

2 Optische Spektroskopie an einzelnen Molekülen

2.1 Einleitung

Die Idee, ein einzelnes Molekül anhand seiner Fluoreszenz zu sehen, ist bereits etwa 100 Jahre alt. Jean Perrin [Per18] unternahm erste Experimente, die nur am Entwicklungsstand der Technik jener Zeit scheiterten. Sowohl die Lichtquellen, als auch die Filter waren unzureichend. Ebenso kannte man keine Farbstoffe mit genügend hoher Fluoreszenzquantenausbeute. Darüber hinaus ist das menschliche Auge als Detektor für das Licht eines einzelnen Moleküls zu unempfindlich [Spr00b]. Man ging schließlich davon aus, dass die optische Messung eines einzelnen Atoms oder Moleküls einfach unmöglich sei. Nur wenige Dekaden später, in den frühen 1950'er Jahren, gelang es mit Hilfe der Elektronenmikroskopie, einzelne Atomreihen in Kristallen zu beobachten. Nach weiteren 30 Jahren wurde durch Rastertunnel- und Rasterkraftmikroskopie atomare Auflösung erreicht. In der Zwischenzeit wurde es gleichfalls möglich, einzelne Atome optisch in der Gasphase im Atomstrahl mittels Laser zu untersuchen.

Jedoch besteht ein großer Unterschied zwischen der Detektion einzelner Moleküle unter Vakuumbedingungen und dem entsprechenden Experiment, bei dem die Moleküle in einer Wirtsmatrix eingebettet sind. Zum einen produziert ein Substrat üblicherweise eine starke optische Hintergrundstrahlung durch Streuprozesse wie Raman oder Rayleigh oder trägt sogar selbst Verunreinigungen, die bei Bestrahlung fluoreszieren. Zum anderen leuchtet ein gebundenes Molekül im Normalfall bei ständiger Anregung nicht stabil, im Gegensatz zu einem Atom im Vakuum, das praktisch permanent emittieren kann. Beim gebundenen Molekül wird die Fluoreszenz in der Regel irreversibel gelöscht. Diese Art von Prozess wird allgemein als Photobleichen bezeichnet. Diese Effekte und inhärenten Eigenschaften gebundener Moleküle wurden schon Mitte der 1970'er Jahre von Hirschfeld [Hir76a, Hir76b] erkannt. Er leistete auf dem Gebiet der Einzelmolekül-Detektion (SMD) unter physiologischen Bedingungen Pionierarbeit, indem er zum Beispiel ein einzelnes, mit 80-100 Fluorophoren markiertes Antikörper-Molekül nachweisen konnte. Von ihm stammte die Idee, ein kommerzielles Instrument zu bauen, das Virometer, um einzelne Viren nachweisen zu können und sie zu klassifizieren. Die noch bestehenden Hürden konnten bald darauf überwunden werden. Ende der 1980'er, Anfang der 1990'er Jahre gelang erstmals die optische Detektion einzelner Moleküle im Festkörper und in Flüssigkeit. Die

2 Optische Spektroskopie an einzelnen Molekülen

erste Veröffentlichung zur optischen SMD stammt von Moerner und Kador [Moe89], die mit der Methode der sensitiven doppelt modulierten Absorption das System Pentazen in para-Terphenyl bei tiefen Temperaturen untersuchten. Unmittelbar danach zeigten Orrit und Bernard [Orr90] am gleichen System, dass mit Hilfe von Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der vom einzelnen Molekül stammenden Linien beachtlich gesteigert werden kann. Kurz zuvor gelang Keller und seinen Kooperationspartnern die Messung einzelner Fluorophore in einem Flüssigkeitsstrom. Als dann 1993 Betzig und Chichester [Bet93] mittels Raster-Nahfeld-Mikroskopie das erste Einzelmolekülbild von Molekülen auf einer Oberfläche bei Raumtemperatur aufnahmen, wurden unversehens die Tragweite und das Potential der Einzelmolekül-Spektroskopie (SMS) dramatisch erweitert [Amb94, Tra94, Xie94]. Dies gilt insbesondere, nachdem man im Jahr 1996 erkannt hatte, dass sich mit der klassischen und einfacheren Methode der konfokalen Mikroskopie ebenso gute Signale von einzelnen Molekülen messen lassen [Mac96].

2.1.1 Stand der Forschung

Durch die Methode der optischen SMS hat man innerhalb der letzten zehn Jahre Zugang zu völlig neuen Informationen erschlossen. Eine gute Übersicht bieten [Bas97, Tam00, Moe02, Moe03]. Zuvor konnte man mit Hilfe von optischen Experimenten an makroskopischen Proben immer nur über ein Ensemble von Molekülen mitteln. Jedoch verhält sich jedes einzelne Molekül in Abhängigkeit seiner Umgebung, der Art und Stärke der Kopplung an diese und auch gegebenenfalls der Wechselwirkung mit anderen Molekülen innerhalb des Probenvolumens unterschiedlich. Man erhält daher mit konventioneller optischer Spektroskopie eine inhomogen verbreiterte Linienform. Darin verborgen liegen die einzelnen statistisch verteilten homogenen Beiträge aller enthaltenen Moleküle. Mit der Methode der SMS können nun nicht nur auf direktem Wege die einzelnen homogenen Linienbreiten aufgedeckt werden, sondern auch zeitliche Fluktuationen ermittelt werden, die in der Ensemble-Messung vollkommen unzugänglich sind. Insbesondere in der Biophysik bzw. Molekularbiologie liegt daher ein großer Nutzen dieser Messmethode. Eine interessante Zusammenstellung von Arbeiten in diesem Bereich findet man in der Ref. [Rig01]. Aber auch in der Festkörperphysik gibt es interessante Anwendungen, wie zum Beispiel die Untersuchung von Defektzentren in Diamanten [Niz05]. Im Vergleich mit anderen Methoden ist bei der optischen SMS hervorzuheben, dass sie zu den preisgünstigeren Wegen zählt, um Struktur und Dynamik eines Systems zu untersuchen. Ihre Stärke liegt insbesondere darin, dass die Probe aus Distanz auch jenseits der Oberflächenschicht gemessen werden kann, d.h. über ein System können Tiefeninformationen gewonnen werden, ohne Störung oder gar Zerstörung des Systems, was z.B. bei der Gefrierbruchmethode nicht vermieden werden kann. Einen guten Überblick über letztere Methode findet man in [Fuj97]. Außerdem besteht eine große Auswahl an möglichen Versuchsbedingungen: wässrige Lösung bei Zimmertemperatur, gefrorene Lösung bei tiefen Temperaturen, in einer Polymerschicht, an Luft, im Vakuum und noch weitere. Mittlerweile werden auch

erfolgreich andere Messtechniken mit der optischen SMS kombiniert, wie z.B. die Fluoreszenzlebenszeit Mikroskopie (FLIM) [Tin00, Kne03, Ken07]. Seit neuester Zeit sind auch SMS-Experimente in Absorption möglich [Bal06, Car07, Gru07], bei denen die chemische Selektivität optischer Absorptionsspektroskopie mit der atomaren Auflösung eines Rastertunnelmikroskops kombiniert werden. SMS-Methoden, die in Absorption messen, haben gegenüber denen, die in Emission messen, den Vorteil, keine Bedingungen an die zu untersuchenden Moleküle zu stellen, denn wenige Moleküle fluoreszieren, aber jedes Molekül absorbiert.

Im Hinblick auf an der Photosynthese beteiligte Einheiten wurde mit Hilfe der SMS bereits eine Reihe von Pigmentprotein-Komplexen wie LH1 [Ket02, Ger03], LH2 [Tie99, Bop99, vO99, Hof03, Hof05] und LHCII [Tie01] untersucht. Die erste Einzelmolekül-Studie an PS I-Komplexen wurde von Jelezko *et al.* im Jahr 2000 durchgeführt [Jel00]. Hier konnten erstmals die Fluoreszenzbänder von individuellen Verbänden roter Chlorophylle aufgelöst werden.

2.2 Photophysik eines Makromoleküls

2.2.1 Einführung

Im Folgenden werden die photophysikalischen Eigenschaften von einzelnen Makromolekülen behandelt. Das Augenmerk liegt auf photosynthetischen Einheiten, insbesondere auf dem PS I. Vorab sollen kurz die Grundvoraussetzungen geklärt werden, die ein einzelnes Molekül erfüllen muss, damit seine Untersuchung mit der Methode der optischen SMS Erfolg hat. Die wichtigsten Anforderungen sind: Das Molekül muss unter den gegebenen Versuchsbedingungen photophysikalisch und photochemisch stabil sein. Der erforderliche Zeitraum der Stabilität hängt dabei vom gewünschten Informationsgehalt ab, d.h. bei Steigerung der Anregungsleistung stehen mehr Fluoreszenzphotonen zur Detektion zur Verfügung, falls keine Sättigung einsetzt. Durch die Erhöhung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses wird ein schnellerer Messprozess ermöglicht. Nur der Teil der Proteindynamik kann in Form von spektraler Diffusion direkt erfasst werden, der auf der gleichen Zeitskala wie der Messprozess stattfindet. Über schnellere Dynamik können mit Einschränkungen in manchen Fällen indirekt anhand von Linienbreiten Informationen gewonnen werden. Fällt das Molekül bei verwendeter Anregungsleistung zu schnell in einen Dunkelzustand, so dass die Menge der detektierbaren Photonen nicht ausreicht, dann ist das System der optischen SMS nicht zugänglich.

Die Abbildung 2.1 zeigt als Beispiel ein nicht maßstabsgetreues, vereinfachtes Jablonski-Diagramm eines typischen Chromophor-Moleküls. Übergänge können zwischen dem Grundzustand S_0 und den angeregten Singulettzuständen S_1 , S_2 und dem Triplettzustand T_1 stattfinden. Einige Repräsentanten sind eingezeichnet. Die Absorptionsrate k_{12} ist proportional zum eingestrahnten Photonenfluss und zum Absorptionsquerschnitt des

2 Optische Spektroskopie an einzelnen Molekülen

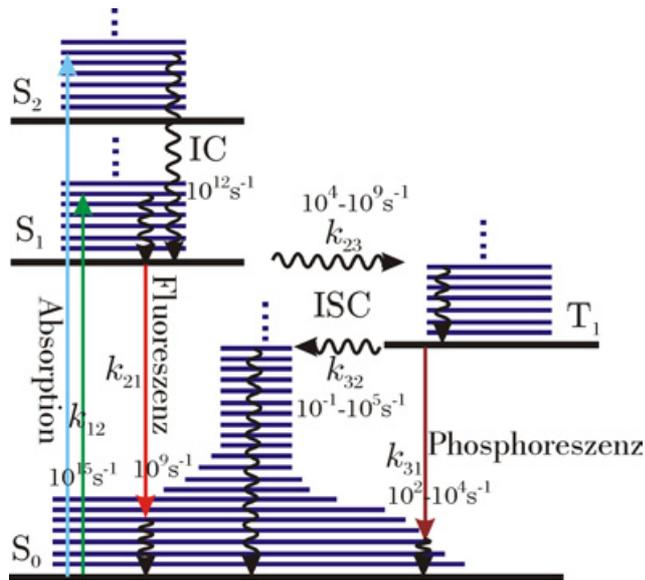


Abbildung 2.1: Vereinfachtes Jablonski-Diagramm eines typischen Chromophor-Moleküls. Zwischen den verschiedenen vibronischen Niveaus der elektronischen Zustände sind einige mögliche Übergänge mit zugehörigen Geschwindigkeitskonstanten eingezeichnet. Die geschwängelten Pfeile markieren strahlungslose und die farbigen strahlende Prozesse.

Moleküls, der ohne Korrekturen für das lokale Feld durch

$$\sigma_0 = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 m_e c \gamma_{\text{hom}}} f$$

gegeben wird. γ_{hom} in s^{-1} ist dabei die homogene Linienbreite, die von den Relaxationszeiten des Übergangs bestimmt wird. f entspricht der Oszillatorstärke des elektronischen Übergangs. Damit ein Molekül effektiv angeregt werden kann, sollte sein Absorptionsquerschnitt möglichst groß sein und damit $f \approx 1$. Man kann ein Molekül in sinnvoller Weise nicht beliebig stark anregen, denn bei hoher Anregungsleistung treten Sättigungseffekte auf, die zur Abhängigkeit des Absorptionsquerschnitts σ_0 von der Laserintensität I führen:

$$\sigma(I) = \frac{\sigma_0}{1 + I/I_S},$$

wobei I_S der Sättigungsintensität

$$I_S = \frac{h\nu}{\sigma_0} \left(\frac{k_{21} + k_{23}}{2 + k_{23}/k_{31}} \right)$$

entspricht. Im Abschnitt 3.3.3 wird sich herausstellen, dass bei den von uns verwendeten Anregungsleistungen Sättigungseffekte keine Rolle spielen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt beinhaltet die Anforderung an das Emissionsverhalten. Dessen ausschlaggebender Parameter ist die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F . Sie errechnet sich aus dem Verhältnis von emittierter zu absorbierten Photonenanzahl

$$\Phi_F = \frac{k_{21}}{k_{21} + k_{23}}.$$

Im Idealfall liegt Φ_F nahe eins. Dies wird nur erreicht, wenn die *intersystem crossing*-Rate (ISC-Rate) k_{23} möglichst klein ist. Der Übergang vom Singulett- in den Triplettzustand ist aufgrund des damit verbundenen Umklappen des Spins spinverboten. Die Spin-Bahn-Kopplung bewirkt jedoch eine endliche Wahrscheinlichkeit dieses Übergangs. Die Triplettlebensdauer ist vergleichsweise sehr lang, wie in Abbildung 2.1 aufgeführt ist. Während dieser Zeit befindet sich der Chromophor in einer Dunkelphase, da er nicht für die Anregung zur Verfügung steht. Dieses Verhalten wird als „*blinking*“ bezeichnet und wird z.B. in Ref. [Moe97] demonstriert. Bei Systemen mit hoher Triplettausbeute oder überwiegend strahlungslosen Relaxationsprozessen, bei denen die Anregungsenergie als Wärme ins Gitter fließt, genügt die abgegebene Fluoreszenz eines einzelnen Moleküls nicht zur Detektion.

Das PS I ist ein Multi-Chromophor-System, bei dem der größte Teil der Pigmente zum Einfangen von Licht benutzt wird. Die gesammelte Energie wird in effektivem Energietransfer auf das Reaktionszentrum weitergeleitet und mündet in einer photochemischen Ladungstrennung. Unter physiologischen Bedingungen geht dem System wenig Anregungsenergie verloren. Aufgrund der geringen Fluoreszenzquantenausbeute ist PS I der SMS bei Raumtemperatur noch unzugänglich [Jel00]. Wie jedoch im einleitenden Kapitel zum PS I ausführlich behandelt wurde, wird bei tiefen Temperaturen ein Teil der Anregungsenergie auf den roten Chlorophyllen gefangen. Freie Chlorophyll-Monomere in Lösung haben eine Triplett-Quantenausbeute

$$\Phi_{\text{ISC}} = \frac{k_{23}}{k_{21} + k_{23} + k_{\text{Rest}}}$$

von $\Phi_{\text{ISC}} = 0,64$ [Bow67] und verhindern somit ihre Detektion mit SMS-Methoden. In Abhängigkeit von der Umgebung kann Φ_{ISC} jedoch wesentlich geringere Werte von bis zu $5 \cdot 10^{-3}$ annehmen [Chi91]. In Kooperation wurde kürzlich von Jelezko *et al.* Φ_{ISC} der roten Chlorophylle mittels Korrelationsanalyse auf $1 \cdot 10^{-2}$ bestimmt [Ell06]. Aus dem stark verringerten Wert wird darauf geschlossen, dass die roten Chlorophylle in nahem Kontakt zu Carotinoiden lokalisiert sind. Diese Nähe ermöglicht die Nutzung der roten Chlorophylle als Fluoreszenzsonde für die Spektroskopie einzelner PS I-Komplexe. Im Fluoreszenzspektrum wird der Einfluss der Vielzahl der in einem einzigen PS I-Komplex an das Proteingerüst gebundenen Pigmente, die einer großen Zahl an Interaktionen unterliegen, widergespiegelt. Zum einen koppeln die Pigmente untereinander und zum anderen an die jeweilige Proteinumgebung. Da die Proteinumgebung lokal erheblich variiert, werden die jeweils an verschiedenen Orten gebundenen Pigmente auch stark unterschiedlich beeinflusst. Dadurch unterscheiden sich die mittleren optischen Übergangsenergien. Darüber hinaus ist ein Protein kein starres Gebilde. Demzufolge können selbst zwei sich entsprechende Pigmente jeweils an gleicher Stelle gebunden innerhalb zweier verschiedener PS I-Komplexe stark unterschiedliche Einflüsse erfahren.

Zwei fundamentale Interaktionen, die Spektren von Pigment-Protein-Komplexen bestimmen, sind die Kopplung zwischen den Elektronen und die Kopplung der Elektronen an die

2 Optische Spektroskopie an einzelnen Molekülen

inter- und intramolekularen vibronischen Freiheitsgrade. Bei der elektronischen Kopplung unterscheidet man zwischen exzitonischer - und Ladungstransferkopplung. Eine ausführliche Abhandlung findet man z.B. in [May00]. Während letztere Kopplung vom Überlapp der Wellenfunktionen lebt und somit exponentiell vom Abstand zwischen Donator und Akzeptor abhängt, benötigt die exzitonische Kopplung keinen Überlapp der Wellenfunktionen. Wie bereits in Abschnitt 1.2.2 beschrieben wurde, hängt sie außerhalb der Reichweite der Wellenfunktionen reziprok von der dritten Potenz der Distanz zwischen Donator und Akzeptor ab. Durch die beiden unterschiedlichen Abstands-Abhängigkeiten gelingt der Natur einerseits ein effektiver Energietransfer der Anregungen im Antennensystem und andererseits eine effiziente Ladungstrennung im Reaktionszentrum. Herrscht zwischen verschiedenen Pigmenten eine starke exzitonische Kopplung, so wird bei Lichteinstrahlung nicht ein individuelles Pigment angeregt, sondern das gekoppelte „Supermolekül“. N Pigmente tragen zu N exzitonischen Zuständen bei, wie in Abbildung 1.7 für $N = 2$ demonstriert wird. Zu welchen dieser Zustände ein Absorptionsübergang aus dem Grundzustand möglich ist, hängt von der relativen Orientierung der beiden Pigmente ab. In der Fluoreszenz wird nur der unterste exzitonische Zustand beobachtet. Der Lokalisierungsgrad eines angeregten Zustandes hängt von den relativen Stärken der Pigment-Pigment-Kopplung und der Pigment-Protein-Kopplung zueinander ab. Die langsame und schnelle Proteindynamik führt zu statischer bzw. dynamischer Unordnung. Diese neigt zur Lokalisierung der elektronischen Zustände. Für den Energietransfer zwischen den Antennen sind zwei begrenzende Fälle ausschlaggebend. Dominiert die Kopplung der Pigmente untereinander über die Kopplung an die Proteinumgebung, lassen sich die optischen Spektren und die exzitonische Relaxation zwischen den delokalisierten, angeregten Zuständen mit Hilfe der Multi-Level-Redfield Theorie [Red57, Red65, Jea92, Pol94, May00] beschreiben. Demgemäß führt die Kopplung der Exzitonen an die Proteinumgebung zu einer Verkürzung der Lebenszeit der exzitonischen Zustände. Für die optischen Übergänge zwischen den verschiedenen exzitonischen Zuständen und dem Grundzustand ergeben sich lorentzförmige Linien im Spektrum. Im Falle starker Pigment-Protein-Kopplung sind die angeregten Zustände lokalisiert. Der resultierende Energietransfer wird durch die Förstertheorie [För46] beschrieben. Dabei wird die Transfer-Rate vom Überlappungsintegral zwischen dem Emissionsspektrum des Donators und dem Absorptionsspektrum des Akzeptors bestimmt. Zudem tritt ein interessanter Effekt auf, wenn ein exzitonischer Zustand mit einem Ladungstransferzustand mischt. Die starke elektronisch-vibronische Kopplung des letzteren führt dann zu einer ebenfalls stärkeren Kopplung des exzitonischen Zustands an die Vielfalt der vibronischen Freiheitsgrade des Proteingerüsts. Dieses Szenario entsteht, wenn z.B. zwei Chromophore so dicht gelegen sind, dass die Wellenfunktionen erheblich überlappen. Dann koppelt der optische Übergang zusätzlich zur exzitonischen Kopplung an die intermolekularen Ladungstransferzustände. Experimentelle Beobachtungen an Chromophoren mit geringem Abstand finden hierin einen Erklärungsansatz, d.h. z.B. optische Übergänge mit ausgeprägten vibronischen Seitenbanden, starker Rotverschiebung, deutlichem Stark-Effekt sowie starken Druck-Verschiebungen. Ein Ladungstransferzustand ist polar. Indem die Proteinumgebung polarisiert wird, entsteht eine starke

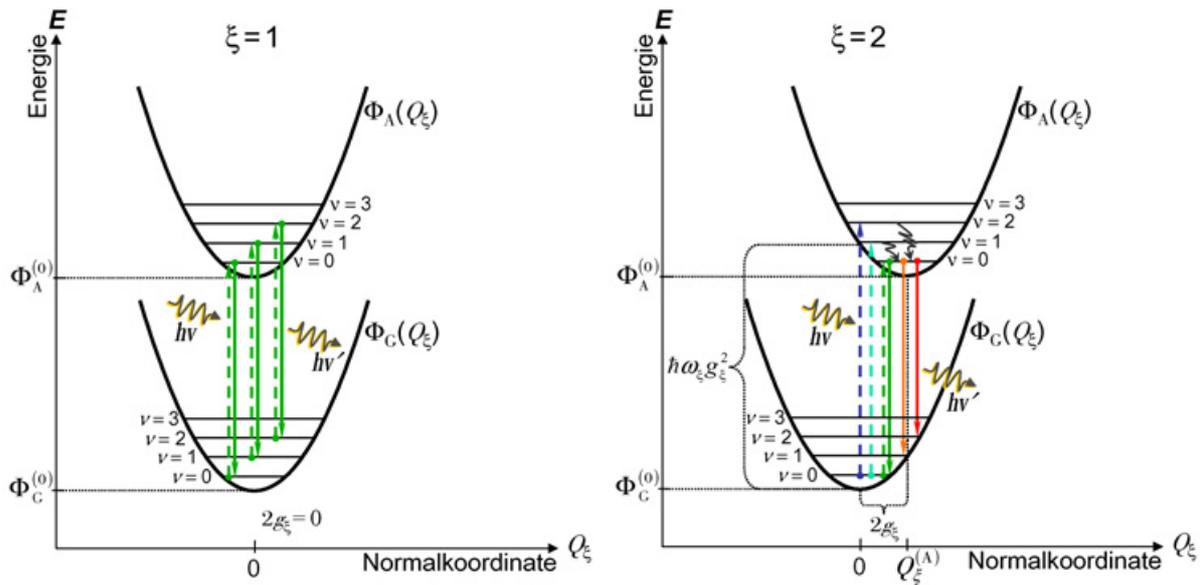


Abbildung 2.2: Auftragung der potentiellen Energie über den Normalkoordinaten Q_ξ für jeweils Grund- und angeregten elektronischen Zustand für zwei verschiedene Normalmoden $\xi = 1$ und $\xi = 2$. **Im linken Bild**, für $\xi = 1$, nimmt der Kern für beide elektronischen Zustände dieselbe Gleichgewichtslage ein, so dass vibronische Schwingungen an keinen der möglichen elektronischen Übergänge koppeln. Der zugehörige Huang-Rhys-Faktor S beträgt Null. **Im rechten Bild**, für $\xi = 2$, liegt eine andere Situation vor: Zwischen den beiden Gleichgewichtslagen der Kerne besteht ein Versatz $2g_\xi$, so dass vibronische Schwingungen an die elektronischen Übergänge koppeln. S nimmt einen endlichen positiven Wert an.

Kopplung an die vibronischen Freiheitsgrade des Proteins. Daraus resultiert eine starke Kopplung an intermolekulare Schwingungen und eine starke Änderung des permanenten Dipolmoments bezüglich des Grundzustandes. Im optischen Spektrum schlägt sich dieser Effekt in einer ausgeprägten vibronischen Seitenbande nieder. Der erste exakte Ausdruck für die lineare Absorption eines einzelnen Chromophores, der an ein Kontinuum von harmonischen Schwingungen gekoppelt ist, stammt von Lax und von Kubo und Toyozawa [Lax52, Kub55]. Eine Möglichkeit, die Kopplung eines Pigments an das Protein zu beschreiben, wird durch die Spektraldichte geboten. Sie erfasst, wie die verschiedenen vibronischen Moden des Proteins an einen optischen Übergang im Pigment koppeln. Dieser Ansatz wird im Abschnitt 2.2.4 verfolgt. Für einen Proteinkomplex mit mehreren Chromophoren gibt es keinen exakten Ausdruck, da die Behandlung beider Einflüsse, Kopplung zwischen den Chromophoren und elektronisch-vibronische Kopplung, mit einer nicht-störungstheoretischer Methode bisher für die Theorie ein ungelöstes Problem darstellt.

2.2.2 Grundlagen für die optische Molekülspektroskopie

Aufgrund der um drei Größenordnungen größeren Masse der Kerne geschieht ein elektronischer Übergang mit vernachlässigbar kleiner Beeinflussung der um Größenordnungen

2 Optische Spektroskopie an einzelnen Molekülen

langsameren Kernbewegung. Gemäß dem Franck-Condon-Prinzip ist die Wahrscheinlichkeit eines Übergangs proportional dem Produkt aus elektronischem Übergangsdipolmatrixelement und dem Überlapp der Schwingungswellenfunktionen zwischen denen der Übergang stattfindet. Die Annahme, dass die Energiedifferenz zwischen dem elektronisch angeregten und dem Grundzustand linear von der Auslenkung der Kerne aus ihrer Gleichgewichtslage abhängt, führt zu harmonischen Potentialflächen mit gleicher Krümmung für elektronischen Grund- und angeregten Zustand. Die Abbildung 2.2 zeigt die vibronischen Konfigurationen im Kernpotential in Abhängigkeit von der generalisierten Kernkoordinate von dem elektronisch angeregten und Grundzustand eines Moleküls für zwei verschiedene Normalmoden $\xi = 1$ und $\xi = 2$. In der Born-Oppenheimer-Näherung wird die Kernposition auf der Zeitskala des Übergangs als fest angenommen. Daraus resultieren bzgl. der Kernkoordinate senkrechte Übergänge zwischen den vibronischen Zuständen der beiden elektronischen Niveaus, wovon einige in der Abbildung 2.2 eingezeichnet sind. In der Regel sind die Potentialminima von Grund- und angeregtem elektronischem Zustand, die jeweiligen Gleichgewichtslagen, je nach Normalmode ξ aufgrund verschiedener Bindungspotentiale von Grund- und angeregtem Zustand gegeneinander verschoben, wie in der rechten Teilabbildung 2.2 dargestellt ist. Anschaulich kann man sich vorstellen, dass sich durch die elektronische Anregung die Verteilung der Ladungsdichte am Pigment verändert. Die Kerne relaxieren in eine neue Gleichgewichtslage. Die Größe dieser Änderung spiegelt sich in dem Versatz $2g_\xi$ der beiden Potentialflächen wider. Je größer der Wert von $2g_\xi$ ist, desto stärker koppeln elektronische Übergänge an vibronische Schwingungen. Über den Versatz $2g_\xi$ ist der sogenannte Huang-Rhys-Faktor $S \propto g_\xi^2$ definiert [Hua50]. Er wird als Maß für die Kopplungsstärke des elektronischen Übergangs an die Schwingungsfreiheitsgrade im Molekül verwendet und gibt die Zahl der Schwingungsquanten an, die bei optischen Übergängen im Mittel angeregt werden [Lax52]. Die zum Versatz $2g_\xi$ zugehörige Energie $\hbar\omega_\xi g_\xi^2$ wird Reorganisationsenergie genannt.

2.2.3 Absorption und Fluoreszenz

Der elektronische Übergang zwischen den beiden vibronischen Grundzuständen des elektronisch angeregten und des elektronischen Grundzustands wird als Null-Null-Übergang bezeichnet. Findet dieser mit genügender Wahrscheinlichkeit statt, wird im Spektrum eine scharfe Linie erzeugt, die sogenannte Null-Phononen-Linie (ZPL). Der Begriff „Phonon“ wurde aus der Festkörperphysik übernommen und wird in der Literatur vielfach im Gebiet der Proteine verwendet, obwohl ein Phonon streng genommen nur für das periodische Gitter eines endlos ausgedehnten Festkörpers definiert ist. Die spektrale Position der ZPL stimmt für Absorption und Emission überein. In der Abbildung 2.3 sind ein berechnetes Absorptions- und Emissionsspektrum dargestellt. Je nachdem wie stark der elektronische Übergang an Proteinschwingungen koppelt, werden bei der Absorption höhere vibronische Niveaus des elektronisch angeregten Zustands, oder bei der Emission des elektronischen Grundzustands, angeregt. In den Spektren bilden sich durch diesen Pro-

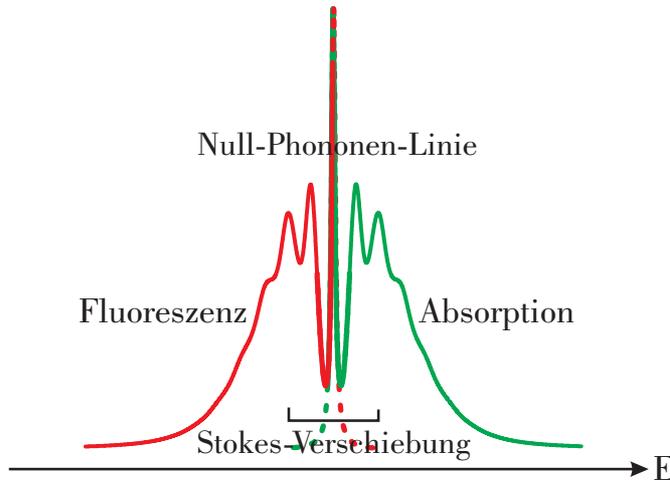


Abbildung 2.3: Berechnetes Absorptions- bzw. Emissionsspektrum aufgetragen über der Energie. Die beiden spektralen Verläufe überschneiden sich in der Mitte in einer Linie, der Null-Phononen-Linie (ZPL), die gleichzeitig die jeweiligen Schwingungsseitenbänder (PSBs) ineinander spiegelt. Der Abstand zwischen den Schwerpunkten der beiden PSBs wird als Stokesverschiebung bezeichnet. Für die Berechnung wurden folgende Werte angenommen: $S = 2$ (Huang-Rhys-Faktor), $\omega_m = 25 \text{ cm}^{-1}$ (mittlere Schwingungsfrequenz) und $\Gamma_{L,G} = 15 \text{ cm}^{-1}$ (Linienbreite von ω_m).

zess breit ausgeschmierte Schwingungsbanden aus, die Schwingungsseitenbänder genannt werden. Absorptions- und Emissionsspektrum sind zur spektralen Position der ZPL in der Mitte spiegelsymmetrisch angeordnet. Die Verschiebung der Schwerpunkte der beiden Spektren gegeneinander ist als Stokesverschiebung bekannt. Das Verhältnis der integrierten Intensität der ZPL I_{ZPL} zur Gesamtintensität aus I_{ZPL} und der Intensität der Schwingungsseitenbänder I_{PSB} ergibt den Debye-Waller-Faktor [Orr93]

$$\alpha_{DW}(T) = \frac{I_{ZPL}}{I_{ZPL} + I_{PSB}},$$

der dem Verhältnis der Oszillatorstärke des 0-0-Übergangs zur gesamten Oszillatorstärke entspricht. Er ist ein Maß für die Stärke der Elektron-Phonon-Kopplung und ist temperaturabhängig. Über die Beziehung

$$\alpha_{DW}(T) = e^{-S(T)}$$

hängt er mit dem im Abschnitt 2.2.2 eingeführten Huang-Rhys-Faktor S zusammen. Hofmann *et al.* haben mittels multivariater Spektrenanalyse am LH2 für die Übergänge der B800-Anregung ein α_{DW} zwischen 0,4 und 0,9 bestimmt, was in die Region einer schwachen Elektron-Phonon-Kopplung fällt [Hof05].

In der Näherung eines harmonischen Oszillators lassen sich die Franck-Condon-Faktoren folgendermaßen berechnen:

$$F_{ag}^2 = \frac{(S_k)^{\nu_k} e^{-S_k}}{\nu_k!},$$

wobei a für elektronisch angeregt und g für den elektronischen Grundzustand steht und S_k und ν_k der Huang-Rhys-Faktor und die Schwingungsfrequenz der an den elektronischen Übergang gekoppelten k -ten Normalschwingung sind. Die S_k ergeben sich zu $S_k = \pi \hbar^{-1} c \nu_k (\Delta Q_k)^2$, wobei ΔQ_k ein Maß für die Geometrieänderungen der Kerne zwi-

2 Optische Spektroskopie an einzelnen Molekülen

schen Anfangs- und Endzustand ist.

2.2.4 Modellierung der spektralen Form

Trifft eine elektromagnetische Welle auf ein Molekül, dessen Energieniveaudifferenz zwischen Grund- und angeregtem Zustand der Photonenenergie $\hbar\omega$ des eingestrahnten Lichts entspricht, so kann Energie absorbiert werden. Der Absorptionsquerschnitt $\alpha(\omega)$ wird an Hand der Energieverlustrate des eingestrahnten elektrischen Feldes und dem Energiefluss des Feldes, dem *Poyntingvektor* S_P bestimmt

$$\alpha(\omega) = -\frac{1}{S_P} \left(\frac{d}{dt} E_{\text{ext}} \right). \quad (2.1)$$

E_{ext} beschreibt das eingestrahlte Feld, und der *Poyntingvektor* ist als $S_P = \frac{cn}{8\pi} |\vec{E}_0|^2$ definiert, wobei c der Vakuumlichtgeschwindigkeit und n dem Brechungsindex und E_0 der Amplitude des externen Feldes

$$E(t) = E_0 \vec{\varepsilon} \cos(\omega t) \quad (2.2)$$

mit der Frequenz ω entspricht. $\vec{\varepsilon}$ ist der Einheitsvektor in Richtung der Polarisation des Feldes. Die Energieverlustrate des externen Feldes ist der Rate des im Molekül optisch induzierten Übergangs proportional

$$dE_{\text{ext}} = -\hbar\omega k_{G \rightarrow A} dt. \quad (2.3)$$

Zur Berechnung der Absorption benötigt man noch die Kopplung zwischen dem eingestrahnten Feld und dem optischen Übergang. In Dipolnäherung erhält man

$$V_{AG}(t) = V_{AG}^{(0)} \cos(\omega t) = -\vec{E}(t) \vec{\mu}_{AG}, \quad (2.4)$$

wobei $V_{AG}^{(0)} = E_0 \vec{\varepsilon} \vec{\mu}_{AG}$ der Kopplung zum Zeitpunkt $t = 0$ und $\vec{\mu}_{AG} = \int dQ \Psi_G^* \hat{d} \Psi_A$ (mit \hat{d} dem Dipolmoment-Operator und Ψ_G, Ψ_A den elektronischen Zuständen im Grund- bzw. angeregten Zustand) dem Übergangsdipolmoment im Molekül entsprechen. Nach Fermis Goldener Regel ist die Übergangsrate durch

$$k = \frac{2\pi}{\hbar} \left| V_{AG}^{(0)} \right|^2 \delta(\hbar\omega + E_G - E_A) \quad (2.5)$$

gegeben. Bezieht man nun die Schwingungsfreiheitsgrade ein und vernachlässigt gemäß der Condon-Näherung die Abhängigkeit des Übergangsdipolmoments von den vibroni-

schen Freiheitsgraden, erhält man für die Rate

$$k_{G \rightarrow A} = \frac{2\pi}{\hbar} \sum_{i,j} f(\omega_{G_i}) \left| \int dQ \chi_{G_i}^* \chi_{A_j} \right|^2 E_0^2 |\vec{\mu}_{AG}|^2 \cos^2(\varphi) \delta(\hbar\omega + E_{G_i} - E_{A_j}). \quad (2.6)$$

Um die Orientierung des Moleküls zum eingestrahlten Feld zu berücksichtigen, wurde das Skalarprodukt $|\vec{\epsilon} \vec{\mu}_{AG}|^2 = |\vec{\mu}_{AG}|^2 \cos^2 \varphi$ verwendet. Die vibronischen Zustände sind als χ_{G_i} und χ_{A_j} aufgeführt, jeweils für Grund- und angeregten Zustand. Setzt man nun die Rate zusammen mit dem *Poyntingvektor* in die Gleichung für den Absorptionsquerschnitt ein, so erhält man entsprechend [Lax52] schließlich

$$\alpha(\omega) = \frac{4\pi^2\omega}{\hbar c n} |\vec{\mu}_{AG}|^2 \cos^2 \varphi D_\alpha(\omega). \quad (2.7)$$

Für die Fluoreszenz entnimmt man der gleichen Referenz

$$I(\omega) = \frac{4\omega^3 n^3}{\hbar^2 c^3} |\vec{\mu}_{AG}|^2 \cos^2 \varphi D_I(\omega). \quad (2.8)$$

Dabei wurden die Linienform-Funktion $D_\alpha(\omega)$ und $D_I(\omega)$ gebildet. Erstere ist gegeben durch

$$D_\alpha(\omega) = \sum_{i,j} f(\omega_{G_i}) \left| \int dQ \chi_{G_i}^* \chi_{A_j} \right|^2 \delta(\omega + \omega_{G_i} - \omega_{A_j}). \quad (2.9)$$

Die Linienform-Funktion der Emission unterscheidet sich nur durch Wechsel der Vorzeichen innerhalb der Deltafunktion, da hier der angeregte Zustand der Anfangszustand der Betrachtung ist. Dadurch sind die beiden Funktionen spiegelsymmetrisch. Alternativ kann die Deltafunktion in Gl. 2.9 als Zeitintegral dargestellt werden

$$D_\alpha(\omega) = \frac{1}{2\pi} \sum_{i,j} f(\omega_{G_i}) \int_{-\infty}^{\infty} dt \left| \int dQ \chi_{G_i}^* \chi_{A_j} \right|^2 e^{i(\omega + \omega_{G_i} - \omega_{A_j})t}. \quad (2.10)$$

Führt man nun den Operator H_G mit

$$H_G \chi_{G_i} = \hbar\omega_{G_i} \chi_{G_i} \quad (2.11)$$

ein, kann die Gl. 2.10 umgeschrieben werden in

$$D_\alpha(\omega) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} dt \int dQ \frac{\exp\left(\frac{-H_G}{k_B T}\right)}{\text{Tr}\left\{\exp\left(\frac{-H_G}{k_B T}\right)\right\}} \exp\left(\frac{i}{\hbar} H_G t\right) \exp\left(-\frac{i}{\hbar} H_A t\right). \quad (2.12)$$

Diese Funktion stellt die vibronische Bewegung innerhalb der Potentialfläche des elektronischen Grundzustands in Relation zu derselbigen des angeregten Zustands. In der Praxis

2 Optische Spektroskopie an einzelnen Molekülen

können die quantenmechanischen Zustände eines makroskopischen Reservoirs, das mit einem System aus Chromophoren interagiert, nicht explizit berechnet werden. Dies trifft insbesondere auf ein willkürlich eingefrorenes, ungeordnetes Lösungsmittel als Umgebung zu. Handelt es sich bei dem Reservoir jedoch um eine weitestgehend geordnete Struktur, die bei genügend tiefer Temperatur nur kleine Oszillationen um die Gleichgewichtslage zulässt, dann ist eine harmonische Näherung möglich. Dafür legt man einen stationären Punkt im Konfigurationsraum fest, der einem globalen Minimum, der Gleichgewichtslage entspricht. Dann können die Kernbewegungen als Superposition von voneinander unabhängigen, harmonischen Schwingungen aufgefasst werden. Dabei haben die Oszillationen der individuellen Atome innerhalb einer Normalmode alle die gleiche Frequenz. Nur die Amplituden, die von der jeweiligen Masse bestimmt werden, unterscheiden sich. Die Potentialfläche $\Phi_j(r)$ für den elektronischen Zustand Ψ_j wird bis zur zweiten Ordnung in der Kernausslenkung $R(t)$ in einer Taylorreihe entwickelt. Nach Einführen von Normalkoordinaten q_ξ erhält man für den Hamiltonoperator der vibronischen Bewegung

$$H_{\text{vib}}^{(j)} = \sum_{\xi} \frac{p_{\xi}^2}{2\mu_{\xi}} + \Phi_0(j) + \frac{\mu_{\xi}\omega_{\xi}^2}{2} \left(q_{\xi} - q_{\xi}^{(j)} \right)^2. \quad (2.13)$$

Der erste Teil der Summe über ξ beschreibt die kinetische Energie der Kerne, der zweite und dritte beinhalten die potentielle Energie des elektronischen Zustands j in der Gleichgewichtslage und für eine kleine Auslenkung der Kerne. Dabei ist p_{ξ} der Impuls, μ_{ξ} die reduzierte Masse und ω_{ξ} die Frequenz des ξ -ten Oszillators, und $q_{\xi}^{(j)}$ ist die zum jeweiligen elektronischen Zustand Ψ_j gehörige Minimumposition der Potentialfläche. Die verschiedenen vibronischen Frequenzen ω_{ξ} sollten zwar unabhängig vom elektronischen Zustand sein, aber die beiden Potentialflächen vom Grund- bzw. angeregten Zustand sind entlang der verschiedenen Normalmodenkoordinaten gegeneinander um

$$2g_{\xi} = 2\sqrt{\frac{\mu_{\xi}\omega_{\xi}}{2\hbar}} \left(q_{\xi}^{(A)} - q_{\xi}^{(G)} \right) \quad (2.14)$$

verschoben. Unter Berücksichtigung der Schwingungsbewegung ergibt sich für die Linienfunktion

$$D_{\alpha}(\omega) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} dt e^{i(\omega - \omega_{AG})t} e^{G(t) - G(0)}, \quad (2.15)$$

mit der Übergangsenergie $\hbar\omega_{AG} = \Phi_A^{(0)} - \Phi_G^{(0)}$, die durch die Werte der zugehörigen vibronischen Gleichgewichts-Konfigurationen der entsprechenden Potentialflächen definiert wird. Die zeitabhängige Funktion $G(t)$ im Exponenten wird durch

$$G(t) = \int_0^{\infty} d\omega J_{AG}(\omega) \left\{ (1 + n(\omega)) e^{-i\omega t} + n(\omega) e^{i\omega t} \right\} \quad (2.16)$$

gegeben. Hier wurde die Spektraldichte

$$J_{\text{AG}}(\omega) = \sum_{\xi} g_{\xi}^2 \delta(\omega - \omega_{\xi}) \quad (2.17)$$

analog zu [Ren02] eingeführt. Sie beschreibt, wie Schwingungen mit der Frequenz $\omega = \omega_{\xi}$ an den optischen Übergang des Pigments koppeln. $n(\omega) = (\exp(\hbar\omega/k_{\text{B}}T) - 1)^{-1}$ ist die Bose-Einstein-Verteilung. Sie beschreibt die Anzahl der bei einer gegebenen Temperatur im Mittel angeregten Schwingungsquanten. Für kleine Temperaturen ist $n(\omega) \approx 0$. Daraus erhält man für $T \rightarrow 0$

$$G(t) = \int_0^{\infty} d\omega J(\omega) e^{-i\omega t} \quad (2.18)$$

und zum Zeitpunkt $t = 0$

$$G(0) = \int_0^{\infty} d\omega J(\omega) = S, \quad (2.19)$$

wobei $S = \int d\omega J_{\text{AG}}(\omega) = \sum_{\xi} g_{\xi}^2$ dem Huang-Rhys-Faktor entspricht. Er ist ein Maß dafür, wie stark die vibronischen Schwingungen an den elektronischen Übergang koppeln. Nun kann man die Linienform-Funktion in zwei Teile zerlegen:

$$D(\omega) = \frac{e^{-S}}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} dt e^{i(\omega - \omega_{\text{AG}})t} (e^{G(t)} - 1 + 1) = Z(\omega) + B(\omega). \quad (2.20)$$

Der erste Summand $Z(\omega) = \exp(-S) \delta(\omega - \omega_{\text{AG}})$ beschreibt die Null-Phononen-Linie und der zweite das vibronische Seitenband

$$B(\omega) = \frac{e^{-S}}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} dt e^{i(\omega - \omega_{\text{AG}})t} (e^{G(t)} - 1). \quad (2.21)$$

Als nächstes kann die Exponentialfunktion in eine Taylorreihe entwickelt werden

$$e^{G(t)} = \sum_{j=0}^{\infty} \frac{1}{j!} (G(t))^j = \sum_{j=0}^{\infty} \frac{1}{j!} \left(\int_0^{\infty} d\omega' J(\omega') e^{-i\omega't} \right)^j \quad (2.22)$$

und in die Gleichung für das Seitenband eingesetzt werden:

$$B(\omega) = \frac{e^{-S}}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} dt e^{i(\omega - \omega_{\text{AG}})t} \sum_{j=1}^{\infty} \frac{1}{j!} \left(\int_0^{\infty} d\omega' J(\omega') e^{-i\omega't} \right)^j. \quad (2.23)$$

2 Optische Spektroskopie an einzelnen Molekülen

Vertauscht man nun die Zeit und Frequenzintegrale

$$B(\omega) = e^{-S} \sum_{j=1}^{\infty} \frac{1}{j!} \int_0^{\infty} d\omega_1 \dots \int_0^{\infty} d\omega_j J(\omega_1) \dots J(\omega_j) \delta(\omega - \omega_{\text{AG}} - \omega_1 - \dots - \omega_j) \quad (2.24)$$

und substituiert $\tilde{\omega} = \omega - \omega_{\text{AG}}$, dann muss für die Integration gelten: $\tilde{\omega} = \omega_1 + \dots + \omega_j$. Daraus folgt, dass man das Integral in guter Näherung als n -fache Faltung des ersten Summanden schreiben kann

$$B(\omega) = e^{-S} \sum_{j=1}^{\infty} \frac{1}{j!} \Theta_j(\tilde{\omega}) . \quad (2.25)$$

Dabei ist

$$\Theta_j(\tilde{\omega}) = \int_0^{\tilde{\omega}} d\omega_2 J(\omega_2) \Theta_{j-1}(\tilde{\omega} - \omega_2) \quad (2.26)$$

$$\text{mit } \Theta_1(\tilde{\omega}) = J(\tilde{\omega}) . \quad (2.27)$$

Nun wird eine lorentzförmige¹ Spektraldichte angenommen: $J(\omega) = S f(\omega)$ mit

$$f(\omega) = \frac{\frac{\gamma}{2\pi}}{(\omega - \omega_m)^2 + \left(\frac{\gamma}{2}\right)^2} , \quad (2.29)$$

wobei gilt: $\int d\omega J(\omega) = S \int d\omega f(\omega) = S$. Um die Funktion $f(\omega)$ j mal mit sich selbst zu falten, betrachtet man ihre Fourier-Darstellung

$$f(\omega) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} dt e^{-i\omega t} e^{i\omega_m t} e^{-\frac{\gamma}{2}|t|}, \text{ d.h. } f(t) = \frac{1}{2\pi} e^{i\omega_m t} e^{-\frac{\gamma}{2}|t|} . \quad (2.30)$$

Dann erhält man nach oben aufgeführter Rechnung und dem Faltungsgesetz für die Funktion Θ

$$\Theta_j(\omega) = S^j \frac{\frac{j\gamma}{2\pi}}{(\omega - j\omega_m)^2 + \left(\frac{j\gamma}{2}\right)^2} . \quad (2.31)$$

¹Eine spontane Emission enthält aufgrund der Abstrahlungsdämpfung ein Kontinuum von Frequenzen. Die Relaxationszeit des Übergangs bestimmt die homogene Linienbreite der Emission des einzelnen Moleküls. Ihre spektrale Form wird durch eine Lorentzkurve

$$L(\omega') = \frac{2 I_{\text{ZPL}}}{\pi} \frac{\gamma_{\text{hom}}}{4(\omega_0 - \omega')^2 + \gamma_{\text{hom}}^2} \quad (2.28)$$

mit der Halbwertsbreite γ_{hom} (FWHM), der energetischen Lage ω_0 und der Intensität I_{ZPL} beschrieben.

Für den geneigten Leser wird im Anhang A die Gleichung 2.31 durch vollständige Induktion verifiziert, was bisher nicht in der Literatur aufgeführt wurde. Mit diesem Ergebnis wird die vibronische Seitenbande für eine lorentzförmige Spektraldichte zu

$$B(\omega) = e^{-S} \sum_{j=1}^{\infty} \frac{S^j}{j!} \Theta_j(\omega) \quad . \quad (2.32)$$

Die Gl. 2.32 wird im Kapitel 6 zur Simulation der Linienform in verschiedenen Spektralbereichen verwendet. Hayes *et al.* sind zur Simulation ihrer Lochbrennspektren von einem ähnlichen Ansatz ausgegangen [Hay94, Pul95].

2.3 Konfokale Mikroskopie

2.3.1 Einführung

Die bislang adäquateste Methode, um auf optischem Weg ein einzelnes Molekül zu untersuchen, besteht darin, aus einem kleinen Proben-Volumen, in dem sich aufgrund starker Verdünnung höchstens ein einziger Chromophor befindet, die laserinduzierte Fluoreszenz zu sammeln. Die Fortschritte der letzten 15 Jahre in der Detektortechnik haben dafür den Weg bereitet, mit dem Prinzip des konfokalen Mikroskops einzelne Moleküle nachzuweisen und zu untersuchen. Durch diese Methode werden die Ideen aus optischer Mikroskopie, bei der nur Licht von der Probe gesendet oder empfangen wird, und Raster-Tunnel-Mikroskopie, bei der die Untersuchung der Probe lokal mit Hilfe eines kleinen Objekts erfolgt, vereint. Anstelle einer scharfen Spitze vermittelt hier das Molekül selbst seine Untersuchung.

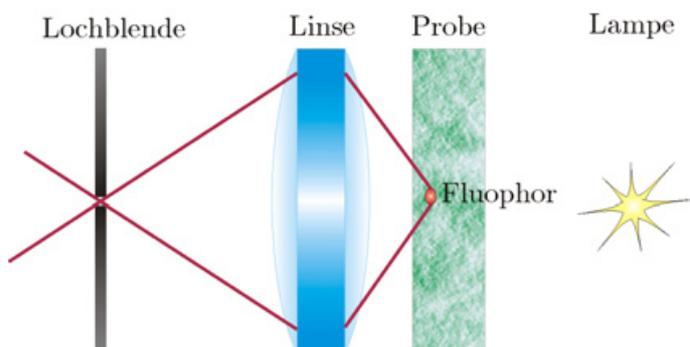


Abbildung 2.4: Eine Probe wird von einer Lampe angeregt und über eine Linse abgebildet. Die Lochblende lässt Licht von dem eingezeichneten Fluorophor gerade passieren, während Licht von außerhalb des Fokuspunkts großteils abgeschnitten wird.

2 Optische Spektroskopie an einzelnen Molekülen

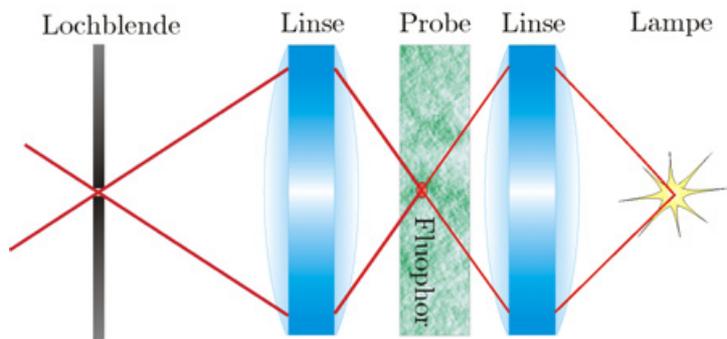


Abbildung 2.5: Zusätzlich zu der in Abbildung 2.4 gezeigten Konstellation wird nun die Probe selektiv angeregt. Der Fluorophor hat eine konfokale Position, da er sich sowohl im Fokuspunkt der Lichtquelle als auch im Fokuspunkt der Lochblende befindet.

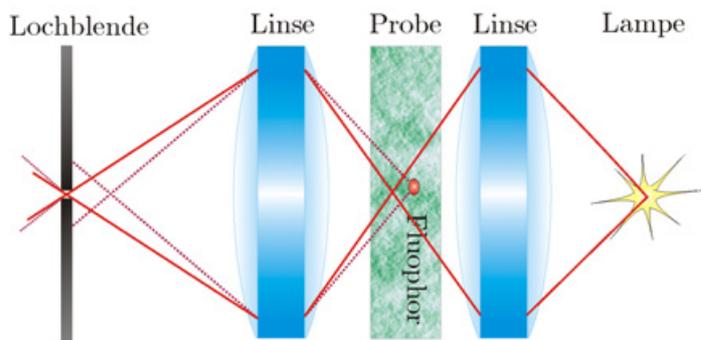


Abbildung 2.6: Im Gegensatz zu der in Abbildung 2.5 dargestellten Situation befindet sich nun der Fluorophor außerhalb des konfokalen Volumens. Sein schwaches Streulicht wird von der Lochblende fast vollständig abgeschnitten.

2.3.2 Konfokales Prinzip

Das Prinzip der konfokalen Mikroskopie wurde bereits 1957 von Marvin Minsky vorgeschlagen [Min57, Min88], blieb jedoch weitgehend unbeachtet. Das lag vermutlich am Mangel von starken Lichtquellen und leistungsfähigen Computern, um mit den Datenmengen umzugehen. Nach Ablauf des Patents um 1979 wurde das Prinzip an zwei verschiedenen Stellen gleichzeitig erneut erfunden: einmal theoretisch von Sheppard in Oxford und experimentell vom holländischen Physiker Brakenhoff [Bra85]. Die konfokale Technik ermöglicht mikroskopische Aufnahmen mit gesteigertem Kontrast im Vergleich zu konventioneller optischer Mikroskopie, was insbesondere für dicke Proben gilt. Somit können insbesondere bei dicken Proben direkt Tiefenschnitte abgebildet werden, ohne dass die Probe zuvor mit Hilfe spezieller Präparationsverfahren zerstört werden muss. Die Idee dieser Methode verlangt, dass dem gewünschten Signal überlagertes Streulicht aus der Umgebung eingedämmt wird. Dies gelingt, indem man das betrachtete Volumen möglichst stark einschränkt. Zwei Faktoren bestimmen die Begrenzung des Volumens: zum einen die Beleuchtung und zum anderen eine geeignete Selektion vor dem Detektor. Letzteres wird dadurch erreicht, dass eine Lochblende vor dem Detektor Licht aus dem Fokuspunkt vollständig passieren lässt, während Licht von außerhalb des Fokuspunkts nur sehr wenig durchdringen kann (s. Abbildung 2.4).

Zusätzlich ist man bemüht, das Anregungsvolumen möglichst klein werden zu lassen. Dazu bildet man eine nahezu punktförmige Lichtquelle, die im Idealfall ein gaußförmiges

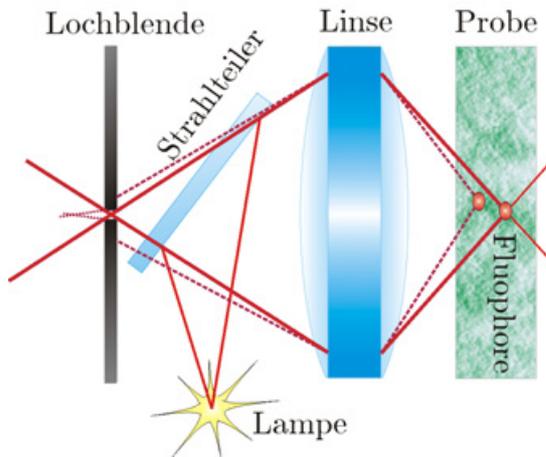


Abbildung 2.7: Durch einen Strahlteiler wird ein einfaches koaxiales konfokales Mikroskop ermöglicht. Die Linse vor der Probe fokussiert den Strahl der Beleuchtungsquelle auf die Probe. Gleichmaßen sammelt die Linse das Licht von der Probe und fokussiert es auf die Lochblende.

Strahlprofil aufweist, auf die Probe ab (s. Abbildung 2.5). So wird sichergestellt, dass sich die Fokusgröße der Anregung in der Größenordnung der Beugungsgrenze befindet. Das auf diese Art und Weise selektierte Detektionsvolumen entspricht genau dem Anregungsvolumen, worin der Name „konfokales Mikroskop“ seinen Ursprung hat. Licht von außerhalb des konfokalen Volumens wird doppelt diskriminiert. Einerseits wird dort nur sehr schwach angeregt und andererseits wird der größte Teil dieses Lichts durch die Lochblende ausgeblendet (s. Abbildung 2.6). Daraus resultiert die besonders hervorzuhebende Tiefenselektion. Alle axial außerhalb der Fokusebene liegenden Fluorophore werden als unscharfe Fläche auf die Lochblende abgebildet (s. Abbildung 2.7). Das Verhältnis dieser Fläche und der Größe der Lochblende bestimmt den Grad der Diskriminierung. Der Preis für den verbesserten Kontrast, der mit dieser Messmethode erreicht wird, ist, dass immer nur ein Punkt abgebildet wird. Um ein vollständiges Abbild der Probe zu erhalten, muss diese daher abgerastert werden.

An dieser Stelle soll noch darauf eingegangen werden, dass beim konfokalen Mikroskop zur Beleuchtung üblicherweise ein Laser als Anregungsmedium dient. Beim herkömmlichen Lichtmikroskop hingegen wird im Normalfall eine inkohärente Lampe verwendet. Kohärente Beleuchtung, wie z.B. mittels Laser, führt in der Mikroskopie grundsätzlich zu Problemen, da ungewollte Interferenzerscheinungen die Abbildungsqualität vermindern. Glücklicherweise spielen beim konfokalen Mikroskop Interferenzeffekte in der Form keine Rolle, da während sich der fokussierte Strahl über die Probe bewegt, immer nur ein Punkt zur Zeit beleuchtet wird. Somit kann ein anderer heller Punkt aus der Umgebung keinen Interferenzbeitrag leisten. Daher treten in der Konsequenz keine *speckle*-Effekte auf, die zu Problemen führen würden.

2.3.3 Laterale und axiale Auflösung

Im Folgenden wird die Auflösung eines Mikroskops beschrieben. Da eine allgemeine Darstellung der funktionellen Zusammenhänge in drei Dimensionen relativ komplex ist, wer-

2 Optische Spektroskopie an einzelnen Molekülen

den die beiden Anteile für laterale und axiale Auflösung separat als Spezialfälle behandelt. Zunächst werden die Beugungseigenschaften einer Linse betrachtet. Die Abbildung 2.8 zeigt die Intensitätsverteilung im Fokus einer mit einem kollimierten Strahl beleuchteten Linse. Die Hauptintensität in der Mitte bis zum ersten Minimum ist als Airy-Scheibe bekannt. Sie wird von konzentrischen Beugungsringen begleitet, die die Auflösungsfähigkeit der Linse begrenzen. Das Beugungsmuster wird von der *point-spread*-Funktion (PSF) $p(z, r)$ beschrieben, wobei in der Abbildung 2.8 der Fall für $z = 0$ dargestellt ist. Bei Abbildung eines beliebigen Objekts erhält man als Ergebnis immer eine Faltung der Objektfläche mit der PSF. Mit diesem Wissen erscheint es sinnvoll, die Größe der Lochblende beim konfokalen Mikroskop auf die Ausdehnung des Hauptmaximums der PSF des verwendeten Objektivs abzustimmen. Bei der Wahl einer zu kleinen Lochblende verliert man Intensität, ohne an Auflösung zu gewinnen. Wählt man eine zu große Lochblende, gewinnt man an Intensität verliert aber entscheidend an nötiger Auflösung, falls man beabsichtigt, die Fluoreszenz einzelner Moleküle separat darstellen zu können. Bei der Airy-Scheibe handelt es sich um die gebräuchlichste Näherung der lateralen PSF für kreisrunde Aperturen in ihrer Fokusebene. Streng genommen gilt sie nur für paraxiale Systeme, d.h. für Systeme mit kleiner numerischer Apertur $NA = n \sin \vartheta$, wobei n dem Brechungsindex des Mediums und ϑ dem halben Winkel des Lichtkegels, der zu einem Punkt hin konvergiert oder von einem Punkt weg divergiert, entsprechen. Somit ist diese Näherung effektiv keine besonders glückliche Wahl für ein Mikroskop. Dennoch wird die Airy-Scheibe für gewöhnlich aufgrund ihres recht einfachen Formalismus

$$p^{(T)}(\rho) = p(z = 0, \rho) = \frac{2J_1^2(\rho)}{\rho^2} \quad (2.33)$$

zur Beschreibung der lateralen Auflösung verwendet. J_1 ist dabei die sphärische Besselfunktion erster Ordnung und

$$\rho = \frac{2\pi}{\lambda} \frac{r}{V} NA \quad (2.34)$$

die reduzierte Variable entlang der zur optischen Achse transversalen Ebene, wobei r dem Abstand zur optischen Achse, V der Vergrößerung des Objektivs, λ der Wellenlänge des Lichts und NA der numerischen Apertur entsprechen. Aufgrund der Rotationssymmetrie der meisten optischen Komponenten hat die laterale PSF auch in der Regel die Eigenschaft, rotationssymmetrisch zur optischen Achse zu liegen, d.h. senkrecht zur optischen Achse ist jede Richtung gleichwertig. Tatsächlich unterscheidet sich die Lösung für $p^{(T)}(\rho)$, die man mit Hilfe recht aufwendiger Mathematik ohne Näherung erhält, für große NA qualitativ auch nicht von der Airy-Funktion. Der interessierte Leser findet eine ausführliche Behandlung in der Ref. [Web96]. Die Hauptabweichung besteht darin, dass die korrekte laterale PSF ein wenig breiter ist als die der Näherung und die Intensität der Beugungsringe nie ganz Null wird.

Ebenfalls mit einer einfachen mathematischen Umschreibung erhält man in der paraxialen

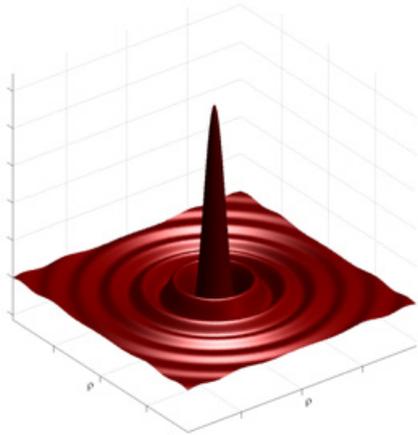


Abbildung 2.8: *Point-spread*-Funktion eines konventionellen optischen Mikroskops. (Für Details s. Text)

Näherung

$$p^{(A)}(\zeta) = p(\zeta, \rho = 0) = \left(\frac{\sin \zeta / 4}{\zeta / 4} \right)^2 \quad (2.35)$$

für die axiale PSF, wobei

$$\zeta = \frac{2\pi}{n\lambda} NA^2 z \quad (2.36)$$

der reduzierten Variable in z -Richtung entspricht.

Gemäß dem Rayleigh-Kriterium ist die Auflösung einer optischen Komponente transversal zur optischen Achse als der Radius der Airy-Scheibe definiert. Aus der lateralen *point-spread*-Funktion $p^{(T)}(\rho)$ erhält man somit für die zur optischen Achse transversalen Auflösung eines konventionellen optischen Mikroskops

$$r_{\text{Airy}} = 0,61 \frac{\lambda}{n \sin \vartheta} . \quad (2.37)$$

Beim konfokalen Mikroskop hängt die Auflösung vom konfokalen Volumen ab. Durch die allgemeine Gleichung $p(\zeta, \rho)$ wird seine Beleuchtung beschrieben. Gleichzeitig bestimmt die gleiche dreidimensionale PSF das Detektionsvolumen. Im Falle identischer optischer Komponenten für Anregung sowie Detektion (s. Abbildung 2.7) erhält man für die dreidimensionale PSF des konfokalen Mikroskops somit

$$p_{\text{konf}}(\zeta, \rho) = p(\zeta, \rho) \times p(\zeta, \rho) , \quad (2.38)$$

also das Quadrat der PSF des herkömmlichen Mikroskops (vergl. Abbildung 2.8).

Mit Verwendung von Objektiven großer NA in Verbindung mit entsprechend kleinen Lochblenden lässt sich das konfokale Volumen aufgrund des Beugungslimits nicht unter einen Wert von ungefähr einem Mikrometer bringen [Rig93]. Jedoch kann z.B. mit Hilfe des Verfahrens der „*stimulated emission depletion*“ eine Schmälerung des Anregungsvolu-

2 Optische Spektroskopie an einzelnen Molekülen

mens bis zu einem Faktor von 18 in Bezug auf ein herkömmliches konfokales Mikroskop erreicht werden [Kla00]. Das Ergebnis der Funktion (2.38) ist in Abbildung 2.9 dargestellt. Durch das Quadrieren entsteht ein schärferes Maximum, wodurch sich eine etwas bessere laterale Auflösung ergibt

$$r_{\text{konf}} = \frac{0,61}{\sqrt{2}} \frac{\lambda}{n \sin \vartheta} . \quad (2.39)$$

Selbstverständlich gilt die Gleichung (2.39) nur im Falle guter Konfokalität, d.h. bei der Wahl einer geeigneten Lochblende für das jeweilige Objektiv.

Die starke Kontrastverbesserung des konfokalen Mikroskops kommt zum Vorschein, wenn man seine Abbildungseigenschaften von Objekten betrachtet, die außerhalb der Fokusebene liegen. Entlang der optischen Achse ergibt sich für die axiale PSF

$$p_{\text{konf}}^{(\text{T})}(\zeta) = p_{\text{konf}}(\zeta, \rho = 0) = \left(\frac{\sin \zeta/4}{\zeta/4} \right)^4 . \quad (2.40)$$

Gemäß dem Rayleigh Kriterium wird auch die Auflösung in z -Richtung wieder über eine Intensitätsminderung von 26 % in der Verbindungslinie zwischen zwei gleichhellen abgebildeten Objekten definiert

$$\Delta z_{\text{konf}} = 1,5 \frac{n\lambda}{NA^2} . \quad (2.41)$$

Diese enorme axiale Auflösung wird beim konfokalen Mikroskop real erreicht, d.h. zwei gleichhelle Punkte auf der optischen Achse im Abstand Δz_{konf} können tatsächlich auseinander gehalten werden. Die Sichtbarkeit oder Trennbarkeit zweier Objekte wird allerdings nicht ausschließlich vom Kontrast, sondern auch wesentlich vom Rauschen bestimmt. Dieses kann nicht beliebig reduziert werden. Die untere Grenze wird von den statistischen poissonverteilten Prozessen der Ankunft von Photonen bestimmt, dem sogenannten Schrot- oder Quantenrauschen. Die Qualität des Signals hängt somit nicht nur vom Kontrast, sondern auch stark von der Beleuchtung ab. Dadurch, dass beim konfokalen Mikroskop Punkt für Punkt nacheinander beleuchtet wird, kann die Probe beim konfokalen Mikroskop mit deutlich höherer Intensität bestrahlt werden als beim konventionellen Mikroskop. Darüber hinaus ergibt sich durch das Abrastern ein weiterer Vorteil. Die Probe wird nur lokal mit Licht belastet, d.h. während z.B. ein Fluorophor untersucht wird, befinden sich alle andern zu dem Zeitpunkt in Dunkelheit und können somit in dieser Zeit nicht photobleichen.

Im Gegensatz zur herkömmlichen Mikroskopie ist die konfokale Mikroskopie ein digitales Bildgebungsverfahren, d.h. eine stärkere Vergrößerung erfolgt nicht durch Auswechseln des Objektivs, sondern durch eine feinere Abrasterung. Da die Auflösung jedoch durch die Beugungsbegrenzung des konfokalen Volumens bestimmt wird, hat eine beliebig feine Rasterung keinen Sinn. Dem Nyquist-Shannonschen Abtasttheorem zu Folge sollten

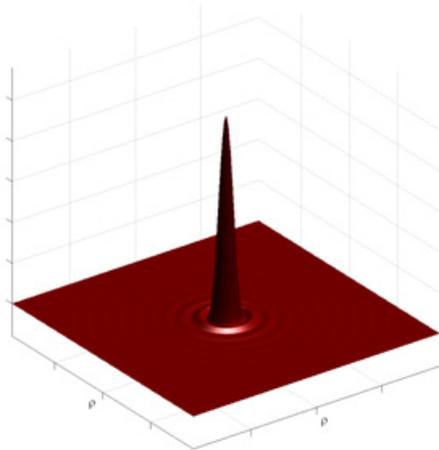


Abbildung 2.9: Laterale *point-spread*-Funktion eines konfokalen Mikroskops. Man erhält sie durch Quadrieren der Airy-Funktion (s. Abbildung 2.8).

jedoch mindestens 2,3 Rasterschritte für eine Fläche in der Größe der entsprechenden Schnittfläche des konfokalen Volumens transversal zur optischen Achse vollführt werden, wenn keine Informationen verloren gehen sollen. Für digitale Abbildungssysteme wird zur Bestimmung der Auflösung üblicherweise das Sparrow-Kriterium verwendet. Hierbei wird das Rayleigh-Kriterium in der Weise ergänzt, dass, anders als beim menschlichen Auge, Kontrastverstärkung und Hintergrundkorrekturen möglich sind.

Die konfokale Mikroskopie bietet ideale Voraussetzungen zur optischen Untersuchung einzelner Fluorophore. Durch die hohe axiale Auflösung ergibt sich eine große Flexibilität und Akzeptanz, unterschiedlichste Proben typen, in Form und besonders Tiefe, zu spektroskopieren. Unerwünschte Hintergrundstrahlung, wie z.B. Ramanstreuung, von außerhalb des konfokalen Volumens wird effektiv ausgeblendet. Als Observable dient bei der Detektion einzelner Moleküle immer deren Fluoreszenz. Um sicher zu gehen, dass beim Abrastern einer Probe sich tatsächlich nur ein einziges Molekül zur Zeit im konfokalen Volumen aufhält, muss die Probe hinreichend stark verdünnt sein, so dass die Moleküldichte kleiner wird als die laterale Auflösung der Apparatur. Auf den experimentellen Aufbau wird im nächsten Abschnitt genauer eingegangen. Viele Anwendungen der konfokalen Mikroskopie zur Untersuchung einzelner Moleküle werden in [Rig01, Zan02, Bas97, Tam00] vorgestellt, in [Paw91] wird insbesondere die Untersuchung makroskopischer Systeme, z.B. Visualisierung biologischer Zellen, behandelt.