

■ Fokussieren mit Gold

Plasmonische Nanostrukturen verstärken die Fluoreszenz einzelner Farbstoffmoleküle.

Moderne Fluoreszenzmikroskopie kann einzelne Farbstoffe direkt sichtbar machen. Das beste Signal-zu-Hintergrundverhältnis erreicht dabei die konfokale Fluoreszenzmikroskopie. Diese erlaubt es, Farbstoffe in einem winzigen Volumen, definiert durch den Einsatz geeigneter Lochblenden, spektroskopisch zu charakterisieren. Da das Detektionsvolumen dabei etwa ein Femtoliter (10^{-15} l) beträgt, muss die Farbstoffkonzentration im Bereich von Nano- bis Pikomolar (10^{-9} bis 10^{-12} Mol/L) liegen, um Einzelmolekülexperimente zu ermöglichen. Einige biologisch relevante Reaktionen laufen jedoch bei wesentlich höheren Konzentrationen ab. So verlangt der effiziente enzymbasierte Aufbau eines DNA-Strangs Konzentrationen der Bausteine (Nukleotide) von Mikro- bis Millimolar. Um Einzelmolekülreaktionen auch hier direkt verfolgen zu können, gilt es daher, zum einen das Anregungsvolumen drastisch zu reduzieren und zum anderen die Photonenausbeute des Farbstoffs zu erhöhen. Hierfür bieten sich metallische Nanostrukturen an, die wie eine „Nanolinse“ wirken.

Möglichkeiten für solche Nanolinsen bietet das noch junge Gebiet der Nanophotonik. Sie beschäftigt sich damit, gekoppelte Resonanzen und die von ihnen hervorgerufenen Phänomene zu untersuchen, wie verstärkte Raman-Streuung und Fluoreszenz auf nanostrukturierten Metalloberflächen [1]. So versucht man mittels Nanostrukturen, Licht auf Skalen unterhalb der Beugungsgrenze zu manipulieren, beispielsweise um es effektiv zu konzentrieren [2,3]. Der Ansatz beruht darauf, dass metallische Nanostrukturen, die wesentlich kleiner sind als die Wellenlänge des verwendeten Lichts, optisch angeregt werden. Die Leitungsbandelektronen lassen sich dann phasengleich gegenüber dem Gitter der positiv geladenen Atomrümpfe auslenken. Aufgrund der resultierenden Polarisierung

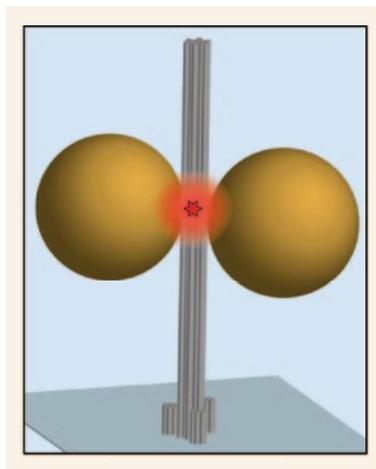


Abb. 1 Im „Hotspot“ von zwei Goldpartikeln befindet sich eine DNA-Origami-Nanosäule mit einem Farbstoff. Um diese Struktur herzustellen, wird ein langer Einzelstrang Viren-DNA mithilfe vieler kürzerer Einzelstränge gefaltet, um sich der gewünschten 3D-Form anzunähern. Dann wird die DNA-Nanosäule auf einer Glasoberfläche immobilisiert.

verhält sich die Nanostruktur wie ein durch die elektromagnetische Welle getriebener Oszillator. Dessen Eigenfrequenz und Stärke hängen nicht nur vom Material ab, sondern auch von der Form und Größe der Nanostruktur sowie seiner dielektrischen Umgebung. Die bei der Eigenfrequenz des Oszillators auftretende Resonanz liegt im optischen Bereich und wird Plasmon genannt. Metallische Nanostrukturen heißen daher auch „plasmonische Strukturen“ oder „optische Antennen“ [2].

Da das Feld der polarisierten Nanostruktur teilweise in den Außenraum reicht, verändert sich die lokale elektrische Feldstärke in seiner Umgebung (abhängig von Betrag und Orientierung zum einfallenden Feld), für ein Nanopartikel innerhalb eines Radius, der seiner Größenordnung entspricht. Dies wirkt sich auf die Fluoreszenzeigenschaften von Farbstoffen im Nahfeld der optischen Antenne aus. Bei sehr geringen Abständen von unter 10 nm löscht das absorbierende Nanopartikel die Fluoreszenz des Farbstoffs [4]. Der Energietransfer ist umso effizienter,

je kleiner der Abstand zwischen Farbstoff und Partikel ist und je mehr das Emissionsspektrum des einen mit dem Absorptionsspektrum des anderen überlappt. Zudem verstärkt die Anregung des Plasmons im Metall die einfallenden und abstrahlenden elektrischen Felder. Diese Verstärkung ist proportional zur Anregungsrate und fällt mit wachsendem Abstand zur Nanostruktur langsamer ab als der Energietransfer. Farbstoffe im Nahfeld einer metallischen Nanostruktur können deshalb die Intensität der Fluoreszenz deutlich erhöhen und zudem ihre Abklingdauer reduzieren, d. h. die Farbstoffe werden in der gleichen Zeit öfter angeregt und können mehr Photonen emittieren. Dieser Effekt lässt sich noch verstärken, wenn der Abstand zweier Strukturen kleiner als ihre Abmessungen wird. Bei diesen „Dimeren“ kann sich die elektrische Feldstärke im Zwischenraum durch die Kopplung der Plasmonen bei resonanter Anregung enorm erhöhen. Dimere eignen sich daher als Nanolinsen und sind ideale Modellsysteme für die Nanophotonik. Für ihre Herstellung kommen Methoden wie Elektronenstrahlolithographie oder Selbstassemblierung zum Einsatz. Für die Verstärkung ist entscheidend, die Farbstoffe gezielt an definierter Stelle zwischen den Nanostrukturen zu positionieren.

Der Gruppe um Philip Tinnefeld an der TU Braunschweig ist es nun gelungen, durch Selbstassemblierung eine dreidimensionale „DNA-Origami-Struktur“ herzustellen [5] (Abb. 1): Sie hat eine Länge von 220 nm und einem Durchmesser von 15 nm und besteht aus 208 Nukleinsäuren. Durch spezifische Hybridisierung konnten die Forscher an definierter Position zwei mit jeweils drei kurzen Nukleinsäuresequenzen modifizierte Goldpartikel anbringen [6]. Hierdurch gelang es ihnen, den Abstand zwischen den beiden Goldpartikeln auf 23 nm exakt einzustellen und

einen Farbstoff (ATTO647N) ebenfalls durch spezifische Hybridisierung im „Hotspot“ der Dimere zu positionieren. Das ist die Position mit der höchsten Fluoreszenzverstärkung.

Zeitaufgelöste Fluoreszenzexperimente mit einzelnen Farbstoff-Molekülen zwischen unterschiedlich großen Goldpartikeln (20 bis 100 nm) zeigen, dass sich die Abklingdauer des Farbstoffs von 3,8 ns in wässrigem Puffer bis auf 0,2 ns im Hotspot von zwei Goldpartikeln reduziert. Bei 100 nm großen Partikeln nahm im selben Experiment die gemittelte Fluoreszenz auf das 8-Fache für einzelne Goldpartikel und 28-Fache für Dimere zu. Einige Dimere zeigten eine bis zu 100-fache Verstärkung (Abb. 2).

Bei einem radial zwischen den beiden Goldpartikeln ausgerichteten Übergangsdipolmoment des Farbstoffs ist für die Nanostruktur eine 115-fache Fluoreszenzverstärkung zu erwarten. Dass die gemittelten Werte davon abweichen, hängt von der Größenverteilung der Goldpartikel, den Abweichungen von der senkrechten Ausrichtung der DNA-Nanosäule auf der Oberfläche sowie von der freien Rotation des Farbstoffdipolmoments im Hotspot des Dimers ab. Da für die tangential Ausrichtung des Dipolmoments die Fluoreszenzintensität stark abnimmt, die Abklingdauer aber nur minimal, fällt die Verstärkung (bei einer Rotationskorrelationszeit des Farbstoffs von 0,8 ns) geringer aus als erwartet.

In den Braunschweiger Experimenten ist es gelungen, die Konformationsdynamik einzelner im Hotspot angebrachter Holliday-Strukturen, DNA-Zwischenstufen bei der genetischen Rekombination, mit einer um eine Größenordnung höheren Photonenanzahl zu verfolgen [6]. Sehr schnelle Proteinfaltungsprozesse auf Einzelmolekülebene sind somit in Reichweite. Die Fluoreszenzverstärkung kann auch gezielt in der hochempfindlichen fluoreszenzbasierten Diagnostik zum Einsatz kommen, bei der positive Signale, ausgelöst durch spezifisches Binden im Hotspot, verstärkt werden.

Das durch die DNA-Gold-Nanolinse erzeugte kleine Anregungsvolumen macht die Fluoreszenzanalyse einzelner Moleküle in verschiedenen biologisch und medizinisch hochrelevanten Reaktionen wie der DNA-Replikation möglich. Diese nur bei höheren Konzentrationen effizient ablaufenden Reaktionen sind nun durchführbar, weil die Fluoreszenz nur in dem kleinen Volumen der Nanolinse dramatisch verstärkt wird. Darüber hinaus lassen sich fundamentale physikalische Aspekte der Wechselwirkung zwischen Licht und Nanopartikeln mithilfe gut definierter unterschiedlicher DNA-Origami-Strukturen untersuchen, da es jetzt gelingt, optische Quellen (Farbstoffe) gezielt im Fokus der Nanolinse zu positionieren.

Während das Detektionsvolumen bei der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie im Bereich

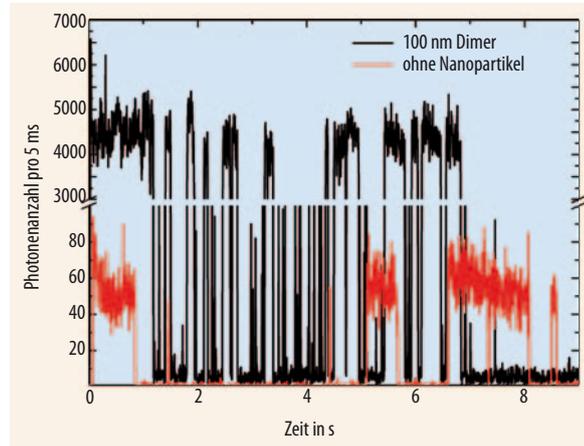


Abb. 2 Die Photonenanzahl steigt im Hotspot des Dimers etwa um den Faktor 90 an. Dies zeigt sich in den typischen Fluoreszenzzeitspuren des Farbstoffs ATTO647 ohne Nanopartikel bzw. im Hotspot von zwei 100 nm großen Goldpartikeln.

von Femtolitern liegt, zeigen diese Beispiele eindrucksvoll, dass es mithilfe der Nanolinse möglich ist, die Fluoreszenzintensität einzelner Farbstoffe in einem millionenfach geringeren Volumen im Bereich von Zeptolitern (10^{-21} l) gezielt zu verstärken.

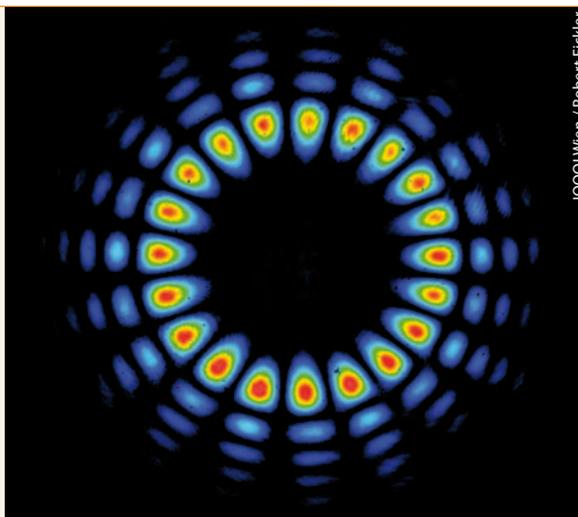
Markus Sauer

- [1] N. van Hulst, Nanophotonics Foresight Report, Nanophotonics Europe Association (2011), <http://bit.ly/SXo4hr>
- [2] L. Novotny und N. van Hulst, Nature Photonics 5, 83 (2011)
- [3] J. Schuller et al., Nature Materials 9, 193 (2010)
- [4] P. Anger, P. Bharadwaj und L. Novotny, Phys. Rev. Lett. 96, 113002 (2006)
- [5] P. W. Rothemund, Nature 440, 297 (2006)
- [6] G. Acuna et al., Science 338, 506 (2012)

VERSCHRÄNKT UND VÖLLIG VERDREHT

Gemäß der Quantenphysik könnte sich eine Eistanzerin bei einer Pirouette gleichzeitig links- wie rechtsherum drehen. Möglich wäre es auch, eine linksdrehende Tänzerin mit einer rechtsdrehenden zu verschränken. Das ist Wiener Physikern um Anton Zeilinger nun mit Lichtquanten gelungen: Sie konnten zwei Lichtquanten mit einer Bahndrehimpuls-Quantenzahl l von bis zu 300 miteinander verschränken – ein Weltrekord. Das Bild zeigt eine Kameraaufnahme in Falschfarbendarstellung eines Lasers, der sich in einer quantenmechanischen Überlagerung aus Drehimpulsquanten mit $l = 10$ bzw. $l = -10$ befinden. Daher sind 20 ringförmig angeordnete Intensitätsmaxima zu sehen. Neben der grundlegenden Frage makroskopischer Verschränkung lassen sich die verschränkten Lichtquanten auch dazu nutzen, um mit sehr geringer Intensität genauere Winkelmessungen durchzuführen.

R. Fickler et al., Science 338, 640 (2012)



IQOQI Wien / Robert Fickler