

Single Molecule Detection mittels Epifluoreszenzmessung (SMD)

Simon Breitler, *Studiengang Chemie, 5. Semester*, brsimon@student.ethz.ch

Matthias Geibel, *Studiengang Chemie, 5. Semester*, mgeibel@student.ethz.ch

Daniel A. Frick, *Studiengang Chemie, 5. Semester*, frickd@student.ethz.ch

Assistent: Dr. Alois Renn

Team 4

Abstract:

Mit Hilfe von Fluoreszenzspektroskopie wurden einzelne Moleküle detektiert. Für die optimale Verdünnung zur Bestimmung einzelner Moleküle wurde eine Konzentration von ca. 10^{-9} M ermittelt. In einem weiteren Versuch wurde gemessen, wie genau sich Moleküle lokalisieren lassen. Die Standardabweichung der FWHM beträgt 13.6 nm. Bei beiden Versuchen wurde das Chromophor 1,4-Bis(DIPP-POCl)piperatin benutzt. Die Photobleaching-Rate wurde durch die Analyse einer Fotoserie ermittelt. Dabei wurde festgestellt, dass die Photobleaching-Rate grösser wird, falls das Chromophor (Dil) Luftsauerstoff ausgesetzt wird. Danach wurde eine weitere Bilderserie auf Bewegung der Moleküle des Farbstoffes Dil hin untersucht. Die Moleküle bewegen sich im Durchschnitt weniger als ein Pixel (32.25 nm). Zuletzt wurde die Orientierung von Terrylen-Molekülen untersucht.

Zürich ZH, 25. Oktober 2007

1. Einleitung [1]

Unsere Wahrnehmung ist dominiert vom optischen Sinn. Meist wird dem Gesehenen eine höhere Gewichtung gegeben als jedem anderen unserer 5 Sinne. Es ist daher verständlich, dass ein grosser Traum eines jeden Chemikers das „Sehen“ einzelner Moleküle ist und dass für das Erreichen dieses Ziels ein erheblicher Aufwand betrieben wurde bzw. wird. Ein Produkt dieses Strebens ist die Single Molecule Detection (SMD) oder Single Molecule Spectroscopy (SMS) mittels Epifluoreszenz. Dabei werden verdünnte Lösungen eines stark fluoreszierenden Stoffes mittels eines Lasers angeregt. Um die einzelnen Moleküle unterscheiden zu können, wird dazu ein Mikroskop eingesetzt, welches es erlaubt, extrem kleine (diffraktionslimitierte) Bereiche zu beobachten. Die so erzeugten Bilder werden mittels einer CCD-Kamera aufgenommen und sind so digital verfügbar.

2. Theorie [1]

2.1. Fluoreszenz

Fluoreszenz ist die Eigenschaft von organischen und anorganischen Stoffen, unter wellenlängenspezifischer Bestrahlung selbstleuchtend zu sein. Dabei wird Strahlung im Wellenlängenbereich der Absorptionsbanden absorbiert und längerwelliges und kurzlebiges Licht ausgestrahlt. Der Nachweis der Fluoreszenzstrahlung ist sehr schnell und sensibel.

2.1.1. Absorptions-Emissions-Zyklus

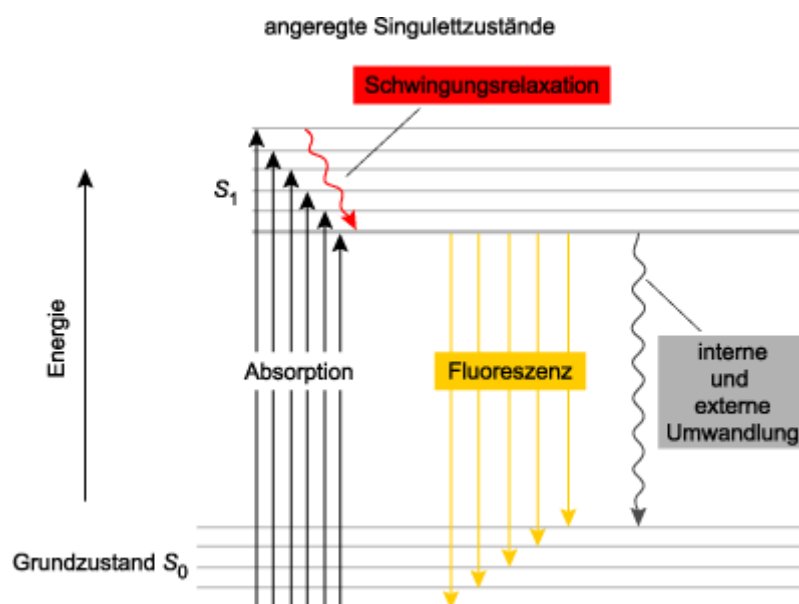


Abbildung 1: Jablónski-Termschema für Fluoreszenzstrahlung [1]

Damit Fluoreszenz auftritt, müssen zuerst Photonen absorbiert werden, was der Anregung des Moleküls entspricht. Wenn das Molekül aus dem angeregten Singulettzustand (S_1) wieder in den Grundzustand (S_0) zurück relaxiert, wird Fluoreszenzstrahlung emittiert (siehe Abbildung 1). Die

Energie der emittierten Strahlung ist im Vergleich zu der absorbierten Strahlung in den roten Wellenlängenbereich verschoben. Die Lebensdauer des Singulettzustandes liegt im Bereich von 10^{-9} – 10^{-7} s.

Die Anregung kann auch in angeregte Vibrationszustände erfolgen. Von dort aus kann das Molekül durch Schwingungsrelaxation in den niedrigsten angeregten Zustand zurückfallen, von wo aus Fluoreszenzstrahlung emittiert werden kann. Zusätzlich besteht auch die Möglichkeit für Intersystem Crossing in den relativ langlebigen Triplet-Zustand, der nicht fluoreszierend und deshalb unerwünscht ist.

Für übliche fluoreszierende Substanzen liegt die Zyklusrate (Anregung-Emission) bei 10^8 s⁻¹. Die Absorption des eingestrahlten Lichtes folgt dem Lambert-Beer-Gesetz.

Für die Näherung des stationären Zustandes beträgt die maximale Photonenemissionsrate:

$$R_{\infty} = \frac{k_{\text{rad}}}{2 + k_{\text{isc}}/k_{\text{T}}} \quad (1)$$

k_{rad} spontane Emissionsrate $S_1 - S_0$

k_{isc} Intersystem Crossing-Rate

k_{T} Triplet-Relaxationsrate

Aus Gleichung (1) ist ersichtlich, dass verwendete Substanzen einen möglichst kleinen k_{isc} - und einen möglichst grossen k_{T} - Wert besitzen sollten. Um eine gute Fluoreszenzintensität zu erhalten, spielt auch die Stärke des Lichtes eine Rolle. Falls das eingestrahlte Licht zu stark wird, kommt es zu einer Übersättigung. Dies bedeutet, dass es eine nichtlineare Abhängigkeit von Anregungsintensität zu Übergangsrate gibt, wodurch die Detektion eines einzelnen Moleküls schwieriger wird. Ein weiterer Effekt, der zur Reduzierung des Molekülsignals beiträgt, ist das Photobleaching. Dabei handelt es sich um einen photochemischen Prozess der dazu führt, dass das Molekül aufhört Photonen zu absorbieren und/oder zu emittieren. Der Prozess kann durch zu starke Strahlung und durch Luftsauerstoff verursacht werden.

2.2. Mikroskopie

Um die Fluoreszenzstrahlung nachzuweisen bedient man sich der traditionellen Spektroskopie. Zur Einzelmoleküldetektion wird unter anderem die Epifluoreszenz-Mikroskopie verwendet.

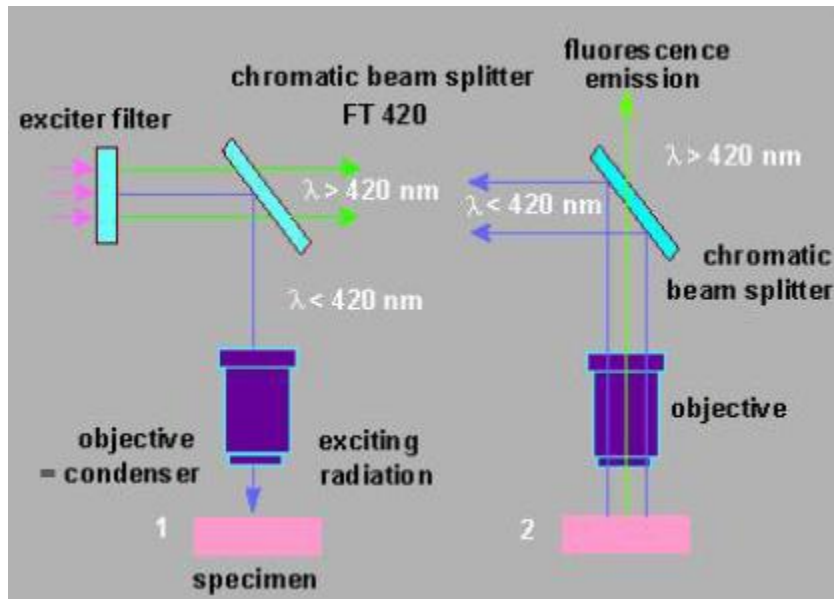


Abbildung 2: Funktionsweise eines Epifluoreszenz-Mikroskops.

Die Absorptionsstrahlung wird mit Hilfe eines dichromatischen Spiegels durch das Objektiv auf die Probe gelenkt. Die emittierte Fluoreszenzstrahlung wird von dem Interferenzspiegel durchgelassen, während die restliche Strahlung reflektiert wird. So wird emittierte Strahlung abgetrennt und kann separat detektiert werden.

Für alle Einzelmoleküldetektions-Experimente ist der Wert der numerischen Apertur (NA) ein wichtiger Parameter. Um den Lichteinfall bei der Detektion zu maximieren sollte der NA-Wert möglichst gross sein.

$$NA = n \cdot \sin(\mu) \quad (2)$$

mit dem Brechungsindex n des Mediums zwischen Probe und Objektiv, sowie dem maximalen Sammlungswinkel μ des Objektivs.

Die Auflösung des optischen Mikroskops erhält man durch die Sparrow-Gleichung:

$$R = \frac{0.61\lambda}{NA} \quad (3)$$

mit der Wellenlänge λ und der Numerischen Apertur NA.

Die Auflösung sagt aus, wie gut man zwei naheliegende Probenmoleküle voneinander unterscheiden kann. Der erhaltene Wert für R gibt an wie nah sich zwei benachbarte Probenmoleküle kommen dürfen.

3. Experiment [2]

3.1. Versuchsaufbau

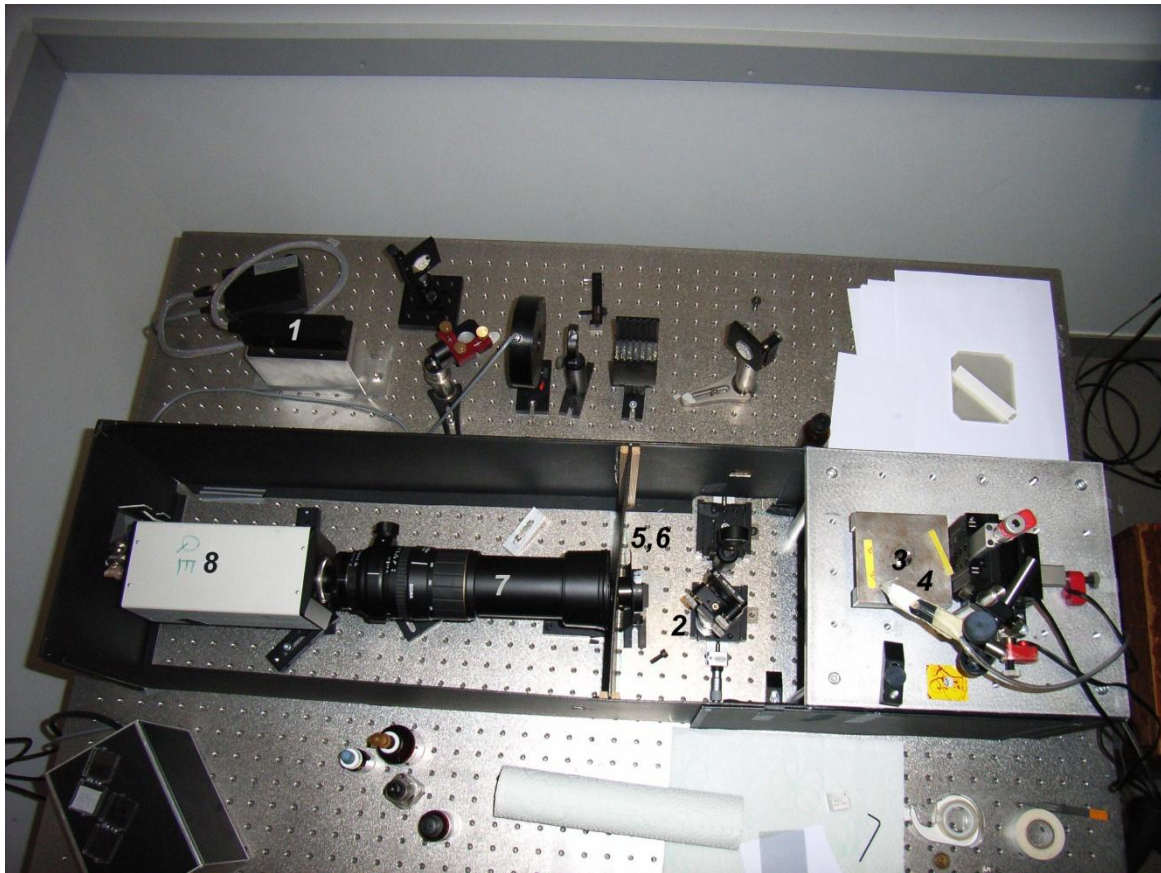


Abbildung 3: Foto des Versuchsaufbaus

Legende:

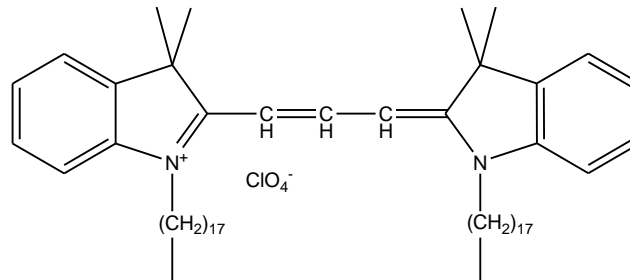
1. Frequenzverdoppelter Nd YAG-Laser (CrystaLaser GCL025L)
2. Dichromatischer Spiegel (Omega Optics 560 DRLP)
3. Mikroskop-Objektiv (Nikon Plan Fluor 100 x NA 1.3) (im Bild verdeckt)
4. Piezoelektronisch gesteuerte Metallplatte (New Focus 8322)
5. Raman Cut-Off Filter (Omega Optics XR 3002)
6. Holographischer Notch-Filter (Kaiser Optical Systems Inc. HNPF 532)
7. Zoom-Objektiv (Nikon Nikkor 1:4, 200mm)
8. Peltier-gekühlte CCD-Kamera (PCO Sencicam QE)

3.2. Verwendete Chromophore

3.2.1 1,4-Bis(DIPP-POCl)piperatin

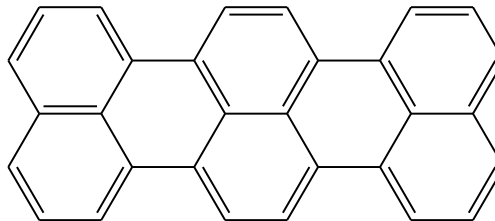
Keine Daten gefunden

3.2.2 DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate)



Strukturformel	$\text{C}_{59}\text{H}_{97}\text{ClN}_2\text{O}_4$
Molmasse (g/mol)	933.87
Absorptionsmaximum (nm)	549
Emissionsmaximum (nm)	565

3.2.3 Terrylene



Strukturformel	$\text{C}_{30}\text{H}_{16}$
Molmasse (g/mol)	376.45
Absorptionsmaximum (nm)	556
Emissionsmaximum (nm)	568

3.3. Versuchsdurchführung

3.3.1. Verdünnung

In einem ersten Versuch wurden Lösungen verschiedener Konzentration von 1,4-Bis(DIPP-POCl)piperatin hergestellt und auf Deckgläser aufgetragen. Dazu wurde ausgehend von einer Stammlösung (vorhanden, ca. 10^{-3} M) je eine 10^{-5} M, 10^{-7} M und 10^{-8} M Lösung in Toluol hergestellt. Danach wurden alle Lösungen noch einmal um einen Faktor 10 mit einer bereitgestellten Lösung von 2 g PMMA in 60 ml Toluol verdünnt.

Diese Lösungen wurden anschliessend mittels eines Spincoaters bei 3000 Umdrehungen pro Minute auf gebackene Deckgläser aufgetragen, wodurch ein extrem dünner PMMA-Film gebildet wurde. Die so hergestellten Probengläser wurden anschliessend unter einem N₂-Fluss per Laser angeregt und die Fluoreszenz gemessen.

3.3.2. Präzision

Im folgenden Teil des Experimentes wurde versucht, das Auflösungsvermögen der Apparatur zu bestimmen. Dafür wurden Covergläser mit der zuvor in Versuch 1 bestimmten optimalen Lösung (10⁻⁹ M) beschichtet und davon Bilder aufgenommen.

Die gespeicherten Fotos wurden anschliessend mittels Scanhasee vermessen und mit Origin 7 ausgewertet.

3.3.3. Photobleaching

Für den dritten Versuch, die Untersuchung des Photobleachings mit und ohne Sauerstoff, wurde eine Lösung des fluoreszierenden Stoffes Dil (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) mit einer Konzentration von 10⁻⁹ M hergestellt und damit die gebackenen Covergläser beschichtet. Die so hergestellten Gläser wurden jeweils mit bzw. ohne N₂-Einfluss mit dem Laser bestrahlt. Dabei wurde die Justierung und Fokussierung jeweils mit den bereitgestellten Filtergläsern (ND1-8) durchgeführt um frühzeitiges Photobleaching zu verhindern. Nachdem die Kamera scharfgestellt war, wurden die Filter entfernt und im abgedunkelten Raum jeweils Serien von 100 Bildern in einem Abstand von 0.2 s aufgenommen. Nach jeder Serie wurde ein neues Coverglas eingesetzt. Die Auswertung der Bilderserien geschah mittels seitens des Assistenten geschriebenen PV-Wave-Routinen (b16read.pro, maxfind.pro), die erhaltenen Daten wurden statistisch mittels Origin 7 verarbeitet.

3.3.4. Orientierung von Terrylene

Beim letzten Versuch wurde versucht, die räumliche Ausrichtung einzelner Terrylene-Moleküle zu erkennen. Dazu wurde erst eine 10⁻⁹ M Terrylene-Lösung hergestellt und damit ein Coverglas überzogen. Anschliessend wurde das Glas auf die Metallplatte gelegt und unter O₂-Ausschluss beobachtet.

Die räumliche Anordnung wurde untersucht, indem der Winkel des Spiegels vor dem Mikroskop-Objektiv von Hand verstellt wurde. Es wurden mehrere Bilder aufgenommen um die räumliche Orientierung einzelner Moleküle zu dokumentieren.

4. Resultate

4.1. Konzentrationsabhängigkeit

Es wurde mit dem Farbstoff 1,4-Bis-(DIPP-POCl)-piperatin eine Verdünnungsreihe, ausgehen von der Stammlösung 10^{-3} mol/L, hergestellt. Bei einer Verdünnung von 10^{-6} bis 10^{-8} mol/L konnten die einzelnen Moleküle noch nicht eindeutig voneinander getrennt werden. Ab einer Verdünnung von 10^{-9} mol/L waren die einzelnen Moleküle gut unterscheidbar. Die weiteren Experimente wurden deshalb bei einer Verdünnung von 10^{-9} mol/L durchgeführt.

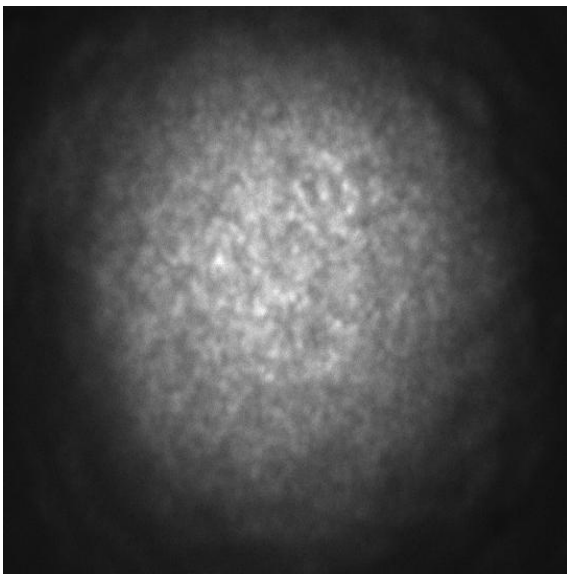


Abbildung 4: 10^{-6} mol/L, Filter ND8, 1x1 Pixel

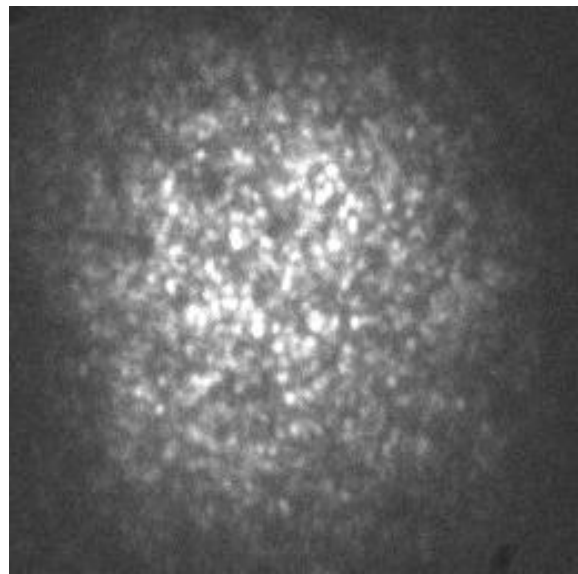


Abbildung 5: 10^{-7} mol/L, Filter ND8, 2x2 Pixel

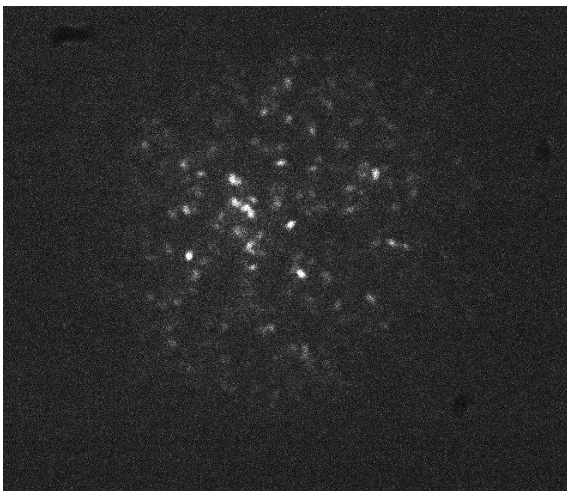


Abbildung 6: 10^{-8} mol/L, Filter ND4, 1x1 Pixel

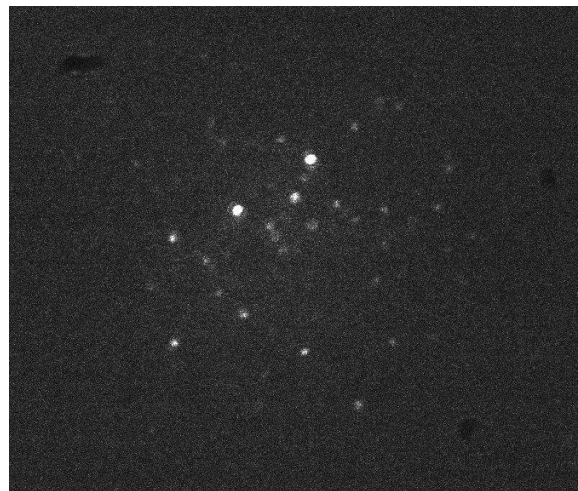


Abbildung 7: 10^{-9} mol/L 1x1 Pixel

4.2. Räumliche Position der Moleküle

Bei der Verdünnung von 10^{-9} mol/L wurden anschliessend noch mit dem Programm Scanhasee jeweils einmal drei Moleküle vermessen (Pixel versus Intensität) und mit dem Programm Origin 7 geplottet und mit einer Gauss-Funktion gefittet (siehe Abbildung 20 bis 25 im Anhang 6.2.1).

Daraus erhält man die folgenden Peak-Breiten und die Standardabweichungen des Gauss-Fits:

Messung	Peak-Breite	Standardabweichung
X1	6.78483	± 0.14446
X2	6.21663	± 0.18895
X3	6.39409	± 0.20259
Y1	5.50971	± 0.13652
Y2	6.21071	± 0.19461
Y3	5.90883	± 0.20158

Tabelle 1: Peak-Breite von verschiedenen Molekülen

Des Weiteren gilt:

$$FWHM = 2 \cdot \sqrt{2 \ln(2)} \cdot w \quad (4) [3]$$

mit w = Peak-Breite aus der Gauss-Funktion. Die Auflösung berechnet sich dann wie folgt:

$$A = \frac{L_p \cdot FWHM}{V} \quad (5)$$

mit L_p = Länge eines Pixels ($6.45 \cdot 10^{-6}$ m) in der Kamera und V der Vergrösserung (200x). Es ergeben sich somit die folgenden Werte:

Messung	Auflösung A
X1	$0.52 \pm 0.01 \mu\text{m}$
X2	$0.47 \pm 0.01 \mu\text{m}$
X3	$0.49 \pm 0.02 \mu\text{m}$
Y1	$0.42 \pm 0.01 \mu\text{m}$
Y2	$0.47 \pm 0.01 \mu\text{m}$
Y3	$0.45 \pm 0.02 \mu\text{m}$
Δx-Mittelwert	13.6 nm
Δy-Mittelwert	13.5 nm

Tabelle 2: Auflösung von verschiedenen Molekülen

Aus Tabelle 2 ist ersichtlich, dass man den Ort eines Moleküls auf 13.6 nm genau bestimmen kann.

4.3. Photobleaching

Es wurde die Photobleaching-Rate einer 10^{-9} mol/L Lösung von Dil mit Hilfe einer 50 Bilder umfassenden Serie dokumentiert. Dazu wurde die Serie nach dem Abspeichern mit Hilfe eines PV-Wave-Skripts analysiert. Auffallend ist der signifikante Unterschied zwischen einer sauerstoffarmen Umgebung und einer sauerstoffreichen Umgebung. Dil ist unter Stickstoff photobeständiger und

kann somit mehr Photonen abgeben als der gleiche Fluoreszenzfarbstoff in einer Sauerstoff-Atmosphäre.

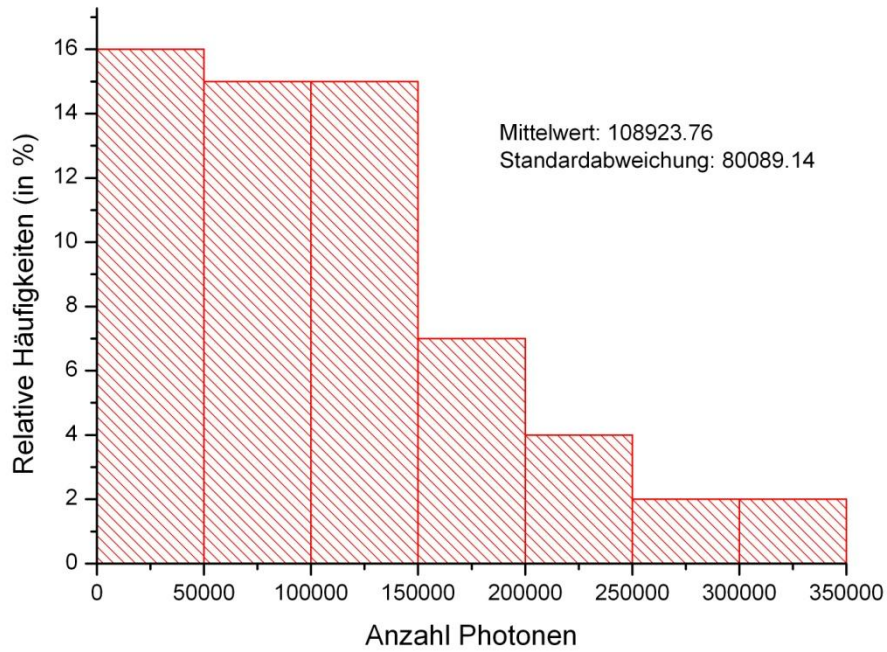


Abbildung 8: Histogramm mit der Anzahl Photonen und die rel. Häufigkeit (unter Stickstoff) (Serie 5)

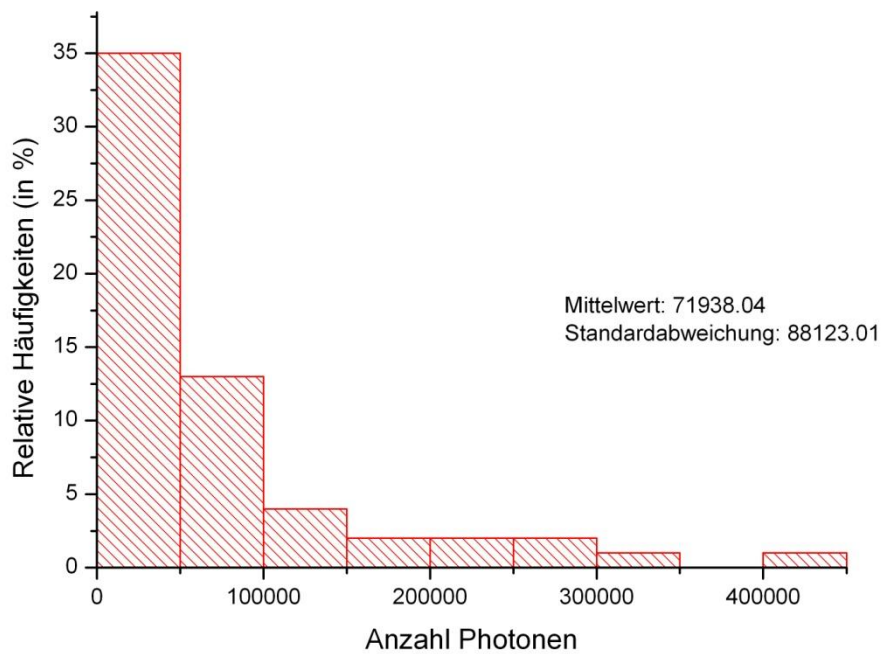


Abbildung 9: Histogramm mit der Anzahl Photonen und die rel. Häufigkeit (mit Sauerstoff) (Serie 8)

4.4. Wanderung von Dil

Es wurde eine Serie von 50 Bildern einer 10^{-9} mol/L Lösung von Dil in Toluol/PMMA aufgenommen und mittels Auswertung mit MatLab® versucht, die Wanderung nach zu verfolgen.

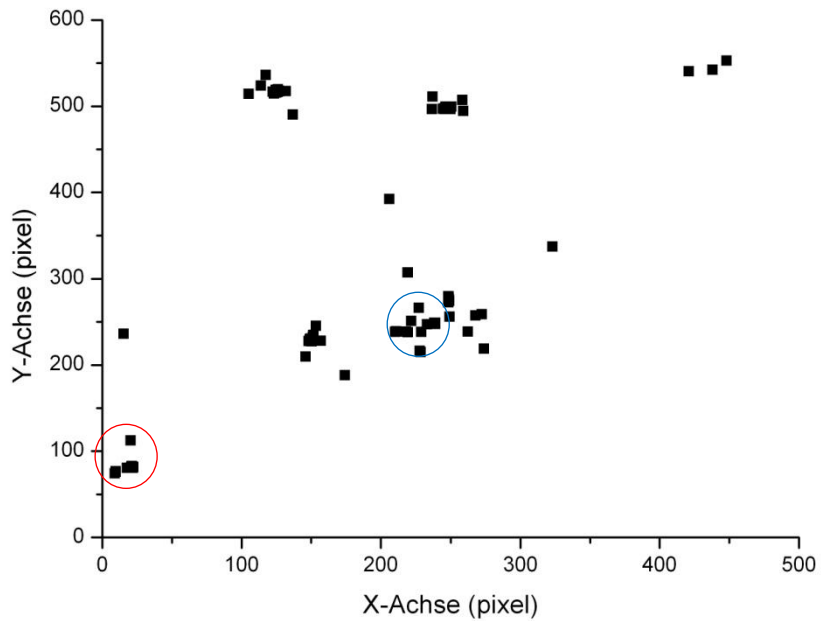


Abbildung 10: Wanderung von verschiedenen Molekülen, 1 Pixel entspricht 32.25 nm.

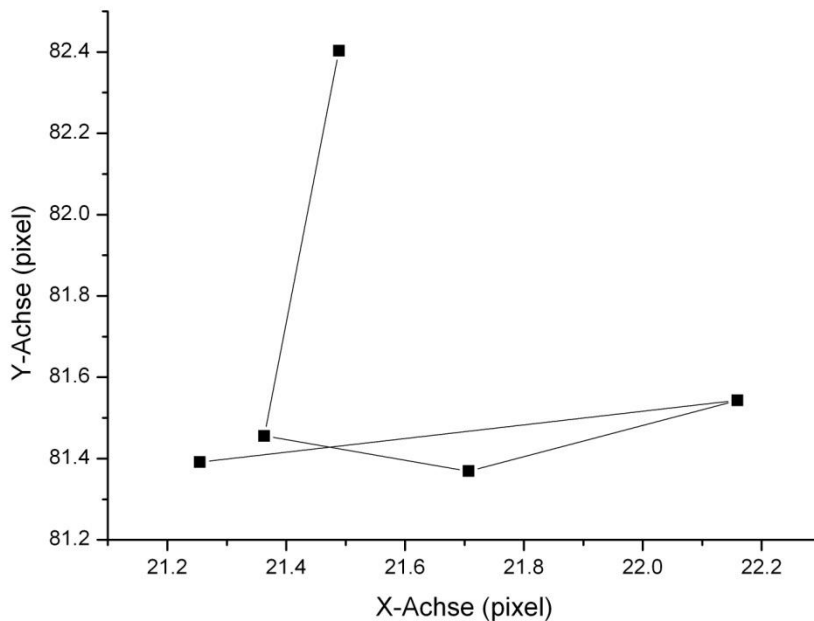


Abbildung 11: Wanderung der Molekülgruppe 1 (Rot in Abb. 10), 1 Pixel entspricht 32.25 nm.

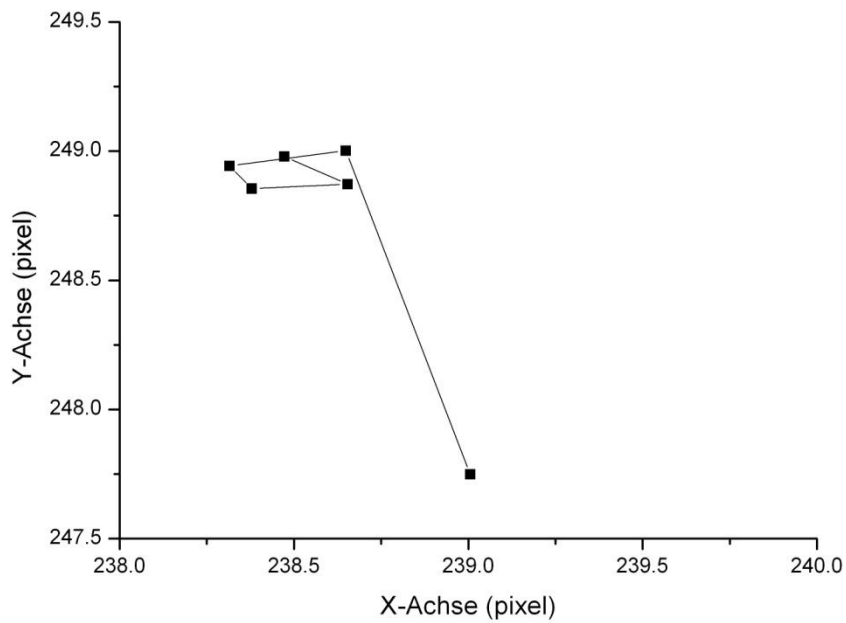


Abbildung 12: Wanderung der Molekülgruppe 2 (Blau in Abb. 10), 1 Pixel entspricht 32.25 nm.

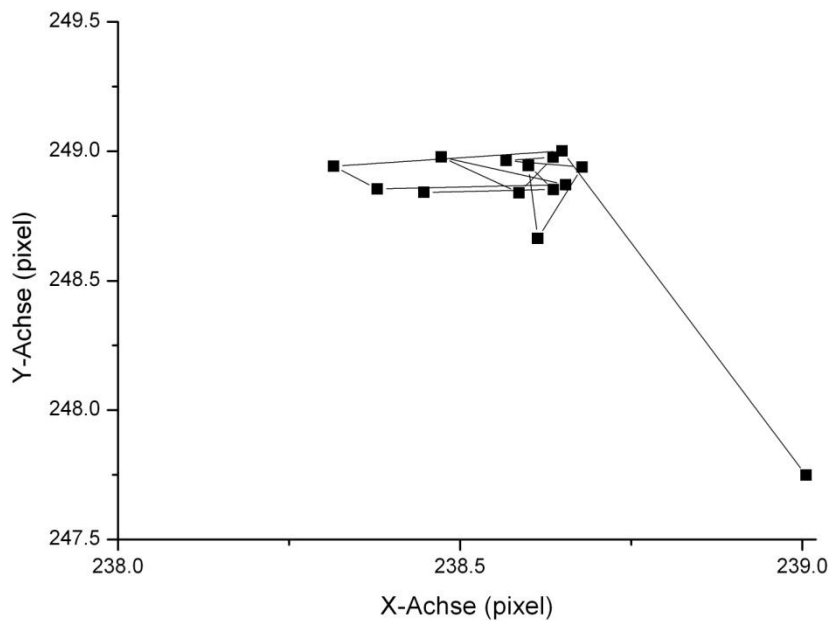


Abbildung 13: Wanderung der Moleküle 23, 47 & 74, 1 Pixel entspricht 32.25 nm.

Wie in Abbildungen 8 und 9 zu erkennen ist, gibt es keine systematischen Bewegungen, äussere Störungen, wie zum Beispiel Erschütterungen oder Luftbewegung durch den Stickstofffluss können somit ausgeschlossen werden. In Abbildung 10 wurden mehrere eng benachbarte Peaks, die vom Computer in verschiedenen Moleküle unterteilt wurden, zusammen gefasst. Ein möglicher Grund dafür,

dass der Computer das Molekül nicht einer Serie zugeordnet hat, ist, dass es zwischenzeitlich in den Bildern nicht entdeckt wurde.

4.5. Orientierung von Terrylen

Als letzter Versuch wurde die Orientierung von einzelnen Molekülen untersucht. Dafür wurde eine 10^{-9} mol/L Lösung von Terrylen unter Einsatz eines ND4 Filter bestrahlt. Während des Bestrahleins wurde die Einstrahlrichtung des Lasers von 90° auf ca. 30° gekippt. Der linear polarisierte Laserstrahl bekommt dadurch eine zusätzliche Vektor-Komponente. Durch diese zusätzliche Komponente kann der Laser nun auch diejenigen Moleküle anregen, welche nicht horizontal auf dem Objektträger liegen, sondern auch die vertikal Orientierten. Es wurde eine Serie von Bildern während des Umklappens aufgenommen, welche den Effekt des Erscheinens von Molekülen, abhängig vom Winkel, zeigt.

Während des Umklappens war das Bild durch das Bewegen des diagonalen Spiegels leider etwas unscharf; um den Effekt des Ringes besser darzustellen wurde in Abbildung 16 ein gut fokussierter Ring zusätzlich abgebildet.



Abbildung 14: Bild 1

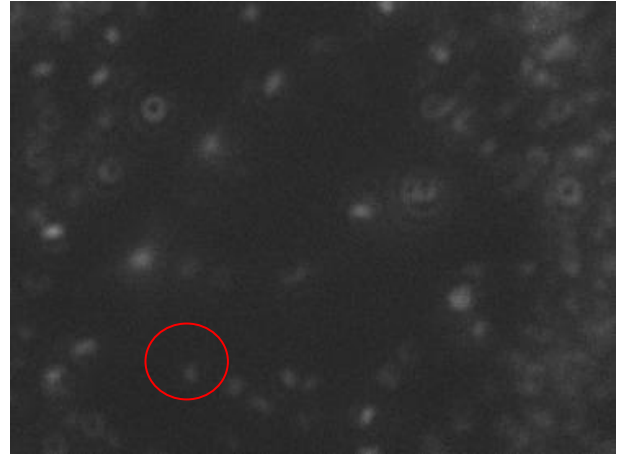


Abbildung 15: Bild 60



Abbildung 16: Bild 65

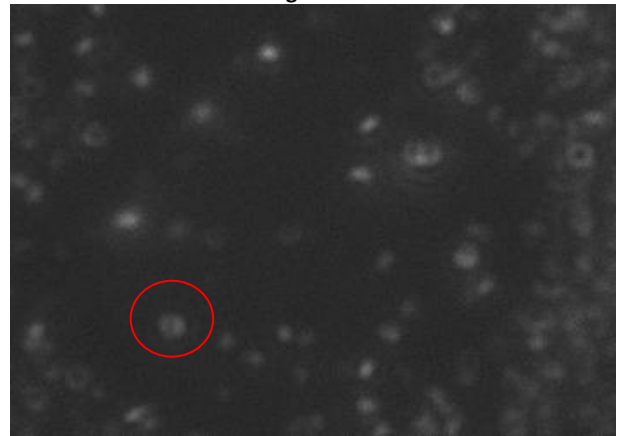


Abbildung 17: Bild 70

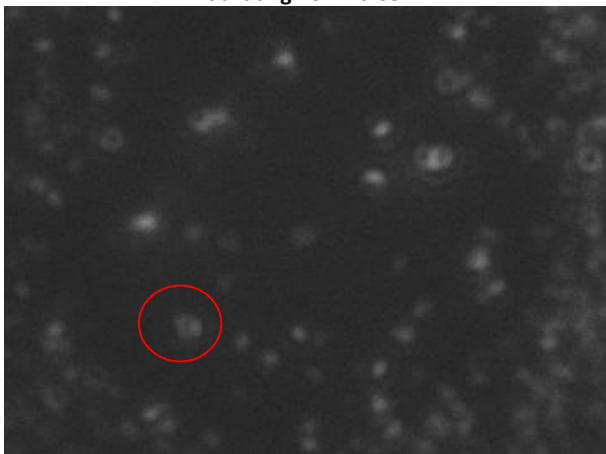


Abbildung 18: Bild 80

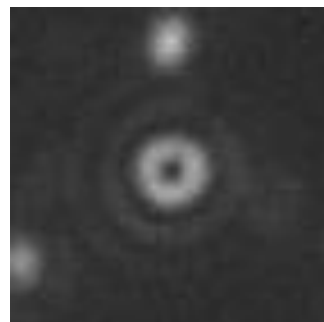


Abbildung 19: Ring

5. Diskussion

Die Herstellung der Verdünnungen, sowie das Aufbringen der Lösungen auf die gebackenen Covergläser bereitete keine Probleme. Die Ermittlung der idealen Konzentration von 10^{-9} mol/L stimmte mit den Erwartungen überein und die Verdünnungsreihen zeigten eindrücklich, wie die Konzentration der Moleküle und somit auch die Anzahl der Photonen, welche den Detektor erreicht haben, abnahm. Dank der optimalen Konzentration konnten dann auch einzelne Moleküle separiert und vermessen werden. Die erhaltenen Daten aus dem Gauss-Fit zeigten, dass eine präzise Bestimmung des Ortes möglich ist.

Sehr schön zu sehen war der Einfluss von Luftsauerstoff auf die Photobleaching-Rate von DiI. Bei Ausbleiben eines Stickstoffflusses auf die Probe war eine signifikante Zunahme der Photobleaching-Rate festzustellen.

Die Untersuchung der Wanderung einzelner Moleküle zeigte eine nur sehr geringe Bewegung derselben. Durch die Effekte von Blinking, Photobleaching und den nicht sehr robusten Auswertungs-Skripten konnten die einzelnen Moleküle nicht durchgehend verfolgt werden. Eine Möglichkeit zur Verbesserung wäre, wenn das Skript Moleküle, welche an der gleichen Stelle auftreten und wieder verschwinden zusammenfassend als einzelnes Molekül betrachten würde.

6. Anhang

6.1. Literaturverzeichnis

- [1] A. Renn, Spektroskopie Praktikum: Single molecule detection, v3.0, Zürich, 2006.
- [2] www.roempp.com, 17.10.2007
- [3] Halbwertsbreite, <http://de.wikipedia.org/wiki/Halbwertsbreite>, 18.10.2007.
- [4] W. E. Moerner, D. P. Fromm, Methods of single-molecule fluorescence spectroscopy and microscopy, *Rev. Sci. Instrum.* **8** (2003) 3597.
- [5] A. Renn, J. Seelig, V. Sandoghdar, Oxygen dependent photochemistry of fluorescent dyes studied at the single molecule level, *Mol. Phys.* **3** (2006) 409.
- [6] J. Zimmermann, A. van Dorp, A. Renn, Fluorescence Microscopy of Single Molecules, *J. Chem. Educ.* **4** (2004) 553.

6.2. Daten und Bilder

6.2.1. Räumliche Position der Moleküle

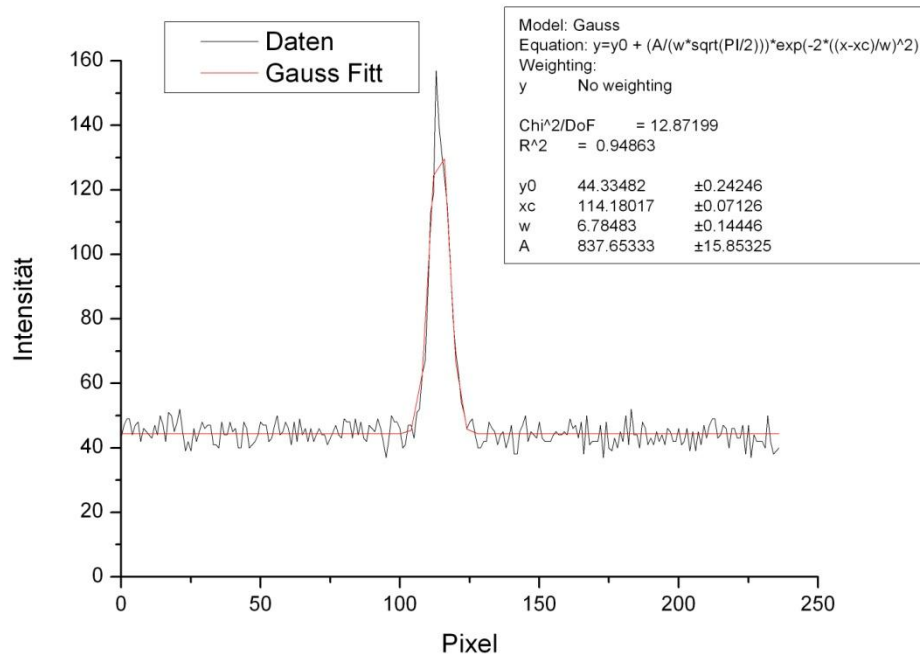


Abbildung 20: X1, Intensität gegen Pixel zur Bestimmung der Auflösung

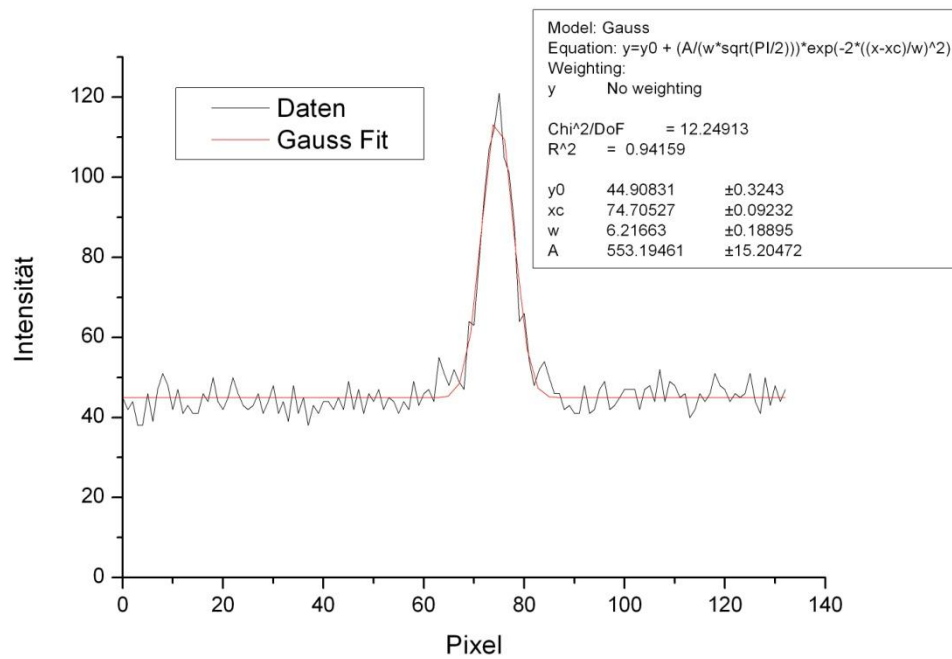


Abbildung 21: X2, Intensität gegen Pixel zur Bestimmung der Auflösung

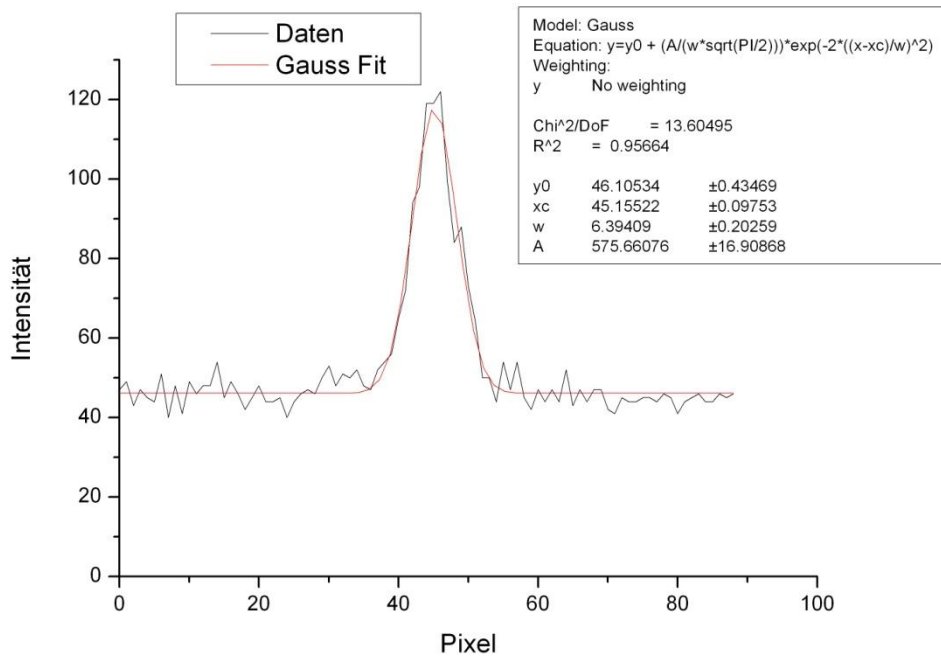


Abbildung 22: X3, Intensität gegen Pixel zur Bestimmung der Auflösung

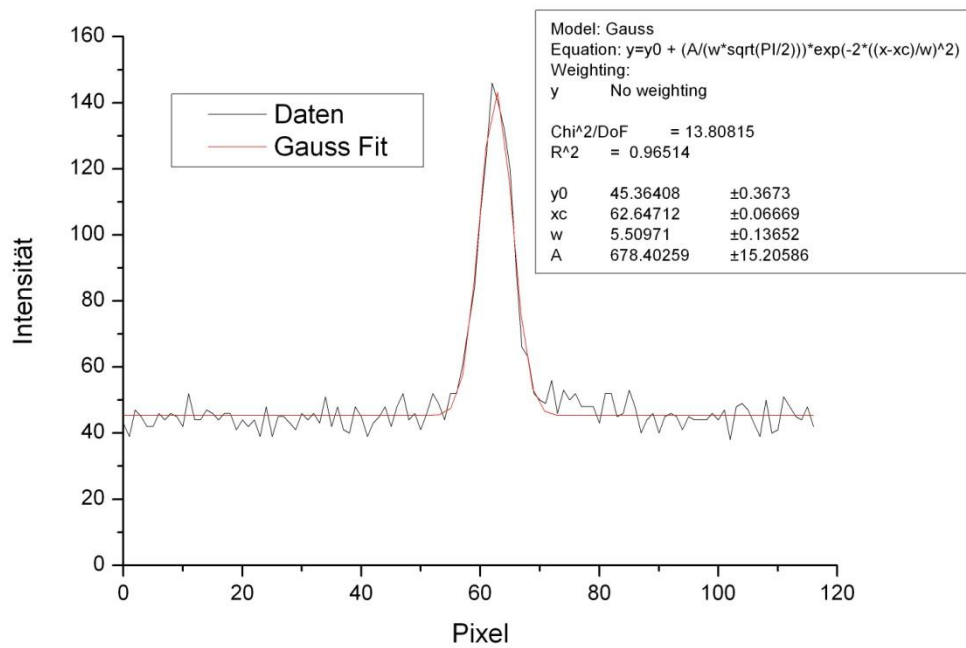


Abbildung 23: Y1, Intensität gegen Pixel zur Bestimmung der Auflösung

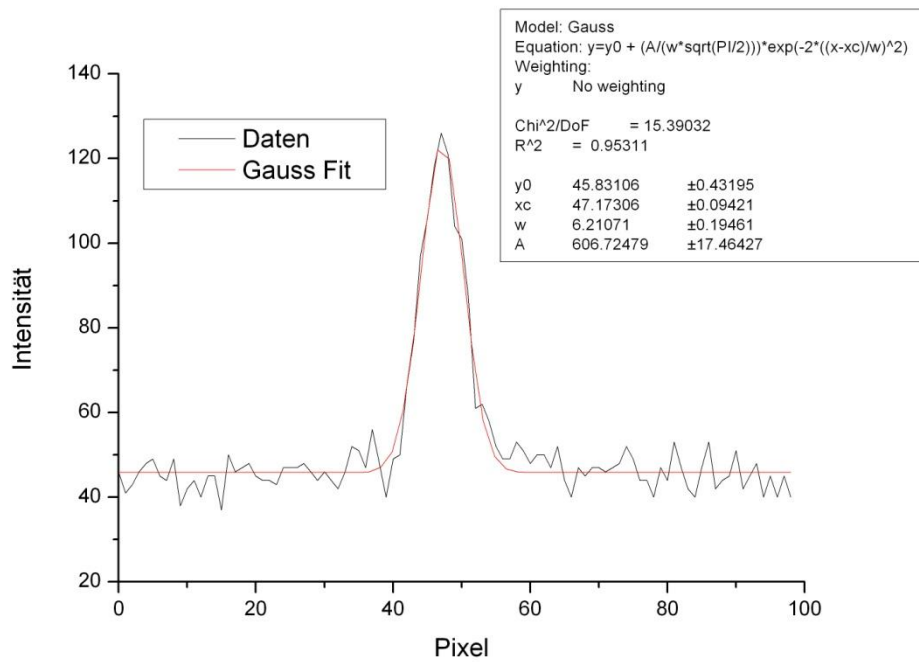


Abbildung 24: Y2, Intensität gegen Pixel zur Bestimmung der Auflösung

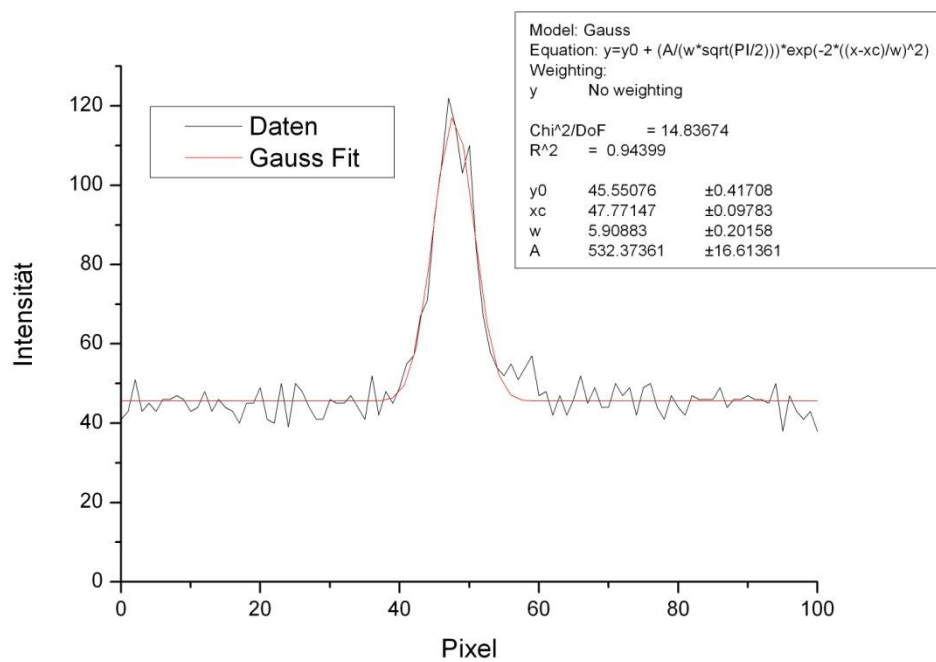


Abbildung 25: Y3, Intensität gegen Pixel zur Bestimmung der Auflösung

SMD-Versuch

27

15.10.2007

Assistent: Alois Reu

Problemvorbereitung

Fr. 9-11, CUGR 2670

* 1. 10^{-6} M Lösung von 1,4-Bis (DIPP-POCl)-piperazin ②

Annahme: bereitgestellte Lsg. ① ist 10^{-3} M

10 μ l Lsg
1000 μ l Toluol

Schütteln $\Rightarrow 10^{-5}$ M in Toluol ②

* 100 μ l ②

1000 μ l 2g/60ml PMMA/Toluol

Schütteln $\Rightarrow 10^{-6}$ M in Toluol/PMMA ③

100 μ l ③

1000 μ l 2g/60ml

Schütteln $\Rightarrow 10^{-7}$ M in Toluol / PMMA ④

100 μ l ④

$\Rightarrow 10^{-8}$ M

⑤

100 μ l ⑤

1000 μ l 2g/60ml

$\Rightarrow 10^{-9}$ M

⑥

100 μ l ⑥

1000 μ l 2g/60ml

$\Rightarrow 10^{-10}$ M

⑦

Versuch 3

16.10.07

28

DI

StammLösung $10^{-5} M$

10 μl StammLösung
1000 μl Toluol

Schütteln \Rightarrow (10)

100 μl (10)

1000 μl PMMA in Toluol

\Rightarrow (11)

100 μl (11)

1000 μl PMMA in Toluol

\Rightarrow (12)

Versuch 4

Ter / Tol 1:50 (ca 10^{-5})

(20)

10 μl StammLösung
1000 μl PMMA in Toluol

Kamera: CamWare

29

Origin 7

Matlab 2006

PV-Wave 8.51 → b16read.pro
matfind.pro