

# Einblick in das Unsichtbare

**Nichtlineare optische Phänomene ermöglichen die chemisch selektive Mikroskopie ohne Anfärbung**

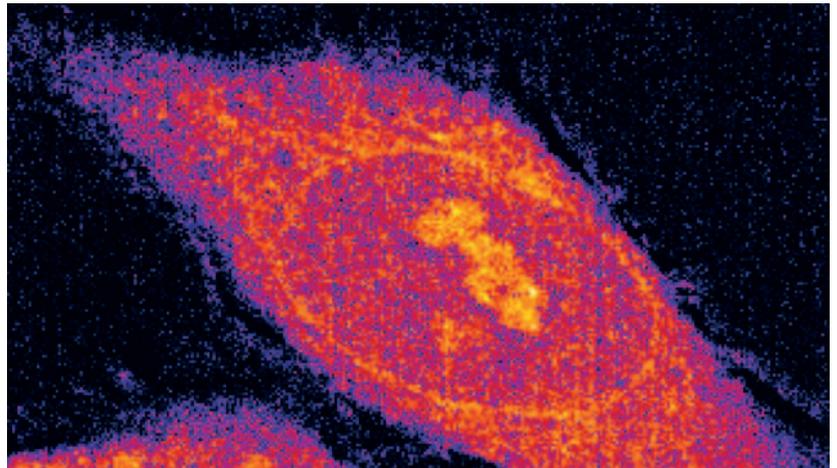
Andreas Zumbusch und Andreas Volkmer

**Die CARS-Mikroskopie ist eine neue optische Technik für die räumlich hoch aufgelöste Bildgebung. Mit neuesten Laserspektroskopischen Methoden erlaubt sie die chemisch selektive Darstellung mikroskopischer Details ohne Anfärbung. Sie eröffnet so eine Vielzahl von Anwendungen in der Zellbiologie und den Materialwissenschaften.**

Die Entwicklung der optischen Mikroskopie und der Biologie ist ein faszinierendes Beispiel für die wechselseitige Befruchtung verschiedener wissenschaftlicher Disziplinen. So war es Robert Hooke, der 1667 mit seiner Beschreibung mikroskopischer Aufnahmen von Kork den Begriff der biologischen Zelle prägte. Die folgende Entwicklung der optischen Mikroskopie ging Hand in Hand mit jener der Zellbiologie. Bereits die 1890 verfügbaren Mikroskope boten eine optische Auflösung, die an der durch die Beugung gegebenen Grenze lag. Schon damals gelang es, Strukturen mit einer Größe von etwa 200 nm zu unterscheiden. Erst in den letzten Jahren wurden optische Verfahren mit einer noch besseren Auflösung entwickelt.

Ein entscheidender Aspekt jeder Art von Mikroskopie ist die Frage, welches physikalische Phänomen zur Erzeugung von Kontrast benutzt wird. In der optischen Mikroskopie ist dies meist die Lichtabsorption, bei der das unter gleichmäßiger Probenbeleuchtung transmittierte Licht beobachtet wird. Die erhaltenen Intensitätsmodulationen ergeben dann das Bild der Probe. Die natürlich vorkommenden Absorptionsunterschiede genügen aber selten, um interessante Details selektiv darzustellen. Deshalb wurde eine Vielzahl von Anfärbetechniken entwickelt. Ein bekanntes Beispiel ist die von Gram 1884 eingeführte Verwendung von Kristallviolett, das die Zellwand bestimmter, inzwischen gram-positiv genannter Bakterien anfärbt. Solche chemischen Methoden zur Kontrastverbesserung haben sich in der Zellbiologie und Histologie als ungemein hilfreich erwiesen.

Eine heute besonders bedeutende Spielart der Mikroskopie mit vorheriger Probenanfärbung ist die Fluoreszenzmikroskopie. Im Gegensatz zur Absorptionmikroskopie wird hier ein fluoreszierender Farbstoff zur



Die CARS-Mikroskopie eignet sich zur chemisch selektiven Darstellung zellulärer Strukturen, wie hier an einer unangefärbten, lebenden menschlichen Tumorzelle gezeigt. Die Membran des Zellkerns im Zellplasma ist deutlich zu erkennen (Ausschnittgröße  $46 \mu\text{m} \times 30 \mu\text{m}$ ).

Anfärbung verwendet. Beobachtet wird nun nicht die Absorption des Anregungslichts, sondern die spektral verschobene Fluoreszenz der Farbstoffe.

Besonders die als konfokale Fluoreszenzmikroskopie bekannte Technik hat die Zellbiologie in den letzten 15 Jahren revolutioniert. Dabei wird die Probe abgerastert und mithilfe einer Blende im Detektionsstrahlengang jeweils nur das Signal eines kleinen Volumenelements detektiert. Man erhält so räumlich hoch aufgelöste dreidimensionale Bilder. Trotz ihres großen Erfolgs ist aber auch die Fluoreszenzmikroskopie mit Makeln behaftet: Zum einen setzt ihr Einsatz die Anfärbung mit

Farbstoffen voraus, die selektiv mit bestimmten Teilen der Probe wechselwirken. Solche Farbstoffe existieren aber nicht für alle Proben, und nicht jede Probe lässt sich ohne dramatische Änderung ihrer Eigenschaften anfärben. Dies gilt für alle Färbetechniken und ist besonders bei der Beobachtung von lebenden Zellen ein Problem. In der Fluoreszenzmikroskopie kommt als zweites, ebenso wichtiges Problem hinzu, dass alle Farbstoffe unter der nötigen intensiven Beleuchtung

## KOMPAKT

- ▶ Die sog. CARS-Mikroskopie (Coherent Anti-Stokes Raman Scattering) ermöglicht die chemisch selektive Bildgebung auf der Grundlage der kohärenten Anti-Stokes-Raman-Streuung, ohne dass die Probe mit Farbstoffen angefärbt werden müsste.
- ▶ Diese Methode erlaubt es, chemische oder biologische Komponenten innerhalb eines komplexen und heterogenen Systems nicht-invasiv zu untersuchen, und zwar mit hoher räumlicher und spektroskopischer Auflösung.

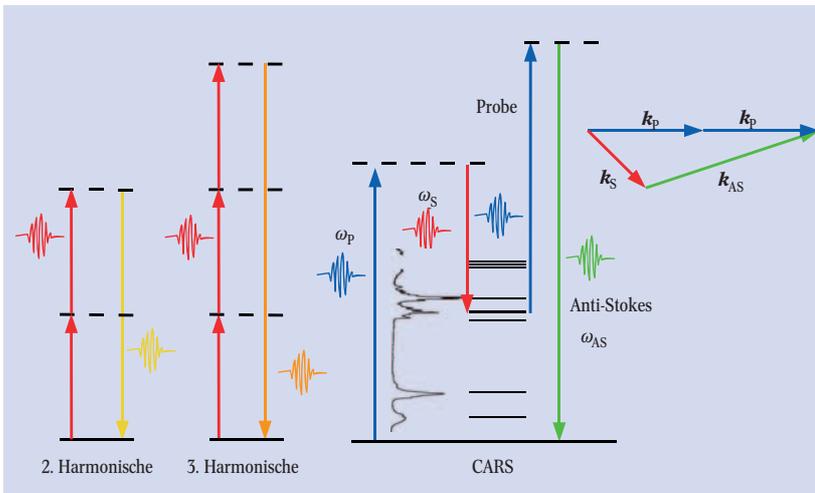
Dr. Andreas Zumbusch, University College London, Department of Physics and Astronomy, Gower Street, London WC1E 6 BT, England, E-Mail: a.zumbusch@ucl.ac.uk;  
Dr. Andreas Volkmer, Universität Stuttgart, 3. Physikalisches Institut, Pfaffenwaldring 57, 70550 Stuttgart, E-Mail: a.volkmer@physik.uni-stuttgart.de

mehr oder weniger schnell ausbleichen. Dies begrenzt die möglichen Beobachtungszeiten stark.

Aufgrund dieser Probleme wurde im letzten Jahrhundert eine Reihe von anfärbefreien Techniken entwickelt. Dazu gehören z. B. die Interferenzkontrast- und die Phasenkontrast-Mikroskopie. Beide Methoden nutzen nicht die Amplitude, sondern die Phase des Lichts für die Kontrasterzeugung in optisch transparenten Proben. Frits Zernike<sup>1)</sup> schrieb: „Man kann davon sprechen, dass das transparente Detail ‚optisch angefärbt‘ wird“.

Die Suche nach neuen Kontrastmethoden, nach physikalischen Effekten, die auch dem transparenten Detail Farbe verleihen, hat auch in den letzten Jahren nicht Halt gemacht. Neue Laser mit sehr kurzen Lichtpulsen haben hier ein völlig neues Feld eröffnet. Dabei nutzt man die sehr hohen Pulsenergien für die Erzeugung von Kontrast mit nichtlinearen optischen Phänomenen aus. Die in diesem Artikel vorgestellte CARS-Mikroskopie (Coherent Anti-Stokes Raman Scattering)

1) Zernike erhielt 1953 den Physik-Nobelpreis für die Entwicklung der Phasenkontrast-Mikroskopie.



**Abb. 1:** Bestrahlt man eine Probe mit starken ultrakurzen Laserpulsen, so kann diese Pulse bei Vielfachen der Anregungsfrequenz (2. und 3. Harmonische) emittieren. Bei zwei unterschiedlichen Anregungsfrequenzen (Pump  $\omega_p$ , Stokes  $\omega_s$ ) beobachtet man auch Abstrahlung bei Kombinationsfrequenzen. Stimmt  $\omega_p - \omega_s$  mit einem Schwingungsübergang der Probenmoleküle überein, so kommt es zu einer Resonanz-verstärkten Abstrah-

lung, dem Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS). Für die Impulserhaltung muss dabei die Beziehung  $2k_p = k_{AS} + k_s$  zwischen den Wellenvektoren  $k$  gelten (rechts). Dies kann durch das Einstrahlen von Pump- und Stokes-Strahl unter einem bestimmten Winkel erzielt werden. Die Impulserhaltung entspricht einer Phasenanpassung (s. Infokasten „CARS-Phasenanpassung“).

stößt gegenwärtig auf breites Interesse, da sie es erlaubt, chemische oder biologische Komponenten innerhalb eines komplexen und heterogenen Systems (z. B. ungefärbte, lebende Zellen und Gewebe) nicht-invasiv zu untersuchen, aber im Gegensatz zu den bereits erwähnten Techniken molekulare Selektivität bietet. Aus physikalischer Sicht ist die CARS-Mikroskopie dabei besonders interessant, weil in ihr gegenwärtig eine Vielzahl neuer Verfahren der kohärenten Laserspektroskopie und Lasertechnik erprobt werden.

### Grundlagen der CARS-Mikroskopie

Schwingungsresonanzen ermöglichen es, ohne Anfärbung molekular selektiven Kontrast zu erzeugen. Jedes Molekül besitzt ein charakteristisches Spektrum scharfer Schwingungsbanden, die eine hohe Selektivität gewährleisten. Die in der linearen Spektroskopie genutzte Infrarot-Absorption lässt sich in der Mikroskopie aber nur bedingt einsetzen, denn die beugungsbegrenzte

Fokussierung der nötigen langen Wellenlängen erlaubt nur eine kleine räumliche Auflösung, und die sehr breite und starke Absorption von Wasser erschwert besonders die Untersuchung biologischer Proben. Schwingungsspektren lassen sich aber auch durch inelastische Streuung von Licht der Frequenz  $\omega$  mit der Raman-Spektroskopie beobachten. Dabei kann ein Molekül im Schwingungsgrundzustand unter Anregung einer Schwingung der Frequenz  $\omega_{vib}$  Licht streuen. Man spricht dann von Stokes-Streuung, bei der ein Photon der Frequenz  $\omega_S = \omega - \omega_{vib}$  erzeugt wird. Den umgekehrten Fall (ein zuvor angeregtes Molekül geht nach der Streuung in seinen Schwingungsgrundzustand über) bezeichnet man als Anti-Stokes-Streuung. Dabei hat das erzeugte Photon die Frequenz  $\omega_{AS} = \omega + \omega_{vib}$ . Die Probleme der Infrarot-Absorption lassen sich hier umgehen, da meist sichtbares Licht gestreut wird. Allerdings sind Raman-Streuquerschnitte sehr klein, sodass hohe, für biologische Proben nicht tolerierbare Anregungsintensitäten nötig sind. Das größte Hindernis bei der Anwendung der Raman-Mikroskopie in der Biologie ist aber die Autofluoreszenz der Proben. Diese entsteht z. B. durch die Anregung der Fluoreszenz von enzymatischen Kofaktoren und erscheint im selben Spektralbereich wie die Stokes-Streuung. Selbst eine sehr schwache Probenfluoreszenz übersteigt die Intensität typischer Raman-Signale um Größenordnungen und macht deren Detektion dann unmöglich. Ein Ausweg wäre die Beobachtung des Anti-Stokes-Signals bei kürzeren Wellenlängen. Allerdings ist dieser Weg nicht gangbar, da molekulare Schwingungen bei Raumtemperatur thermisch kaum angeregt sind.

Sowohl IR- als auch Raman-Mikroskopie stoßen also bei vielen Anwendungen an enge Grenzen. Schwingungsresonanzen lassen sich aber auch durch nichtlineare optische Techniken zur Kontrasterzeugung verwenden. Ganz allgemein werden Moleküle einer Probe durch die Wechselwirkung der Elektronen mit dem Anregungslicht polarisiert. Genügend starke elektrische Felder, wie sie in kurzen Laserpulsen auftreten, erzeugen dabei nicht nur eine Polarisierung mit der Frequenz des Anregungspulses, sondern auch nichtlineare Polarisationskomponenten. Diese können der zweiten oder höheren Harmonischen der Laserfrequenz (Abb. 1) oder – wenn gleichzeitig zwei Anregungslaser mit verschiedenen Frequenzen verwendet werden – Kombinationsfrequenzen entsprechen. Die induzierte Polarisierung führt dann zu einer Abstrahlung mit der entsprechenden Frequenz.

Wie führt aber nun ein solches nichtlineares Signal zur selektiven Erzeugung von Kontrast in der Mikroskopie? Zur Beantwortung dieser Frage ist es wichtig zu wissen, dass die Stärke der nichtlinearen induzierten Polarisierung  $n$ -ter Ordnung  $P^{(n)}$  nicht nur von der elektrischen Feldstärke  $E$  und damit der Intensität des eingestrahlten Lichts, sondern auch von der Suszeptibilität  $n$ -ter Ordnung  $\chi^{(n)}$  der Probe abhängt:  $P^{(n)} \propto \chi^{(n)} E^n$ . Dabei haben die Symmetrieeigenschaften einen wichtigen Einfluss auf  $\chi^{(n)}$ . Bei Inversionssymmetrie der Probe verschwinden etwa die Nichtlinearitäten gerader Ordnung. Mit der Erzeugung der 2. Harmonischen lassen sich deshalb Grenzflächen innerhalb einer Probe, z. B. zwischen zwei Medien mit unterschiedlichem Brechungsindex, mikroskopisch unterscheiden. Man erhält Kontrast mit struktureller Selektivität. Die Kopplung der mit dem Anregungslicht wechselwirkenden Elektronen an die Schwingungen der Probenmoleküle führt aber auch zum Auftreten von Resonanztermen für

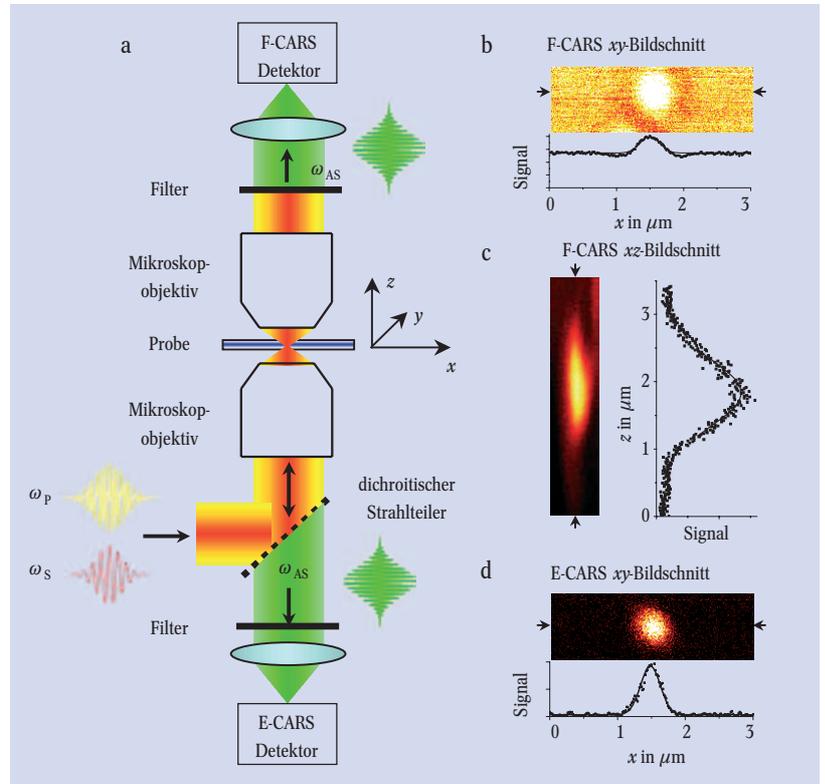
Molekülschwingungen. In größeren Molekülen wird die Lage von Resonanzen für Schwingungen bestimmter molekularer Gruppen, wie etwa von C-H- oder C-C-Bindungen, charakteristisch durch deren Nachbargruppen bestimmt. Daher eignen sich Schwingungsresonanzen für die molekular selektive Kontrasterzeugung.

In der Mikroskopie lassen sich molekulare Schwingungsresonanzen mit der seit langem aus der Spektroskopie bekannten CARS nutzen. CARS ist ein nichtlinearer Prozess dritter Ordnung, bei dem drei Anregungsfelder wechselwirken. Normalerweise werden aber nur zwei Laserfelder, der Pump- ( $\omega_p$ ) bzw. Stokes-Puls ( $\omega_s$ ), zur Anregung verwendet. In der Photonenbilanz tauchen dann zwei Pump-Photonen auf. Stimmt  $\omega_p - \omega_s$  mit der Frequenz eines Schwingungsübergangs  $\omega_{\text{vib}}$  der Probe überein, so führt das zu einer resonanten Verstärkung des CARS-Signals (Abb. 1). Im Bild der induzierten Polarisation wird dies dadurch wiedergegeben, dass man die Suszeptibilität dritter Ordnung  $\chi^{(3)}$  durch einen resonanten und einen nicht-resonanten Term darstellt:  $\chi^{(3)} = \chi_r^{(3)} + \chi_{\text{nr}}^{(3)}$ . Durch Variieren der Frequenzdifferenz zwischen den Anregungslasern lassen sich verschiedene Resonanzen der Probe abfragen. Im Vergleich zu anderen Techniken bietet die CARS-Mikroskopie folgende Vorteile: chemische Selektivität lässt sich ohne vorherige Anfärbung der Probe erzielen; das detektierte Signal erscheint bei kleineren Wellenlängen als das Anregungslicht und wird nicht durch Untergrundfluoreszenz beeinträchtigt; die Kohärenz des CARS-Prozesses, bei der die aktiv gepumpten und in Phase oszillierenden Molekülbindungen konstruktiv interferieren, führt zu einer Verstärkung der Streuintensität, die quadratisch von der Anzahl der streuenden Moleküle abhängt; das CARS-Signal wird wegen der nichtlinearen Abhängigkeit von der Anregungsintensität nur im Fokus erzeugt, und ermöglicht somit eine dreidimensionale Bildgebung.

Dass sich CARS potenziell für die Kontrasterzeugung in der Mikroskopie eignet, wurde bereits Anfang der 80er-Jahre erkannt [1]. Allerdings ging man zunächst davon aus, dass man auch in der Mikroskopie die Dispersion in der Probe berücksichtigen müsste, d. h. die Tatsache, dass der Brechungsindex und damit die Ausbreitungsgeschwindigkeit von Licht von der Wellenlänge abhängt. Um mit einem kohärenten Prozess wie CARS eine große Probenpolarisation zu induzieren und somit ein starkes Signal zu erzeugen, müssen sich aber die beteiligten Felder über einen gewissen räumlichen Bereich mit gleicher Phase addieren (s. Infokasten „CARS-Phasenanpassung“). Betrachtet man die Wellenvektoren der Anregungsstrahlen, so entspricht dies der Impulserhaltung (Abb. 1). Sie wird in der CARS-Spektroskopie durch die Phasenanpassung erreicht. Die Anregungsstrahlen werden dabei in verschiedenen Winkeln eingestrahlt, sodass die Strahlen über eine lange Wegstrecke konstruktiv miteinander wechselwirken. Das CARS-Signal wird dann unter einem bestimmten Winkel abgestrahlt und lässt sich mit einer Blende von den Anregungsstrahlen trennen. Die direkte Übertragung dieses Schemas auf die CARS-Mikroskopie setzte sich allerdings nicht durch, da es die räumliche Trennung der Anregungsstrahlen im Mikroskopobjektiv erfordert. Damit verringert sich aber der nutzbare Öffnungswinkel und in der Folge die räumliche Auflösung drastisch.

Erst Ende der 90er-Jahre wurde erkannt, dass Objektive mit großen Öffnungswinkeln CARS-Mikrosko-

pie auch ohne räumliche Trennung der Strahlen ermöglichen [2]. Wird nämlich das Objektiv durch jeden Anregungsstrahl voll ausgeleuchtet, dann gibt es im Fokus für jede Wellenvektorkomponente des Pump-Strahls die für die Phasenanpassung nötige des Stokes-Strahls. In der Praxis müssen deshalb lediglich beide Anregungsstrahlen kollinear in ein Objektiv eingekoppelt werden (Abb. 2a). Ein intensives CARS-Signal wird dann in einem Kegel nach vorne abgestrahlt und kann mit einem



**Abb. 2:** Beim CARS-Mikroskop sind Pump- und Stokes-Strahlen parallel und das gestreute CARS-Signal lässt sich in Vorwärts- (F-CARS) und Rückwärtsrichtung (E-CARS) detektieren (a).<sup>2)</sup> Die dreidimensionale Bildgebung der C=C-Streckschwingungs-mode (ca.  $1595 \text{ cm}^{-1}$ ) lässt sich anhand einzelner Polyesterollkugeln in einer wässrigen Umgebung demonstrieren: F-CARS- (b) und E-CARS xy-Bildschnitte (d) einer

$0,5 \mu\text{m}$  großen Kugel; F-CARS-xz-Bildschnitt durch eine  $1 \mu\text{m}$  große Kugel (c). Die Intensitätsprofile zeigen, dass sich mit der CARS-Spektroskopie laterale und longitudinale Ortsauflösungen von ca.  $340 \text{ nm}$  und ca.  $1,2 \mu\text{m}$  erreichen lassen. Bei der E-CARS-Detektion ist das nicht-resonante Untergrundsignal der wässrigen Umgebung im Vergleich zur F-CARS-Detektion stark unterdrückt.

spektralen Filter leicht vom Anregungslicht getrennt werden. Durch das gerasterte Bewegen der Anregungsstrahlen über die Probe oder umgekehrt, durch Bewegen der Probe durch den festen Fokus, lassen sich dreidimensionale CARS-Bilder erzeugen (Abb. 2b–2d).

Die beschriebenen Vorteile der CARS-Mikroskopie kommen besonders bei der Untersuchung lebender Zellen zur Geltung. Die Abbildung auf S. 31 zeigt die Aufnahme einer ungefärbten menschlichen Tumorzelle. Deutlich ist die Membran des Zellkerns zu sehen. Die in der Membran enthaltenen Fettsäuremoleküle lassen sich über die Schwingungen, die zur Streckung des C-H-Abstandes führen und eine Resonanz bei  $2900 \text{ cm}^{-1}$  besitzen, sichtbar machen. Dabei können solche Aufnahmen über mehrere Stunden an einer Zelle gemacht werden, da die benötigten Anregungsleistungen im Bereich weniger  $100 \mu\text{W}$  liegen und kein Bleichen auftritt. Jüngste Fortschritte in der CARS-Mikroskopie erlauben es, vesikulären Transport in Zellen mit einer zeitlichen Auflösung von einem Bild pro Sekunde zu verfolgen.

<sup>2)</sup> „F“ steht hier für „forward“ und „E“ für „epi-detected“.

Ein interessanter Aspekt der CARS-Mikroskopie ist die Erzeugung des Anti-Stokes-Signals in einer heterogenen Probe von Streuobjekten, die kleiner sind als die Wellenlänge des Anregungslichts und sich in einem Medium befinden, das ebenfalls ein nichtlineares Signal liefert. Bei der Verwendung von stark fokussierten Anregungspulsen kann dann ein intensives CARS-Signal auch in Rückwärtsrichtung detektiert werden [3]. Die Erklärung des Kontrastmechanismus dieser so genannten Epi-Detektion ist im Infokasten „CARS-Phasenanpassung“ zu finden. Da in der E-CARS-Konfiguration sowohl die Anregung der Probe als auch die Detektion des CARS-Signals mit ein und demselben Mikroskopobjektiv erfolgt, gleicht der vereinfachte Aufbau eines E-CARS-Mikroskopes dem eines konventionellen invertierten Fluoreszenzmikroskops und ermöglicht es, biologische Proben zu untersuchen, die gleichzeitig, beispielsweise mit Mikroelektroden, manipuliert werden sollen.

Wegen der Nichtlinearität des CARS-Prozesses benötigt man hohe Anregungsfeldstärken für die Signal-erzeugung, wie sie sich mit kurzen Laserpulsen leicht erreichen lassen. Das größte Problem besteht darin, die beiden ultrakurzen Laserpulse mit einer Genauigkeit von wenigen hundert Femtosekunden zu synchronisieren. Dies ist am einfachsten rein optisch möglich, indem man beide Anregungspulse von einem gemeinsamen Pump-puls ableitet. Dieses Vorgehen wurde mit optisch parametrischen Verstärkern und Oszillatoren und neuerdings mit einem Weißlichtkontinuum aus einer Glasfaser gezeigt. Inzwischen gelingt es aber auch, zwei unabhängige Titan-Saphir-Laseroszillatoren elektronisch ausreichend stabil für die CARS-Mikroskopie zu synchronisieren. Für die Antwort auf die Frage, welche Pulsauern in der CARS-Mikroskopie ideal sind, muss man sich noch einmal die Faktoren in Erinnerung rufen, die die Stärke der induzierten Polarisation bestimmen. Einerseits soll die Feldstärke und damit die Pulsenergie möglichst groß sein, andererseits aber die spektrale Breite der Pulse möglichst klein, um haupt-

sächlich die Resonanz anzuregen und nur wenig des fast frequenzunabhängigen nicht resonanten Signals zu erzeugen. Allerdings ist die spektrale Breite sehr kurzer Pulse viel größer als die einer typischen Schwingungsresonanz (wenige  $\text{cm}^{-1}$ ). Im Experiment wählt man deshalb einen Kompromiss. Die Pulsauern der Anregungsstrahlen sollen dabei für die effiziente Erzeugung eines CARS-Signals möglichst kurz sein, doch nicht so kurz, dass die spektrale Breite der Pulse größer als die der Schwingungsresonanz wird. Dies wurde mit Pump- und Stokes-Pulsen im Pikosekundenbereich, aber auch mittels der spektralen Fokussierung eines identisch gechirpten Femtosekunden-Pulspaars erreicht (vgl. Infokasten „Femto- oder Pikosekundenpulse?“)

### Zugang zu chemischen und physikalischen Strukturinformationen

Die CARS-Mikroskopie ermöglicht sowohl eine hohe räumliche als auch eine hohe spektroskopische Auflösung. Damit erhält man Zugang zu chemischen und physikalischen Strukturinformationen von Objekten mit Volumina unterhalb eines Femtoliters in einer komplexen Probenumgebung. Dies soll im Folgenden für verschiedene spektroskopische Umsetzungen der CARS-Mikroskopie vorgestellt werden.

#### CARS-Mikrospektroskopie in der Frequenzdomäne

Möchte man eine Verbindung über ihr Schwingungsspektrum identifizieren, so reicht es oft nicht aus, nur eine Resonanz zu beobachten. Um ein CARS-Spektrum mit den oben beschriebenen schmalbandigen Anregungstechniken aufzunehmen, ist jedoch das sequentielle Abfragen der Wellenlänge nötig. Ein solches Vorgehen ist zeitaufwändig und anfällig für Fehler durch Fluktuationen der Anregungslaser. Quantitative Unterschiede in einem CARS-Spektrum lassen sich damit kaum verfolgen. Dieses Problem umgeht die Multiplex-CARS-Mikrospektroskopie. Dabei werden mit jedem Paar von einem spektral schmalen Pump- und einem breiten Stokes-Puls mehrere Raman-Resonan-

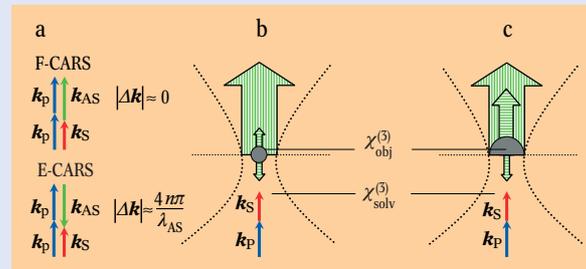
#### Die CARS-Phasenanpassung mit stark fokussierten Laserfeldern: Konsequenzen für den Bildkontrast

Für die effiziente Erzeugung des CARS-Signals muss die Phasenanpassungsbedingung  $\pi/|\Delta k| > l$  erfüllt werden. Dabei ist  $\Delta k = k_{AS} - (2k_p - k_s)$  die Fehlanpassung der Wellenvektoren des Pump- ( $k_p$ ), Stokes- ( $k_s$ ) und Anti-Stokes-pulses ( $k_{AS}$ ) mit  $|k_i| = 2\pi n/\lambda_i$  ( $i = p, s, AS$ ).  $l$  ist die effektive Wechselwirkungslänge und  $n$  der Brechungsindex des nichtlinearen Mediums. Damit wirkt der Betrag der Fehlanpassung wie ein Filter für Streuobjekte bestimmter Größe, für die ein CARS-Signal erzeugt werden kann.  $|\Delta k|$  wird aber durch die Geometrie für die Ausbreitungsrichtungen der Anregungsstrahlen und des abgestrahlten CARS-Feldes bestimmt. Abb. (a) zeigt die Wellenvektordiagramme entlang der optischen Achse für die kolineare Anregung in der F- und E-CARS-Kon-

figuration des Aufbaus in Abb. 2a. Im Fall von F-CARS gilt  $k_{AS} \approx (2k_p - k_s)$ , womit die Phasenanpassungsbedingung immer erfüllt ist, d. h.  $|\Delta k| \approx 0$ . Für E-CARS gilt jedoch  $k_{AS} \approx -(2k_p - k_s)$ , woraus sich eine beträchtliche Fehlanpassung von  $|\Delta k| \approx$

nichtlinearen Medium mit  $\chi_{\text{solv}}^{(3)}$  (z. B. Lösungsmittel) befinden, alleine aufgrund ihrer verschiedenen Wechselwirkungslängen auch verschiedene starke CARS-Signale. Dies ist qualitativ in Abb. b und c dargestellt, die die vom Objekt bzw. vom Lösungs-

viel stärkeren CARS-Signal des Mediums kohärent überlagert. Das Resultat ist ein geringer Kontrast im CARS-Bild des Objektes (Abb. 2b). Im Gegensatz dazu erlaubt die E-CARS-Detektion eine Bildgebung mit viel besserem Kontrast, da das E-CARS-Signal des Mediums aufgrund destruktiver Interferenz verschwindet. Das gilt nicht für das E-CARS-Signal des Objektes, wenn dessen Größe vergleichbar zur Anti-Stokeswellenlänge ist. Dann trägt nur das Objekt zum Bildkontrast bei (Abb. 2d). Ein weiterer Kontrastmechanismus in der E-CARS-Detektion beruht auf der Symmetriebrechung in der Fokalebene [11]. Abb. c zeigt, dass dies an ausgedehnten Grenzflächen von Bereichen mit verschiedenen nichtlinearen Suszeptibilitäten der Fall ist.



$2|k_{AS}| = 4\pi n/\lambda_{AS}$  ergibt [3]. In heterogenen Proben erzeugen Objekte, die auf einer sub-Mikrometerskala unterschiedliche Suszeptibilitäten  $\chi_{\text{obj}}^{(3)}$ , Formen und Dimensionen haben und sich in einem

mittel abgestrahlten CARS-Felder als horizontal bzw. vertikal schraffierte Pfeile zeigt. In der F-CARS-Geometrie ist das CARS-Feld des Objektes dem wegen der größeren Wechselwirkungslänge

zen über einen weiten Frequenzbereich gleichzeitig angeregt. Das entstehende breite CARS-Spektrum kann leicht mit einem CCD-Zeilendetektor aufgenommen werden. Während die Bandbreite des Pumpulses die spektrale Auflösung der Messung festlegt, bestimmt die des Stokes-Pulses die spektrale Breite des CARS-Spektrums. Experimentell wurde die Multiplex-CARS-Mikrospektroskopie bislang mit zwei elektronisch synchronisierten Ti:Saphir-Oszillatoren durchgeführt, welche transform-limitierte ps-Pumpulse und fs-Stokes-Pulse erzeugen. Unlängst gelang es aber zu zeigen, dass breite Spektralbereiche sowohl mit einer einzelnen fs-Pulsquelle und dem Weißlichtkontinuum aus einer Glasfaser als auch mit sehr kurzen und deshalb spektral breitbandigen fs-Pulsen zugänglich sind.

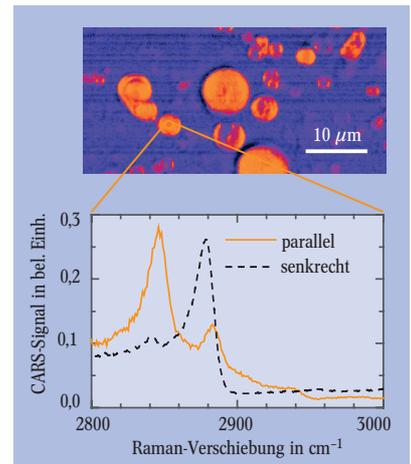
Wie die CARS-Mikroskopie, so lässt sich auch die Multiplex-CARS-Mikrospektroskopie mit einer polarisationssensitiven Detektion kombinieren. Damit gelingt es, den nichtresonanten Untergrund zu unterdrücken, die Depolarisationsverhältnisse der Raman-Banden zu bestimmen und überlappende Raman-Banden aufgrund der Unterschiede in ihren Symmetrieeigenschaften aufzulösen. Dies ist exemplarisch in Abb. 3 für das CARS-Spektrum eines einzelnen, aus mehreren Lipidmembranen aufgebauten, Vesikels aus DSPC<sup>3)</sup> im Bereich der C-H-Streckschwingungen gezeigt [4]. Das Raman-Spektrum von Lipidmembranen besteht aus einer Vielzahl von überlappenden Banden, deren relativen Intensitäten stark vom Grad der Hydratisierung, der Packungsdichte und der Ordnung der Lipidketten abhängen. Die spektrale Sensitivität im Hinblick auf die Lipidumgebung erlaubt es, den thermodynamischen Zustand von Phospholipid-Doppelschichten innerhalb eines Lipidmembransystems zu beobachten. Bei Raumtemperatur befinden sich die DSPC-Lipidvesikel in der Gelphase. Die symmetrischen und antisymmetrischen Streckschwingungen in den Methylengruppen (CH<sub>2</sub>) der Fettsäuremoleküle (vgl. Abb. 3) bestimmen das Spektrum. Die Polarisations-eigenschaften dieser Raman-Moden des im CARS-Bild gekennzeichneten DSPC-Vesikels lassen sich direkt aus den CARS-Spektren ablesen, die bei unterschiedlichen Polarisationsorientierungen des Analysators im Detektionsstrahlengang aufgenommen wurden. Ist der Analysator senkrecht zur Polarisation des Pumpfeldes orientiert, dann dominiert die Intensität der  $\nu_a(\text{CH}_2)$ -Bande und die  $\nu_s(\text{CH}_2)$ -Bande verschwindet. Ist andererseits der Analysator parallel zur Polarisation des Pumpfeldes ausgerichtet, so wird die  $\nu_s(\text{CH}_2)$ -Bande deutlich stärker. Inzwischen gelang es sogar, Multiplex-CARS-Spektren von einzelnen Lipidmonolagen aufzunehmen. Dies erlaubt das Studium der chemischen und physikalischen Struktur einzelner Vesikel [5].

**CARS-Mikrospektroskopie in der Zeitdomäne**

Molekulare Schwingungsfrequenzen und Relaxationsprozesse lassen sich auch analysieren, indem man kohärente Oszillationen und das Abklingen eines CARS-Signals in der Zeitdomäne misst. Diese Experimente liefern grundsätzlich die gleichen Informationen, da sie über eine Fourier-Transformation mit denen in der Frequenzdomäne verknüpft sind. Jedoch lässt sich mit der CARS-Mikrospektroskopie in der Zeitdomäne auch der freie Raman-Induktionszerfall als freie Entwicklung des molekularen Systems beobachten und die nicht resonanten und resonanten Beiträge zum CARS-Signal voneinander trennen. Während das

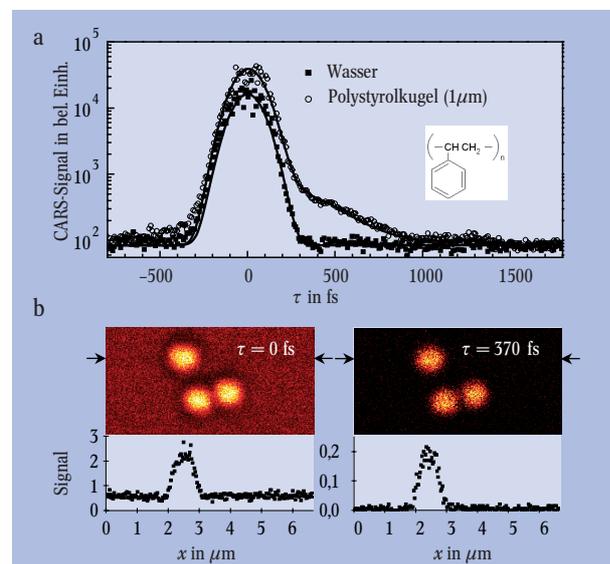
nicht-resonante Signal instantan abklingt, relaxieren die schwingungsresonanten Beiträge zum freien Induktionszerfall in der kondensierten Phase innerhalb weniger Pikosekunden. Um dies zu beobachten, muss in der CARS-Mikrospektroskopie mit drei fs-Anregungspulsen verschiedener Frequenzen gearbeitet werden [6]. Statt wie bisher zwei Pump- und ein Probenphoton in die Photonenbilanz ein. Die Pulspaare der sich zeitlich überlappenden Pump- und Stokes-Felder polarisieren wie bisher die Probe. Die Relaxation der induzierten Polarisation wird nun mit der Streuung des dritten Probepulses nach einer Zeitverzögerung  $\tau$  abgefragt. Eine Messung des Raman-Induktionszerfalls besteht dann in der Aufnahme des Anti-Stokes-Signals als Funktion der Verzögerung von Pump- und Probepuls.

Die Messung des freien Raman-Induktionszerfalls einer mikroskopischen Probe mit zeitaufgelöster CARS-Mikrospektroskopie ist im Folgenden am Beispiel einer einzelnen 1  $\mu\text{m}$  großen Polystyrolkugel in wässriger Umgebung dargestellt. Abbildung 4 zeigt die gemessenen freien Raman-Induktionszerfälle bei Fokussierung auf die Kugel sowie in die wässrige Lösung bei einer eingestellten Raman-Verschiebung von 3054  $\text{cm}^{-1}$ . Aufgrund der großen Spektralbreite der Femtosekunden-Anregungspulse werden eine Vielzahl von sich überlappenden Schwingungsmoden in der Polystyrolkugel kohärent angeregt.



**Abb. 3:** Durch polarisationssensitive Multiplex-CARS-Mikrospektroskopie lässt sich an einem multilamellaren Lipidvesikel (oben) die symmetrische  $\nu_s(\text{CH}_2)$  bzw. antisymmetrische C-H-Streckschwingung  $\nu_a(\text{CH}_2)$  bei 2847 bzw. 2882  $\text{cm}^{-1}$  selektiv detektieren [4].

3) 1,2-Distearoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin



**Abb. 4:** Zeitlich und örtlich aufgelöstes CARS-Signal einer 1  $\mu\text{m}$  großen von Wasser umgebenen Polystyrolkugel bei einer Raman-Verschiebung im Bereich der aromatischen C-H-Streckschwingungen um 3054  $\text{cm}^{-1}$ :  
 ▶ a) Gemessene und simulierte (Linien) Zeitabhängigkeit des freien Raman-Induktionszerfalls bei Fokussierung auf die Polystyrolkugel (○) und in die umgebende Lösung (■).  
 ▶ b) CARS-Bilder mit zugehörigen Intensitätsprofilen, aufgenommen bei zwei Zeitverzögerungen,  $\tau = 0$  und  $\tau = 370$  fs, zeigen die vollständige Auslöschung der nichtresonanten Untergrundbeiträge des Wassers sowie des Objektes zum Bildkontrast bei  $\tau = 370$  fs [6].

Sie tragen alle zum gemessenen freien Raman-Induktionszerfall bei. Die Abklingkurve ist durch einen anfänglichen schnellen Abfall der Antwortfunktion des Geräts und einen anschließenden exponentiellen Abfall mit einer Zeitkonstante von 380 fs gekennzeichnet. Diese spiegelt die schnellste Komponente aller Dephasierungsprozesse wider und kann der Raman-Resonanz bei  $3035\text{ cm}^{-1}$  mit einer Linienbreite von  $15,4\text{ cm}^{-1}$  zugeordnet werden. Wie die CARS-Mikrospektroskopie in der Zeitdomäne für die Erhöhung des Bildkontrastes eingesetzt werden kann, ist an denselben Polystyrolkugeln für zwei Zeitverzögerungen gezeigt (Abb. 4b)

**CARS-Korrelationsspektroskopie von Diffusionsdynamik**

Neben Anwendungen in der Bildgebung werden optische Mikrospektroskopietechniken zunehmend für die Untersuchung von Diffusionsprozessen mit Methoden der Fluktuationsspektroskopie kombiniert. Bekannte Beispiele sind die dynamische Lichtstreuung (DLS) und die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS). Allgemein werden dabei Signalfluktuations detektiert, die von der Diffusion einzelner Partikel oder Moleküle durch ein kleines Detektionsvolumen herrühren. Die Kombination der Struktur- und Dynamikinformation der Korrelationsspektroskopie mit chemischem Kontrast und einer hohen Detektionssensitivität gelang erstmals unter Verwendung der CARS-Mikroskopie. Die CARS-Korrelationsspektroskopie (CARS-CS) ist dabei vorrangig auf die Messung von Fluktuationen der Teilchenzahl beschränkt, die durch die Diffusion von Raman-Streuer durch das offene Beobachtungsvolumen von etwa einem Femtoliter auf der Mikrosekunden- bis Sekundenzeitskala verursacht werden. Es ist wichtig, dabei das nicht-resonante CARS-Signal zu unterdrü-

cken, da es aufgrund seiner fehlenden molekularen Selektivität den Fluktuationskontrast verschlechtert. Aus diesem Grund wird die CARS-CS im Allgemeinen mit Detektionstechniken kombiniert, welche eine effiziente Unterdrückung des nicht-resonanten CARS-Signals erlauben, wie mit epi-detektiertem, polarisationskontrolliertem oder zeitverzögertem CARS.

Experimentell werden in der CARS-CS-Photonendetektionsereignisse als Funktion der Zeit registriert. Abbildung 5 zeigt dies für eine Messung von frei diffundierenden Polystyrolkugeln in wässriger Lösung. Bei konstanten Anregungsintensitäten und einem unveränderten Beobachtungsvolumen fluktuiert das CARS-Signal (Abb. 5a), da die Teilchenzahl um einen Mittelwert fluktuiert. Zur Analyse modelliert man die Autokorrelationsfunktion unter Berücksichtigung der stochastischen Teilchenzahlfluktuationen sowie des Mechanismus der CARS-Signalerzeugung (Abb. 5b). Über die Anfangsamplitude der Autokorrelationsfunktion wird dann die mittlere Partikelkonzentration bestimmt. Die Diffusionszeit  $\tau_D$  erlaubt die Berechnung des lateralen Diffusionsparameters, aus dem sich über die Stokes-Einstein-Beziehung die Partikelgröße oder die mikroskopische Viskosität ermitteln lassen [7].

Der Vorteil der CARS-CS gegenüber der DLS oder FCS besteht in ihrer chemischen Selektivität für Spezies in ihrem nativen Zustand. Damit ist die CARS-CS von speziellem Interesse in Untersuchungen, in denen eine Markierung des Systems nicht möglich oder nicht erwünscht ist. Dies eröffnet nicht nur die Möglichkeit, die dreidimensionale Verteilung der Diffusionskoeffizienten beispielsweise in lebenden Zellen zu verfolgen, sondern auch die spezifische Wechselwirkung einzelner Komponenten innerhalb eines komplexen Systems, wie z. B. Aggregationsprozesse zu beobachten. Im Vergleich

4) engl. chirp = zwitschern; ein lautmalerscher Ausdruck für das zeitliche Auseinanderlaufen der Frequenzkomponenten eines Pulses aufgrund der Dispersion der Gruppengeschwindigkeit

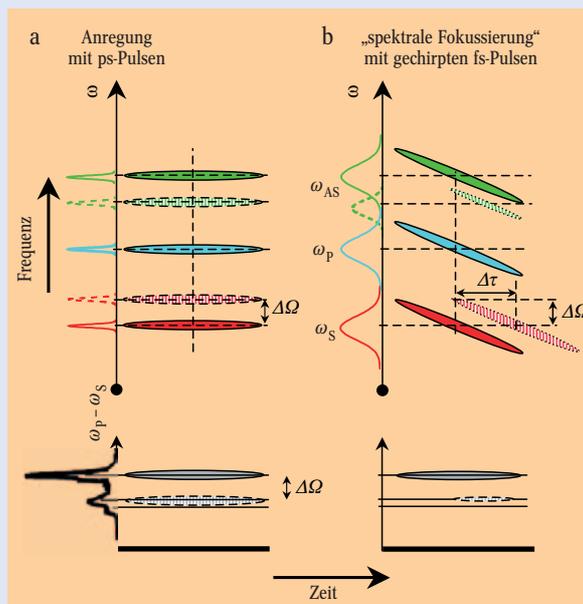
**Die Wahl der Anregungsquelle: Femto- oder Pikosekundenpulse?**

Raman-Moden können mit Pump- und Stokespulsen von etwa 5 ps Pulsdauer (Abb. a), die z. B. von zwei elektronisch-synchronisierten Ti:Saphir-Oszillatoren [12] stammen, selektiv angeregt werden. Es wurden aber auch neue Anregungstechniken entwickelt, die eine schmalbandige Anregung mit gebräuchlichen fs-Lasersystemen ermöglichen. So lässt sich eine hohe spektrale Auflösung von wenigen  $\text{cm}^{-1}$  erzielen, wenn breitbandige Pump- und Stokes-Pulse mit einem identischen linearen Chirp<sup>4)</sup> versehen werden (Abb. b) [13].

Die Abbildung veranschaulicht die prinzipiellen Unterschiede und Analogien zwischen beiden Anregungsmethoden anhand der Frequenz-Zeit-Abhängigkeiten für die Pump-, Stokes- und CARS-Pulse bei den Mittelfrequenzen  $\omega_p$  (blau),  $\omega_s$  (rot) und  $\omega_{AS}$  (grün) sowie für die selektive Anregung einer Raman-Resonanz bei der Raman-Verschiebung  $\omega_p - \omega_s$

(grau): Bei der Anregung mit transform-limitierten ps-Pulsen ist aufgrund der geringen spektralen Pulsbreiten eine

ein ps-Puls. Die Selektion einer um  $\Delta\Omega$  verschobenen Raman-Resonanz erfolgt einfach durch die Verstimmung



schmalbandige Anregung einer Schwingungsmode gewährleistet. Das abgestrahlte CARS-Feld ist dann ebenfalls

der Stokes-Laserfrequenz um den gleichen Betrag. Bei der Anregung mit spektral breiten fs-Pulsen werden ihre

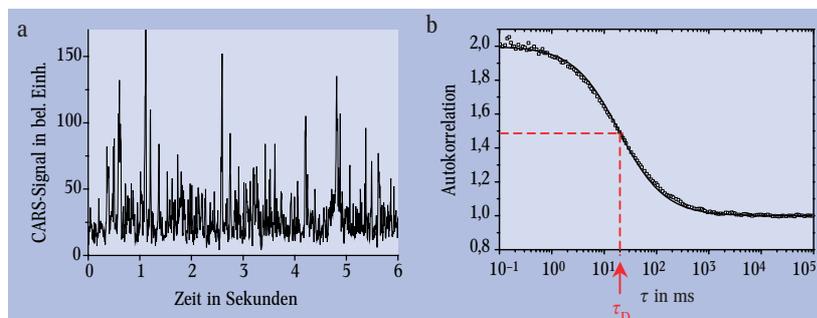
Frequenzkomponenten zuvor zeitlich gestreckt. Die Pulse sind dann chirpt, und niedrige Frequenzen folgen hohen. Ist die zeitliche Änderung der Pulsfrequenzen für Pump- und Stokes-Puls gleich, so lässt sich die gesamte Pulsenergie in ein enges Frequenzband fokussieren, da die instantane Frequenzdifferenz  $\omega_p - \omega_s$  der beiden Anregungspulse über die gesamte Pulslänge gleich bleibt („spektrale Fokussierung“). Während der Frequenzabstand und damit die abgefragte Resonanzfrequenz konstant bleiben, ändert sich die Frequenz des CARS-Signals kontinuierlich, und ein fs-CARS-Puls mit identischem und parallelem Chirp wird abgestrahlt. Die Selektion einer um  $\Delta\Omega$  verschobenen Raman-Resonanz erfolgt hier über die Einstellung einer entsprechenden Zeitverzögerung  $\Delta\tau$ , zwischen den Pump- und Stokes-Pulsen. Die verschobenen Pulse sind in beiden Methoden jeweils schraffiert dargestellt.

zur FCS beruht der größte Nachteil der CARS-CS dabei auf der geringeren Nachweisempfindlichkeit. Während mit Fluoreszenzanregung Einzelmolekülsensitivität erreicht wird, beruht CARS-CS auf der kohärenten Verstärkung von Tausenden von Raman-Moden, die erst zu einem detektierbaren Signal beitragen.

### Zukünftige Entwicklungen

In den letzten Jahren gelang es zu zeigen, dass die CARS-Mikroskopie eine hoch sensitive Methode ist, die die Abbildung molekularer Schwingungen erlaubt. Mit diesen Bildern kann eine Fülle von chemischen und physikalischen Eigenschaften innerhalb eines Probenvolumens mit der Größe eines Femtoliters dargestellt werden. Eine detailliertere Zusammenfassung der theoretischen und experimentellen Grundlagen sowie des gegenwärtigen Stands der Technik in der CARS-Mikroskopie ist in den Referenzen [8, 9] zu finden. Das sehr breite Interesse, welches die CARS-Mikroskopie gerade weckt, ist in der Möglichkeit begründet, chemische Selektivität ohne vorherige Anfärbung von Proben zu erreichen. Dabei werden wesentliche Beschränkungen vorhandener Techniken, wie die schlechte räumliche Auflösung der IR-Mikroskopie und die für die Raman-Mikroskopie nötige hohe Bestrahlungsintensität, vermieden. Daraus ergibt sich ein großes Potenzial für die Anwendung der CARS-Mikroskopie in materialwissenschaftlichen und biomedizinischen Fragestellungen. Aus physikalischer und technologischer Sicht ist die CARS-Mikroskopie wiederum hoch interessant, da sie sich in idealer Weise für die Erprobung und Anwendung neuer Phänomene in der Kohärenzspektroskopie auf einer nanoskopischen Längenskala und neuartiger kohärenter Anregungstechniken eignet. Eine solche Variante der CARS-Mikroskopie beruht auf dem Einsatz kohärenter Kontrolltechniken [10]. So lässt sich z. B. eine selektive Anregung einer bestimmten Raman-Mode über die periodische Modulation der spektralen Phase innerhalb der Bandbreite eines einzelnen Femtosekundenpulses erreichen. Solche Techniken zeigen ebenso Möglichkeiten einfacher und effizienter Anregung auf, wie sie auch neuartige Anwendungsfelder erschließen.

In der nächsten Zukunft sind für die CARS-Mikroskopie vor allem die folgenden Entwicklungen zu erwarten: Auf der apparativen Seite besteht ein Interesse daran, ein möglichst einfaches, robustes Lasersystem zur Anregung zu verwenden. Dieses soll einen breiten spektralen Bereich erschließen und zur Erhöhung der Selektivität die simultane Beobachtung mehrerer Schwingungsresonanzen erlauben. Besonders vielversprechend sind in dieser Hinsicht sowohl eine neue Generation von Pikosekundenlasern als auch die Erzeugung von kurzen Weißlichtpuls in Glasfasern. Damit eignet sich die CARS-Mikroskopie zur selektiven Darstellung bestimmter Moleküle in komplexen Proben. Auf der Anwendungsseite werden gerade erste auf biologische Probleme fokussierte Experimente durchgeführt. Besonders interessant ist hier, dass sich die CARS-Mikroskopie wegen der Möglichkeit, Infrarot-Laser zur Anregung zu verwenden, die nur schwach von Zellgewebe gestreut werden, hervorragend für Anwendungen in der Mikroskopie von Gewebeschnitten eignet. Hier öffnet sich durch die Möglichkeit, an ungefärbten, vitalen Proben Mikroskopie mit molekularer Selektivität durchführen zu können, ein breiter Horizont an bisher nicht möglichen Untersuchungen.



**Abb. 5:**

► **a)** Typische CARS-Signalfuktuationen, wie sie bei der Brownschen Diffusion kleiner Partikel, hier eine wässrige Suspension von Polystyrolkugeln (Durchmesser 110 nm) erhalten werden. Der CARS-Kontrast beruht auf den Atmungs-schwingungen der Benzolringe bei einer

Raman-Verschiebung von ca.  $999\text{ cm}^{-1}$ .  
► **b)** Die Autokorrelationskurve einer wässrigen Suspension von Polystyrolkugeln (Durchmesser 202 nm) bei einer Raman-Verschiebung von  $3050\text{ cm}^{-1}$  (C-H-Streckschwingungen), aus der eine Diffusionszeit von 20 ms ablesbar ist [7].

### Literatur

- [1] M. D. Duncan, J. Reintjes und T. J. Manuccia, *Opt. Lett.* **7**, 350 (1982)
- [2] A. Zumbusch, G. R. Holtom und X. S. Xie, *Phys. Rev. Lett.* **82**, 4142 (1999)
- [3] A. Volkmer, J.-X. Cheng und X. S. Xie, *Phys. Rev. Lett.* **87**, 023901 (2001)
- [4] J. X. Cheng, A. Volkmer, L. D. Book und X. S. Xie, *J. Phys. Chem. B* **106**, 8493 (2002)
- [5] G. W. H. Wurpel, J. M. Schins und M. Müller, *J. Phys. Chem. B* **108**, 3400 (2004)
- [6] A. Volkmer, L. D. Book und X. S. Xie, *Appl. Phys. Lett.* **80**(9), 1505 (2002)
- [7] T. Hellerer, A. Schiller, G. Jung und A. Zumbusch, *Chem. Phys. Chem.* **7**, 630 (2002)
- [8] J. X. Cheng und X. S. Xie, *J. Phys. Chem. B* **108**, 827 (2004)
- [9] A. Volkmer, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **38**, R59 (2005)
- [10] N. Dudovich, D. Oron und Y. Silberberg, *Nature* **418**(6897), 512 (2002)
- [11] J.-X. Cheng, A. Volkmer und X. S. Xie, *J. Opt. Soc. Am. B* **19**(6), 1363 (2002)
- [12] J.-X. Cheng, A. Volkmer, L. D. Book und X. S. Xie, *J. Phys. Chem. B* **105**(7), 1277 (2001)
- [13] T. Hellerer, A. M. K. Enejder und A. Zumbusch, *Appl. Phys. Lett.* **85**, 25 (2004)

### Die Autoren

**Andreas Zumbusch** beschäftigt sich mit biophysikalischen Anwendungen ultrasensitiver Spektroskopie und Mikroskopie. Er studierte an der LMU München Chemie und fertigte seine Diplomarbeit am CNRS in Bordeaux an. Nach der Promotion an der TH Karlsruhe (1996) war er als Feodor-Lynen-Stipendiat zwei Jahre am PNNL in Richland, USA. Im Jahr 2003 habilitierte er sich in Physikalischer Chemie an der LMU München. Seit 2004 ist Zumbusch Reader in Biophysics am University College London.

**Andreas Volkmer** studierte Physik an der HU Berlin und promovierte 1998 an der University of Strathclyde in Glasgow. Anschließend arbeitete er als Postdoc am MPI für Biophysikalische Chemie in Göttingen. Nach einem zweijährigen Forschungsaufenthalt an der Harvard University leitet er seit 2002 eine Emmy Noether-Forschungsgruppe am FB Physik der Uni Stuttgart. Sein wissenschaftliches Hauptinteresse gilt der nichtlinearen Mikroskopie sowie der Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie mit Anwendungen in der Biophysik.

