

**Lichtstreuung und Fluoreszenz, von optischer  
Sensorik bis zur (Einzelmolekül-)Mikroskopie  
und Spektroskopie bei Raum- sowie  
Tieftemperatur**

**Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
Dipl.-Chem. Michael Metzger  
aus Sindelfingen

Tübingen  
2020

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Prüfung:

31.07.2020

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Marc Brecht

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Alfred J. Meixner

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Gliederung</b>	<b>5</b>
<b>3</b>	<b>Grundlagen - Wechselwirkung Licht mit Materie</b>	<b>7</b>
3.1	Lichtstreuung an Partikeln . . . . .	7
3.2	Absorption und Fluoreszenz . . . . .	10
3.3	Mikro-Resonator . . . . .	17
3.4	Auflösung und Beugung . . . . .	21
<b>4</b>	<b>Entwicklung eines Trübungssensors</b>	<b>25</b>
4.1	Theoretische Grundlagen - GRIN-Optiken . . . . .	28
4.2	Experimenteller Aufbau . . . . .	32
4.3	Ergebnisse . . . . .	34
4.4	Diskussion . . . . .	37
4.5	Ausblick . . . . .	38
<b>5</b>	<b>Konfokale Mikroskopie bei Raumtemperatur - Aufbau und Experimente</b>	<b>41</b>
5.1	Theoretische Grundlagen . . . . .	42
5.1.1	Konfokale Mikroskopie . . . . .	42
5.1.2	Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung . . . . .	46
5.1.3	Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET) . . . . .	49
5.2	Experimenteller Aufbau . . . . .	53
5.3	Farbstoff Atto488 im stimmbaren Resonator . . . . .	55
5.3.1	Experimenteller Teil und Probenpräparation . . . . .	58
5.3.2	Ergebnisse . . . . .	61

5.3.3	Diskussion . . . . .	65
5.4	FRET im durchstimmbaren Resonator . . . . .	66
5.4.1	Experimenteller Teil und Probenpräparation . . . . .	68
5.4.2	Ergebnisse . . . . .	70
5.4.3	Diskussion . . . . .	75
5.5	Konfokale Mikroskopie an anisotropen Siliziumdioxid-Partikeln . . . . .	78
5.5.1	Probenpräparation . . . . .	79
5.5.2	Ergebnisse . . . . .	82
5.5.3	Diskussion . . . . .	84
5.6	Ausblick . . . . .	84
<b>6</b>	<b>Konfokale Tieftemperatur-Mikroskopie mit Immersion</b>	<b>87</b>
6.1	Theoretische Grundlagen - Einzelmolekülexperimente bei tiefen Temperaturen . . . . .	89
6.2	Experimenteller Aufbau . . . . .	91
6.3	Probenpräparation . . . . .	93
6.4	Ergebnisse . . . . .	95
6.5	Diskussion . . . . .	99
6.6	Ausblick . . . . .	102
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>105</b>
<b>8</b>	<b>Appendix</b>	<b>107</b>
8.1	Danksagung . . . . .	107
8.2	Wissenschaftliche Beiträge . . . . .	108
8.2.1	Publikationsliste . . . . .	108
8.2.2	Konferenzbeiträge . . . . .	110
<b>9</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>113</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>115</b>

# Abbildungsverzeichnis

3.1	Winkelabhängige Streulichtverteilung bei unterschiedlicher Partikelgröße . . . . .	8
3.2	Schematische Darstellung der Energieübergänge bei Absorption und Emission . . . . .	11
3.3	Franck-Condon-Prinzip anhand eines zweiatomigen Moleküls . . . . .	13
3.4	Jablonski-Termschema . . . . .	15
3.5	Geometrie eines Fabry-Pérot-Resonators . . . . .	17
3.6	Modell eines Zwei-Niveau-Moleküls in einem Resonator . . . . .	20
3.7	Entstehung von Beugungseffekten . . . . .	21
3.8	Auflösungskriterien der konfokalen Mikroskopie . . . . .	23
3.9	Vergleich eines Luft- und Immersionsobjektivs . . . . .	24
4.1	Vergleich einer konventionellen, konvexen Sammellinse mit einer GRIN-Linse . . . . .	29
4.2	Schematischer Strahlenverlauf und Brechungsindexgradient einer GRIN-Sammel- und Zerstreulinse . . . . .	30
4.3	Anwendungsmöglichkeiten von GRIN-Optiken mit Pitch von 0,25 und 0,23 . . . . .	30
4.4	GRIN-Optik mit radialem Brechungsindexgradienten inklusive Pitch-Variationen und entsprechendem Strahlenverlauf . . . . .	31
4.5	Schematischer Aufbau des Nephelometer-Prototyps . . . . .	33
4.6	Frequenzsignal und konvertierte NTU-Werte des Prototyps für StablCal® Standards . . . . .	36
4.7	Vergleich des Prototyps mit Nephelometer Hach2100Qis . . . . .	37
5.1	Darstellung des konfokalen Prinzips . . . . .	44
5.2	Erklärung des TCSPC-Prinzips . . . . .	47
5.3	Energie-Termschema eines Förster-Resonanz-Energietransfers . . . . .	49
5.4	Abhängigkeit des Orientierungsfaktors (FRET) . . . . .	51
5.5	Schematische Darstellung des Überlappungsintegrals (FRET) . . . . .	52

5.6	Schematischer Aufbau des entwickelten Mikroskops für Raumtemperatur- experimente. . . . .	55
5.7	Jablonski-Termschema im Resonator . . . . .	57
5.8	Strukturformel sowie Absorptions- und Fluoreszenzspektrum des Atto488- Farbstoffs . . . . .	59
5.9	Schematischer Aufbau des Resonators . . . . .	60
5.10	Gemessene und simulierte Fluoreszenz-Spektren eines Atto488-Farbstoffs .	62
5.11	Vergleich von experimentell und simulierten Emissionsspektren des Atto488- Farbstoffs . . . . .	63
5.12	Fluoreszenz-Zerfallskurven und Relaxationsraten eines Atto488-Farbstoffs innerhalb eines Resonators . . . . .	64
5.13	Strukturformel sowie Absorptions- und Fluoreszenzspektrum des Atto590- Farbstoffs . . . . .	68
5.14	Schema eines FRET-Paares gebunden an einem DNS-Strang . . . . .	69
5.15	Schematischer Aufbau des Resonators Teil 2 . . . . .	71
5.16	Fluoreszenz-Spektrum des FRET-Paares Atto488 und Atto590 im freien Raum . . . . .	73
5.17	Fluoreszenz-Zerfallkurven des reinen Donors und Donors als Teil eines FRET-Paares im freien Raum . . . . .	74
5.18	Transferraten-Konstante als Funktion des Spiegelabstandes im Resonator	76
5.19	REM- und TEM-Bilder von isotropen und anisotropen Partikeln . . . . .	80
5.20	Konfokaler Aufbau für die Messung der mit Farbstofflösung präparierten Siliziumdioxid-Partikel . . . . .	81
5.21	Konfokale Aufnahmen eines isotropen und anisotropen Partikels . . . . .	82
5.22	z-Scan eines anisotropen Partikels . . . . .	83
6.1	Schematischer Aufbau des Mikroskops für Tieftemperaturexperimente . .	93
6.2	Präparationsschritte der Probe mit 1-Propanol als Immersionsmedium . .	95
6.3	Detaillierte Abbildung des patentierten Transfersystems bzw. Probenkopfs	96
6.4	Konfokal aufgenommene Lumineszenz eines Quantenpunkts bei 160 K . .	96
6.5	Konfokale Lumineszenz-Bilder von einzelnen Quantenpunkten . . . . .	98
6.6	Einfluss der Planheit des Strahlteilers auf den Fokusbereich . . . . .	102
6.7	Fluoreszenz-Mikroskopie Bilder von Escherichia coli . . . . .	104

# 1 Einleitung

Das Jahr 2015 wurde von den Vereinten Nationen zum „internationalen Jahr des Lichts und der lichtbasierten Technologien“ ausgerufen. Dadurch sollte auf die enorme Bedeutung von Licht als Lebensvoraussetzung für Tiere, Pflanzen und Menschen, als auch für die technischen Möglichkeiten wie z.B. Laser aufmerksam gemacht werden. Lichtbasierte Technologien beruhen dabei auf verschiedenen Wechselwirkungsphänomenen von Licht mit Materie. Treffen elektromagnetische Felder (Licht) auf Materie, werden nach der Maxwell-Theorie Elektronen zu einer harmonischen Schwingung angeregt [1]. Das dadurch induzierte Dipolmoment oszilliert mit der Frequenz des eingestrahnten Feldes und strahlt wiederum ein elektromagnetisches Feld in Form von Dipolstrahlung ab. Entspricht diese Energie dem Wert der einfallenden Strahlung, so spricht man von elastischer Streuung (siehe Kapitel 3.1). Dieser Prozess liefert Informationen über die geometrische Struktur und Konzentration der Streuzentren, da die Intensität der winkelabhängigen Streustrahlung unter anderem von der Art, Form und Größe der Streuzentren abhängig ist. Moderne Trübungssensoren, wie sie z.B. in der Lebensmittelindustrie [2, 3], der Wasseranalyse [4–8] sowie in der chemischen und pharmazeutischen Industrie (z.B. Prozessüberwachung [9–12]) zum Einsatz kommen, nutzen dieses Phänomen der Lichtstreuung, um die Trübung von Flüssigkeiten zu bestimmen. Im Rahmen dieser Dissertation konnte durch den gezielten Einsatz von miniaturisierten optischen Elektronikkomponenten und GRIN-Linsen [13, 14] als optische Hauptkomponenten ein sehr kompakter und preiswerter Trübungssensor entwickelt werden (Kapitel 4). Dabei weist der Trübungssensor eine vergleichbar hohe Genauigkeit und Reproduzierbarkeit gegenüber kommerziell erhältlichen Geräten auf und ist aufgrund der Kompaktheit und vorhandenen Microcontroller-Schnittstelle für Industrie-4.0-Anwendungen geeignet.

Eine weitere Wechselwirkung von Licht mit Materie ist die Absorption. Wird ein Teil der

einfallenden Strahlung absorbiert und Rotationen oder Schwingungen der Materie angeregt, findet eine inelastische Streuung (z.B. die sog. Raman-Streuung) statt. Inelastische Streuprozesse liefern Informationen über energetische Zustände der Streuzentren und erlauben so Rückschlüsse auf Materialeigenschaften bzw. Zusammensetzung. Entspricht die Energie der elektromagnetischen Welle bzw. des eintreffenden Photons exakt der Differenz zweier Energieniveaus ( $\Delta E = h\nu$ ), so wird das Photon absorbiert. Das dadurch angeregte Atom/Molekül relaxiert unter Emission eines Photons, dessen Energie kleiner ist als die des eintreffenden Photons, in den Grundzustand. Dieser Prozess wird als Fluoreszenz bezeichnet und wird in Kapitel 3.2 genauer beschrieben. Die Fluoreszenz von Quantenemittern ist nach Fermis Goldener Regel (siehe Kapitel 3.2) von der elektromagnetischen Umgebung des Emitters abhängig und kann unter anderem mit Hilfe eines Fabry-Pérot-Resonators gezielt verändert werden. Dieser sog. Purcell-Effekt sowie die Grundlagen eines Resonators werden in Kapitel 3.3 behandelt. (Kapitel 5.3) zeigt in einem Experiment an einem einzelnen Farbstoff-Molekül (Atto488) den Zusammenhang zwischen den modifizierten Fluoreszenz-Spektren und den Zerfallskurven im Resonator. Dabei wurden die jeweiligen Anteile der strahlenden Übergänge des Farbstoffs mit Hilfe des Resonators gezielt variiert und modifiziert. Diese Erkenntnisse und die Möglichkeit, optische Quantensysteme gezielt zu kontrollieren und zu verändern, sind Grundvoraussetzung für die Entwicklung und das Design neuer nanoskaliger photonischer Geräte [15, 16]. In einem weiteren Experiment wurde der Förster-Resonanz-Energietransfer als Funktion des Spiegelabstandes im Resonator spektral und zeitaufgelöst untersucht (Kapitel 5.4). Grundlegendes Verständnis und Kontrolle über diesen Energietransfer könnten zu verschiedensten zukünftigen Anwendungen in photonischen Geräten (beispielsweise in Lasern [17] oder OLEDs [18]) führen.

Die Beobachtung der Fluoreszenz mittels konfokaler Lasermikroskopie lässt eine weitere Wechselwirkung von elektromagnetischen Wellen beobachten. Eine (durch Laseranregung) leuchtende Struktur (Farbstoffmolekül, Quantenpunkt) im Nanometerbereich kann aufgrund von Beugungseffekten an den Objektivblenden nicht als ebenso kleiner Punkt, sondern nur als unscharfer Fleck (sogenanntes Beugungsscheibchen) detektiert werden. Dieser Sachverhalt ist für die Auflösungsgrenze der Mikroskopie entscheidend und wird in Kapitel 3.4 ausführlich dargestellt. Bisher konnte die Auflösungsgrenze der Mikroskopie nur bei Raumtemperatur mit den technisch höchstmöglichen numerischen Aperturen (NA)

---

von Immersionsobjektiven erreicht werden. Das Mikroskopieren bei tiefen Temperaturen (bis zu 1,6 K) war bisher auf den Einsatz von Luftobjektiven und daher auf eine maximale NA von 1 beschränkt [19, 20]. Dabei hat die konfokale Mikroskopie bei tiefen Temperaturen insbesondere bei biologischen Proben enorme Vorzüge (weitere Vorteile von tiefen Temperaturen siehe Kapitel 6.1). Biologische Proben (bspw. bestimmte Bereiche einer Zelle) müssen für die Fluoreszenzmikroskopie gewöhnlich mit einem Farbstoff gelabelt werden. Dieses Einfärben führt zu einer Veränderung der Zelle, welche dann nicht mehr in ihrem natürlichen (nativen) Zustand abgebildet werden kann. Durch die Erhöhung der Autofluoreszenz (auch Primärfluoreszenz genannt) einer Zelle bei tiefen Temperaturen kann diese in einem nativen Zustand mikroskopiert werden, da das zusätzliche Einfärben und Fixieren der Zelle entfällt. Mit Hilfe eines patentierten Probentransfersystems, zahlreichen Modifizierungen an dem bereits bestehenden Mikroskop-Aufbau und einer neuen innovativen Probenpräparation sowie der experimentellen Bestimmung eines tieftemperaturtauglichen Immersionsmediums gelang es erstmalig, die Auflösung gegenüber einem Luftobjektiv und ohne hochauflösende (Nahfeld-)Techniken deutlich zu erhöhen (siehe Kapitel 6). Zu den Auflösungsexperimenten bei tiefen Temperaturen wurden weitere auflösungsrelevante Experimente bei Raumtemperatur durchgeführt (siehe Kapitel 5.5). Dabei wurden zweiteilige Silicapartikel, hergestellt von der Arbeitsgruppe um Prof. Mayer der Universität Tübingen, mit Farbstoffen präpariert und konfokal detektiert. Da die Größe der Partikel im  $\mu\text{m}$ -Bereich und somit über der Auflösungsgrenze liegt, ließ sich eindeutig nachweisen, dass ein Teil dieser Partikel hohl (Farbstoffe auch in dem Partikel), der andere hingegen mit Glas gefüllt ist (Farbstoffe nur an der Oberfläche). Diese anisotrope Partikel könnten in Zukunft als Transporthilfe für Medikamente im menschlichen Organismus dienen. Dabei sind das hohe Oberflächenvolumen, große Poren und die nicht vorhandene Toxizität als Hauptvorteile zu nennen.



## 2 Gliederung

In diesem Kapitel wird der grundlegende Aufbau dieser Dissertation kompakt zusammengefasst. Das nachfolgende Grundlagenkapitel 3 stellt die in dieser Arbeit behandelten Wechselwirkungsphänomene zwischen Licht und Materie dar. Das Kapitel 3.1 zeigt die Streuung von Licht an Partikeln, gefolgt von Kapitel 3.2 in welchem die Absorption und Fluoreszenz von Quantenemittern diskutiert wird. Die Wechselwirkung von Licht bzw. eines Quantenemitters in einem Resonator wird in Kapitel 3.3 beschrieben, das Phänomen der Lichtbeugung bzw. die resultierende Auflösung in der Mikroskopie stellt Kapitel 3.4 dar.

Jedes der drei anschließenden Kapitel (4, 5, 6) beschreibt Experimente, welche sich den eben dargestellten Wechselwirkungsphänomenen des Lichts mit Materie widmen. Dabei beginnt jedes Kapitel mit einer Einleitung und Motivation der Experimente, gefolgt von einem ausführlichen und spezifischen Theorieteil. Neben der Probenpräparation werden die Messergebnisse, eine ausführliche Diskussion der Resultate sowie ein Ausblick, wie sich dieses Themenfeld in Zukunft entwickeln könnte, dargestellt.

Das Kapitel 4 stellt die vollständige Neuentwicklung eines Trübungssensors mit GRIN-Linsen als optische Hauptelemente dar. Nach einer allgemeinen Einführung in das Sensorsystem gliedert sich ein Grundlagenteil zum Thema GRIN-Optiken (Kapitel 4.1) an. Die weiteren Unterkapitel zeigen den experimentellen Aufbau (Kapitel 4.2), gefolgt von den erzielten Ergebnissen mit diesem Sensorsystem (Kapitel 4.3). Das Kapitel 4.4 beinhaltet die Diskussion der Ergebnisse mit abschließendem Ausblick (Kapitel 4.5).

Das darauf folgende Kapitel 5 beschreibt Experimente über die gezielte Modifizierung der optischen Eigenschaften eines einzelnen Farbstoffes (Kapitel 5.3) und eines Förster-

Resonanz-Energietransfer-Paares (Kapitel 5.4) mit Hilfe eines Fabry-Pérot-Resonators. Dazu werden zu Beginn des Kapitel 5 die theoretischen Grundlagen wie die konfokale Mikroskopie (Kapitel 5.1.1), die zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung (Kapitel 5.1.2) und der Förster-Resonanz-Energietransfer (Kapitel 5.1.3) behandelt. Darauf folgt eine ausführliche Darstellung des für diese Experimente verwendeten neu aufgebauten konfokalen Mikroskops (Kapitel 5.2). In einem weiteren Experiment mit diesem Aufbau wurden teilweise hohle Silicapartikel untersucht und optisch charakterisiert (Kapitel 5.5). Wie sich diese Themenfelder in Zukunft entwickeln könnten, zeigt abschließend Kapitel 5.6.

Das Kapitel 6 betrachtet Immersionsexperimente bei tiefen Temperaturen (160 K), welche durch eine spezielle Probenpräparation und die gezielte Weiterentwicklung eines bestehenden konfokalen Mikroskops ermöglicht wurden. Beginnend mit einer kurzen Einführung und Motivation der Mikroskopie bei tiefen Temperaturen (Kapitel 6) folgen die theoretischen Grundlagen bzw. die Vorteile von Experimenten bei kryogenen Bedingungen (Kapitel 6.1). Neben des experimentellen Aufbaus in Kapitel 6.2 wird darauffolgend die spezielle Probenpräparation (Kapitel 6.3) beschrieben. Das Kapitel 6.4 zeigt die Ergebnisse der Messungen auf, welche in Kapitel 6.5 diskutiert werden. Abschließend zeigt ein Ausblick (Kapitel 6.6), wie sich dieses Thema zukünftig entwickeln könnte.

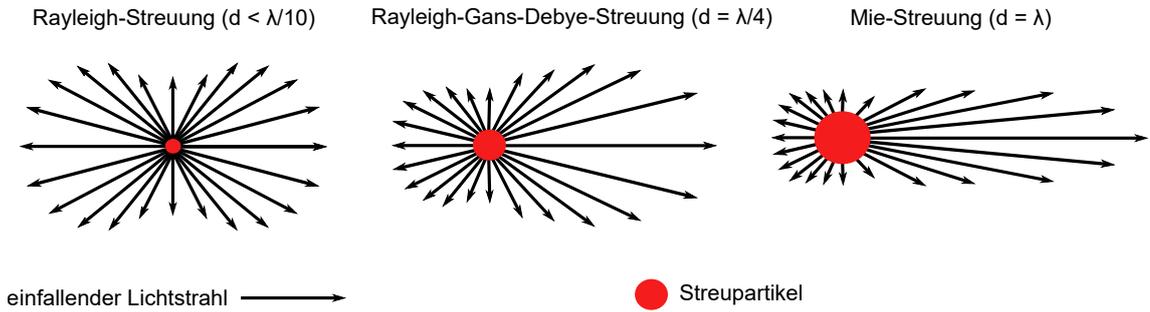
Kapitel 7 fasst den wissenschaftlichen Beitrag dieser Disstertation kompakt zusammen.

# 3 Grundlagen - Wechselwirkung Licht mit Materie

## 3.1 Lichtstreuung an Partikeln

Im Jahre 1908 entwickelte der deutsche Physiker Gustav Mie eine Streutheorie durch Lösen der Maxwell'schen Gleichungen innerhalb und außerhalb eines streuenden sphärischen Partikels beliebiger Größe [21]. Das eingestrahlte Licht regt dabei eine Vielzahl von Hertz'schen Dipolen im streuenden Partikel an, welche miteinander und mit dem einfallenden Lichtstrahl interferieren. Dieses charakteristische und winkelabhängige Streulicht kann als Interferenz der am Partikel gestreuten Welle verstanden werden. Einen Überblick bzw. genaue Herleitung kann folgenden Quellen entnommen werden [22–25].

Je nach Partikelform und -größe kann die Simulation der winkelabhängigen Streuintensität durch verschiedene Approximationen vereinfacht werden (siehe Abbildung 3.1). Die dabei am häufigsten verwendete Näherung ist die sogenannte Rayleigh-Theorie [26–30], welche für Partikel, deren Durchmesser kleiner als  $1/10$  der eingestrahnten Wellenlänge ist, angewendet werden kann [31]. Aufgrund der geringen Größe des Partikels regt das oszillierende elektromagnetische Feld des eingestrahnten Lichts im Streuzentrum des Partikels oder Moleküls nur einen Hertz'schen Dipol an. Daher erhalten wir als winkelabhängiges Streumuster denselben Verlauf wie die Abstrahlcharakteristik eines Hertz'schen Dipols. Aufgrund dieser Symmetrie um die Dipolachse ist die Wahrscheinlichkeit der Vorwärts- und Rückwärtsstreuung gleich, was als isotrope Streuung bezeichnet wird (siehe Abbildung 3.1 links). Diese Intensität  $I$  der winkelabhängigen ( $\theta$ ) Rayleigh-Streuung kann unter Berücksichtigung des Brechungsindex des Partikels  $n_p$  in einem Medium mit Bre-



**Abbildung 3.1:** Links: (isotrope) winkelabhängige Streulichtverteilung für die Rayleigh-Näherung bei Partikelgrößen kleiner  $\lambda/10$ . Mitte: Streulichtverteilung der Rayleigh-Gans-Debye-Näherung gültig für Partikelgrößen  $\lambda/10 < d < \lambda$ . Rechts: Streulichtverteilung bei Partikeln mit der Größenordnung der eingestrahlten Wellenlänge ( $d = \lambda$ ).

chungsindex  $n_m$  folgendermaßen dargestellt werden. Es gilt [6]:

$$I = I_0 \left( \frac{n_p}{n_m} - 1 \right)^2 \frac{NV^2}{\lambda^4 R^2} (1 + \cos^2 \theta), \quad (3.1)$$

wobei  $I_0$  die Intensität des einfallenden Strahls mit Wellenlänge  $\lambda$ ,  $N$  die Anzahl der Partikel,  $V$  das Volumen und  $R$  den Abstand von Streuzentrum zum Detektor darstellt. Mit dieser Gleichung (3.1) kann die Frequenzabhängigkeit der Intensität mit  $I \propto \lambda^{-4}$  gezeigt werden. Demzufolge werden hochfrequente Wellen deutlich stärker gestreut als niederfrequente. Mit dieser Frequenzabhängigkeit erklärte Lord Rayleigh im 19. Jahrhundert die Farbe des Himmels [29]. Für etwas größere Partikel als  $1/10 \lambda$  schwingen verschiedene Teile des Partikels mit verschiedenen Phasen, wodurch resultierende Interferenzen berücksichtigt werden müssen. Destruktive Interferenzen in Richtung der einfallenden Strahlung führen zu einer Zunahme der Vorwärtstreuung (siehe Abbildung 3.1 Mitte). Man spricht hier von der sogenannten Rayleigh-Gans-Debye-Näherung, bei welcher als Voraussetzung gilt [24, 31–33]:

$$d \frac{(n_p - n_m)}{n_m} < \frac{\lambda}{4\pi} \quad (3.2)$$

Im Größenbereich der Mie-Theorie ( $d \approx \lambda$ ) können Partikel aufgrund ihrer Größe nicht mehr als einzelne Streuzentren angesehen werden, sondern entsprechen mehreren Streuzentren.

ten, deren Streulicht miteinander interferiert (siehe Abbildung 3.1 rechts). Im Falle der Mie-Streuung erfolgt eine Anregung vieler kohärenter Elementarwellen im Streupartikel. Dabei ist die Mie-Strahlung kaum frequenzabhängig, wodurch Wolken (Streuung von Sonnenlicht an Wassertropfen) weiß erscheinen.

Die Streuintensität ist abhängig von dem Streuwinkel  $\theta$ , der Partikelgröße  $d$  und von den beiden Brechungsindices  $n_p$  und  $n_m$ . Für  $d \gg \lambda$  ist die Streutheorie identisch zur Fernfeldnäherung zur Beugung von Licht an einem Spalt, beschrieben durch die Theorie von Fresnel-Kirchhoff. Daher bezeichnet man diesen Bereich als Fraunhofer-Beugung, indem die Vorwärtsstreuung deutlich überwiegt. Es gilt für Partikel [33]:

$$d \frac{(n_p - n_m)}{n_m} > 5\lambda, \quad (3.3)$$

Der physikalische Effekt der Lichtstreuung wird in Bezug auf Flüssigkeiten als Trübung wahrgenommen. Die Trübung beschreibt dabei die Reduktion der Transparenz einer flüssigen Probe durch die Streuung von Licht an ungelösten Partikeln. Dabei ist für die Intensität der Streuung besonders die Konzentration, die Form und Größe der Partikel sowie die Wellenlänge des eingestrahnten Lichts zu beachten [6]. Werden mehrere Partikel detektiert, steigt die Streustrahlung in gewissen Bereichen linear an, wodurch die detektierte Streuintensität Rückschlüsse auf die Konzentration der Partikel zulässt. Um die Trübung messen zu können, haben sich drei verschiedene Verfahren etabliert [6, 34, 35]. Alle Messsysteme bestehen dabei aus den selben Grundkomponenten. Als Beleuchtung der Probe kommen Laser bzw. LED-Quellen zum Einsatz, verschiedene Lichtdetektoren (in bestimmter Orientierung zur Beleuchtung) mit entsprechender Auswertelektronik detektieren das gestreute Licht. Zwischen der Beleuchtung und Detektion befindet sich die Messkammer bzw. Probenkammer. Ein möglicher Aufbau um besonders trübe Proben zu charakterisieren ist der Turbidimeter. Dabei wird die Transmission bzw. die Vorwärtstreuung ( $0^\circ$ ) der Probe gemessen. Der Nephelometer hingegen detektiert das Streulicht ausschließlich in  $90^\circ$  zur Anregung und weist daher eine hohe Sensitivität besonders für kleine Partikel bei geringer Trübung auf. Die dritte Möglichkeit ist eine Kombination und Erweiterung aus beiden Methoden, die sogenannte Ratio-Methode. Dabei werden bis zu fünf Winkel (Rückwärtsstreuung z.B.  $120^\circ$ ,  $90^\circ$ , Vorwärtsstreuung  $0^\circ$  und  $60^\circ$ ) simultan detektiert und mittels Algorithmus ausgewertet. Dadurch kann sehr genau in einem großen Trübungsbereich gemessen werden.

## 3.2 Absorption und Fluoreszenz

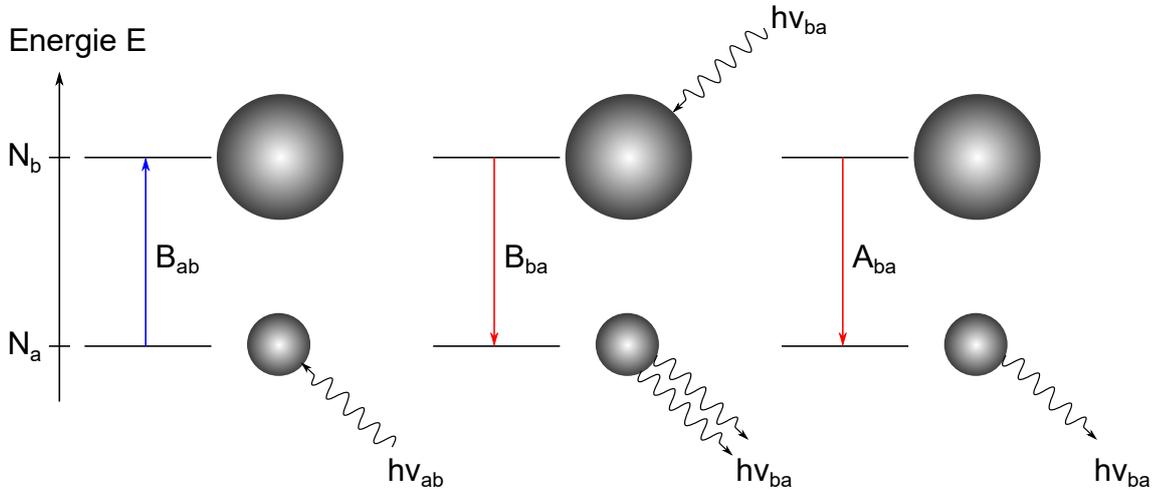
Damit ein Molekül Licht in Form von Fluoreszenz emittieren kann, muss dieses zuvor elektronisch angeregt werden, was meist durch Absorption eines Photons geschieht. Die absorbierte Energie des Photons ( $E_{\text{Photon}} = h\nu$ ) muss dabei der Energiedifferenz der Zustände ( $E_b - E_a \approx h\nu$ ) entsprechen zwischen denen der Übergang stattfinden soll [1, 36–40]. Zudem erfordert die Anregbarkeit eines Übergangs zwischen zwei Zuständen die Ausbildung eines Dipolmoments des Moleküls, welches mit dem elektromagnetischen Strahlungsfeld wechselwirken kann. Dieses Moment wird als Übergangsdipolmoment  $\vec{\mu}_{ab}$  bezeichnet und ist definiert als

$$\vec{\mu}_{ab} = \int \Psi_a^* \hat{\mu} \Psi_b d\tau = \langle a | \hat{\mu} | b \rangle, \quad (3.4)$$

wobei,  $\Psi_b$  und  $\Psi_a$  die Wellenfunktionen der elektronischen Zustände  $a$  und  $b$  und  $\hat{\mu}$  den Operator des Dipolmoments beschreibt [1, 37, 38, 40]. Dabei sind Übergänge zwischen zwei Niveaus erlaubt, wenn das Übergangsdipolmoment ungleich null ist. So ist beispielsweise ein Übergang eines Elektrons aus einem 1s- in ein 2s-Orbital verboten, da sich hierbei kein Dipolmoment ausbilden kann. Die Wechselwirkung von Photonen mit einem Molekül bzw. die Wahrscheinlichkeit dafür wurde im Jahre 1916 und 1917 von Einstein in einer Theorie zum dynamischen Gleichgewicht eines Stoffes, welcher von elektromagnetischer Strahlung umgeben ist, zusammengefasst [41, 42]. Er beschreibt dabei die Absorption sowie die Emission eines Photons durch den Vorgang der spontanen und induzierten Emission (siehe Abbildung 3.2) [1, 36–38, 40]. Die Wahrscheinlichkeit eines Übergangs bzw. einer Absorption und Emission von Photonen kann über die Einsteinkoeffizienten ( $B_{ab}$ ,  $B_{ba}$ ,  $A_{ba}$ ) ausgedrückt werden [1, 37, 38, 40]:

$$\frac{dW_{ab}}{dt} = B_{ab} \cdot \rho(\nu), \quad (3.5)$$

wobei  $\frac{dW_{ab}}{dt}$  die Wahrscheinlichkeit, dass ein Molekül (im Mittel im Zeitintervall  $dt$ ) ein Photon absorbiert,  $B_{ab}$  den Einsteinkoeffizient der Absorption und  $\rho(\nu)$  die Strahlungsdichte abhängig von der Frequenz  $\nu$  angibt. Die Proportionalitätskonstante  $B_{ab}$  ist ein Parameter, welcher die Wahrscheinlichkeit eines Übergangs beschreibt. Bei großen Werten der Konstante  $B_{ab}$  induziert die einfallende Strahlung sehr viele Übergänge; die Probe



**Abbildung 3.2:** Schematische Darstellung der Energieübergänge der Niveaus  $N_a$  und  $N_b$  mit induzierter Absorption (links), stimulierter Emission (mitte) und spontaner Emission (rechts).  $B_{ab}$  beschreibt den Einsteinkoeffizienten für die Absorption,  $B_{ba}$  für die induzierte Emission und  $A_{ba}$  für die spontane Emission. Die Darstellung der Kerne samt Elektronenwolke stellt die Unordnung und Vergrößerung der Kern-Kern-Abstände sowie Elektronenwolke im angeregten Zustand dar.

ist stark absorbierend. Zudem ist die Wahrscheinlichkeit der Absorption proportional zur Strahlungsdichte im Frequenzbereich des Übergangs. Diese absorbierte Strahlung kann dann in Form von spontaner oder induzierter Emission wieder abgegeben werden. Analog zur Wahrscheinlichkeit der Absorption beschreibt die Multiplikation des Einsteinkoeffizienten  $B_{ba}$  mit der Strahlungsdichte  $\rho(\nu)$  die Wahrscheinlichkeit ( $\frac{dW_{ba}}{dt}$ ), dass ein Molekül ein Photon (im Mittel im Zeitintervall  $dt$ ) induziert emittiert. Es gilt [1, 36–38, 40]:

$$\frac{dW_{ba}}{dt} = B_{ba} \cdot \rho(\nu). \quad (3.6)$$

Die Wahrscheinlichkeit einer spontanen Emission wird durch den Einsteinkoeffizient  $A_{ba}$  dargestellt und ist unabhängig von der Strahlungsdichte:

$$\frac{dW_{ba}}{dt} = A_{ba} \quad (3.7)$$

Quantenmechanisch ist der Einsteinkoeffizient  $B_{ab}$  definiert als [43]:

$$B_{ab} = \frac{2\pi}{3\hbar^2} |\langle \Psi_a | \hat{\mu} | \Psi_b \rangle|^2, \quad (3.8)$$

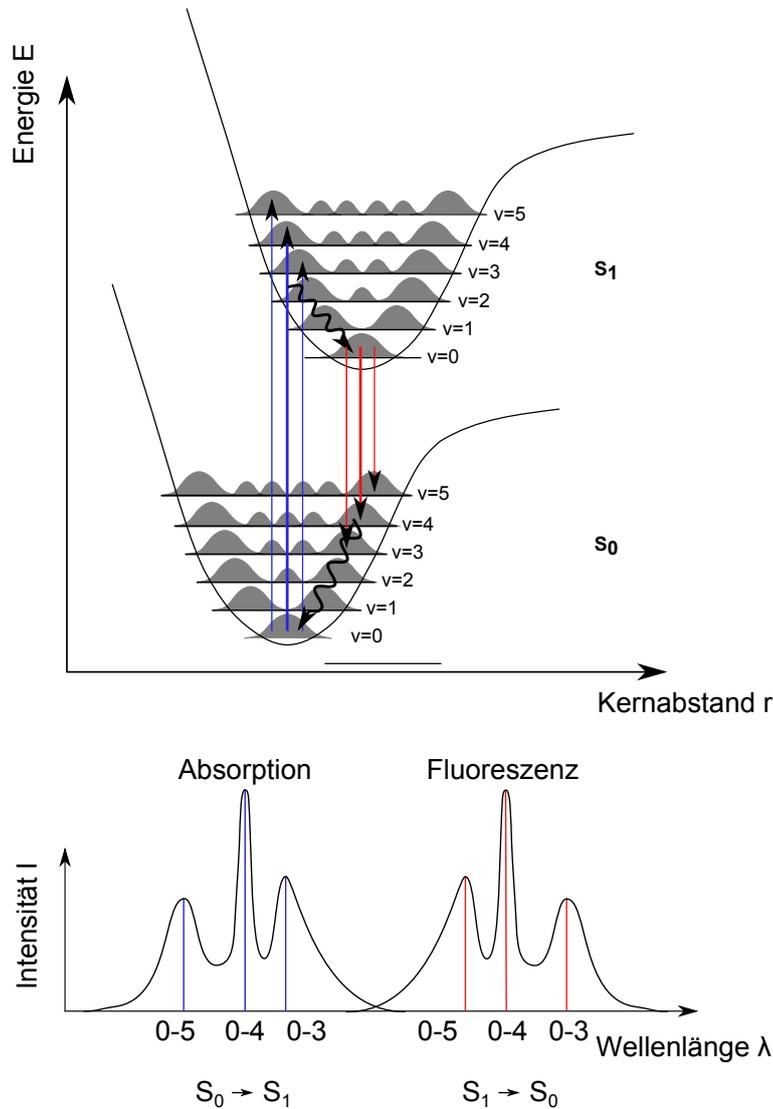
wobei  $\hbar = \frac{h}{2\pi}$  dem reduzierten Planckschen Wirkungsquantum entspricht. Abschließend lässt sich feststellen: Je höher der Wert des Übergangsdipolmoments, desto stärker ist die Wechselwirkung mit der Strahlung. Dabei beschreiben beide Einsteinkoeffizienten die Wahrscheinlichkeit eines Übergangs, welche proportional zum Betragsquadrat des Übergangsdipolmoments ist. Durch die Absorption eines Photons kann ein Molekül sowohl elektronisch als auch vibronisch angeregt werden. Aufgrund des Massenunterschieds zwischen den Elektronen und Kernen der Moleküle lässt sich gemäß der Born-Oppenheimer-Näherung die Wellenfunktion in ein Produkt aus elektronischer Wellenfunktion  $\Psi_{el}$  und Kernwellenfunktion  $\Psi_N$  aufspalten. Es gilt [40]:

$$\Psi = \Psi_{el} \cdot \Psi_N = \phi(r, R) \cdot \lambda(R), \quad (3.9)$$

wobei  $\phi$  die elektronischen Zustände in Abhängigkeit der Kernorte  $R$  und Positionen der Elektronen  $r$  sowie  $\lambda$  die Wellenfunktion des molekularen Kerngerüsts beschreibt. Absorbiert ein Molekül ein Photon, ist die Bewegung der Kerne aufgrund der deutlich größeren Masse und der daraus resultierenden Trägheit gegenüber der Elektronen vernachlässigbar. Daher ist das Übergangsdipolmoment in erster Näherung von der Kernbewegung unabhängig. Veranschaulicht wird dieser Sachverhalt in Abbildung 3.3, dem sogenannten Franck-Condon-Prinzip [1, 37–40]. Dargestellt werden hier der Grundzustand  $S_0$  und der angeregte Zustand  $S_1$ , welcher aufgrund der schwächeren Kernbindung durch die Anregung zu einem höheren Kernabstand verschoben ist. Nach der Born-Oppenheimer-Näherung ändert sich die Kernanordnung während eines Übergangs nicht und wird daher im Franck-Condon-Diagramm als senkrechte Linie dargestellt [37, 38, 40]. Der Franck-Condon-Faktor  $q_{\nu_b, \nu_a}$  beschreibt die Übergangswahrscheinlichkeit zwischen dem Grund- und angeregten Zustand [40]:

$$q_{\nu_b, \nu_a} = \left| \int \Psi_{vib}(\nu_b) \Psi_{vib}(\nu_a) dR \right|^2, \quad (3.10)$$

wobei  $\nu_a$  und  $\nu_b$  die Schwingungsniveaus der elektronischen Zustände und  $\Psi_{vib}$  die Wellenfunktion der Schwingungen darstellt. Die maximale Übergangswahrscheinlichkeit liegt

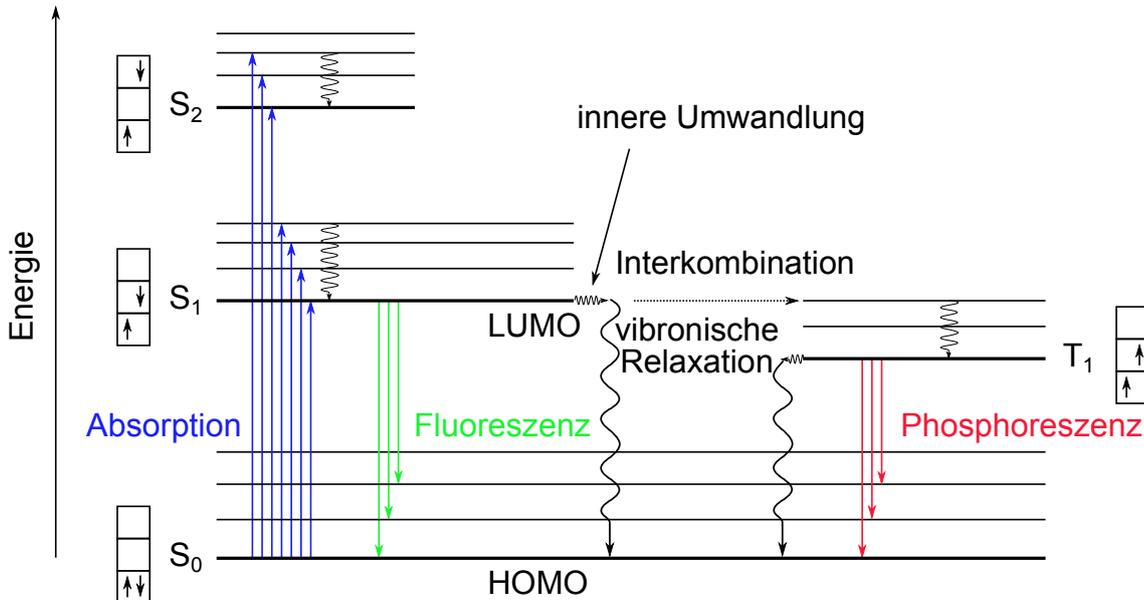


**Abbildung 3.3:** Franck-Condon-Prinzip anhand eines zweiatomigen Moleküls mit Energie  $E$  und Kernabstand  $r$ . Es sind die Potentialkurven des Grundzustandes  $S_0$  und des ersten angeregten Zustand  $S_1$  mit den Aufenthaltswahrscheinlichkeiten eines Kerns (Wellenfunktionen im Quadrat ( $\Phi^2$ )) dargestellt. Die blauen Pfeile zeigen die Absorption, die roten die Fluoreszenz, wobei der jeweils mittlere Pfeil die höchste Wahrscheinlichkeit liefert. Die welligen Pfeile zeigen strahlungslose Prozesse. Das Spektrum (unten) beschreibt die spiegelbildliche Anordnung von Emissions- und Absorptionsspektrum.

vor, wenn bei einem senkrechten Übergang beide beteiligten Wellenfunktionen jeweils ein Maximum aufweisen. Durch die größere Bindungslänge des Moleküls im angeregten Zustand ist die Überlappung mit dem vibronischen Grundzustand des angeregten Zustandes eher gering. Beim Gleichgewichtsabstand des Moleküls im Grundzustand ist die Wahrscheinlichkeitsdichte  $\Psi^2$  im vibronischen Grundzustand am höchsten, weswegen die Anregung aus dem elektronischen Grundzustand mit größter Wahrscheinlichkeit aus diesem vibronischen Grundzustand erfolgt (ohne Berücksichtigung des Boltzmann-Faktors). Quantenmechanisch und nach erster störungstheoretischer Näherung [44] kann die Fluoreszenz als spontane Emission von Photonen dargestellt werden. Die Übergangsrate für ein Zwei-Niveau-System ist dann nach Fermis Goldener Regel [45]:

$$\Gamma_{spE} = \frac{2\pi}{\hbar^2} |\langle \mu \cdot E \rangle|^2 \rho(\omega) \quad (3.11)$$

wobei  $\Gamma_{spE}$  die spontane Emissionsrate,  $\mu \cdot E$  die Störung zwischen Grund- und angeregtem Zustand durch die Wechselwirkung des Dipoloperators  $\mu$  mit dem elektrischen Feld  $E$ ,  $\rho(\omega)$  die räumliche und energetische optische Modendichte und  $\omega$  die Kreisfrequenz des Lichts der Mode darstellt. Für die Eigenschaften der Fluoreszenz, wie beispielsweise deren Lebensdauer, ist die elektromagnetische Umgebung ( $\rho(\omega)$ ) entscheidend. Diese lässt sich z.B. durch einen Fabry-Pérot-Resonator gezielt modulieren. Vereinfacht werden Prozesse rund um die Absorption und Emission von Licht anhand eines Jablonski-Termschemas beschrieben (Abbildung 3.4) [36, 39, 46]. Wird ein Molekül z.B. mit einem Laser angeregt bzw. absorbiert ein Molekül ein Photon, befindet sich dieses im angeregten Zustand des elektronischen Niveaus  $S_1$  oder  $S_2$ . Danach relaxieren Moleküle in kondensierter Phase (Flüssigkeiten und Feststoffe) durch den Verlust der Rotations- und Schwingungsenergie innerhalb  $10^{-12}$  s in den untersten vibronischen Zustand des  $S_1$ -Niveaus. Dieser Prozess ist in Abbildung 3.4 jeweils als Welle gezeichnet und wird als vibronische Relaxation bezeichnet. Aufgrund der deutlich langsameren Photoemission ( $10^{-8}$  s) findet die Fluoreszenz nach Kasha's Regel überwiegend aus dem vibronischen Grundzustand des angeregten  $S_1$ -Niveaus statt und ist somit unabhängig von der Energie bzw. Wellenlänge der Anregung [47]. Durch die vorangegangene vibronische Relaxation ist die Energie des emittierten Photons geringer als die Energie des absorbierten Photons, d.h. die Wellenlänge des absorbierten Photons ist kürzer als die der Emission. Diesen Effekt entdeckte Sir G. G. Stokes im Jahre 1852, weshalb man hier von der sogenannten Stokes-Shift spricht [48]. Dadurch lassen sich in modernen Fluoreszenzexperimenten die anregenden Lichtstrahlen



**Abbildung 3.4:** Jablonski-Termschema mit möglichen Übergängen eines organischen Farbstoffmoleküls.  $S_0$  beschreibt den elektronischen sowie vibronischen Grundzustand und  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $T_1$  und  $T_2$  die angeregten (Singulett und Triplett) Zustände. Die Linien zwischen den elektronischen Zuständen beschreiben vibronische Zwischenniveaus. Nach Anregung des Moleküls folgt nach rascher Relaxation in den tiefsten vibronischen Zustand des ersten elektronisch angeregten Zustands  $S_1$  die Emission eines Fluoreszenzphotons. Nach Interkombination (inter system crossing) unter Spinumkehr in ein vibronisches Niveau des Triplettzustandes  $T_1$  erfolgt Phosphoreszenz zu dem elektronischen Grundzustand  $S_0$ .

sehr leicht mittels Langpassfilter von der Fluoreszenz optisch separieren. Eine weitere Möglichkeit, die absorbierte Energie wieder zu emittieren, stellt die Phosphoreszenz dar. Hierfür wird das Elektron im Zustand  $S_1$  per Interkombination in einen vibronisch angeregten Triplett-Zustand per Spinumkehr geführt. Dieser Vorgang ist aufgrund der beiden Zustände mit unterschiedlicher Multiplizität verboten und daher sehr unwahrscheinlich. Die Kombination aus einer Wechselwirkung zwischen dem magnetischen Moment des Spins und der Spin-Bahnkopplung (jj-Kopplung) des zugehörigen Orbitals, welche bei Atomen mit hohen Ordnungszahlen eine Rolle spielen, ermöglichen diesen Übergang. Der strahlende Übergang von  $T_1$  nach  $S_0$  wird Phosphoreszenz genannt und ist ebenfalls aufgrund der Spinumkehr verboten bzw. sehr unwahrscheinlich. Dieser Sachverhalt ist für das Nachleuchten (bis zu Stunden) verantwortlich. Die Phosphoreszenz bzw. das Verweilen des angeregten Elektrons im Triplett-Zustand führt zum Blinken bei Einzelmolekülexperimenten. Aufgrund der durchgeführten Fluoreszenzexperimente wollen wir uns auf die Fluoreszenz im weiteren Verlauf beschränken. Wichtige Parameter in Bezug auf die Fluoreszenz von z.B. Farbstoffen sind die Fluoreszenz-Lebensdauer und -Quantenausbeute. Mathematisch kann die Fluoreszenz-Quantenausbeute  $Q$  folgendermaßen ausgedrückt werden [39]:

$$Q = \frac{k_{str}}{k_{str} + k_{nstr}}, \quad (3.12)$$

wobei  $k_{str}$  die strahlende Rate und  $k_{nstr}$  die nicht-strahlende Rate beschreibt. Dabei erzielen Farbstoffe wie beispielsweise Rhodamin 6G eine Quantenausbeute von nahezu 1 (0,95) [49]. Konkurrenzprozesse zu den strahlenden Übergängen sind Energietransfers zu einem anderen Molekül (z.B. FRET, siehe Kapitel 5.2) oder die Abgabe der Energie in Form von Wärme an die Umgebung. Die Lebensdauer eines Moleküls bzw. des angeregten Zustandes ist als die mittlere Zeit definiert, in der das angeregte Elektron in diesem Zustand verweilt bis es zum Grundzustand relaxiert. Formal ist die Lebensdauer definiert als reziproker Wert aus der Summe der möglichen Zerfallsraten [39]:

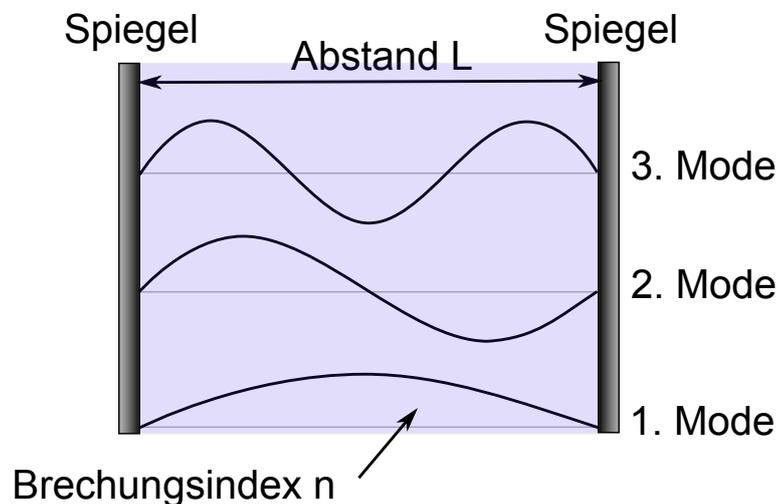
$$\tau = \frac{1}{k_{str} + k_{nstr}}. \quad (3.13)$$

Dabei gibt die mittlere Lebensdauer  $\tau$  das Zeitintervall an, in welchem noch ca. 37% ( $\frac{1}{e}$ ) im angeregten Zustand vorzufinden und bereits ca. 63 % in den Grundzustand relaxiert sind [39]. Eine für Moleküle typische Größenordnung der Lebensdauer  $\tau$  sind dabei mehrere Nanosekunden. Die Fluoreszenzquantenausbeute eines Farbstoffs kann durch

unterschiedliche Fluoreszenzlöschungsprozesse (englisch quenching) abgeschwächt werden. Dabei wird entweder der angeregte Zustand strahlungslos in den Grundzustand überführt oder die Anregung in den angeregten Zustand verhindert. Bei einem Zusammenstoß eines angeregten Moleküls mit z.B. Lösungsmittelmolekülen oder  $O_2$  kann die Energie auf das Quenchemolekül übertragen werden. Die Energie wird in diesem Fall durch Stöße übertragen und führt zu einer verminderten Fluoreszenzausbeute. So kann mit einer schützenden PVA-Schicht die Reaktion des Luftsauerstoffs mit der Probe reduziert und die Quantenausbeute erhöht werden.

### 3.3 Mikro-Resonator

In Kapitel 3.2 konnte mittels Fermis Goldener Regel (Gleichung 3.11) gezeigt werden, dass die Eigenschaften von Quantenemittern (z.B. Fluoreszenz) von der elektromagnetischen Umgebung ( $\rho(\omega)$ ), der sogenannten lokalen optischen Modendichte (englisch: local density of optical states, LDOS), abhängig sind. Diese lokale optische Modendichte kann mit Hilfe von (Micro-)Resonatoren gezielt verändert werden [15, 50, 51]. Im Jahre 1899 entwickelten



**Abbildung 3.5:** Geometrie eines Fabry-Pérot-Resonators mit zwei plan-parallelen Spiegeln im Abstand  $L$  mit Medium  $n$ . Dargestellt sind zudem die ersten drei longitudinalen Moden des Resonators.

Charles Fabry und Alfred Pérot das sogenannte Fabry-Pérot-Interferometer, welches die einfachste Form eines Resonators darstellt (siehe Abbildung 3.5) [52]. Dieser besteht aus zwei plan-parallelen und reflektierenden Oberflächen (Spiegeln) im Abstand  $L$ . Zwischen den Spiegeln befindet sich ein Medium mit Brechungsindex  $n$ . Das in einen Resonator eingekoppelte Licht wird zwischen zwei plan-parallelen Spiegeln hin- und herreflektiert. Ein stabiles Lichtfeld kann sich dabei im Resonator nur dann ausbilden, wenn die reflektierenden Wellen bei jedem Umlauf phasenrichtig, d.h. konstruktiv interferieren und dabei stehende Wellen ausbilden. Die entstehende räumliche Verteilung der elektrischen Feldstärke wird Schwingungsformen oder Moden des Resonators genannt (siehe Abbildung 3.5). Um diese Moden ausbilden zu können, muss folgende Resonanzbedingung erfüllt sein (ohne Berücksichtigung von Phasensprüngen bei Reflexion)<sup>1</sup> [55]:

$$nL = m \frac{\lambda_m}{2}, \quad (3.14)$$

wobei  $m$  eine natürliche Zahl und  $\lambda$  die Wellenlänge des eingestrahlichten Lichts darstellt. Dabei kann jeder longitudinalen Mode eine Frequenz zugeordnet werden und Gleichung 3.14 umgestellt werden zu [55]:

$$f_m = m \frac{c}{2nL}, \quad (3.15)$$

wobei  $c$  die Lichtgeschwindigkeit und  $f_m$  die Frequenz darstellt. Zudem weist jede Mode eine Frequenzbreite  $\Delta f_m$  auf. Der Quotient aus der Frequenz und der Frequenzbreite  $\Delta f_m$  entspricht dem sogenannten Gütefaktor (Q-Faktor), es gilt:

$$Q = \frac{f_m}{\Delta f_m}. \quad (3.16)$$

Dieser Gütefaktor  $Q$  beschreibt die Dämpfung bzw. den Energieverlust eines Resonators, wobei ein hoher Q-Faktor einer geringen Dämpfung entspricht.

Befindet sich innerhalb eines Resonators ein Quantenemitter, kann dieser mit dem EM-Feld im Resonator wechselwirken. Dazu muss die Frequenz des Quantenemitters (hauptsächlich abhängig von dessen Struktur) einer oder mehreren Resonatormoden (abhängig vom Spiegelabstand und Brechungsindex innerhalb des Resonators, vgl. Gleichung 3.14 und 3.15) entsprechen. Die resultierende Stärke der Kopplung zwischen Molekül und Resonator ist dabei von der Photonenzerrfallsrate  $\kappa$  des Resonators, der nicht resonanten Zerfallsrate

---

<sup>1</sup>Eine genaue Betrachtung der Resonanzbedingung mit Phasensprüngen an den reflektierenden Schichten kann den Quellen [53, 54] entnommen werden.

$\gamma$  des Quantenemitters und dem Molekül-Photon-Parameter (Kopplungsparameter)  $g_0$  abhängig (siehe Abbildung 3.6) [50].

Die Photonenzerfallsrate  $\kappa$  des Resonators beschreibt den Verlust (z.B. durch Absorptionsprozesse) bzw. den Austritt von Photonen aus dem Resonator. Dieser Parameter kann über den Q-Faktor des Resonators quantifiziert werden. Es gilt [50]:

$$\kappa \equiv \Delta f_m = \frac{1}{\tau_{resonator}} \quad (3.17)$$

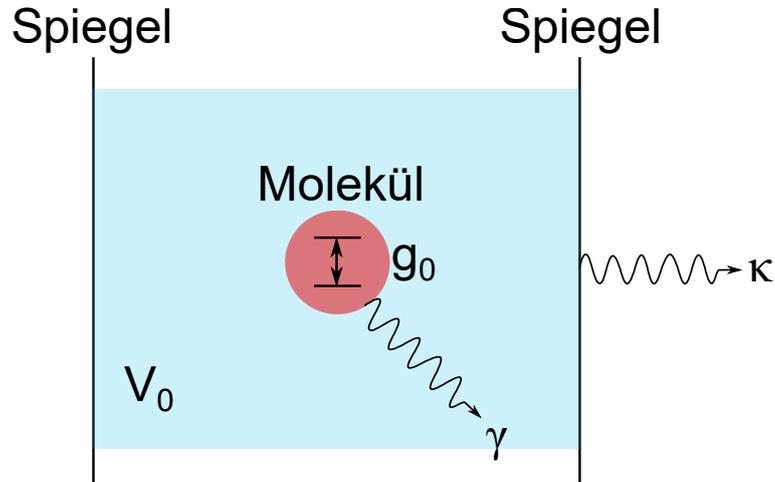
und

$$\kappa = \frac{f_m}{Q}, \quad (3.18)$$

wobei  $\tau_{resonator}$  der Photonen-Lebensdauer im Resonator entspricht. Dies bedeutet, dass die Breite der resonanten Moden eines Resonators von der Photonenzerfallsrate des Resonators abhängig ist, ähnlich wie die Breite der Emission eines Quantenemitters von dessen Rate. Der zweite Parameter ist die nicht resonante Zerfallsrate  $\gamma$  des Quantenemitters, beispielsweise das Emittieren eines Photons mit anderer Frequenz. Der dritte Parameter ist der sogenannte Molekül-Photon-Koppelparameter  $g_0$ , welcher die Stärke der Wechselwirkung zwischen Quantenemitter und Resonator angibt. Dieser ist abhängig vom Dipolmoment  $\mu_{12}$ , der Frequenz der Resonatormode  $f_m$  und dem modalen Volumen  $V$  sowie  $\epsilon$  der Permittivität des Vakuums. Es gilt [50]:

$$g_0 = \sqrt{\left(\frac{\mu_{12}^2 f_m}{2\epsilon \hbar^2 V}\right)}. \quad (3.19)$$

Ist bei einer Kopplung zwischen Quantenemitter und Resonatormode der Kopplungsparameter  $g_0 \gg (\kappa, \gamma)$ , sprechen wir von starker Kopplung zwischen Molekül und Resonator. Dabei ist die Molekül-Photon-Wechselwirkung (Quantenemitter und Resonator) schneller als der irreversible Prozess des Verlustes eines Photons aus einer Resonator-Mode. Dadurch wird die Emission eines Photons zu einem reversiblen Prozess, indem das Photon von dem Atom mehrmals reabsorbiert wird. Dieser Prozess der starken Kopplung setzt das Einsetzen von Resonatoren mit hohem Q-Faktor voraus (siehe Gleichung 3.18). Für den Fall das  $g_0 \ll (\kappa, \gamma)$  ist, sprechen wir von schwacher Kopplung. Realisierbar ist diese schwache Kopplung mit Fabry-Pérot-Resonatoren mit Q-Faktoren in einem Bereich von 50 [53, 56, 57]. Hierbei ist die Emission eines Photons durch den Emittier ein irrevesibler Prozess, ähnlich der spontanen Emission im freien Raum, allerdings mit veränderter



**Abbildung 3.6:** Modell eines Zwei-Niveau-Moleküls in einem Resonator mit dem Modenvolumen  $V_0$  nach [50]. Dabei beschreiben die Parameter  $\kappa$  die Photonenerfallsrate des Resonators,  $\gamma$  die nicht resonante Zerfallsrate des Atoms,  $g_0$  die Atom-Photon-Kopplung und somit die Stärke der Quantenemitter-Resonator-Kopplung.

Emissionsrate. Diesen nach ihm benannten (Purcell-)Effekt entdeckte Edward Mills Purcell im Jahre 1946 [15, 58]. Quantifiziert werden kann dieser Effekt durch Fermis Goldene Regel, nach der die Übergangrate der spontanen Emission  $\Gamma$  von der optischen Zustandsdichte  $\rho(E_f)$  des elektromagnetischen Feldes abhängig ist (vgl. Gleichung 3.11). Diese optische Zustandsdichte  $\rho(\omega) = \frac{\omega^2 V_0}{\pi^2 c^3}$  verändert sich durch den Resonator zu [50]:

$$\rho(\omega) = \frac{2Q}{\pi\omega}. \quad (3.20)$$

Daher folgt für den Purcell-Faktor  $F_P$  [50]:

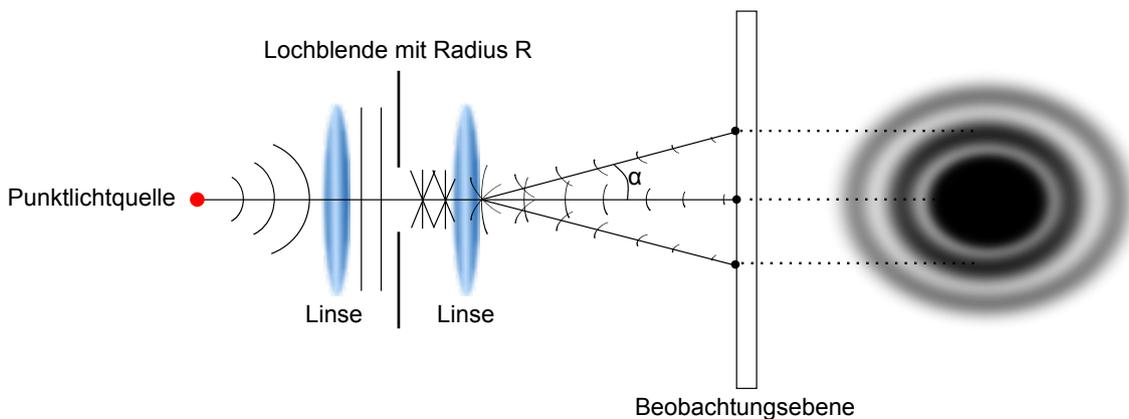
$$F_P = \frac{\Gamma_{resonator}}{\Gamma_{spE}} = \frac{3Q\left(\frac{\lambda}{n}\right)^3}{4\pi^2 V_0}. \quad (3.21)$$

Dabei beschreibt ein Purcell-Faktor  $> 1$  eine Erhöhung der spontanen Emission gegenüber dem freien Raum (Resonanz zwischen Quantenemitter und Resonator) durch die Erhöhung der optischen Zustandsdichte im Resonator [15, 51, 58]. Durch diesen Effekt ist eine maximale Erhöhung der Emission um den Faktor 3 möglich [59]. Bei einem Purcell-Faktor  $< 1$  wird die Emission unterdrückt (keine Resonanz zwischen Quantenemitter und

Resonator), da keine oder weniger resonante Moden vorliegen, in die der Quantenemitter emittieren kann [60]. Zusätzlich können Emissionsspektren von Quantenemittern durch die Verstärkung oder Unterdrückung von vibronischen Übergängen gezielt verändert werden [61, 62]. Durch Variation des Spiegelabstandes lässt sich das Emissionsspektrum auch reversibel variieren [63].

### 3.4 Auflösung und Beugung

Verwendet man zur Beschreibung der Auflösung eines Mikroskops die Näherung der geometrischen Optik, könnte ein minimal kleiner Objektpunkt einen ebenso kleinen Bildpunkt erzeugen. Dadurch wäre die Auflösung maximal und jeder noch so geringe Abstand zwischen zwei Strukturen könnte aufgelöst werden. Berücksichtigt man allerdings die realen wellenoptischen Eigenschaften wie Interferenz und Beugung von Elementarwellen, entstehen nach einer Blende bzw. Apertur (im Objektiv) in der Beobachtungsebene sogenannte Beugungsscheibchen (Airy-Scheibchen, siehe Abbildung 3.7) [1, 55, 64]. Daher



**Abbildung 3.7:** Entstehung der Beugung. Eine selbstleuchtende Punktlichtquelle wird durch ein Linsensystem (mit Lochblende) abgebildet. Man erhält in der Beobachtungsebene die typische Intensitätsverteilung.

wird ein minimal kleiner Objektpunkt auch bei idealer Abbildung nicht als ebenso kleiner Bildpunkt sondern mittels Airy-Verteilung mit endlichem Durchmesser dargestellt. Somit können Strukturen mit kleinerem Durchmesser als das Beugungsscheibchen nicht mehr

aufgelöst werden. Man spricht daher von beugungsbegrenzter Auflösung. Ursache für das Phänomen der Beugung ist nach dem Fresnel-Huygens-Prinzip, dass jeder Punkt einer primären Wellenfront Ausgangspunkt von Sekundärwellen ist, welche sich in der Blendenöffnung mit den Elementarwellen zur Beugungsverteilung  $I(\theta)$  überlagern (siehe Abbildung 3.7) [1, 64]. Die Beugungsverteilung  $I(\theta)$  ist dabei von dem Verhältnis des Aperturdurchmessers  $R$  zu der eingestrahlten Wellenlänge  $\lambda$  abhängig. Es gilt [64]:

$$I(\theta) = I_0 \left[ \frac{2J_1(x)}{x} \right]^2, \quad (3.22)$$

mit

$$x = \frac{2\pi R}{\lambda} \cdot \sin \theta, \quad (3.23)$$

wobei  $J_1(x)$  die Besselfunktion 1. Art darstellt,  $I_0$  die ursprüngliche Intensität des Senders und  $\theta$  den Beobachtungswinkel beschreibt. Unter Berücksichtigung der Beugung versteht man unter der Auflösung eines Mikroskops den minimalen Abstand zweier Strukturen (besser: Punktlichtquellen), damit sie noch als zwei getrennte lichtemittierende Quellen wahrgenommen werden können.

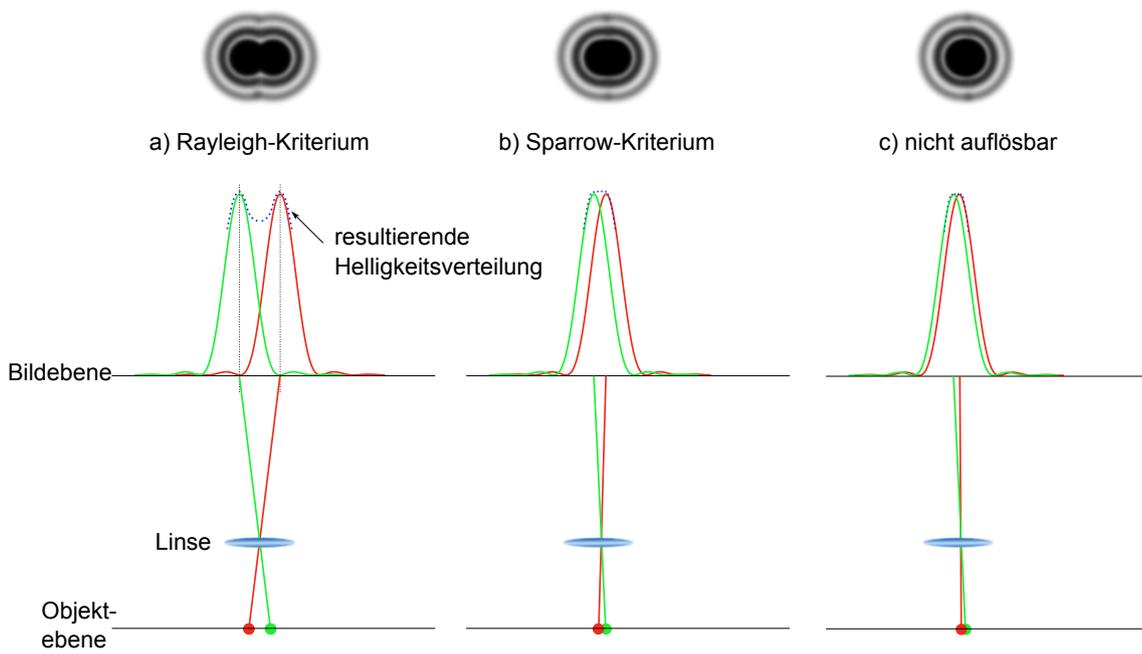
Der englische Physiker Rayleigh entwickelte Ende des 19. Jahrhunderts das sogenannte Rayleigh-Kriterium. Dabei gelten zwei dicht nebeneinander liegende Punktlichtquellen gleicher Wellenlänge, wie beispielsweise ein fluoreszierender Farbstoff, gerade als aufgelöst, wenn das Maximum der Intensität des ersten Beugungsscheibchens im Intensitätsminimum der zweiten Struktur bzw. dessen Beugungsscheibchen liegt. Dabei folgt als Auflösung nach Rayleigh [1, 28, 29]:

$$d = \frac{0,61\lambda}{NA}, \quad (3.24)$$

wobei  $d$  den Mindestabstand, dass zwei Punkte noch als getrennt aufgelöst werden können, und  $NA$  die numerische Apertur des Objektivs darstellt. Sparrow hingegen postulierte, dass zwei Punkte auch noch auflösbar sind, wenn die Intensität zwischen ihnen genau der Helligkeit der Punkte entspricht. Es folgt die Gleichung [1, 65]:

$$d = \frac{0,47\lambda}{NA}. \quad (3.25)$$

Ein Vergleich der beiden Auflösungskriterien ist in Abbildung 3.9 dargestellt [66]: So ist die  $NA$  des Objektivs neben der Wellenlänge ein wesentlicher Bestandteil für die erzielbare Auflösung eines Mikroskops. Durch die  $NA$  wird die minimale Größe des fokussierten

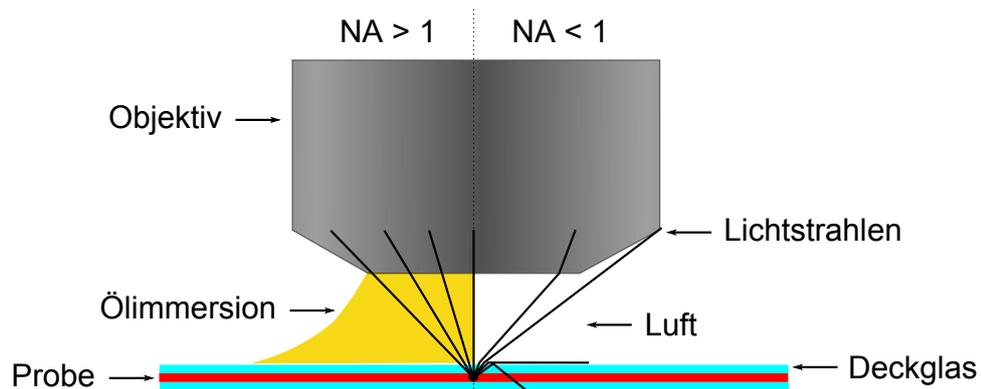


**Abbildung 3.8:** Vergleich der resultierenden Intensitätsverteilungen zweier selbstleuchtender Objekte in unterschiedlichen Abständen zueinander. a) Rayleigh-Kriterium b) Sparrow-Kriterium und c) nicht mehr auflösbar.

Lichtstrahls und somit die Auflösung bestimmt. Sie wird definiert als:

$$NA = n \cdot \sin \alpha, \quad (3.26)$$

wobei  $n$  den Brechungsindex zwischen Objektiv und Fokus bzw. Probe und  $\alpha$  den halben Öffnungswinkel des Objektivs beschreibt. Abbildung 3.9 zeigt schematisch den Unterschied zwischen Immersionsobjektiven und Luftobjektiven. In Luft, also einem Brechungsindex



**Abbildung 3.9:** Vergleich des Strahlenverlaufs eines Immersionsobjektivs (links) und eines Luftobjektivs (rechts). Durch die Anpassung des Brechungsindexes mit Hilfe des Immersionsöls an die Optik des Objektivs und des oberen Deckglases verschwindet die Reflexion und Brechung der Lichtstrahlen nahezu vollständig. Dadurch kann mehr Licht eingesammelt werden. Die Sammeffizienz und somit Auflösung steigt.

von ca. 1, ist die numerische Apertur auf den maximalen Wert von 1 limitiert. Mit Ölimmersionsobjektiven und der Verwendung von Ölimmersion steigt der Wert auf ca. 1,46. Dabei wird die Sammeffizienz des Objektivs gesteigert und sowohl die Brechung als auch die Reflektion der Strahlen deutlich reduziert. So können Auflösungen im Bereich von wenigen Hundert Nanometern erreicht werden. Neben der Elektronenmikroskopie konnten in den letzten Jahrzehnten einige sog. Super-Resolution-Techniken die (optische) Auflösungsgrenze deutlich überwinden [67, 68].

## 4 Entwicklung eines Trübungssensors

In diesem Kapitel wird die Entwicklung eines kostengünstigen Trübungssensors nach DIN EN ISO 7027 für die Messung der Lichtstreuung bzw. Trübung von Flüssigkeiten, basierend auf der Publikation [69], beschrieben. Dabei sollte die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der kommerziell erhältlichen, portablen und teuren Sensorsysteme mit einem kostengünstigen Prototyp realisiert werden. Der Fokus dieses Laborprototyps lag auf einem einfachen und robusten Ansatz für die Analyse von (sehr) geringen Trübungswerten wie z.B. klarem Wasser. Daher wurde das Konzept des Nephelometers umgesetzt (vgl. Kapitel 3.1), welches überwiegend in der Wasseranalyse [5–8], der Prozessüberwachung [11, 12] und in der Medikamentenentwicklung [9, 10] eingesetzt wird. Zudem findet der Nephelometer in der Getränkeindustrie für Trübungsmessungen z.B. bei der Herstellung von Säften Verwendung [3, 70].

Die Norm DIN EN ISO 7027 und die Richtlinie EPA Methode 180.1 (der United States Environmental Protection Agency, kurz USEPA), Vorgaben zur Bestimmung der Wasserbeschaffenheit, schreiben (für geringe Trübungswerte) ebenfalls die Messung des Streulichts in  $90^\circ$  vor.

Bei dieser vollständigen Neukonzeptionierung eines solchen Sensors mit der Fokussierung auf besonders günstige Komponenten musste jedes Bauteil gezielt ausgewählt und auf Anwendbarkeit überprüft werden. Ein Großteil der nachfolgenden Ergebnisse und Prüfungen von Komponenten wurden in Zusammenarbeit mit Daniela Riedel (im Rahmen ihrer Zulassungsarbeit) und mit Anne Fleischmann (im Rahmen ihrer Bachelorarbeit) durchgeführt [71, 72].

Eine wesentliche Komponente des Prototyps ist die Beleuchtung der Probe. Aufgrund der europäischen Norm DIN EN ISO 7027 dürfen nur Lichtquellen, welche eine Emissionwellenlänge von 860 nm und dabei minimale Konvergenz bzw. Divergenz aufweisen, eingesetzt werden. Zudem muss die Lichtquelle mit konstanter Lichtintensität strahlen,

um die resultierende Intensität der Lichtstreuung nicht zu beeinflussen. Des Weiteren sollte die Beleuchtung gleichzeitig kostengünstig sein und einen geringen Stromverbrauch aufweisen, um einen zukünftigen Batteriebetrieb des Sensors zu ermöglichen. Daher wurde als Strahlungsquelle eine SMD-LED ausgewählt, welche die gewünschte Emissionswellenlänge von 860 nm emittiert. Um den Sensor in einer Weiterentwicklung auch Inline betreiben zu können, wollte man zudem das Licht mit Hilfe einer Faser an die Probe leiten. Die daraus nötige Kollimierung der aus der Faser divergent austretenden Lichtstrahlen wurde mittels einer GRIN-Linse (siehe Kapitel 4.1) realisiert. Die Faser weist in Kombination mit der GRIN-Linse eine max. (simulierte) Divergenz von  $2,7^\circ$  auf [71]. Die Gleichmäßigkeit der Intensität wurde durch Verwendung eines Powermeters überprüft. Die ausführliche Auswahl der Strahlungskomponenten sowie die einzelnen Präparationsschritte wie das Verkleben der optischen Komponenten diskutiert D. Riedel ausführlich in ihrer Zulassungsarbeit [71].

Bei der Auswahl des Detektors werden von der Norm DIN EN ISO 7027 keine besonderen Merkmale gefordert. Die primäre Aufgabe des Detektors ist die Umwandlung der Intensität des streuenden Lichts in eine elektrische Größe, welche mit Hilfe kostengünstiger Elektronik wie beispielsweise eines Microcontrollers ausgelesen werden kann. Wichtig waren auch hier geringe Kosten bei möglichst guter Sensitivität (bei geringer Intensität) sowie lineares Intensitätsverhalten. Die Wahl fiel daher auf sogenannte Licht-Frequenz-Wandler, welche eine Art von Silizium-Photodioden darstellen. Diese bewegen sich preislich im einstelligen Euro-Bereich, weisen eine sehr gute Empfindlichkeit gegenüber geringer Lichtintensität auf und sind im gesamten einsetzbaren Bereich in Abhängigkeit der Lichtintensität linear (lineare Kennlinie). Die Linearität wurde mittels unterschiedlicher Laserintensitäten und durch einen Vergleich mit einem Powermeter überprüft [71]. Nach DIN EN ISO 7027 darf nur Streulicht in einem Messwinkel von  $90^\circ (\pm 2,5^\circ)$  und einem Öffnungswinkel zwischen  $20^\circ$  und  $30^\circ$  detektiert werden. Dies wurde mit Hilfe einer GRIN-Linse vor dem Sensor realisiert, welche das einfallende gestreute Licht auf den Licht-Frequenz-Wandler fokussiert und in einem Winkel von genau  $90^\circ$  zur Beleuchtung platziert ist. Mit Hilfe einer Blende zwischen GRIN-Linse und Detektor mit einem Durchmesser von 2 mm ist der maximale Öffnungswinkel ( $2\theta = 55^\circ$ ) bzw. die numerische Apertur der GRIN-Linse auf  $30^\circ$  reduziert ( $2\theta = 30^\circ$ ) und entspricht so der Norm [71].

Ein weiteres Kriterium für das Design des Nephelometers ist die Größe des Probenraums, welche abgeschätzt werden musste. Dabei gilt, dass ein kleiner Probenraum eher für

---

Messungen von trübere Flüssigkeiten und ein größerer Probenraum für Messungen im geringen Trübungsbereich von Vorteil ist. Grund hierfür ist, dass die Sensitivität mit zunehmender Weglänge des Lichts durch die Probenkammer steigt und so sehr geringe Trübungen detektiert werden können. Leider führt eine große Probenkammer bei höheren Trübungswerten zu Mehrfachstreuungen und dadurch zu einer Abweichung der Linearität, was eine Trübungsmessung ungenau bzw. unbrauchbar werden lässt. Aufgrund der Anforderung, geringe Trübungswerte zu messen, wurde ein großer Durchmesser gewählt. Um die Standardkalibrierlösungen der Firma Hach verwenden zu können, wurde die Standardgröße des Branchenprimus Hach mit einem Durchmesser von 25 mm realisiert. Ein Vergleich des Sensors mit einem kommerziellen Hach-Gerät war so ebenfalls einfacher zu bewerkstelligen.

Um diesen Vergleich durchführen zu können, müssen die detektierten Streuintensitäten (Zählungen/s) des Prototyps in eine Trübungseinheit wie Formazine Nephelometric Unit (FNU), Formazine Turbidity Unit (FTU) oder Nephelometric Turbidity Unit (NTU) umgewandelt werden. Die Wahl der Einheit ist von dem Sensorprinzip, der Anwendung und der Kalibrierung abhängig [35]. Bei dem nephelometrischen Messprinzip, also der Detektion der Lichtstreuung in  $90^\circ$  zur Anregung, wird in der Regel die Einheit NTU verwendet<sup>1</sup>. Zur Kalibrierung eines Trübungsmessgeräts haben sich sog. Primärstandards etabliert. Dabei stellt das Formazin den bekanntesten Primärstandard dar, welcher auch in der Norm EN ISO 7027 vorgeschrieben wird. Die genaue Beschreibung des Kalibriervorgangs folgt in Kapitel 4.3.

Als Besonderheit dieses Prototyps ist die Implementierung eines Schrittmotors zu nennen. Bei Vorstufen dieses Prototyps ohne Schrittmotor waren geringe Trübungen sehr schwer reproduzierbar messbar. Bei geringen Trübungswerten verfälschen Störquellen wie Luftblasen, Fingerabdrücke oder Kratzer auf dem Probenglas sehr leicht den gemessenen Trübungswert. Mit Hilfe des Schrittmotors kann die Probe rotiert und somit an verschiedenen Küvettenpositionen automatisiert gemessen werden. Dadurch ist die Aufnahme von bis zu 50 Messwerten (an verschiedenen Positionen) möglich. Zudem können durch die Anwendung eines speziellen und komplexen Algorithmus Ausreißer (in den Messwerten) durch Störquellen eliminiert und Mittelwerte der gemessenen Werte gebildet werden.

---

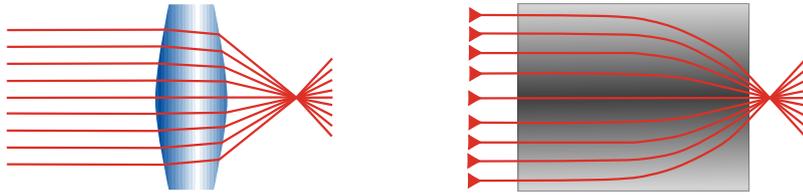
<sup>1</sup>Trinkfähiges Wasser hat einen NTU-Wert kleiner 1 [4], destilliertes Wasser 0,08 NTU, Tafelwasser 0,54 NTU und Brauchwasser 3,52 NTU [6] weswegen der Trübungswert bei der Aufbereitung von (Trink-)Wasser entscheidend ist [73, 74]. Ab einem Wert von ca. 100 NTU erscheint die Lösung deutlich trüb.

Die bisher aus der Literatur bekannten Sensorsysteme bzw. Prototypen weisen zum Teil deutlich größerer Abweichungen besonders bei geringen Trübungen auf. Zudem ist aus der Literatur kein kostengünstiges Sensorsystem bekannt, welches die Norm EN ISO 7027 erfüllt. Aufgrund der gewählten Komponenten und Geometrie entspricht unser Prototyp bis zu einem NTU-Wert von 400 vollständig der EN ISO 7027. Die Unterschiede bzw. Verbesserungen zu bereits publizierten Sensoren werden im Diskussionskapitel ausführlich besprochen.

### 4.1 Theoretische Grundlagen - GRIN-Optiken

Dieses Kapitel beschreibt die Grundlagen von GRIN-Linsen, der optischen Hauptkomponente des Trübungssensors (in Anlehnung an [75]).

Die zunehmende Automatisierung und Überwachung von Produktionsabläufen durch digital vernetzte Systeme - bekannt unter dem Schlagwort „Industrie 4.0“ - verlangt unter anderem nach intelligenten und kompakten Sensorsystemen. Um eine stetige Überwachung der Produktion und ein automatisiertes Handeln zu garantieren, werden häufig sogenannte Online- und Inline-Messtechniken, welche eine kontinuierliche Messung der Prozessparameter gewährleisten, eingesetzt. Für die Entwicklung von solchen Messtechniken ist die Miniaturisierung der Aufbauten zur einfachen Implementierung eine der wichtigsten Aufgabenstellungen. Hierfür eignen sich im optischen Bereich Gradienten-Index-(GRIN)Linsen, welche durch ihre sehr kompakte Bauform mit geraden Stirnflächen sehr einfach in bestehende optische Systeme integriert bzw. neue Systeme mit deutlich geringeren Ausmaßen konstruiert werden können [13]. Diese kostengünstigen Linsen werden millionenfach zur Miniaturisierung faseroptischer Systeme eingesetzt [13]. Durch ein definiertes Brechzahlprofil entsteht die Linsenwirkung einer GRIN-Linse, wodurch sich die gewölbten Oberflächen von konventionellen Linsen durch ebene optische Grenzflächen ersetzen lassen [13, 14]. Dies ermöglicht zudem, dass sich - je nach Eigenschaften der GRIN-Optik - die Bildebene direkt auf der planen Oberfläche der Linse befinden kann. Dadurch entfällt das oft aufwendig und teuer zu realisierende Fokussieren der Probe vollständig. GRIN-Linsen sind in der Regel Stab- bzw. Zylinderlinsen in einem



**Abbildung 4.1:** Vergleich einer konventionellen, konvexen Sammellinse (links) mit einer GRIN-Linse mit Pitch 0,23 (rechts) nach [75].

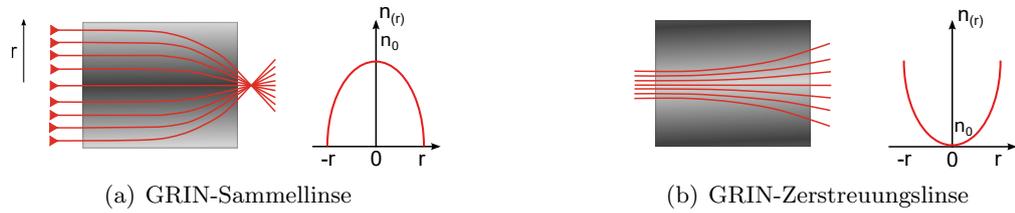
Größenbereich von 0,5-4 mm Durchmesser und einer Länge von ca. 1-10 mm. Diese werden durch Ionenaustauschprozesse in speziellen Gläsern mit hohem Natriumoxidanteil oder speziellen Polymeren produziert [13, 76]. Die Hauptvorteile von GRIN-Linsen gegenüber herkömmlichen sphärischen Linsen sind die ebenen Stirnflächen und somit einfache Implementierung in bestehende optische Systeme, was durch die einfachere und nahezu beliebig wählbare Geometrie zudem begünstigt wird [77]. GRIN-Linsen sind kommerziell für wenige Euro zu erhalten, was meist einer deutlichen Einsparung entspricht. Abbildung 4.1 zeigt den Vergleich einer GRIN-Linse mit einer konventionellen Sammellinse. Bei der Sammellinse werden die Lichtstrahlen durch den Brechungsindex-Sprung am Ein- und Austritt der Linse gebrochen. GRIN-Optiken erreichen ihre Linsenwirkung durch eine kontinuierliche Brechzahländerung innerhalb der Linse, dem sogenannten Gradienten-Index (siehe Abbildung 4.2) [13]. Dabei haben sie einen eindimensionalen parabelförmigen Brechungsindexgradienten orthogonal zur optischen Achse, der bei einer Sammellinse mathematisch folgendermaßen ausgedrückt werden kann [13, 14]:

$$n(r) = n_0 \left( 1 - \frac{g^2}{2} r^2 \right), \quad (4.1)$$

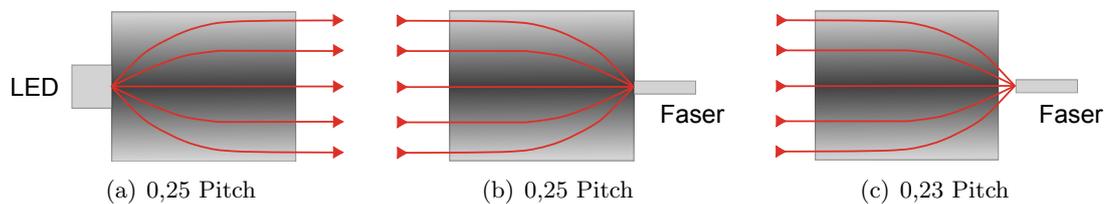
wobei  $n_0$  den Brechungsindex der Zylinderachse,  $g$  die Gradientenkonstante und  $r$  den Abstand von der Zylinderachse darstellt.

Die Gradientenkonstante  $g$  beschreibt die Differenz der Brechungsindices zwischen Mitte und Rand der Linse. Demnach bestimmen sie und die Länge ( $L$ ) der Linse die resultierende Brennweite ( $f$ ) der GRIN-Optik. Es gilt [13]:

$$f = \frac{1}{n_r g \sin(gL)}. \quad (4.2)$$



**Abbildung 4.2:** Schematischer Strahlenverlauf und Brechungsindexgradient einer GRIN-Sammel- und Zerstreuungslinse im Vergleich nach [75].



**Abbildung 4.3:** Anwendungsmöglichkeiten von GRIN-Optiken mit Pitch von 0,25 und 0,23 nach [75]. Die Brechung der Lichtstrahlen beim Austritt aus der GRIN-Linse in (c) wurde in dieser schematischen Darstellung nicht berücksichtigt.

Befindet sich das Maximum des Brechungsindex in der Mitte der Linse, fungiert diese als Sammellinse. Bei dem maximalen Wert am Rand werden die eintreffenden Strahlen aufgeweitet, es ergibt sich eine Zerstreuungslinse (siehe Abbildung 4.2). Die numerische Apertur einer solchen Optik kann dargestellt werden als [13]:

$$NA = \sin \theta = \sqrt{n_0^2 - n_r^2}, \quad (4.3)$$

wobei  $n_r$  den Brechungsindex am Rand der GRIN-Linse angibt.

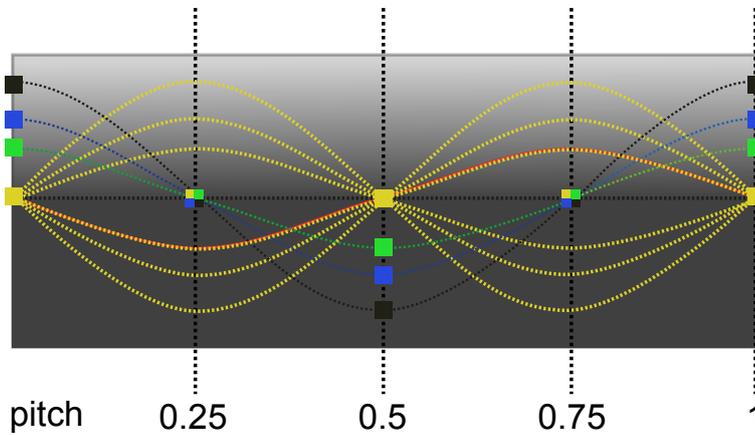
GRIN-Linsen werden vielfach als Kollimatorlinsen für Lichtleitfasern [13], in der Endoskopie [78, 79] und in der Einzelmolekülspektroskopie bei Raumtemperatur und Tieftemperatur als Ersatz für gewöhnliche Objektive [80, 81] eingesetzt. Im Jahre 2007 gelang der erste klinische Einsatz eines GRIN-Endoskops [79]. Weitere Anwendungsmöglichkeiten sind in Abbildung 4.3 dargestellt.

Dabei wird eine GRIN-Linse je nach Eigenschaften durch den sogenannten Pitch charak-

terisiert. Abbildung 4.4 zeigt, dass sich ein Lichtstrahl in einer GRIN-Linse sinusförmig ausbreitet. Zudem sind die verschiedenen und gängigen Pitchlängen dargestellt. Die Länge einer GRIN-Linse im Verhältnis zur Periodenlänge dieser Sinusfunktion bestimmt deren Eigenschaften. Die Pitch-Länge ( $P$ ) kann folgendermaßen berechnet werden [13]:

$$P = \frac{2\pi}{g}. \quad (4.4)$$

Eine GRIN-Linse mit einem ganzzahligen Pitch bildet ein Objekt auf der Oberfläche

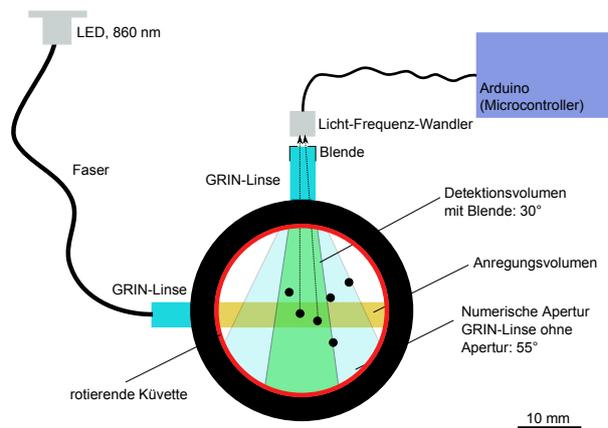
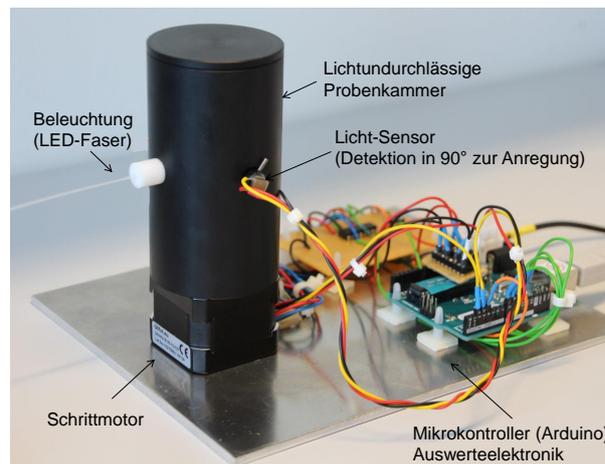


**Abbildung 4.4:** GRIN-Optik mit radialem Brechungsindexgradienten inklusive Pitch-Variationen und entsprechendem Strahlenverlauf nach [75].

der Linse direkt wieder auf der Oberfläche der Rückseite ab. Mit einem Pitch von 0,5 wird es invertiert. Der am häufigsten verwendete GRIN-Linsen-Typ ist die 0,25 Pitch Linse. Sie fokussiert ankommende parallele Lichtstrahlen auf einen Punkt auf der Linsenoberfläche und ermöglicht so die Kopplung der Lichtstrahlen in eine Faser. Außerdem können emittierende Punktquellen direkt auf den Fokuspunkt der GRIN-Linse aufgebracht werden. Man erhält paralleles kollimiertes Licht. Eine 0,23 Pitch Linse entspricht einem Standardobjektiv und weist einen geringen Arbeitsabstand von wenigen Hundert Mikrometern auf. Sie fokussiert ebenfalls einen parallelen Lichtstrahl.

## 4.2 Experimenteller Aufbau

Die Abmaße der Probenkammer des Nephelometer-Prototyps wurde ähnlich gewählt wie die des kommerziell erhältlichen Nephelometers Hach 2100Qis (siehe Abbildung 4.5). So wurde ein Küvettenhalter aus Polyoxymethylen (POM) für 25 mm runde Glasküvetten (2434706, Hach) konstruiert. Für die Beleuchtung der Probe wird eine SMD-LED (SFH 4253, Osram) mit einer Emissionswellenlänge von 860 nm verwendet. Diese LED wird in eine Glasfaser (FP200URT, Thorlabs) mit einem Kerndurchmesser von 0,2 mm eingekoppelt, indem diese Faser auf die LED mittels optischem Kleber (Norland NOA 61) geklebt wird. Zum Auskoppeln und gleichzeitigen Kollimieren der Lichtstrahlen wird eine 4 mm (Durchmesser) GRIN-Linse (W40-S0250-063-NC) an die Faser geklebt. Die Detektion des streuenden Signals erfolgt über einen Licht-Frequenz-Wandler (TSL237, Taos). Um nur Lichtstrahlen in  $90^\circ$  zur Anregung und mit einem max. Öffnungswinkel von  $30^\circ$  zu detektieren, wird zwischen Sensor und GRIN-Linse eine Lochblende mit 2 mm Durchmesser verklebt. Beide GRIN-Optiken werden in dem POM-Halter in einem Winkel von  $90^\circ$  zueinander verschraubt. Unterhalb des Küvettenhalters befindet sich ein Stepper-Motor (QSH4218-35-10-027, Trinamic), welcher es ermöglicht, die Küvette zu drehen. Sowohl der Detektionssensor als auch der Motor werden über einen 8-bit, 16 MHz Mikroprozessor (Arduino Uno, Atmel) gesteuert bzw. ausgelesen. Die Anzeige der Messwerte erfolgt am PC. Für die Kalibrierung des Sensors wurden Standardkalibrierlösungen (STABLCAL®, Hach) mit den NTU-Werten 0,1; 1; 10; 20; 100; 200; 800; 1000 und Verdünnungen der 4000 NTU-Lösung, sogenanntes stabilisiertes Formazin, verwendet.



**Abbildung 4.5:** Oben: Bild des Nephelometer-Prototyps mit den einzelnen Komponenten: Schrittmotor, Probenkammer, Beleuchtung, Licht-Sensor und Auswerteelektronik. Unten: schematischer Aufbau des Sensors nach [69].

### 4.3 Ergebnisse

Um den Prototyp zu kalibrieren, wurden verschiedene Formazin-Kalibrationsstandards in einem NTU-Bereich von 0,1 bis 1000 NTU gemessen. Dabei handelt es sich um Kalibrierstandards der Firma Hach (Stabcal® Trübungsstandards Kalibration Kit, 2662105, Hach) mit den NTU-Werten 0,1; 20; 200 und 1000. Dazu werden an 50 Küvettepositionen (jeweils 7,2° weiter gedreht) die jeweiligen Intensitäten der Streustrahlung gemessen und im internen Speicher gespeichert. Dies geschieht automatisiert durch die Ansteuerung des Stepper-Motors mittels Microprozessor. Nach einem Ausreißertest (nach Grubbs [82, 83]) wird aus mindestens 45 Messwerten (ohne Ausreißer) ein Mittelwert mit Standardabweichung bestimmt<sup>2</sup>. Sollten es mehr als fünf Ausreißer sein, wird die Messung an einer anderen Position neu gestartet. Liegen nach weiteren fünf Messungen weiterhin mehr als fünf Ausreißer vor, wird ein Fehler ausgegeben. Helfen könnte dann ein Austausch der vermeintlich verkratzten Küvette. Die mittlere Spalte der Tabelle 4.1 beschreibt die gemittelten ausgegebenen Frequenzwerte (in Abhängigkeit der Streulichtintensität) des Licht-Frequenz-Wandlers in Zeitintervallen von jeweils einer Sekunde. Diese erhaltenen Frequenzwerte wurden in die NTU-Werte der Standards konvertiert (siehe Tabelle 4.1 rechte Spalte). Da es keine generelle Vorschrift gibt wie Nephelometer kalibriert werden sollen und sich konstruktionsbedingt kein linearer Verlauf zwischen 0,1 und 1000 NTU zeigt, wurde der Messbereich zur Kalibrierung unterteilt. Aufgrund der vier Kalibrierlösungen (0,1, 20, 200, 1000) in dem Messbereich von 0,1 bis 1000 NTU wurde der Bereich in drei Unterregionen unterteilt. Diese Bereiche sind in Abbildung 4.6 dargestellt, wobei Abbildung 4.6 oben den Messbereich von 0-200 NTU und unten den Bereich von 200-1000 NTU zeigt. Dabei beschrieben die x-Werte die Werte der Standards in der Einheit NTU, die y-Werte die Frequenzwerte (graue, blaue und grüne Punkte) bzw. umgerechneten NTU-Werte (rote Kreuze) des Sensors.

Um das Sensorsystem zu validieren und damit die Genauigkeit und Praktikabilität zu ermitteln, wurde der Sensor mit einem kommerziell erhältlichen Gerät (Hach2100Qis) verglichen. Dazu wurden weitere kommerziell erhältliche Lösungen in dem Bereich zwischen 0,1 und 1000 NTU eingesetzt (1, 10, 100 und 800 NTU) und die 4000 NTU-Lösung des Kalibrierungs-Kits manuell verdünnt. Die mit dem kommerziellen Gerät gemessenen Trübungswerte aller Standards sowie Verdünnungen der 4000 NTU-Lösung sind in

---

<sup>2</sup>Entwicklung Algorithmus in Zusammenarbeit mit A. Fleischmann [72]

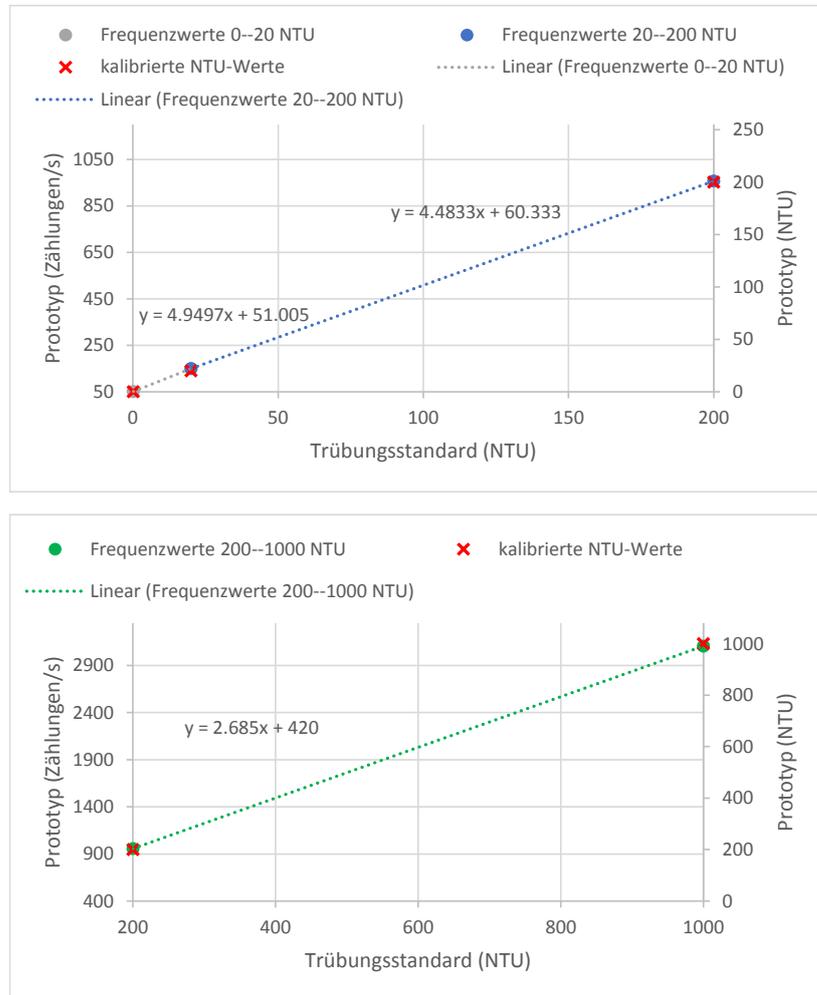
**Tabelle 4.1:** Frequenz-Mittelwerte und Standardabweichungen des Prototyps in Zählungen/s (mittlere Spalte) und konvertierte NTU-Werte (rechte Spalte) verschiedener StablCal® Standards nach [69].

StablCal® Standard (NTU)	Prototyp Frequenz (Zählungen/s)	Prototyp (NTU)
0,1	$51.5 \pm 0.1$	$0.10 \pm 0.01$
20	$150 \pm 1$	$20.0 \pm 0.2$
200	$957 \pm 3$	$200 \pm 1$
1000	$3105 \pm 8$	$1000 \pm 3$

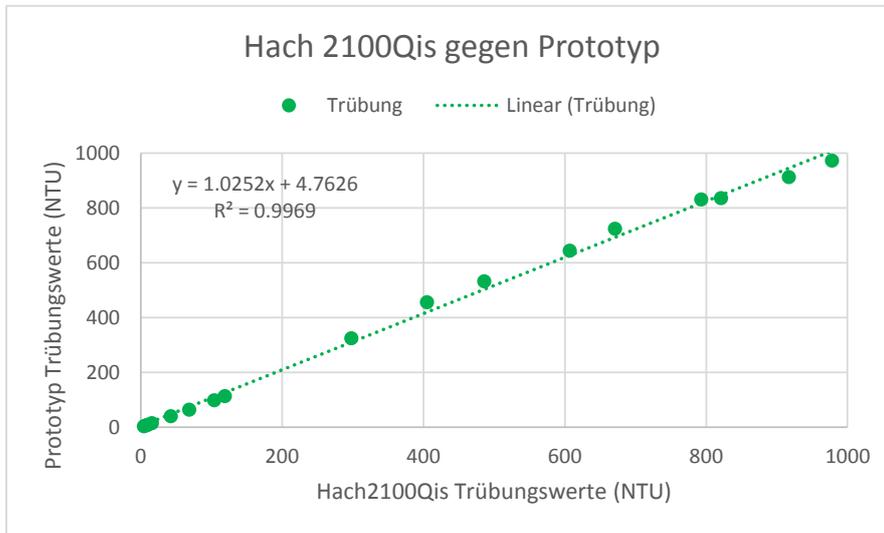
**Tabelle 4.2:** NTU-Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen (Standard) StablCal® Lösungen des Hach2100Qis Nephelometers und des Prototyps nach [69].

Probe	HACH2100Qis (NTU)	Prototyp (NTU)
Standard 1 NTU	$1.09 \pm 0.01$	$0.993 \pm 0.04$
dilution 1	$4.50 \pm 0.02$	$3.94 \pm 0.08$
dilution 2	$7.91 \pm 0.02$	$7.57 \pm 0.09$
Standard 10 NTU	$10.3 \pm 0.1$	$9.64 \pm 0.1$
dilution 3	$15.8 \pm 0.1$	$15.4 \pm 0.1$
dilution 4	$42.6 \pm 0.2$	$40.7 \pm 0.2$
dilution 5	$68.6 \pm 0.3$	$64.4 \pm 0.3$
Standard 100 NTU	$104 \pm 1$	$98.7 \pm 0.5$
dilution 6	$119 \pm 1$	$114 \pm 1$
dilution 7	$298 \pm 1$	$325 \pm 1$
dilution 8	$405 \pm 1$	$456 \pm 1$
dilution 9	$486 \pm 1$	$532 \pm 1$
dilution 10	$607 \pm 2$	$644 \pm 2$
dilution 11	$671 \pm 2$	$724 \pm 2$
dilution 12	$793 \pm 2$	$831 \pm 2$
Standard 800 NTU	$821 \pm 2$	$836 \pm 2$
dilution 13	$917 \pm 2$	$912 \pm 3$
dilution 14	$978 \pm 2$	$972 \pm 3$

Tabelle 4.1 mittlere Spalte dargestellt. Tabelle 4.1 rechte Spalte zeigt die NTU-Werte des Prototyps. Diese wurden durch die Konvertierung der gemessenen Frequenzwerte anhand der linearen Regressionsgeraden aus Abbildung 4.6 ermittelt. Dabei zeigt der Korrelationskoeffizient von 0,9969 im gesamten Bereich die hervorragende Anwendbarkeit und Reproduzierbarkeit dieses Sensorsystems und ist somit mit dem kommerziellen Nephelometer (Hach2100Qis) vergleichbar.



**Abbildung 4.6:** Oben: Gemessenes Frequenzsignal (linke Y-Achse) und konvertierte NTU-Werte (rechte Y-Achse) des Prototyps [Zählungen/s] für StablCal® Standards (x-Achse) im Bereich von 0.1-200 NTU. Unten: Gemessenes Frequenzsignal und konvertierte NTU-Werte im Bereich von 200-1000 NTU nach [69].



**Abbildung 4.7:** Vergleich Hach2100Qis Nephelometer (x-Achse) mit dem Prototyp (y-Achse) nach [69].

## 4.4 Diskussion

Aufgrund der vielen Einsatzmöglichkeiten von Nephelometern (siehe Kapitel 4) haben sich viele Arbeitsgruppen mit der Entwicklung eines Nephelometer-Prototyps beschäftigt. Aus der Literatur bekannte Nephelometer messen NTU-Bereiche von 0-100 NTU [34, 84], 0-400 NTU [85], 0-500 NTU [7] bzw. 0-1000 NTU [86]. Zudem wurden Sensorsysteme entwickelt, wo das Messprinzip der Trübung noch um die Bestimmung der Farbe der zu untersuchenden Probe [87], bzw. Temperatur [8, 88], pH, Leitfähigkeit und weitere Parameter [8] erweitert wurde. Sowohl die entwickelten Nephelometer [7, 34, 84–86] als auch die Sensorsysteme [8, 87, 88] legen den Fokus der Analyse auf die Bestimmung der Trübung bzw. Qualität von Wasser. Die Systeme von Kelley et al. [86] und Hussain et al. [85] erreichen dabei zufriedenstellende und reproduzierbare Ergebnisse mit deutlichen Ungenauigkeiten bei geringen Trübungswerten. Dabei weichen alle entwickelten Nephelometer von der Norm EN ISO 7027 (siehe Kapitel 4), der europäischen Norm zur Messung der Wasserbeschaffenheit, ab. Des Weiteren hat ein Großteil der entwickelten Nephelometer einen geringeren Messbereich und wird nicht mit einem anerkannten

Primärstandard (wie beispielsweise Formazin) kalibriert. Der in dieser Dissertation vorgestellte Prototyp eines Nephelometers weist eine extreme Genauigkeit und Präzision sowie Wiederholbarkeit vor allem im schwierig zu messenden geringen Trübungsbereich auf. Zudem entspricht der Sensor bis zu einem NTU-Wert von 400 vollständig der Norm EN ISO 7027. Das Herzstück des Sensors ist dabei der Schrittmotor, welcher - in Verbindung mit einem Microcontroller - das automatisierte Messen von mehreren Küvettenpositionen ermöglicht und so vor allem Werte mit geringen Trübungen reproduzierbarer gemessen werden können. In dem Bereich geringer Trübung wo geringste Streuintensitäten detektiert werden, verfälschen Störquellen wie Verunreinigungen oder Beschädigungen der Küvette oder Luftblasen das Ergebnis extrem. Durch das Messen an verschiedenen Stellen und der Mittelung mittels Algorithmus können hier deutlich bessere Ergebnisse bei Trübungen kleiner 5 NTU gegenüber einfachen Einzelmessungen erzielt werden, wie sie vor der Implementierung des Schrittmotors durchgeführt wurden [71]. Der Hauptfokus lag bei der Entwicklung neben der Leistung des Sensors zudem auf der Kostenreduzierung. Der Vergleich der Standardabweichungen einzelner NTU-Werte (siehe Tabelle 4.2) zeigt einen geringfügig besseren Wert beim kommerziellen Gerät bei gleichem Messbereich. Gewöhnliche und kommerziell erhältliche Nephelometer kosten allerdings in Abhängigkeit des Messbereichs und der gewünschten Genauigkeit Tausende Euro. Dieses Sensorsystem wäre durch geringfügige Modifikationen im niedrigen 2-stelligen Eurobereich zu fertigen. Möglich machen dies einfache und kostengünstige Komponenten wie eine LED in Kombination mit einer GRIN-Optik zur Beleuchtung der Probe und ein einfacher Licht-Frequenz-Wandler, ebenfalls in Kombination mit GRIN-Optiken zur Detektion. Beide Komponenten sind sehr günstig, erfüllen trotzdem durch hohe Konstanz und Genauigkeit ihren Zweck, was in der Zulassungsarbeit von D. Riedel überprüft wurde [71]. Aufgrund des geringen Stromverbrauchs des Sensors bzw. der einzelnen Komponenten könnte der Sensor problemlos mit Batterien betrieben werden.

#### 4.5 Ausblick

Nach einer Vielzahl von verschiedenen Evolutionsschritten in dieser Sensorentwicklung und verschiedenen Messreihen konnten sehr gute Ergebnisse im Vergleich zu teuren

Laboraufbauten erzielt werden. Trotzdem besteht eine Reihe von Ideen, wie der Sensor zukünftig weiterentwickelt werden könnte. Zum einen sind hier einfachere kleine Verbesserungsmöglichkeiten zu nennen, um die Ergebnisse noch reproduzierbarer und genauer zu gestalten. Ein verbesserter Schutz gegen äußere Einflüsse wie externes Streulicht würde die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit des Sensors weiter verbessern. Die Implementierung eines Displays würde den Anschluss eines externen Computers überflüssig machen. Zudem könnte das komplette Setup noch kompakter gestaltet werden. Eine Möglichkeit der Weiterentwicklung wäre die Implementierung eines zusätzlichen Detektors in Vorwärtsrichtung ( $0^\circ$  zur Anregung), um vollständig, d.h. auch bei Trübungswerten über 400 NTU, der EN ISO 7027 Norm zu entsprechen. Dies könnte durch einfache Modifikationen der Probenkammer und Software realisiert werden. Des Weiteren könnten weitere zusätzliche Sensoren in Kombination mit einem speziell programmiertem Auswerte-Algorithmus die sogenannte Ratio-Methode ermöglichen. Dadurch wäre es möglich, einen größeren NTU-Bereich abzudecken und eine höhere Auflösung der Messung bzw. Genauigkeit zu erreichen. Die Verwendung von Fasern ermöglicht das prinzipielle Eintauchen des Sensors in die zu messende Flüssigkeit bei gleichzeitigem Schutz der Auswerteelektronik. Hier könnte das Ziel eines Inline-Sensors weiter verfolgt werden. Dies wäre ein weiterer wichtiger Fortschritt des Sensors für eine mögliche Kommerzialisierung des Systems.



# 5 Konfokale Mikroskopie bei Raumtemperatur - Aufbau und Experimente

Dieser Teil der Dissertation beschreibt in den Kapiteln 5.3 und 5.4 Experimente, wie sich mit Hilfe von optischen Fabry-Pérot-Resonatoren (siehe Kapitel 3.3) Eigenschaften von Quantenemittern - z.B. durch Variation des Spiegelabstandes - gezielt verändern lassen [15, 51, 61]. So wurde in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Meixner gezeigt, dass sowohl die Fluoreszenz-Lebensdauer als auch die Fluoreszenz-Spektren im Resonator von der spektralen Modendichte abhängig sind [61–63]. Es konnte zudem der experimentelle Zusammenhang zwischen den im Resonator modifizierten Fluoreszenz-Spektren und Zerfallskurven anhand einzelner  $SiO_2$ -Nanopartikel nachgewiesen werden [89]. Darauf basierend bestätigte sich dieser Kontext, im Rahmen dieser Dissertation, auch für das Farbstoff-Molekül Atto488 (siehe Kapitel 5.3). Dabei konnten die Anteile der einzelnen strahlenden und nicht-strahlenden Übergänge des Farbstoffs mit Hilfe des Resonators systematisch verändert werden.

Neben der Variation von einzelnen optischen Quantenemittern können auch Transferprozesse wie der Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET) gezielt beeinflusst werden. So zeigten Andrew und Barnes im Jahre 2000 erstmals, dass dieser Transfer zwischen Donor und Akzeptormolekül von der spektralen Modendichte in  $\lambda/2$ -Resonatoren abhängig ist [90]. Schleifenbaum et al. konnte darstellen, dass sich unter kontinuierlicher Laseranregung die Ratenkonstante eines FRET-Transfers (Maß für die Kopplungsstärke zwischen Donor und Akzeptor) nicht verändert, die Förster-Transferrate, welche die Energietransfers pro Zeit angibt, hingegen schon [91]. Um ein tieferes Verständnis des FRET-Transfers in Resonatoren zu erzielen, wurden aufbauend auf diesem Experiment Einzelmolekülmessungen

eines DNS-gekoppelten FRET-Paares im Resonator durchgeführt (siehe Kapitel 5.4). Dazu wurde mit einem durchstimmbaren Mikroresonator der Energietransfer als Funktion des Spiegelabstandes spektral und zeitaufgelöst untersucht.

Wichtige Erkenntnisse lieferte dabei die Untersuchung des einzelnen Donors (Atto488) in Kapitel 5.3, da sich die Transferraten-Konstante zwischen zwei FRET-Partnern durch die Erhöhung der Relaxationsrate des Donors bestimmen lässt [54, 92]. Mit dem für diese Experimente neu konstruierten konfokalen Mikroskop wurde zudem in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis von Prof. Mayer der Universität Tübingen neu synthetisierte anisotrope Siliziumdioxid-Partikel (sogenannte Dumbbell-Partikel) optisch charakterisiert (siehe Kapitel 5.5). Dies gelang durch konfokale Fluoreszenz-Mikroskopie, indem die  $SiO_2$ -Partikel mit Atto488-Farbstoffen gelabelt wurden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die ca.  $2,5 \mu m$  großen Partikel teilweise hohl und teilweise mit  $SiO_2$  gefüllt sind.

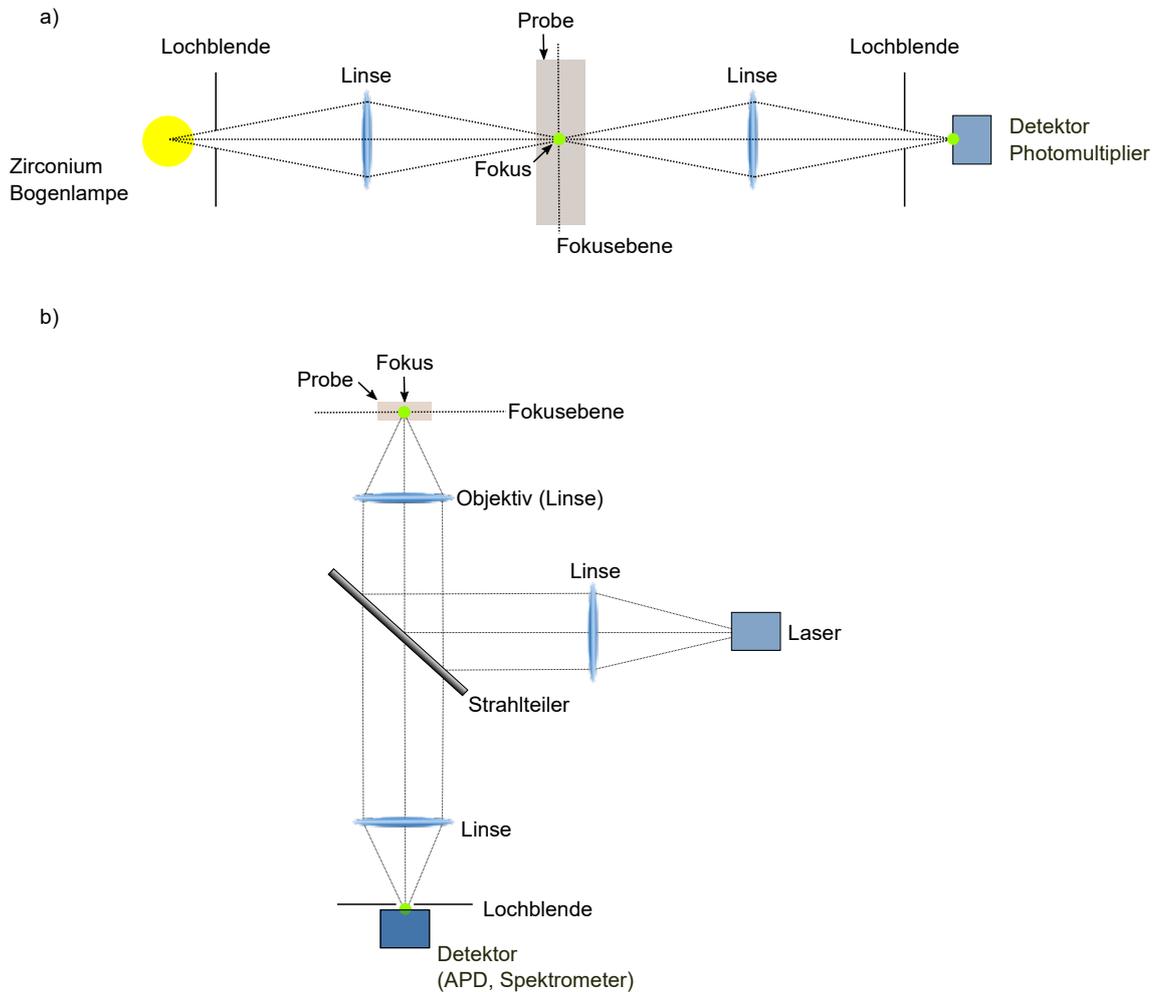
### 5.1 Theoretische Grundlagen

Die folgenden Unterkapitel beginnen mit einer ausführlichen Einführung in die konfokale Mikroskopie (Kapitel 5.1.1). Zudem werden die Theorien zu den Experimenten wie die zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung (5.1.2) und der Förster-Resonanz-Energietransfer (5.1.3) behandelt. Die allgemeine Fluoreszenz von Farbstoffen (Kapitel 3.2) sowie die Grundlagen (bzw. Wechselwirkung mit Licht) eines Resonators (Kapitel 3.3) wurden bereits in vorherigen Kapiteln erläutert.

#### 5.1.1 Konfokale Mikroskopie

Die Fluoreszenz-Mikroskopie ist in der modernen Nanowelt der physikalischen Chemie und anderen Bereichen der Naturwissenschaften bzw. Medizin nicht mehr wegzudenken. Die bahnbrechende Erfindung der konfokalen Mikroskopie verbesserte maßgeblich Kontrast und Auflösung und ermöglicht sowohl 2D- als auch 3D-Aufnahmen von verschiedensten Proben [39, 68, 93, 94]. Die konfokale Mikroskopie ist ein Spezialfall der Lichtmikroskopie und wurde im Jahre 1957 von Marvin Minsky zum Patent angemeldet und 1961

veröffentlicht [93, 95]. Der Durchbruch dieser Methode gelang in den Jahren 1969 und 1971 durch die Verwendung eines Lasers als Lichtquelle [96, 97]. Im Jahre 1976 gelang damit das erste Einzelmolekülexperiment mit Proteinen, welche mit durchschnittlich 100 Fluorescein-Farbstoffmolekülen markiert wurden [98]. Einige Jahre später, genauer im Jahre 1989 und 1990, gelang Moerner et al. und Orrit et al. die spektroskopische Detektion einzelner Pentacen-Moleküle bei tiefen Temperaturen [99, 100]. Bei der konfokalen Mikroskopie wird die Probe, im Gegensatz zur herkömmlichen Lichtmikroskopie, nicht im Weitfeld großflächig beleuchtet, sondern orts aufgelöst mit Hilfe eines Lasers angeregt [1, 68, 101]. Wird dieses Prinzip in der Fluoreszenz-Mikroskopie angewendet, werden Farbstoffmoleküle, welche sich im Fokus des Laserstrahls befinden, angeregt und können diese Energie durch das Emittieren eines Photons (Fluoreszenz) wieder abgeben. Durch das Scannen bzw. Abrastern der Probe und die Detektion der Fluoreszenz entsteht so ein zweidimensionales Bild. Dieses Abscannen der Probe kann entweder durch das sogenannte „sample scanning“ oder „beam scanning“ erfolgen. Beim „sample scanning“ wird die Probe mittels eines Scan-Tisches verfahren, wohingegen beim „beam scanning“ die Probe fixiert bleibt und der Laserfokus seine Position durch die Verwendung eines Scanning-Spiegels verändert. Neben dem Scannen der Probe ist ein weiterer Hauptunterschied zur konventionellen Lichtmikroskopie die vor dem Detektor platzierte Punktlochblende. Dabei sind die Foki bzw. die Fokivolumen der Anregungsstrahlen in der Probenebene mit den Detektionsstrahlen aus der Probenebene an der Lochblende gleichzeitig im Fokus, was als konfokal bezeichnet wird. Dabei sollten Lichtquelle und Detektor nahezu punktförmig sein. Die Punktlochblende wirkt als Raumfilter, indem sie Licht außerhalb der Fokusebene blockiert und nur Licht aus derselben transmittiert. Dadurch kann durch Variation der Probenebene während des Scanvorgangs eine dreidimensionale Aufnahme ohne spezielle Präparation der (z.B. biologischen) Probe erzielt werden. Minsky realisierte dieses Prinzip, indem er von der einen Seite mit einer Zirconium-Bogenlampe über eine Lochblende und ein Objektiv Licht auf die Probe fokussierte und mit einem zweiten Objektiv auf der anderen Seite auf eine weitere Lochblende mit angrenzendem Detektor die Strahlen der Probe detektierte (siehe Abbildung 5.1a) [93, 95]. Heutzutage wird bei konfokalen Mikroskopen nur noch ein Objektiv eingesetzt, welches mit Hilfe eines dichroitischen Strahlenteilers sowohl die Anregung der Probe mit Laserstrahlen, als auch die Detektion der langwelligeren Fluoreszenz realisieren kann (siehe Abbildung 5.1b) [1, 68]. Durch das konfokale Prinzip und die Unterdrückung von Streulicht durch die Lochblende resultiert



**Abbildung 5.1:** Darstellung des konfokalen Prinzips. a) Ursprünglicher Aufbau aus der Patentschrift von Marvin Minsky mit zwei Objektiven (dargestellt als Linsen) nach [95]. b) Moderne Realisierung des konfokalen Prinzips für die Fluoreszenz-Mikroskopie mit nur einem Objektiv und Strahlteiler.

eine höhere axiale Auflösung und ein höherer Kontrast, was die konfokale Mikroskopie seit einigen Jahren zur Methode der Wahl für Einzelmolekülexperimente macht [68, 102–104]. Die PSF des konfokalen Systems, also die zu detektierende Intensitätsverteilung einer Punktlichtquelle, setzt sich bei der konfokalen Mikroskopie aus der PSF des Detektionstrahlengangs (punktförmige Detektion) und der PSF der Beleuchtung (punktförmige Beleuchtung) zusammen. Mathematisch stellt dies eine Multiplikation der beiden PSFs dar [105, 106]:

$$PSF_{gesamt}(x, y, z) = PSF_{Beleuchtung}(x, y, z) \cdot PSF_{Detektion}(x, y, z) \quad (5.1)$$

Die  $PSF_{Beleuchtung}$  ist dabei von der NA des Objektivs und der Wellenlänge sowie der Modi (z.B. Gauss) des Lasers abhängig. Zusätzlich treten Beugungserscheinungen an der Eintrittspupille des Objektivs auf, welche die  $PSF_{Beleuchtung}$  beeinflussen. Außerdem wird die  $PSF_{Detektion}$  neben oben genannten Effekten noch von der Größe der Lochblende bestimmt. Eine punktförmige Lochblende hätte eine  $PSF_{Detektion}$  mit ähnlichem Ausmaß wie der  $PSF_{Beleuchtung}$  zur Folge. Die Formel für die theoretisch maximal mögliche laterale Auflösung ist für die konfokale Mikroskopie [106, 107]:

$$FWHM_{lateral} = 0,37 \frac{\lambda_{mittel}}{NA}, \quad (5.2)$$

wobei

$$\lambda_{mittel} = \sqrt{2} \frac{\lambda_{Beleuchtung} \cdot \lambda_{Detektion}}{\sqrt{\lambda_{Beleuchtung}^2 + \lambda_{Detektion}^2}} \quad (5.3)$$

ist.

Diese maximal mögliche Auflösung des konfokalen Mikroskops mit unendlich kleiner Blende ist für Einzelmolekülmessungen nicht anwendbar, da zu viel Signal verloren geht. Daher ist diese Auflösung von konfokalen Mikroskopen ähnlich der konventionellen Mikroskopie [106, 107]):

$$FWHM_{lateral} = 0,51 \frac{\lambda}{NA}, \quad (5.4)$$

Für die axiale Auflösung entlang der z-Achse gilt [106, 107]:

$$FWHM_{axial} = \frac{0,88\lambda}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}} \quad (5.5)$$

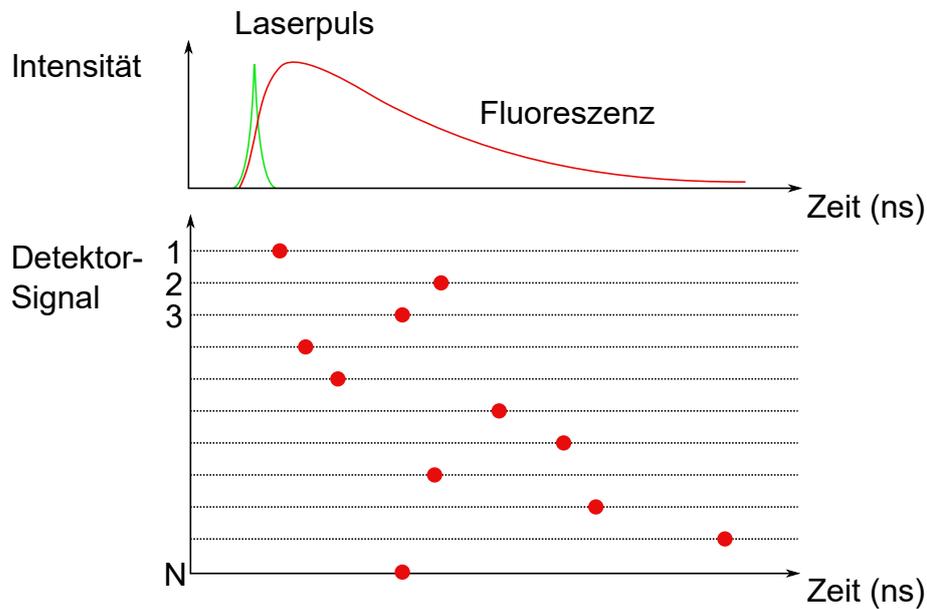
wobei  $FWHM$  die Full Width at Half Maximum, zu deutsch die Halbwertsbreite der Punktspreizfunktion,  $\lambda$  die Wellenlänge des Lichts und  $NA$  die numerische Apertur des Objektivs darstellt. Bei der konfokalen Mikroskopie ist die Halbwertsbreite von der anregenden Wellenlänge und bei der konventionellen Fluoreszenz-Mikroskopie von der Emissionswellenlänge abhängig. Somit ist die laterale Auflösung um den Faktor des Stokes-Shifts ( $\lambda_{Emission}/\lambda_{Beleuchtung}$ ) erhöht [106].

### 5.1.2 Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung

Die Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie (englisch: fluorescence lifetime imaging microscopy, FLIM) wird als bildgebende Information für die unterschiedlichen Lebensdauern von Farbstoffen bzw. deren angeregte Zustände verwendet. Die Fluoreszenz-Lebensdauer ist dabei die Zeit, welche das Molekül im angeregten Zustand verweilt, bis es unter Emission eines Photons wieder in seinen Grundzustand relaxiert. Die zeitliche Verteilung der Fluoreszenz als spontanen Prozess bzw. der emittierten Photonen entspricht für einfache Systeme in der Regel einer exponentiellen Abnahme der Fluoreszenz-Intensität  $I$  abhängig von der Zeit  $t$  [39]

$$I(t) = I_0 e^{-\frac{t}{\tau}}, \quad (5.6)$$

wobei  $\tau$  der Zerfallskonstante  $\tau = (k_{str} + k_{nstr})^{-1}$  und  $I_0$  der Intensität bei  $t = 0$  entspricht. Dabei ist die Fluoreszenz-Lebensdauer sowohl vom Molekül als auch von dessen Umgebung abhängig (siehe Kapitel 3.2). Für die Messung bzw. Bestimmung der Fluoreszenz-Lebensdauern, welche im Kapitel 3.2 besprochen wurde, hat sich die Methode der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung mit Lasern zur gepulsten Anregung, etabliert. Als wichtigste Erfindung für die aus dem englischen abgekürzte TCSPC-Methode (englisch: time correlated single photon counting) gelten die modernen Laserdioden bzw. gepulste LEDs, welche dieses Messprinzip deutlich vereinfachten und vergünstigten. Dabei wird zur Messung der Fluoreszenz-Lebensdauer das Quantensystem (beispielsweise ein Farbstoffmolekül) mit regelmäßigen Laserpulsen angeregt. Elektronisch startet mit dem Aussenden des Laserpulses eine elektronische Stoppuhr, welche bei der Detektion eines Photons auf dem Detektor wieder stoppt. Durch die kontinuierlichen Laserpulse mit bestimmter und einstellbarer Puls-Repetitionsrate werden die im Bezug zum Anregungspuls zeitlich korrelierten Photonen in einem Histogramm dargestellt. Dieses Histogramm



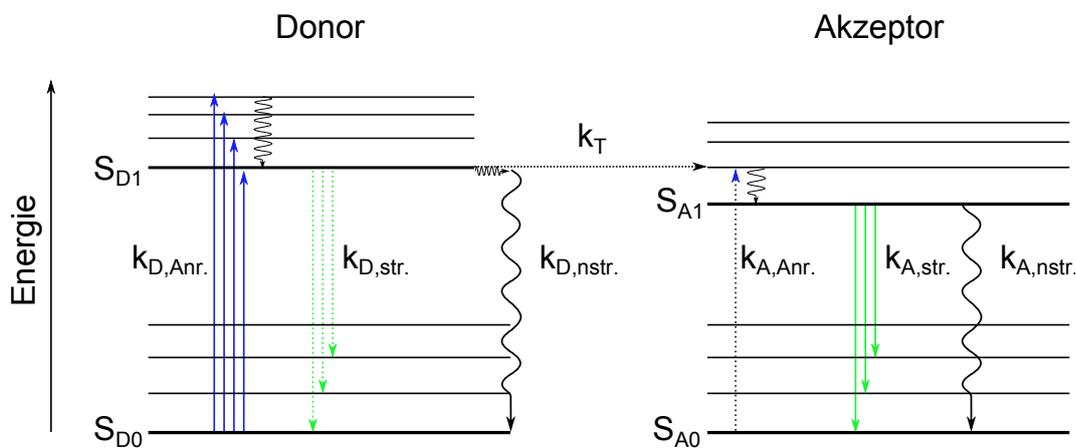
**Abbildung 5.2:** Erklärung des TCSPC-Prinzips nach [39]. Durch einen kontinuierlichen Laserpuls wird die Probe angeregt und emittiert. Dieses Photon wird auf dem Detektor zu unterschiedlichen Zeiten detektiert (Abbildung unten) und in einer monoexponentiellen Kurve (Abbildung oben) zusammengefasst.

beschreibt die statistische Verteilung der eingetroffenen Fluoreszenz-Photonen bzw. den zeitlichen oft monoexponentiellen Zerfall von angeregten Molekülen oder anderen optisch anregbaren quantenmechanischen Systemen. Sobald ein Photon von dem Detektor detektiert wurde, folgt die sogenannte Totzeit, welche verstreichen muss bis die Photodiode das nächste Photon wieder zählen kann. Alle Photonen, die während dieser Totzeit auf den Detektor treffen, können nicht detektiert werden. Avalanche Photodioden (APD) haben sich aufgrund der hohen Detektionswahrscheinlichkeit und Quanteneffizienz, geringer Dunkelzählrate, geringer Totzeit sowie hohen Zeitauflösung als Detektor etabliert. Eine APD ist eine schnelle Photodiode, die den inneren Photoeffekt zur Ladungsträgererzeugung nutzt, welche durch eine interne Verstärkung, den sogenannten Avalanche-Effekt, erhöht wird. Dadurch lassen sich mit diesen Photodioden einzelne Photonen detektieren. Entscheidend für die hohe Zeitauflösung einer APD ist die Größe der aktiven Fläche. Je größer die Fläche, desto größer die zeitliche Streuung der gemessenen Photonen [108]. Die zeitlich minimale Auflösungsgrenze des kompletten Systems ist über die Instrumentenfunktion (englisch: instrument response function, IRF) limitiert [39]. Sie beschreibt neben der Pulsform des Lasers die zeitliche Dispersion aller optischen Elemente des Mikroskops wie Linsen, Filter, Detektoren etc. sowie die der Messelektronik und somit die Detektionsdauer einer Probe mit einer Lebensdauer von möglichst 0. Die Messungenaugkeit jeder einzelnen Komponente sowie besonders die des Detektors und des endlichen Laserpulses trägt zu einer Verbreiterung der IRF bei. Die IRF wird für die Bestimmung eines Fluoreszenz-Zerfalls bzw. einer Fluoreszenz-Lebensdauer aus einem Histogramm benötigt und daher für jedes Mikroskop gemessen. Dazu wird das Streusignal einer verdünnten Probe aufgenommen, da Streuprozesse schneller als Fluoreszenz-Prozesse ablaufen. Die IRF limitiert die messbaren Prozesse, da nur solche gemessen werden können, welche deutlich länger als die IRF des Mikroskops sind. Typische Werte von IRFs sind zwischen 0,5 und 2 ns [39]. Zur Bestimmung der Fluoreszenz-Lebensdauer eines Moleküls aus den gemessenen Histogrammen muss die systembedingte IRF in der Auswertung berücksichtigt werden. Daher wird Gleichung 5.6 zu [54]:

$$I(t) = I_0[e^{(-\frac{t}{\tau})} * IRF(t)], \quad (5.7)$$

### 5.1.3 Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET)

Unter dem Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET) versteht man die Wechselwirkung der Übergangsdipolmomente zweier Farbstoffmoleküle [39, 109, 110]. Der oszillierende Dipol eines Farbstoffmoleküls, dem sogenannten Donor, kann dabei Energie auf ein resonantes Akzeptormolekül übertragen. Der Übergang der Energie des elektronisch angeregten Donors auf den im Grundzustand befindlichen Akzeptor erfolgt dabei strahlungslos (siehe Abbildung 5.3). Grundvoraussetzung für FRET ist neben dem spektralen Überlapp



**Abbildung 5.3:** Energie-Termschema mit möglichen Übergängen beim Förster-Resonanz-Energietransfer von einem Donor- auf ein Akzeptormolekül (Vergleich Abbildung 3.4), wobei  $k_{D,Anr.}$  die Anregungsrate des Donormoleküls,  $k_{D,str.}$  und  $k_{A,str.}$  die radiativen Zerfallsraten beider Moleküle,  $k_{D,nstr.}$  und  $k_{A,nstr.}$  die nicht-strahlende Zerfallsrate und  $k_T$  die FRET-Rate darstellt. Nach Anregung des Donormoleküls durch Absorption eines Photons befindet sich das Elektron nach kurzer innerer Konversion ( $10^{-10}$  s) im vibronischen Grundzustand des angeregten elektronischen Zustandes  $S_1$  des Donormoleküls. Die FRET-Rate  $k_T$  stellt nun einen Konkurrenzprozess zu den nicht-strahlenden ( $k_{D,nstr.}$ ) und strahlenden ( $k_{D,str.}$ ) Raten des Donors dar. Bei der Übertragung der Energie an das Akzeptormolekül in ein höheres vibronischen Zustand erfolgt wiederum die innere Konversion in den Schwingungsgrundzustand des angeregten  $S_{A1}$ -Niveaus. Der Übergang in den Grundzustand  $S_{A0}$  kann entweder strahlungslos ( $k_{A,nstr.}$ ) oder unter der Emission eines Photons erfolgen ( $k_{A,str.}$ ).

der Emission des Donors mit der Absorptionsbande des Akzeptors die Orientierung der Dipolmomente zueinander. Zusätzlich ist die Quantenausbeute des Donors und der

Abstand beider Moleküle zueinander entscheidend. Da das elektrische Feld eines Dipols proportional zu  $r^{-3}$  ( $r$  beschreibt die Entfernung) abnimmt, verringert sich die Wahrscheinlichkeit eines Energietransfers mit  $r^{-6}$  [38, 39]. Die Transferrate  $k_T(r)$ , bei welcher ein Förster-Resonanz-Energietransfer stattfindet, kann im einfachsten Fall (Abstand zweier Farbstoffmoleküle entspricht dem Förster-Radius) definiert werden als [39]:

$$k_{T(r)} = \frac{1}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{r} \right)^6, \quad (5.8)$$

mit

$$\tau_D = \frac{1}{k_{str} + k_{nstr}}, \quad (5.9)$$

wobei  $\tau_D$  die Lebensdauer des Donors ohne Akzeptor,  $R_0$  den Förster-Radius und  $r$  den Abstand zwischen Donor und Akzeptor beschreibt. Unter dem Förster-Radius versteht man den Abstand der beiden Farbstoffmoleküle bei dem mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% Energieübertragung vom Donor auf den Akzeptor stattfindet. Typischerweise liegt dieser in einem Bereich von 2-6 nm. Befinden sich also Donor und Akzeptor im Abstand des Förster-Radius' ( $R_0 = r$ ), ist die Transferrate gleich der reziproken Zerfallsrate des Donors ( $k_{T(r)} = \frac{1}{\tau_D}$ ). Aufgrund der Komplexität des FRET-Transfers kann die Transferrate genauer folgendermaßen ausgedrückt werden [39]:

$$k_{T(r)} = \frac{Q_D \kappa^2}{\tau_D r^6} \left( \frac{9000(\ln 10)}{128\pi^5 N n^4} \right) \int_0^\infty F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda, \quad (5.10)$$

wobei  $Q_D$  die Quantenausbeute des Donors ohne Akzeptor,  $\kappa$  der relativen Orientierung beider Dipole zueinander,  $n$  dem Brechungsindex des Mediums,  $N$  der Avogadro-Zahl,  $F_D(\lambda)$  dem Emissionsspektrum des Donors und  $\epsilon_A(\lambda)$  dem Extinktionskoeffizient des Akzeptors entspricht. Unter der Annahme  $R_0 = r$  vereinfacht sich Gleichung 5.8 zu  $k_T = \frac{1}{\tau_D}$ . Somit kann Gleichung 5.10 nach dem Förster-Radius aufgelöst werden. Es gilt [39]:

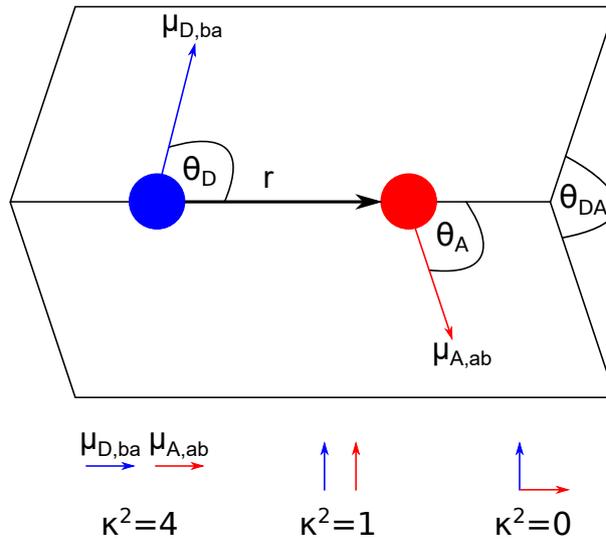
$$R_0^6 = \frac{9000(\ln 10) \kappa^2 Q_D}{128\pi^5 N n^4} \int_0^\infty F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda, \quad (5.11)$$

So kann der Förster-Radius aus den spektralen Eigenschaften von Donor und Akzeptor sowie der Donor-Quantenausbeute bestimmt werden. Nach Abbildung 5.4 liegt  $\kappa^2$  zwischen 0 und 4 und ist für eine zufällig orientierte Probe  $\kappa^2 = 2/3$ . Berechnet wird dieser Faktor

nach [39]:

$$\kappa^2 = (\cos \theta_T - 3 \cos \theta_D \cos \theta_A)^2, \quad (5.12)$$

wobei  $\theta_T$  den Winkel zwischen dem Donoremissions-Dipolmoment und dem Akzeptorabsorptions-Dipolmoment,  $\theta_D$  und  $\theta_A$  die Orientierung der Moleküle (Abbildung 5.4) beschreiben. Das Integral aus Gleichung 5.10 und 5.11 zeigt das Überlappungsintegral zwischen Donor-



**Abbildung 5.4:** Abhängigkeit des Orientierungsfaktors  $\kappa^2$  von der gegenseitigen Lage des Donoremissions-Dipolmoments und des Akzeptorabsorptions-Dipolmoments nach [39].

emission und Akzeptorabsorption und wird als  $J(\lambda)$  bezeichnet (siehe Abbildung 5.5) [39]:

$$J(\lambda) = \int_0^\infty F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda. \quad (5.13)$$

Ein weiterer wichtiger Parameter zur Quantifizierung des Transfers ist die FRET-Effizienz. Diese kann ausgedrückt werden als [39]:

$$E_{FRET} = \frac{k_T(r)}{\frac{1}{\tau_D} + k_T(r)} \quad (5.14)$$

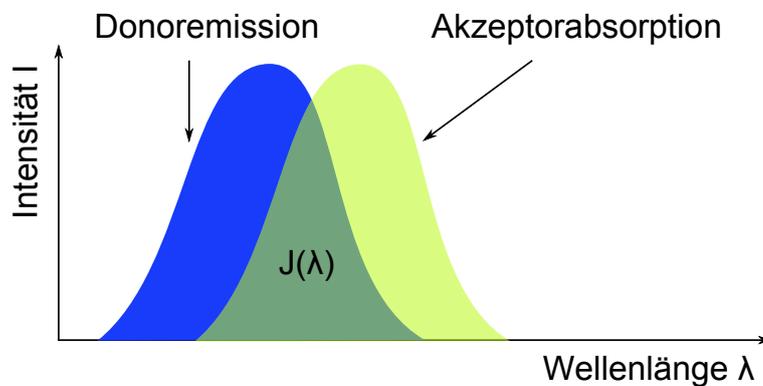
oder über die Lebensdauer des Donors [39]:

$$E_{FRET} = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} = 1 - \frac{\frac{1}{k_{str} + k_{nstr} + k_T}}{\frac{1}{k_{str} + k_{nstr}}}, \quad (5.15)$$

bzw. über den Abstand [39]:

$$E_{FRET} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}, \quad (5.16)$$

wobei  $\tau_{DA}$  die Lebensdauer des Donors mit Akzeptor und  $\tau_D$  ohne Akzeptor beschreibt. Aufgrund des zusätzlichen Relaxationskanals  $k_T$  des Donors verkürzt sich die Lebensdauer des Donors mit Akzeptor entsprechend, wodurch der FRET-Prozess schließlich quantifiziert werden kann. Aufgrund der Abstandsabhängigkeit des Transfers kann FRET in biologischen Anwendungen zur Bestimmung von Abständen der beiden Moleküle als sogenanntes spektroskopisches Lineal verwendet werden. So werden z.B. Proteine an beiden Enden mit Akzeptor und Donor kovalent verknüpft, um über die FRET-Effizienz Rückschlüsse über die Größe des Proteins zu ziehen. So können auch Abstandsänderungen, z.B. durch Konformationsänderungen des Proteins, anhand der geänderten Transferrate klassifiziert werden.



**Abbildung 5.5:** Schematische Darstellung des Überlappungsintegrals  $J(\lambda)$  (grün) mit der Überschneidung aus Donoremission (blau) und Akzeptorabsorption (gelb).

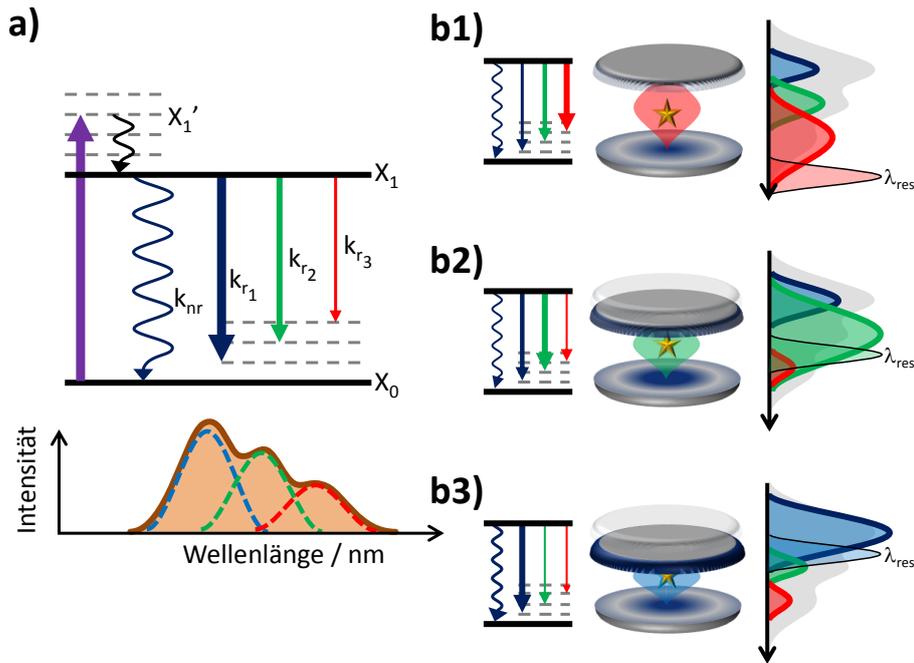
## 5.2 Experimenteller Aufbau

Das in diesem Kapitel gezeigte konfokale Mikroskop ist ein vollständiger Neuaufbau eines weiteren optischen Systems im Arbeitskreis Meixner, welches in Zusammenarbeit mit Dr. Alexander Konrad geplant, konstruiert und aufgebaut wurde. Dr. Andreas Kern und Dipl.-Phys. Felix Blendinger steuerten zu diesem erfolgreichen Aufbau die Programmierung eines Scan-Generators und weiterer Elemente der LabView-Steuerung bei. Neben dem Aufbau werden in den folgenden drei Unterkapiteln (5.3, 5.4 und 5.5) die ersten durchgeführten und publizierten Experimente nach Fertigstellung des Mikroskops beschrieben. Auch bei diesem System wird die Probe durch das sogenannte sample scanning abgerastert, d.h. die Probe wird mittels Scan-Tisch verfahren und gleichzeitig der anregende Laser(-fokus) konstant gehalten. Der Verlauf der Laseranregung sowie die verschiedenen Detektionsstrahlen sind in Abbildung 5.6 dargestellt. Zur Anregung der Probe werden zwei fasergekoppelte gepulste Laser verwendet, zum einen eine 485 nm Laserdiode (PicoQuant, LDH-P-C-485) und zum anderen ein 532 nm Nd:YAG Laser (PicoQuant, LDH-P-FA-530L), welche nach Auskopplung aus der Faser durch einen Bandpassfilter (AHF Analysentechnik, F94-488 und F49-532) spektral aufgereinigt werden. Dabei lässt sich die Diode per Software elektronisch bis zu einer maximalen gepulsten Laserleistung von 0,7 mW regeln (auch CW möglich). Bei dem 532 nm Laser lässt sich mittels einer Spaltöffnung am Laser die Leistung bis max 20 mW steuern. Mit Hilfe eines Strahlteilers (AHF Analysentechnik, F38-M03) werden beide Laserstrahlen zu einem Anregungsstrahl überlagert. Die überlagerten Laserstrahlen treffen nun auf ein telezentrisches System, um den Laserstrahl auf einen Strahldurchmesser von 8 mm zu vergrößern. So wird die vollständige Ausleuchtung der Blende des Objektivs erzielt. Durch die Implementierung einer Lochblende im Brennpunkt der beiden Linsen werden zusätzlich störende höhere Lasermoden unterdrückt und die Probe somit durch einen linear polarisierten Gaußstrahl angeregt. Neben der elektronischen Möglichkeit oder der Einstellung per Spaltöffnung kann die Laserleistung zudem per Graufilterrad verschiedener sogenannter optischer Dichten (OD) von 0,5-5 reduziert werden. Die resultierende Laserleistung wird mittels Powermeter (Coherent, FieldMax II) überprüft. Über insgesamt fünf Spiegel und einen Strahlteiler (AHF Analysentechnik, Sonderanfertigung) wird der Lichtstrahl in das Objektiv (Zeiss alpha Plan-Apochromat 63x/1,46 Öl,  $NA = 1,46$ ) gelenkt und auf die Probenebene fokussiert. Durch den speziellen Strahlteiler vor dem Objektiv können beide

Laser auf das Objektiv reflektiert werden, Fluoreszenz zwischen den Laserwellenlängen und ab 540 nm wird hingegen transmittiert. Das gegenüber der Anregung rotverschobene emittierte Licht der Probe des Raum- oder Tieftemperaturpfades wird vom Objektiv wieder eingesammelt und kollimiert. Das durch den Strahlteiler transmittierte Signal wird über eine achromatische Linse mit Brennweite  $f=60$  mm (Thorlabs, AC254-060-B-ML) auf eine Punktlochblende (Durchmesser:  $50 \mu\text{m}$ ) fokussiert, um bei optimaler Justage nur Signal der Fokusebene zu detektieren und Licht außerhalb der Fokusebene zu unterdrücken. Ein weiterer Filter (AHF Analysentechnik, NF01-488/532-25x5.0), welcher die anregende Laserstrahlung unterdrückt und rotverschobene Fluoreszenz transmittiert, folgt nach dem telezentrischen System. Durch einen computergesteuerten Klappspiegel kann zwischen zwei Detektionsmöglichkeiten unterschieden werden. Die Aufnahme von Spektren erfolgt über ein Spektrometer, bestehend aus Monochromator (Acton SP 2500) mit drei verschiedenen Gittern (150, 600 und  $1200 \text{ g/mm}$ ) und EMCCD-Kamera (Princeton Instruments PRO-EM 512). Dazu wird der Detektionsstrahl mit einer Linse mit Brennweite  $f=50$  mm (Thorlabs, AC254-050-A-ML) auf den Eintrittsspalt des Monochromators fokussiert. Wird der Lichtstrahl auf die beiden APDs gelenkt, folgt ein weiterer Strahlteiler (AHF Analysentechnik F48-533), welcher Wellenlängen bis 532 nm in 90 Grad ablenkt und Wellenlängen über 532 nm transmittiert. Strahlen mit 90-Grad-Ablenkung werden mit einer Photodiode von Perkin Elmer (SPCM-AQR-14), transmittierte Strahlen mit einer Diode des Types PDM-100-CTD (Micro Photon Devices) detektiert. Auch hier wird der Detektionsstrahl mittels Linse ( $f=50$  mm, Thorlabs, AC254-050-A-ML) auf die aktive Fläche der APDs fokussiert. Der optische Aufbau ist zur Schwingungsdämpfung auf einem aktiv gedämpften Tisch (Newport, RS 4000 und I-2000) aufgebaut. Mit Hilfe von LabView konnte das Mikroskop und die einzelnen Komponenten in einer Software vereint werden. Dies ermöglicht die Automatisierung von kompletten Messreihen ohne Eingreifen des Operators. Durch die Implementierung einer Auswertelektronik für zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung eignet sich das System für die Messung von Fluoreszenz-Lebensdauern. Bei der Konzeptionierung des Aufbaus wurde zudem auf die modulare und daher einfache Implementierung eines optischen Resonators besonderen Wert gelegt.



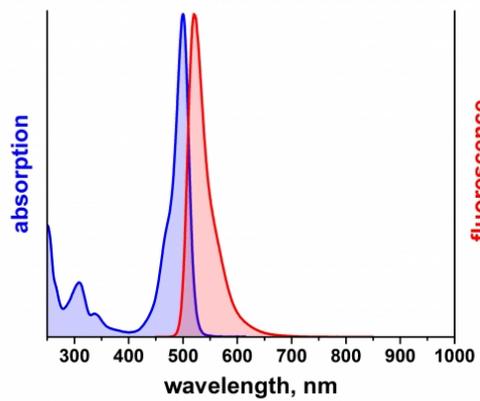
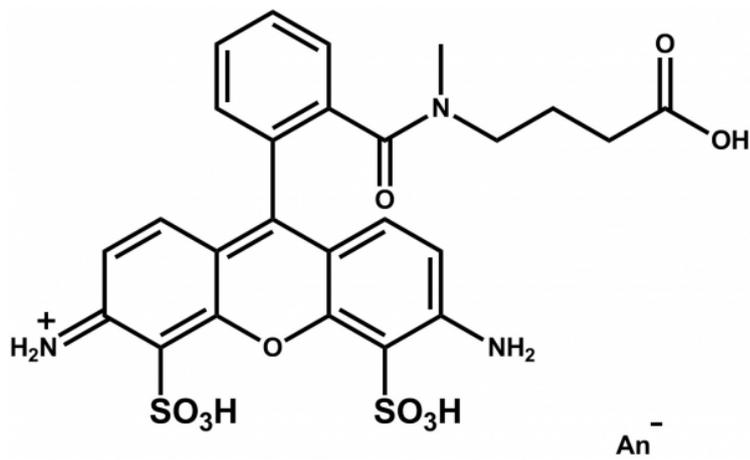
tel 3.3). So können durch unterschiedliche Spiegelabstände des Resonators sowohl das Fluoreszenz-Spektrum als auch die radiativen Übergänge des Farbstoffs gezielt verändert werden. Durch die lokalen optischen Modendichten des Resonators lassen sich die einzelnen Banden der Übergänge darstellen, was im freien Raum durch die inhomogene Verbreiterung nicht möglich wäre. Die im freien Raum als auch im Resonator bei verschiedenen Spiegelabständen aufgenommenen Spektren und Lebensdauern wertete dabei Dr. Alexander Konrad mit Hilfe eines theoretischen Modells [89, 112] aus. Dabei wurden die detektierten spektralen und zeitaufgelösten optischen Informationen mit dem Wellenlängen abhängigen Purcell-Effekt korreliert. Dadurch konnten die strahlenden und nicht-strahlenden Relaxationseigenschaften der angeregten Moleküle in Abhängigkeit der Resonatorstellung bestimmt werden. Abbildung 5.7a und b1-b3 stellen die vorhandenen Übergänge im freien Raum und bei unterschiedlichen Spiegelabständen dar. Dabei wird jeder einzelne Übergang mit Hilfe eines Gauss-Fits und den Parametern Amplitude, spektrale Position und Halbwertsbreite beschrieben. Zudem kann durch die per Weißlichttransmission bestimmte Resonatorconfiguration der Purcell-Faktor berechnet werden [89, 112, 113]. Wendet man nun den wellenlängenabhängigen Purcell-Faktor auf eine vibronische Fluoreszenz-Bande an, erhält man die daraus resultierende Veränderung des radiativen Zerfalls [111]. Mit Hilfe der gemessenen absoluten Zerfallsrate (Summe aus strahlender und nicht-strahlender Rate) lässt sich damit der Anteil der nicht-strahlenden Rate bestimmen [111]. Die Evaluierung durch einen Fit-Algorithmus läuft dabei nach folgendem Schema: Zuerst werden die detektierten einzelnen Übergänge im Spektrum angefitet und darauffolgend anhand der Resonatorstellung der Purcell-Faktor ermittelt. Abschließend wird die Abweichung zwischen den gemessenen Spektren und Zerfallsraten der Fluoreszenz im freien Raum und im Resonator mittels Fit-Algorithmus und Variation der spektralen Gauss-Parameter und Quantenausbeute angepasst bzw. minimiert. Der große Vorteil dieser Methode ist die Unabhängigkeit der Anregungsleistung und die Anzahl der detektierten Moleküle im fokalen Volumen. Daher ist die Intensität der einzelnen vibronischen Banden nur von dem Purcell-Faktor und dem gegebenen Intensitätsverhältnis im freien Raum abhängig.



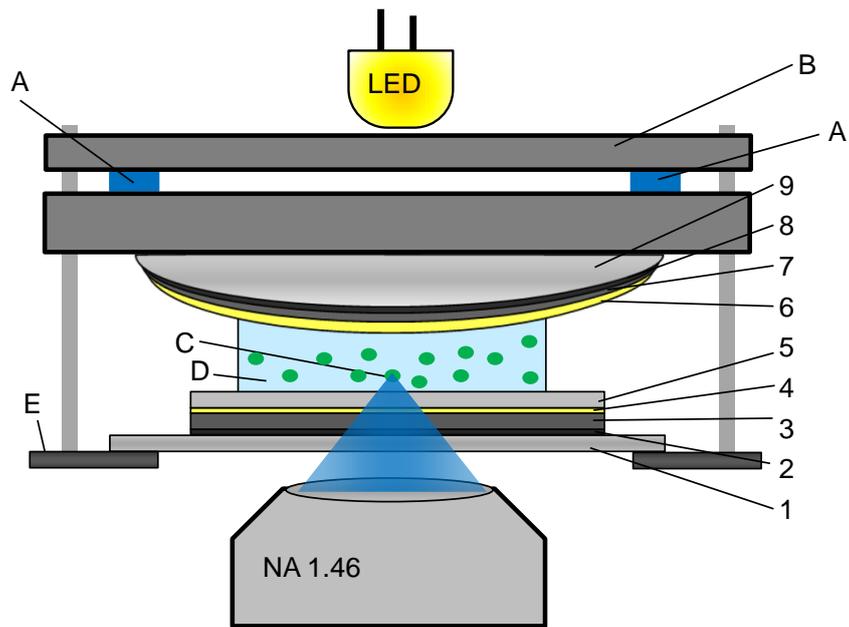
**Abbildung 5.7:** a) Jablonski-Termschema mit Grundzustand  $X_0$  und angeregtem Zustand  $X_1$  nach [111], veröffentlicht von „The Royal Society of Chemistry“. Nach der Absorption (violetter Strich) in den vibronisch und elektronisch angeregten Zustand  $X_1'$  relaxiert das System zu  $X_1$ . Das endgültige Relaxieren in den Grundzustand kann über mehrere strahlende ( $k_{1r}$ ,  $k_{2r}$  und  $k_{3r}$ ) Übergänge oder nicht radiativ ablaufen. Dabei kann jeder Übergang mittels Gauss-Fit beschrieben werden. Die Wahrscheinlichkeit eines Übergangs ist durch die Pfeildicke dargestellt. b1-3) Einfluss des Spiegelabstandes des Resonators auf die strahlenden Übergänge.

### 5.3.1 Experimenteller Teil und Probenpräparation

Sowohl die Experimente im freien Raum als auch im Resonator wurden mit Hilfe des in Kapitel 5.2 beschriebenen konfokalen Mikroskops durchgeführt. Ein Tropfen (40  $\mu\text{l}$ ) einer wässrigen Lösung aus Atto488-Molekülen mit einer Konzentration von ca.  $1 \times 10^{-7}$  wurde mit einer 4% PVA-Lösung gemischt und per Spin-Coating (5 min bei 6000 Umdrehungen/min) auf ein mit Chromschwefelsäure (mehrfach gespült mit Tri-Dest und Methanol) gereinigtes Deckglas (Menzel 22x22 mm, Thermo Fisher Scientific, USA) aufgetragen. Dadurch konnte ein dünner Film des Farbstoffmoleküls Atto488 aufgetragen werden. Die Strukturformel sowie optischen Eigenschaften des Farbstoffmoleküls Atto488 sind in Abbildung 5.8 dargestellt. Der Farbstoff Atto488 wurde aufgrund seiner hohen Quantenausbeute gewählt. Zudem ist er aufgrund seines monoexponentiellen Zerfalls im Nanosekundenbereich durch den Purcell-Effekt manipulierbar. Für die Experimente im Resonator wurden ein Deckglas (Menzel 22x22 mm) sowie eine konvexe Linse (Thorlabs, LA1433,  $f=150$  mm,  $R=77,3$  mm) mittels Elektronenstrahlverdampfer (Edwards, EB3) mit einer reflektierenden Schicht aus 1 nm Chrom, 40 nm (Deckglas) und 60 nm (Linse) Silber, 1 nm Gold und 80 nm  $\text{SiO}_2$  beschichtet. Die verwendeten Linsen (Thorlabs, LA1433,  $f=150$  mm,  $R=77,3$  mm) wurden zuvor mit Methanol und dreifach destilliertem Wasser gründlich gereinigt. Da der Radius der Spiegel um einiges größer als der Spiegelabstand und der Radius des Lasers ist, kann der Resonator als plan-paralleler Fabry-Pérot-Resonator angesehen werden. Nach der Beschichtung des Deckglases mit einer reflektierenden Schicht wurde die Atto488-PVA-Lösung wieder (per Spin-Coating) aufgetragen. Anschließend wird die Linse an einem piezoelektrischen Halter (Thorlabs, KC1-T-PZ) fixiert, um den Resonatorabstand reproduzierbar einstellen und kontrollieren zu können (siehe Abbildung 5.9). Durch die Beleuchtung des Resonators mit einer Weißlicht-LED kann mittels Transmissionspektrum der Abstand der Spiegel bestimmt werden. Der genaue Aufbau des Resonators ist in Abbildung 5.9 dargestellt. Um die Fluoreszenz-Spektren und Zerfallskurven bei verschiedenen Resonatorabständen aufzunehmen, wurde die Probe mittels eines Scan-Tisches lateral durch den beugungsbegrenzten Laserfokus geschoben. Dieser Messablauf (genauer in Kapitel 5.3.2 beschrieben) wurde durch ein Labview-Programm von Dr. Alexander Konrad völlig automatisiert betrieben.



**Abbildung 5.8:** Strukturformel (oben) und Absorptions- sowie Fluoreszenzspektrum (unten) des Farbstoffmoleküls Atto488 [114].



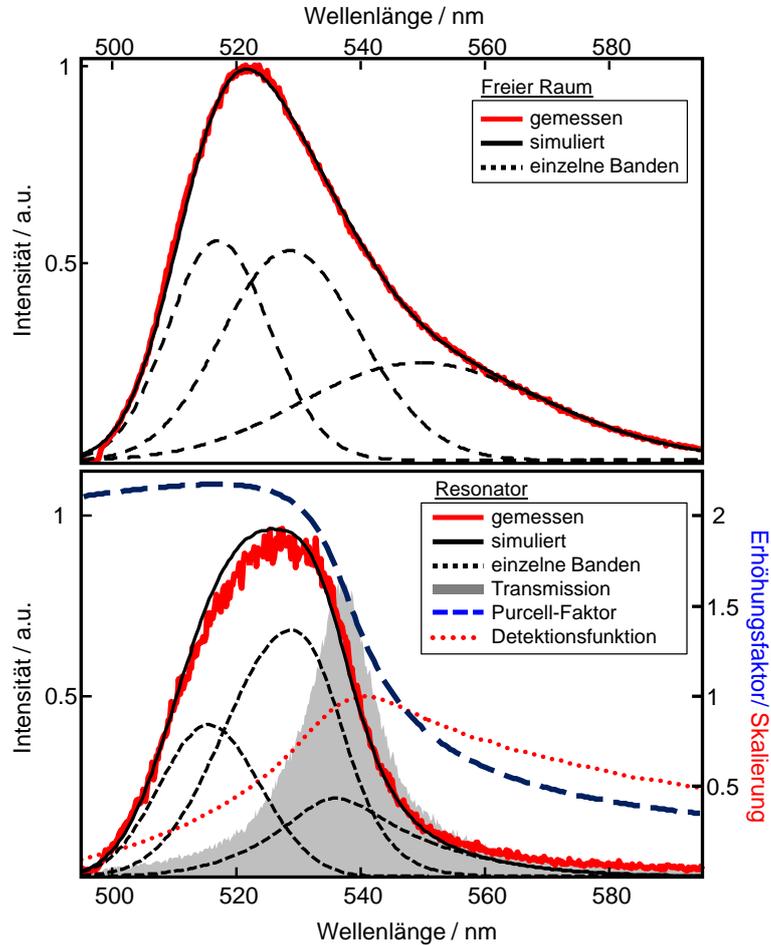
**Abbildung 5.9:** Schematischer Aufbau des Resonators mit weißer LED zur Messung der Weißlichttransmission nach [111](supplementary information), veröffentlicht von „The Royal Society of Chemistry“. 1: Deckglas, 2: 1 nm Chrom, 3: 40 nm Silber, 4: 1 nm Gold, 5: 80 nm  $SiO_2$ , 6: 1 nm Gold, 7: 60 nm Silber, 8: 1 nm Chrom, 9: Linse mit Brennweite  $f=150$  mm, A: Piezo-Aktuatoren in Spiegelhalter (B), C: Probe, D: PVA-Wasser Gemisch, E: Scan-Tisch (vergleiche Kapitel 5.2).

### 5.3.2 Ergebnisse

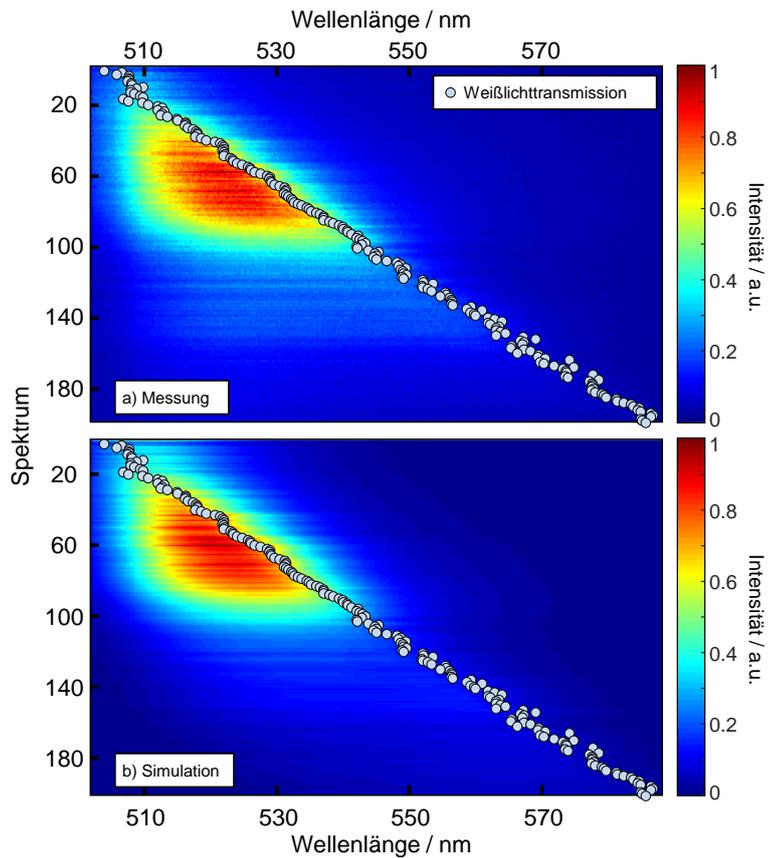
Mit einer 488 nm Laserdiode mit Laserpulsbreite von 100 ps und einer Wiederholungsrate von 40 MHz wurden eine Vielzahl von konfokalen Fluoreszenz-Spektren und Lebensdauern bzw. -Zerfallsraten der Atto488-Moleküle aufgenommen. Die gesammelten Daten wurden mittels Fit-Algorithmus ausgewertet. Abbildung 5.10 zeigt das gemessene Fluoreszenz-Spektrum eines Atto488-Farbstoffs in einer PVA-Matrix. Das gemessene Spektrum (rote Kurve) kann dabei als Superposition dreier Gauss-Fits (schwarz gestrichelte Kurven), welche jeweils einen vibronischen Übergang darstellen, beschrieben werden. Die Summe dieser vibronischen Banden stellt die schwarze Linie dar. Zudem wird der Einfluss eines Resonators mit Spiegelabstand von 540 nm (grauer Lorentz-Fit) beschrieben. Dabei zeigt die blaue gestrichelte Kurve den Purcell-Effekt, welcher Anhand des Weißlicht-Transmissionsspektrums berechnet wurde [111]. Die rot gepunktete Linie beschreibt die Detektionsfunktion, welche die winkelabhängige Emission des Quantenemitters im Resonator und die NA des Objektivs berücksichtigt. Durch den Purcell-Effekt ist deutlich zu erkennen, dass die vibronischen Banden gegenüber dem freien Raum beeinflusst werden. Die Bande bei 549 nm wird bei dieser Resonatorconfiguration nahezu vollständig unterdrückt, wohingegen die Bande bei 530 nm deutlich verstärkt wird. Mit Hilfe des Spektrums im freien Raum sowie des Purcell-Effekts und unter der Berücksichtigung der Detektionsfunktion konnte das modifizierte Spektrum errechnet werden.

Abbildung 5.11 zeigt den Vergleich der Fluoreszenz-Spektren zwischen gemessenen und simulierten Werten bei unterschiedlichen Spiegelabständen bzw. resonanten Wellenlängen (500-590 nm) des Resonators. Die grauen Punkte beschreiben den Lorentz-Fit der Weißlichttransmission, welche kurz vor dem Fluoreszenz-Signal aufgenommen wurden. Jedes Spektrum wurde aus denselben vibronischen Gauss-Banden aus Abbildung 5.10 zusammengesetzt und für jede resonante Wellenlänge bzw. dessen Purcell-Effekt berechnet.

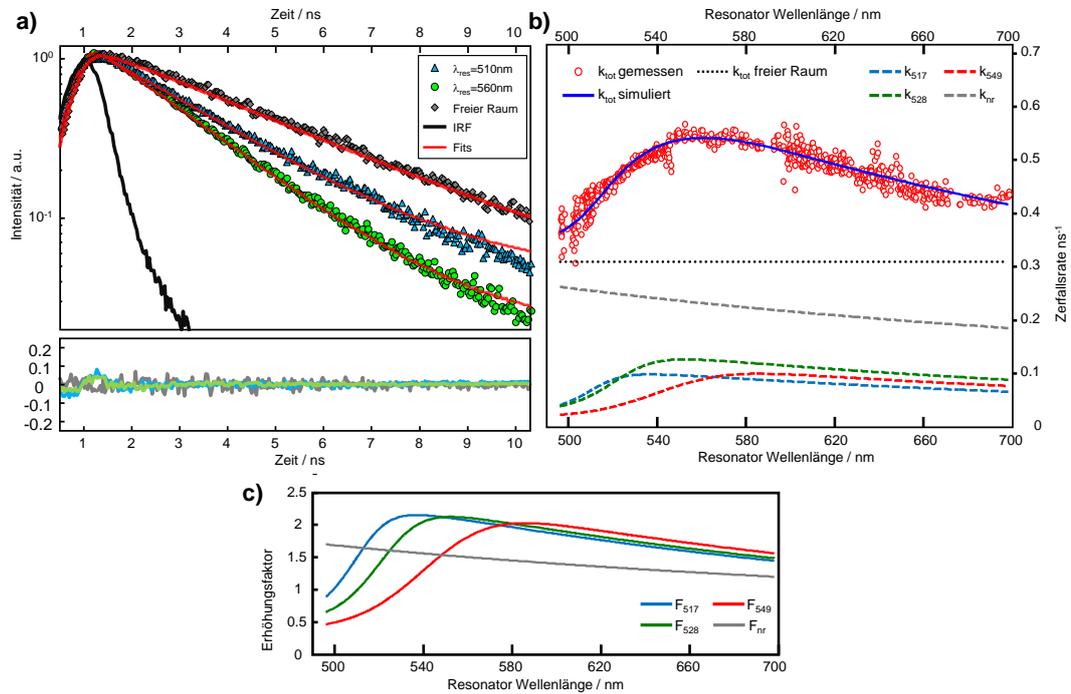
Abbildung 5.12a stellt Zerfallskurven des Atto488-Farbstoffs im freien Raum sowie im Resonator dar. Diese können als monoexponentielle Kurven durch eine Faltung aus der Modelfunktion mit der IRF beschrieben werden. Eine Auswertung der experimentellen Zerfallskurven in Abhängigkeit der Resonanzwellenlänge ergibt eine erhöhte Zerfallsrate gegenüber den Experimenten ohne Resonator. Abbildung 5.12b zeigt die Zerfallsraten (rote Kreise) und Abbildung 5.12c die jeweiligen berechneten Erhöhungsfaktoren der einzelnen strahlenden und nicht-strahlenden Übergänge.



**Abbildung 5.10:** Ensemble Fluoreszenz-Spektrum (rote Kurven) von Atto488 im freien Raum (oben) und bei der Resonanzwellenlänge von 540 nm (unten) zusammen mit drei Gaussfunktionen (schwarze gestrichelte Kurven) nach [111], veröffentlicht von „The Royal Society of Chemistry“. Die drei Gauss-Fits im Resonator resultieren aus der Anwendung des Purcell-Faktors (blau) und der winkelsensitiven Detektionsfunktion (rot) auf die drei ursprünglichen Gaussfunktionen. Die graue Fläche beschreibt die Weißlichttransmission (Lorentz-Fit). Die gaussförmigen spektralen Banden im freien Raum werden durch den Resonator charakteristisch verzerrt und das Intensitätsverhältnis verändert.



**Abbildung 5.11:** Gemessene (oben) und simulierte Fluoreszenz-Spektren-Serie (unten) des Atto488-Farbstoffs als Konturplot bei variablen Resonatorwellenlängen nach [111], veröffentlicht von „The Royal Society of Chemistry“. Die Simulation basiert auf den jeweiligen Purcell-Faktoren und einer geänderten Detektionseffizienz der drei Banden des Spektrums im freien Raum.



**Abbildung 5.12:** a) Fluoreszenz-Zerfallskurven von Atto488 im freien Raum (graue Rauten) und bei den Resonanzwellenlängen 510 nm (blaue Dreiecke) und 560 nm (grüne Kreise) nach [111], veröffentlicht von „The Royal Society of Chemistry“. Die Kurven sind mit monoexponentiellen Kurven und der Faltung der Instrumentenfunktion (IRF, schwarze Linie) gefittet (rote Kurven). Die Fluoreszenz-Zerfallskurven (rot) wurden durch die Faltung der IRF (schwarze Linie) mit verschiedenen monoexponentiellen Zerfallskurven gefittet. Dabei konnten folgenden Zerfallsraten bestimmt werden: im freien Raum (grau):  $0,31 \text{ ns}^{-1}$ , im Resonator bei Weißlichttransmission bei 510 nm (blau):  $0,41 \text{ ns}^{-1}$  und im Resonator bei Weißlichttransmission bei 560 nm (grün):  $0,55 \text{ ns}^{-1}$ . b) Relaxationsraten eines Atto488-Farbstoffs als Funktion der Resonanzwellenlänge nach [111], veröffentlicht von „The Royal Society of Chemistry“. Dabei stellen die roten Kreise die experimentell bestimmten und die blaue Kurve die berechneten Werte dar. Bestimmt wurden diese Größen durch monoexponentielle Fits von TCSPC-Histogrammen. Die Summe der einzelnen radiativen Ratenkonstanten (grün, blau und rote Linien) und nichtradiativen Ratenkonstanten (grau) ergeben die blaue Linie, welche die Simulation der experimentell bestimmten Messwerte darstellt. c) Berechnete Erhöhungsfaktoren in Abhängigkeit der Resonanzwellenlänge für die strahlenden und nicht-strahlenden Übergänge nach [111], veröffentlicht von „The Royal Society of Chemistry“.

### 5.3.3 Diskussion

Die Bestimmung der Fluoreszenz-Eigenschaften in Form von Spektren bzw. Lebensdauern ist durch das Phänomen der inhomogenen Verbreiterung nicht einfach zu realisieren. So können Fluoreszenz-Spektren des Atto488-Farbstoffs mit verschiedenen strahlenden Übergängen vom angeregten Zustand in den Grundzustand aufgrund dieser inhomogenen Verbreiterung nicht ohne weiteres aufgelöst werden. Dieser Effekt wird gewöhnlich durch Messungen an Einzelmolekülen oder bei tiefen Temperaturen (Kapitel 6.1) umgangen. In diesem Fall erlaubt die Verwendung von Fabry-Pérot-Resonatoren durch die gezielte Modifikation von Quantenemittern auch Messungen im Ensemble, da durch die externe Störung die inhomogene Verbreiterung unterdrückt wird. Von ausgesprochener Wichtigkeit ist dabei, dass die Störung des Resonators jederzeit bekannt ist, realisierbar durch die Aufnahme von Weißlichttransmissionsspektren. Eine weitere Schwierigkeit ist die Möglichkeit, dass Emitter strahlungslos aus dem angeregten in den Grundzustand relaxieren können, was mit unseren optischen Möglichkeiten nicht detektierbar ist. Die experimentell bestimmte Fluoreszenz-Lebensdauer repräsentiert dabei nur die totale Relaxationsrate des angeregten Zustandes. Bei diesen Experimenten konnte beobachtet werden, dass bei großer Überlappung zwischen Emitterfluoreszenz und dem Purcell-Faktor eine deutliche Verkürzung der Lebensdauer des angeregten Zustandes im Vergleich zum freien Raum eintritt. Bei geringer werdendem Spiegelabstand erkennt man zudem (Abbildung 5.12c) die Erhöhung der nicht-strahlenden Rate aufgrund von reduziertem Emitter-Metallspiegelabstand. Aufgrund des erhöhten Nahfeldeffekts bei geringeren Spiegelabständen und der resultierenden erhöhten Quenching-Gefahr muss von einem erhöhten nicht-strahlenden Zerfall ausgegangen werden. Als Näherung wurde die nicht-strahlende Rate in Abhängigkeit der resonanten Spiegelabstände mit Hilfe der  $r^{-3}$  berechnet. Die experimentell bestimmten Zerfallsraten passen so sehr gut zu den Superpositionen der einzelnen Relaxationsprozesse, bestehend aus den drei strahlenden und der nicht-strahlenden Komponente.

Für die Veränderung der strahlenden und nicht-strahlenden Relaxationsprozesse von Emitttern sind neben Fernfeldeffekten [51, 115–118] wie den Resonatoren, sowohl Nahfeldeffekte durch Nanopartikel [59, 119, 120], Nanostrukturen [121, 122], Oberflächen [123] und weitere [91, 92, 110, 124] aus der Literatur bekannt. Nachteilig bei der Verwendung von Nano-Antennen kann das Quenchen bzw. die chemische Degradierung der Quante-

nemitter sein [125, 126]. Zudem ist eine genaue Positionierung der Nano-Antennen im Umfeld des zu untersuchenden Emitters nur schwer möglich bzw. kontrollierbar. Anhand der Experimente konnte gezeigt werden, dass sich das Spektrum des Atto488-Farbstoffs mit Hilfe eines Resonators über einen großen spektralen Bereich mit hoher Auflösung stimmen und simulieren lässt. Dabei konnten die Relaxationseigenschaften des angeregten Farbstoffs in Abhängigkeit der Resonatorstellung sowohl spektral als auch zeitaufgelöst bestimmt und miteinander korreliert werden. Sowohl der Einfluss des Resonators auf unser Quantensystem, als auch das Verhalten der nicht-strahlenden Rate stimmt mit der Literatur überein [89, 118, 119, 127–130].

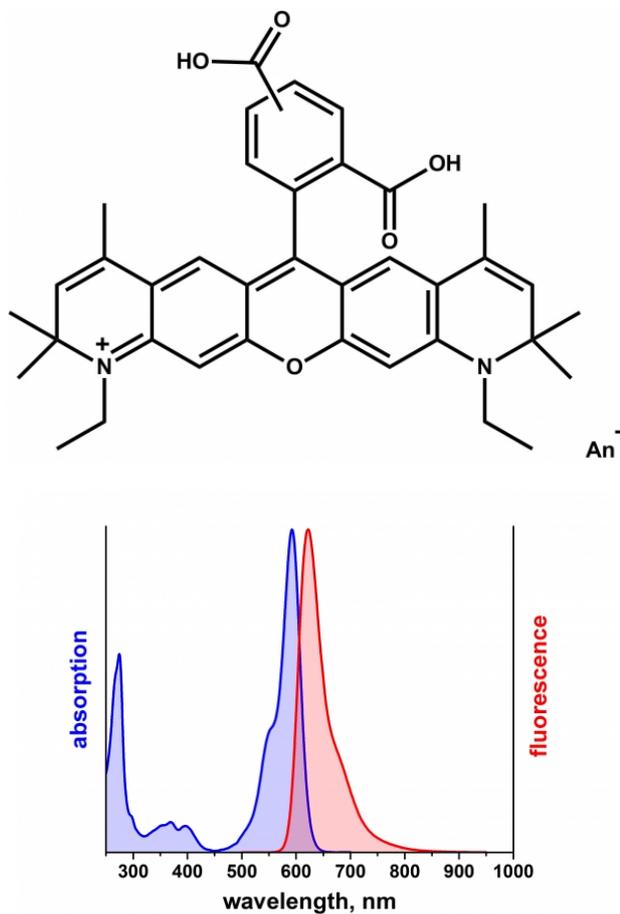
## 5.4 FRET im durchstimmbaren Resonator

Der Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET) ist einer der prominentesten Energietransfer-Mechanismen, welcher in der Natur z.B. bei der Photosynthese [131] oder in der Biologie zur Bestimmung kleiner Distanzen verwendet wird [39, 110]. Die Grundlagen des FRET-Prozesses wurden bereits in Kapitel 5.1.3 ausführlich behandelt. Im Jahre 2014 wurde in der Arbeitsgruppe um Prof. Meixner der Einfluss eines  $\lambda/2$ -Resonators (siehe Kapitel 3.3) auf den Förster-Resonanz-Energietransfer bzw. dessen Effizienz untersucht [91]. Die von den Spiegelabständen des Resonators abhängige spektrale optische Modendichte führte zu einer Veränderung der strahlenden Rate des Donors bzw. Akzeptors. Dadurch wurde die FRET-Effizienz des Proteins DsRed, also die Wahrscheinlichkeit eines Energietransfers, nach Gleichung 5.14 verändert. So konnte gezeigt werden, dass durch gezielte Variation der kontinuierlichen Anregungsleistung und Spiegelabstände eine FRET-Effizienz zwischen 50% und 75% präzise eingestellt werden kann. Die Transferraten-Konstante  $k_t$ , ein Nahfeld-Effekt, welcher die Stärke der Dipol-Dipol-Kopplung ausdrückt, konnte durch den Weitfeld-Effekt des Resonators nicht beeinflusst werden. Unter dem Einfluss der lokalen Modendichte des Resonators (LDOS) konnten in der Literatur weitere Experimente über die Änderung der Transferraten-Konstante rechechert werden. Die darin gezeigten Resultate liefern widersprüchliche Schlussfolgerungen. Hier ist zum einen von keiner [132, 133] oder einer linearen [90, 134, 135] Abhängigkeit der Transferraten-Konstante zu lesen. Der Hauptgrund hierfür ist unter anderem in der Probenpräparation der FRET-Probe

auszumachen, welche während der Messung den Abstand zwischen beiden Chromophoren ändert und so unterschiedliche Transferraten-Konstanten liefert. Auf diesen Vorarbeiten und Erkenntnissen aufbauend beschreibt dieses Kapitel, basierend auf der Publikation [92], Experimente über die Dynamik eines Förster-Resonanz-Energietransfer zweier Fluorophore in einem  $\lambda/2$ -Resonator um dessen Einfluss auf die FRET-Transferraten-Konstante zu bestimmen. Das FRET-Paar besteht dabei aus einzelnen Atto488- und Atto590-Farbstoffen, welche über einen DNS-Strang miteinander verbunden sind, wodurch ein konstanter Abstand gewährleistet werden konnte. Der genaue Aufbau des FRET-Paares wird im nächsten Kapitel (5.4.1) erläutert. Die beiden Farbstoffe wurden gewählt, da sie eine große spektrale Überlappung der Donoremission und Akzeptorabsorption aufweisen, was zu einem effizienten Förster-Resonanz-Energietransfer führt (siehe Kapitel 5.1.3). Ziel dieses Experiments war es, die spektralen und zeitlichen Eigenschaften von FRET-gekoppelten Modellsystemen zu charakterisieren und durch den Einfluss der photonischen Zustandsdichte eines Fabry-Pérot-Resonators zu steuern. Genauso sollte die Frage geklärt werden, ob durch Variation des Spiegelabstandes des Resonators der Energietransfer von einem Donor- zu einem Akzeptor-Molekül gezielt kontrolliert werden kann. Eingebettet in einen  $\lambda/2$ -Resonator und durch die Variation der spektralen Moden des Resonators (Veränderung des Spiegelabstandes) konnten die radiativen Eigenschaften der einzelnen Fluorophore und somit die FRET-Effizienz gezielt verändert werden. Dazu wurde der radiative Zerfall des Donors in Form von Histogrammen zur Bestimmung der Fluoreszenz-Lebensdauer in Abhängigkeit des Spiegelabstandes bestimmt und mit den Fluoreszenz-Lebensdauern im freien Raum verglichen. Dies konnte durch die gepulste Laseranregung im Gegensatz zur cw-Anregung in den Vorarbeiten [91] realisiert werden. Die Transferraten-Konstante wurde über das Ratengleichungsmodells bzw. einer Näherung des Ratengleichungsmodells bestimmt [91, 92]. So konnte mit diesem Experiment auf Einzelmolekülniveau gezeigt werden, dass sich mittels Fabry-Pérot-Resonator zwar die FRET-Effizienz gezielt verändern lässt, hingegen die FRET-Transferraten-Konstante nicht.

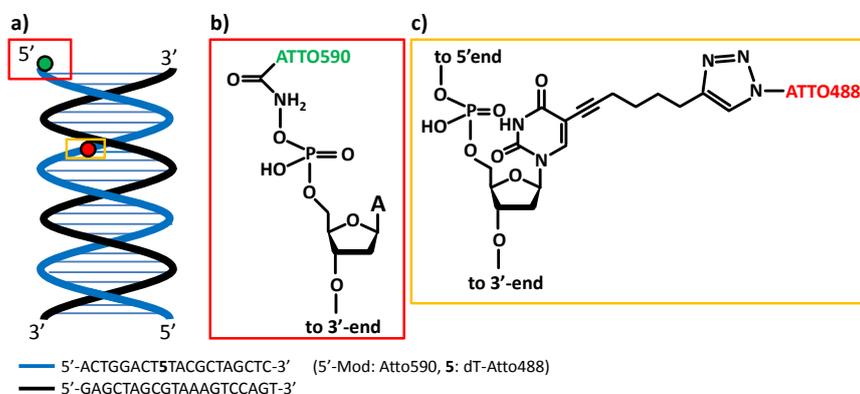
### 5.4.1 Experimenteller Teil und Probenpräparation

In Zusammenarbeit mit der Firma Biomers aus Ulm wurde ein spezielles FRET-System, bestehend aus Atto488- (Donor, Atto-Tec, Siegen) und Atto590-Farbstoffen (Akzeptor, Atto-Tec, Siegen), entwickelt. Die Strukturformel sowie optischen Eigenschaften des Farbstoffmoleküls Atto590 sind in Abbildung 5.13 dargestellt (Eigenschaften Atto488, siehe Abbildung 5.8). Für das Koppeln der Farbstoffe wird ein Atto590-Molekül über



**Abbildung 5.13:** Strukturformel (oben) und Absorptions- sowie Fluoreszenzspektrum (unten) des Farbstoffmoleküls Atto590 [136].

ein Linker an das 5' Ende eines DNS-Strangs und an denselben Strang genauer an die 8. Base (Thymin), ebenfalls über ein Linker, wird ein Atto488-Molekül gebunden (siehe Abbildung 5.14). Dies ergibt einen definierten Abstand von ca. 5 nm, verbunden an einem DNS-Strang, stabilisiert mit einem komplementär hybridisierten DNS-Strang, welcher die Festigkeit des kompletten Systems gewährleistet. Auf diese Weise soll der Abstand der Fluorophore während der Messung konstant bleiben, da falsch hybridisierte FRET-Paare oder einzelne Farbstoffmoleküle vermieden werden. Nur dadurch können reproduzierbare und aussagekräftige Ergebnisse über die FRET-Transfer-Raten-Konstante erzielt werden, da diese maßgeblich vom Abstand der beiden Fluorophore zueinander abhängig ist. Der Donor des FRET-Paares (Atto488) sowie das FRET-Paar wurden



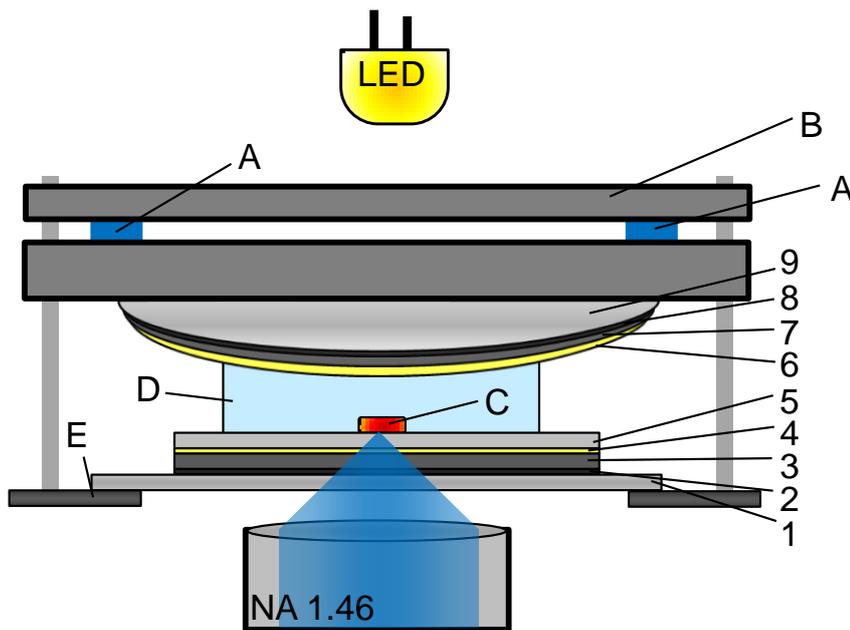
**Abbildung 5.14:** a) Schema des FRET-Paares gebunden an einem DNS-Strang nach [92], veröffentlicht von „The Royal Society of Chemistry“. Dabei ist der blaue DNS-Strang an der 8. Base mit dem Atto488 und an dem 5'-Ende mit dem Atto590 gelabelt. Der schwarze DNS-Strang dient dabei lediglich zur Stabilisierung des FRET-Abstandes. b) zeigt den Linker zwischen Atto590 und der Thymin-Base. c) Linker des 5'-Endes und Atto488.

sowohl im freien Raum als auch im Resonator untersucht. Daher wurden für vier unterschiedliche Experimente zwei verschiedene Proben hergestellt, welche dann für das jeweilige Experiment präpariert wurden. Diese Proben wurden beide mittels dreifach destilliertem Wasser auf eine Konzentration von ca.  $10 \times 10^{-9}$  verdünnt, um die Detektion der Fluoreszenz-Spektren und Zerfallsraten einzelner Atto488-Farbstoffen und einzelner FRET-Paare zu gewährleisten. Ein Deckglas (Menzel, Thermo Fisher Scientific, USA), welches für mindestens 24 Stunden in Chromschwefelsäure getaucht war und abschließend

mehrfach mit Methanol und Tri-Dest gereinigt wurde, wird mit der Donorfarbstofflösung oder der FRET-Lösung präpariert. Dazu wird den jeweiligen Lösungen im Verhältnis 1:1 eine 4% Polyvinylalkohol-(PVA)-Lösung hinzugegeben und diese Mischung mittels Rotationsbeschichter bei 6500 Umdrehungen für 1 min beschichtet. Die Polymerisation des PVA garantiert, dass die Farbstoffmoleküle während der Detektion nicht driften und unterdrücken eine Konformationsänderung. Für die Präparation der Probe im Resonator gelten ähnliche Schritte. Die Behandlung des Deckglases ist identisch, die verwendeten Linsen (Thorlabs, LA1433,  $f=150$  mm,  $R=77,3$  mm) werden mit Methanol und dreifach destilliertem Wasser gründlich gereinigt. Nach dem Beschichten der Linse und des Deckglases mittels Elektronenstrahlverdampfens (Edwards, EB3) in der Schichtfolge 1 nm Chrom, 40 nm Ag, 1 nm Au und 80 nm  $SiO_2$  für das Deckglas sowie 1 nm Chrom, 60 nm Ag, 1 nm Au werden die Lösungen wieder mittels Rotationsbeschichter auf das Deckglas aufgetragen. Die Konvexlinse wurde an einem piezoelektrischen Halter (Thorlabs, KC1-T-PZ) fixiert, um den Resonatorabstand reproduzierbar einzustellen und zu bestimmen. Zu jedem Abstand wurde durch Beleuchtung des Resonators mit einer Weißlicht-LED ein Weißlicht-Transmissionsspektrum aufgenommen, um den Abstand zu kontrollieren. Der genaue Aufbau des Resonators ist in Abbildung 5.15 dargestellt. Da der Radius der Spiegel um einiges größer als der Spiegelabstand und der Radius des Lasers ist, kann der Resonator als plan-paralleler Fabry-Pérot-Resonator angesehen werden. Um die Fluoreszenz-Spektren und Zerfallskurven bei verschiedenen Resonatorabständen aufzunehmen, wurde die Probe mittels eines Scan-Tisches lateral durch den beugungsbegrenzten Laserfokus geschoben.

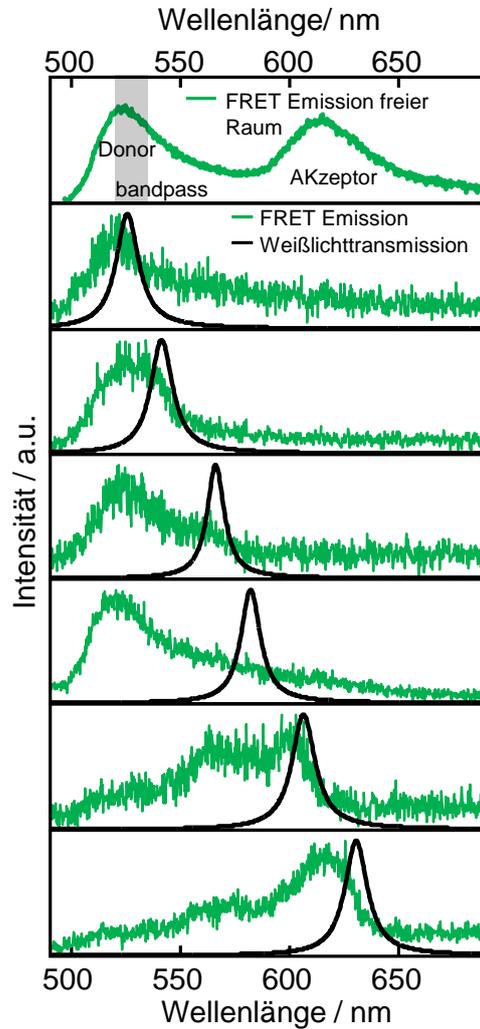
### 5.4.2 Ergebnisse

Die konfokal aufgenommenen Fluoreszenz-Spektren und über TCSPC bestimmten Lebensdauern wurden mit einer 488 nm Laserdiode mit einer Laserpulsbreite von 100 ps und einer Wiederholungsrate von 40 MHz aufgenommen. Dabei wurde der Resonator oder der einzelne Farbstoff mit Hilfe des in Kapitel 5.2 beschriebenen konfokalen Mikroskops sowohl spektral in Form von Transmissionsspektren des Resonators sowie die Fluoreszenz-Spektren der Farbstoffe (Spektrograph mit CCD-Kamera) als auch die Lebensdauern des Atto488-Farbstoffs untersucht. Mit Hilfe einer „scanning stage“, auf der sowohl die

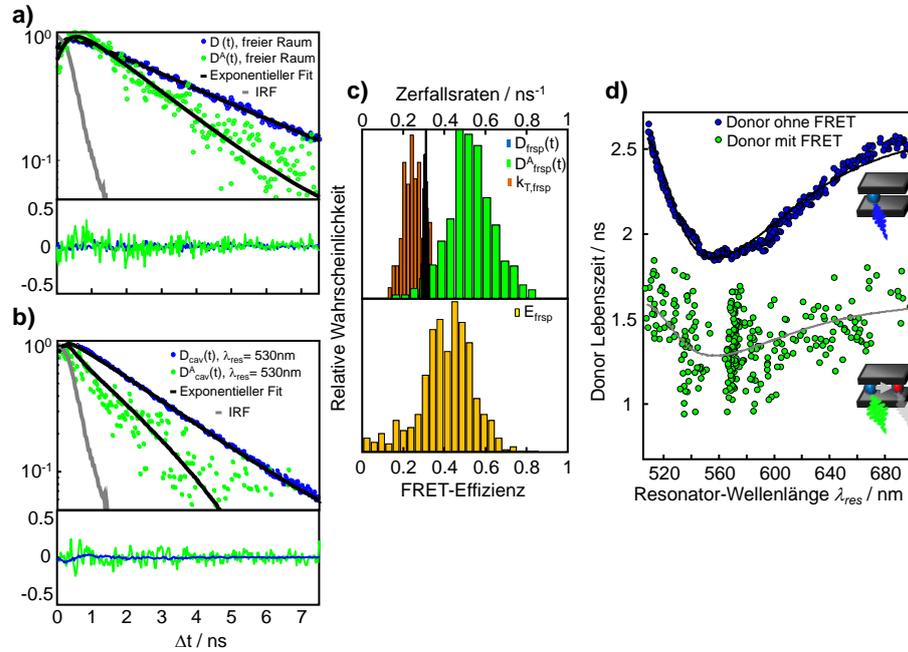


**Abbildung 5.15:** Schematischer Aufbau des Resonators mit weißer LED zur Messung der Weißlichttransmission nach [92], veröffentlicht von „The Royal Society of Chemistry“. 1: Deckglas, 2: 1 nm Chrom, 3: 40 nm Silber, 4: 1 nm Gold, 5: 80 nm  $SiO_2$ , 6: 1 nm Gold, 7: 60 nm Silber, 8: 1 nm Chrom, 9: Linse mit Brennweite  $f=150$  mm, A: Piezo-Aktuatoren in Spiegelhalter (B), C: Probe, D: PVA-Wasser-Gemisch, E: Scan-Tisch (vergleiche Kapitel 5.2).

Probe im freien Raum als auch im Resonator fixiert war, und einer von Dr. Alexander Konrad geschriebenen Labview-Routine konnten über 10.000 Probenvolumina größtenteils automatisiert aufgenommen werden. So werden die einzelnen Proben (1. einzelner Atto488 im freien Raum, 2. einzelner Atto488 im Resonator, 3. FRET im freien Raum, 4. FRET im Resonator) nach erfolgter Aufnahme eines Fluoreszenz-Spektrums und der Lebensdauer bzw. im Falle einer Messung im Resonator nach zusätzlicher Detektion eines Transmissionsspektrums automatisch um einen Mikrometer lateral verschoben. Durch die Verwendung eines Bandpassfilters (Transmission im Bereich 520-540 nm) vor der APD konnte so nur die Lebensdauer des Donors gemessen werden. Zunächst wurde hierfür der Resonator auf etwa einen Spiegelabstand von 500 nm eingestellt, was mit Hilfe des Transmissionsspektrums des Resonators überprüft werden konnte. Danach wurde sowohl (über die APD) die Zerfallsrate des Donors (Bandpass vor der APD verhindert die Detektion des Akzeptors) als auch die spektrale Emission des FRET-Paares detektiert. Abbildung 5.16 zeigt gemittelte Spektren des FRET-Paares sowohl ohne Resonator als auch mit Resonator mit verschiedenen Abständen. Dabei zeigen die schwarzen Lorentz-Fits die jeweilige Weißlichttransmission des Resonators an. So können die Banden um 528 und 560 nm dem Donor und die Bande um 620 nm dem Akzeptor zugeschrieben werden. Bis zu einem Abstand des Resonators von ca. 580 nm bleiben die Emissionsbanden des Akzeptors vollständig unterdrückt. Erst ab einer Transmissionswellenlänge von 600 nm des Resonators ist die Seitenbande des Donors und des Akzeptors deutlich zu sehen. Dieses Verhalten stimmt mit der Resonanzbedingung der Fluoreszenz-Emission eines Quantenemitters innerhalb eines Resonators überein [89, 113, 137]. Abbildung 5.17a und b zeigen den Fluoreszenz-Zerfall von einzelnen Donormolekülen und FRET-Paaren sowohl im freien Raum als auch im Resonator (Transmissionswellenlänge von 530 nm). Beide Zerfallskurven können sehr gut durch die Faltung einer monoexponentiellen Modelfunktion mit der IRF beschrieben werden. Nach ca. 800 FRET-Paar-Messungen und 1200 Donormessungen und somit einer Vielzahl von aufgenommenen Zerfallsraten des reinen Donors als auch mit Akzeptor konnte nach  $k^{DA} = k^D + k_T$  die FRET-Transferraten-Konstante  $k_T$  bestimmt werden, was in Abbildung 5.17c dargestellt wird. So ist die Zerfallsrate  $k^D = 0,309 \pm 0,016 \text{ ns}^{-1}$ , für  $k^{DA} = 0,524 \pm 0,137 \text{ ns}^{-1}$  und die FRET-Effizienz nach  $E = k_T/[k^D + k_T] = 0,448 \pm 0,083$ . Da  $\tau = \frac{1}{k}$  gilt sind die Lebensdauern des reinen Donors ( $k^D$ ) 3,2 ns und die durch den zusätzlichen Relaxationskanal reduzierte Lebensdauer des FRET-Paar-Donors ( $k^{DA}$ ) nur noch 1,9 ns. Abbildung 5.17d



**Abbildung 5.16:** Oben: Fluoreszenz-Spektrum des FRET-Paares Atto488 und Atto590 im freien Raum nach [92], veröffentlicht von „The Royal Society of Chemistry“. Grau markiert ist dabei der Bandpassfilter, der vor der APD platziert ist, um nur die Photonen des Donors zu detektieren und bestimmen zu können. Die weiteren Spektren zeigen dasselbe FRET-Paar in einem Resonator bei unterschiedlichen Spiegelabständen, was durch die schwarze Linie (Transmissionsmaximum) angedeutet ist.

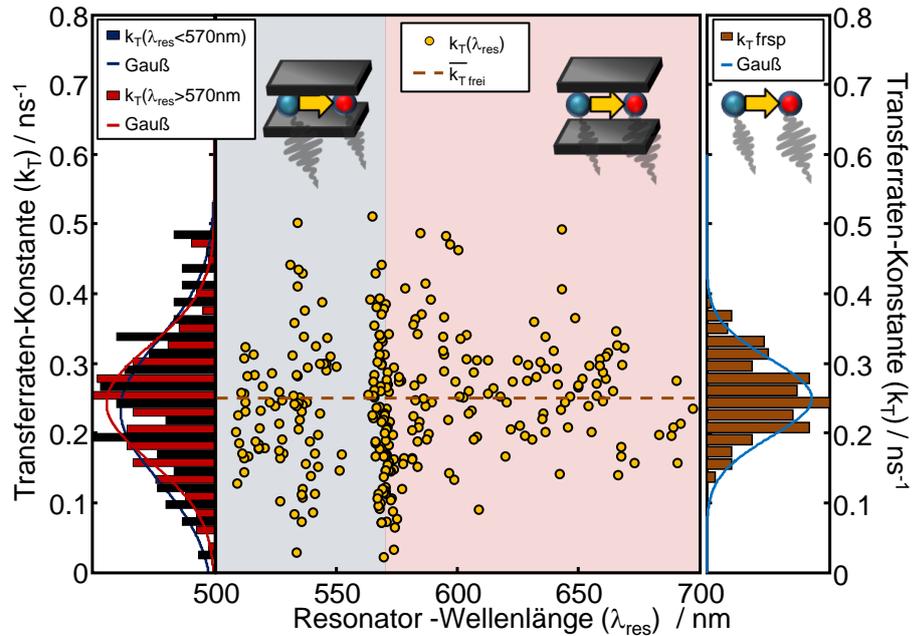


**Abbildung 5.17:** nach [92], veröffentlicht von „The Royal Society of Chemistry“. a): Fluoreszenz-Zerfallkurven des reinen Donors (blau) als auch des Donors als Teil eines FRET-Paares (grün) im freien Raum, detektiert mit einem Bandpassfilter von 520-540 nm. Somit werden nur die Photonen des Donors gemessen und daraus der Fluoreszenz-Zerfall bestimmt. b): Fluoreszenz-Zerfallkurven des reinen Donors (blau) als auch des FRET-Paares (grün) im Resonator mit einem Spiegelabstand von 530 nm. Beide Fluoreszenz-Zerfälle können durch einen monoexponentiellen Zerfall beschrieben werden. Durch eine Faltung mit der IRF konnten so die Lebensdauern bzw. Zerfallsraten des reinen Donors ( $\tau^D$ ) bzw. des FRET-Paares ( $\tau_A^D$ ) bestimmt werden. c) Die Streuung der berechneten Zerfallsraten ist in Form eines Histogramms dargestellt. Zudem werden die Transferraten in Form von braunen Balken dargestellt. d) Lebensdauern in Abhängigkeit des Spiegelabstandes im Resonator, oben des reinen Donors (ohne Akzeptor) und unten mit Akzeptor unter der Annahme einer konstanten Transferrate.

zeigt die Lebensdauern in Abhängigkeit des Spiegelabstandes im Resonator. Dabei folgt der reine Donor sehr genau einem analytisch berechneten Profil in Abhängigkeit des Spiegelabstandes im Resonator [113]. Die Verteilung der Donor-Lebensdauern als Teil eines FRET-Paares im Resonator ist auf die Variation der Transferraten-Konstante des reinen FRET-Paares durch minimal unterschiedliche Abstände bzw. Orientierungen der beiden Farbstoffe zueinander zurückzuführen. Die graue Linie in Abbildung 5.17d zeigt die Lebensdauern des Donors im FRET-System unter der Annahme, dass sich  $k_T$  im Resonator nicht ändert. Aufgrund der geringen Streuung des reinen Donorzerfalls und dem mit diesem Aufbau nicht detektierbaren geringen Unterschied zwischen der mono-exponentiellen Näherung und der numerischen Lösung kann das Ratengleichungsmodell durch  $k_T(\lambda_{res}) = k^{DA}(\lambda_{res}) - k^D(\lambda_{res})$  vereinfacht werden. Dadurch konnten je nach resonantem Resonatorabstand und für jedes  $k_a^D$  die Transferraten-Konstanten berechnet werden (siehe Abbildung 5.18). Dabei wird zwischen den Bereichen der resonanten Resonatorwellenlänge  $< 570 \text{ nm}$  und  $> 570 \text{ nm}$  sowie dem freien Raum unterschieden. In dem Bereich unter  $570 \text{ nm}$  ist der Donor in Resonanz, hingegen bei einer Wellenlänge größer  $570 \text{ nm}$  befindet sich der Akzeptor in Resonanz. Über die Histogramme der Abbildung 5.18 bestimmten Transferraten-Konstante  $k_T$  liefern folgende Ergebnisse: Für  $k_T(< 570 \text{ nm})$  erhalten wir  $0,233 \pm 0,141 \text{ ns}^{-1}$ , für  $k_T(> 570 \text{ nm})$  einen Wert von  $0,242 \pm 0,112 \text{ ns}^{-1}$  und im freien Raum von  $k_T(\text{frei}) = 0,249 \pm 0,079 \text{ ns}^{-1}$ . Die Transferraten-Konstante ist in Abbildung 5.18 gestrichelt eingezeichnet. Alle Histogramme bzw. darauffolgende Gaussverteilungen verteilen sich um den Wert im freien Raum und sind zudem symmetrisch und überlappen sehr gut mit den Mittelwerten. Daher kann von keiner signifikanten Änderung der Transferraten-Konstante im Resonator ausgegangen werden.

### 5.4.3 Diskussion

Die in diesen Experimenten bestimmten Transferraten-Konstanten sind wie im vorangegangenen Kapitel gezeigt von der unterschiedlichen LDOS unabhängig und sowohl im freien Raum als auch im Resonator bei unterschiedlichen Spiegelabständen nahezu konstant. Es konnte mittels zeitaufgelösten und spektralen Fluoreszenz-Messungen gezeigt werden, dass der Effekt der unterschiedlichen LDOS im Resonator nicht stark genug ist, um die Dipol-Dipol-Kopplung zwischen dem FRET-Paar zu beeinflussen. Dies konnten aufgrund der



**Abbildung 5.18:** Aus Abbildung 5.17 ermittelte Transferraten-Konstante (gelbe Kreise) als Funktion des Spiegelabstandes im Resonator nach [92], veröffentlicht von „The Royal Society of Chemistry“. Dabei zeigt sich keine Wellenlängenabhängigkeit und die bestimmten  $k_T$ -Werte schwanken um den Wert im freien Raum (angedeutet durch die gestrichelte Linie). Die berechneten Werte sind:  $k_T(< 570 \text{ nm}) = 0,233 \pm 0,141$ ,  $k_T(> 570 \text{ nm}) = 0,242 \pm 0,112$ ,  $k_T(\text{frei}) = 0,249 \pm 0,079$ . Die Histogramme links zeigen die Verteilung der Ratenkonstanten für Resonatorwellenlängen kleiner 570 nm (schwarz) und größer 570 nm (rot). Das Histogramm rechts repräsentiert die Verteilung der Ratenkonstanten im freien Raum.

speziell entwickelten FRET-Probe sowie dem weiter entwickeltem Mikroresonatoraufbau in Kombination mit dem neuen konfokalen Mikroskopaufbau gezeigt werden. Hauptvorteil dieses Systems gegenüber den bisherigen in der Literatur genannten Systemen ([133, 135, 138]) ist die Möglichkeit, die LDOS in Echtzeit und gezielt durch Veränderung der Spiegelabstände an ein und demselben FRET-System oder Donor zu variieren und mittels Transmissionsspektrum zu überprüfen. Zudem konnte durch die Probenpräparation - genauer durch Fixierung der Probe mittels PVA-Matrix - eine geometrische Veränderung (Orientierung und Abstand) des FRET-Paares verhindert bzw. unterdrückt werden. Den Beweis hierfür liefert die Bestimmung der Zerfallsraten (Abbildung 5.17), welche mit Hilfe eines monoexponentiellen Zerfalls beschrieben werden konnten. Veränderungen des FRET-Paares während der Messung oder die Detektion mehrerer FRET-Paare bzw. Donoren würden zu einem multiexponentiellen Verhalten führen. Dies konnte durch die Verdünnung der Probe auf ca.  $10 \times 10^{-9}$  ebenfalls vermieden werden. So kann ein Mitteln der unterschiedlichen FRET-Parameter mehrerer FRET-Paare ausgeschlossen werden. Das Design des FRET-Paares an einem DNS-Strang garantiert zudem, dass nur Donormoleküle gemessen wurden, welche auch sicher mit einem Akzeptor verbunden sind. Die große Streuung zwischen verschiedenen Paaren in der Transferraten-Konstante (Abbildung 5.18) kann durch die minimal unterschiedlichen Orientierungen und Abstände bei der Vielzahl von verschiedenen gemessenen Probenvolumen erklärt werden [139, 140]. Zudem entspricht die Streuung der Ergebnisse im Resonator denen im freien Raum. Das spezielle Design des Resonators mit der genauen Piezosteuerung des Spiegelabstandes bzw. der lateralen Messposition erlaubt präzise Berechnungen der LDOS. Durch die Präparation einer dünnen PVA-Matrix und die als „Puffer“ wirkende (80 nm dicke) Glasschicht auf den reflektierenden Schichten des Resonators ist ein Einfluss von auf den Metallflächen entstehenden Plasmonen (Nahfeldeffekt der Metalloberflächen nimmt mit  $r^{-3}$  ab), welches die Fluoreszenz-Lebensdauern verringern würde, ausgeschlossen bzw. minimiert [127]. Dies konnte durch die Übereinstimmung der gemessenen und simulierten Werte (Abbildung 5.17) bestätigt werden.

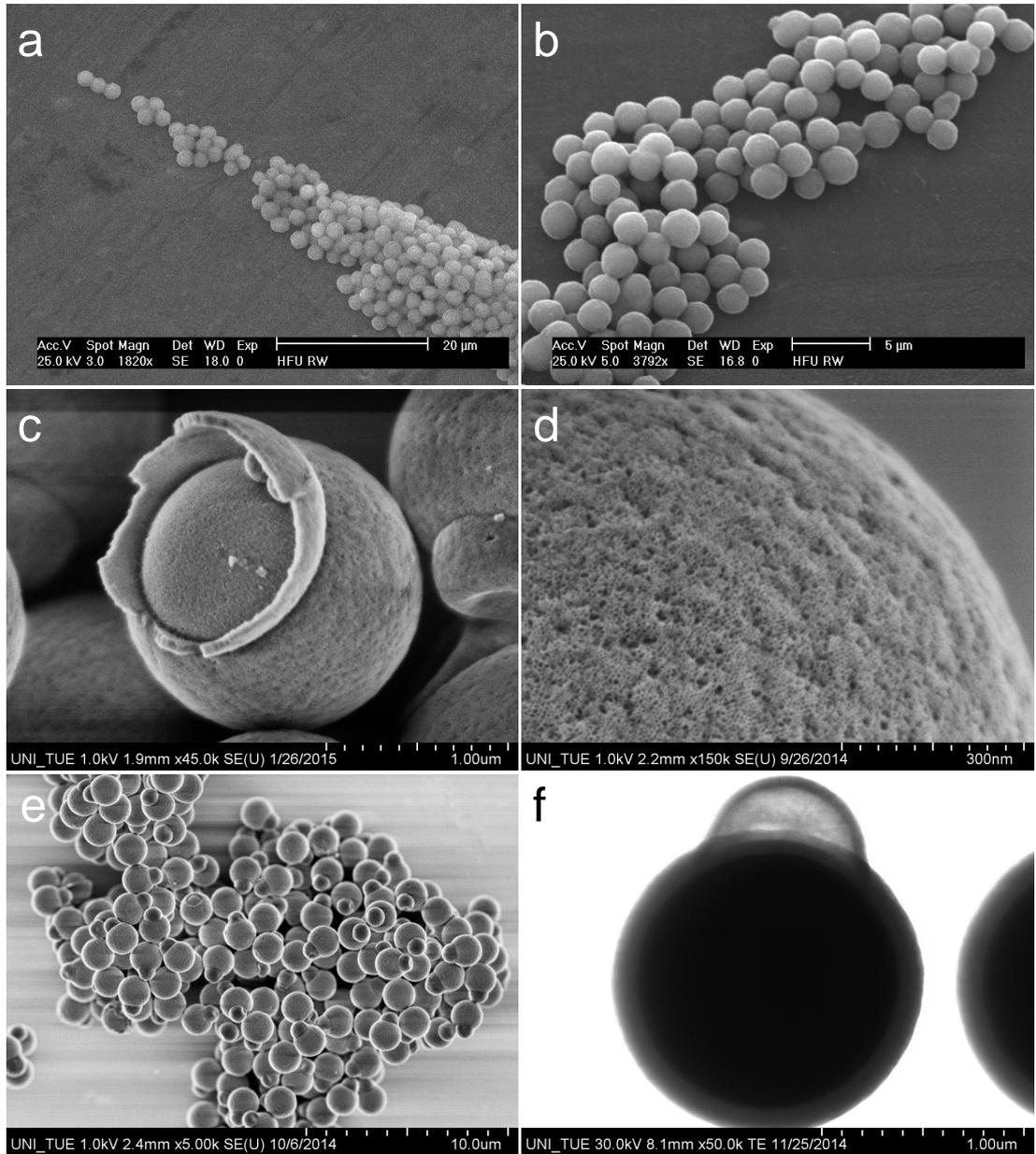
## 5.5 Konfokale Mikroskopie an anisotropen Siliziumdioxid-Partikeln

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Prof. Mayer und seinem damaligen Mitarbeiter Dr. Johannes Maisch am Institut für Anorganische Chemie der Universität Tübingen wurden bereits bestehende isotrope und neu synthetisierte anisotrope Siliziumdioxid- ( $SiO_2$ )-Partikel mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. Die dazu in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse basieren auf der daraus entstandenen Publikation [141]. Poröse und isotrope  $SiO_2$ -Partikel stellen eine große Anwendungsplattform in verschiedensten Richtungen wie Materialwissenschaften, Biotechnologie und Nanomedizin sowie bei der Medikamentenentwicklung dar [142]. Die Gründe hierfür sind das hohe Oberflächenvolumen, große Porenvolumen und neben der für den menschlichen Organismus nicht vorhandene Toxizität die gleichzeitig günstige und oft auch einfache Herstellung [141]. In den letzten Jahren sind anisotrope Partikel, also Partikel mit komplexer Form, immer mehr in den Vordergrund gerückt. Durch die Anisotropie sind unterschiedliche Wechselwirkungen eines Partikels mit seiner Umgebung oder anderen Stoffen möglich [143, 144]. Sie zeichnen sich z.B. durch ein verbessertes Verhalten in biologischen Umgebungen aus, wodurch neue Anwendungsmöglichkeiten z.B. bei der Wirkungsweise von Arzneimitteln entstehen [145]. Bisher erreichte anisotrope Partikel müssen aufwendig in bis zu zehn Schritten und mit dem Nachteil von geringen Ausbeuten synthetisiert werden [143, 146–150]. Der Arbeitsgruppe um Prof. Mayer gelang es, nichtporöse Partikel, welche mittels Stöber-Prozess ([151, 152]) hergestellt wurden, in einer Eintopf-Synthese in Abhängigkeit der Zentrifugengeschwindigkeit entweder in poröse isotrope (150 oder 280 Umdrehungen/min) oder poröse anisotrope Partikel (240-250 Umdrehungen/min), welche ausschließlich aus  $SiO_2$  bestehen, zu überführen. Erste Untersuchungen mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie (REM) und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) zeigen den Vergleich von isotropen und anisotropen Partikeln (siehe Abbildung 5.19). Abbildung 5.19a-e zeigen dabei REM-Aufnahmen, wobei a und b die isotropen Partikel, c, d und e die anisotropen Partikel darstellen. Das letzte Teilbild (Abbildung 5.19f) zeigt eine TEM-Aufnahme eines anisotropen Partikels. Die im Durchschnitt  $2,5 \mu\text{m}$  großen Partikel zeichnen sich dadurch aus, dass sie aus einer  $SiO_2$ -Kugel mit einem Durchmesser von ca.  $1,6 \mu\text{m}$  und angrenzender Halbkugel mit einer Größe von  $0,9 \mu\text{m}$  bestehen. Der

deutlich unterschiedliche Kontrast der TEM-Aufnahme zwischen großer Kugel und kleiner Halbkugel sowie die Form des defekten Partikels (Abbildung 5.19e) lassen vermuten, dass die Halbkugel hohl, die Kugel hingegen mit  $SiO_2$  gefüllt ist. Aufgrund der mesoporösen Struktur (siehe Abbildung 5.19d) des Partikels wurde zudem vermutet, dass sich auf der Kugel z.B. Farbstoffmoleküle anlagern und in die Halbkugel diffundieren können. Der letztendliche Beweis der hohlen Halbkugel und der gefüllten Kugel konnte anhand von konfokaler Mikroskopie erbracht werden. Dabei wurden sowohl die isotropen als auch die anisotropen Partikel mit Atto488-Molekülen präpariert. Aufgrund der Größe der Kugel und der ausschließlichen Möglichkeit, dass Farbstoffmoleküle am Rand der Hülle angelagert werden können, muss der innere Bereich der Kugel in der Intensität deutlich vom Rand der Kugel abweichen, was die Kugel als Ring erscheinen lässt. Aufgrund der theoretischen Auflösungsgrenze (siehe Kapitel 3.4) bei einer Anregung mit einem 488 nm Diodenlaser und einem Ölimmersionsobjektiv mit NA von 1,46 von 171 nm und der experimentell bestimmten Auflösungsgrenze von 274 nm ([153]) wäre die ca.  $0,9 \mu\text{m}$  große Halbkugel ebenfalls aufzulösen. Würde die Halbkugel ebenfalls mit  $SiO_2$  gefüllt und somit eine Diffusion der Farbstoffmoleküle in die Halbkugel nicht möglich sein, würde ebenfalls ein geöffneter Ring und keine Halbkugel detektiert werden.

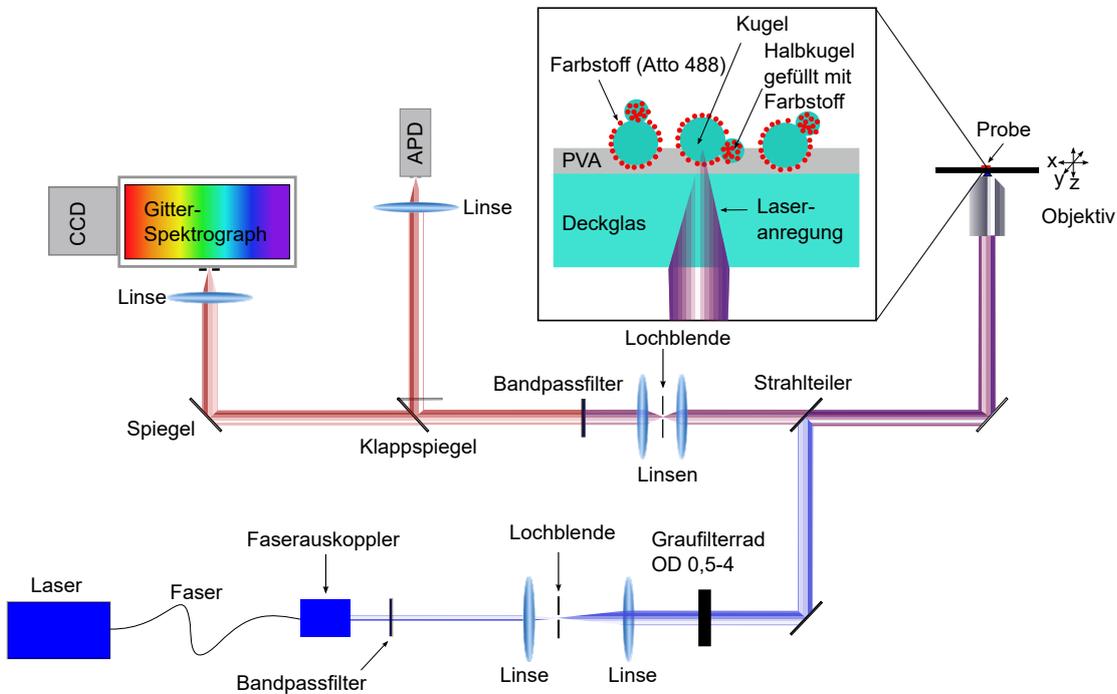
### 5.5.1 Probenpräparation

Die aus einer Eintopf-Synthese hergestellten isotropen und anisotropen Siliziumdioxid-Partikel werden jeweils mit einer Farbstofflösung (Atto488) und  $50 \mu\text{l}$  einer 4% PVA-Lösung vermischt. Dazu werden 0,2 mg der Partikel eingewogen und mittels Eppendorf-Pipette  $50 \mu\text{l}$  einer  $10^{-7}$  mol/l Farbstofflösung hinzugegeben. Anschließend kommen die Lösungen für 10 min in ein Ultraschallbad, um die Absorption und Diffusion der Farbstoffmoleküle in die mesoporösen Hülle und im anisotropen Partikel zusätzlich in die Halbkugel sicherzustellen. Abschließend wird ein Tropfen (1 ml) der jeweiligen Partikellösung bei 350 Umdrehungen für 5 min auf ein mit dreifach destilliertem Wasser und Methanol gereinigtem Deckglas (Menzel,  $22 \times 22$  mm) rotationsbeschichtet. Dabei wird die Konzentration der Farbstofflösungen und Partikel so gewählt, dass möglichst einzelne Partikel mit geeigneter Anzahl an Farbstoffmolekülen detektiert werden können. Das zugegebene Polymer PVA verhindert dabei das Clustern bzw. Verklumpen der



**Abbildung 5.19:** REM- und TEM-Bilder der von der Arbeitsgruppe um Prof. Mayer synthetisierten isotropen und anisotropen Partikel nach [141], abgebildet mit Genehmigung von „The Royal Society of Chemistry“. a+b) REM-Aufnahmen der isotropen, runden und porösen Partikel mit unterschiedlichen Vergrößerungen. c+d+e) REM-Aufnahmen der anisotropen Partikel mit unterschiedlichen Vergrößerungen. f) TEM-Aufnahme eines anisotropen Partikels.

Partikel. Das mit den  $\text{SiO}_2$ -Partikeln präparierte Deckglas wurde mit dem in Kapitel

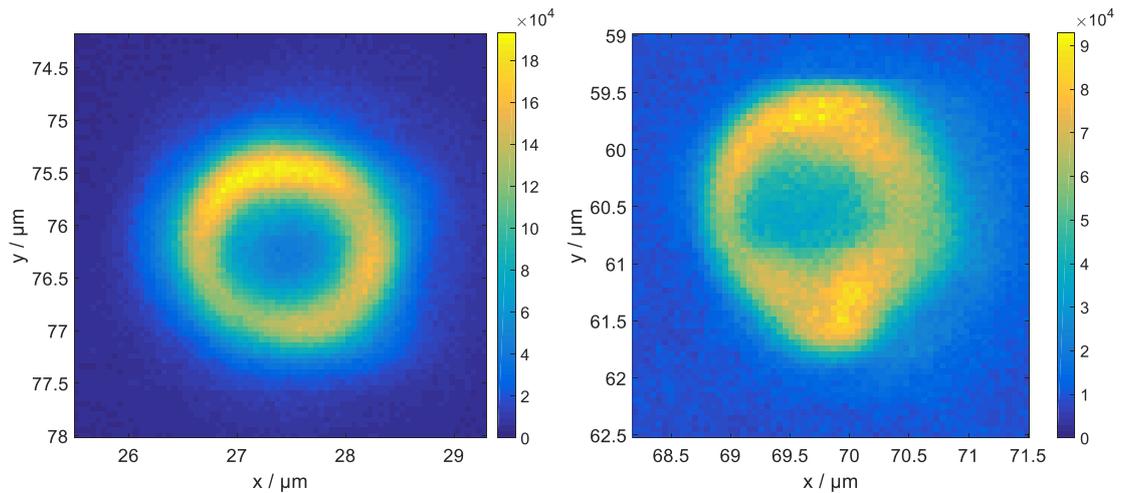


**Abbildung 5.20:** Konfokaler Aufbau für die Aufnahme der mit Farbstofflösung präparierten anisotropen Siliziumdioxid-Partikel nach [141], abgebildet mit Genehmigung von „The Royal Society of Chemistry“.

5.2 und in Abbildung 5.20 beschriebenen Aufbau konfokal untersucht. Dazu wurde die Probe mit Hilfe einer 485 nm Laser-Diode (PicoQuant, LDH-P-C-485) mit einer durchschnittlichen Laserleistung von  $1 \mu\text{W}$  angeregt, welche über einen Strahlenteiler (AHF, F43-088) in Reflektion auf das Objektiv bzw. die Probe gelenkt bzw. fokussiert wurde. Das von der Probe enthaltene Fluoreszenz-Signal wurde durch das gleiche Objektiv wieder aufgenommen und durch den Strahlenteiler transmittiert. Nach dem Pinhole ( $50 \mu\text{m}$ ), wie in Kapitel 5.2 beschrieben, wird das Laserlicht durch einen Langpassfilter geblockt und das reine Fluoreszenz-Signal mit einem Emissionsmaximum bei 520 nm kann über eine APD (Perkin Elmer, SPCM-AQRH) detektiert werden.

### 5.5.2 Ergebnisse

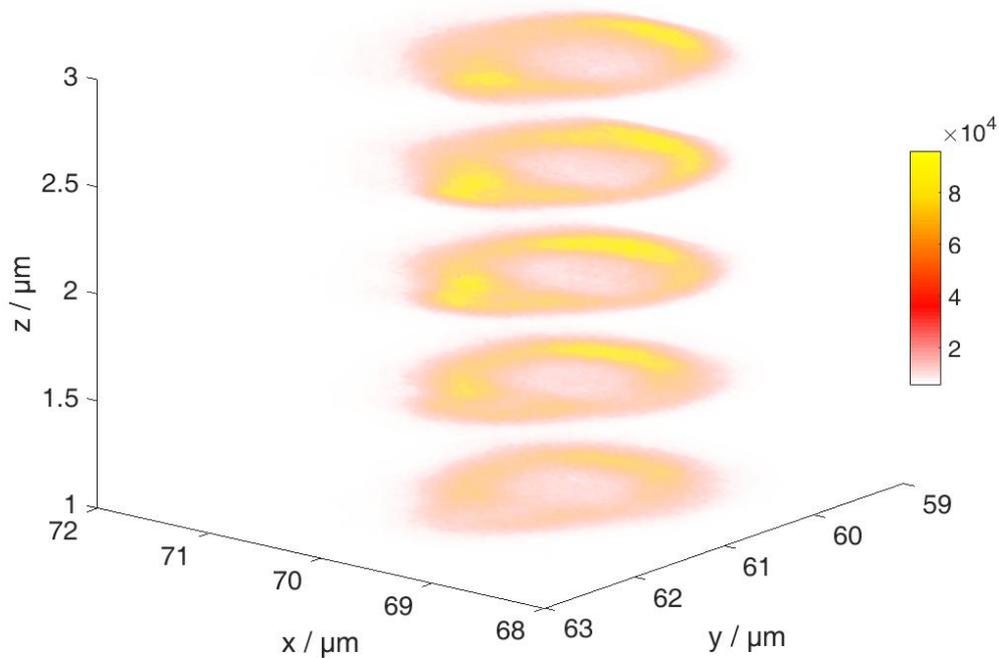
Abbildung 5.21 zeigt konfokal aufgenommene Fluoreszenz-Bilder, welche in der Fokusebene mit maximaler Intensität aufgenommen wurden. Dies wurde anhand einer Fokusvariation mit verschiedenen Fokuspositionen gewährleistet. Dabei kann die aus der REM-Aufnahme



**Abbildung 5.21:** Konfokale Aufnahmen eines isotropen Partikels (links) und eines anisotropen Partikels (rechts) nach [141], abgebildet mit Genehmigung von „The Royal Society of Chemistry“.

bestimmte Größe der Partikel, sowohl des isotropen ( $1,6 \mu\text{m}$ ) als auch den des anisotropen Partikels ( $2,5 \mu\text{m}$ ), bestätigt werden. Wie aufgrund der REM- und TEM-Aufnahmen zu erwarten war, beschreibt Abbildung 5.21 links aufgrund der Anlagerung der Atto488-Moleküle an die mesoporöse Kugelhülle ein kreisförmiges Muster. Abbildung 5.21 rechts stellt den anisotropen Partikel dar. Dabei zeigt sich bei der großen Kugel das gleiche Ergebnis wie bei dem isotropen Partikel. Die Anlagerung der Farbstoffmoleküle findet hier ebenfalls nur an der Kugelhülle statt. Anders in der kleinen Halbkugel, welche mit Farbstoffen gefüllt erscheint. So ist, wie erwartet, eine vollflächige Struktur mit erhöhter Intensität zu erkennen. Um sicherzustellen, dass sich Farbstoffmoleküle auch innerhalb der Halbkugel befinden, wurden konfokale Bilder in verschiedenen Fokusebenen aufgenommen. Bei erfolgreicher Einlagerung müsste ein Intensitätsmaximum (in z-Richtung) für das

Kugelzentrum zu erkennen sein - bei erfolgloser Einlagerung hingegen zwei Maxima für die beiden Pole. Abbildung 5.22 zeigt ein z-Scan, d.h. eine Variation der Fokusposition, um insgesamt  $2 \mu\text{m}$  in Intervallen von  $0,5 \mu\text{m}$ . Dabei beschreibt die z-Position mit  $2 \mu\text{m}$  den Abstand der Detektionsebene von der Ausgangsebene mit der höchsten Intensität in der Halbkugel. Diese Ebene halbiert die Halbkugel exakt in der Mitte und liefert deshalb aufgrund der höchsten Farbstoffkonzentration die höchste Intensität.



**Abbildung 5.22:** z-Scan eines anisotropen Partikels nach [141], abgebildet mit Genehmigung von „The Royal Society of Chemistry“.

### 5.5.3 Diskussion

Die konfokale Mikroskopie an isotropen und anisotropen Siliziumdioxid-Partikeln, welche mit Atto488-Farbstoffen eingefärbt wurden, konnte erfolgreich durchgeführt werden. In einem ersten Versuch wurde das Experiment mit Atto590-Farbstoffmolekülen durchgeführt und mit einem 532 nm Laser angeregt. Durch die Verwendung des Atto488 und demzufolge Anregung mit kürzerer Wellenlänge konnte die Auflösung weiter verbessert werden. Der Farbstoff Atto488 wurde gewählt, da er mit der vorhandenen 485 nm Laserdiode im optimalen Absorptionsbereich angeregt werden kann. Zudem ist er mit dem einfachen Strahlteiler (vergleiche Kapitel 5.2) und seinem hohen Extinktionskoeffizient ( $9 \times 10^4$ ) und hoher Fluoreszenz-Quantenausbeute (80%) auch in der Einzelmoleküldetektion sehr einfach zu detektieren. Ein erster Versuch ohne PVA-Lösung und höherer Partikelkonzentration zeigte ein deutliches Verklumpen und Clustern der Partikel, was eine Orientierung und Detektion der kleineren Hülle unmöglich machte. Die Reduktion der  $SiO_2$ -Partikelkonzentration in Kombination mit der Verwendung von PVA brachte den gewünschten Erfolg und ermöglichte die Detektion einzelner Partikel. Dabei werden die isotropen  $SiO_2$ -Partikel eindeutig und klar als Ringmuster dargestellt. Dies belegt, dass diese vollständig aus  $SiO_2$  bestehen, wodurch sich die Farbstoffe nur in der Hülle einlagern können. Ein Ergebnis, welches mit den REM- und TEM-Aufnahmen übereinstimmt. Anders bei den anisotropen Partikeln, welche in der Halbkugeln gefüllt mit Atto488-Partikeln eine Fläche mit erhöhter Intensität und kein ringförmiges Muster darstellen. Der dreidimensionale Scan aus Abbildung 5.22 mit der höchsten Intensität an einem einzelnen Maximum in z-Richtung bei  $z=2 \mu m$ , also in der Mitte des Partikels, ist ein Beleg dafür, dass die Farbstoffmoleküle sich in der Mitte der Halbkugel in höchster Konzentration aufhalten. Dies markiert den endgültigen Beweis für die hohle Halbkugeln, was sich durch die unterschiedlichen TEM-Intensitäten schon angedeutet hat.

## 5.6 Ausblick

Der vollständige Neuaufbau dieses konfokalen Mikroskops mit der Implementierung zweier gepulster Laser und der möglichen Detektion von Spektren und Fluoreszenz-Lebensdauern

ermöglicht eine Vielzahl weiterer Experimente. Die durchgeführte Wartung und Reparatur des Kryostaten erlaubt durch das Installieren von Tieftemperatur-Piezo-Aktuatoren auch Experimente bei tiefen Temperaturen. So wäre ein mögliches Experiment die Kopplung eines Einzelmoleküls an den Resonator als Funktion bzw. in Abhängigkeit der Temperatur (von Raumtemperatur bis 1,6 K). Hierbei ließe sich untersuchen, inwiefern die reduzierte Temperatur, und dadurch resultierende Verringerung der spektralen Linienbreite, Einfluss auf die Kopplung zwischen Emitter und Resonatormoden nimmt. Zudem könnte der Frage nachgegangen werden, ob sich mit Hilfe des Resonators die Emission der vibronischen Banden zugunsten der Nullphononenlinie unterdrücken lässt. Untersuchungen bei tiefen Temperaturen von einem FRET-Paar, wie das in Kapitel 5.4 beschriebene, würden zu weiterem grundlegenden Verständnis des FRET-Prozesses führen. Dabei wäre interessant, inwieweit sich Effizienz und Ratenkonstante der Energieübertragung durch eine verringerte Elektron-Phonon-Kopplung (bei tiefer Temperatur) verändern. Durch die Implementierung einer optischen oder elektronischen Verzögerungsstrecke (Delay-Line) zur zeitlichen Regelung der Laserpulse könnten Pump-Probe-Experimente an einzelnen FRET-Paaren durchgeführt werden. Durch die gepulste Anregung nach einem klassischen Pump-Probe-Experiment kann eine Zeitauflösung von wenigen Pikosekunden erreicht werden. Experimentell realisiert wird dieses Experiment, indem der Anregungspuls aufgeteilt und ein Teil des Lichts über eine Verzögerungsstrecke auf die Probe geleitet wird. Dabei bringt der erste Puls die Probe in einen definierten, angeregten Zustand. Mit dem zweiten Puls wird dieser Zustand nach gegebener Zeit abgefragt.



## 6 Konfokale Tieftemperatur-Mikroskopie mit Immersion

Dieses Kapitel zeigt Tieftemperatur-Experimente, die eine Auflösungssteigerung der konfokalen Mikroskopie durch die spezielle Probenpräparation mit substituierter Immersionsflüssigkeit, basierend auf der Publikation [154], beschreiben. Dazu ist nach den Auflösungskriterien (siehe Kapitel 3.4) ein Objektiv mit möglichst hoher numerischer Apertur (NA) notwendig [155]. Allerdings war die konfokale Mikroskopie bei tiefen Temperaturen bisher auf den Einsatz von einfachen Luftobjektiven mit einer maximalen NA von 1 limitiert, was z.B. durch den Einsatz eines Parabolspiegels realisiert werden konnte [156]. Bisherige Lösungsansätze die Auflösung zu steigern sind die Fluoreszenz-Mikroskopie mit der Elektronenmikroskopie zu kombinieren (CLEM, correlative light and electron microscopy) [157–161]. Die dabei verwendeten Objektive bewegen sich in einem NA-Bereich zwischen 0,7 und 0,95, wovon größtenteils Objektive mit großem Arbeitsabstand (ca. 3 mm) eingesetzt werden, was sich nachteilig auf die optischen Abbildungen auswirken kann. Ein Tieftempera-turaufbau, veröffentlicht durch Le Gros et al., beschreibt die Anregung im Weitfeld in Kombination mit Propan als Immersionsmedium [162]. Die beschriebenen Ansätze haben gemein, dass sie die Auflösung und Bildqualität von Fluoreszenz-Mikroskopie-Aufbauten bei Raumtemperatur nicht erreichen. Der Einsatz von Immersionsobjektiven mit einer NA größer 1 scheiterte bisher sowohl an der Präparation der Probe mit Immersionsmedium, als auch hauptsächlich an der fehlenden Möglichkeit, Immersionsöl aufgrund der physikalischen Eigenschaften wie Schmelzpunkt und Viskosität als Immersionsmedium bei tiefen Temperaturen zu verwenden. Zudem verlieren die meisten Objektive durch den entstehenden thermischen Stress bei tiefen Temperaturen ihre guten optischen Eigenschaften, wodurch Abbildungsfehler wie chromatische oder sphärische Abberationen entstehen. Die dadurch schlecht korrigierten Objektive in Kom-

ination mit „beam scanning“ oder Weitfeldanregung der Probe können keine Auflösung vergleichbar mit der bei Raumtemperatur erzielen. Im schlimmsten Fall können Objektive bei tiefen Temperaturen sogar zerstört werden [20]. Zusätzlich ist ein generelles Problem der Aufnahmen bei tiefen Temperaturen die thermische Stabilität, da sich bei den meisten Aufbauten das Objektiv und die Probe nicht in derselben Temperaturumgebung befinden, teilweise sogar durch eine Scheibe getrennt sind. Es kommt daher sehr leicht zu thermisch induzierten Störungen beim Scannen der Probe [20]. Bei der Verwendung von konfokalem „sample scanning“, also dem Verfahren der Probe anstatt des Laserfokus, fallen die verschlechterten „off axis“ Eigenschaften des Objektivs kaum ins Gewicht [163]. Glücklicherweise haben sich zudem die Immersionsobjektive aus dem Hause Microthek ebenso wie deren Luftobjektive, welche im Arbeitskreis Brecht schon lange Verwendung finden, als ebenso tieftemperaturtauglich herausgestellt. Mit Hilfe des patentierten Probentransfersystems, das den Austausch der Probe in bzw. aus dem Kryostaten ermöglicht, konnte die Probe mit 1-Propanol als Immersionsmedium im erstarrten Zustand in den Kryostat bei 120 K übergeben werden. Durch die Erwärmung des Kryostaten um ca. 40 K und somit über den Schmelzpunkt von 1-Propanol, konnten Immersionsexperimente erfolgreich erzielt werden. Als Probe für diese Experimente wurden die QP eFluor(R) 650NC verwendet, welche aufgrund der minimalen Größe von 8,7 nm [164] als Punktlichtquelle betrachtet werden können und dadurch die Auflösung des Mikroskops über die erhaltene Halbwertsbreite der PSF bestimmt werden kann. Außerdem zeichnen sich QP durch einen hohen Wirkungsquerschnitt, eine hohe Quantenausbeute und in diesem Fall durch einen molaren Extinktionskoeffizient von  $1,11^6$  und Emissionsmaximum bei 650 nm ohne Seitenbanden aus [165]. Mit Hilfe von Vergleichsmessungen mit einem Luftobjektiv bei derselben Temperatur konnte die deutliche Verbesserung der Auflösung um den Faktor 1,3 gezeigt werden. Neben der Abbildung von QP wurden zusätzlich erste Messungen mit gelabelten (*E. Coli*, Trypanosomen, *Ara*pidopsis) Zellen mit 1-Propanol als Immersionsmedium erfolgreich durchgeführt.

## 6.1 Theoretische Grundlagen - Einzelmolekülexperimente bei tiefen Temperaturen

Die theoretischen Grundlagen zu den Phänomenen „Auflösung und Beugung“ sowie konfokalen Mikroskopie wurden bereits in den Kapiteln 3.4 und 5.1.1 behandelt. Daher werden in diesem Kapitel ausschließlich die Besonderheiten von Einzelmolekülexperimenten bei tiefen Temperaturen dargestellt. Das erste Einzelmolekülexperiment wurde von Moerner et al. im Jahre 1989 bei tiefen Temperaturen mit Pentacen-Moleküle in p-Terphenyl-Kristallen durchgeführt [99]. Einzelmolekülexperimente haben dabei gegenüber sogenannten „bulk“-Messungen eine Vielzahl an Vorteilen [166, 167]. Ein Hauptvorteil bei der Messung einzelner Moleküle ist, dass nicht über die Gesamtheit aller Moleküle gemittelt werden muss [168]. Durch die Spektroskopie eines einzelnen Moleküls gewinnt man durch die spektrale Verteilung Erkenntnisse über die Umgebung, deren unterschiedliche Konfigurationen und Zustände des Moleküls. Ein weiterer Vorteil ist die bessere Detektion von zeitabhängigen Prozessen wie dem Blinken, die sich im Ensemble ausmitteln würden. Bei dem Übergang eines einzelnen Moleküls in seinen Triplett-Zustand, was einen Grund für das Blinken darstellt, wird kein Fluoreszenz-Photon emittiert. Dieser Effekt erscheint dadurch bei einem Einzelmolekülexperiment als Folge von Einzelereignissen digital, d.h. das Molekül emittiert ein Photon oder nicht und kann so detektiert werden. Ein weiteres Phänomen, welches bei Einzelmolekülexperimenten beobachtet werden kann, wird als sogenannte spektrale Diffusion bezeichnet. Dieser Effekt beschreibt die Variation der Anregungs- bzw. Emissionswellenlänge aufgrund dynamischer Prozesse in der Umgebung der Moleküle oder leichten Veränderungen in der Molekülstruktur. Problematisch ist auch bei Einzelmolekülexperimenten weiterhin, dass viele inter- und intramolekulare Prozesse schneller ablaufen als die Zeitauflösung des konfokalen Mikroskops bzw. des Detektors. So können Konformationsänderungen oder geometrische Änderungen nicht detektiert werden. Grund für dieses zeitabhängige Verhalten ist die permanente Kopplung (Energieaustausch) zwischen Molekül und Umgebung des Moleküls, meist über sogenannte Phononen (Gitterschwingungen). Ein Absenken der Temperatur (bis zu 1,6 K) führt zu weniger Phononen (in der Umgebung des Moleküls) und verhindert bzw. verlangsamt Konformationsänderungen im Molekül, wodurch das Molekül in einem Zustand praktisch eingefroren werden kann [20, 169]. Experimente bei tiefen Temperaturen werden aufgrund

verschiedenster weiterer Vorteile mit unterschiedlichsten Proben wie Moleküle, Quantenpunkte oder biologischen Proben auf Einzelmolekülniveau angewendet. So werden geometrische Änderungen (z.B. Konformationsisomere, Änderungen durch Bleichprozesse) von Molekülen bei diesen Temperaturen bzw. Bedingungen weitestgehend unterdrückt. Verantwortlich ist hierfür die Unterdrückung der Rotation und Schwingung des Moleküls (von flüssigen oder gasförmigen Proben) bei tiefen Temperaturen. So ist es möglich, einen 0-0-Übergang (sogenannte Null-Phononen-Linie), bei dem keine vibronische Schwingung stattfindet, zu erzielen [166, 167]. Aufgrund der reduzierten Phononen ergibt sich ein weiterer positiver Effekt: Durch den Wegfall verschiedener nicht-strahlender Zerfallskanäle ist die Fluoreszenz bei tiefen Temperaturen begünstigt (vergleiche Kapitel 3.2 und Gleichung 5.6). Dadurch ist die Fluoreszenz-Quantenausbeute um ein Vielfaches höher als bei Raumtemperatur, wo sie aufgrund von Photobleichen und weiterer photochemischen Reaktionen auf ca.  $10^6$  Photonen limitiert ist [166]. Aufgrund der Helium-Atmosphäre sind zudem typische Quenching-Moleküle wie Sauerstoff nicht vorhanden, was die Intensität weiter erhöht. So können fluoreszierende Komplexe wie z.B. autofluoreszierende Proteine durch die deutliche Erhöhung der Autofluoreszenz (auch Primärfluoreszenz genannt) bei tiefen Temperaturen in ihrem nativen Zustand mikroskopiert werden. Dadurch eignet sich die Kombination aus konfokaler Fluoreszenz-Mikroskopie/Spektroskopie und tiefen Temperaturen hervorragend für die Erforschung von Photoprozessen von komplexen biologischen Systemen wie z.B. dem Photosystem [169, 170]. Kryogene Mikroskopie von Proteinen und Zellen bietet die Möglichkeit, sensitive Proben über einen langen Zeitraum mit hoher lateraler und spektraler Auflösung zu untersuchen. Konjugierte Doppelbindungen, wie sie beispielsweise in Ringstrukturen auftreten, zeigen dieses Phänomen der Autofluoreszenz und können somit detektiert werden. Ein Beispiel für ein in der Natur vorkommendes Molekül mit diesen Eigenschaften ist der Blattfarbstoff Chlorophyll. Außerdem degradieren und bewegen sich gefrorene biologische Proben nicht, was das Mikroskopieren deutlich vereinfacht.

Normalerweise muss hierzu die Probe fixiert werden, was eine strukturelle Veränderung der Probe mit sich bringt. Kombiniert man allerdings die Tieftemperaturexperimente mit einem schonenden Frierprozess, wie beispielsweise dem „plunge-freezing“ oder „high-pressure-freezing“, werden Proteine oder auch ganze Zellen in nahezu nativem Zustand eingefroren. Unter diesen Umständen wird ein Experimentieren mit allen Vorzügen der Tieftemperaturmikroskopie und -spektroskopie an nahezu nativen biologischen Proben

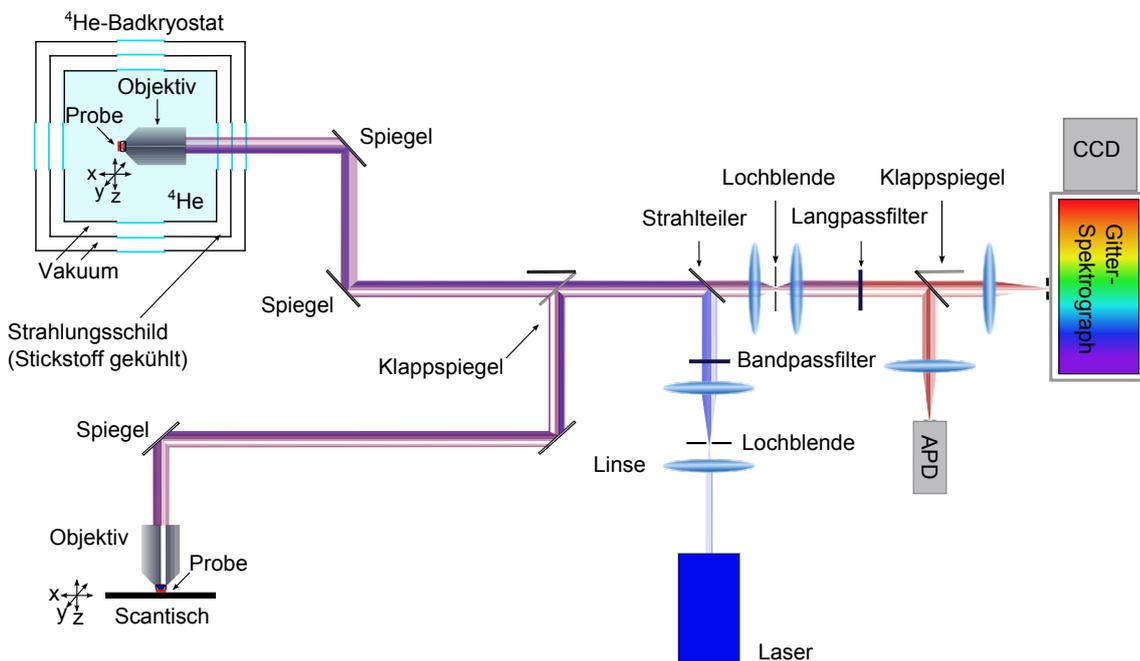
ermöglicht. Ein weiterer wichtiger Parameter, der die Detektierbarkeit eines Emitters maßgeblich beeinflusst, ist dessen Wirkungsquerschnitt (absorption cross-section). Dieser ist bei Tieftemperatur aufgrund der schmalen Linienbreite der Null-Phononen-Linie deutlich erhöht [166]. So steigt der Wirkungsquerschnitt eines aromatischen Systems von  $6 \text{ \AA}^2$  auf  $10^6 \text{ \AA}^2$  [166].

## 6.2 Experimenteller Aufbau

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Apparaturen für konfokale Mikroskopiemessungen verwendet. Das in diesem Abschnitt verwendete, von Dr. Martin Hussels, Dr. Alexander Konrad und Prof. Dr. Marc Brecht entwickelte und aufgebaute konfokale Mikroskop wurde bisher hauptsächlich für Einzelmolekülspektroskopie von Photosystemkomplexen bei tiefen Temperaturen verwendet [112, 170–173]. Dieses Mikroskop wird nachfolgend in seinem für diese Experimente modifizierten Zustand beschrieben. Zusätzlich zu der 665 nm cw Laser-Diode wurde das bestehende Mikroskop um eine 488 nm cw Laser-Diode (OBIS 488-20 LS) erweitert. Damit die volle NA des Objektivs genützt werden kann, muss der Laserstrahl das Objektiv vollständig ausleuchten. Dazu musste der Laserstrahldurchmesser der Laser-Diode von ca. 1,5 mm mit Hilfe eines Keplerschen Fernrohrs (telezentrisches System) aufgeweitet werden. Hierzu wurde der Laserstrahl nach einer Linse mit Brennweite  $f_1 = 50 \text{ mm}$  (Thorlabs LA1131) und einer zweiten mit  $f_2 = 250 \text{ mm}$  (Thorlabs LA1461) um das 5-Fache auf ca. 7,5 mm erweitert. Um einen linear-polarisierten Gauß-Strahl (die sogenannte  $TEM_{00}$ -Mode) zu garantieren, wurde zusätzlich eine Punktlochblende (Durchmesser:  $100 \text{ }\mu\text{m}$ ) in das Keplersche Fernrohr implementiert. Nach einem Bandpassfilter (AHF Analysentechnik, F49-488) zur Unterdrückung von Laser-Seitenbanden wird der Laserstrahl mit Hilfe eines dichroitischen Strahlenteilers (AHF Analysentechnik, F48-487), welcher den Laserstrahl in 90 Grad ablenkt, und mehrerer Spiegel (zur Justage) in das Objektiv (Microthek, 60x NA=0,85 und 100x, NA=1,25) gelenkt. Dieses Luftobjektiv befindet sich in einem Heliumbad-Kryostat mit Heliumreservoir (Janis, SVT-200-5), wodurch Messungen bei tiefen Temperaturen (1,6 K-160 K) ermöglicht werden. Das im Reservoir befindliche Helium kann über eine Kapillare in die Probenkammer geleitet werden. Dabei wird der Zufluss über ein Nadel-

ventil geregelt. Um Wärmestrahlung von außen zu verhindern, ist der Teil unterhalb des Heliumreservoirs mit einem mit Stickstoff gekühlten Strahlungsschild umgeben. Zwischen diesen Kammern werden alle Bereiche auf einen Druck von ca.  $10^{-5}$  mBar evakuiert. Die Probe kann mit Hilfe eines patentierten Transfersystems [174] bestehend aus mehreren Piezoaktuatoren in einem Temperaturbereich von 4.2 K bis 300 K ein- oder ausgeschleust werden. Um ohne Störungen durch Gasbläschen und somit problemlos messen zu können, wird die Temperatur des Heliums weiter abgesenkt. Hierzu wird durch den Einsatz einer Drehschieberpumpe (Alcatel, 063-132 169560) in der mit flüssigem Helium gefüllten Probenkammer Heliumgas abgepumpt, um das flüssige Helium über den energieentziehenden Prozess der Verdampfung die Temperatur auf bis zu 1.6 K abzusenken. Eine detaillierte Beschreibung des Probentransfersystems beinhalten Veröffentlichungen von Dr. Martin Hussels [163, 175]. Nach der erfolgten Übergabe kann die Probe bzw. der Probenhalter von sogenannten Piezo-Steppern (Attocube, 2x ANPx320 für die x- und y-, 1x ANPz101eXT für die z-Achse) positioniert und mit Scannern (Attocube, 2x AN-Sxy100lr für x- und z-, ANSz100lr für y-Achse) abgerastert werden. Dabei wurde mit Hilfe eines Kupfergitters mit 2000 Linien/Zoll die spannungsabhängige Ausdehnung und Linearität der Scanner kalibriert. Alternativ kann mit diesem Mikroskop außerhalb des Kryostaten auch bei Raumtemperatur mit verschiedenen Objektiven (Microthek, 60x, NA=0,85 oder Microthek, 100x, NA=1,25) gemessen werden. Zum Abrastern der Probe wird hierfür ein Feedback kontrollierter Scan-Tisch (Physik Instrumente P-517.3CL) mit einem Scan-Bereich von  $100 \times 100 \times 20 \mu\text{m}$  verwendet. Das emittierte Licht des Tief- oder Raumtemperaturpfades wird vom selben Objektiv wieder eingesammelt und kollimiert. Anschließend wird der dichroitische Strahlenteiler transmittiert und der Lichtstrahl über eine achromatische Linse mit Brennweite  $f=60$  mm (Thorlabs, AC254-060-B-ML) auf eine Punktlochblende (Durchmesser:  $30 \mu\text{m}$ ) fokussiert, um bei optimaler Justage nur Signale der Fokusebene zu detektieren und Licht außerhalb der Fokusebene zu eliminieren. Nach der Punktlochblende wird mit einem weiteren Achromat derselben Brennweite (Thorlabs, AC254-060-B-ML) das detektierte Licht wieder kollimiert und auf einen Langpassfilter (AHF Analystechnik, AHF F76-490) gelenkt, welcher das Laserlicht weitestgehend unterdrückt. Mittels eines computergesteuerten Klappspiegels kann zwischen zwei Detektionsmöglichkeiten gewählt werden. Zum einen kann zum „imagen“ der Probe eine Avalanche-Photodiode (Laser Components, COUNT-100C) verwendet werden und zum anderen ein Gitterspektrograph (Andor Technology, Shamrock 500i) mit

CCD-Kamera (Andor Technology, DU920P-BR-DD) zur spektralen Detektion. Dabei wird das Signal mit jeweils einer weiteren Linse (Thorlabs, AC254-050-B-ML) auf die APD oder (Thorlabs, AC254-150-B-ML) den Gitterspektrograph fokussiert. Um unterschiedliche spektrale Auflösungen zu erzielen, ist der Spektrograph mit zwei Reflexionsgittern (200 und 400 Linien pro Millimeter) ausgestattet. Das ganze Mikroskop befindet sich zur Schwingungsdämpfung auf einem aktiv gedämpften optischen Tisch (Opta GmbH). Der genaue Strahlengang der Anregung und Detektion sowie die Detektionsmöglichkeiten und Optiken sind in Abbildung 6.1 dargestellt.



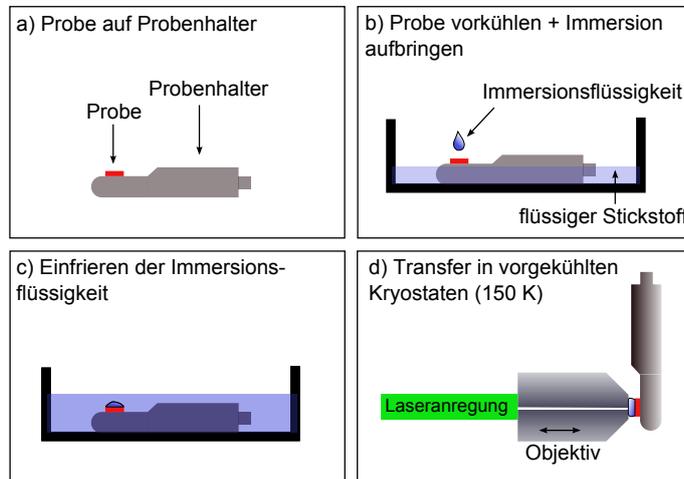
**Abbildung 6.1:** Schematischer Aufbau des verwendeten Aufbaus für Tieftemperatur- und Raumtemperaturexperimente.

## 6.3 Probenpräparation

Für die Präparation der QP (eFluor(R) 650NC von ebioscience) wurden diese mit einer 50:50-Mischung aus dreifach destilliertem Wasser und Glycerin auf eine Konzentration von

1 pmol/l verdünnt, um einzelne QP und keine Ansammlungen (Cluster) zu detektieren. Die bisher verwendete Probenpräparation für Messungen im Kryostat war eine Sandwich-Struktur aus Deckglas, Probe und einem weiteren Deckglas [175]. Dazu wird das erste, mit Aceton gereinigte, Deckglas auf den Probenhalter mittels Vakuumfett angedrückt. Nachdem die Probe in sehr geringer Konzentration (meist in Konzentrationen von nm bis pm, je nach Anwendung), üblicherweise 1  $\mu$ l, mittels Eppendorf-Pipette aufgebracht wurde, folgte ein weiteres Deckglas, da alle verwendeten Objektive Deckglas-korrigiert sind. Die Probe konnte anschließend in den vorgekühlten Kryostat übergeben und mit einem Luftobjektiv (NA=0.85) vermessen werden. Zur Probenpräparation der QP wurden ebenfalls 1  $\mu$ l dieses Gemisches auf ein 4  $\times$  4 mm großes Deckglas pipettiert und mit einem zweiten Deckglas bedeckt. Um 1-Propanol als Immersionsmedium einzusetzen, bedarf es demgegenüber einer zusätzlichen Präparation, da das 1-Propanol nicht im Kryostat, sondern vor dem Einschleusen auf die Probe aufgebracht werden muss. Da 1-Propanol bei Raumtemperatur flüssig vorliegt und die Probe senkrecht in den Kryostat eingeführt wird, konnte das Immersionsmedium nicht flüssig in den Kryostat eingebracht werden. Zudem hätte diese Präparationsform den Nachteil, dass Luftfeuchtigkeit mit eingeschleust würde, welche dann gefriert und so die Detektion maßgeblich beeinträchtigt bzw. unmöglich macht. Daher wurde wie in Abbildung 6.2 dargestellt eine Probenpräparation entwickelt, wodurch das 1-Propanol sowie die Probe auf flüssige Stickstofftemperatur abgekühlt und das Immersionsmedium im festen Zustand übergeben werden kann. Dazu wurde (siehe Abbildung 6.2a) die Probe auf den Probenhalter fixiert und in einem flüssigen Stickstoffbad vorgekühlt. Im zweiten und dritten Schritt (Abbildung 6.2b und c) wird ein Tropfen des Immersionsmediums auf das obere Deckglas getropft und mit dem Probenhalter auf 77 K ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) abgekühlt. Abschließend folgt der Transfer in den mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Kryosten (etwa 120 K). Der Kryostat wird dann mittels Heizwiderstand langsam erwärmt und über einen Cernox-Temperatursensor (CX-1030-SD-HT 0.3L) nahe der Probe konstant auf 160 K geregelt. Dadurch schmilzt das 1-Propanol (Schmelzpunkt 147 K) und das Objektiv kann in das flüssige Medium in Richtung Probe gefahren werden bis der Fokus des Objektivs die Probe erreicht hat (siehe Abbildung 6.2d und 6.3). Für die Kontrollmessungen mit dem Luftobjektiv bei 160 K wurde die Probe bis auf den Immersionsschritt exakt gleich präpariert. Für die Vergleichsmessungen mit demselben Immersionsobjektiv bei Raumtemperatur wurden 22  $\times$  22 mm große Deckgläser verwendet, welche mit Chromschwefelsäure, dreifach destilliertem Wasser

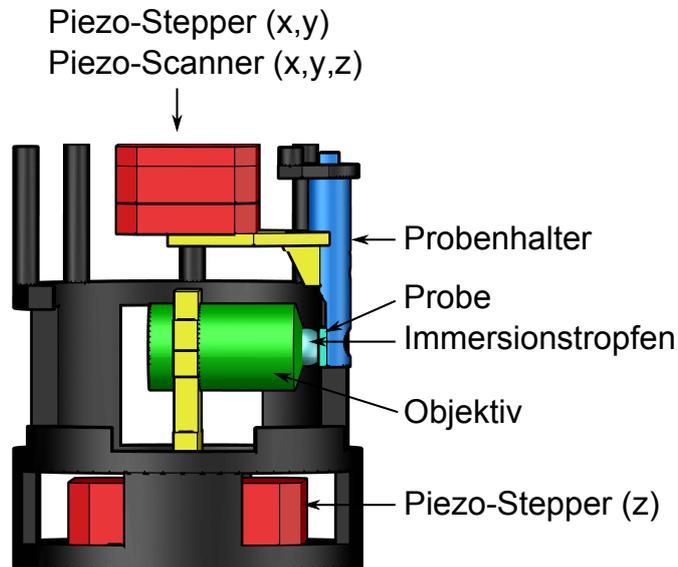
und Methanol gereinigt wurden. Anstatt des 1-Propanols wurde als Immersionsmedium Immersionsöl (Zeiss Immersol 518 F) verwendet.



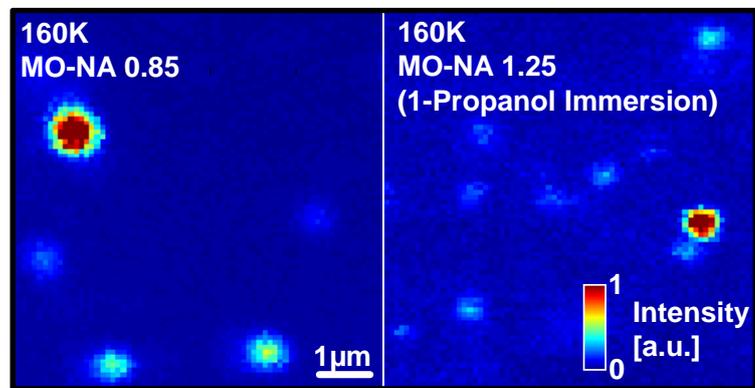
**Abbildung 6.2:** Präparationsschritte der Probe mit 1-Propanol als Immersionsmedium für Messungen bei 160 K (abgebildet mit Genehmigung von [154] © The Optical Society). a) Probe wird auf dem Probenhalter platziert. b) Probe und Probenhalter werden mit flüssigem Stickstoff auf 77 K heruntergekühlt und ein Tropfen 1-Propanol aufgetropft. c) Immersionstropfen, Probe und Probenhalter werden auf 77 K gekühlt. d) Transfer in den auf ca. 120 K vorgekühlten Kryostaten.

## 6.4 Ergebnisse

Wie in der Einleitung dieses Kapitels bereits beschrieben, wurde die auflösungssteigernde Technik der Immersion bei tiefen Temperaturen anhand von Vergleichsmessungen mit einem Luftobjektiv bei derselben Temperatur (160 K) und mit demselben Immersionsobjektiv bei Raumtemperatur belegt [154]. Abbildung 6.4 zeigt den Vergleich von konfokalen Lumineszenzaufnahmen der QP-Probe bei 160 K mit einem Luftobjektiv (Abbildung 6.4 links) mit einer NA von 0,85 und einem Immersionsobjektiv (Abbildung 6.4 rechts) (NA=1.25 mit Immersionsöl) aufgenommen mit 1-Propanol als Immersionsmedium und angeregt mit einer 488 nm Laserdiode. Beide Aufnahmen zeigen symmetrische Spots ohne Verzerrungen und somit keine Anzeichen von Bewegung im System oder andere z.B.

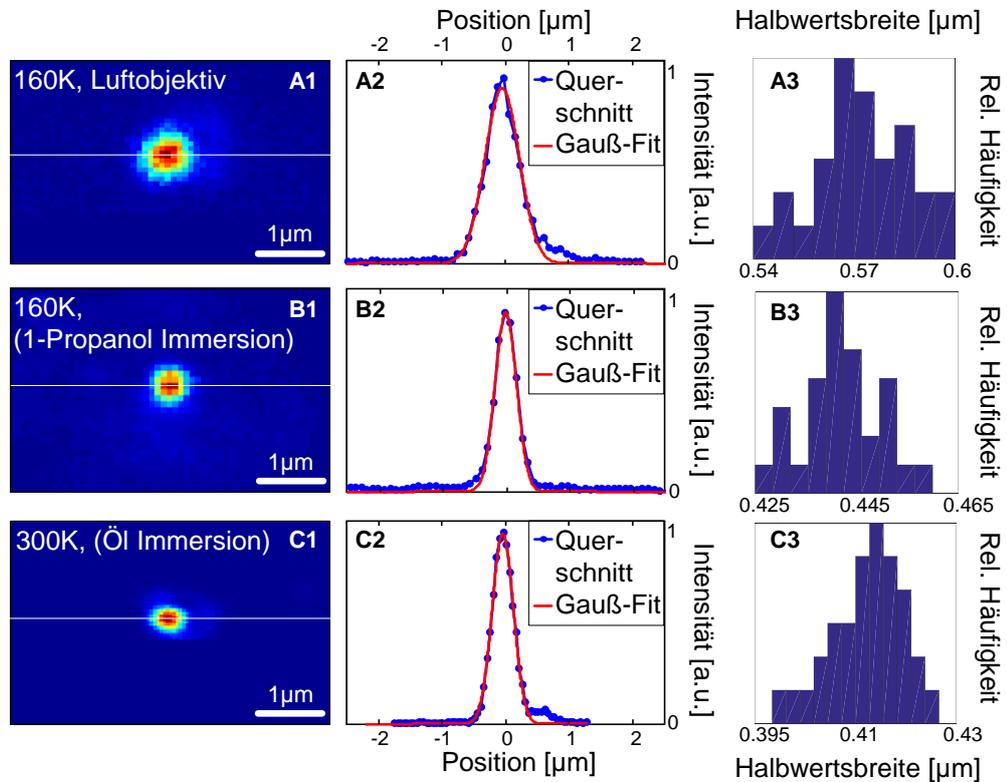


**Abbildung 6.3:** Detaillierte Abbildung des patentierten Transfersystems bzw. Messung mit Immersion nach [163].



**Abbildung 6.4:** Links: konfokal aufgenommene Lumineszenz eines QP bei 160 K mit einem Luftobjektiv mit NA von 0,85. Rechts: QP bei 160 K aufgenommen mit einem Immersionsobjektiv (NA von 1.25 mit Immersionsöl) mit 1-Propanol als Immersionsflüssigkeit (abgebildet mit Genehmigung von [154] © The Optical Society).

thermisch induzierte Instabilitäten. Dabei fällt sofort die Auflösungssteigerung in Form der geringeren Spotgröße bzw. Halbwertsbreite auf. Aufgrund jeweils unterschiedlicher Proben und der durch den Objektivwechsel erforderlichen Neujustierung ist die Intensität der QPs nicht repräsentativ. Außerdem befinden sich nicht immer alle QP in dem durch den Laser angeregten konfokalen Volumen und sind daher nur bedingt detektierbar. Um die Auflösungssteigerung zu quantifizieren wurden mit beiden Objektiven (Luft- und Immersionsobjektiv) QP-Proben gescannt und die PSF der einzelnen QP bestimmt. Zusätzlich zu den Tieftemperaturexperimenten wurden mit dem Immersionsobjektiv Experimente an der gleichen QP-Probe bei Raumtemperatur, allerdings mit Immersionsöl als Immersionsmedium, durchgeführt. Abbildung 6.5 zeigt exemplarisch je einen QP für alle drei Konditionen, wobei A1-A3 dem Luftobjektiv bei 160 K, B1-B3 dem Immersionsobjektiv (mit 1-Propanol als Immersionsmedium) bei 160 K und C1-C3 dem Immersionsobjektiv mit Ölimmersion bei 300 K entspricht. Abbildung 6.5 A1 zeigt die räumlich aufgelöste Lumineszenz eines einzelnen QP bei 160 K aufgenommen mit einem Luftobjektiv. Dabei beschreibt 6.5 A2 den zugehörigen Querschnitt (in A1 mit weißer Linie angedeutet), welche die Intensität als Funktion der x-Scanner Position in  $\mu\text{m}$  beschreibt (blaue Kurve). Dieser Intensitätsverlauf wurde anschließend mit einer Gaußfunktion (rote Kurve), gefittet um die Halbwertsbreite der lateralen PSF zu bestimmen. Aufgrund der Anregung mittels Gaußstrahl (um mehrere Größenordnungen größer als der QP) und der minimalen Größe des QP kann diese Näherung des Gaußfits angewendet werden [176]. Abbildung 6.5 A3 zeigt die Verteilung der Halbwertsbreiten aller gemessenen QPs bei 160 K mit einem Luftobjektiv mit NA von 0,85. B1 zeigt einen QP ebenfalls bei 160 K gemessen mit einem Immersionsobjektiv und 1-Propanol als Immersionsmedium. B2 und B3 beschreiben wieder den zugehörigen Querschnitt zur Bestimmung der Halbwertsbreite sowie die Verteilung der Halbwertsbreite aller gemessenen QP unter diesen Bedingungen. Abbildung 6.5 C1-C3 zeigt einen aufgenommenen QP, Querschnitt und Verteilung bei Verwendung eines Ölimmersionsobjektivs mit Immersionsöl bei Raumtemperatur (300 K). Zusammenfassend beschreibt Tabelle 6.1 die erzielte Halbwertsbreiten bei unterschiedlichen Messbedingungen und die resultierende Auflösungssteigerung gegenüber dem Luftobjektiv.



**Abbildung 6.5:** Drei konfokale Lumineszenz-Bilder von einzelnen QPs, aufgenommen bei unterschiedlichen Bedingungen. A1 zeigt einen Ausschnitt eines QP, aufgenommen bei 160 K mit einem Luftobjektiv mit NA von 0,85. A2 zeigt den Querschnitt von A1 (weiße Linie), gefittet mit einer Gaußfunktion. Die berechnete durchschnittliche Halbwertsbreite aller QP bei diesen Konditionen ist dabei 0,574  $\mu\text{m}$ . A3 Verteilung der Halbwertsbreiten von QPs bei 160 K mit einem Luftobjektiv. B1 zeigt ein Ausschnitt eines QP, aufgenommen bei 160 K mit einem Immersionsobjektiv mit NA von 1,25 (mit Immersionsöl) und 1-Propanol als Immersionsflüssigkeit. B2 zeigt den Querschnitt von B1 (weiße Linie), gefittet mit einer Gaußfunktion. Die berechnete durchschnittliche Halbwertsbreite aller QP bei diesen Konditionen ist dabei 0,442  $\mu\text{m}$ . B3 Verteilung der Halbwertsbreiten von QPs bei 160 K 1-Propanol Immersion. C1 zeigt ein Ausschnitt eines QP, aufgenommen bei Raumtemperatur (300 K) mit einem Immersionsobjektiv mit NA von 1,25 und Immersionsöl als Immersionsflüssigkeit. C2 zeigt den Querschnitt von C1 (weiße Linie), gefittet mit einer Gaußfunktion. Die berechnete durchschnittliche Halbwertsbreite aller QP bei diesen Konditionen ist dabei 0,415  $\mu\text{m}$ . C3 Verteilung der Halbwertsbreiten von QPs bei 300 K mit Ölimmersion (abgebildet mit Genehmigung von [154] © The Optical Society).

**Tabelle 6.1:** Vergleich der experimentell bestimmten Daten von QPs, aufgenommen mit einem Luftobjektiv bei 160 K, einem Immersionsobjektiv mit 1-Propanol als Immersionsmedium bei 160 K und demselben Objektiv mit Immersionsöl bei 300 K (abgebildet mit Genehmigung von [154] © The Optical Society).

	Luftobjektiv	<b>Immersionsobjektiv</b>	Immersionsobjektiv
Immersionsmedium	Luft	<b>1-Propanol</b>	Immersionsöl
Brechungsindex [bei 300 K]	1.0	<b>1.3851[177]</b>	1.518
Temperatur [K]	160	<b>160</b>	300
FWHM [nm]	574	<b>442</b>	415
Auflösungssteigerung	–	<b>1.3</b>	1.38

## 6.5 Diskussion

Wie in Kapitel 6.4 beschrieben, zeigen die mit 1-Propanol bei 160 K aufgenommenen QP in Bezug auf Qualität, Bereich und Auflösung ähnlich gute Ergebnisse wie das gleiche Objektiv mit Immersionsöl bei Raumtemperatur. Tabelle 6.1 beschreibt einen Auflösungssteigerungsfaktor von 1.3 im Vergleich zum Luftobjektiv. Aufgrund des Mikroskopdesigns mit patentiertem Probentransfer, wobei Objektiv und Probenhalter in derselben Umgebung sind, treten keine Temperaturgradienten auf. Daher können Bilder bei 160 K mit Immersion ohne Verzerrungen und thermische Instabilitäten aufgenommen werden. Der Grund für die Auflösungssteigerung ist der erhöhte Brechungsindex von 1-Propanol gegenüber Luft bzw. Helium beim Luftobjektiv. Für die Temperatur von 160 K findet man in der Literatur keine Brechungsindexangabe von 1-Propanol. Mit der Näherung des TOC-Wertes von  $-4 \times 10^{-4}$  erhalten wir für 160 K einen Wert des Brechungsindex von 1,46 [177]. Da die NA linear von diesem Brechungsindex nach Gleichung 3.26 in Kapitel 3.4 abhängig ist und somit auch die Halbwertsbreite, welche nach Gleichung 5.4 in Kapitel 5.1.1 mit steigender NA abnimmt, erhöht sich demzufolge die Auflösung. Hell et al. zeigte, dass eine Fehlanpassung des Brechungsindex zwischen Objektiv und Deckglas zu einer verbreiterten FWHM der PSF, Verzerrungen und Intensitätsverlusten führt [105]. Allerdings verglichen sie Wasser und Glycerol ( $\Delta n_e = 0,14199$ ), was eine größere Brechungsindexdifferenz gegenüber Immersionsöl und 1-Propanol ( $\Delta n_e = 0,058$ ) darstellt. Zudem verschlechtert sich in dieser Studie die laterale Auflösung nur marginal, die axiale Auflösung allerdings um den Faktor 1.4 bei einer Brechungsindexdifferenz von Wasser und Glycerol. Aufgrund der sehr dünnen Probe und der geringen Brechungsindexdifferenz

**Tabelle 6.2:** Vergleich der experimentell bestimmten Daten von QPs inklusive berechneter NA bei unterschiedlichen Bedingungen

	Luftobjektiv	<b>Immersionsobjektiv</b>	Immersionsobjektiv
Immersionsmedium	Luft	<b>1-Propanol</b>	Immersionsöl
Brechungsindex [at 300 K]	1.0	<b>1.3851[177]</b>	1.518
Temperatur [K]	160	<b>160</b>	300
FWHM [nm]	574	<b>442</b>	415
Auflösungssteigerung	–	<b>1.3</b>	1.38
NA ( $\lambda = 488 \text{ nm}$ )	0,43	0,56	0,6

erwarten wir bei unserer Methode keinen nachteiligen Effekt in Bezug auf die laterale Auflösung. Die minimale Fehlanpassung - d.h. der geringe Brechungsindexunterschied zwischen Glas und 1-Propanol - führt dabei nur zu einer geringeren NA und Sammeleffizienz des Objektivs gegenüber der Verwendung mit normalem Immersionsöl. Der Grund 1-Propanol als Immersionsflüssigkeit für Messungen bei 160 K zu wählen, waren dessen physikalische Eigenschaften wie Schmelzpunkt von 117 K ( $-126 \text{ }^\circ\text{C}^1$ ), Viskosität und optische Klarheit bei großem Brechungsindex. Aufgrund des geringeren Brechungsindex von Propanol ( $n_{160K}=1,46$  [177]) gegenüber Immersionsöl mit ( $n_{546,1,298K}=1,518$ ) und der Vielzahl an Optiken (Kryofenster, mehr Spiegel als im Raumtemperaturpfad) ist der Vergrößerungsfaktor 1,3 mit 1-Propanol gegenüber 1,38 zu Ölimmersion, wie theoretisch zu erwarten war, etwas geringer.

Für diese Art der Probenpräparation ist das Probentransfersystem unverzichtbar, was gleichzeitig durch das sample scanning anstatt des beam scanning die Auflösung weiter steigert. Durch dieses Transfersystem können gefrorene (vitrifizierte) Proben jederzeit in einem Temperaturbereich von 4-300 K ein- und ausgebaut werden. Die Verwendung eines Immersionsobjektivs mit hoher NA und gleichzeitig geringem Arbeitsabstand in Kombination mit einem mechanisch stabilen System ohne Temperaturgradienten gestattet die Aufnahme von hochauflösenden Bildern bei tiefen Temperaturen. Das neu entdeckte Prinzip der Immersion bei tiefen Temperaturen erhöht die laterale Auflösung bei tiefen Temperaturen maßgeblich gegenüber den bisher eingesetzten Luftobjektiven.

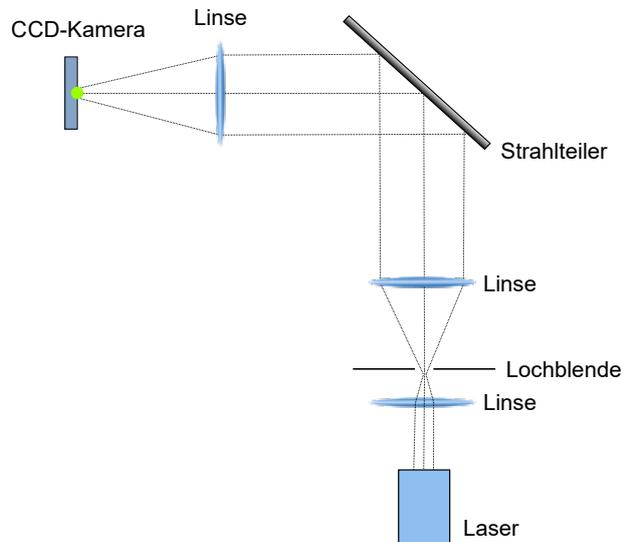
Berechnet man allerdings mit Hilfe der Gleichung 5.4 aus den Halbwertsbreiten der Messungen die NA, erhält man viel zu kleine Werte. Für alle drei Konditionen wurde die Tabelle 6.1 um die Werte für die NA ergänzt (siehe Tabelle 6.2). Da alle drei NA-Werte

<sup>1</sup>GESTIS-Stoffdatenbank, 1-Propanol, CAS-Nummer: 71-23-8

deutlich zu gering sind, muss ein systematischer Fehler vorliegen. Erfreulich ist, dass sich die aus den Messdaten berechneten NA-Werte für 1-Propanol und Immersionsöl nur geringfügig unterscheiden. Hauptgrund für diese NA ist der nicht für „imaging“-Experimente geeignete Strahlteiler. Da der Aufbau üblicherweise nur für die Spektroskopie verwendet wird, wurde hier ein ultra-dünner Strahlteiler mit einer Dicke von 1,05 mm (AHF, F48-487), welcher in eine Thorlabs-Halterung (FFM1) eingespannt wird, verwendet. Diese Strahlteiler weisen eine zu geringe Planheit auf, weswegen sich der Strahl nach der Reflexion am Strahlteiler divergent verhält und somit in einem vergrößerten Fokus nach dem Objektiv abgebildet wird. In Kombination mit der Thorlabs-Halterung, welche sich im Nachhinein als zu kraftvoll erwiesen hat, wird eine zu große Kraft auf den Strahlteiler ausgeübt, welche diesen zusätzlich verbiegt. Dieser Sachverhalt wurde bei der Firma AHF mittels eines Wellenfrontensensors (MetroLux MI4062) nach dem Shack-Hartmann-Prinzip untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Strahlteiler ohne Thorlabshalterung eine Planheit von 0,23 Lambda also ca.  $\lambda/4$  aufweist. Mit der verwendeten Halterung verschlechtert sich die Planheit der optischen Komponente auf 0,74 Lambda (ca.  $3\lambda/4$ ). Nach Rücksprache mit dem Hersteller Semrock und AHF sollte ein Imaging-Strahlteiler eine Planheit von 0,1 Lambda (ca.  $\lambda/10$ ) aufweisen. Der Filter-Hersteller Semrock beschreibt diesen Effekt in einer zum Download erhältlichen Broschüre [178]. Mit dem in Abbildung 6.6 realisierten Aufbau wurde der Einfluss der Planheit bzw. des Radius' der Krümmung ( $r_c$ , englisch, radius of curvature) des Strahlteilers bestimmt. Je größer der Radius der Krümmung, desto planer ist der Strahlteiler. Um den Effekt der Planheit darzustellen, wurde von der Firma Semrock ein Aufbau realisiert, indem ein Laserstrahl mit einem telezentrischen System aufgeweitet und auf einen Strahlteiler mit unterschiedlicher Planheit in  $45^\circ$  gelenkt wird. Nach Reflektion an dem Strahlteiler wurde der Laserstrahl mit einer Linse mit Brennweite von 300 mm auf eine CCD-Kamera fokussiert. So erzielt ein im Durchmesser 11 mm großer Laserstrahl bei extremer Planheit ( $r_c=3414$  m) einen fokussierten Punkt mit einem Durchmesser von  $0,68 \mu\text{m}$ . Der gleiche Strahldurchmesser erzeugt bei einem Strahlteiler mit geringem  $r_c$  (7 m) einen Punkt mit einer Größe von  $343,66 \mu\text{m}$ . So beschreibt der Hersteller die Abhängigkeit des abgebildeten Punktdurchmessers  $d_{\text{punkt}}$  als:

$$d_{\text{punkt}} \approx \frac{f}{\sqrt{2r_c}} d, \quad (6.1)$$

wobei  $f$  die Brennweite der Linse vor der CCD-Kamera und  $d$  den Durchmesser des Laserstrahls darstellt. Dabei bewirkt die Krümmung einen Abbildungsfehler ähnlich dem



**Abbildung 6.6:** Versuchsaufbau der Firma Semrock, um den Einfluss der Planheit des Strahlteilers auf den Fokusbereich zu bestimmen nach [178].

Astigmatismus. Dieser führt zu einer ovalen Form des Laserstrahls nach Reflektion am Strahlteiler, was den fokussierten Laserstrahl deutlich vergrößert, da zwei laterale zur optischen Achse versetzte Foki entstehen. Durch den falschen Strahlteiler typ erhalten wir einen nicht beugungsbegrenzten Anregungsspot, wodurch die zu geringe NA erklärt werden kann. Ein weiterer Grund könnten die vielen Kühlzyklen der Objektive darstellen, mit möglichen Auswirkungen auf die optischen Eigenschaften. Außerdem erreichen in der Regel die wenigsten Objektive ihre in den Spezifikationen angegebene NA.

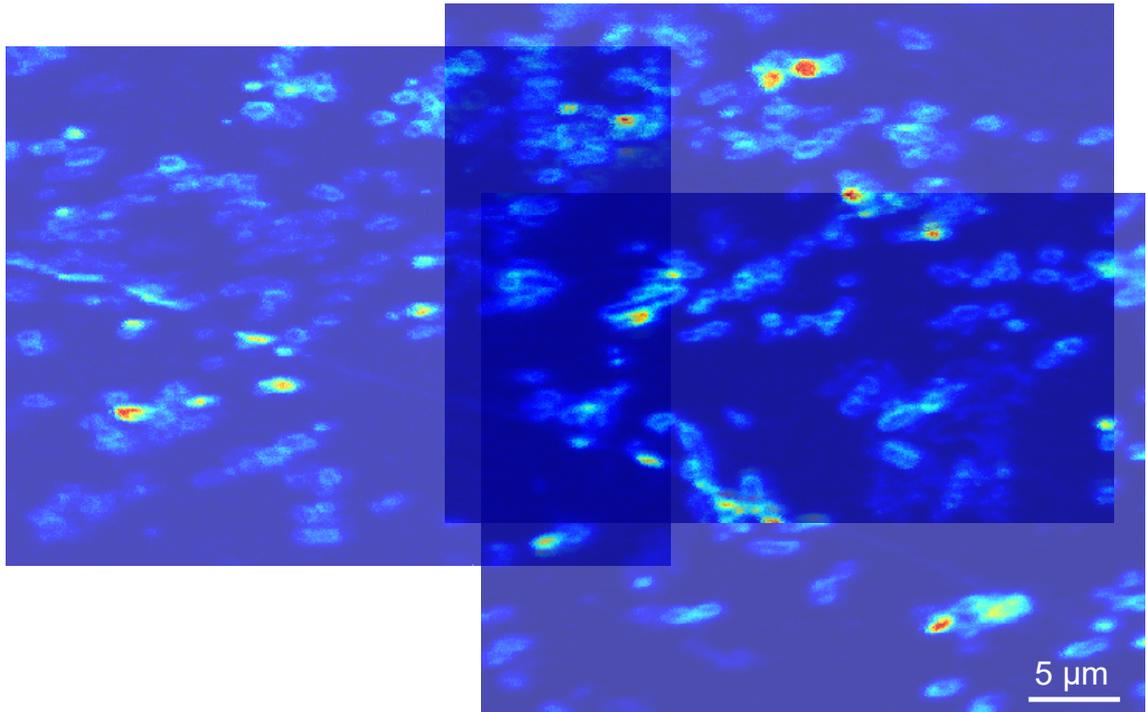
## 6.6 Ausblick

Kürzlich publizierte Übersichtsartikel [20, 169] von auflösungssteigernden Techniken in der Kryo-Mikroskopie sowie eine weitere Publikation zur Immersion bei tiefen Temperaturen beschreiben das hohe wissenschaftliche Interesse dieser Technik [179]. Um die theoretisch mögliche numerische Apertur des Objektivs und somit maximal mögliche Auflösung der Fluoreszenz-Mikroskopie zu erreichen, müssen zuvor einige Mikroskopmodifikationen durchgeführt werden. Hauptaugenmerk wäre die Implementierung eines

„imaging“-Strahlteilers mit neuer Halterung. Dazu müsste für die neuen Ausmaße des Strahlteilers ein Halter konstruiert werden, welcher in das bestehende Mikroskop ohne größere Umbaumaßnahmen implementierbar wäre. Kommerziell erhältliche Halter können entweder nicht in den bestehenden Aufbau implementiert werden oder sind ebenfalls für das „imagen“ nicht geeignet, da sie aufgrund der Klemmvorrichtung den Strahlteiler ebenfalls zu sehr verformen. Eine weitere denkbare Modifikation der Methode könnte der Austausch des Immersionsmediums von 1-Propanol zu Isopentan darstellen. Der Schmelzpunkt von Isopentan befindet sich bei 113 K<sup>2</sup>), was eine Untersuchung von vitrifizierte Proben ermöglichen würde. Um das Immersionsmedium auf vitrifizierte Proben anwenden zu können, müssten einzelne Präparationsschritte überarbeitet werden. Als erster Test von biologischen Proben mit Immersionsmedium wurden Ultradünnschnitte (ca. 70 nm) von Escherichia Coli Bakterien präpariert von Dr. York Stierhof vom ZMBP der Universität Tübingen untersucht. Um die Zellen mittels Fluoreszenz-Mikroskopie detektieren zu können, wurden die Proben mit Alexa 488 gelabelt. Der Immersions-schritt entspricht der Probenpräparation der QP-Probe, welche in Kapitel 6.3 beschrieben wurde. Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von E. coli-Bakterien, welche als Ultradünnschnitte präpariert wurden, konnten aufgenommen werden. Die Größe und Form der Zellen stimmt mit den Literaturangaben überein. Mit diesen Aufnahmen und der einfachen Wiedererkennung von Zellgruppen konnte zudem die Möglichkeit getestet werden, größere Bereiche wie die der Scanner (bei 160 K mit  $36 \times 36 \mu\text{m}$ ) aufzulösen. Durch das Verfahren der Stepper und die Überlagerung von überlappenden Stellen kann so ein maximal  $15 \times 15 \text{ mm}$  großer Bereich aufgenommen werden (siehe Abbildung 6.7). Verknüpfen der Bilder mittels Software ermöglicht die Betrachtung von größeren Ausschnitten der Probe als die pro Scan abgefahrenen  $36 \times 36 \mu\text{m}$ . Durch den Probentransfer dieses Aufbaus könnte die gewonnene Auflösungssteigerung der Fluoreszenz-Mikroskopie zukünftig mit der Elektronenmikroskopie erweitert werden (CryoCLEM).

---

<sup>2</sup>GESTIS-Stoffdatenbank, Isopentan, CAS-Nummer: 78-78-4



**Abbildung 6.7:** Mittels konfokaler Fluoreszenz-Mikroskopie aufgenommene Bilder eines *Escherichia coli* (Kolibakterium) Dünnschnitts gelabelt mit Alexa488-Farbstoffen. Dabei kann der maximale Bereich der Scanner von 36  $\mu\text{m}$  durch das Verfahren der Stepper (max. Strecke von ca. 15 mm) erweitert und so größere Bereiche aufgenommen werden.

## 7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde auf dem Gebiet modernster Fluoreszenz-Mikroskopie und -Spektroskopie sowie optischer Sensorik geforscht. Dabei wurden verschiedene Wechselwirkungen zwischen Licht und Materie betrachtet (siehe Kapitel 3). So wurden die Phänomene der Lichtstreuung, die Absorption bzw. Fluoreszenz, die Wechselwirkung von Quantenemittern in einem Fabry-Pérot-Resonator und die Beugung bzw. die dadurch resultierende Auflösung behandelt.

Ein Ziel dieser Promotion war die **Entwicklung eines kostengünstigen Nephelometers** (siehe Kapitel 4). Herzstück dieses Sensors ist der Schrittmotor, wodurch die Probe automatisch an 50 Positionen gemessen wird. Dadurch sind die Messergebnisse des Sensorsystems deutlich reproduzierbarer, vor allem im niedrigen Trübungsbereich bei geringer Signalintensität. Durch gezielte Wahl der Optik- und Elektronikkomponenten ist der entwickelte Sensor eine kostengünstige, präzise und reproduzierbare Alternative gegenüber kommerziellen Geräten. Dieses Sensorsystem könnte in seiner momentanen Entwicklungsstufe z.B. zur Qualitätskontrolle von Trinkwasser eingesetzt werden.

Weitere Ziele dieser Promotion waren **die bewusste Veränderung bzw. Manipulation der optischen Eigenschaften von Quantenemittern in Mikroresonatoren** (siehe Kapitel 5). Diese Experimente wurden mit einem im Rahmen dieser Dissertation völlig neu konzipierten und neu aufgebauten Mikroskop durchgeführt. Ein Experiment untersuchte anhand des Farbstoff-Moleküls Atto488 den Zusammenhang zwischen den modifizierten Fluoreszenz-Spektren und Zerfallskurven im Resonator. Dabei konnten die Anteile der einzelnen strahlenden Übergänge des Farbstoffs mit Hilfe des Resonators gezielt verändert werden. Es konnte zudem der Förster-Resonanz-Energietransfer als

Funktion des Spiegelabstandes (des Resonators) bestimmt werden. Somit ließen sich experimentell - zeitaufgelöst und spektral - der Zusammenhang zwischen Fluoreszenz-Spektren und Zerfallskurven sowie die Energietransferdynamik von FRET-Prozessen darstellen. Außerdem konnte mit diesem Neuaufbau mittels konfokaler Fluoreszenz-Mikroskopie nachgewiesen werden, dass anisotrope  $SiO_2$ -Partikel teilweise hohl und teilweise mit  $SiO_2$  gefüllt sind.

Der wissenschaftliche Beitrag von Kapitel 6 ist die Weiterentwicklung eines bestehenden konfokalen Tieftemperaturmikroskops und die **Messung von Proben bei 160 K mit Immersionsmedium**. Mit Hilfe von 1-Propanol als Immersionsmedium konnte erstmalig ein Experiment mit einem Immersionsobjektiv bei tiefen Temperaturen durchgeführt werden. Die dadurch erzielte Auflösungssteigerung könnte zukünftig beispielsweise an biologischen Proben Anwendung finden. Mit geringfügigen Modifikationen und dem Austausch des Immersionsmediums zu Isopentan könnten auch vitrifizierte und somit native Proben untersucht werden.

# 8 Appendix

## 8.1 Danksagung

Folgenden Personen möchte ich besonders danken:

- Prof. Dr. Marc Brecht und Prof. Dr. Alfred J. Meixner für das persönliche Verhältnis und die enge Zusammenarbeit. Sie haben mit ihrer offenen und ehrlichen Art wesentlich zum Erfolg der Promotion beigetragen. Unzählige wissenschaftliche Diskussionen und Gespräche haben meinen Sinn für die physikalische Chemie, im speziellen der Mikroskopie und Optik, geschärft und erweitert.
- Jochen Mehne, Johannes Riedt und Dr. Wolfgang Langer für ihr offenes Ohr, ihre schnellen Lösungen bei Problemen und ständige Hilfe.
- Alexander Konrad für die sehr angenehme, immer lustige und sehr konstruktive Zusammenarbeit. Seine Unterstützung bei Simulationen und der täglichen Laborarbeit war einer der wichtigsten Säulen dieser Promotion.
- Daniela Riedel, Vanessa Stooß, Stefanie Armbruster, Anne Fleischmann und Felix Blendinger, welche Experimente im Rahmen ihrer Abschlussarbeit durchgeführt und stets für eine angenehme Arbeitsatmosphäre gesorgt haben.
- allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Brecht.

- allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Meixner.
- ganz besonders meiner gesamten Familie, besonders meinen Eltern Susanne und Gerd Metzger für ihre bedingungslose Unterstützung.
- Nadine Wengle, meiner Lebensgefährtin, für ihre Geduld und tolle Unterstützung während des Studiums und der Promotion.
- meinem Sohn Ben für die strahlenden und zuckersüßen Momente.
- den Mitgliedern der Eingreiftruppe des A-Baus.
- Prof. Dr. Hermann A. Mayer und Dr. Johannes Maisch für die interessante Fragestellung der anisotropen Partikel.

## 8.2 Wissenschaftliche Beiträge

### 8.2.1 Publikationsliste

#### peer reviewed journals

- **Michael Metzger**, Alexander Konrad, Felix Blendinger, Andreas Modler, Alfred J. Meixner, Volker Bucher, Marc Brecht: Low-cost GRIN-Lens-based nephelometric turbidity sensing in the range of 0.1-1000 NTU, *Sensors* 18(4), 1115, (2018).
- Sepideh Skandary, Frank Müh, Imran Ashraf, Mohamed Ibrahim, **Michael Metzger**, Athina Zouni, Alfred J. Meixner, Marc Brecht: Role of Missing Carotenoid in Reducing the Fluorescence of Single Monomeric Photosystem II Core Complexes, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 19(20), 13189-13194, (2017).
- Imran Ashraf, Alexander Konrad, Heiko Lokstein, Sepideh Skandary, **Michael**

- Metzger**, Joseph M. Djouda, Thomas Maurer, Pierre M. Adam, Alfred J. Meixner, Marc Brecht: Temperature Dependence of Metal-Enhanced Fluorescence of Photosystem I from *Thermosynechococcus elongatus*, *Nanoscale* 9(12), 4196-4204, (2017).
- Johannes Maisch, Farhad Jafarli, Thomas Chassé, Felix Blendinger, Alexander Konrad, **Michael Metzger**, Alfred J. Meixner, Marc Brecht, L. Dähne, Hermann A. Mayer: One-pot synthesis of micron partly hollow anisotropic dumbbell shaped silica core-shell particles, *Chemical Communications* 52(100), 14392-14395, (2016).
  - Alexander Konrad, **Michael Metzger**, Andreas M. Kern, Marc Brecht, Alfred J. Meixner: Revealing the radiative and non-radiative relaxation rates of the fluorescence dye Atto488 in a  $\lambda/2$  Fabry-Pérot-resonator by spectrally and time resolved measurements, *Nanoscale* 8(30), 14541-14547, (2016).
  - **Michael Metzger**, Alexander Konrad, Sepideh Skandary, Imran Ashraf, Alfred J. Meixner, Marc Brecht: Resolution Enhancement For Low-Temperature Scanning Microscopy By Cryo-Immersion, *Opt. Express* 24(12), 13023-13032, (2016).
  - Imran Ashraf, Sepideh Skandary, Mohammad Y. Khaywah, **Michael Metzger**, Alfred J. Meixner, Pierre M. Adam, Marc Brecht: Effects of Irregular Bimetallic Nanostructures on the Optical Properties of Photosystem I from *Thermosynechococcus elongatus*, *Photonics* 2(3), 838-854, (2015).
  - Alexander Konrad, **Michael Metzger**, Andreas M. Kern, Marc Brecht, Alfred J. Meixner: Controlling the dynamics of Förster resonance energy transfer inside a tunable sub-wavelength Fabry-Pérot-resonator, *Nanoscale* 7(22), 10204-10209, (2015).

#### weitere Beiträge

- **Michael Metzger**, Marc Brecht: Mit Durchblick zur Trübung – Neuer Sensor für die Trübungsmessung im klaren Bereich, *Laborpraxis* August 2016 (LP 7/8),

(2016).

- **Michael Metzger**, Vanessa Schenk, Alexander Konrad, Jan Brunner, Victoria Radun, Sabrina Hajek, Alfred J. Meixner, Andreas Modler, Dieter Stoll, Volker Bucher, Marc Brecht: Kompakter optischer Hybrid-Sensor für Brechungsindexmessungen, WOMag 4/2016, (2016).
- **Michael Metzger**, Alexander Konrad, Tobias Menold, Hyeyun Go, Andreas Horrer, Sabrina Rau, Andreas Modler, Günther Gauglitz, Monika Fleischer, Dieter Kern, Dai Zhang, Alfred J. Meixner, Marc Brecht: Kompakter optischer Sensor für raum aufgelöste Echtzeitmessungen des Brechungsindex, Photonik 1, (2014).

### in Bearbeitung

- Jan Brunner, **Michael Metzger**, Volker Bucher, Alfred J. Meixner, Marc Brecht: refractive index sensing using a grin-lens based micro cavity.

## 8.2.2 Konferenzbeiträge

### Vorträge

- **Michael Metzger**, Alexander Konrad, Alfred J. Meixner, Marc Brecht: Resolution Enhancement For Scanning Microscopy By Immersion At Low Temperature, Vortrag auf der NPFM 2015, Göttingen (26.11. – 27.11.2015).
- **Michael Metzger**, Alexander Konrad, Alfred J. Meixner, Marc Brecht: Resolution Enhancement For Scanning Microscopy By Immersion At Low Temperature, Vortrag auf dem 21th International Workshop on „Single Molecule Spectroscopy and Super-resolution Microscopy in the Life Sciences“, Berlin (2.9. – 4.9.2015).
- **Michael Metzger**, Alexander Konrad, Alfred J. Meixner, Marc Brecht: Resolution Enhancement For Scanning Microscopy By Immersion At Low Temperature, Vortrag

auf der FOM 2015, Göttingen (29.3. – 1.4.2015).

- **Michael Metzger**, Alexander Konrad, Alfred J. Meixner, Marc Brecht: Resolution Enhancement For Low-Temperature Scanning Microscopy By Cryostat Immersion Imaging, Vortrag auf der DPG-Frühjahrstagung 2015, Berlin (15.3. – 20.3.2015).

### Posterpräsentationen

- Andreas Horrер, **Michael Metzger**, Kathrin Freudenberger, Jonas Haas, Lothar Leidner, Günter Gauglitz, Monika Fleischer, Dieter P. Kern, Alfred J. Meixner, Dai Zhang, Marc Brecht: Hybride Resonatoren und plasmonisch strukturierte GRIN-Linsen als kompakte Sensoren für Einzelpartikel, Posterbeitrag auf dem Forschungstag der Baden-Württemberg Stiftung, Stuttgart (22.07.2015).
- **Michael Metzger**, Alfred J. Meixner, Jan Brunner, Andreas Modler, Marc Brecht: Hybrid GRIN-lens microresonator for sensing applications, Posterbeitrag auf der Bioprocess Analytics and Sensor Technology, Wädenswil, Schweiz (4.9. – 5.9.2014).
- **Michael Metzger**, Alexander Konrad, Rainer Kaufmann, Martin Hussels, Sepideh Skandary, Christoph Hagen, Kay Grünewald, Alfred J. Meixner, Marc Brecht: Resolution Enhancement For Low-Temperature Scanning Microscopy By Cryostat Immersion Imaging, Posterbeitrag auf der FOM 2014, Sydney, Australien (13.4. – 16.4.2013).
- Andreas Horrер, **Michael Metzger**, Sabrina Rau, Dominik Gollmer, Julia Fulmes, Dai Zhang, Alfred J. Meixner, Günter Gauglitz, Marc Brecht, Dieter Kern, Monika Fleischer: Plasmonically structured GRIN lenses as compact elements for biosensing, Posterbeitrag auf der Europt(r)ode 2014, Athen, Griechenland (13.4. - 16.4.2014).
- **Michael Metzger**, Andreas Horrер, Sabrina Rau, Günter Gauglitz, Dieter Kern, Monika Fleischer, Dai Zhang, Alfred J. Meixner, Marc Brecht: Hybrid GRIN-lens microresonator for sensing applications, Posterbeitrag auf der Europt(r)ode 2014, Athen, Griechenland (13.4. – 16.4.2013).

- **Michael Metzger**, Andreas Horrer, Sabrina Rau, Tobias Menold, Günter Gauglitz, Dieter Kern, Monika Fleischer, Dai Zhang, Alfred J. Meixner, Günther Proll, Dai Zhang, Marc Brecht: Hybrid GRIN-lens microresonator for sensing applications, Posterbeitrag auf der DPG-Frühjahrstagung 2014, Dresden (30.3. – 4.4.2014).
- **Michael Metzger**, Andreas Horrer, Sabrina Rau, Günter Gauglitz, Dieter Kern, Monika Fleischer, Dai Zhang, Alfred J. Meixner, Marc Brecht: Hybrid GRIN-lens microresonator for sensing applications, Posterbeitrag auf der COST Action MP1302 Nanospectroscopy, Tübingen (23.3. – 28.3.2014).
- Andreas Horrer, **Michael Metzger**, Sabrina Rau, Dominik A. Gollmer, Julia Fulmes, Günter Gauglitz, Marc Brecht, Dieter P. Kern, Monika Fleischer: GRIN lenses with plasmonic structures as compact elements for biosensing, Posterbeitrag auf der Conference of COST Action MP1302 Nanospectroscopy - "Optical Nanospectroscopy I", Tübingen (23.03. - 28.03.2014).
- Andreas Horrer, **Michael Metzger**, Sabrina Rau, Günter Gauglitz, Monika Fleischer, Dieter P. Kern, Alfred J. Meixner, Günther Proll, Dai Zhang, Marc Brecht: Hybride Resonatoren und plasmonisch strukturierte GRIN-Linsen als kompakte Sensoren für Einzelpartikel, Posterbeitrag auf dem Forschungstag der Baden-Württemberg Stiftung, Stuttgart (11.07.2013).
- **Michael Metzger**, Andreas Kern, Alfred J. Meixner: Micro-Spectroscopy of Single Molecules, Aussteller und Teilnehmer auf dem 63. Lindauer Nobelpreisträger Treffen (63rd Lindau Meeting of Nobel Laureates), Lindau (30.6. – 5.7.2013).

## 9 Abkürzungen

AE	Airy-Einheit
APD	avalanche photo diode
CCD	Charge-coupled Device
CLEM	correlative light and electron microscopy (Korrelative Licht und Elektronenmikroskopie)
CW	continuous wave
E. Coli	Escherichia coli
EPA	Environmental Protection Agency
FLIM	fluorescence lifetime imaging microscopy
FNU	Formazine Nephelometric Unit
FRET	Fluorescence resonance energy transfer (Förster-Resonanz-Energietransfer)
FTU	Formazine Turbidity Unit
FWHM	Full width at half maximum (Halbwertsbreite)
GRIN-Linse	Gradienten-Index-Linse
IRF	instrument response function (Instrumentenfunktion)
LDOS	local density of optical states (lokale optische Modendichte)
LED	light-emitting diode (Licht emittierende Diode)
NA	Numerische Apertur
NTU	Nephelometric Turbidity Unit
OD	optische Dichte
OLED	Organic light-emitting diode (organische Licht emittierende Diode)

POM	Polyoxymethylen
PSF	Punktspreizfunktion
PVA	Polyvinylalkohol
Q-Faktor	Gütefaktor
QP	Quantenpunkt
REM	Rasterelektronenmikroskopie
<i>SiO<sub>2</sub></i>	Siliziumdioxid
STED	Stimulated emission depletion microscopy
STORM	Stochastic optical reconstruction microscopy
TCSPC	time correlated single photon counting (Einzelphotonenzählung)
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie

## Literaturverzeichnis

- [1] E. Hecht. *Optik*. Oldenbourg, 2009.
- [2] E. Dickinson. Colloidal aspects of beverages. *Food Chemistry*, 51(4):343 – 347, 1994.
- [3] M. L. Dongare, P. B. Buchade, M. N. Awatade, and A. D. Shaligram. On-line turbidity measurement of clear juice. *Journal of Optics*, 42(2):92–95, 2013.
- [4] J. Gregory. Turbidity and beyond. *Filtration & Separation*, 35(1):63 – 67, 1998.
- [5] P. J. Barter and T. Deas. Comparison of portable nephelometric turbidimeters on natural waters and effluents. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 37(3):485–492, 2003.
- [6] D. M. Lawler. *Encyclopedia of Analytical Science*, volume 10. Elsevier, 2nd edition, 2005.
- [7] A. Fairuz Omar and M. Z. Mat Jafri. The swift turbidity marker. *Physics Education*, 46(1):90, 2011.
- [8] T. P. Lambrou, C. G. Panayiotou, and C. C. Anastasiou. A low-cost system for real time monitoring and assessment of potable water quality at consumer sites. In *2012 IEEE Sensors*, pages 1–4, 2012.

- [9] C. D. Bevan and R. S. Lloyd. A high-throughput screening method for the determination of aqueous drug solubility using laser nephelometry in microtiter plates. *Analytical Chemistry*, 72(8):1781–1787, 2000.
- [10] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, and P. J. Feeney. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1):3 – 26, 2001.
- [11] K. N. Baker, M. H. Rendall, A. Patel, P. Boyd, M. Hoare, R. B. Freedman, and D. C. James. Rapid monitoring of recombinant protein products: a comparison of current technologies. *Trends in Biotechnology*, 20(4):149 – 156, 2002.
- [12] A. Chianese, M. Bravi, and E. Fazio. *Turbidimetry and Nephelometry*, pages 51–57. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012.
- [13] B. Messerschmidt. Gradientenoptik - eine innovative Mikrooptik für die Optoelektronik und die medizinische Bilderfassung. *Photonik*, No. 6:54–57, 2003.
- [14] B. Messerschmidt. *Springer Handbook of Lasers and Optics*. Springer, 2007.
- [15] K. J. Vahala. Optical microcavities. *Nature*, 424(6950):839–846, 2003.
- [16] G. M. Akselrod, C. Argyropoulos, T. B. Hoang, C. Ciraci, C. Fang, J. Huang, D. R. Smith, and M. H. Mikkelsen. Probing the mechanisms of large purcell enhancement in plasmonic nanoantennas. *Nature Photonics*, 8:835, 2014.
- [17] M. Aas, Q. Chen, A. Jonáš, A. Kiraz, and X. Fan. Optofluidic fret lasers and their applications in novel photonic devices and biochemical sensing. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 22(4):188–202, 2016.
- [18] S. Kappaun, C. Slugovc, and E. J. W. List. Phosphorescent organic light-emitting devices: Working principle and iridium based emitter materials. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(8):1527–1547, 2008.

- [19] M. A. Lieb and A. J. Meixner. A high numerical aperture parabolic mirror as imaging device for confocal microscopy. *Opt. Express*, 8(7):458–474, 2001.
- [20] R. Kaufmann, C. Hagen, and K. Grunewald. Fluorescence cryo-microscopy: current challenges and prospects. *Current opinion in chemical biology*, 20:86–91, 2014.
- [21] G. Mie. Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Annalen der Physik*, 330(3):377–445, 1908.
- [22] J. A. Stratton. *Electromagnetic Theory*. Mcgraw Hill Book Company, 1941.
- [23] H. C. van de Hulst. *Light scattering by small Particles*. 1957.
- [24] D. R. Huffman C. F. Bohren. *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*. Wiley-VCH, 1998.
- [25] T. Wriedt W. Hergert. *The Mie Theory*. Springer, 2012.
- [26] Hon. J.W. Strutt. XV. On the light from the sky, its polarization and colour. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 41(271):107–120, 1871.
- [27] Hon. J.W. Strutt. LVIII. On the scattering of light by small particles. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 41(275):447–454, 1871.
- [28] Lord Rayleigh F.R.S. X. on the electromagnetic theory of light. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 12(73):81–101, 1881.
- [29] Lord Rayleigh F.R.S. XXXIV. On the transmission of light through an atmosphere containing small particles in suspension, and on the origin of the blue of the sky.

- The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 47(287):375–384, 1899.
- [30] A. T. Young. Rayleigh scattering. *Appl. Opt.*, 20(4):533–535, 1981.
- [31] M. Kerker and E. M. Loebel. *The Scattering of Light and Other Electromagnetic Radiation*. Academic Press, 1969.
- [32] L. P. Bayvel. *Electromagnetic Scattering and its Applications*. Applied Science Publishers, 1981.
- [33] H. Wiese. Lichtstreuung und Teilchengrößenmessung. *GIT Fachz. Lab.*, 7:762–768, 1992.
- [34] T. P. Lambrou, C. C. Anastasiou, and C. G. Panayiotou. *A Nephelometric Turbidity System for Monitoring Residential Drinking Water Quality*, pages 43–55. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2010.
- [35] M. Taufiq M. Khairi, S. Ibrahim, M. A. Md Yunus, and M. Faramarzi. A review on the design and development of turbidimeter. *Sensor Review*, 35(1):98–105, 2015.
- [36] B. Valeur. *Molecular Fluorescence Principles and Applications*. WILEY-VCH, 2001.
- [37] G. Wedler. *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*. Wiley-VCH, 2004.
- [38] P. W. Atkins, J. de Paula. *Physikalische Chemie*. Wiley-VCH, 2006.
- [39] J. R. Lackowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, 2010.
- [40] W. Demtröder. *Molekülphysik Theoretische Grundlagen und experimentelle Methoden*. Oldenbourg, 2013.

- [41] A. Einstein. Strahlungs-Emission und -Absorption nach der Quantentheorie. *Verhandlungen der Deutschen Physikalischen Gesellschaft*, 18:318–323, 1916.
- [42] A. Einstein. Zur Quantentheorie der Strahlung. *Physikalische Zeitschrift*, 18:121–128, 1917.
- [43] J. B. Birks. *Photophysics of Aromatic Molecules*. John Wiley & Sons, 1970.
- [44] S. F. Tuan J. J. Sakurai. *Modern Quantum Mechanics*. Addison-Wesley, 1994.
- [45] E. Fermi. Quantum theory of radiation. *Rev. Mod. Phys.*, 4:87–132, 1932.
- [46] A. Jabłoński. Über den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren. *Zeitschrift für Physik*, 94(1):38–46, 1935.
- [47] M. Kasha. Characterization of electronic transitions in complex molecules. *Discuss. Faraday Soc.*, 9:14–19, 1950.
- [48] G. G. Stokes. Xxx. on the change of refrangibility of light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 142:463–562, 1852.
- [49] R.F. Kubin and A.N. Fletcher. Fluorescence quantum yields of some rhodamine dyes. *Journal of Luminescence*, 27(4):455 – 462, 1982.
- [50] M. Fox. *Quantum Optics*. Oxford University Press, 2006.
- [51] S. Bär, A. Chizhik, R. Gutbrod, F. Schleifenbaum, A. Chizhik, and A. J. Meixner. Microcavities: tailoring the optical properties of single quantum emitters. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(1):3–14, 2010.
- [52] C. Fabry A. Perot. On the application of interference phenomena to the solution of various problems of spectroscopy and metrology. *apj*, 9:87, 1899.

- [53] M. Steiner. Control of molecular spontaneous emission in an optical lambda/2-microresonator, Dissertation. Universität Tübingen, 2006.
- [54] A. Konrad. Nano-photonics on luminescent molecular systems and metal particles in optical sub-wavelength microresonators, Dissertation. Universität Tübingen, 2016.
- [55] D. Kühlke. *Optik, Grundlagen und Anwendungen*. Verlag Harri Deutsch, 2011.
- [56] F. Schleifenbaum. Energy transfer in the red fluorescent protein dsred in confined optical fields, Dissertation. Universität Tübingen, 2008.
- [57] R. Gutbrod. Determination of position and three-dimensional orientation of single quantum emitters in a lambda/2-microresonator, Dissertation. Universität Tübingen, 2010.
- [58] R. V. Pound M. Purcell. Spontaneous emission probabilities at radio frequencies. *Phys. Rev.*, 69:681, 1946.
- [59] A. M. Kern, D. Zhang, M. Brecht, A. I. Chizhik, A. V. Failla, F. Wackenhut, and A. J. Meixner. Enhanced single-molecule spectroscopy in highly confined optical fields: from lambda/2-fabry-perot resonators to plasmonic nano-antennas. *Chem. Soc. Rev.*, 43:1263–1286, 2014.
- [60] D. Kleppner. Inhibited spontaneous emission. *Phys. Rev. Lett.*, 47:233–236, 1981.
- [61] M. Steiner, F. Schleifenbaum, C. Stupperich, F. A. Virgilio, A. Hartschuh, and A. J. Meixner. Microcavity-controlled single-molecule fluorescence. *ChemPhysChem*, 6(10):2190–2196, 2005.
- [62] Mathias S., A. V. Failla, Achim H., Frank S., Clemens S., and A. J. Meixner. Controlling molecular broadband-emission by optical confinement. *New Journal of Physics*, 10(12):123017, 2008.

- [63] A. Chizhik, F. Schleifenbaum, R. Gutbrod, A. Chizhik, D. Khoptyar, A. J. Meixner, and J. Enderlein. Tuning the fluorescence emission spectra of a single molecule with a variable optical subwavelength metal microcavity. *Phys. Rev. Lett.*, 102:073002, 2009.
- [64] W. Demtröder. *Experimentalphysik 2*. Springer Spektrum, 2013.
- [65] C. M. Sparrow. On Spectroscopic Resolving Power. *apj*, 44:76, 1916.
- [66] M. A. Lauterbach. Finding, defining and breaking the diffraction barrier in microscopy – a historical perspective. *Optical Nanoscopy*, 1(1):8, 2012.
- [67] S. W. Hell. Microscopy and its focal switch. *Nature Methods*, 6(1):24–32, 2009.
- [68] B. Hecht L. Novotny. *Principles of Nano-Optics*. Cambridge University Press, 2012.
- [69] M. Metzger, A. Konrad, F. Blendinger, A. Modler, A. J. Meixner, V. Bucher, and M. Brecht. Low-cost grin-lens-based nephelometric turbidity sensing in the range of 0.1-1000 ntu. *Sensors*, 18(4), 2018.
- [70] J. Markowski, A. Baron, M. Mieszczakowska, and W. Plochanski. Chemical composition of french and polish cloudy apple juices. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 84(6):68–74, 2009.
- [71] D. Riedel. Prototypenentwicklung eines kostengünstigen und kompakten Sensors zur Trübungsmessung und Prüfung möglicher Einsatzgebiete, Zulassungsarbeit Lehramt. Universität Tübingen, 2016.
- [72] A. Fleischmann. Entwicklung eines Sensors zur Trübungsmessung im niedrigen Trübungsbereich, Bachelorarbeit. Universität Tübingen, 2016.
- [73] M. W. LeChevallier, T. M. Evans, and R. J. Seidler. Effect of turbidity on chlorinati-

- on efficiency and bacterial persistence in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*, 42(1):159–167, 1981.
- [74] M. W. LeChevallier, W. D. Norton, and R. G. Lee. Giardia and cryptosporidium spp. in filtered drinking water supplies. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(9):2617–2621, 1991.
- [75] M. Metzger. GRadienTen INdex (GRIN) Optiken - Anwendungsmoeglichkeiten in der Mikrospektroskopie und -Sensorik, Diplomarbeit. Universität Tübingen, 2013.
- [76] B. Messerschmidt, T. Possner, and R. Goering. Colorless gradient-index cylindrical lenses with high numerical apertures produced by silver-ion exchange. *Applied Optics*, 34(34):7825–7830, 1995.
- [77] C. Gomez-Reino, M.V. Perez, C. Bao, and M.T. Flores-Arias. Design of grin optical components for coupling and interconnects. *Laser & Photonics Reviews*, 2(3):203–215, 2008.
- [78] M. J. Levene, D. A. Dombek, K. A. Kasischke, R. P. Molloy, and W. W. Webb. In vivo multiphoton microscopy of deep brain tissue. *Journal of Neurophysiology*, 91(4):1908–1912, 2004.
- [79] K. Konig, A. Ehlers, I. Riemann, S. Schenkl, R. Buckle, and M. Kaatz. Clinical two-photon microendoscopy. *Microscopy Research and Technique*, 70(5):398–402, 2007.
- [80] M. Vacha, H. Yokoyama, T. Tokizaki, M. Furuki, and T. Tani. Laser scanning microscope for low temperature single molecule and microscale spectroscopy based on gradient index optics. *Review of Scientific Instruments*, 70(4):2041–2045, 1999.
- [81] M. Vacha, K. Hashizume, and T. Tani. Sub-micron scale spectroscopy and microscopy of individual mesoscopic systems at cryogenic temperatures. *Journal of Luminescence*, 86(3-4):195–200, 2000.

- [82] F. E. Grubbs. Sample criteria for testing outlying observations. *Ann. Math. Statist.*, 21(1):27–58, 1950.
- [83] F. E. Grubbs. Procedures for detecting outlying observations in samples. *Technometrics*, 11(1):1–21, 1969.
- [84] H. Tai, D. Li, C. Wang, Q. Ding, C. Wang, and S. Liu. Design and characterization of a smart turbidity transducer for distributed measurement system. *Sensors and Actuators A: Physical*, 175(Supplement C):1 – 8, 2012.
- [85] I. Hussain, K. Ahamad, and P. Nath. Water turbidity sensing using a smartphone. *RSC Adv.*, 6:22374–22382, 2016.
- [86] C. D. Kelley, A. Krolick, L. Brunner, A. Burklund, D. Kahn, W. P. Ball, and M. Weber-Shirk. An affordable open-source turbidimeter. *Sensors*, 14(4):7142–7155, 2014.
- [87] Ó. Sampedro and J. R. Salgueiro. Turbidimeter and rgb sensor for remote measurements in an aquatic medium. *Measurement*, 68(Supplement C):128 – 134, 2015.
- [88] N. I. Nuzula, W. Sakinah, and E. Endarko. Manufacturing temperature and turbidity sensor based on atmega 8535 microcontroller. *AIP Conference Proceedings*, 1788(1):030108, 2017.
- [89] A. I. Chizhik, A. M. Chizhik, A. M. Kern, T. Schmidt, K. Potrick, F. Huisken, and A. J. Meixner. Measurement of vibrational modes in single  $\text{SiO}_2$  nanoparticles using a tunable metal resonator with optical subwavelength dimensions. *Phys. Rev. Lett.*, 109:223902, 2012.
- [90] P. Andrew and W. L. Barnes. Förster energy transfer in an optical microcavity. *Science*, 290(5492):785–788, 2000.

- [91] F. Schleifenbaum, A. M. Kern, A. Konrad, and A. J. Meixner. Dynamic control of forster energy transfer in a photonic environment. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 16:12812–12817, 2014.
- [92] A. Konrad, M. Metzger, A. M. Kern, M. Brecht, and A. J. Meixner. Controlling the dynamics of forster resonance energy transfer inside a tunable sub-wavelength fabry-perot-resonator. *Nanoscale*, 7:10204–10209, 2015.
- [93] M. Minsky. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning*, 10(4):128–138, 1988.
- [94] G. Lin, M. K. Chawla, K. Olson, C. A. Barnes, J. F. Guzowski, C. Bjornsson, W. Shain, and B. Roysam. A multi-model approach to simultaneous segmentation and classification of heterogeneous populations of cell nuclei in 3d confocal microscope images. *Cytometry Part A*, 71A(9):724–736, 2007.
- [95] M. Minsky. Microscopy apparatus, 1961.
- [96] P. Davidovits and M. D. Egger. Scanning laser microscope. *Nature*, 223(5208):831, 1969.
- [97] P. Davidovits and M. D. Egger. Scanning laser microscope for biological investigations. *Appl. Opt.*, 10(7):1615–1619, 1971.
- [98] T. Hirschfeld. Optical microscopic observation of single small molecules. *Appl. Opt.*, 15(12):2965–2966, 1976.
- [99] W. E. Moerner and L. Kador. Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid. *Phys. Rev. Lett.*, 62:2535–2538, 1989.
- [100] M. Orrit and J. Bernard. Single pentacene molecules detected by fluorescence excitation in a p-terphenyl crystal. *Phys. Rev. Lett.*, 65:2716–2719, 1990.

- [101] C. Sheppard T. Wilson. *Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy*. Academic Press, 1984.
- [102] W. E. Moerner and David P. Fromm. Methods of single-molecule fluorescence spectroscopy and microscopy. *Review of Scientific Instruments*, 74(8):3597–3619, 2003.
- [103] S. Shashkova and M. C. Leake. Single-molecule fluorescence microscopy review: shedding new light on old problems. *Bioscience Reports*, 37(4):BSR20170031, 2017.
- [104] H. Miller, Z. Zhou, J. Shepherd, A. J. M. Wollman, and M. C. Leake. Single-molecule techniques in biophysics: a review of the progress in methods and applications. *Reports on Progress in Physics*, 81(2):024601, 2018.
- [105] S. Hell, S. W., G. Reiner, C. Cremer, and E. H. K. Stelzer. Aberrations in confocal fluorescence microscopy induced by mismatches in refractive-index. *Journal of Microscopy*, 169:391–405, 1993.
- [106] S. Wilhelm, B. Groebler, M. Gluch, and H. Heinz. Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie. 2003.
- [107] E. Egelman. *Comprehensive Biophysics*. Elsevier Science, 2012.
- [108] P. Kapusta, M. Wahl and R. Erdmann. *Advanced Photon Counting*. Springer International Publishing, 2015.
- [109] Th. Förster. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik*, 437:55–75, 1948.
- [110] R. Roy, S. Hohng, and T. Ha. A practical guide to single-molecule fret. *Nature Methods*, 5:507, 2008.
- [111] A. Konrad, M. Metzger, A. M. Kern, M. Brecht, and A. J. Meixner. Revealing

- the radiative and non-radiative relaxation rates of the fluorescent dye atto488 in a  $\lambda/2$  fabry-perot-resonator by spectral and time resolved measurements. *Nanoscale*, 8:14541–14547, 2016.
- [112] A. Konrad, A. Trost, S. Skandary, M. Hussels, A. J. Meixner, N. V. Karapetyan, and M. Brecht. Manipulating the excitation transfer in photosystem i using a fabry-perot metal resonator with optical subwavelength dimensions. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 16:6175–6181, 2014.
- [113] G. Bjork. On the spontaneous lifetime change in an ideal planar microcavity-transition from a mode continuum to quantized modes. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, 30(10):2314–2318, 1994.
- [114] ATTO-TEC. [https://www.atto-tec.com/product\\_info.php?language=en&info=p99\\_atto-488.html](https://www.atto-tec.com/product_info.php?language=en&info=p99_atto-488.html), abgerufen Januar 2020.
- [115] A.C. Millard, L. Jin, J.P. Wuskell, D.M. Boudreau, A. Lewis, and L.M. Loew. Wavelength- and time-dependence of potentiometric non-linear optical signals from styryl dyes. *The Journal of Membrane Biology*, 208(2):103–111, 2005.
- [116] D. I. Schuster, A. Wallraff, A. Blais, L. Frunzio, R.-S. Huang, J. Majer, S. M. Girvin, and R. J. Schoelkopf. Ac-stark shift and dephasing of a superconducting qubit strongly coupled to a cavity field. *Phys. Rev. Lett.*, 94:123602, 2005.
- [117] S. Noda, M. Fujita, and T. Asano. Spontaneous-emission control by photonic crystals and nanocavities. *Nature Photonics*, 1:449–, 2007.
- [118] Chizhik A. I., Gregor I., Ernst B., and Enderlein J. Nanocavity-based determination of absolute values of photoluminescence quantum yields. *ChemPhysChem*, 14(3):505–513, 2013.
- [119] P. Anger, P. Bharadwaj, and L. Novotny. Enhancement and quenching of single-molecule fluorescence. *Phys. Rev. Lett.*, 96:113002, 2006.

- [120] A. M. Kern and O. J. F. Martin. Excitation and reemission of molecules near realistic plasmonic nanostructures. *Nano Letters*, 11(2):482–487, 2011.
- [121] M. Frimmer, Y. Chen, and A. F. Koenderink. Scanning emitter lifetime imaging microscopy for spontaneous emission control. *Phys. Rev. Lett.*, 107:123602, 2011.
- [122] M. Brecht, M. Hussels, J. B. Nieder, H. Fang, and C. Elsässer. Plasmonic interactions of photosystem I with Fischer patterns made of Gold and Silver. *Chemical Physics*, 406:15–20, 2012.
- [123] E. Fort and S. Grésillon. Surface enhanced fluorescence. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 41(1):013001, 2008.
- [124] X. Wang, K. Braun, D. Zhang, H. Peisert, H. Adler, T. Chassé, and A. J. Meixner. Enhancement of radiative plasmon decay by hot electron tunneling. *ACS Nano*, 9(8):8176–8183, 2015.
- [125] S. Chah, M. R. Hammond, and R. N. Zare. Gold nanoparticles as a colorimetric sensor for protein conformational changes. *Chemistry & Biology*, 12(3):323–328, 2005.
- [126] L. Shang, Y. Wang, J. Jiang, and S. Dong. pH-dependent protein conformational changes in albumin:gold nanoparticle bioconjugates: A spectroscopic study. *Langmuir*, 23(5):2714–2721, 2007.
- [127] K. H. Drexhage. Monomolecular Layers and Light. *Scientific American*, 222:108–119, 1970.
- [128] B. C. Buchler, T. Kalkbrenner, C. Hettich, and V. Sandoghdar. Measuring the quantum efficiency of the optical emission of single radiating dipoles using a scanning mirror. *Phys. Rev. Lett.*, 95:063003, 2005.
- [129] M. Steiner, F. Schleifenbaum, C. Stupperich, A.V. Failla, A. Hartschuh, and A.J.

- Meixner. A new microcavity design for single molecule detection. *Journal of Luminescence*, 119-120:167 – 172, 2006.
- [130] E. Castanié, V. Krachmalnicoff, A. Cazé, R. Pierrat, Y. De Wilde, and R. Carminati. Distance dependence of the local density of states in the near field of a disordered plasmonic film. *Opt. Lett.*, 37(14):3006–3008, 2012.
- [131] R. M. Clegg. *The History of FRET*, pages 1–45. Springer US, Boston, MA, 2006.
- [132] M. J. A. de Dood, J. Knoester, A. Tip, and A. Polman. Förster transfer and the local optical density of states in erbium-doped silica. *Phys. Rev. B*, 71:115102, 2005.
- [133] C. Blum, N. Zijlstra, A. Legendijk, M. Wubs, A. Mosk, V. Subramaniam, and W. L. Vos. Nanophotonic control of the förster resonance energy transfer efficiency. *Phys. Rev. Lett.*, 109:203601, 2012.
- [134] X. Zhang, C. A. Marocico, M. Lunz, V. A. Gerard, Y. K. Gun'ko, V. Lesnyak, N. Gaponik, A. S. Susha, A. L. Rogach, and A. L. Bradley. Experimental and theoretical investigation of the distance dependence of localized surface plasmon coupled förster resonance energy transfer. *ACS Nano*, 8(2):1273–1283, 2014.
- [135] P. Ghenuche, J. de Torres, S. Babu Moparthi, V. Grigoriev, and J. Wenger. Nanophotonic enhancement of the förster resonance energy-transfer rate with single nanoapertures. *Nano Lett.*, 14(8):4707–4714, 2014.
- [136] ATTO-TEC. [https://www.atto-tec.com/product\\_info.php?language=en&info=p105\\_atto-590.html](https://www.atto-tec.com/product_info.php?language=en&info=p105_atto-590.html), abgerufen Januar 2020.
- [137] A. Konrad, F. Wackenhut, M. Hussels, A. J. Meixner, and M. Brecht. Temperature dependent luminescence and dephasing of gold nanorods. *Journal of Physical Chemistry C*, 117(41):21476–21482, 2013.

- [138] P. J. Zhang. Correlative cryo-electron tomography and optical microscopy of cells. *Current Opinion In Structural Biology*, 23(5):763–770, 2013.
- [139] A. A. Deniz, M. Dahan, J. R. Grunwell, T. Ha, A. E. Faulhaber, D. S. Chemla, S. Weiss, and P. G. Schultz. Single-pair fluorescence resonance energy transfer on freely diffusing molecules: Observation of Förster distance dependence and subpopulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(7):3670–3675, 1999.
- [140] A. K. Wozniak, G. F. Schröder, H. Grubmüller, C. A. M. Seidel, and F. Oesterheld. Single-molecule fret measures bends and kinks in dna. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(47):18337, 2008.
- [141] J. Maisch, F. Jafarli, T. Chasse, F. Blendinger, A. Konrad, M. Metzger, A. J. Meixner, M. Brecht, L. Dahne, and H. A. Mayer. One-pot synthesis of micron partly hollow anisotropic dumbbell shaped silica core-shell particles. *Chem. Commun.*, 52:14392–14395, 2016.
- [142] S. Kunjachan, J. Ehling, G. Storm, F. Kiessling, and T. Lammers. Noninvasive imaging of nanomedicines and nanotheranostics: Principles, progress, and prospects. *Chemical Reviews*, 115(19):10907–10937, 2015.
- [143] S. C. Glotzer and M. J. Solomon. Anisotropy of building blocks and their assembly into complex structures. *Nature Materials*, 6:557, 2007.
- [144] S. N. Fejer, D. Chakrabarti, and D. J. Wales. Self-assembly of anisotropic particles. *Soft Matter*, 7:3553–3564, 2011.
- [145] G. Tuncelli, A. Nedim Ay, and B. Zümreoglu-Karan. 5-fluorouracil intercalated iron oxide@layered double hydroxide core-shell nano-composites with isotropic and anisotropic architectures for shape-selective drug delivery applications. *Materials Science and Engineering: C*, 55:562 – 568, 2015.

- [146] J. Wang, A. Sugawara, A. Shimojima, and T. Okubo. Preparation of anisotropic silica nanoparticles via controlled assembly of presynthesized spherical seeds. *Langmuir*, 26(23):18491–18498, 2010.
- [147] Q. Chen, Q. Li, and J. Lin. Synthesis of janus composite particles by the template of dumbbell-like silica/polystyrene. *Materials Chemistry and Physics*, 128(3):377 – 382, 2011.
- [148] S. Sacanna, M. Korpics, K. Rodriguez, L. Colón-Meléndez, S. Kim, D. J. Pine, and G. Yi. Shaping colloids for self-assembly. *Nature Communications*, 4:1688, 2013.
- [149] S. Wang and N. Wu. The impact of nonpolymerizable swelling agents on the synthesis of particles with combined geometric, interfacial, and compositional anisotropy. *Langmuir*, 31(29):7962–7969, 2015.
- [150] P. Datskos, D. A. Cullen, and J. Sharma. Step-by-Step Growth of Complex Oxide Microstructures. *Angewandte Chemie International Edition*, 54(31):9011–9015, 2015.
- [151] W. Stöber, A. Fink, and E. Bohn. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of Colloid and Interface Science*, 26(1):62 – 69, 1968.
- [152] N. Plumeré, A. Ruff, B. Speiser, V. Feldmann, and H. A. Mayer. Stöber silica particles as basis for redox modifications: Particle shape, size, polydispersity, and porosity. *Journal of Colloid and Interface Science*, 368(1):208 – 219, 2012.
- [153] F. Blendinger. Untersuchung einzelner Quantensysteme im  $\lambda/2$ -Resonator, Diplomarbeit. Universität Tübingen, 2015.
- [154] M. Metzger, A. Konrad, S. Skandary, I. Ashraf, A. J. Meixner, and M. Brecht. Resolution enhancement for low-temperature scanning microscopy by cryo-immersion. *Opt. Express*, 24(12):13023–13032, 2016.

- [155] E. Abbe. Beitrage zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. 9(1):413–418–, 1873.
- [156] A. Drechsler, M. A. Lieb, C. Debus, A. J. Meixner, and G. Tarrach. Confocal microscopy with a high numerical aperture parabolic mirror. *Optics Express*, 9(12):637–644, 2001.
- [157] C. L. Schwartz, V. I. Sarbash, F. I. Ataullakhanov, J. R. McIntosh, and D. Nicastro. Cryo-fluorescence microscopy facilitates correlations between light and cryo-electron microscopy and reduces the rate of photobleaching. *Journal of Microscopy*, 227(2):98–109, 2007.
- [158] L. F. van Driel, J. A. Valentijn, K. M. Valentijn, R. I. Koning, and A. J. Koster. Tools for correlative cryo-fluorescence microscopy and cryo-electron tomography applied to whole mitochondria in human endothelial cells. *European Journal of Cell Biology*, 88(11):669–684, 2009.
- [159] A. Briegel, S. Y. Chen, A. J. Koster, J. M. Plitzko, C. L. Schwartz, and G. J. Jensen. Correlated light and electron cryo-microscopy, 2010.
- [160] A. Rigort, E. Villa, F. J. B. Bauerlein, B. D. Engel, and J. M. Plitzko. Integrative approaches for cellular cryo-electron tomography: Correlative imaging and focused ion beam micromachining, 2012.
- [161] M. Schorb and J. A. G. Briggs. Correlated cryo-fluorescence and cryo-electron microscopy with high spatial precision and improved sensitivity. *Ultramicroscopy*, 143:24–32, 2014.
- [162] M. A. Le Gros, G. McDermott, M. Uchida, C. G. Knoechel, and C. A. Larabell. High-aperture cryogenic light microscopy. *Journal of Microscopy-oxford*, 235(1):1–8, 2009.
- [163] M. Hussels, A. Konrad, and M. Brecht. Confocal sample-scanning microscope for

- single-molecule spectroscopy and microscopy with fast sample exchange at cryogenic temperatures. *Review of Scientific Instruments*, 83(12):123706, 2012.
- [164] T. L. Jennings, S. G. Becker-Catania, R. C. Triulzi, G. L. Tao, B. Scott, K. E. Sapsford, S. Spindel, E. Oh, V. Jain, J. B. Delehanty, D. E. Prasuhn, K. Boeneman, W. R. Algar, and I. L. Medintz. Reactive semiconductor nanocrystals for chemoselective biolabeling and multiplexed analysis. *Acs Nano*, 5(7):5579–5593, 2011.
- [165] W. W. Yu, L. H. Qu, W. Z. Guo, and X. G. Peng. Experimental determination of the extinction coefficient of cdte, cdse, and cds nanocrystals. *Chemistry of Materials*, 15(14):2854–2860, 2003.
- [166] W. E. Moerner and M. Orrit. Illuminating single molecules in condensed matter. *Science*, 283(5408):1670–+, 1999.
- [167] W. E. Moerner. A dozen years of single-molecule spectroscopy in physics, chemistry, and biophysics. *The Journal of Physical Chemistry B*, 106(5):910–927, 2002.
- [168] T. Basché, W. E. Moerner, M. Orrit, and U. P. Wild. *Single-Molecule Optical Detection, Imaging and Spectroscopy*. VCH, 1997.
- [169] T. Kondo, W. J. Chen, and G. S. Schlau-Cohen. Single-molecule fluorescence spectroscopy of photosynthetic systems. *Chemical Reviews*, 117(2):860–898, 2017.
- [170] M. Brecht. Spectroscopic characterization of photosystem i at the single-molecule level. *Molecular Physics*, 107(18):1955–1974, 2009.
- [171] M. Brecht, S. Skandary, J. Hellmich, C. Glöckner, A. Konrad, M. Hussels, A. J. Meixner, A. Zouni, and E. Schlodder. Spectroscopic properties of photosystem II core complexes from *Thermosynechococcus elongatus* revealed by single-molecule experiments. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1837(6):773 – 781, 2014.

- [172] S. Skandary, F. Muh, I. Ashraf, M. Ibrahim, M. Metzger, A. Zouni, A. J. Meixner, and M. Brecht. Role of missing carotenoid in reducing the fluorescence of single monomeric photosystem II core complexes. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 19:13189–13194, 2017.
- [173] I. Ashraf, A. Konrad, H. Lokstein, S. Skandary, M. Metzger, J. M. Djouda, T. Maurer, P. M. Adam, A. J. Meixner, and M. Brecht. Temperature dependence of metal-enhanced fluorescence of photosystem I from *Thermosynechococcus elongatus*. *Nanoscale*, 9:4196–4204, 2017.
- [174] M. Brecht and M. Hussels. Vorrichtung und Verfahren zum Transferieren eines Probenhalters von einer Transportvorrichtung zu einer Scanvorrichtung, DE102012218377B3, 2013.
- [175] M. Hussels. Einzelmolekülspektroskopie an photosystem-i-komplexen und bio-nano-hybridssystemen unter kryogenen bedingungen, Dissertation. Universität Tübingen, 2012.
- [176] S. W. Hell, M. Dyba, and S. Jakobs. Concepts for nanoscale resolution in fluorescence microscopy. *Current Opinion In Neurobiology*, 14(5):599–609, 2004.
- [177] K. Moutzouris, M. Papamichael, S. C. Betsis, I. Stavrakas, G. Hloupis, and D. Triantis. Refractive, dispersive and thermo-optic properties of twelve organic solvents in the visible and near-infrared. *Applied Physics B-lasers and Optics*, 116(3):617–622, 2014.
- [178] Semrock. <https://www.semrock.com/flatness-of-dichroic-beamsplitters-affects-focus-and-image-quality.aspx>, abgerufen Januar 2020.
- [179] R. Faoro, M. Bassu, Y. X. Mejia, T. Stephan, N. Dudani, C. Boeker, S. Jakobs, and T. P. Burg. Aberration-corrected cryoimmersion light microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018.