



Doctoral Thesis

Single molecules as sensitive probes in high-resolution optical microscopy

Author(s):

Sick, Beate

Publication Date:

2001

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004179478> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH No. 14055

Single molecules as sensitive probes in high-resolution optical microscopy

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH

For the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by

BEATE SICK

Diplom-Physikerin, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

born August 25, 1967 in Stuttgart
Germany

Accepted on the recommendation of:
Prof. Dr. Urs P. Wild, Examiner
Prof. Dr. Frédéric Merkt, Co-Examiner
Dr. Bert Hecht, Co-Examiner

Zürich 2001

Abstract

Widely used models in physics, chemistry and biology are often based on a single-molecule description. In the last decade it became possible to detect single molecules, and to measure some of their physical and chemical properties. Single-molecule experiments can directly provide the distribution and time trajectory of an observable. This is an essential advantages over ensemble measurements, which yield only mean values averaged over a whole population of molecules.

This thesis is concerned with the optical investigation of single molecules at room temperature. A high-resolution fluorescence microscope has been developed, which combines a scanning confocal optical microscope (SCOM) and a scanning optical near-field microscope (SNOM). A new method for the fabrication of optical near-field probes is presented, which yields high-quality probes. Single-molecule sensitivity and an optical resolution down to 50 nm is demonstrated for the SNOM part of the instrument. The single-molecule sensitivity of the confocal microscope is shown in various experiments. The theoretically predicted resolution is achieved which is proven by the comparison of simulated and measured single-molecule images.

The main limitation in optical single-molecule studies at room temperature results from the limited number of photons emitted by a fluorescent molecule. The investigation of single terrylene molecules embedded in a *p*-terphenyl crystal reveals an extraordinarily high photostability of the fluorophores. More than 10^8 fluorescence photons are on average emitted from individual molecules before photo-bleaching takes place. This number of photons exceeds all previously reported values by more than one order of magnitude. However, fluorescent molecules which are frequently

used as labels in biological experiments requiring physiological conditions only emit in the order of 10^5 photons before photo-bleaching. For this reason efficient methods are required which allow to gain as much information as possible from the limited amount of photons. A new method for rapid identification of single molecules is presented which relies on simultaneous spectral and time-resolved photon counting. It is shown that a few hundred detected photons are sufficient to assign an observed molecule to one out of four species with a confidence level higher than 99.9%.

An important parameter in various single-molecule experiments is the orientation of the molecular absorption dipole moment, because the orientation has an influence on other parameters, e.g. the lifetime of a fluorophore in the neighborhood of a dielectric or metallic interface does depend on the orientation of the molecule. It is shown for the first time how a confocal microscope can be utilized for reliably determining the three-dimensional orientation of single molecules. The method relies on engineering the field-distribution in the focus of a high numerical aperture lens such that all electric field components acquire comparable magnitudes. Single molecules are utilized to map the field distribution in the excitation focus, which verify the performed simulations.

Zusammenfassung

Weitverbreitete Modelle in der Physik, Chemie und Biologie beruhen auf einer Einzelmolekülbeschreibung. Im letzten Jahrzehnt wurde es möglich einzelne Moleküle zu detektieren und manche ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften zu messen. Experimente an einzelnen Molekülen machen sowohl die Verteilung einer physikalischen Meßgröße als auch deren zeitliche Entwicklung direkt zugänglich. Dies ist ein wesentlicher Vorteil gegenüber Ensemble-Experimenten, bei denen immer ein Mittelwert über eine ganze Population von Molekülen gemessen wird.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der optischen Untersuchung von einzelnen Molekülen bei Zimmertemperatur. Ein hochauflösendes Fluoreszenzmikroskop wurde entwickelt, welches ein konfokales optisches Rastermikroskop (SCOM) und ein nahfeldoptisches Rastermikroskop (SNOM) kombiniert. Ein neues Herstellungsverfahren für qualitativ hochwertige optische Nahfeldspitzen wird vorgestellt. Die Einzelmolekülsensitivität und eine optische Auflösung von bis zu 50 nm wird für den SNOM-Teil des Instruments nachgewiesen. Die Einzelmolekülsensitivität des konfokalen Mikroskops wird in verschiedenen Experimenten demonstriert. Durch den Vergleich von simulierten und gemessenen Rasterbildern von einzelnen Molekülen wird nachgewiesen, daß die theoretische Auflösungsgrenze erreicht wird.

Die größte Beschränkung bei optischen Messungen an einzelnen Molekülen bei Zimmertemperatur ist die begrenzte Zahl von emittierten Photonen. Die Untersuchung von einzelnen Terrylenmolekülen, die in einen *p*-terphenyl Kristall eingelagert sind, weist eine extrem hohe Photostabilität der Fluorophore nach. Mehr als 10^8 Fluoreszenzphotonen werden im Mittel von einem einzelnen Molekül emittiert bevor es photobleicht. Diese Zahl übersteigt alle zuvor bekannten Werte um mehr als eine

Größenordnung. Allerdings emittieren Fluoreszenzmoleküle, die in der Biologie als Marker eingesetzt werden, unter physiologischen Bedingungen im Mittel nur etwa 10^5 Photonen bevor sie bleichen. Aus diesem Grund bedarf es effizienter Methoden, die es erlauben möglichst viel Information aus der begrenzten Zahl von Photonen zu gewinnen. Eine neue Methode für effiziente und schnelle Identifikation von einzelnen Molekülen wird vorgestellt, die auf gleichzeitigem spektral und zeitaufgelöstem Photonenzählen beruht. Es wird nachgewiesen, daß wenige hundert detektierte Photonen ausreichen, um ein beobachtetes Molekül mit einer Sicherheit von 99,9% einer von vier verschiedenen Spezies zuzuordnen.

Ein wichtiger Parameter in verschiedenen Experimenten mit einzelnen Molekülen ist die Orientierung des molekularen Absorptionsdipolmoments. So wird etwa die Lebensdauer von Fluorophoren in der Nähe von dielektrischen oder metallischen Grenzflächen durch die Orientierung des Moleküls beeinflusst. In der vorliegenden Arbeit wird zum ersten mal gezeigt, wie ein konfokales Mikroskop eingesetzt werden kann, um die dreidimensionale Orientierung eines Moleküls zuverlässig zu bestimmen. Die Methode beruht darauf, eine elektrische Feldverteilung im Fokus eines Objektivs mit hoher numerischer Apertur so zu konstruieren, daß alle Feldkomponenten vergleichbare Größe haben. Einzelne Moleküle werden eingesetzt, um die Feldverteilung im Anregungsfokus abzubilden, wodurch die durchgeführten Simulationen zur Berechnung der Feldverteilung verifiziert werden.