



Doctoral Thesis

## Optical methods for nanoscale investigations in biology

**Author(s):**

Seelig, Johannes

**Publication Date:**

2006

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005330863> →

**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. 16856

**Optical Methods for  
Nanoscale Investigations in Biology**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of  
Doctor of Natural Sciences

presented by

**JOHANNES SEELIG**

Dipl. Phys.  
University of Basel

born 31st May 1978

citizen of Basel

Prof. Vahid Sandoghdar, examiner  
Prof. Wolf-Dietrich Hardt, co-examiner

2006

# Abstract

The distance range between around 10 nm and distances accessible with diffraction limited microscopes is not easily accessible with optical methods. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) gives access to distances below 10 nm. Much effort has been spent in recent times for developing methods filling the resolution gap between around 10 nm and 100 nm. Some of these efforts are summarized in chapter 1 of this thesis with emphasis on single molecule detection and applications in biophysics and molecular biology. This implies a discussion of the spatial and temporal resolution limits of the different methods and motivates the work presented in the following chapters.

In chapter 2 and 3 we present a method that give access on distances below the diffraction limit and beyond the FRET range on the single molecule level. The method is based on the interaction of fluorescent molecules with metallic nanoparticles. Chapter 2 summarizes the theoretical principles underlying this interaction. The presented theory underlies the calculations that we apply for the theoretical description of the experiments presented in chapter 3. Chapter 3 discusses the experimental implementation of a tunable spectroscopic ruler that allows measuring distances on the single molecule level in the mentioned distance range. We have developed a setup that allows the simultaneous detection of single nanoparticles and single molecules. This setup allows studying the photophysical properties of single molecules interacting with single nanoparticles. For demonstrating that the interaction between nanoparticles and fluorophores can serve as a spectroscopic ruler on the single molecule level we have implemented a model system consisting of single fluorophores coupled to single 15 nm gold particles. We use DNA molecules of various lengths in the distance range of interest as spacers between molecules and particles. We show that we can obtain information about the distance between the molecule and the particle by measuring the fluorescence lifetime. Further, we discuss the photophysical characteristics of the fluorophores coupled to the gold particles. It turns out that combined single particle and single molecule detection is a versatile tool for controlled experiments in the field of metal fluorophore interactions. Chapter 4 gives two applications of single molecule detection and single particle detection. First, we use FRET for studying DnaK proteins on the single molecule level. Second, we show that single virus particles can be imaged without labelling and only taking advantage of their intrinsic optical properties.

# Zusammenfassung

Der Distanzbereich zwischen ca. 10 nm und Distanzen, die mit beugungslimitierten Mikroskopen aufgelöst werden können, ist mit optischen Methoden nur bedingt zugänglich. Der Bereich unterhalb von 10 nm kann mit Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) untersucht werden. Für den Bereich zwischen ca. 10 und 100 nm wurden in den letzten Jahren mehrere optische Methoden entwickelt. Einige dieser Ansätze sind im ersten Kapitel der vorliegenden Arbeit zusammengefasst mit Schwerpunkt auf Anwendungen in der Biophysik und der Molekularbiologie. Die Diskussion der erreichten räumlichen und zeitlichen Auflösung liefert gleichzeitig die Motivation für die Arbeit, die in den folgenden Kapiteln beschrieben wird. In den Kapiteln zwei und drei wird eine Methode vorgestellt, die räumliche Information im diskutierten Bereich unterhalb der Beugungsgrenze und oberhalb des FRET Bereichs auf dem Niveau einzelner Moleküle gibt. Die Methode basiert auf der Wechselwirkung von fluoreszierenden Molekülen mit metallischen Teilchen, deren Grösse im Nanometerbereich liegt. In Kapitel zwei wird die theoretische Beschreibung dieser Wechselwirkung zusammengefasst. Diese Theorie wird in Kapitel drei zur Beschreibung der experimentellen Ergebnisse verwendet. In Kapitel drei wird experimentell gezeigt, dass die erwähnte Wechselwirkung ausgenutzt werden kann, um räumlich Information zu erhalten. Dazu wurde ein Mikroskop entwickelt, das die gleichzeitige Detektion von einzelnen Teilchen im Nanometerbereich und von einzelnen Molekülen erlaubt. Die photophysikalischen Eigenschaften von Molekülen, die mit Teilchen im Nanometerbereich interagieren, können so untersucht werden. Um zu zeigen, dass diese Wechselwirkung für Distanzmessungen ausgenutzt werden kann, verwenden wir ein Modellsystem. Dieses besteht aus einzelnen fluoreszierenden Molekülen, die durch eine doppelsträngige DNS variabler Länge an einzelne metallische Goldteilchen mit einem Durchmesser von 15 nm gebunden werden. Es wird gezeigt, dass die Messung der Fluoreszenzlebensdauer Rückschlüsse auf den Abstand zwischen dem Molekül und dem Goldteilchen ermöglicht. Weiterhin werden die photophysikalischen Eigenschaften der Moleküle untersucht. Es stellt sich heraus, dass die kombinierte Detektion von Nanopartikeln und einzelnen Molekülen eine Methode mit vielfältigen Anwendungen ist, die die kontrollierte Untersuchung der Wechselwirkung von Molekülen und Metallstrukturen erlaubt. In Kapitel vier werden zwei Anwendungen der Einzelmolekülmikroskopie und der Detektion einzelner Partikel beschreiben. Einerseits wird FRET verwendet um einzelne DnaK Proteine zu untersuchen. Andererseits wird gezeigt, dass Viren auch ohne Fluoreszenzmarkierung direkt optisch detektiert werden können.