

Einzelne Moleküle Brennpunkt

**Bert Hecht, Beate Sick,
Urs P. Wild**

Mit Hilfe von optischen Mikroskopen können kleinste Lichtmengen bis hin zu einzelnen Lichtquanten (Photonen) ortsaufgelöst detektiert werden. Die spektrale Analyse dieses Lichts erlaubt Aussagen über die chemische Zusammensetzung der untersuchten Probe. Dabei bleibt die Probe im Normalfall unverändert. Die Einsatzmöglichkeiten der optischen Mikroskopie sind äusserst vielfältig: Besonders interessant und wichtig ist die Untersuchung biologischer Präparate in physiologischer Umgebung. Aber auch extreme Bedingungen, wie Vakuum und tiefe Temperaturen, stellen keine wesentlichen Hindernisse für optische Mikroskopie dar, was das Spektrum potentieller Anwendungen zusätzlich erweitert.

In unserer Gruppe werden moderne, räumlich hochauflösende Methoden der


optischen Mikroskopie verwendet. In Kombination mit einer hohen Lichtempfindlichkeit ist es damit möglich, einzelne, in einer Matrix eingebettete, fluoreszierende Farbstoffmoleküle aufzufinden und ihr Verhalten zu studieren. Die Detektion einzelner Moleküle stellt die ultimative Grenze chemischer Empfindlichkeit dar. Das Verständnis und die Beherrschung einer solchen Technologie sind besonders für die Biologie von grosser praktischer Bedeutung. Biologische Präparate, wie zum Beispiel Chromosomen, können mit Farbstoffmolekülen markiert werden. Dadurch lassen sich diese nicht nur im Mikroskop sichtbar

machen, auch bestimmte funktionelle Einheiten können selektiv markiert werden, um sie mit hoher räumlicher Auflösung zu lokalisieren und zuzuordnen. Ein weiterer interessanter Aspekt von hochauflösender optischer Mikroskopie mit Einzelmolekül-Sensitivität ist die Tatsache, dass Farbstoffmoleküle, die für sich betrachtet einzelne Quantensysteme darstellen, in ihrer Wechselwirkung mit der Umgebung studiert und unter Umständen gezielt beeinflusst werden können.

Farbstoffmoleküle geben sich anhand ihrer Fluoreszenz zu erkennen. Durch



Moleküle im



Bestrahlen mit Photonen geeigneter Energie wird das Farbstoffmolekül aus seinem Grundzustand in den ersten angeregten Zustand überführt. Von dort aus relaxiert es innerhalb einiger Nanosekunden unter Emission eines Photons geringerer Energie (größerer Wellenlänge). Durch geeignete optische Filter kann unerwünschtes Anregungslicht ausgeblendet werden. Die längerwellige Fluoreszenz dagegen erreicht den Detektor ungehindert.

Eine Voraussetzung, das Signal eines einzelnen Moleküls über dem Hintergrund der schwachen Signale aller anderen an-

wesenden Teilchen zu detektieren, ist es, das beobachtete Volumen, welches das Einzelmolekül enthält, weitestmöglich einzuschränken. Dazu bedarf es einer möglichst hohen räumlichen Auflösung des optischen Mikroskops.

Die räumliche Auflösung eines optischen Mikroskops ist durch Lichtbeugung an der Eintrittsöffnung des Objektivs auf etwa 250 nm begrenzt. Das entspricht etwa der Hälfte der Wellenlänge des ver-

wendeten Lichtes. Mit der Konfokalen optischen Rastermikroskopie kann diese untere Schranke erreicht, jedoch nicht unterschritten werden. Bei dieser Technik wird Licht über einen Strahlteiler durch das Mikroskopobjektiv in einen beugungsbegrenzten Brennpunkt fokussiert. Im Brennpunkt erzeugtes Streu- oder Fluoreszenzlicht der zu untersuchenden Probe wird von eben diesem Objektiv gesammelt, gefiltert und auf einen punktförmigen Detektor fokussiert. Nur Licht aus dem zentralen Bereich des Brennpunkts, dem sogenannten konfokalen Volumen, trifft den Detektor und trägt somit zum detektierten Lichtsignal

bei. Zur Bilderzeugung wird die Probe Punkt für Punkt durch das konfokale Volumen gerastert und jeweils das entsprechende Lichtsignal gespeichert. Anschliessend werden die einzelnen Bildpunkte im Computer zu einem vollständigen Bild zusammengefügt. Von genügend transparenten Proben kann so auch ein dreidimensionales Bild erstellt werden.

Um sicherzustellen, dass sich genau ein Molekül im konfokalen Volumen befindet, muss die Konzentration der detektierten Moleküle genügend klein sein. Dies kann im Experiment durch entsprechende Verdünnung der Moleküle in der Probe leicht erreicht werden. Eine wei-

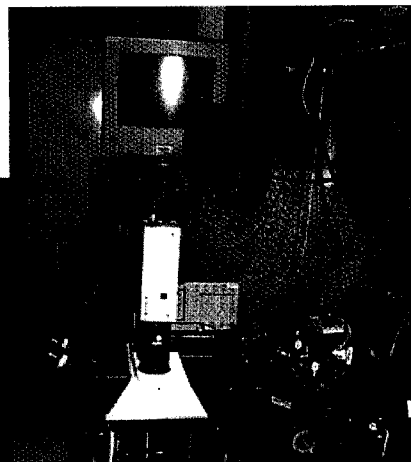
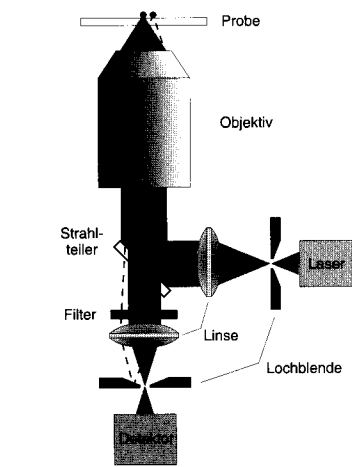
In realen Proben kann die Konzentration der Farbstoffmoleküle in der Regel nicht uneingeschränkt frei gewählt werden. Insbesondere kann die Anzahl der sich gleichzeitig im konfokalen Volumen befindlichen Moleküle sehr viel grösser sein als erwünscht. In diesem Fall bietet sich die Verwendung einer noch hochauflösenderen Methode der optischen Mikroskopie an. Das beleuchtete Volumen kann nämlich noch weiter eingeschränkt werden, indem man das Licht durch eine kleine Lochblende auf die Probe fallen lässt. Wird diese Lochblende

Ätzen oder Schmelzen und Ziehen zu einer scharfen Spitze geformt und anschliessend mit einer Aluminiumschicht verspiegelt. Dabei wird das Aluminium seitlich auf die Faserspitze aufgebracht, so dass an der Spitze durch Schattenwurf ein kleines Loch von etwa 50 nm Durchmesser entsteht. Gewöhnlich wird eine Glasfaser zur Herstellung der Spitzen verwendet. Das hat den Vorteil, dass Licht, welches einmal in die Faser eingekoppelt wurde, automatisch zur Lochblende an der Spitze geleitet wird.

Mit dem Vorteil einer gesteigerten Auflösung handelt man sich jedoch auch eine technische Schwierigkeit ein. Der Abstand zwischen Lochblende und Probe muss wesentlich kleiner sein als der Lochblendendurchmesser, da die Blendenwirkung durch Lichtbeugung schon nach Bruchteilen der Wellenlänge (~10 nm) wieder verloren geht. Diese Tatsache hat der Methode den Namen Nahfeldoptische Rastermikroskopie eingebracht. Die Abstandsregulierung zwischen Lochblende und Probenoberfläche erfordert einen nicht unerheblichen technischen Aufwand. Hieran scheiterte auch E. H. Syngé, der dieses Verfahren der Rastermikroskopie bereits 1928 vorschlug. Erst 1984, nach einer unabhängigen Wiedererfindung im IBM-Forschungslabor in Zürich, gelang seine Umsetzung. Nach der Entwicklung des Rastertunnelmikroskops war es dort erstmals möglich, Bewegungen von feinen Spitzen über Oberflächen mittels piezoelektrischer Stillelemente im Nanometer-Bereich zu kontrollieren.

Um also beim Abrastern des abzubildenden Bereichs die Auflösung konstant zu halten, muss auch der winzige Abstand zwischen Spitze und Probe konstant bleiben. Man verwendet dazu heute beinahe ausschliesslich die Methode der Scherkraftdetektion. Dabei wird die Spitze in Vibration versetzt und die Dämpfung der Vibrationsamplitude als Funktion des Abstandes beobachtet. Es zeigt sich, dass die Vibrationsamplitude (~1 nm) über eine Distanz von wenigen Nanometern bei der Annäherung von Spitze und Probe kontinuierlich kleiner wird und schliesslich verschwindet. Dieses stark abstandsabhängige Signal kann nun in einem Rückkopplungskreis dazu ver-

Abb. 2: Prinzip des Konfokalen Rastermikroskops: Laserlicht wird über einen dichroischen Strahlteiler durch das Objektiv auf die Probe fokussiert. Im Brennpunkt erzeugtes Fluoreszenzlicht der Probe wird von eben diesem Objektiv gesammelt, gefiltert und auf einen punktförmigen Detektor fokussiert. Nur Licht aus dem zentralen Bereich des Brennpunkts, dem sogenannten konfokalen Volumen, trifft den Detektor und trägt somit zum detektierten Lichtsignal bei. Zur Bilderzeugung wird die Probe Punkt für Punkt durch das konfokale Volumen gerastert und jeweils das entsprechende Lichtsignal gespeichert.



Eindrücke aus dem Labor.

tere Vorbedingung stellt die ausreichende Photostabilität der untersuchten Moleküle dar. Unvermeidliche Verluste in der Detektionsoptik führen dazu, dass nur etwa 1 von 100 Photonen den Detektor wirklich erreichen. Um das Molekül nachweisen zu können, muss daher eine genügend grosse Anzahl von Fluoreszenzphotonen emittiert werden, bevor das Molekül photoinduziert zerfällt oder aus anderen Gründen nicht mehr fluoresziert.

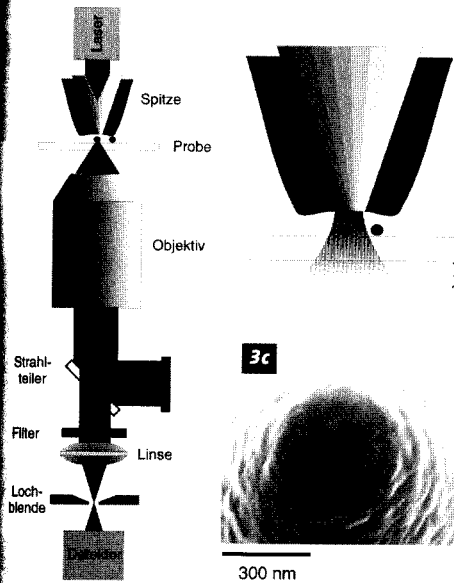
nun ähnlich wie zuvor das konfokale Volumen über die Probe gerastert, erhält man ein optisches Bild, dessen Auflösung nicht mehr durch Beugung begrenzt, sondern durch die Grösse der Lochblende gegeben ist. Insbesondere kann die Lochblende – und mit ihr auch das durch sie definierte Volumen – nur einen Durchmesser von wenigen 10 nm haben und damit sehr viel kleiner als die Wellenlänge des Anregungslichtes sein.

Die technische Herstellung der nanoskopischen Lochblende beruht auf folgendem Prinzip: Eine Glasfaser wird durch

3a

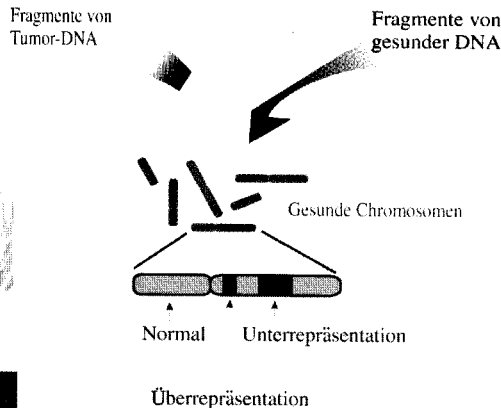
3b

Abb. 3: (a) Prinzip des Nahfeldoptischen Rastermikroskops: Die Probe wird sehr lokal durch eine Lochblende an der Spitze einer Glasfaser beleuchtet. Fluoreszenzlicht wird von einem Objektiv gesammelt, gefiltert und auf einen punktförmigen Detektor fokussiert. Zur Bilderzeugung wird die Probe Punkt für Punkt unter der Spitze gerastert, wobei der Abstand zwischen Spitze und Probe konstantgehalten wird. Das entsprechende Lichtsignal an jedem Rasterpunkt wird gespeichert.



(b) Das Licht ist nach der Lochblende nur innerhalb eines Abstandes von etwa 10 nm noch auf den Blendendurchmesser konzentriert. (c) Elektronenmikroskopische Abbildung der Lochblende an einer Glasfaser Spitze.

Abb. 4: Anwendungsbeispiel DNA-Analyse



wendet werden, beim Abrastern einer Kontur konstanter Scherkräftdämpfung zu folgen. Auf diese Weise wird nicht nur ein hochaufgelöstes optisches Bild der Probenoberfläche gewonnen, sondern zusätzlich auch die Topographie der Probe ermittelt.

Da das Licht nach der Lochblende nur innerhalb eines Abstandes von etwa 10 nm noch auf den Blendendurchmesser konzentriert ist, eignet sich die optische Nahfeldmikroskopie vor allem zur hochaufgelösten optischen und topographischen Abbildung von Oberflächen. In diesem Sinne ist sie komplementär zur konfokalen Mikroskopie einsetzbar, die bei transparenten Proben auch eine dreidimensionale Abbildung erlaubt.

Mit der Kombination von Einzelmoleküldetektion und hochauflösender optischer Mikroskopie hat man ein Werkzeug in der Hand, in dem noch ungeahntes Potential steckt. Unser Hauptinteresse wird sich in Zukunft vor allem auf die Anwendung der oben beschriebenen Methoden auf biologische Fragestellungen und grundlegende Aspekte der Untersuchung einzelner Moleküle richten. Dabei

wird auch der Weiterentwicklung von hochauflösenden lichtmikroskopischen Methoden eine gewichtige Rolle zukommen. Ein Beispiel aus der aktuellen Forschungstätigkeit kann dies illustrieren. Es ist bekannt, dass die Entwicklung von Tumoren häufig durch Über- und Unterrepräsentationen von DNA-Abschnitten verursacht wird. Die Position und Ausprägung solcher Störungen auf den Chromosomen werden mit Hilfe der sogenannten komparativen Genomhybridisierung (comparative genomic hybridization, CGH) charakterisiert. Bei diesem Verfahren erhitzt man eine Mischung kurzer DNA-Fragmente, die zum Teil aus gesunden Zellen (markiert mit roten Farbstoffmolekülen) und zum Teil aus Tumorzellen (markiert mit grünen Farbstoffmolekülen) gewonnen werden, zusammen mit gesunden intakten Chromosomen. Dabei trennen sich die Doppelstränge der DNA. Beim anschliessenden Abkühlen lagern sich passende Einzelstränge statistisch wieder zu einem Doppelstrang zusammen (Hybridisierung). Wenn nun im Tumorgenom ein bestimmter DNA-Abschnitt stark überrepräsentiert ist, werden sich wesentlich mehr Tumor-DNA-Fragmente an den entsprechenden Abschnitt der intakten Chromosomen anlagern als Fragmente aus gesunden Zellen. Eine Überbeziehungsweise Unterrepräsentation von

Tumor-DNA-Fragmenten (grün) im Vergleich zu DNA-Fragmenten des gesunden Genoms (rot) an den entsprechenden Positionen des intakten Chromosoms lässt sich an einer Abweichung des Grün-Rot-Verhältnisses vom Wert 1 ablesen. Die Position dieser Rot-Grün-Abweichungen lässt sich als Überbeziehungsweise Unterrepräsentation des betreffenden DNA-Abschnittes an der entsprechenden Position im Tumorgenom interpretieren.

Um Tumore gut klassifizieren zu können, ist es sehr wichtig, die Ausdehnung und die Position dieser Störungen genau bestimmen zu können. Das gleiche gilt, wenn aufgrund der Ergebnisse der CGH die gestörten DNA-Abschnitte weiter untersucht werden sollen. Die Anwendung unseres Nahfeld-Mikroskopiesystems auf Proben des Pathologischen Instituts der Universität Basel soll es hierbei ermöglichen, die optische Auflösung bei der Detektion dieser Störungen von den heute üblichen zirka 1 µm auf unter 100 nm zu verbessern. Die Verwendung angepasster Präparationstechniken könnte es uns in Zukunft sogar erlauben, einzelne Markermoleküle auf DNA-Strängen mit hoher optischer Auflösung zu detektieren.



Laboratorium für
Physikalische Chemie der ETH Zürich



Laboratorium für
Physikalische Chemie der ETH Zürich



Professor am Institut
für Physikalische Chemie der ETH Zürich