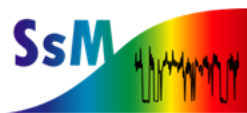
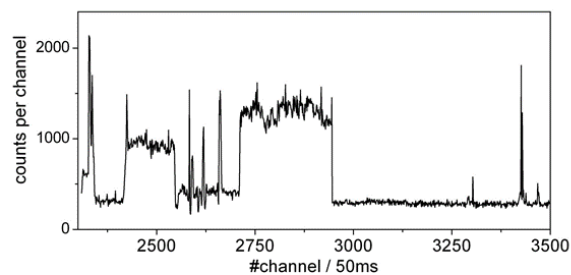
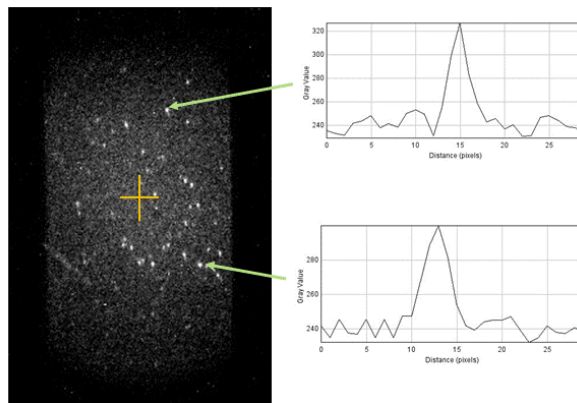


Einzelmolekülspektroskopie



Lehrstuhl für
Spektroskopie Weicher Materie
Prof. J. Köhler

Dr. U. Gerken

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
2	Experimenteller Aufbau und Messmethode	2
2.1	Konfokaler Aufbau	2
2.2	CCD-Kamera	3
2.3	Fokussieren der Probe	3
2.4	Aufnahme von Bildern	4
2.5	Aufnahme von Spektren	4
2.6	Untergrundkorrektur	4
2.7	Bildverarbeitung	4
3	Versuchsdurchführung und Auswertung	5
3.1	Allgemeine Hinweise	5
3.2	Kalibration des Spektrographen	5
3.3	Bestimmung der Vergrößerung	6
3.4	Einzelmolekülspektroskopie	6
3.5	Hinweise zur Auswertung	10
4	Fragen zur Vorbereitung	11
5	Literatur	12
A		13
A.1	Spektren	13
A.2	ImageJ	14

1 Einführung

Die Einzelmolekülspektroskopie ist ein relativ junger Zweig der optischen Spektroskopie, so gelang erstmals 1989 der optische Nachweis einzelner Perylen-Moleküle [W.E. Moerner L. Kador, Phys. Rev. Letters (62), 2535, (1989)]. Dieses Gebiet hat sich seitdem rasant entwickelt und es werden immer neue Anwendungsbereiche in den Bereichen Physik, Biologie, Chemie, Informationstechnik usw. gefunden. Spektroskopie an einzelnen Molekülen erlaubt die Bestimmung molekularer Parameter, die in Ensemblemessungen und dem damit verbundenen Mittelungsprozess verborgen bleiben. Zu diesen Parametern gehören u.a. die natürliche Linienbreite eines Übergangs, die Polarisation des emittierten Lichtes und der Ort eines Chromophors. Ebenfalls lassen sich Quanteneffekte wie Photonbunching und -antibunching nur an Einzelmolekülproben nachweisen. Durch einzelne Farbstoff-markierte Proteine bzw. Biomoleküle kann man z.B. Diffusions- und Transportprozesse innerhalb von lebenden Zellen gezielt verfolgen.

Die besondere experimentelle Herausforderung in der Einzelmolekülspektroskopie besteht darin, die (geringe) Fluoreszenz des zu untersuchenden einzelnen Chromophors zu detektieren. Weiterhin ist dieses Signal von der Fluoreszenz anderer Chromophoren, von der Fluoreszenz der umgebenden Matrix sowie von gestreutem Anregungslicht zu trennen. Dies geschieht durch den Einsatz Einzelphotonen-empfindlicher Detektoren wie der Avalanche Photodiode (APD) in Verbindung mit konfokaler Mikroskopie und dem Einsatz optischer Filter. Moderne CCD- oder CMOS-Kameras erlauben heutzutage auch Weitfeld-Aufnahmen mit Einzelphotonenempfindlichkeit. Weiterhin müssen die Chromophore in sauberen Umgebungen (Lösemittel oder feste Matrices) so stark vereinzelt, d.h. verdünnt ($\sim 1 \times 10^{-9}$ M), vorliegen, dass sie mit optischen Methoden räumlich getrennt dargestellt werden können. Der Einsatz optischer Bandpassfilter, die das Anregungslicht mit einer optischen Dichten von ≥ 6 nahezu komplett unterdrücken, aber im Bereich der Fluoreszenz vollständig transparent sind, ermöglicht ein hohes Signal-zu-Rausch Verhältnis.

Ziel des Praktikums ist es, grundlegende Prinzipien und Techniken der Einzelmolekülspektroskopie anzuwenden und zu verstehen. Als Chromophor wird Perylenbisimid (PBI) verwendet, welches in eine Polystyrol (PS) Matrix eingebettet wird. PBI eignet sich wegen seiner großen Quantenausbeute von $\simeq 1$ und hoher Extinktion gut für Einzelmolekülexperimente.

2 Experimenteller Aufbau und Messmethode

2.1 Konfokaler Aufbau

Immersionsobjektiv

Imaging Spectrograph

CCD

Der Versuchsaufbau ist schematisch in Abb. 2.1 dargestellt. Die Probe wird mit der 510 nm Linie eines Diodenlasers angeregt. Die Anregungsleistung kann dabei mit dem Graufilterrad vor dem Faserkoppler stufenlos variiert werden. Das Anregungslicht wird über einen dichroitischen Spiegel in das Mikroskopobjektiv (Olympus 100× NA 1,3, Ölimmersion) mit hoher numerische Apertur gelenkt. Ein Clean-up Filter im Strahlengang unterdrückt unerwünschte Emission des Diodenlasers sowie Fluoreszenz der Glasfaser. Das Fluoreszenzlicht der angeregten Probe passiert den Dichroit und gelangt entweder zum Photonendetektor (APD, Avalanche Photodiode) oder über den Klappspiegel zum Gitterpektrograph (Acton SP-150). Der Spektrograph besitzt als Detektor eine hoch empfindliche CCD-Kamera (pco.pixelfly usb). Ein Bandpassfilter (Bandkante bei 516 nm) vor dem Klappspiegel sorgt dafür, dass nur die zu untersuchende Fluoreszenz und nicht die „Reste“ des Anregungslichtes zu den Detektoren gelangt. Die Probe ist auf einem motorisierten x/y-Verschiebetisch befestigt, der es ermöglicht, die Probe mit hoher Genauigkeit ($\simeq 0.1 \mu\text{m}$) zu positionieren.

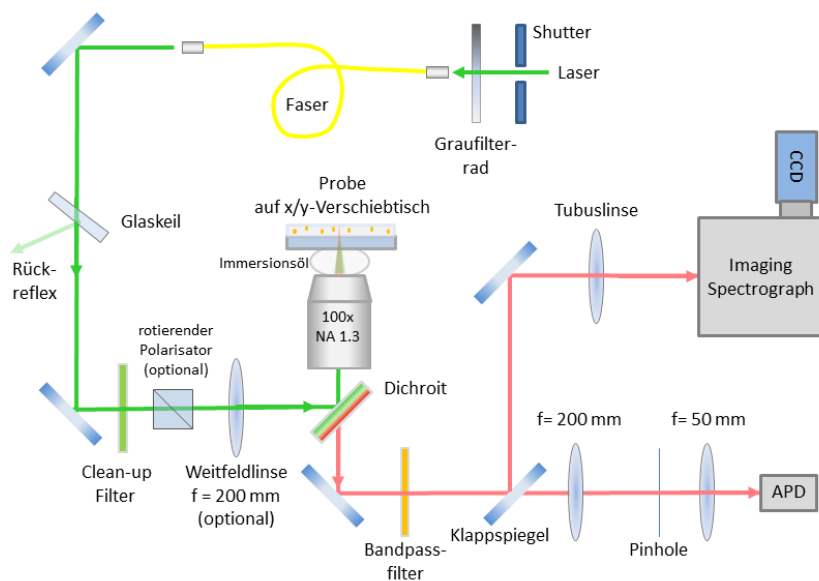


Abbildung 2.1: Versuchsaufbau zur Einzelmoleküldetektion. Der Detektionsarm mit dem Pinhole und der Avalanche Photodiode (APD) als Detektor wird zur Zeit nicht für den Versuch verwendet.

Im Spektrographen befindet sich ein Gitterturm mit dem wahlweise ein Gitter mit 150 Linien/mm oder ein Spiegel in den Strahlengang eingefügt werden kann. Durch Benutzung des Gitters ist es möglich, ein Weitfeldbild der Probe aufzunehmen.

Zur Bestimmung der Anregungsleistung kann vor der Weitfeldlinse der Messkopf eines Powermeters (nicht eingezeichnet) in den Strahlengang eingesetzt werden. Ein rotierender Polarisator kann ebenfalls in den Strahlengang eingebaut werden.

Die Polarisation kann durch einen Faserpolarisator (KS Photonics STCP-45, nicht eingezeichnet) beliebig verändert werden. Für diesen Versuch wird das Licht des Lasers zirkular polarisiert.

2.2 CCD-Kamera

2×2 Binning

Eine Einzelphotonen-empfindliche CCD Kamera (pco.pixelfly usb) wird in diesem Versuch als Detektor am Spektrographen verwendet. Zur Verbesserung des S/N-Verhältnisses wird ein 2×2-Binning der Pixel verwendet. Für die Bildaufnahmezeit hat sich ein Wert von 500 ms als geeignet herausgestellt.

Im Experiment nehmen Sie statt eines einzelnen Bildes eine Bildsequenz von mehreren Bildern hintereinander auf. Dies ermöglicht, speziell bei der Aufnahme von Einzelmolekülspektren, eine Mittlung der Bilder und führt zu einer Verbesserung des S/N-Verhältnisses. Die Sequenzen lassen sich im Steuerprogramm der CCD unter

- File → Save Raw Recorder Sequence

als tiff-Dateien (16 bit) abspeichern.

Für die Auswertung werden folgende Angaben zur CCD-Kamera benötigt:

- Pixelanzahl CCD: 1392×1040 Pixel (Breite×Höhe)
- Größe eines Pixel: $6,45 \times 6,45 \mu\text{m}^2$

Beachten Sie das 2×2-Binning!

2.3 Fokussieren der Probe

Rückreflex

Nach dem Auflegen eines Deckglases muss dieses in die Fokalebene des Objektivs gefahren werden. Der Abstand der Deckglasoberfläche zum Fokus kann dabei mit einfachen Mitteln kontrolliert werden. Entfernen Sie dazu die Weitfeldlinse aus dem Strahlengang, öffnen Sie den Shutter und stellen Sie eine Anregungsleistung von etwa 100 μW ein. Nähern Sie die Probe vorsichtig dem Objektiv und beobachten Sie dabei das am Glaskeil rückreflektierte Anregungslicht (s. Abb. 2.1) mit Hilfe eines Stück weißen Papiers. Die Probe befindet sich dann im Fokus, wenn der Reflex eine Durchmesser von ungefähr 5 mm hat.

Im Allgemeinen ist danach die Probe im Bereich des Fokus, so dass nur noch leichte Korrekturen mit dem Stellrad an der Höhenverstellung vorzunehmen sind, um ein scharfes Bild zu erhalten.

2.4 Aufnahme von Bildern

Im Weitfeldmodus, ähnlich einem konventionellen Lichtmikroskop, wird die Probe großflächig angeregt und man erhält ein Fluoreszenzbild der Probe. Dazu muß die Weitfeldlinse sich im Strahlengang befinden und der Spektrograph mit dem Spiegel betrieben werden. Die Bildaufnahme erfolgt durch den weit geöffneten Spalt (Stellschraube im Uhrzeigersinn drehen) des Spektrographen mit der CCD-Kamera.

2.5 Aufnahme von Spektren

Soll der Aufbau als (konfokales) Spektrometer benutzt werden, muß die Weitfeldlinse aus den Strahlengang entfernt und der Spektrograph mit dem Gitter betrieben werden. So wird nur ein durch den Fokus des Objektivs definierter Punkt der Probe angeregt und man erhält das Fluoreszenzsignal aus diesem räumlich eng begrenzten Bereich. Die Aufnahme der Spektren erfolgt auch hier durch den weit geöffneten Spalt des Spektrographen mit der CCD-Kamera.

2.6 Untergrundkorrektur

Bei Messungen von Einzelmolekülfluoreszenz mit einer CCD-Kamera machen sich selbst schwache Hintergrundsignale wie das Ausleserauschen, Hot-Pixel sowie Verunreinigungen der Einbettungsmatrix störend bemerkbar. Von allen aufgenommenen Spektren und Weitfeldbildern muß daher der Untergrund abgezogen werden. **Weitfeldaufnahmen:** Bei geschlossenem Shutter wird eine Bildsequenz des Untergrundes aufgenommen und diese von der Weitfeldaufnahme subtrahiert.

Spektren: Bei geöffnetem Shutter wird eine Bildsequenz an einem Ort knapp neben dem Molekül aufgenommen, an dem kein Spektrum sichtbar meßbar ist. Diese Sequenz wird dann von dem Spektrum subtrahiert.

2.7 Bildverarbeitung

ImageJ

Die Verarbeitung und Analyse der Aufnahmen wird dem Freewareprogramm *ImageJ* durchgeführt. ImageJ ermöglicht u.a. die Mittelung von Bildsequenzen und die Addition und Subtraktion von Bildern. Laden Sie sich vor Beginn des Praktikums das Programm bei <https://imagej.nih.gov/ij/index.html> herunter und installieren Sie es. Eine kurze Einführung in die für die Auswertung wichtigsten Befehle finden Sie im Anhang A.2.

3 Versuchsdurchführung und Auswertung

3.1 Allgemeine Hinweise



Der für die Messungen verwendete Laser ist ein Laser Klasse 3. Diese Laser gelten als nicht augensicher. Schauen Sie daher niemals in den Strahl und vermeiden Sie Reflexe auf Augenhöhe.

Für die Präparation der PBI Einzelmolekülproben wird Toluol als Lösemittel verwendet. Toluol ist gesundheitsschädigend und kann über die Haut und Inhalation aufgenommen werden. Tragen Sie beim Präparieren Handschuhe und Schutzbrille.

Während den Einzelmolekül-Messungen muß die Probentisch mit der schwarzen Lichtschutzkappe abgedeckt und die Deckenlampe ausgeschaltet sein. Ansonsten erhält man einen erhöhten Untergrund und somit ein schlechtes S/N-Verhältnis.

Aus Sicherheitsgründen und zur Vermeidung des Photobleichens der Probe, ist der Shutter beim Wechseln der Probe und der Weitfeldlinse sowie wenn nicht gemessen wird zu schließen.

3.2 Kalibration des Spektrographen

Für die Wellenlängenkalibration des Spektrographen benutzen Sie das Licht der Deckenlampe. Klappen Sie dem Umlenkspiegel in den Strahlengang und entfernen Sie die Lichtschutzkappe des Objektisches.

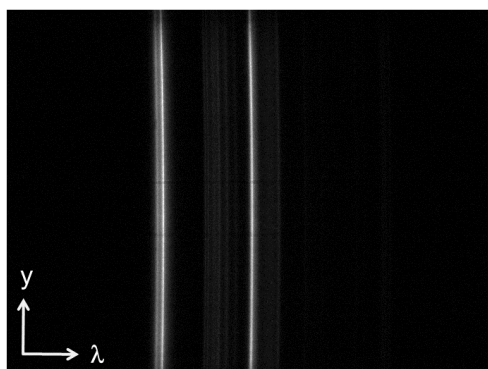


Abbildung 3.1: Spektrum der Deckenlampe. Untergrund-korrigiertes Bild auf dem CCD-Chip (2×2 -binning).

Machen Sie folgende Einstellungen am Spektrographen:

- Grating: Tur: 1 2 , 150 g/mm, Blz=500 nm
- Wavelength: 600 nm

Regeln Sie die Spaltbreite so ein, dass Sie bei einer Belichtungszeit von 500 ms die in Abb. 3.1 dargestellten Linien erkennen können. Nehmen Sie von dem Spektrum eine Bildsequenz von 5 Bildern auf sowie eine Sequenz des Untergrunds.

1. Erstellen Sie ein Spektrum wie in Abb. A.1.
2. Tragen Sie die Linienpositionen gegen die Pixel-Nummer auf und stellen Sie ein (Geraden-) Gleichung auf zur Ermittlung der Wellenlängen.

3.3 Bestimmung der Vergrößerung

Befestigen Sie ein sauberes Deckglas auf dem Objektisch des Mikroskop-Aufbaus und pipettieren Sie 2 μ L einer mit Ethanol verdünnten FluoSpheres[®]-Lösung in die Mitte des Deckglases. FluoSpheres[®] sind mit Farbstoff gefüllte Latex-Kugeln. Die in diesem versuch verwendeten Kugeln haben einen Durchmesser von 300 nm. Machen Sie im Weitfeldmodus eine Aufnahme der Probe. Stellen am Spektrographen folgende Werte ein:

- Grating: Tur:1 1 , 1200 g/mm, Blz=Mirror
- Wavelength: 0 nm

und stellen Sie eine Anrgungsleistung von ungefähr 3 μ W ein. Fokussieren Sie auf das Deckglas.

Verfahren Sie die Probe mit dem motorisierten Verschiebetisch 4-5 mal in 2,5 μ m Schritten in x-Richtung und nehmen Sie eine Bildsequenz auf.

- Bestimmen Sie aus der Verschiebung eines Beads die Vergrößerung des Weitfeldaufbaus.
- Bestimmen Sie aus dem Fluoreszenzprofil und der Vergrößerung von 10 FluoSpheres[®] Beads die Breite (FWHM) der Point-Spread-Function und vergleichen Sie diesen mit dem theoretischen Wert

$$\text{FWHM} = 0,51 \times \frac{\lambda_{\text{em}}}{\text{NA}}$$

Dabei ist λ_{em} die Emissionswellenlänge (hier: $\lambda_{\text{em}} = 550$ nm und $\text{NA} = 1,3$).

3.4 Einzelmolekülspektroskopie

Probenpräparation: Stellen Sie 100 μ L einer 0.1 nM PBI-Lösung durch Verdünnen einer 1 nM Stammlösung (PBI in Toluol)



her. Benutzen Sie zum Verdünnen eine Polystyrol (PS)-Lösung (2.5 mg mL^{-1} in Toluol). Anschließend werden $25 \mu\text{L}$ der 0.1 nM Lösung mit dem Spin Coater auf ein vorher gesäubertes Mikroskopdeckglas aufgebracht. Die einzelnen Arbeitsschritte werden vom Versuchsbetreuer erklärt und begleitet.

Legen Sie das beschichtete Deckglas dann mit der Probe nach oben auf den Probentisch und befestigen Sie es.

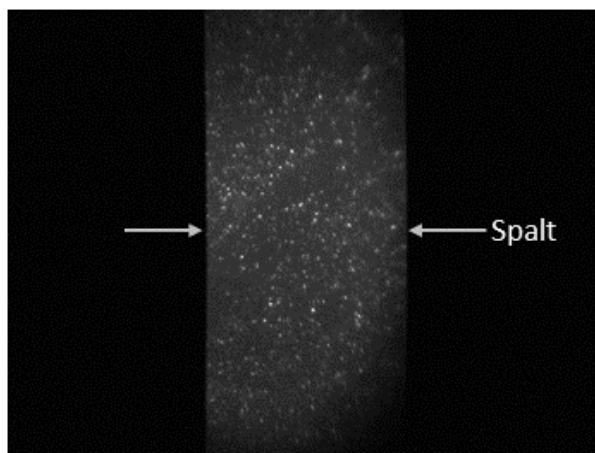


Abbildung 3.2: Weitfeldaufnahme (2×2 -binning) einer PBI-Probe (0.12 nM) in Polystyrol-Matrix. Die Aufnahme ist Untergrundkorrigiert.

Weitfeld-Bild: Für eine Weitfeldaufnahme klappen Sie die Weitfeldlinse in den Strahlengang wählen und eine Anregungsleistung von etwa 0.8 mW . Öffnen Sie den Spalt am Spektrographen so weit wie möglich. Stellen am Spektrographen folgende Werte ein:

- Grating: Tur:1 1 , 1200 g/mm , Blz=Mirror
- Wavelength: 0 nm

Fokussieren Sie bis ein Bild ähnlich wie Abb. 3.2 erhalten und nehmen Sie eine Bildsequenz von 100 Bildern auf. Nehmen Sie ebenfalls den Untergrund auf. Können Sie auf der Probe Effekte wie Blinken und Photobleichen der Moleküle beobachten?

1. Versuchen Sie, das Blinken und Photobleichen einzelner Moleküle aus der aufgenommenen Bildsequenz mittels ImageJ (*Orthogonal Views*) darzustellen.

Das typische Blinking einzelner PBI-Moleküle ist in Abb. 3.3 dargestellt.

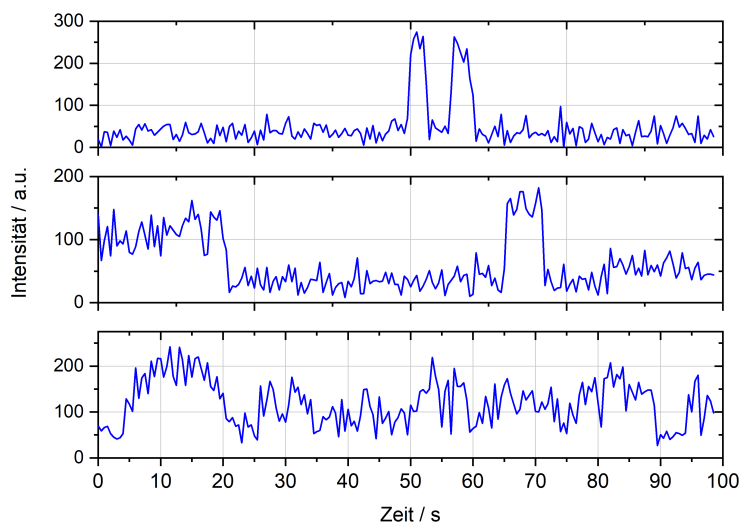


Abbildung 3.3: Typisches Blinking drei einzelner PBI-Moleküle. Die einzelnen Abbildungen wurden aus 200 Bildern mit einer Belichtungszeit von 0.5 s erstellt. Der Untergrund liegt bei 30–50 Einheiten.

Polarisation der Fluoreszenz: Klappen Sie jetzt den Polarisator in den Strahlengang und starten sie den Motor. Der Polarisator sollte sich jetzt mit einer Frequenz von ungefähr $f = 0.15 \text{ s}^{-1}$ drehen. Die Probe wird jetzt linear angeregt, wobei die Anregungsrichtung mit der selben Frequenz wie der Polarisator rotiert. Nehmen Sie eine Bildsequenz von 100 Bildern auf, und nehmen Sie ebenfalls den Untergrund auf.

1. Stellen Sie die modulierte Fluoreszenz einzelner PBI-Moleküle aus der aufgenommenen Bildsequenz mittels ImageJ (*Orthogonal Views*) dar. Eine mögliche Darstellung eines Ergebnisses ist in Abb.3.4 gezeigt.
2. Bestimmen Sie die Periodenlänge der Modulation, und vergleichen Sie diese mit der Rotationsfrequenz des Polarisators.

Spektren: Für die Aufnahme der Spektren entfernen Sie die Weitfeldlinse aus dem Strahlengang und reduzieren die Laserleistung auf etwa 50 μW . Stellen am Spektrographen folgende Werte ein:

- Grating: Tur: 1 2 , 150 g/mm, Blz=500 nm
- Wavelength: 600 nm

Fahren Sie mit dem Verschiebetisch 15-20 verschiedene PBI-Moleküle an und nehmen Sie deren Spektren auf. Lassen sie Aufnahme so lange laufen, bis das Molekül „aus“ ist. Nehmen Sie ebenfalls den Untergrund auf. Ein Spektrum eines einzelnen PBI-Moleküls ist in Abb. 3.5 dargestellt.

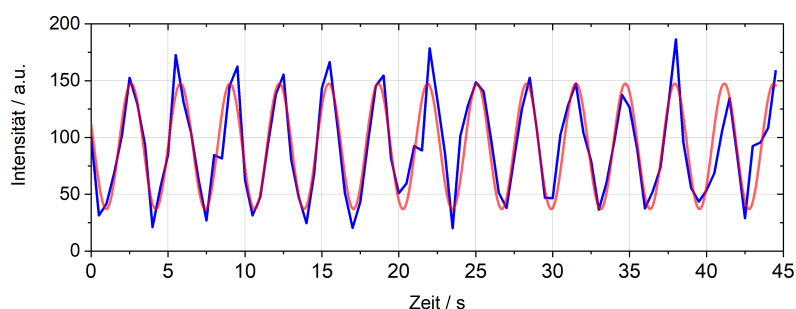


Abbildung 3.4: Modulierte Fluoreszenz (blau) eines einzelnen PBI Moleküls durch rotierende Polarisation des Anregungslichts. Die Abbildung wurde erstellt aus 89 Bildern mit einer Belichtungszeit von 0.5 s. Der Untergrund (nicht dargestellt) liegt bei $\simeq 26$ Einheiten. Ein Fit mit einer Kosinus-Funktion (rot) ergibt eine Periodenlänge von 3.1 s.

1. Bestimmen Sie aus den Spektren die Wellenlängen der Übergänge $0^* \rightarrow 0$, $0^* \rightarrow 1$ und (soweit erkennbar) $0^* \rightarrow 2$ und erstellen Sie ein Histogramm. Die Zuordnung der Übergänge entnehmen Sie aus Abb. A.2.
2. Geben Sie die Energiedifferenz der Zustände $0 - 1$ und $1 - 2$ in Wellenzahlen (cm^{-1}) an.
3. Vergleichen Sie das Ensemblespektrum mit den Einzelmolekülspektren und dem Histogramm der Übergänge.

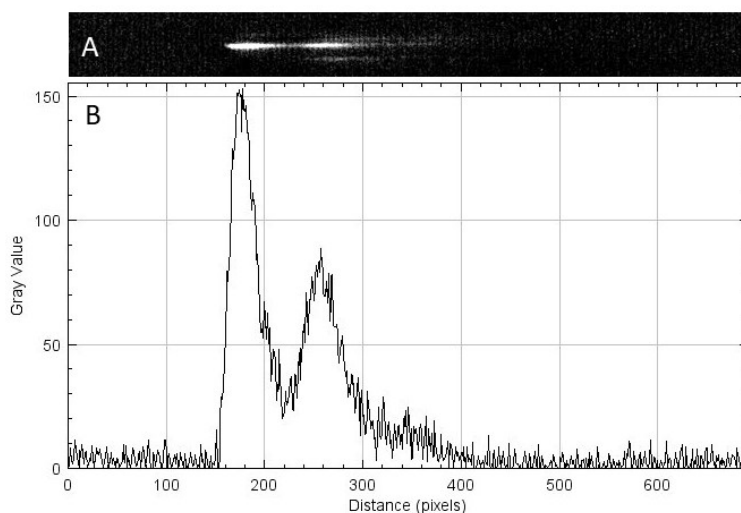


Abbildung 3.5: Spektrum eines einzelnen PBI-Moleküls. (A) Spektrum auf CCD-Chip (Ausschnitt) und (B) mit ImageJ erzeugtes Profil des CCD-Bildes (2×2 -binning). Das Spektrum wurde über 15 Bilder gemittelt und Untergrund-korrigiert.

3.5 Hinweise zur Auswertung

Ihre Messungen bestehen aus Sequenzen von einzelnen Bildern (Spektren oder Weitfeldaufnahmen der Probe). Um aus solch einer Sequenz ein mittels *ImageJ* (s. Anhang A.2) gemitteltes und Untergrund-korrigiertes Bild zu erhalten, gehen Sie wie folgt vor:

- Öffnen der Sequenz der Messung und die des dazugehörigen Untergrundes
- Mitteln der beide Sequenzen.
- Subtraktion des gemittelten Untergrundes von der gemittelten Messung
- Abspeichern des Ergebnisses

Das so erhaltene gemittelte und korrigierte Bild kann dann, z.B. mit dem *Rectangle Tool*, weiter ausgewertet werden,

4 Fragen zur Vorbereitung

1. Was versteht man unter Fluoreszenz? Was ist der Unterschied zwischen den Spektren von Atomen und Molekülen?
2. Erläutern Sie das Franck-Condon Prinzip.
3. Was versteht man unter Quantenausbeute?
4. Was unterscheidet das Fluoreszenzsignal eines einzelnen Moleküls von dem eines Ensembles?
5. Was sind die Vor- und Nachteile der Einzelmolekülspektroskopie?
6. Erklären Sie den Aufbau eines konfokalen Mikroskops. Welche Aufgabe hat das Pinhole?
7. Was bestimmt das Auflösungsvermögen eines Mikroskops?
8. Was ist eine point-spread-function (PSF)?
9. Welche Bedeutung hat die numerische Apertur NA?
10. Die CCD-Kamera wird mit einem 2×2 -Binning betrieben. Welchen Vorteil bietet das Binning für das Experiment?

5 Literatur

1. Grundlagen Spektroskopie

J.R. Lakowicz: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Kapitel 23, 757-795; Springer Verlag (2006)

B.H. Bransden & C.J. Joachain: *Physics of Atoms and Molecules*; Longman Publishing Group (1983)

J.B. Pawley Hrsg.: *Handbook of Biological Confocal Microscopy*; Springer (2006)

W.W. Parson: *Modern Optical Spectroscopy*; Springer (2009)

2. Einzelmolekülspektroskopie

W.E. Moerner, Y. Shechtman u. Q. Wang: *Single-Molecule Spectroscopy and Imaging Over the Decades*; Faraday Discuss., 184, 9–36 (2015) doi:10.1039/c5fd00149h

S. Adhikari u. Michel Orrit: *Progress and Perspective in Single-Molecule Optical Spectroscopy*; J. Chem. Phys., 150 (16) (2022) doi: 10.1063/5.0087003

Anhang A

A.1 Spektren

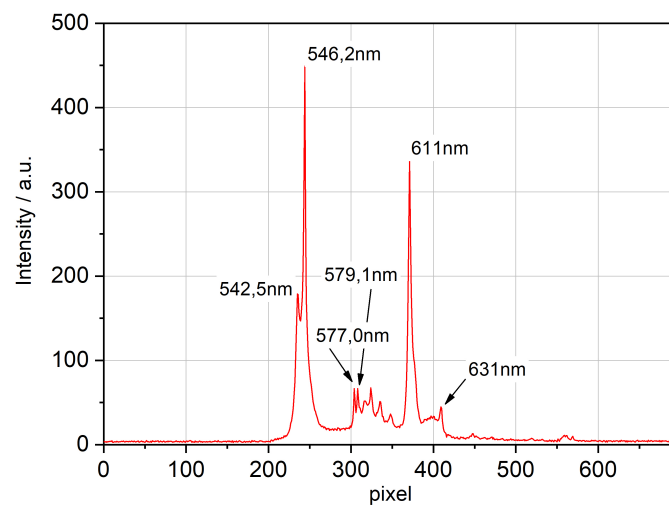


Abbildung A.1: Spektrum der Deckenlampe (Leuchtstoffröhre). Die Linien bei 611 und 631 nm sind Emissionslinien des Leuchtstoffes (Eu³⁺), alle anderen sind Quecksilber-Linien.

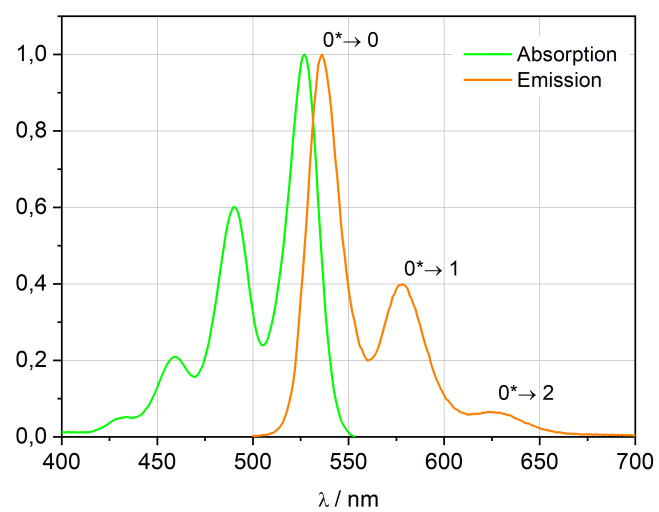


Abbildung A.2: Normiertes Absorptions- und Emissionsspektrum von PBI in Toluol.

A.2 ImageJ

Öffnen einer Datei:

- File → Open → Datei auswählen (Strg+O)

Ein *Drag & Drop* der Datei ist auch möglich.

Einstellen des Kontrastes & Helligkeit:

- Image → Adjust → Brightness/Contrast (Strg+Umschalt+C)

Mittelung:

- Image → Stacks → Z Project

Wählen Sie dann *Average Intensity*. Für die Mittelung muß ein *Stack*, d.h. eine Bildsequenz geöffnet sein.

Orthogonaler Schnitt: Um den zeitlichen Verlauf eines Signals bzw. einer Bildsequenz entlang eines Schnittes durch den Stack darzustellen, wählen Sie

- Image → Stacks → Orthogonal Views (Strg+Umschalt+H)

Subtraktion des Hintergrundes:

- Process → Image Calculator

Im dem sich öffnenden Fenster wählen Sie dann die beiden Bilder und die Operation *Subtract* aus. Es ist auch möglich, von einer Bildsequenz ein einzelnes Bild zu subtrahieren.

Recangle Tool: Nutzen Sie das Rectangle-Werkzeug, um einen Bereich aus einem Bild oder Film einzugrenzen. Zur Erzeugung eines Intensitätsprofils wählen Sie dann

- Analyze → Plot Profile (Strg+K)

Das so erzeugte Profil ist die Summe aller Zeilen im gewählten Bereich. Durch

- Data → Save Data

(im Plot-Fenster) läßt sich der Plot als csv-Datei abspeichern. Der mit dem Rectangle-Werkzeug markierte Bereich kann mit

- Image → Crop (Strg+Umschalt+X)

auch ausgeschnitten werden.

Wechsel der Farbtabelle: Um ein kontrastreichere Darstellung der Spektren zu erreichen, kann man von der Schwarz/Weiss-Darstellung zu einer Falschfarben-Darstellung wechseln. Wählen Sie

- Image → Lookup Tables

und wählen dann z.B. *Green Fire Blue* aus.

Abspeichern eines Bildes: Ein mit ImageJ erzeugtes oder geöffnetes Bild läßt sich durch

- File → Save (Strg+S)

oder

- File → Save As

abspeichern. Sind mehrere Bilder gleichzeitig geöffnet, muss das Bild vorher durch einen Rechtsklick aktiviert werden.