ebene ( $\phi$ ) und von 30° für den Winkel senkrecht zur Ebene ( $\theta$ ).<sup>[8f,g,58]</sup>

Die defokussierte Weitfeldmikroskopie konnte außerdem zur Klärung der Fortbewegungsart von Myosin V entlang von Aktin beitragen.<sup>[59a]</sup> Der interessierte Leser sei für andere Beispiele von Orientierungsstudien mit defokussierter Weit-



**Abbildung 5.** Defokussiertes ( $1 \mu\text{m}$ ) Weitfeld-Epifluoreszenzbild (Ausschnitt) einzelner Cy5-Moleküle. a) Experimentelles Bild, b) zusammengesetztes berechnetes Bild mit der Darstellung identifizierter Moleküle und ihrer zugeordneten Muster. Die Fitprozedur ermöglicht die Bestimmung der 3D-Orientierung für jedes Molekül. Abdruck nach Lit. [8g]. Copyright 2004, mit Genehmigung der American Chemical Society.

feldmikroskopie auf Einzelmolekül niveau an die Literatur verwiesen.<sup>[58,59]</sup>

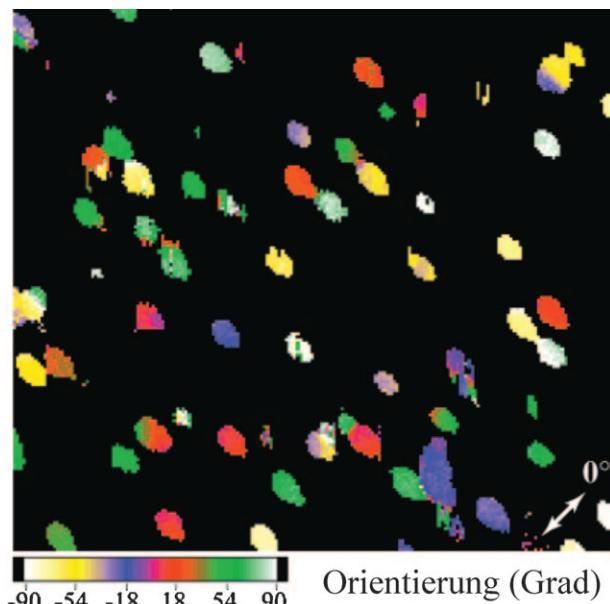
#### 4.2. Polarisationsaufgelöste Techniken

Die Wechselwirkung von Licht und einzelnen Molekülen hängt von der relativen Orientierung der Anregungspolarisation und des molekularen Dipols ab. Die Messung der Polarisationsrichtung des Anregungslichts und/oder des emittierten Lichts ermöglicht daher, die Orientierung des Absorptions- und/oder Emissionsdipolmoments zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurden unterschiedliche Methoden entwickelt, die in verschiedenen Wissenschaftsbereichen weitverbreitete Anwendungen gefunden haben.

Unter Umgebungsbedingungen wurden einzelne Moleküle zuerst mittels optischer Nahfeldmikroskopie beobachtet.<sup>[9a]</sup> Durch das Angleichen der experimentellen Muster mit theoretisch vorhergesagten<sup>[9a]</sup> konnte, zusammen mit einer hohen Lokalisierungsgenauigkeit von  $1 \text{ nm}$  und auf einer Zeitskala von  $10^{-2}$ – $10^3 \text{ s}$ , die 2D-Orientierung mit einer Zuverlässigkeit von wenigen Grad bestimmt werden.<sup>[9b]</sup>

Die Messung der Absorptionsdipolorientierung durch Modulation der Anregungspolarisation ist weit verbreitet, um die Orientierung einzelner Moleküle zu bestimmen. Die Arbeiten reichen von Orientierungsstudien mit einer sehr hohen Genauigkeit von  $0.2^\circ$ <sup>[9d]</sup> oder in Matrices bei  $1.8 \text{ K}$ <sup>[9e]</sup> bis zu sich bewegenden Proteinen.<sup>[60]</sup> Weston und Goldner entwickelten eine Variante der Technik, bei der die Orientierung in den erhaltenen Bildern farbkodiert wird. Rotierende Moleküle weisen dabei eine Farbveränderung auf (Abbildung 6).<sup>[9e]</sup>

Um die vollständige 3D-Orientierung zu bestimmen, wurde die Modulation der Polarisation mit der TIRF-Mikroskopie kombiniert. Ein Nachteil ist jedoch die geringe Auflösung für Dipole mit Orientierungen fast parallel oder senkrecht zur Bildebene ( $\theta \approx 0, 90^\circ$ ).<sup>[9f]</sup>



**Abbildung 6.** Orientierungsbild einzelner DilC<sub>18</sub>-Moleküle in einem dünnen PVB-Film (Bildlänge  $20 \mu\text{m}$ ). Die Orientierung wurde aus der Modulationsphase der Fluoreszenz abgeleitet; Bereiche mit einem Fluoreszenzsignal unter  $7 \text{ kHz}$  wurden zur besseren Übersicht in der Farbskala ignoriert (erscheinen schwarz). Rotierende Moleküle zeigen mehr als eine Farbe. Teilweiser Abdruck aus Lit. [9e]. Copyright 2001, mit Genehmigung der American Chemical Society.

Die Orientierung des Emissionsdipolmoments kann ebenso zur Verfolgung der Rotation einzelner Moleküle genutzt werden. In den meisten Fällen werden hierzu zwei Detektoren verwendet, die auf zueinander senkrechte Polarisationsrichtungen ( $x$  und  $y$ ) reagieren. Die Dipolorientierung kann aus dem Intensitätsverhältnis der beiden Detektoren abgeleitet werden:<sup>[9b,g,61]</sup>

$$\phi = \tan^{-1} \sqrt{\frac{I_x}{I_y}}, \quad (9)$$

wobei die gemessenen Intensitäten  $I_x, I_y$  der beiden Kanäle eventuell mit einem Gewichtungsfaktor korrigiert werden müssen, wenn unterschiedliche Detektionseffizienzen auftreten. Die Werte für die Emissionsdipolorientierung liegen zwischen  $0^\circ$  und  $90^\circ$  [siehe Gl. (9), mit einer „Unsicherheit“ von  $n\pi$ ]. Dabei kann linear polarisiertes Licht zur Anregung verwendet werden. Um unterschiedliche Absorptionseffizienzen zu vermeiden, ist jedoch auch die Verwendung von zirkular polarisiertem Licht möglich.

Durch diese Technik konnte die Dipolorientierung, Rotation und Adsorptionsdynamik von DNA-Fluorophorkomplexen bestimmt werden. Dabei wurde gezeigt, dass die Absorptions- und Emissionsdipole von Cy5-Molekülen nicht perfekt parallel, sondern um etwa  $5^\circ$  zueinander verschoben sind.<sup>[62]</sup> Rotationsstudien an einzelnen Molekülen sind auch auf einer ultrakurzen Zeitskala möglich und ermöglichen so Einblick in Matrix- oder Moleküldynamiken<sup>[9g,63]</sup> oder eignen sich für biologische Anwendungen.<sup>[64]</sup> In besonderen hochsymmetrischen Fällen kann sogar die 3D-Orientierung be-

stimmt werden, wie für CdSe-Quantenpunkte gezeigt wurde.<sup>[65]</sup>

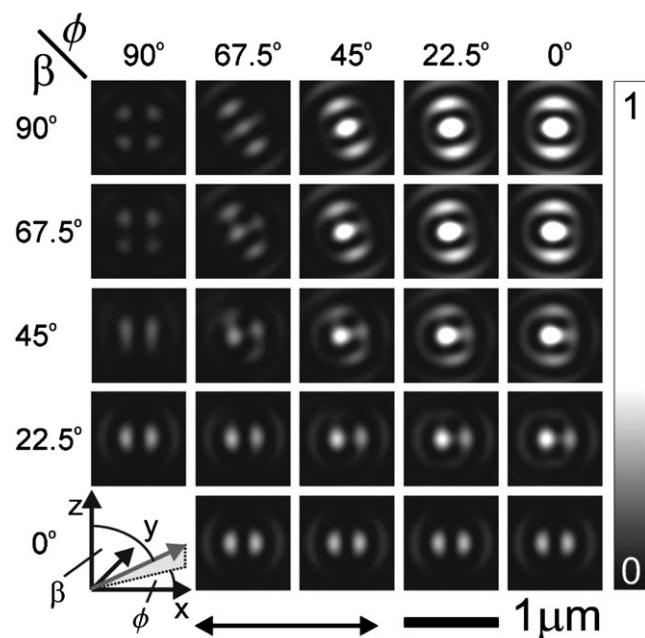
Da bei all diesen Methoden das Anregungsfeld keine ausgeprägte longitudinale Komponente besitzt, kann nur die Projektion des Dipolmoments in die Probenebene gemessen werden. Außerdem ist die Bestimmung des Emissionsdipolmoments sehr eingeschränkt. Darum wurden einige Anstrengungen unternommen, um die vollständige 3D-Orientierung von Nanoobjekten mithilfe polarisationsempfindlicher Methoden zu bestimmen. Beispielsweise wurde ein Mikroskop mit drei Detektoren für jeweils drei verschiedene Polarisationen vorgeschlagen,<sup>[66]</sup> seine theoretischen Grenzen diskutiert<sup>[67]</sup> und ein experimenteller Aufbau realisiert.<sup>[68]</sup> In einem anderen Ansatz wurde die Anregung mit verschiedenen Polarisationen erreicht. Damit kann die 3D-Orientierung einzelner Absorptionsdipole mit drei aufeinanderfolgenden Bildern und einer Genauigkeit von mindestens  $10^\circ$ <sup>[69]</sup> oder – in einem ähnlichen Ansatz – mit einer Genauigkeit von  $2^\circ$ <sup>[70]</sup> bestimmt werden.

### 4.3. Doughnut-Moden und einzelne Moleküle

#### 4.3.1. Linear polarisierte Doughnut-Moden

Die 3D-Orientierung einzelner Moleküle kann auch ohne Polarisationsempfindlichkeit im Detektionsstrahlengang bestimmt werden. Durch annulare Beleuchtung mit einem linear polarisierten Gauß-Strahl kann die Absorptionsdipolorientierung grob über das Emissionsmuster bestimmt werden. Die Stärken der elektrischen Feldkomponenten entlang der drei Raumachsen sind unter annularer Beleuchtung vergleichbar, während die Formen der Feldverteilungen im Fokus stark variieren. Die einzelnen Moleküle bilden die elektrische Feldverteilung ab, weshalb sich die Emissionsmuster als Überlagerungen der drei „reinen“ Intensitätsverteilungen ergeben (siehe die drei Ecken in Abbildung 7).<sup>[10a]</sup> Damit kann die Orientierung prinzipiell aus einem einzigen Fluoreszenzmuster bestimmt werden (siehe Abbildung 7). Leider bietet diese Technik keine allzu hohe Genauigkeit.<sup>[10]</sup> Es wurde eine Präzision von etwa  $5^\circ$  berichtet, begleitet von einer höheren Ungenauigkeit für Winkel, die fast parallel oder senkrecht zur Bildebene liegen ( $\theta = 0, 90^\circ$ ).<sup>[71]</sup>

Darüber hinaus stimmt die tatsächliche Orientierung nicht vollständig mit der vom Angleichalgorithmus ausgegebenen überein, da z. B. niemals Winkel mit perfekt zur Bildebene paralleler oder senkrechter Orientierung (d. h.  $\beta = \theta = 0, 90^\circ$ ) ausgegeben werden. Trotzdem konnte mit der Technik noch einmal gezeigt werden, dass die Lebenszeit einzelner Moleküle an einer Grenzfläche stark von ihrer Orientierung abhängt.<sup>[54]</sup> Außerdem konnte der Nachweis erbracht werden, dass die Ausrichtung der Absorptionsdipole einzelner FRET-Paare nicht immer kollinear sein muss, auch wenn die Molekülstruktur des gekoppelten Systems dies erwarten lässt, da die lokale Umgebung die Dipolorientierungen beeinflussen kann. Durch eine geringe Variation der vorgestellten Technik, bei der die Emissionsmuster direkt in der hinteren Fokalebene eines Objektivs hoher  $NA$  abgebildet werden, lässt sich die Genauigkeit auf  $1\text{--}2^\circ$  erhöhen.<sup>[10b]</sup> Unserer Meinung nach



**Abbildung 7.** Fluoreszenzmuster einzelner Moleküle 5 nm unter der Grenzfläche, berechnet nach der Feldverteilung. Koordinatensystem: Definition der Dipolorientierung mit den Winkeln  $\beta$  und  $\phi$  in Bezug auf die Anregungspolarisation (Doppelpfeil). Abdruck aus Lit. [10a], Copyright 2000, mit Genehmigung der American Physical Society. <http://link.aps.org/abstract/PRL/v85/p4482>.

opfert dieser Weg jedoch den intuitiven Ansatz gängiger Abbildungstechniken.

Die Molekülorientierung kann mit einer linear polarisierten DM auch direkt bestimmt werden, wie sowohl theoretisch als auch experimentell gezeigt wurde.<sup>[72]</sup> Die Methode ist jedoch besonders empfindlich für Dipole, die parallel zur optischen Achse oder senkrecht zur Polarisationsrichtung ausgerichtet sind. Darum kann die Orientierung willkürlich ausgerichteter Moleküle nur für eine Teilpopulation genau bestimmt werden. Die erhaltenen theoretischen Ergebnisse zeigen, dass die molekulare Orientierung auch die Auflösungsverbesserung in der STED-Mikroskopie beeinflusst,<sup>[72a]</sup> was mit experimentellen Ergebnissen übereinstimmt.<sup>[72b]</sup> Wenn beide Strahlen linear polarisiert sind, ist der Effekt besonders ausgeprägt. Eine höhere Auflösung wird dann nur erreicht, wenn die Dipole entlang der Polarisationsrichtung orientiert sind, während die Auflösung für andere Orientierungen sogar verringert wird. Auch im experimentell relevanten Fall von zirkular polarisiertem Licht hängt die Auflösung immer noch von der Orientierung ab.<sup>[72a]</sup>

#### 4.3.2. Radial und azimutal polarisierte Doughnut-Moden

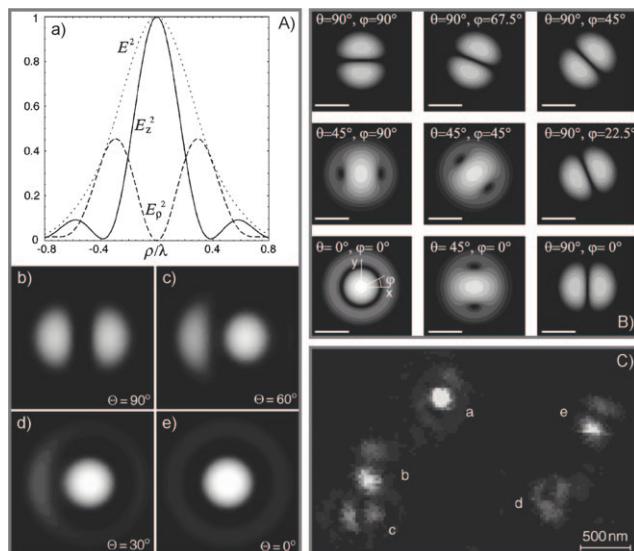
Ein sehr eleganter Ansatz zur Bestimmung der molekularen Orientierung besteht in der Verwendung von radial oder azimutal polarisierten DMs, die zu Beginn dieses Aufsatzes vorgestellt wurden. Wie bereits erwähnt, hängt die Wechselwirkung von Licht und einzelnen Molekülen von der Orientierung der Polarisierung und des Dipolmoments ab. Die besonderen Polarisationsmerkmale der DMs bieten ver-

schiedene Polarisationsrichtungen im Fokus. Darum kann die Ausrichtung einzelner Dipole direkt abgebildet werden, wenn die elektrische Feldverteilung im Fokus bekannt ist. Die rein zweidimensionale Polarisation der APDM ermöglicht es, die Projektion des Dipolmoments in die Probenebene abzubilden. Die Kombination einer longitudinalen und transversalen Komponente, die eine RPDM bietet, ermöglicht dagegen, die vollständige 3D-Orientierung einzelner Dipole und damit einzelner Moleküle zu bestimmen.<sup>[6]</sup>

Dies wurde von Lieb et al. theoretisch für den Fall eines Parabolspiegels<sup>[6b]</sup> untersucht, während Novotny et al. das Problem für ein Objektiv hoher *NA* sowohl theoretisch als auch experimentell angegangen sind.<sup>[6a]</sup> Das longitudinale Feld einer RPDM kann mit einzelnen Molekülen abgebildet werden.<sup>[6a]</sup> Umgekehrt kann aus den Fluoreszenzmustern, die mit einer RPDM aufgenommen wurden, die 3D-Orientierung einzelner Dipole bestimmt werden (Abbildung 8).<sup>[6a]</sup> Bei einer lateralen Orientierung wird das Molekül nur vom transversalen Feld der RPDM angeregt und es entsteht ein

zweiflügeliges Muster, das die Dipolorientierung wiedergibt (Verbindungsline zwischen den Flügeln).<sup>[6a]</sup> Diese Muster erinnern etwas an die, die auch durch defokussierte Abbildung gefunden werden (Abbildung 5). Eine rein longitudinale Ausrichtung führt zu einem einzelnen Punkt, während Orientierungen mit sowohl lateraler als auch longitudinaler Komponente zu Mustern zwischen diesen beiden Extremen führen.<sup>[6a]</sup> Es wurde eine gute Übereinstimmung zwischen den experimentellen und theoretisch vorhergesagten Mustern erreicht (Abbildung 8).<sup>[6a]</sup> Wenn ein Parabolspiegel als fokussierendes und sammelndes Element verwendet wird, erwartet man etwas andere Muster (Abbildung 8B).<sup>[6b]</sup>

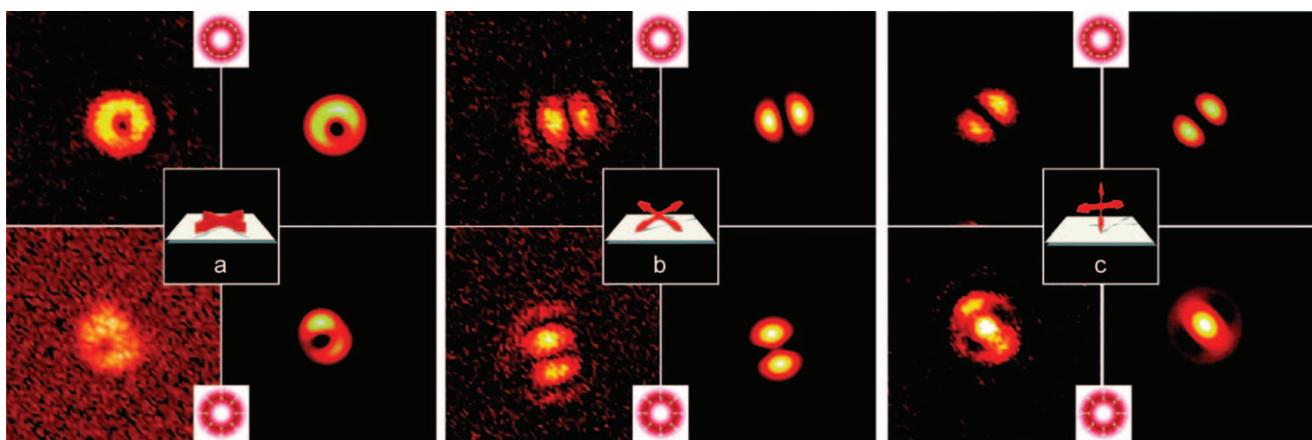
Obwohl diese Ergebnisse mit einer beugungsbegrenzten Technik erhalten wurden, sind Informationen aus dem Nanometerbereich zugänglich, wie z.B. die Orientierung einzelner Moleküle, die mit bloßem Auge und ohne weitere Datenbearbeitung sichtbar gemacht wird. Sogar wenn man die Beugungsgrenze durchbricht,<sup>[72b]</sup> erhält man diese Information nicht. Darüber hinaus ermöglichen DMs in besonderen Fällen sogar die Verfolgung chemischer Reaktionen auf Einzelmolekülniveau. Beispielsweise konnte die Tautomerisierung einzelner Porphycenmoleküle mit azimuthal polarisiertem Licht abgebildet werden.<sup>[7a,b]</sup> Bei der Tautomerisierung in Porphycenen werden zwei Wasserstoffatome zwischen vier Stickstoffatomen im inneren Ring des Moleküls umgelagert. Schon früher wurde gezeigt, dass sich die Übergangsdipolmomente der zwei chemisch identischen Isomere um 70–80° unterscheiden.<sup>[73]</sup> Da die Tautomerisierung im Vergleich zur Zeitskala der Abbildungsmethode sehr viel schneller abläuft, sollten für jedes Molekül zwei zueinander fast senkrechte Dipole, und damit ein ringförmiges Muster, beobachtet werden. Tatsächlich wurden experimentelle Muster von fast perfekter Doughnutform beobachtet (Abbildung 9a).<sup>[7a,b]</sup> Einige der beobachteten Moleküle führten aber auch zu zweiflügeligen Mustern. Durch die Kombination von azimuthaler und radialem Polarisation konnte gezeigt werden, dass diese Muster zu Molekülen gehörten, die auf den Ecken oder Kanten standen (Abbildung 9b, c).<sup>[7c]</sup>



**Abbildung 8.** A) a) Vergleich der longitudinalen Feldstärke  $E_z^2$ , der transversalen Feldstärke  $E_p^2$  und der gesamten Feldstärke  $E^2$  als Funktion der Radialkoordinate beim Fokussieren mit einem Mikroskopobjektiv hoher *NA* ( $NA=1.4$ ), 2 nm unter der Grenzfläche. b–e) Berechnete Emissionsratenbilder [ $R(x,y)$ ] für unterschiedliche polare Orientierungen eines Moleküls in der  $xz$ -Ebene.  $\theta$  gibt den Winkel zwischen der Dipolachse und der Strahlachse an. B) Berechnete konfokale Bilder,  $|E|^2$ , für einen Dipolmitter unterschiedlicher Orientierung nach Anregung mit einer RPDM nach Fokussierung mit einem Parabolspiegel ( $NA=1.515$ ). Die beleuchtete Apertur wird auf 1.21 verkleinert und der Dipol in der  $xy$ -Ebene gerastert. Die Winkel der Dipolorientierung sowie die Achsen sind in der Abbildung links unten gezeigt. Es wurde eine logarithmische Skala mit einem Faktor 2 zwischen den Farbniveaus verwendet. Die Längenskala entspricht einer Wellenlänge  $\lambda/n$ . C) Fluoreszenzmuster [ $R(x,y)$ ] von willkürlich orientierten Molekülen nach Anregung mit einer fokussierten RPDM. Das Dipolmoment von Molekül *a* ist fast longitudinal (vgl. A,d), während die Dipolmomente der Moleküle *c* und *d* transversal sind (vgl. A,b). Die Moleküle *b* und *e* haben eine Orientierung von  $\theta \approx 60^\circ$  (vgl. A,c). A) und C): Abdruck aus Lit. [6a], Copyright 2001, mit Genehmigung der American Physical Society. <http://link.aps.org/abstract/PRL/v86/p5251>. B) Teilweise Abdruck mit Genehmigung aus Lit. [6b].

## 5. Doughnut-Moden und einzelne Metallnanopartikel

Edelmetallnanopartikel sind von gesteigertem wissenschaftlichem Interesse für mikroskopische Untersuchungen. Im Vergleich zu einzelnen Molekülen und einzelnen Quantenpunkten (quantum dots, QDs) bleibt die Emission einzelner Edelmetallnanopartikel nicht aus. Zusätzlich zu dieser stabilen Lichtemission streuen diese Partikel Licht sehr stark und ermöglichen damit die Detektion einzelner Partikel. Statt des Dipolmoments, das von einzelnen Molekülen bekannt ist, kommt bei metallischen Nanopartikeln der Polarisierbarkeitstensor ins Spiel. Wir konnten zeigen, dass es durch die Kombination von konfokaler Interferenzstreuichtmikroskopie (confocal interference scattering microscopy, CISM) mit DMs (APDMs oder RPDMs) möglich ist, die Orientierung metallischer Nanostäbchen an dielektrischen Grenzflächen exakt zu bestimmen und ihre Rotation zu verfolgen.<sup>[11a, 21b, 74]</sup> Darüber hinaus lassen sich mit CISM-DM unterschiedliche



**Abbildung 9.** Konfokale Fluoreszenzbilder eines Porphycenderivats (2,7,12,17-tetra-tert-Butylporphycen), nach Anregung mit einer APDM (oben) oder einer RPDM (unten), die drei unterschiedliche Orientierungen des Chromophors zeigen. a) Ein Moleköl liegt flach auf der Oberfläche; b,c) Moleköl mit senkrechter Orientierung der molekularen Fläche zur Probenebene. In (b) stehen zwei Dipole im gleichen Winkel zur Probenebene (das Moleköl steht auf der Kante), während in (c) ein Dipol senkrecht auf der Oberfläche und der andere fast parallel zu ihr ist (das Moleköl steht auf der Ecke). Links die experimentellen, rechts die simulierten Muster. Abdruck aus Lit. [7c]. Copyright 2009, mit Genehmigung der American Chemical Society.

Partikelformen über ihre Streumuster einfach unterscheiden (Abbildung 10).<sup>[11b]</sup> Da solche Informationen mit etablierten Mikroskopietechniken nicht zugänglich sind, beschäftigt sich dieser Abschnitt mit dem Thema etwas genauer.

Für die beschriebenen Experimente wurde ein selbstgebautes invertiertes konfokales Mikroskop mit einer APDM oder RPDM als Anregungsquelle verwendet. In CISM wird das an der Probengrenzfläche elastisch gestreute Licht detektiert. Das detektierte Signal entsteht durch Interferenz zwischen dem Anregungslicht, das an der Probengrenzfläche reflektiert wird, und dem am Partikel elastisch gestreuten Licht.<sup>[75]</sup>

Die optischen Eigenschaften von Edelmetallnanostäbchen können über ihre Größe genau gesteuert werden, weshalb sie besonders interessant für mikroskopische Anwendungen sind. Die Partikel zeigen eine stark anisotrope Polarisierbarkeit, da sich die Plasmonenresonanzen ihrer beiden Hauptachsen voneinander unterscheiden. Normalerweise liegt die Resonanz für die kurze Achse im Blauen bis Grünen, während die für die lange Achse rotverschoben ist und vom Aspektverhältnis (dem Verhältnis der Länge zur Breite) abhängt. Mit zunehmender Partikellänge wird die Bande weiter rotverschoben. Daher werden im Fokus einer APDM oder RPDM bei 633 nm vor allem Partikelplasmonen der langen Achse angeregt, weshalb ein ausgeprägtes Dipolmoment induziert wird, das die Partikelorientierung abbildet. Die entstehenden Bilder von Partikeln, die flach auf einer Glasoberfläche liegen, erinnern stark an die, die man von einzelnen Molekülen mit lateraler Dipolorientierung erhält. Verursacht durch destruktive Interferenz kann jedoch der Bildkontrast invertiert sein.

Die experimentellen Ergebnisse sind in Abbildung 10 A dargestellt: Die *in situ* gewonnenen Topographiedaten geben die Orientierung zweier einzelner Goldnanostäbchen wieder, daneben sind die experimentellen konfokalen Streubilder derselben Partikel nach Anregung mit einer APDM gezeigt. Ganz ähnliche zweiflügelige Muster erhält man nach Anre-

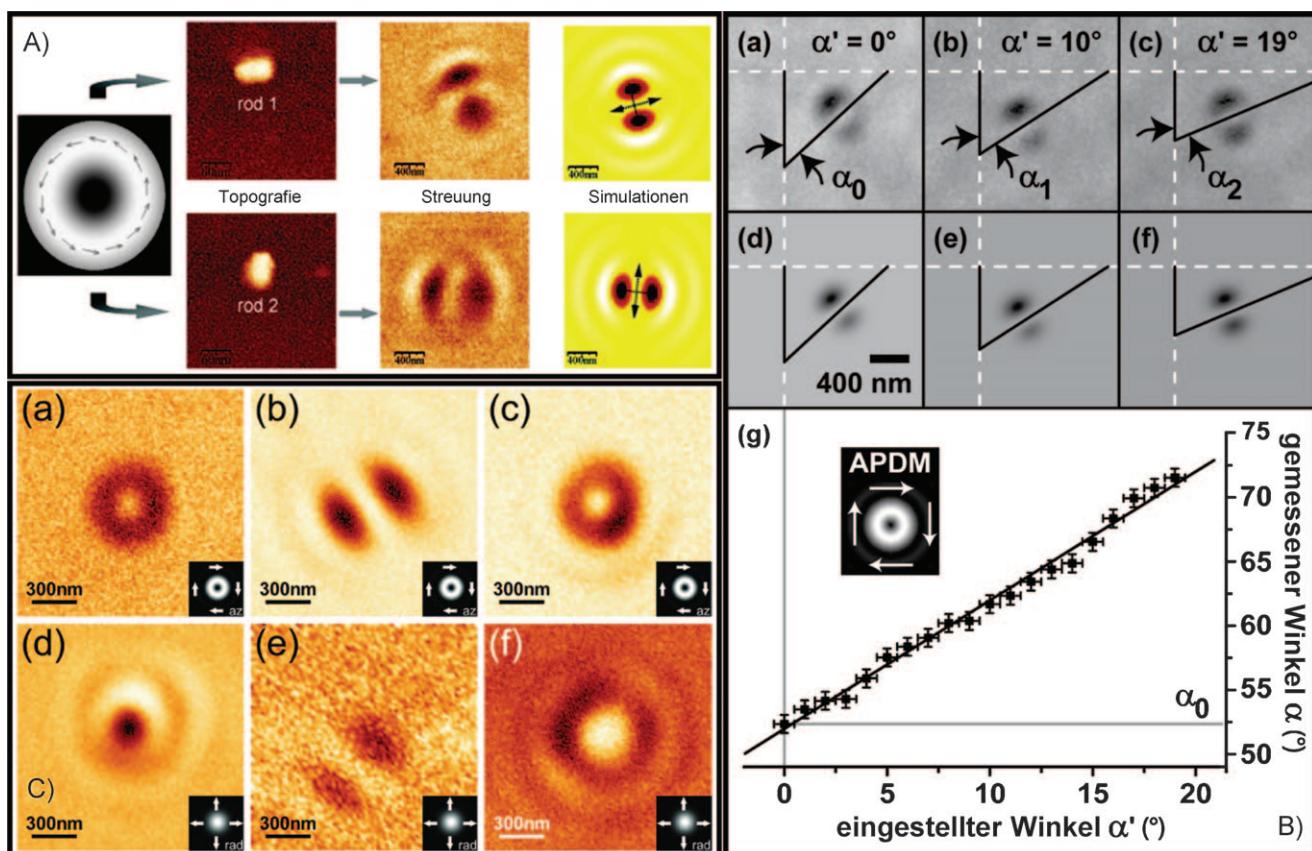
gung mit einer RPDM (Abbildung 10 C,d). Die zweiflügeligen Muster bilden die Partikelorientierung direkt in einem einzigen konfokalen Bild ab.<sup>[11a]</sup> Durch Reproduktion der experimentellen Muster mit einer 2D-Angleichfunktion kann die Orientierung mit einer hohen Genauigkeit von unter 1° bestimmt werden (Abbildung 10 B).<sup>[74]</sup> Bei Partikeln in Flüssigkeiten konnten wir kürzlich zeigen, dass es sogar möglich ist, die Rotation von Nanostäbchen zu verfolgen, selbst wenn sich die Partikel dabei nicht fortbewegen.<sup>[21b]</sup> Die beobachtete spontane Bewegung eines einzelnen Goldnanostäbchens in wässriger Umgebung<sup>[21b]</sup> hätte mit der konventionellen Lichtmikroskopie nicht beobachtet werden können.

Wie in Abbildung 10 C gezeigt, können verschiedene Partikelformen unterschieden werden: Ein isotropes Streuobjekt, wie eine Goldnanokugel, die sich wie eine punktförmige Probe verhält, bildet die Intensitätsverteilung des Anregungsstrahls ab. Daher kann eine Kugel leicht von einem Nanostäbchen oder einem Goldnanodreieck unterschieden werden, das, im Vergleich zur Kugel, ein verzerrtes Muster erzeugt.<sup>[11b]</sup>

Es bleibt anzumerken, dass all diese Informationen aus dem Nanometerbereich mit einer beugungsbegrenzten und einfachen konfokalen Abbildungstechnik und ohne anspruchsvolle Datenanalyse zugänglich sind. Ein bemerkenswerter Vorteil der vorgestellten Technik ist die außergewöhnlich hohe Genauigkeit der Orientierungsbestimmung für metallische Nanostäbchen. Ähnliche Ergebnisse sind für Fluoreszenzmoleküle erreichbar.

## 6. Doughnut-Moden und SiO<sub>2</sub>-Nanopartikel

Es wurde gezeigt, dass einzelne SiO<sub>2</sub>-Nanopartikel (NPs), bei denen die Photolumineszenz (PL) von Fehlstellen in der Kristallstruktur herrührt, ein stabiles lineares Übergangsdipolmoment haben.<sup>[12]</sup> Daher sollten sie ähnliche Bilder erzeugen wie einzelne Moleküle. Die 3D-Orientierung ihres



**Abbildung 10.** Streubilder einzelner Metallnanopartikel, die das Potential der konfokalen Interferenzstreuulichtmikroskopie mit Doughnut-Moden zeigen. A) Topographie ( $180 \times 180 \text{ nm}^2$ ) und zugehörige Streubilder ( $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ ) zweier einzelner Goldnanostäbchen (APDM bei 633 nm). Die experimentellen zweiflügeligen Muster geben die Partikelorientierung direkt wieder und stimmen gut mit den Simulationen überein. Die Maßstabsbalken entsprechen jeweils 400 nm. B) Die Orientierung kann mit einer hohen Genauigkeit von ca.  $0.5^\circ$  bestimmt werden. Streubilder desselben Silbernanostäbchens, während die Probe von Bild zu Bild um etwa  $10^\circ$  gedreht wird a–c) experimentelle Daten, d–f) angeglichene Daten, g) Auftragung des gemessenen Winkels  $\alpha$  gegen den eingestellten  $\alpha'$ . C) Goldnanopartikel verschiedener Form können aufgrund ihrer Streumuster unterschieden werden. a, d) Kugel, b, e) Stäbchen, c, f) Dreieck. A) Teilweiser Abdruck aus Lit. [11a]. Copyright 2006, mit Genehmigung der American Chemical Society. B) Abdruck mit Genehmigung aus Lit. [74]. C) Abdruck mit Genehmigung aus Lit. [43].

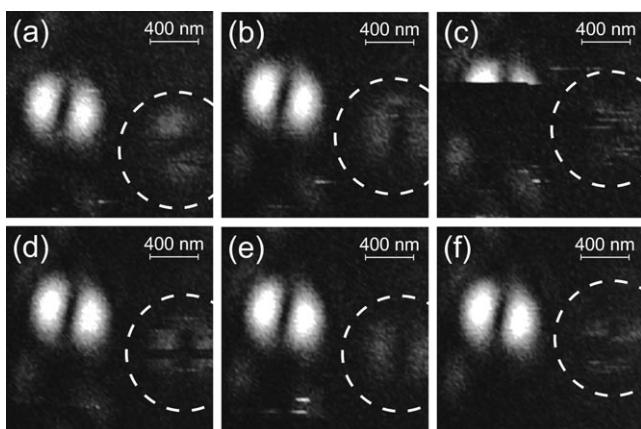
Dipolmoments wurde durch Anregung sowohl mit azimuthal als auch mit radial polarisiertem Licht abgebildet. Abbildung 11 zeigt eine Reihe von experimentellen zweiflügeligen PL-Bildern einzelner NPs nach Anregung mit einer APDM, die nacheinander aufgenommen wurden.<sup>[12]</sup> Es konnten seltsame dynamische Effekte wie das Blinken der PL und das Umklappen des Übergangsdipolmoments beobachtet werden, obwohl die NPs in einer Polymermatrix fixiert waren.

Bei Anregung mit einer RPDM wurden, wie im Fall der Einzelmolekülfloreszenz,<sup>[6a]</sup> verschiedene Mustertypen beobachtet,<sup>[12]</sup> was die Bestimmung der 3D-Dipolorientierung ermöglichte. Außerdem wurde Blinken des hellen NP in Abbildung 11c beobachtet, genauso wie für das schwächeren NP in Abbildung 11d (eingekreist). Das Übergangsdipolmoment des schwächeren NP klappt zudem um (Abbildung 11a, b).<sup>[12]</sup>

Es konnte gezeigt werden, dass Absorptions- und Emissionsdipolmoment parallel zueinander stehen. Dies führt zu der wichtigen Schlussfolgerung, dass das PL-Photon von genau der Fehlstelle stammt, die angeregt wurde.

## 7. Mikroresonatoren

Metallische Kavitäten, d. h. Mikroresonatoren, wurden in der Optik, der Laserphysik, der Quantenoptik und der physikalischen Chemie eingehend untersucht.<sup>[76]</sup> Obwohl ein detaillierter Überblick über die Bedeutung von Mikroresonatoren in der wissenschaftlichen Forschung nicht das Ziel dieses Aufsatzes ist, haben diese Systeme sicherlich eine wichtige Rolle bei der Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen elektromagnetischen Feldern und Materie gespielt, besonders auf dem Niveau einzelner Moleküle. Auf diesem weiten Gebiet haben Steiner et al. einen neuartigen metallischen Mikroresonator entwickelt und charakterisiert, bei dem der Abstand zwischen den Silberspiegeln der Kavität mit Nanometergenauigkeit eingestellt werden kann.<sup>[13a]</sup> Dieses einzigartige und leistungsstarke Instrument wurde zur Untersuchung und Kontrolle der optischen Eigenschaften von Nanoemittern verwendet. So wurden z. B. kavitätskontrollierte Spektren und Zerfallskurven einzelner Moleküle erzeugt, die bei Raumtemperatur an die erste longitudinale Mode eines Fabri-Perot-Interferometers koppeln.<sup>[13a]</sup> Ebenso



**Abbildung 11.** Bilder von  $\text{SiO}_2$ -Nanopartikeln (NP), eingebettet in eine Polystyrolmatrix nach Anregung mit einer APDM ( $\lambda = 488 \text{ nm}$ ). Die Teilbilder (a–f) zeigen denselben Ausschnitt einer Serie von Bildern, die eins nach dem anderen alle 100 s aufgenommen wurden. Jedes Bild zeigt zwei NPs, wobei der eine ein helles zweiflügeliges Muster und der andere ein schwächeres Muster zeigt, das durch einen gestrichelten Kreis markiert ist. Die folgenden dynamischen Prozesse wurden beobachtet: in (c) tritt Blinken der Photolumineszenz (PL) des helleren NP auf. In (d) ist dies auch für das schwächere NP zu beobachten. Außerdem klappt das Übergangsdiploment des schwächeren NP plötzlich um, wie der Vergleich von (a) und (b) oder (e) und (f) zeigt. Abdruck nach Lit. [12]. Copyright 2009, mit Genehmigung der American Chemical Society.

wurde der Effekt der optischen Auswahl durch den Mikroresonator auf die optischen Eigenschaften von Nanoemittern sowohl im Ensemble als auch individuell quantitativ untersucht.<sup>[77]</sup>

Im gleichen System haben Khoptyar et al. die Feldverteilung einer RPDM und APDM in einer Mikrokavität durch Vergleich der Fluoreszenzmuster punktartiger Kugelchen mit theoretischen Berechnungen untersucht.<sup>[13b]</sup> Später haben Gutbrod et al. die Felder, die eine RPDM erzeugt, als Funktion der Kavitätslänge untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die besondere räumliche Feldverteilung einer RPDM in einer Kavität die Lokalisierung eines Fluoreszenzmittlers mit einer Genauigkeit unterhalb der Auflösung ( $\lambda/60$ ) ermöglicht.<sup>[13c]</sup> Schließlich zeigten Gutbrod et al., dass eine RPDM erfolgreich dazu eingesetzt werden kann, einzelne Moleküle in einer Kavität zu lokalisieren und ihre Orientierung zu bestimmen.<sup>[78]</sup> Obwohl die Genauigkeit in diesem Fall nicht extrem hoch ist, könnten RPDM dennoch dazu eingesetzt werden, FRET-Paare zu charakterisieren und ihre Wechselwirkung zu optimieren.

## 8. Optische Fallen und Pinzetten

Seitdem optische Fallen 1970 zum ersten Mal von Ashkin experimentell demonstriert wurden,<sup>[79]</sup> haben sie weitverbreitete Anwendungen in der Physik, Chemie und Biologie gefunden. Dies reicht vom optischen Kühlen und Fangen neutraler Atome<sup>[80]</sup> über optische Pinzetten bis hin zur Manipulation einzelner Moleküle, Nano- und Mikropartikel<sup>[79,81]</sup>

und sogar biologischer Proben (lebende Bakterien und Viren,<sup>[82]</sup> Zellkompartimente oder ganze Zellen<sup>[83]</sup>).

Im Folgenden sollen die Vorteile, die sich aus der Einführung von DMs für optische Fallen ergeben, zusammengefasst werden. Zuerst erfolgt eine kurze allgemeine Diskussion des Funktionsprinzips optischer Fallen, da dies nicht immer direkt intuitiv ist. Das zu fangende Objekt hat normalerweise einen höheren Brechungsindex als die Umgebungsmatrix. Darum werden die Partikel in den Fokus eines Laserstrahls – die optische Falle oder Pinzette – gezogen. Typischerweise liegen die Partikelgrößen zwischen 200 und 500 nm, es sind aber auch Durchmesser von einigen  $\lambda$  oder bis hinunter zu einigen 10 nm möglich.<sup>[84]</sup> Der Laserstrahl und die Probe können relativ zueinander verschoben werden, weshalb das eingefangene Objekt dem fokalen Punkt folgt und nach Belieben aus der Falle entlassen werden kann.

Die Bewegung des Partikels kann gleichermaßen mit dem Strahlungsdruck, den es erfährt, oder mit dem Impulsübertrag der auftreffenden Photonen erklärt werden. Diese optischen Kräfte sind klein und unter normalen Umständen ausgeglichen. In der Nähe eines scharfen Laserfokus können sie jedoch gerichtet und ausreichend groß werden, um die Braunsche Bewegung, die Schwerkraft und die Auftriebskraft zu überwinden. Selbstverständlich ist es notwendig, diese Kräfte zu übertreffen, um eine stabile Falle zu erzeugen. Aus historischen Gründen wird die Kraft für gewöhnlich in zwei Komponenten aufgeteilt, die Streukraft und die Gradientenkraft. Die erste Komponente ergibt sich aus der Tatsache, dass das Objekt nur von einer Seite von Photonen getroffen wird, weshalb das Licht das Partikel in seine Ausbreitungsrichtung schiebt und damit aus dem Fokus hinaus. Die zweite wird durch das inhomogene elektrische Feld verursacht, das durch das scharfe Fokussieren erhalten wird. Die Feldfluktuationen erzeugen oszillierende Dipole im Partikel, die wiederum mit dem elektrischen Feld wechselwirken und die Gradientenkraft verursachen. Darum ist diese Kraft eine Funktion der Polarisierbarkeit des Partikels, und der Gradient der optischen Intensität zieht das Objekt in die optische Falle. Um die Effizienz der Falle zu erhöhen, muss man also das Verhältnis der Gradienten- zur Streukraft optimieren.

Wenn DMs mit einer Linse mit hoher *NA* fokussiert werden, tragen nur Strahlkomponenten unter großen Winkeln zum elektromagnetischen Feld bei. DMs wurden für optische Fallen vorgeschlagen,<sup>[14f,22c,81a,85]</sup> weil achsenparallele Strahlen vor allem zur Streukraft beitragen, während Strahlen unter höheren Winkeln besonders für die Gradientenkraft verantwortlich sind. Da die Streukraft durch Reflexion verursacht wird, hängt sie von der Polarisierung des einfallenden Lichts ab. Darum kann sie durch p-Polarisation, wie sie bei einer fokussierten RPDM vorliegt, minimiert werden. Darüber hinaus wird die longitudinale Komponente des Strahls stärker fokussiert als ein linear polarisierter Strahl, was die Effizienz der optischen Falle weiter erhöhen sollte. Aus diesen Gründen verspricht eine RPDM, dem optimalen Strahl für optische Fallen nahezukommen. Die in Berechnungen vorausgesagten Effizienzen sind jedoch widersprüchlich und bemerkenswert unterschiedlich, je nachdem, welche Rechentheorie verwendet wird. Für dielektrische Partikel wurden höhere Kräfte in der Falle vorhergesagt,<sup>[85a,b]</sup>

und durch die bessere Effizienz sollte es sogar möglich sein, metallische Rayleigh-Partikel zu fangen.<sup>[85a]</sup> Sowohl Berechnungen im strahlenoptischen Regime als auch mittels exakter elektromagnetischer Theorie kommen zu höheren Effizienzen für eine RPDM im Vergleich zu einem Gauß-Strahl.<sup>[85b,c]</sup> Demgegenüber zeigen Berechnungen mit ebenen Wellen einen großen Einfluss der Partikelgröße.<sup>[86]</sup> Nach diesen Ergebnissen sollte eine RPDM nur für große Partikel in der Größenordnung der Wellenlänge bis zu mehreren  $\mu\text{m}$  vorteilhaft sein.<sup>[86]</sup>

Generell sollten Anwendungen mit optischen Fallen von jeglichem doughnutförmigem Strahl profitieren. In longitudinaler Richtung wurden 20 % höhere Kräfte im Vergleich zu einem linear polarisierten Gauß-Strahl berichtet.<sup>[14a]</sup> In lateraler Richtung ist dagegen keine Verbesserung durch diese DM zu finden.<sup>[87]</sup> Dennoch kann die Einführung von DMs vielen Standardanwendungen zugutekommen,<sup>[14b-f]</sup> besonders nützlich sind sie jedoch im Fall von Partikeln, die sonst nur schwer einzufangen sind. Dies schließt das erfolgreiche Fangen von absorbierenden, stark reflektierenden oder Partikeln mit niedrigem Brechungsindex ein.<sup>[14b-e, 15a]</sup> Es konnte auch gezeigt werden, dass Partikel mit hohem und niedrigem Brechungsindex gleichzeitig in ein und derselben DM gefangen werden können.<sup>[15b]</sup>

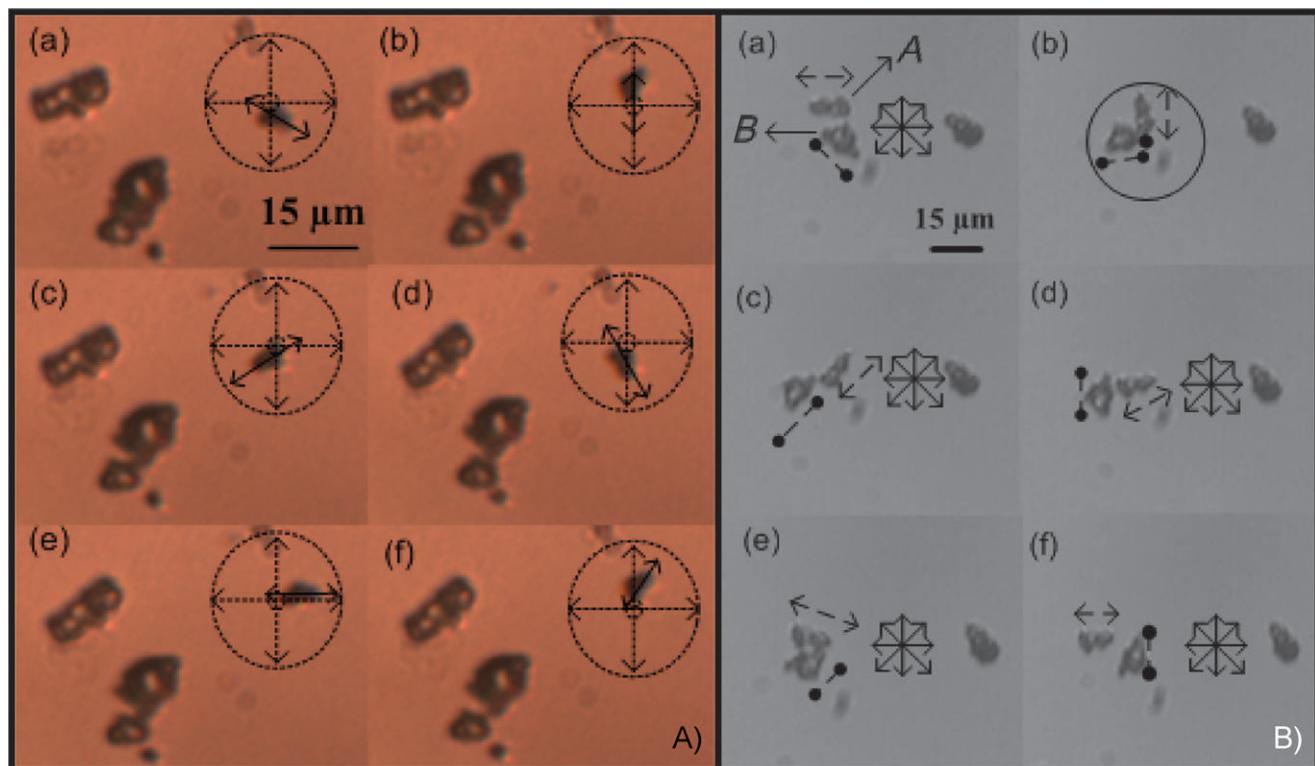
Bisher steht die experimentelle Arbeit mit radial polarisiertem Licht und optischen Fallen noch am Anfang, dennoch konnten Calcitmikropartikel mit einer RPDM gedreht werden.<sup>[14g]</sup> Obwohl das Licht nicht scharf fokussiert wurde, sind die erhaltenen Daten vielversprechend für optische Fallen.

Im Unterschied zu einem anisotropen Partikel, das im Fokus von zirkular oder elliptisch polarisiertem Licht um eine Achse unabhängig vom Laserstrahl rotiert,<sup>[88]</sup> drehen sich die Partikel um die Strahlachse, d.h. die optische Achse (Abbildung 12).<sup>[14g]</sup> Die Drehrichtung konnte dabei nicht vorhergesagt werden, was die Autoren der Partikelform, -größe und -ausdehnung zuschreiben.<sup>[14g]</sup>

Es sollte noch erwähnt werden, dass auch eine APDM für optische Fallen geeignet sein kann, wie das stabile Fangen von Wolframpartikeln zeigt.<sup>[20b]</sup>

## 9. Nahfeldmikroskopie

Nach der Entwicklung der Nahfeldmikroskopie in den frühen 1980er Jahren<sup>[3]</sup> hat das Feld eine lebhafte Entwicklung gezeigt und bewiesen, dass die optische Mikroskopie weit über die Beugungsgrenze hinausreichen kann. Die höchsten Auflösungen werden in der spitzenverstärkten optischen Nahfeldmikroskopie (TENOM) erreicht, die – im Unterschied zur Aperturnahfeldmikroskopie – sehr scharfe Metallspitzen (normalerweise aus Gold oder Silber) verwendet. Bringt man diese Spitzen in den Fokus einer RPDM, so werden die Elektronen durch das longitudinale Feld in Schwingungen entlang der optischen Achse versetzt. An (oder nahe) der Plasmonenresonanz, werden die Elektronen effektiv in die Spitze gepumpt. So werden hohe Feldverstärkungen am Ende der Spitze erreicht, und die Spitze selbst verhält sich als Antenne. In der Nähe einer Grenzfläche kann



**Abbildung 12.** A) Polarisationsinduziertes Drehmoment auf ein anisotropes Partikel durch eine RPDM, das es in Rotation (gegen den Uhrzeigersinn) um den Strahl versetzt. B) Ein System von zwei anisotropen Mikropartikeln in einer RPDM. Partikel A dreht sich im Uhrzeigersinn, Partikel B dreht sich gegen den Uhrzeigersinn. Abdruck aus Lit. [14g]. Copyright 2007, mit Genehmigung des American Institute of Physics.

spitzenverstärkte Fluoreszenz (tip-enhanced fluorescence, TEF) oder spitzenverstärkte Raman-Streuung (tip-enhanced Raman scattering, TERS) beobachtet werden. Diese Verstärkungseffekte versprechen, die Empfindlichkeit der optischen Mikroskopie und Spektroskopie weiter zu erhöhen. Die tatsächliche Realisierung des Mikroskopaufbaus variiert je nach den spezifischen experimentellen Anforderungen. Die meisten Nahfeldmikroskope basieren im Prinzip auf einem konfokalen Aufbau und beinhalten darum ein Objektiv als fokussierendes und sammelndes Element. Als Folge ist die Untersuchung lichtundurchlässiger Proben schwierig. Wird anstelle eines Objektivs ein Parabolspiegel verwendet, lassen sich diese Einschränkungen überwinden. Ein weiterer Vorteil eines solchen Aufbaus ist, dass das longitudinal polarisierte Feld im Fokus, mit dem die Elektronen in der scharfen Metallspitze angeregt werden, für einen Parabolspiegel sehr viel stärker ist als für ein Mikroskopobjektiv vergleichbarer *NA*.<sup>[6b]</sup> Mit einem solchen Mikroskop wurden außergewöhnlich starke Feldverstärkungen in der durchstimmbaren Lücke eines 3D-„Bowtie-Antennensystems“ erreicht, das aus einer scharfen Metallspitze und einem Goldnanokegel besteht.<sup>[89]</sup> Man sollte jedoch bedenken, dass die Technik auf die Untersuchung von Oberflächen beschränkt ist. Die detaillierte Behandlung der Nahfeldoptik geht über das Ziel dieses Aufsatzes hinaus. Hierzu gibt es zahlreiche Übersichtsartikel und Bücher.<sup>[21a, 90]</sup> Die jüngsten Entwicklungen in der TENOM sind in einem Aufsatz von Hartschuh zusammengefasst.<sup>[4]</sup>

## 10. Oberflächenplasmonenresonanzabbildung

Das Phänomen der Oberflächenplasmonenresonanz (surface plasmon resonance, SPR) in dünnen Metallfilmen (typischerweise 50 nm Ag) hat vielfältige Anwendungen in der optischen Sensorik gefunden.<sup>[91]</sup> Rothenhäusler et al. nutzten diesen Effekt für die Oberflächenplasmonenmikroskopie (surface plasmon microscopy, SPM).<sup>[92]</sup> Im Unterschied zu konventionellen Mikroskopietechniken mit Lichtquellen wie Lampen und Lasern werden Oberflächenplasmonenpolaritonen (surface plasmon polaritons, SPPs) für die Anregung verwendet. Diese nicht-strahlenden elektromagnetischen Moden wandern entlang von Grenzflächen (Metall-Dielektrikum) als oberflächengebundene Wellen. Da die Intensität senkrecht zur Grenzfläche exponentiell abnimmt, reagiert diese Methode nur auf die direkte Umgebung des Metallfilms empfindlich. Die Ausbreitungslänge der SPP beschränkt dabei die laterale Auflösung jedoch auf einige (zehn)  $\mu\text{m}$ .<sup>[93]</sup> Um die Auflösung zu verbessern, wurden scharf fokussierte Laserstrahlen benutzt, um SPP lokal in einer Region mit etwa der Größe des fokussierten Strahls anzuregen. Kano et al. führten numerische Simulationen und Experimente durch, um den Einfluss der Polarisation auf die elektrische Feldverteilung zu untersuchen.<sup>[16g, 94]</sup> Diese Ergebnisse konnten experimentell für linear polarisiertes Licht bestätigt werden und zeigten eine lokale Anregung auf einer Fläche von nur  $0.5 \times 0.5 \mu\text{m}^2$ .<sup>[16g]</sup>

Da die SPPs von der longitudinalen Komponente ange regt werden, sollte eine RPDM sowohl in Hinblick auf die

Lokalisierung als auch auf die Intensität besser geeignet sein, wie sowohl theoretisch als auch experimentell gezeigt wurde.<sup>[16a,g]</sup> Obwohl eine völlige Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment noch nicht erreicht werden konnte, wurden evanescente, nicht-beugende Bessel-Strahlen durch SPR-Anregung mit einer RPDM erzeugt.<sup>[16b-e]</sup> Solche Strahlen könnten als virtuelle Sonden in der SPR-Abbildung eingesetzt werden, wie in einem experimentellen Funktionsnachweis im Prinzip schon gezeigt wurde.<sup>[16f]</sup> Zellen und ihre Substratkontakte konnten erfolgreich abgebildet werden, indem eine Karte der Brechungsindizes erstellt wurde (Abbildung 13).<sup>[16f]</sup>

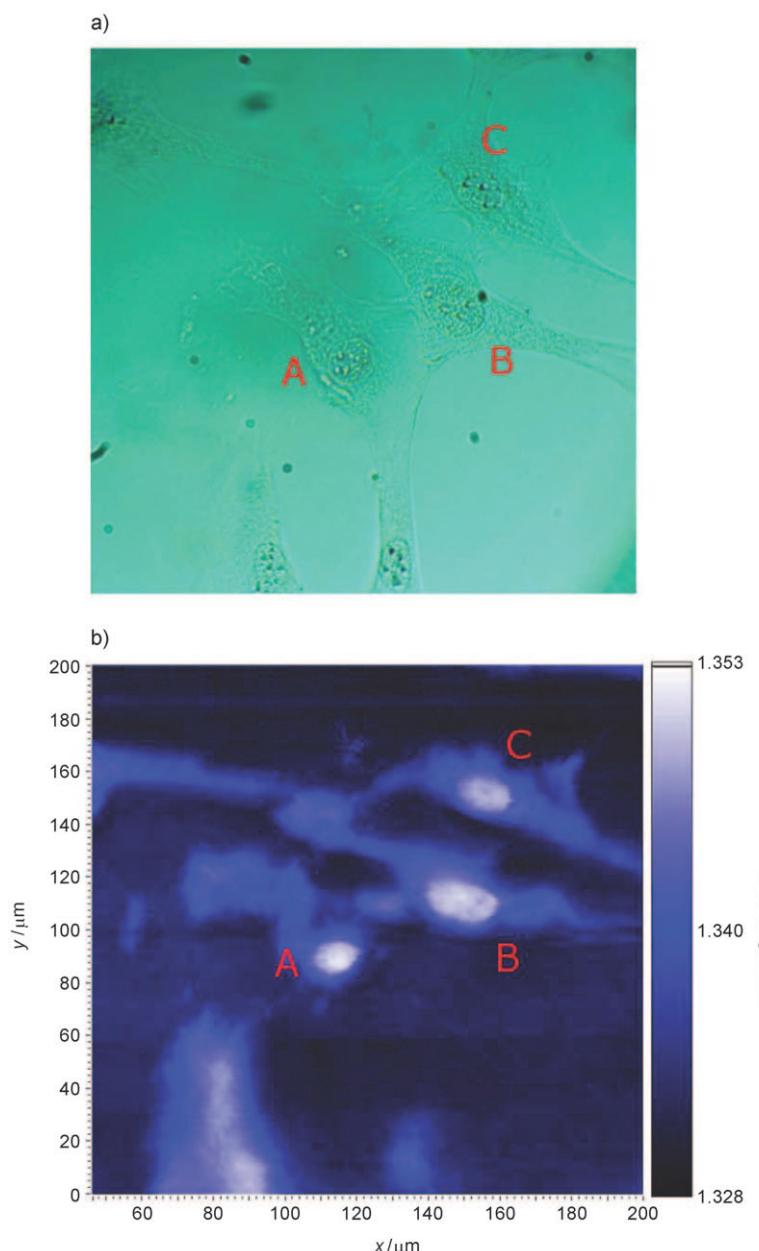
Kürzlich wurden auch erste experimentelle Ergebnisse zur Zweiphotonenlumineszenz, die durch eine solche virtuelle Sonde ausgelöst wurde, veröffentlicht.<sup>[95]</sup> Diese Ergebnisse sind vielversprechend für Rastersondentechniken, da eine materielle Sonde, die in eine abgeschlossene Umgebung eindringt, nicht länger nötig ist. Man sollte jedoch bedenken, dass die Methode auf die Untersuchung von Regionen in der Nähe eines Metallfilms beschränkt ist. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine RPDM die laterale Auflösung in der SPR-Abbildung und der Sensorik des Brechungsindex verbessern kann und damit zusätzliche Informationen zugänglich sind, die andere Lichtmikroskopietechniken unterstützen können.

## 11. Nichtlineare optische Mikroskopie

Wenn ein gepulster Laser hoher Intensität und großer Wellenlänge scharf auf ein nicht-amorphes Medium fokussiert wird, kann Frequenzverdopplung (SHG) auftreten. Bei diesem Prozess müssen zwei Photonen simultan mit einem Molekül wechselwirken, dass nicht zentrosymmetrisch sein darf. Die Photonen werden rein elastisch gestreut, und es wird Licht der halben Wellenlänge emittiert (die Energie bleibt dabei erhalten). Darum verändert sich mit der Anregungs wellenlänge auch die Farbe der emittierten Strahlung. Zusätzlich bleibt auch der Impuls erhalten, d.h., die Vektor summe der Polarisationsrichtung muss mit der Dipolmomentorientierung übereinstimmen. Da radial und azimutal polarisiertes Licht hier unterschiedliche Polarisationsausrichtungen anbietet, sind sie aussichtsreiche Kandidaten für Anwendungen mit SHG.

Biss und Brown haben gezeigt, dass SHG an glatten Metall- und Halbleiteroberflächen sowie an dünnen Filmen für eine RPDM am stärksten ist, im Vergleich zu linear, zirkular und azimutal polarisiertem Licht.<sup>[96]</sup> Die Autoren erklären dieses Phänomen mit der Stärke der longitudinalen Feldkomponente im Fokus, die in der oben genannten Reihenfolge abnimmt.<sup>[96]</sup> Darüber hinaus bietet die RPDM eine höhere räumliche Auflösung als die anderen untersuchten Strahlen.<sup>[96]</sup>

Eine RPDM wurde zur Detektion der 3D-Molekülorientierung in der SHG-Mikroskopie vorgeschlagen.<sup>[17a,b]</sup> Ein technischer Vorteil des vorgeschlagenen Aufbaus zur Modenumwandlung in Lit. [17b] ist die Möglichkeit des schnellen Umschaltens zwischen den Moden, was besonders für kommerzielle Mikroskope sehr vielversprechend erscheint.



**Abbildung 13.** a) Lichtmikroskopiebild humaner 3T3-Fibroblastzellen, b) erhaltene Brechungsindexkarte derselben Gruppe von Zellen, aufgenommen mit einer virtuellen SPR-Sonde. Dieselbe Probenregion kann leicht wiedererkannt werden, was das Potential der vorgestellten Technik unterstreicht und Zugang zu zusätzlichen Informationen ermöglicht, was andere Lichtmikroskopiemethoden unterstützt. Abdruck mit Genehmigung aus Lit. [16f].

Biologische Proben, die reich an Collagen mit einer bevorzugten molekularen Ausrichtung entlang der optischen Achse sind, zeigten einen höheren SHG-Kontrast nach Anregung mit radial polarisiertem Licht als mit Licht, das in der Probenebene polarisiert war.<sup>[17a,c]</sup> Kürzlich wurde gezeigt, dass dies auch für eine selbstangeordnete Monolage auf einer Goldoberfläche gilt, bei der die molekularen Dipole eine bevorzugt longitudinale Orientierung zeigen.<sup>[97]</sup> Yew und Sheppard zeigten, dass sowohl die longitudinale als auch die transversale Komponente des elektrischen Feldes im Fokus in

Betracht gezogen werden müssen, um ihre experimentellen SHG-Daten zu erklären.<sup>[98]</sup> Obwohl unseres Wissens nach bisher nur Ensemblemessungen realisiert wurden, verspricht die Technik generell auch eine Empfindlichkeit auf Einzelmolekül niveau. Darüber hinaus wird das Signal einer selbstangeordneten Monolage auf Gold durch Verwendung einer RPDM verstärkt.<sup>[97]</sup> Andererseits kann die SHG eines Kristalls auch genutzt werden, um radial polarisiertes Licht zu erzeugen.<sup>[37c]</sup> Zusätzlich lassen theoretische Simulationen erwarten, dass sogar Frequenzverdreibefachung (third harmonic generation, THG) unter definierten Bedingungen möglich sein sollte.<sup>[99]</sup> Darüber hinaus sind RPDMs wichtig, um die Auflösung in der Zweiphotonenmikroskopie zu verbessern.<sup>[100]</sup> Entsprechend ist auch in der THG-Mikroskopie eine bessere räumliche Auflösung zu erwarten.<sup>[99]</sup>

Schließlich kann die RPDM noch für eine andere nichtlineare optische Technik, die Zweiphotonen-Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (two-photon fluorescence correlation spectroscopy, 2p-FCS) verwendet werden. Dadurch können Einzelmoleküluntersuchungen mit höheren Probenkonzentrationen durchgeführt werden, da die Intensitätsgrenze für die Zweiphotonenanregung das effektive fokale Volumen verkleinert. In der Folge tragen die Nebenmaxima der elektrischen Feldverteilung nicht länger zur Anregung der Probe bei, und das effektive fokale Volumen wird kleiner als bei der konventionellen einphotonischen Anregung.<sup>[101]</sup>

## 12. Mikromechanische Anwendungen

Hochleistungslaser spielen eine wichtige Rolle beim industriellen Schneiden und Bohren von Metallen. Darum ist es von substantiellem Interesse, Laserquellen und -strahlen weiter zu entwickeln. In Bezug auf mikromechanische Anwendungen deuten Simulationen darauf hin, dass eine RPDM bis zu zweimal effizienter sein sollte als ein p- oder zirkular polarisierter Strahl, die beide in konventionellen Bohr- und Schneidetechniken mit Laserstrahlen verwendet werden.<sup>[18a,102]</sup> Experimentelle Ergebnisse an dünnen Metallfolien belegten tatsächlich eine höhere Effizienz für eine RPDM. Weiterführende Experimente zeigten jedoch, dass die Effizienzsteigerung mit DMs ein sehr viel komplexeres Problem ist. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl eine APDM als auch eine RPDM effizienter als linear und zirkular polarisierte Strahlen sind. Abhängig von den optischen Eigenschaften des Metalls und seiner Dicke kann eine APDM in weichem Stahl bis zu viermal so effektiv sein und damit sogar die RPDM in ihrer Effizienz übertreffen.<sup>[18b]</sup> Überra-

schenderweise konnten Meier et al. zeigen, dass unter besonderen Bedingungen die Löcher, die mit einer APDM gebohrt werden, sehr viel kleiner sein können als mit einer RPDM derselben Fokusgröße.<sup>[18b]</sup>

Um untereinander verbundene Mikrolöcher in Silicium zu bohren, wurde für eine RPDM ein deutlich besseres Verhalten im Vergleich zu zirkular polarisiertem Licht beobachtet.<sup>[103]</sup> Die um einen Faktor von bis zu 2<sup>[103]</sup> bessere Abtragungsrate bestätigte genau den in Lit. [18a] vorhergesagten Wert. Der Durchmesser der gebohrten Löcher war um 30% verringert, während die höhere Effizienz der RPDM von der Wiederholungsrate und damit der Energie der verwendeten Pulse abhing. Der Durchmesser der Mikrolöcher nahm mit der Pulsennergie (steigender Wiederholungsrate) ab. Die Energieabhängigkeit der Abtragungsrate war für die RPDM stärker als für andere p-polarisierte Strahlen. Das Tiefenprofil hing ebenso stark von der Pulsennergie ab, wobei der Neigungswinkel gemeinsam mit dieser Größe abnahm. Gerade Seitenwände konnten zusammen mit einer sauberen Oberfläche und weniger Rückständen erreicht werden, was die Reinigungsprozedur nach dem Schneiden stark vereinfacht.<sup>[103]</sup>

### 13. Zusammenfassung und Ausblick

In den letzten Jahren sind Doughnut-Moden (DMs) in den Fokus des Interesses in verschiedenen Wissenschaftsbereichen gerückt. Zahlreiche Techniken wurden zur Herstellung ringförmiger Strahlen entwickelt, von denen hier nur einige vorgestellt werden konnten. Ihre physikalischen Eigenschaften wurden eingehend untersucht, mit besonderem Schwerpunkt auf ihrem Verhalten beim scharfen Fokussieren. Diese grundlegenden Untersuchungen zeigten die außergewöhnlichen Eigenschaften der DMs, die in vielfältiger Weise ausgenutzt werden können. Beispielsweise erlaubt die Einführung von DMs in die Lichtmikroskopie, Abbes berühmte Beugungsgrenze mithilfe der STED-Mikroskopie zu umgehen. In der spitzenverstärkten Nahfeldmikroskopie werden scharfe Metallspitzen mit DMs spezieller Polarisation beleuchtet, sogenannten radial polarisierten DMs (RPDMs). So können Plasmonenresonanzen in den Metallspitzen mit den starken longitudinal polarisierten Feldern angeregt werden, die durch scharfes Fokussieren dieser Moden erzeugt werden.

Im Schatten solch gut bekannter Anwendungen hat sich eine Anzahl neuer Techniken entwickelt, die vor allem radial und azimutal polarisiertes Licht verwenden. Diese Ansätze werden hier vorgestellt und reichen von der Einführung dieser Moden in verschiedene Methoden der Lichtmikroskopie und verwandte Techniken wie optische Fallen und Pinzetten bis zu mikromechanischen Anwendungen.

In der konventionellen Lichtmikroskopie kann radial polarisiertes Licht wegen seiner besonderen Eigenschaften beim Fokussieren zur Verbesserung der lateralen Auflösung eingesetzt werden. Dies ist jedoch nur ein Aspekt. Diese Moden haben auch das Interesse von Forschern auf sich gezogen, die auf dem Gebiet der Einzelmolekülmikroskopie und -spektroskopie aktiv sind. Aus grundlegender Sicht können einzelne Moleküle dazu genutzt werden, die beson-

dere Feldverteilung dieser Moden im Fokus abzubilden. Kennt man die Feldverteilung, erhält man andererseits zusätzliche Informationen über einzelne Moleküle wie z. B. ihre Orientierung. In besonderen Fällen kann man sogar chemische Reaktionen auf Einzelmolekülniveau beobachten. Sowohl mit einer APDM als auch mit einer RPDM lassen sich Informationen über die Orientierung einzelner Moleküle, oder allgemeiner gesagt, einzelner Nanoobjekte, z. B. Edelmetall- oder SiO<sub>2</sub>-Nanopartikel, erhalten. Natürlich ist dies nicht die einzige Technik, mit der Orientierungsinformationen zugänglich sind. Um die Möglichkeiten von DM in der Lichtmikroskopie zu verdeutlichen und die Vorteile, die ihre Einführung mit sich bringt zu unterstreichen, haben wir auch andere, gut etablierte Techniken zur Orientierungsbestimmung einzelner Moleküle, wie die defokussierte Abbildung und polarisationsempfindliche Methoden, vorgestellt.

Ausgehend von einzelnen Molekülen mögen einzelne Nanoobjekte dennoch von allgemeinem Interesse sein. Azimutal und radial polarisiertes Licht ermöglicht dabei wiederum Zugang zu zusätzlichen Informationen, die mit der konventionellen Lichtmikroskopie nicht erhältlich sind. Beispielsweise können Metallnanopartikel verschiedener Form mithilfe von DMs unterschieden werden.

Die einzige Modifikation, die im Vergleich zu einem konventionellen konfokalen Mikroskop nötig ist, ist die Modenumwandlung, für die eine Anzahl geeigneter Techniken verfügbar ist, die hier zum Teil vorgestellt wurden. Der technische Aufwand ist damit weitgehend vernachlässigbar. Kürzlich wurde über ein Laserrastermikroskop mit variabler Laserpolarisation berichtet,<sup>[104]</sup> das sicherlich für ähnliche Experimente genutzt werden könnte und besonders für biologische Proben geeignet erscheint. Solch ein System kann als Prototyp eines kommerziell erhältlichen Mikroskops betrachtet werden.

Auch weiterentwickelte Mikroskopietechniken wie die Oberflächenplasmonenresonanzabbildung oder die Frequenzverdopplungsmikroskopie profitieren von der Einführung von DMs. Eng mit der Mikroskopie verwandte Techniken wie optische Fallen und Pinzetten oder mikromechanische Anwendungen für das industrielle Bohren und Schneiden von Metallen sind ebenso betroffen.

Man sollte auch in Betracht ziehen, dass sich dieser Aufsatz vor allem mit RPDMs und APDMs erster Ordnung beschäftigt. Heutzutage werden auch DMs zweiter und dritter Ordnung immer mehr entdeckt,<sup>[39a,b]</sup> was die optische Auflösungsgrenze sogar noch weiter verbessern und vielseitige neue Werkzeuge für die Nanotechnologie bieten könnte. Beispielsweise könnte es möglich sein, durch Einstellen der Eigenschaften einer fokussierten RPDM zweiter Ordnung einen optischen Käfig zu erzeugen (eine zentrale dunkle Region im Fokus, umgeben von einem starken elektrischen Feldgradienten).<sup>[39a, 40a]</sup>

Wir glauben, dass diese Anwendungen nur der Anfang einer langen Reihe zukünftiger Techniken sind, die die günstigen Eigenschaften von DMs ausnutzen, so wie diese Strahlen immer mehr ins Bewusstsein der Fachwelt rücken. Obwohl die meisten hier vorgestellten Anwendungen in Bezug zur Mikroskopie stehen, zeigen die erreichten Ergebnisse bereits Wege in viele Richtungen und sind äußerst

vielversprechend für die nächsten Jahre. DMs stellen Verbindungen zwischen den verschiedensten Bereichen der Wissenschaft her, die normalerweise als weit voneinander entfernt gelten. Diese Verbindungen reichen von der reinen Optik und Lichtmikroskopie über das weite Feld der Nanotechnologie bis zur industriellen Anwendung des Metallschneidens.

Wir zeigen in diesem Aufsatz, dass das Eis gebrochen ist und wir heute den Anfang eines Prozesses erleben, der eine regelrechte Lawine neuartiger Anwendungen und Erkenntnisse auslösen könnte.

*Unser Dank gilt Frank Wackenhut für unterstützende Experimente und anregende Diskussionen. Ebenso danken wir der Deutschen Forschungsgemeinschaft DFG und der Landesstiftung Baden-Württemberg für die finanzielle Unterstützung.*

Ein eingegangen am 17. September 2010,  
veränderte Fassung am 15. Dezember 2010  
Online veröffentlicht am 17. Mai 2011

- [1] S. W. Hell, J. Wichmann, *Opt. Lett.* **1994**, *19*, 780–782.
- [2] S. W. Hell, *Science* **2007**, *316*, 1153–1158.
- [3] a) D. W. Pohl, W. Denk, M. Lanz, *Appl. Phys. Lett.* **1984**, *44*, 651–653; b) A. Lewis, M. Isaacson, A. Harootunian, A. Muray, *Ultramicroscopy* **1984**, *13*, 227–231.
- [4] a) A. Hartschuh, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8298–8312; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8178–8191.
- [5] a) S. Quabis, R. Dorn, M. Eberler, O. Glöckl, G. Leuchs, *Opt. Commun.* **2000**, *179*, 1–7; b) R. Dorn, S. Quabis, G. Leuchs, *Phys. Rev. Lett.* **2003**, *91*, 233901; c) J. Stadler, C. Stanciu, C. Stupperich, A. J. Meixner, *Opt. Lett.* **2008**, *33*, 681–683; d) A. Yanai, U. Levy, *Opt. Express* **2009**, *17*, 924–932; e) G. M. Lerman, A. Yanai, U. Levy, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 2139–2143.
- [6] a) L. Novotny, M. R. Beversluis, K. S. Youngworth, T. G. Brown, *Phys. Rev. Lett.* **2001**, *86*, 5251–5254; b) M. A. Lieb, A. J. Meixner, *Opt. Express* **2001**, *8*, 458–474.
- [7] a) J. Waluk, *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 945–952; b) H. Piwoński, C. Stupperich, A. Hartschuh, J. Sepiol, A. Meixner, J. Waluk, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5302–5303; c) H. Piwoński, A. Hartschuh, N. Urbańska, M. Pietraszkiewicz, J. Sepiol, A. J. Meixner, J. Waluk, *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 11514–11519.
- [8] a) J. Jasny, J. Sepiol, *Chem. Phys. Lett.* **1997**, *273*, 439–443; b) J. Sepiol, J. Jasny, J. Keller, U. P. Wild, *Chem. Phys. Lett.* **1997**, *273*, 444–448; c) R. M. Dickson, D. J. Norris, W. E. Moerner, *Phys. Rev. Lett.* **1998**, *81*, 5322–5325; d) A. P. Bartko, R. M. Dickson, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 3053–3056; e) A. P. Bartko, R. M. Dickson, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 11237–11241; f) M. Böhmer, J. Enderlein, *J. Opt. Soc. Am. B* **2003**, *20*, 554–559; g) D. Patra, I. Gregor, J. Enderlein, *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 6836–6841.
- [9] a) E. Betzig, R. J. Chichester, *Science* **1993**, *262*, 1422–1425; b) A. G. T. Ruiter, J. A. Veerman, M. F. Garcia-Parajo, N. F. van Hulst, *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101*, 7318–7323; c) F. Güttinger, J. Sepiol, T. Plakhotnik, A. Mitterdorfer, A. Renn, U. P. Wild, *J. Lumin.* **1993**, *56*, 29–38; d) T. Ha, T. Enderle, D. S. Chemla, P. R. Selvin, S. Weiss, *Phys. Rev. Lett.* **1996**, *77*, 3979–3982; e) K. D. Weston, L. S. Goldner, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 3453–3462; f) M. Vacha, M. Kotani, *J. Chem. Phys.* **2003**, *118*, 5279–5282; g) G. S. Harms, M. Sonnleitner, G. J. Schütz, H. J. Gruber, T. Schmidt, *Biophys. J.* **1999**, *77*, 2864–2870.
- [10] a) B. Sick, B. Hecht, L. Novotny, *Phys. Rev. Lett.* **2000**, *85*, 4482–4485; b) M. A. Lieb, J. M. Zavislan, L. Novotny, *J. Opt. Soc. Am. B* **2004**, *21*, 1210–1215.
- [11] a) A. V. Failla, H. Qian, H. Qian, A. Hartschuh, A. J. Meixner, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 1374–1378; b) T. Züchner, A. V. Failla, A. Hartschuh, A. J. Meixner, *J. Microsc.* **2008**, *229*, 337–343.
- [12] A. M. Chizhik, A. I. Chizhik, R. Gutbrod, A. J. Meixner, T. Schmidt, J. Sommerfeld, F. Huiskens, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 3239–3244.
- [13] a) M. Steiner, F. Schleifenbaum, C. Stupperich, A. V. Failla, A. Hartschuh, A. J. Meixner, *ChemPhysChem* **2005**, *6*, 2190–2196; b) D. Khoptyar, R. Gutbrod, A. Chizhik, J. Enderlein, F. Schleifenbaum, M. Steiner, A. J. Meixner, *Opt. Express* **2008**, *16*, 9907–9917; c) R. Gutbrod, A. Chizhik, A. Chizhik, D. Khoptyar, A. J. Meixner, *Opt. Lett.* **2009**, *34*, 629–631.
- [14] a) S. Sato, M. Ishigure, H. Inaba, *IET Electron. Lett.* **1991**, *27*, 1831–1832; b) A. Ashkin, J. M. Dziedzic, *Appl. Phys. Lett.* **1974**, *24*, 586–588; c) H. He, N. R. Heckenberg, H. Rubinsztein-Dunlop, *J. Mod. Opt.* **1995**, *42*, 217–223; d) H. He, M. E. J. Friese, N. R. Heckenberg, H. Rubinsztein-Dunlop, *Phys. Rev. Lett.* **1995**, *75*, 826–829; e) K. T. Gahagan, G. A. Swartzlander, Jr., *Opt. Lett.* **1996**, *21*, 827–829; f) M. E. J. Friese, H. Rubinsztein-Dunlop, N. R. Heckenberg, E. W. Dearden, *Appl. Opt.* **1996**, *35*, 7112–7116; g) B. P. S. Ahluwalia, X.-C. Yuan, K. J. Moh, J. Bu, *Appl. Phys. Lett.* **2007**, *91*, 171102.
- [15] a) V. G. Shvedov, A. S. Desyatnikov, A. V. Rode, W. Krolikowski, Y. S. Kivshar, *Opt. Express* **2009**, *17*, 5743–5757; b) K. T. Gahagan, G. A. Swartzlander, Jr., *J. Opt. Soc. Am. B* **1999**, *16*, 533–537.
- [16] a) K. Watanabe, N. Horiguchi, H. Kano, *Appl. Opt.* **2007**, *46*, 4985–4990; b) T. Grosjean, D. Courjon, *J. Microsc.* **2001**, *202*, 273–278; c) Q. Zhan, *Opt. Lett.* **2006**, *31*, 1726–1728; d) T. Grosjean, D. Courjon, D. van Labeke, *J. Microsc.* **2003**, *210*, 319–323; e) W. Chen, Q. Zhan, *Opt. Lett.* **2009**, *34*, 722–724; f) K. J. Moh, X.-C. Yuan, J. Bu, S. W. Zhu, B. Z. Gao, *Opt. Express* **2008**, *16*, 20734–20741; g) H. Kano, S. Mizuguchi, S. Kawata, *J. Opt. Soc. Am. B* **1998**, *15*, 1381–1386.
- [17] a) K. Yoshiki, M. Hashimoto, T. Araki, *Jpn. J. Appl. Phys.* **2005**, *44*, L1066–L1068; b) M. Hashimoto, K. Yamada, T. Araki, *Opt. Rev.* **2005**, *12*, 37–41; c) K. Yoshiki, K. Ryosuke, M. Hashimoto, N. Hashimoto, T. Araki, *Opt. Lett.* **2007**, *32*, 1680–1682.
- [18] a) V. G. Niziev, A. V. Nesterov, *J. Phys. D* **1999**, *32*, 1455–1461; b) M. Meier, V. Romano, T. Feurer, *Appl. Catal. A* **2007**, *86*, 329–334.
- [19] a) L. Novotny, B. Hecht, *Principles of Nano-Optics*, University Press, Cambridge, **2006**; b) S. Quabis, R. Dorn, G. Leuchs, *Appl. Catal. B* **2005**, *81*, 597–600; c) S. Quabis, R. Dorn, M. Eberler, O. Glöckl, G. Leuchs, *Appl. Catal. B* **2001**, *72*, 109–113.
- [20] a) N. Davidson, N. Bokor, *Opt. Lett.* **2004**, *29*, 1318–1320; b) K. Sakai, S. Noda, *IET Electron. Lett.* **2007**, *43*, 107–108.
- [21] a) Lit. [19a]; b) T. Züchner, F. Wackenhut, A. V. Failla, A. J. Meixner, *Appl. Surf. Sci.* **2009**, *255*, 5391–5395.
- [22] a) K. S. Youngworth, T. G. Brown, *Opt. Express* **2000**, *7*, 77–87; b) N. K. Viswanathan, V. V. G. Inavalli, *Opt. Lett.* **2009**, *34*, 1189–1191; c) Q. Zhan, *J. Opt. A* **2003**, *5*, 229–232; d) G. M. Lerman, Y. Lilach, U. Levy, *Opt. Lett.* **2009**, *34*, 1669–1671.
- [23] a) G. C. Dente, *Appl. Opt.* **1979**, *18*, 2911–2912; b) R. A. Chodzko, S. B. Mason, E. B. Turner, W. W. Plummer, Jr., *Appl. Opt.* **1980**, *19*, 778–789; c) H. Kogelnik, T. Li, *Appl. Opt.* **1966**, *5*, 1550–1567; d) G. Machavariani, Y. Lumer, I. Moshe, A. Meir, S. Jackel, N. Davidson, *Appl. Opt.* **2007**, *46*, 3304–3310.
- [24] a) D. Pohl, *Appl. Phys. Lett.* **1972**, *20*, 266–267; b) Y. Mushiake, K. Matsumura, N. Nakajima, *Proc. IEEE* **1972**, *60*, 1107–1109; c) M. A. Ahmed, J. Schulz, A. Voss, O. Parriaux, J.-C. Pommier, T. Graf, *Opt. Lett.* **2007**, *32*, 1824–1826; d) R. Oron, S. Blit, N.

- Davidson, A. A. Friesem, Z. Bomzon, E. Hasman, *Appl. Phys. Lett.* **2000**, 77, 3322–3324; e) Y. Kozawa, S. Sato, *Opt. Lett.* **2005**, 30, 3063–3065; f) T. Hirayama, Y. Kozawa, T. Nakamura, S. Sato, *Opt. Express* **2006**, 14, 12839–12845; g) A. Ito, Y. Kozawa, S. Sato, *J. Opt. Soc. Am. B* **2009**, 26, 708–712; h) F. Enderli, T. Feurer, *Opt. Lett.* **2009**, 34, 2030–2032.
- [25] T. A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A. Egner, S. W. Hell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 8206–8210.
- [26] S. C. Tidwell, D. H. Ford, W. D. Kimura, *Appl. Opt.* **1990**, 29, 2234–2239.
- [27] a) S. C. Tidwell, G. H. Kim, W. D. Kimura, *Appl. Opt.* **1993**, 32, 5222–5229; b) D. P. Biss, K. S. Youngworth, T. G. Brown, *Appl. Opt.* **2006**, 45, 470–479.
- [28] T. A. Klar, E. Engel, S. W. Hell, *Phys. Rev. E* **2001**, 64, 066613.
- [29] P. B. Phua, W. J. Lai, Y. L. Lim, B. S. Tan, R. F. Wu, K. S. Lai, H. W. Tan, *physics.optics* **2007**, arXiv:0710.4979v1.
- [30] G. Machavariani, Y. Lumer, I. Moshe, A. Meir, S. Jackel, *Opt. Lett.* **2007**, 32, 1468–1470.
- [31] G. M. Lerman, U. Levy, *Opt. Lett.* **2008**, 33, 2782–2784.
- [32] M. Stalder, M. Schadt, *Opt. Lett.* **1996**, 21, 1948–1950.
- [33] M. Schadt, W. Helfrich, *Appl. Phys. Lett.* **1971**, 18, 127–128.
- [34] M. A. A. Neil, F. Massoumian, R. Juškaitis, T. Wilson, *Opt. Lett.* **2002**, 27, 1929–1931.
- [35] E. G. Churin, J. Hoßfeld, T. Tschudi, *Opt. Commun.* **1993**, 99, 13–17.
- [36] a) T. Grosjean, D. Courjon, M. Spajer, *Opt. Commun.* **2002**, 203, 1–5; b) T. Grosjean, A. Sabac, D. Courjon, *Opt. Commun.* **2005**, 252, 12–21; c) T. Grosjean, M. Suarez, A. Sabac, *Appl. Phys. Lett.* **2008**, 93, 231106.
- [37] a) Z. Bomzon, G. Biener, V. Kleiner, E. Hasman, *Opt. Lett.* **2002**, 27, 285–287; b) J.-i. Hotta, H. Uji-i, J. Hofkens, *Opt. Express* **2006**, 14, 6273–6278; c) S. Sato, Y. Kozawa, *Opt. Lett.* **2009**, 34, 3166–3168.
- [38] a) T. Grosjean, D. Courjon, *Phys. Rev. E* **2003**, 67, 046611; b) R. K. Singh, P. Senthilkumaran, K. Singh, *J. Opt. Soc. Am. A* **2009**, 26, 576–588; c) C. J. R. Sheppard, A. Choudhury, *Appl. Opt.* **2004**, 43, 4322–4327; d) I. J. Cooper, C. J. R. Sheppard, M. Sharma, *Optik* **2002**, 113, 293–298; e) D. G. Hall, *Opt. Lett.* **1996**, 21, 9–11; f) R. H. Jordan, D. G. Hall, *Opt. Lett.* **1994**, 19, 427–429.
- [39] a) Y. Kozawa, S. Sato, *Opt. Lett.* **2006**, 31, 820–822; b) Y. Kozawa, S. Sato, *J. Opt. Soc. Am. A* **2007**, 24, 1793–1798; c) Q. Zhan, J. R. Leger, *Opt. Express* **2002**, 10, 324–331; d) I. J. Cooper, M. Roy, C. J. R. Sheppard, *Opt. Express* **2005**, 13, 1066–1071; e) Y. Lumer, I. Moshe, *Opt. Lett.* **2009**, 34, 265–267; f) D. P. Brown, A. K. Spilman, T. G. Brown, R. Borghi, S. N. Volkov, E. Wolf, *Opt. Commun.* **2008**, 281, 5287–5290; g) Y. Luo, B. Lü, *J. Opt. A* **2009**, 11, 015707; h) R. Martínez-Herrero, P. M. Mejías, G. Piquero, V. Ramírez-Sánchez, *Opt. Commun.* **2008**, 281, 1976–1980; i) S. Sato, Y. Kozawa, *J. Opt. Soc. Am. A* **2009**, 26, 142–146; j) R. Borghi, M. Santarsiero, M. A. Alonso, *J. Opt. Soc. Am. A* **2005**, 22, 1420–1431.
- [40] a) G. Zhou, *J. Opt. Soc. Am. A* **2009**, 26, 1654–1660; b) Y. Lumer, I. Moshe, A. Meir, Y. Paiken, G. Machavariani, S. Jackel, *J. Opt. Soc. Am. B* **2007**, 24, 2279–2286.
- [41] B. Richards, E. Wolf, *Proc. R. Soc. London Ser. A* **1959**, 253, 358–379.
- [42] E. Wolf, *Proc. R. Soc. London Ser. A* **1959**, 253, 349–357.
- [43] T. Züchner, A. V. Failla, M. Steiner, A. J. Meixner, *Opt. Express* **2008**, 16, 14635–14644.
- [44] C. Eggeling, C. Ringemann, R. Medda, G. Schwarzmann, K. Sandhoff, S. Polyakova, V. N. Belov, B. Hein, C. von Middendorff, A. Schonle, S. W. Hell, *Nature* **2009**, 457, 1159–1162.
- [45] J. Keller, A. Schönle, S. W. Hell, *Opt. Express* **2007**, 15, 3361–3371.
- [46] a) K. I. Willig, S. O. Rizzoli, V. Westphal, R. Jahn, S. W. Hell, *Nature* **2006**, 440, 935–939; b) E. Engel, N. Huse, T. A. Klar, S. W. Hell, *Appl. Phys. B* **2003**, 77, 11–17.
- [47] M. Dyba, S. W. Hell, *Phys. Rev. Lett.* **2002**, 88, 163901.
- [48] M. C. Lang, T. Staudt, J. Engelhardt, S. W. Hell, *New J. Phys.* **2008**, 10, 043041.
- [49] N. Bokor, N. Davidson, *Opt. Commun.* **2008**, 281, 5499–5503.
- [50] M. Hofmann, C. Eggeling, S. Jakobs, S. W. Hell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 17565–17569.
- [51] G. Terakado, K. Watanabe, H. Kano, *Appl. Opt.* **2009**, 48, 1114–1118.
- [52] F. Lu, W. Zheng, Z. Huang, *Opt. Lett.* **2009**, 34, 1870–1872.
- [53] W. T. Tang, E. Y. S. Yew, C. J. R. Sheppard, *Opt. Lett.* **2009**, 34, 2147–2149.
- [54] M. Kreiter, M. Prummer, B. Hecht, U. P. Wild, *J. Chem. Phys.* **2002**, 117, 9430–9433.
- [55] J. Enderlein, E. Toprak, P. R. Selvin, *Opt. Express* **2006**, 14, 8111–8120.
- [56] M. A. Osborne, *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 18153–18161.
- [57] A. P. Bartko, L. A. Peyer, R. M. Dickson, A. Mehta, T. Thundat, R. Bhargava, M. D. Barnes, *Chem. Phys. Lett.* **2002**, 358, 459–465.
- [58] W. Schroeyers, R. Vallée, D. Patra, J. Hofkens, S. Habuchi, T. Vosch, M. Cotlet, K. Müllen, J. Enderlein, F. C. De Schryver, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 14310–14311.
- [59] a) E. Toprak, J. Enderlein, S. Syed, S. A. McKinney, R. G. Petschek, T. Ha, Y. E. Goldman, P. R. Selvin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 6495–6499; b) H. Uji-i, S. M. Melnikov, A. Deres, G. Bergamini, F. De Schryver, A. Herrmann, K. Müllen, J. Enderlein, J. Hofkens, *Polymer* **2006**, 47, 2511–2518.
- [60] a) H. Sosa, E. J. G. Peterman, W. E. Moerner, L. S. B. Goldstein, *Nat. Struct. Biol.* **2001**, 8, 540–544; b) E. J. G. Peterman, H. Sosa, L. S. B. Goldstein, W. E. Moerner, *Biophys. J.* **2001**, 81, 2851–2863.
- [61] W. Göhde, Jr., U. C. Fischer, H. Fuchs, J. Tittel, T. Basché, C. Bräuchle, A. Herrmann, K. Müllen, *J. Phys. Chem. A* **1998**, 102, 9109–9116.
- [62] a) T. Ha, J. Glass, T. Enderle, D. S. Chemla, S. Weiss, *Phys. Rev. Lett.* **1998**, 80, 2093–2096; b) T. Ha, T. A. Laurence, D. S. Chemla, S. Weiss, *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103, 6839–6850.
- [63] B. C. Stevens, T. Ha, *J. Chem. Phys.* **2004**, 120, 3030–3039.
- [64] a) K. Adachi, R. Yasuda, H. Noji, H. Itoh, Y. Harada, M. Yoshida, K. Kinoshita, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 7243–7247; b) J. E. T. Corrie, B. D. Brandmeier, R. E. Ferguson, D. R. Trentham, J. Kendrick-Jones, S. C. Hopkins, U. A. van der Heide, Y. E. Goldman, C. Sabido-David, R. E. Dale, S. Criddle, M. Irving, *Nature* **1999**, 400, 425–430; c) D. M. Warshaw, E. Hayes, D. Gaffney, A.-M. Lauzon, J. Wu, G. Kennedy, K. Trybus, S. Lowey, C. Berger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 8034–8039; d) J. N. Forkey, M. E. Quinlan, M. A. Shaw, J. E. T. Corrie, Y. E. Goldman, *Nature* **2003**, 422, 399–404; e) I. Sase, H. Miyata, S. Ishiwata, K. Kinoshita, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 5646–5650.
- [65] S. A. Empedocles, R. Neuhauser, M. G. Bawendi, *Nature* **1999**, 399, 126–130.
- [66] J. T. Fourkas, *Opt. Lett.* **2001**, 26, 211–213.
- [67] C.-Y. Lu, D. A. Vanden Bout, *J. Chem. Phys.* **2008**, 128, 244501.
- [68] J. Hohlbein, C. G. Hübner, *Appl. Phys. Lett.* **2005**, 86, 121104.
- [69] A. Débarre, R. Jaffiol, C. Julien, D. Nutarelli, A. Richard, P. Tchénio, F. Chaput, J.-P. Boilot, *Eur. Phys. J. D* **2004**, 28, 67–77.
- [70] M. Prummer, B. Sick, B. Hecht, U. P. Wild, *J. Chem. Phys.* **2003**, 118, 9824–9829.
- [71] C. G. Hübner, V. Ksenofontov, F. Nolde, K. Müllen, T. Basché, *J. Chem. Phys.* **2004**, 120, 10867–10870.
- [72] a) P. Dedecker, B. Muls, J. Hofkens, J. Enderlein, J.-i. Hotta, *Opt. Express* **2007**, 15, 3372–3383; b) V. Westphal, L. Kastrup, S. W. Hell, *Appl. Phys. B* **2003**, 77, 377–380.

- [73] J. Waluk, E. Vogel, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 4530–4535.
- [74] A. V. Failla, S. Jäger, T. Züchner, M. Steiner, A. J. Meixner, *Opt. Express* **2007**, *15*, 8532–8542.
- [75] a) J. S. Batchelder, M. A. Taubenblatt, International Business Machines Corporation (Armonk, NY), U.S., **1991**; b) L. Novotny, R. D. Grober, K. Karrai, *Opt. Lett.* **2001**, *26*, 789–791.
- [76] K. J. Vahala, *Nature* **2003**, *424*, 839–846.
- [77] M. Steiner, A. V. Failla, A. Hartschuh, F. Schleifenbaum, C. Stupperich, A. J. Meixner, *New J. Phys.* **2008**, *10*, 123017.
- [78] R. Gutbrod, D. Khoptyar, M. Steiner, A. M. Chizhik, A. I. Chizhik, S. Bär, A. J. Meixner, *Nano Lett.* **2010**, *10*, 504–508.
- [79] A. Ashkin, *Phys. Rev. Lett.* **1970**, *24*, 156–159.
- [80] a) A. L. Migdall, J. V. Prodan, W. D. Phillips, T. H. Bergeman, H. J. Metcalf, *Phys. Rev. Lett.* **1985**, *54*, 2596–2599; b) S. Chu, J. E. Bjorkholm, A. Ashkin, A. Cable, *Phys. Rev. Lett.* **1986**, *57*, 314–317; c) V. S. Bagnato, G. P. Lafyatis, A. G. Martin, E. L. Raab, R. N. Ahmad-Bitar, D. E. Pritchard, *Phys. Rev. Lett.* **1987**, *58*, 2194–2197.
- [81] a) A. Ashkin, *Biophys. J.* **1992**, *61*, 569–582; b) A. Ashkin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 4853–4860.
- [82] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, *Science* **1987**, *235*, 1517–1520.
- [83] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, T. Yamane, *Nature* **1987**, *330*, 769–771.
- [84] K. C. Neuman, S. M. Block, *Rev. Sci. Instrum.* **2004**, *75*, 2787–2809.
- [85] a) Q. Zhan, *Opt. Express* **2004**, *12*, 3377–3382; b) H. Kawauchi, K. Yonezawa, Y. Kozawa, S. Sato, *Opt. Lett.* **2007**, *32*, 1839–1841; c) T. A. Nieminen, N. R. Heckenberg, H. Rubinsztein-Dunlop, *Opt. Lett.* **2008**, *33*, 122–124; d) D. W. Zhang, X.-C. Yuan, *Opt. Lett.* **2003**, *28*, 740–742.
- [86] S. Yan, B. Yao, *Phys. Rev. A* **2007**, *76*, 053836.
- [87] A. T. O’Neil, M. J. Padgett, *Opt. Commun.* **2001**, *193*, 45–50.
- [88] M. E. J. Friese, T. A. Nieminen, N. R. Heckenberg, H. Rubinsztein-Dunlop, *Nature* **1998**, *394*, 348–350.
- [89] M. Fleischer, C. Stanciu, F. Stade, J. Stadler, K. Braun, A. Heeren, M. Häffner, D. P. Kern, A. J. Meixner, *Appl. Phys. Lett.* **2008**, *93*, 111114.
- [90] a) A. Bouhelier, *Microsc. Res. Tech.* **2006**, *69*, 563–579; b) L. Novotny, S. J. Stranick, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2006**, *57*, 303–331; c) *Tip Enhancement (Advances in Nano-Optics and Nano-Photonics)* (Hrsg.: S. Kawata, V. M. Shalaev), Elsevier, Amsterdam, **2007**.
- [91] J. Homola, S. S. Yee, G. Gauglitz, *Sens. Actuators B* **1999**, *54*, 3–15.
- [92] B. Rothenhäusler, W. Knoll, *Nature* **1988**, *332*, 615–617.
- [93] a) C. E. H. Berger, R. P. H. Kooyman, J. Greve, *Rev. Sci. Instrum.* **1994**, *65*, 2829–2836; b) W. Hickel, W. Knoll, *Thin Solid Films* **1990**, *187*, 349–356.
- [94] K. Watanabe, G. Terakado, H. Kano, *Opt. Lett.* **2009**, *34*, 1180–1182.
- [95] K. J. Moh, X.-C. Yuan, J. Bu, S. W. Zhu, B. Z. Gao, *Opt. Lett.* **2009**, *34*, 971–973.
- [96] D. P. Biss, T. G. Brown, *Opt. Lett.* **2003**, *28*, 923–925.
- [97] M. Hashimoto, K. Ashida, K. Yoshiaki, T. Araki, *Opt. Lett.* **2009**, *34*, 1423–1425.
- [98] E. Y. S. Yew, C. J. R. Sheppard, *Opt. Commun.* **2007**, *275*, 453–457.
- [99] S. Yang, Q. Zhan, *J. Opt. A Opt.* **2008**, *10*, 125103.
- [100] H. Dehez, M. Piché, Y. De Koninck, *Opt. Lett.* **2009**, *34*, 3601–3603.
- [101] D. Ivanov, V. Shcheslavskiy, I. Märki, M. Leutenegger, T. Lasser, *Appl. Phys. Lett.* **2009**, *94*, 083902.
- [102] A. V. Nesterov, V. G. Niziev, *J. Phys. D* **2000**, *33*, 1817–1822.
- [103] K. Venkatakrishnan, B. Tan, *J. Micromech. Microeng.* **2006**, *16*, 2603–2607.
- [104] B. R. Boruah, M. A. A. Neil, *Rev. Sci. Instrum.* **2009**, *80*, 013705.