

- [14] A. Schmuck, P. Pykkö, K. Seppelt, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 211; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 213.
- [15] S. Wallenhauer, K. Seppelt, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1044; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 976.
- [16] Dagegen sind in der Struktur von Pentamethylantimon, das in derselben Raumgruppe *Cmcm* kristallisiert, die Sb-C-Abstände der axial angeordneten Methylgruppen um 7 pm länger als die Sb-C-Bindungen der äquatorial angeordneten Methylgruppen. C. Pulham, A. Haaland, A. Hammel, K. Rypdal, H. P. Verne, H. V. Volden, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 1534; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 1464; S. Wallenhauer, D. Leopold, K. Seppelt, *Inorg. Chem.*, im Druck.
- [17] T. Auf der Heyde, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 871; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 823.
- [18] J. C. Duncan, F. G. Thomas, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1967**, *29*, 869.
- [19] L. Ahmed, J. A. Morrison, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7911.
- [20] Wir danken Herrn Prof. Dr. K. Seppelt für die Überlassung von Strukturunterlagen. Die Berechnung der Struktur von **10** wurde von den Autoren [15] in der nichtkonventionellen Aufstellung *Cmcm* vorgenommen. Unseren Abbildungen liegt die konventionelle Aufstellung *Cmcm* zugrunde.
- [21] Eine Verzwilligung der Kristalle an **10** ist nach den uns vorliegenden Strukturdaten nur schwer vorstellbar. Anders verhält es sich bei einer Überstruktur, die z.B. zur Verdopplung einer der Gitterkonstanten führen würde. Betroffen wären davon aber in der Hauptsache die Positionen der C-Atome. Aufgrund des hohen Streuvermögens der Bi-Atome ließen sich eventuell auftretende Überstrukturreflexe nur mit Tieftemperaturaufnahmen detektieren.

Detektion und Abbildung einzelner Moleküle mit optischer Nahfeldmikroskopie

Thomas Basché*

....we never experiment with just one electron or atom or molecule. In thought experiments we sometimes assume we do; this invariably entails ridiculous consequences.“

Erwin Schrödinger, 1952

Die erfolgreiche Speicherung und spektroskopische Charakterisierung einzelner Atome in elektromagnetischen Fallen oder die Entwicklung von Mikroskopietechniken mit atomarer Auflösung wie der Rastertunnel-(STM) und Rasterkraftmikroskopie (AFM) sind nur zwei Beispiele dafür, daß diese Aussage Schrödingers inzwischen von der Realität überholt worden ist. Man sollte jedoch nicht vergessen, daß die Beobachtung einzelner Teilchen, die heutzutage schon fast selbstverständlich scheint, unabhängig von der jeweiligen Methode erst seit ca. 10–15 Jahren möglich ist. Dieses Highlight befaßt sich mit neuen Entwicklungen bei der optischen Detektion einzelner Moleküle, andere Verfahren zur Detektion einzelner Teilchen müssen daher unberücksichtigt bleiben. Die optische Detektion eines einzelnen Moleküls in der kondensierten Phase gelang erstmals 1989, als ein einzelnes Pentacenmolekül in einem organischen Mischkristall bei tiefen Temperaturen ($T = 1.5$ K) spektroskopisch nachgewiesen werden konnte^[1]. Kurz darauf und völlig unabhängig von den Arbeiten mit Festkörpern führten auch Bemühungen, einzelne Farbstoffmoleküle in einer Flüssigkeit nachzuweisen, zum Erfolg^[2]. Während bei tiefen Temperaturen im Festkörper das einzelne Molekül wegen der extrem schmalen optischen Linienbreite eine äußerst empfindliche spektroskopische Sonde für die Eigenschaften seiner lokalen Umgebung ist, stehen bei der Einzelmoleküldetektion (Single Molecule Detection, SMD) in Flüssigkeiten oder generell bei allen Techniken, die bei Raumtemperatur durchgeführt werden können, neben spektroskopischen primär analytische Fragestellungen im Vordergrund. SMD ist das Limit in der chemischen Spurenanalyse

und wurde als realistische Methode vorgeschlagen, um die DNA des menschlichen Genoms in vertretbarer Zeit zu sequenzieren. Es ist abzusehen, daß in der Molekularbiologie die Detektion einzelner, mit Fluoreszenzfarbstoffen markierter Partikel (Proteine, Viren) immer größere Bedeutung erlangen wird.

Die optische Spektroskopie einzelner Moleküle hat bereits eine Fülle neuartiger experimenteller Resultate hervorgebracht. Dazu gehört auch die Entwicklung von Techniken, um einzelne Moleküle mit immer höherer Empfindlichkeit optisch charakterisieren zu können. Die sehr empfindliche Fluoreszenzdetektion ist ideal geeignet zur optischen Beobachtung einzelner Moleküle. Die experimentelle Herausforderung besteht dabei darin, das schwache Fluoreszenzlicht eines einzelnen Moleküls noch vom Streulichtuntergrund der Matrix (Rayleigh- und Raman-Streuung, Matrixlumineszenz) unterscheiden zu können. Da das Signal proportional zur Bestrahlungsintensität (Leistung/Fläche) ist und das Untergrundlicht und der damit verbundene Rauschpegel mit zunehmender Leistung ansteigen, ist die Empfindlichkeit um so größer, je kleiner die beleuchtete Fläche ist. Das Laseranregungslicht muß demzufolge so gut wie möglich fokussiert werden. Bei der Fokussierung mit Linsen tritt jedoch das fundamentale Abbesche Beugungslimit auf, d.h. es können keine Lichtföki kleiner als die Lichtwellenlänge erzeugt werden. Mit der optischen Raster-Nahfeldmikroskopie (Near Field Scanning Optical Microscopy, NSOM) wurde jedoch in den letzten Jahren eine Methode entwickelt, deren Basis die Überwindung dieses Limits ist und die sich deshalb ideal zur Fluoreszenzdetektion einzelner Moleküle eignet. Kürzlich ist nun unabhängig voneinander E. Betzig et al.^[3] und W. P. Ambrose et al.^[4] gelungen, mit dieser neuen Mikroskopietechnik einzelne Farbstoffmoleküle auf der Oberfläche eines Substrats bei Raumtemperatur abzubilden. Bevor im folgenden diese Experimente beschrieben werden, sollen das Prinzip und potentielle Anwendungsmöglichkeiten der optischen Nahfeldmikroskopie dargestellt werden.

Konventionelle optische Mikroskopie ist in ihrer Auflösung limitiert auf ca. $\lambda/2$ der verwendeten Lichtwellenlänge λ . Dieses

[*] Dr. T. Basché

Institut für Physikalische Chemie der Universität
Sophienstraße 11, D-80333 München
Telefax: Int. + 89/590-2602

theoretische Auflösungsvermögen, das eine Folge von Beugungseffekten wegen der Wellennatur des Lichts ist, kann in guten optischen Mikroskopen tatsächlich erreicht werden und liegt für grünes Licht unter idealen Bedingungen bei ca. $0.3\text{ }\mu\text{m}$. (Es soll an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben, daß durch besondere „Tricks“ auch in der konfokalen Mikroskopie eine Auflösung $<\lambda/2$ erreicht werden kann.) Wird Licht durch eine Apertur geschickt, deren Durchmesser kleiner als die Lichtwellenlänge ist, so existiert ein Bereich in unmittelbarer Nähe der Apertur, in dem der Lichtstrahl ungefähr deren Dimensionen beibehält. Diesen Bereich bezeichnet man als optisches Nahfeld. Eine solche Apertur kann über die Oberfläche eines nahegelegenen Objekts gerastert werden. Aus vielen solchen Punktaufnahmen kann dann ein Bild der Oberfläche zusammengesetzt werden. Die Auflösung dieser Mikroskopie ist nicht durch die Wellenlänge des Lichts begrenzt, sondern nur durch die Abmessungen der Apertur und ihren Abstand vom Objekt.

Im Bereich des sichtbaren Lichts wurde die Nahfeldmikroskopie erstmals unabhängig voneinander von Pohl et al.^[5] und Lewis et al.^[6] demonstriert. Seit dieser Zeit wurde eine Reihe optischer Nahfeldsonden entwickelt. In den meisten Fällen wird das Licht von einer Quelle über eine Wellenleiterstruktur zur Apertur geführt. Dabei ist es vor allem wichtig, möglichst viel Licht durch die kleine Apertur zu schicken, um schnell und mit gutem Signal-Rausch-Verhältnis Bilder aufnehmen zu können. Als ideale Aperturen mit Dimensionen im Bereich von einigen zehn Nanometern erwiesen sich die Spitzen verjüngter optischer Fasern oder Mikropipetten. Jedoch auch andere Aperturgeometrien, z.B. eine partiell metallbeschichtete, tetraedrische Spitzewurden vorgeschlagen und kürzlich erfolgreich eingesetzt^[7]. Die Apertur kann auch verwendet werden, um Licht vom Objekt einzusammeln oder evaneszente Wellen im optischen Nahfeld in propagierende Moden des optischen Wellenleiters zu streuen. Im folgenden soll beispielhaft der Aufbau eines Nahfeldmikroskops im Beleuchtungs- oder Transmissionsmodus beschrieben werden (Abb. 1), bei dem die Spitz einer verjüngten optischen Faser als Apertur über das abzubildende Objekt gerastert wird.

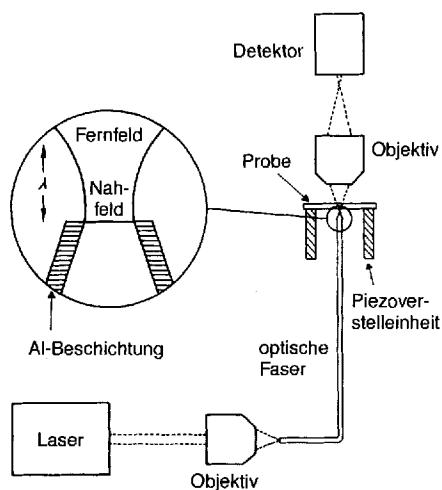


Abb. 1. Schematischer Aufbau eines Raster-Nahfeldmikroskops. Der vergrößerte Ausschnitt links zeigt die Faserspitze mit den Bereichen des Nah- und Fernfeldes. Zu einer detaillierteren Beschreibung siehe Text.

Das Licht wird mit einem Objektiv in die Faser eingekoppelt. Die Faser verjüngt sich vom ursprünglichen Faserdurchmesser zu einer Spitz, deren flaches Ende senkrecht zur Faserachse steht. Zur Herstellung der Spitz wird die Faser mit einem CO_2 -Laser aufgeheizt und gleichzeitig auseinandergezogen. Dieser Prozeß führt sehr reproduzierbar zu Aperturen zwischen 20 und 500 nm. Die Spitz der Faser wird abschließend mit einem Metallfilm (Al) bedampft, um das seitliche Austreten des Lichts zu verhindern. Die Probe wird in einen Abstand von ca. 10 nm zur Faserspitze gebracht und in x,y -Richtung mit einer Piezoverstelleneinheit bewegt. An jedem Punkt wird dann das transmittierte Lichtsignal detektiert, und die Abbildung wird pixelweise zusammengesetzt. Bei der Aufnahme des Bildes muß der Abstand zwischen Faserspitze und Objekt durch einen aktiven Rückkopplungsmechanismus konstant gehalten werden. Eine elegante Möglichkeit, dies zu realisieren, bietet die Scherkraftdetektion (nicht eingezeichnet in Abb. 1), bei der die Faserspitze bei einer ihrer mechanischen Resonanzfrequenzen angeregt wird und die Dämpfung dieser Schwingung bei Annäherung des Objekts an die Faser als abstandsabhängiges Signal aufgenommen wird. Mit einem Aufbau ähnlich dem in Abbildung 1 konnte eine laterale Auflösung (x,y) von ca. 12 nm (ca. $\lambda/43$) demonstriert werden^[8].

Vergleicht man die derzeit erzielbare Auflösung von NSOM mit der anderer Rastermikroskopien wie STM oder AFM, so ist sie um ein bis zwei Größenordnungen schlechter. Jedoch bietet NSOM eine Reihe höchst interessanter Möglichkeiten: 1) Es können alle Kontrastmechanismen, die aus der konventionellen optischen Mikroskopie (Fernfeld) bekannt sind, z.B. Polarisierung, Brechungsindex oder Fluoreszenz, eingesetzt werden. 2) NSOM kann unter Umgebungsbedingungen durchgeführt werden, und Licht beeinflußt das zu untersuchende Objekt nur wenig – eine wichtige Voraussetzung für Messungen an Biomolekülen. 3) Spezifische Wechselwirkungen im optischen Nahfeld (evaneszente Moden) können z.B. zu einer lokalen Verstärkung der Fluoreszenz führen. 4) Ein weiteres, sehr attraktives Merkmal von NSOM ist die Möglichkeit der Kombination mit anderen optischen Spektroskopietechniken bei gleichzeitig hoher lokaler Auflösung. Eine gute Übersicht über neue, teilweise spektakuläre nahfeldmikroskopische Arbeiten, vielfach an biologischen Systemen, bietet der Konferenzband^[9] zur Second-Near-Field Optics Conference in Raleigh, NC, USA, 1993. Er enthält neben NSOM-Bildern von Blutzellen oder DNS auch z.B. solche von Quantenschichten. Erste Untersuchungen zur magnetooptischen Datenspeicherung mit NSOM ergaben Speicherdichten von 7 Gbit cm^{-2} , wobei die lokale Auflösung 30–60 nm betrug^[10].

In Abbildung 2 ist ein NSOM-Bild (Betzig et al.) eines dünnen Polymethylmethacrylat(PMMA)-Films zu sehen, auf den lipophile Cyaninmoleküle in hoher Verdünnung (ca. 23 Moleküle pro μm^2) aufgebracht wurden^[31]. Die hohe Verdünnung gewährleistet einen mittleren Abstand zwischen den Molekülen, der größer ist als der Aperturdurchmesser; dies ist Voraussetzung dafür, daß einzelne Moleküle aufgelöst werden können. Die Funktionsweise des Nahfeldmikroskops war die in Abbildung 1 dargestellte. Die zur Fluoreszenz angeregten individuellen Moleküle erscheinen als mikroskopische Lichtquellen, die lateral innerhalb 50 nm und vertikal innerhalb 5 nm aufgelöst werden konnten. Daß es sich wirklich um die Emission einzelner



Abb. 2. Nahfeldmikroskopische Abbildung der Fluoreszenz individueller Cyaninmoleküle auf der Oberfläche eines PMMA-Films (aus Lit. [3]).

Moleküle handelt, ist durch vielfältige Argumente belegt. Am meisten überzeugt die Tatsache, daß das photoinduzierte Ausbleichen, das bei einigen der Moleküle nach längerer Belichtungszeit auftritt, nicht zu einer kontinuierlichen Schwächung der Signale führt, sondern zu einer diskreten und vollständigen Auslöschung einzelner Emissionen. Das sehr gute Signal-Rausch-Verhältnis in Abbildung 2 ist – wie bereits eingangs ausgeführt – vor allem auf das geringe Untergrundsignal der NSOM-Technik zurückzuführen, bei der nur ein sehr kleines Probenvolumen mit hoher Intensität beleuchtet wird. Noch nicht geklärt ist, ob eine Verstärkung der Fluoreszenz durch evaneszente Felder im optischen Nahfeld zum Signal beiträgt. Bei genauerer Inspektion erkennt man unterschiedliche geometrische Formen der Strukturen in Abbildung 2. Sie sind eine Folge der unterschiedlichen Orientierung der molekularen Übergangsdipolmomente, und aus einer Analyse dieser Formen konnten die Autoren auf die Lagen der individuellen molekularen Dipole, d. h. der individuellen Moleküle, auf der Oberfläche schließen. Darüber hinaus konnten Betzig et al. auch „den

Spieß umkehren“ und den molekularen Punktdipol dazu nutzen, das optische Nahfeld ihrer Faserspitze auszumessen.

Ambrose et al. gelang es mit einem im Prinzip gleichen NSOM-Aufbau, die Fluoreszenz einzelner Rhodamin-6G-Moleküle auf einer Quarzoberfläche abzubilden^[4]. Ein interessantes Ergebnis dieser Arbeit ist die Beobachtung eines reversiblen Ausbleichens einzelner molekularer Chromophore. Die Autoren führten dies auf Hüpfbewegungen zurück, die die molekulare Orientierung und damit die Anregungswahrscheinlichkeit verändern. In gewissem Sinne ist damit eine photoinduzierte Reaktion eines Einzelmoleküls bei Raumtemperatur beobachtet worden.

Es ist zu erwarten, daß die Nahfeldmikroskopie in naher Zukunft eine Reihe faszinierender Experimente mit einzelnen Molekülen ermöglichen wird. Dazu gehören die Untersuchung der Bedingungen des lichtinduzierten Ausbleichens einzelner Chromophore, ein störender Effekt, der alle empfindlichen Fluoreszenzmessungen bei Raumtemperatur limitiert. Auch zeitaufgelöste Messungen nach Anregung mit Pikosekundenpulsen oder durch Analyse der Fluoreszenz-Autokorrelationsfunktion werden bereits in Angriff genommen^[11]. Eine besonders interessante Perspektive bietet die Untersuchung einzelner Moleküle mit einer Kombination von NSOM und optischer Spektroskopie bei tiefen Temperaturen, bei der neben der hohen lokalen Auflösung zusätzlich die extreme spektrale Auflösung genutzt werden kann.

- [1] W. E. Moerner, L. Kador, *Phys. Rev. Lett.* **1989**, *62*, 2535; M. Orrit, J. Bernard, *ibid.* **1990**, *65*, 2716; W. E. Moerner, T. Basché, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 537; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 457.
- [2] E. B. Shera, N. K. Seitzinger, L. M. Davis, R. A. Keller, S. A. Soper, *Chem. Phys. Lett.* **1990**, *174*, 553; R. Rigler, J. Widengren, Ü. Mets in *Fluorescence Spectroscopy: New Methods and Applications* (Hrsg.: O. S. Wolfbeis), Springer, Berlin, **1993**, S. 13.
- [3] E. Betzig, R. J. Chichester, *Science* **1993**, *262*, 1422.
- [4] W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, J. C. Martin, R. A. Keller, *Phys. Rev. Lett.* **1994**, *72*, 160.
- [5] D. W. Pohl, W. Denk, M. Lanz, *Appl. Phys. Lett.* **1984**, *44*, 651.
- [6] A. Lewis, M. Isaacson, A. Harootunian, M. Muray, *Ultramicroscopy* **1984**, *13*, 227.
- [7] U. C. Fischer in *Near Field Optics* (Hrsg.: D. W. Pohl, D. Courjon), Kluwer, Dordrecht, **1993**, S. 255.
- [8] E. Betzig, J. K. Trautman, T. D. Harris, J. S. Weiner, R. L. Kostelak, *Science* **1991**, *251*, 1468.
- [9] Siehe *Second Near-Field Optics Conference* (Raleigh, NC, Oktober 1993), Sonderband *Ultramicroscopy* **1994**, im Druck.
- [10] E. Betzig, J. K. Trautman, R. Wolfe, E. M. Gyorgy, P. L. Finn, M. H. Kryder, C.-H. Chang, *Appl. Phys. Lett.* **1992**, *61*, 142.
- [11] Siehe beispielsweise: W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, J. C. Martin, R. A. Keller, *Science* **1994**, *265*, 364.