



Master Fortgeschrittenen Praktikum

STED-Mikroskopie

Praktikant: Philip Marszal

Prüfer: Prof. S. Hell

Betreuer: F. Kleißler

Durchgeführt: 20.01.16

E-Mail: philip.marszal@stud.uni-goettingen.de

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theorie	2
2.1	Lichtmikroskopie	2
2.2	Fluoreszenzmikroskopie	4
2.3	Konfokalmikroskopie	5
2.4	STED-Mikroskopie	5
3	Aufbau	7
4	Durchführung	8
5	Auswertung	10
5.1	Messung der PSF	10
5.2	Tiefendiskriminierung	12
5.3	STED-Auslöschung	13
5.4	Auflösung der STED-Mikroskopie	13
5.5	Untersuchung der Mikrotubuli	16
6	Diksussion	17
A	Anhang: Bestimmung der FWHM	20

1 Einleitung

Bis zum 16. Jahrhundert war die reale Welt eine Welt des Meters. Die meisten damals bekannten Lebewesen haben sich auf Skalen des Meters bewegt, seien es millimetergroße Insekten oder meterlange Wale.

Im 16. Jahrhundert aber änderte eine Erfindung die Sicht auf die Welt. Das Mikroskop ermöglichte die Erkundung der kleinsten Längen. Es ermöglichte die Entdeckung von Zellen, Bakterien und auch physikalischen Phänomenen wie der Brown'schen Molekularbewegung.

Seitdem unterliegt das Prinzip der Mikroskopie einem steten Wandel, um noch kleinere Skalen untersuchen zu können. Eine grundlegende physikalische Begrenzung jedoch stellt die Wellenoptik dar. Beugung beschränkt die Auflösung der Mikroskopie.

Diese Grenze kann jedoch mithilfe der STED-Mikroskopie umgangen werden.

Dieser Versuch beschäftigt sich mit der Untersuchung und Funktionsweise der STED-Mikroskopie. Er wird deutlich die Vorteile gegenüber herkömmlicher Mikroskopietechniken aufzeigen.

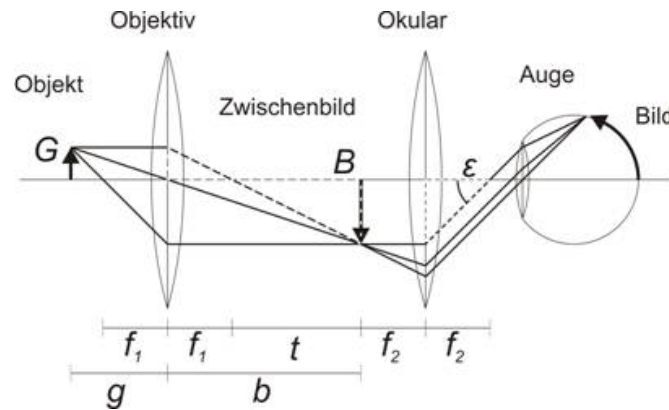


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Zwei-Linsen Mikroskops. (Quelle: <https://wiki.physik.fu-berlin.de>)

2 Theorie

2.1 Lichtmikroskopie

STED-Mikroskopie ist eine Form der Lichtmikroskopie, die eine besonders gute Auflösung erreicht im Vergleich zu klassischen Mikroskopen. Das klassische Lichtmikroskop basiert auf einem simplen Aufbau aus Linsen, wie er für einen einfachen Fall in Abb. 1 zu sehen ist. Im simpelsten Fall wirft die erste Linse, das Objektiv, ein Bild in die Fokusebene der zweiten Linse, dem Okular [?]. Der kleinst mögliche Abstand zweier Punkte, unter dem noch zwei getrennte Punkte erkannt werden können, ist die Auflösung des Mikroskops. Sie ist bei der Lichtmikroskopie grundlegend durch Beugung beschränkt. Beugung bewirkt, dass das Bild eines Punktes kein weiterer Punkt ist, sondern eine mithilfe der Besselfunktion beschriebene Verteilung konzentrischer Ringe [7], die sogenannte Punktspreizfunktion (PSF, *point spread function*). Insbesondere hat das Zentrum der Ringe, das erste Maximum, eine endliche Ausdehnung. Dieses erste Maximum wird im Allgemeinen als Arrayscheibe bezeichnet.

Das mit einem Mikroskop aufgenommene Bild einer Probe entspricht in seiner Form der Faltung der realen Form der Probe mit der PSF des Mikroskops. Auf eine scharfe Kante wirkt diese Faltung als Glättung, sodass im Bild nur ein gradueller Übergang zu erkennen ist. Die Wirkung der Faltung einer Kante mit einer Arrayscheibe ist in Abb. 2 schematisch dargestellt.

Liegen zwei Punkte zu dicht beieinander, so überlappen sich ihre Arrayscheiben, und die Punkte können nicht mehr aufgelöst werden.

Die minimale Distanz, die zwei Punkte voneinander haben müssen, um als zwei Punkte erkannt zu werden, wird durch Auflösungskriterien bestimmt. Das Spar-

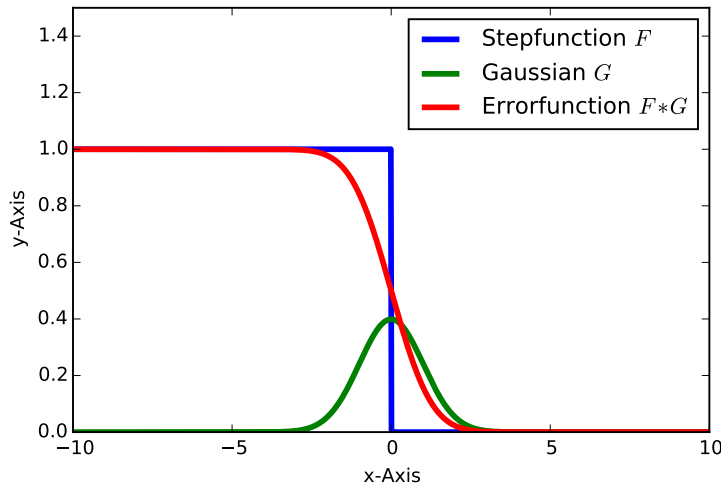


Abbildung 2: Faltung einer Kante (Stufenfunktion) mit einer Arrayscheibe (hier durch eine Gauß'sche Funktion genähert). Aus dem diskreten Sprung wird ein Gradient (in diesem Beispiel die Errorfunktion).

row'sche Auflösungskriterium [8] besagt, dass zwei Punkte (im Original Sterne) dann noch aufgelöst werden können, wenn die Intensitätsverteilung zwischen zwei Maxima gerade noch ein Minimum aufweist. Eine konservativere Definition eines Auflösungskriteriums ist hingegen das Rayleighkriterium, welches in diesem Versuch hauptsächlich benutzt wird. Nach Rayleigh werden zwei Punkte genau dann noch aufgelöst, wenn das Maximum eines Punktes in das Minimum des anderen fällt [?]. Dies entspricht dem Abstand des ersten Minimums der PSF vom ersten Maximum und ist gegeben durch die Formel 1

$$d_{min} = 1.22 \cdot \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}. \quad (1)$$

Hierbei beschreibt λ die Wellenlänge des zu Mikroskopieren verwendeten Lichts, n den Brechungsindex des Mediums und α den maximalen Öffnungswinkel der Objektivlinse. Der Term $n \sin \alpha$ wird als die numerische Apertur eines Objektivs NA bezeichnet [7].

Experimentell ist die Auflösung nach Rayleigh oder Sparrow nur schwer zu messen. Als Maß für die Auflösung kann jedoch die Halbwertsbreite der PSF (FWHM, *full width at half maximum*) benutzt werden.

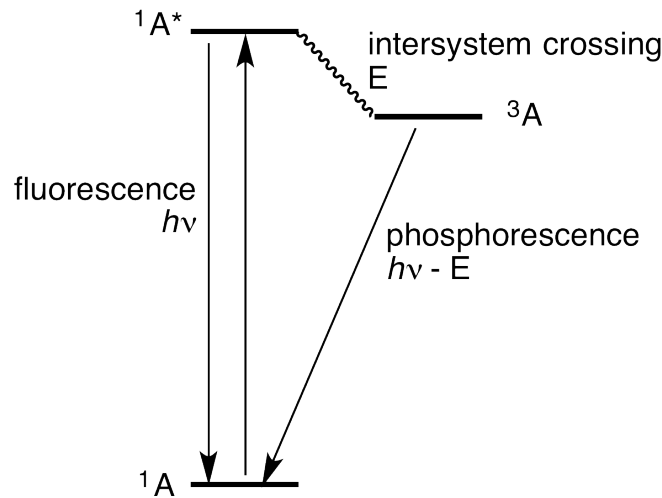


Abbildung 3: Jablonski-Diagramm. (Quelle: en.wikipedia.org)

2.2 Fluoreszenzmikroskopie

Eine besondere Art von Lichtmikroskopie ist die Fluoreszenzmikroskopie. Im Gegensatz zur klassischen Mikroskopie wird nicht das von der Probe reflektierte oder an der Probe gebrochene Licht im Okular detektiert, vielmehr wird die Probe selbst zum Leuchten angeregt. Das Prinzip der Fluoreszenz besteht darin, Moleküle mithilfe von Licht einer spezifischen Wellenlänge in einen energetisch höheren Zustand zu versetzen. Bei der Rückkehr der Moleküle in ihren Grundzustand senden diese Photonen aus. Die Wellenlänge der absorbierten und emittierten Photonen hängt von der Verteilung der Energieniveaus des Moleküls ab. Sie ist in sogenannten Jablonski-Diagrammen schematisch dargestellt (siehe Abb. 3). In der Regel befindet sich ein angeregtes Molekül nicht nur in einem elektronisch angeregten Zustand, sondern auch in einem angeregten Schwingungszustand. Durch die Relaxation aus dem Schwingungszustand besitzt das Molekül eine geringere Energie vor der Emission eines Photons als unmittelbar nach der Anregung. Dies führt dazu, dass emittiertes Licht eine größere Wellenlänge hat als absorbiertes Licht. Dieses Phänomen trägt den Namen Stokes-Shift [5].

Der Vorteil der Fluoreszenzmikroskopie gegenüber der herkömmlichen Lichtmikroskopie ist, dass gezielt Strukturen mit Fluoreszenzfarbstoff präpariert werden können (über Proteine u.ä.) und ungewollte Brechungszentren ausgeblendet werden können. Durch im Strahlengang eingesetzte Farbfilter wird gewährleistet, dass lediglich die emittierte Wellenlänge in das Objektiv gelangt und reflektiertes Licht abgeschirmt wird.

2.3 Konfokalmikroskopie

Eine Form der Fluoreszenzmikroskopie ist die Konfokalmikroskopie. Konfokalmikroskopie beleuchtet meist mit einem fokussierten Laser nur einen kleinen Ausschnitt der Probe. Allerdings wird die gesamte Probe abgerastert, sodass erst nach dem Zusammenfügen der einzelnen Flecken ein vollständiges Bild entsteht. Das Besondere an der Konfokalmikroskopie ist eine im Detektionsstrahlengang eingebrachte Lochblende. Ihre Funktion ist die Abschirmung von Licht, welches nicht von der Fokusebene stammt. Dadurch ist es möglich einen hohen Kontrast zu erzielen und nur einen scharfen Ausschnitt einer Ebene der Probe aufzunehmen.

Die axiale Auflösung eines Konfokalmikroskops ist durch Gleichung (2) bestimmt [3].

$$d_{axial} = \frac{0.88 \cdot \lambda_{ex}}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}}. \quad (2)$$

Hier bezeichnet λ_{ex} die Wellenlänge der Fluoreszenzanregung. Die Dicke der beleuchteten Schicht lässt sich nach Gleichung (3) bestimmen [3].

$$d_{schicht} = \sqrt{\left(\frac{0.88\lambda_{ex}}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}}\right)^2 + \left(\frac{\sqrt{2} \cdot n \cdot PH}{NA}\right)^2}. \quad (3)$$

PH bezeichnet den Durchmesser der konfokalen Lochblende.

2.4 STED-Mikroskopie

Die STED-Mikroskopie bietet eine Möglichkeit, die ansonsten in der Lichtmikroskopie auftretende Begrenzung der Auflösung durch Beugung zu umgehen. Sie basiert auf der Fluoreszenzmikroskopie, und wird häufig mit einem konfokalen Aufbau realisiert.

STED steht für *stimulated emission depletion*, und bezieht sich auf die Abregung von Fluoreszenzmolekülen durch das Prinzip der stimulierten Emission. Im Gegensatz zur konventionellen Fluoreszenzmikroskopie, kommen zwei Laser unterschiedlicher Wellenlängen zum Einsatz [6]. Der Anregungslaser verfügt über eine PSF, wie sie auch in der herkömmlichen Konfokalmikroskopie angewendet wird, i.e. eine gewöhnliche Airyscheibe. Hinzu kommt nun ein Abregungslaser oder STED-Laser, dessen PSF die Form eines Ringes hat. Die Wellenlänge des STED-Lasers ist dabei größer als die des Anregungslasers. Die PSFs beider Laser sind so überlagert, dass das Maximum der Anregung im Mittelpunkt des Ringes liegt.

Der Anregungslaser regt Moleküle auf ein höheres Energieniveau an, die daraufhin unter Aussendung von Photonen wieder in ihren Grundzustand zurückkehren. Durch stimulierte Emission, lässt sich die Photonemission einer spezifischen Wellenlänge kontrolliert herbeiführen. Interagiert ein angeregtes Elektron des Moleküls mit einem Photon, dessen Wellenlänge dem Übergang zu einem niedrigeren Energieniveau entspricht, so fällt das Elektron in diesen Zustand unter Aussendung eines weiteren Photons dieser Wellenlänge.

Dieses Prinzip wird durch den STED-Laser angewendet. Dadurch werden Moleküle aus dem Ring wieder abgeregt. Da die Moleküle jedoch in der Regel in einen vibronischen Zustand fallen, können diese nicht sofort wieder durch den Anregungslaser zur Fluoreszenz angeregt werden. So werden gezielt Fluoreszenzmoleküle um einen Punkt herum ausgeschaltet. Als direkte Folge der Rategleichungen nimmt die Anzahl der ausgeschalteten Moleküle mit steigender Intensität des STED-Lasers I_{STED} exponentiell ab [4]. Die STED-Intensität, bei der die Hälfte aller angeregten Moleküle ausgeschaltet wurde, wird als Sättigungsintensität I_S bezeichnet.

Detektiert wird jetzt nur das von den verbleibenden fluoreszierenden Molekülen ausgesendete Licht. Es kann gezeigt werden, dass der Durchmesser der Scheibe, in der die Moleküle nicht abgeregt werden, mit steigender Intensität des STED-Lasers abnimmt [6].

$$d = \frac{\lambda_{ex}}{2NA\sqrt{1 + I_{STED}/I_S}}. \quad (4)$$

Dies ermöglicht eine theoretisch unbegrenzt gute Auflösung, deren Grenze nur durch die Leistung des STED-Lasers und der räumlichen Ausdehnung eines Fluoreszenzmoleküls festgelegt ist.

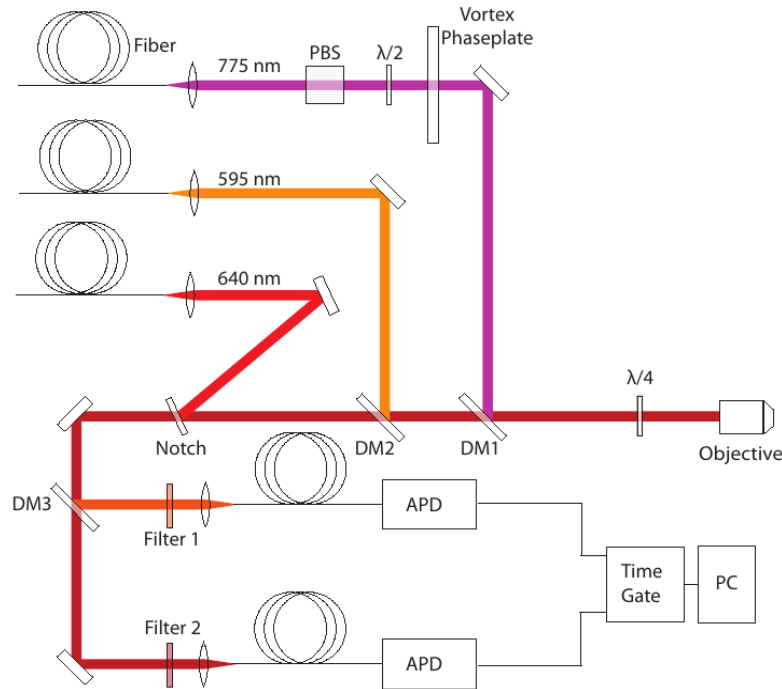


Abbildung 4: Skizze des Aufbaus. Der Laser der Wellenlänge 595 nm und der Detektionspfad dieses Strahls kommen in diesem Versuch nicht zum Einsatz.

3 Aufbau

Zur STED-Mikroskopie in diesem Versuch wird ein 640 nm Laser als Anregungslaser und ein 775 nm Laser als STED-Laser verwendet. Beide Laser sind gepulst und werden mithilfe von polarisationserhaltenden Fasern in den Aufbau eingebracht und mit Linsen kollimiert.

Zur Erzeugung der Ringform des STED-Lasers wird eine Polymer-Phasenplatte und eine $\lambda/4$ -Platte verwendet. Dafür muss der STED-Laser linear polarisiert sein, was durch einen polarisierenden Strahlteiler erreicht wird.

Nachdem die Strahlen überlagert wurden, werden sie in das Objektiv geleitet. Bei dem Objektiv handelt es sich um ein *Leica HCX PL APO 100X/1.40-0.70 OIL CS* mit einer numerischen Apertur von 1.4. Das Immersionsöl besitzt einen Brechungsindex von 1.52.

Das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht passiert das Objektiv und die Einkoppelspiegel, und wird an einen Photomultiplier (PMT) bzw. eine Avalanchephotodiode (APD) geleitet, die die Intensität über die Zahl der einfallenden Photonen misst.

4 Durchführung

Die Durchführung des Versuches kann grob in vier Abschnitte unterteilt werden. Im ersten Teil wird die Form der PSF der beiden Laser bestimmt. Dazu werden 80 nm große Goldkügelchen als Probe verwendet. Da die PSF der reinen fokussierten Laser betrachtet werden soll, wird die Phasenplatte aus dem Strahlengang entfernt.

Der Strahlteiler, der einen Teil des Lichts an den Photomultiplier (PMT) weitergibt, wird eingesetzt. Mithilfe der Kamera wird die Fokusebene eingestellt. Dazu wird die z-Achse zunächst grob per Hand in die Nähe der Goldkügelchen bewegt, und anschließend die Feineinstellung mit dem Motor durchgeführt.

Nun können die Goldkügelchen mit dem Inspector im Scanmodus betrachtet werden. Für die Messung wird nun ein Goldkügelchen möglichst zentriert und sein Bild in der xy -, xz - und yz -Ebene gescannt. Aus diesen Bildern lässt sich nachher die PSF rekonstruieren.

Als nächstes wird die Tiefendiskriminierung des Anregungslasers bestimmt. Hierfür wird ein dünner Farbstofffilm als Probe verwendet. Anstelle des PMT wird nun eine Avalanche-Photodiode (APD) als Detektor verwendet. Die APD ist direkt an eine Faser gekoppelt, deren Kern die Rolle der konfokalen Lochblende übernimmt.

Der Farbstofffilm wird nun in z-Richtung gescannt und die gemessene Intensität in Abhängigkeit von der z-Tiefe bestimmt.

Für den zweiten Teil wird die Überlagerung von Anregungslaser und STED-Laser untersucht. Dazu müssen zunächst die PSF der beiden Laser mittels des dikroitischen Spiegels überlagert werden. Es empfiehlt sich dies direkt an die Messung der Goldkügelchen anzuschließen und die durch ein Goldkügelchen erzeugten PSFs zu überlagern.

Jetzt kann die Auslöschung der Fluoreszenz durch den STED-Laser untersucht werden. Als Probe wird nun eine Lösung von fluoreszierenden Nanoteilchen verwendet (Größe 40 nm).

Bei konstanter Anregungsleistung wird die gemessene Intensität in Abhängigkeit von der STED-Leistung bestimmt. Pro STED-Leistung wird sechs mal die integrierte Intensität über einen Bereich bestimmt. Zwei mal nur mit dem Anregungslaser, zweimal mit Anregungs- und STED-Laser und wieder zweimal nur mit dem Anregungslaser. Die Messungen mit dem Anregungslaser, werden vor und nach der STED-Beleuchtung durchgeführt um Effekte durch Ausbleichen der Probe auszugleichen.

Dies wird für steigende STED-Leistungen durchgeführt. Wichtig für die Auswertung sind die Verhältnisse zwischen reiner Fluoreszenz durch den Anregungslaser und Auslöschung durch den STED-Laser.

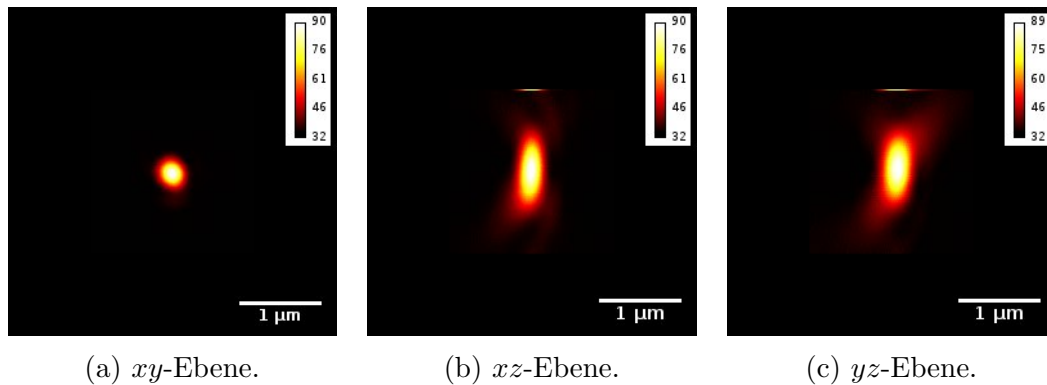


Abbildung 5: PSF des Anregungslasers (640 nm). Beleuchtet wird ein Goldkügelchen mit einem Durchmesser von ca. 80 nm.

Im dritten Teil des Versuches wird die Auflösung der STED-Mikroskopie bestimmt. Vorbereitend wird dafür mittels der Phasenplatte die 'Doughnut'-Form des STED-Lasers erzeugt. Um die PSF möglichst gut justieren zu können, wird wieder die Goldkügelchenprobe verwendet, und die Form der STED-PSF durch Verschieben der Phasenplatte justiert. Außerdem muss, das Minimum der STED-PSF mit der Anregungs-PSF überlagert werden. Für die Auswertung wird die Restintensität am Minimum der STED-PSF bestimmt.

Die Auflösung der STED-Mikroskopie wird nun anhand der fluoreszierenden Probe aus dem zweiten Teil bestimmt.

Für steigende STED-Intensitäten werden Bilder der fluoreszierenden Kügelchen aufgenommen. Die Probe wird dabei nach jeder Aufnahme neu justiert, damit das Ausbleichen der Fluoreszenzpartikel möglichst wenig Einfluss auf die Messungen nimmt.

Im vierten Teil des Versuchs werden nun Säugetier-Zellen mithilfe von STED-Mikroskopie untersucht. Bei den fluoreszierenden Teilen der Zelle handelt es sich um von fluoreszierenden Antikörpern besetztes Tubulin.

Zunächst wird eine Stelle mit dichten Tubulinstrukturen nur mithilfe des Anregungslasers gesucht. Von dieser Stelle werden nun Aufnahmen nur mit dem Anregungslaser, mit Anregungs- und STED-Laser und nur mit dem STED-Laser gemacht.

5 Auswertung

5.1 Messung der PSF

Zur Bestimmung der Form der PSF werden Aufnahmen, der xy-, xz, und yz-Ebene der Goldbeads verwendet. Dabei wird jeweils die Ausdehnung des Bildes in x-,y- und z-Richtung bestimmt. Da die Goldkugeln in erster Näherung als rund angenommen werden können, ist die Form der PSF theoretisch bekannt. Das Interferenzmuster kann angenähert werden durch die Funktion (5):

$$f(x) = I_0 \cdot \exp(-k \cdot x^2) \cdot \cos^2(-\omega \cdot x). \quad (5)$$

Die Ausdehnung der Airyscheibe entspricht nach dem Rayleigh-Kriterium dem Abstand der beiden ersten Minima voneinander. Durch (5) ist der Abstand des ersten Minimums vom ersten Maximum eindeutig mit dem Parameter w bestimmt als:

$$x_{min} = \frac{\pi}{2} \omega. \quad (6)$$

Die PSF wird mit ImageJ [1] vermessen, indem das Profil entlang der jeweiligen Achse durch das Maximum bestimmt wird. In Abb. 6 sind die alle Vermessungen der PSF zu sehen. In Tab. 1 sind die durch nonlinear-regression bestimmten Werte aufgetragen, der Fehler ergibt sich aus der bei der Regression auftretenden Standardabweichung.

Die aus dem Aufbau nach (1) bestimmte Airyscheibe hat einen Durchmesser von 557.7 nm für eine Wellenlänge von 640 nm und 675.4 nm für eine Wellenlänge von 775 nm.

Bei der Messung der Auslöschung der FLuoreszenz durch den STED-Laser wird eine konfokale Lochblende mit einem Durchmesser von 62.5 μm und einer 100-fachen Vergrößerung des Bildes benutzt. Dies entspricht dem 1.12-fachen Durchmesser der Airyscheibe für 640 nm und 0.92-fachen Durchmesser der Airyscheibe für 775 nm.

Ein geringerer Fehler der Messung der Ausdehnung der PSF ist für den Fit mit einer reinen Gaußfunktion zu erwarten, da die Minima nur sehr schwach ausgeprägt sind. In diesem Fall lässt sich die FWHM durch die Gaußfunktion bestimmen. Die bestimmten Werte für die FWHM sind in Tab. 2 abzulesen. Eine Übersicht der gemessenen Profile mit zugehörigen Fits ist in Abb. 13 zu finden. Die sich aus dem Aufbau ergebenden Werte sind in Tab. 3 zu sehen.

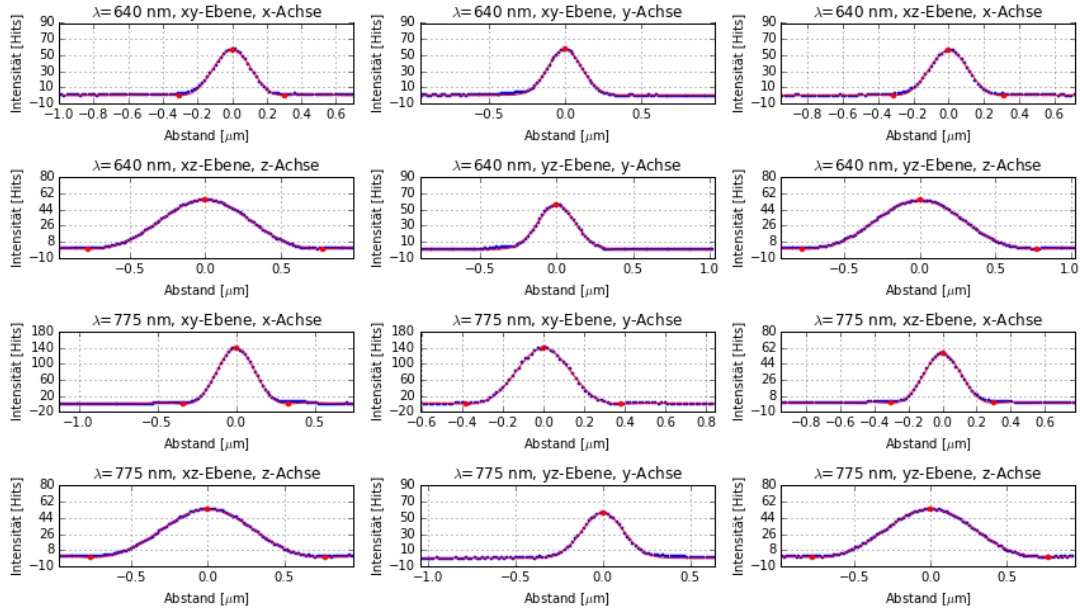


Abbildung 6: Verteilung der Intensität der Aufnahmen, als Funktion des Abstandes vom ersten Maximum. Mit ImageJ bestimmte Werte sind schwarz dargestellt. Maxima und erste Minima sind in rot hervorgehoben. Die gefittete Funktion (grün) entspricht Gleichung (5). Für die Messungen der y -Achse für die Wellenlängen 640 nm und 775 nm, liefert diese Methode der bestimmung der Minima keine sinnvollen Ergebnisse.

Tabelle 1: Gewichtete Mittelwerte der Messungen des Abstandes der ersten Minima voneinander. In x - und y -Richtung entspricht dies dem Durchmesser der Airyscheibe. Für die y -Achse bei $\lambda = 640$ nm ist der Fehler der Regression viel größer als der bestimmte Durchmesser, der weit außerhalb der betrachteten Region liegen würde. Bei der $\lambda = 775$ nm Messung hat nur ein Fit ein sinnvolles Ergebnis erzielt.

Wellenlänge [nm]	Achse	Doppelte Auflösung (Rayleigh) [nm]
640	x	610(5)
	y	—
	z	1557(4)
775	x	639(5)
	y	761(8)
	z	1546(8)

Tabelle 2: Durch einen Fit mit einer Gaußfunktion bestimmte Werte für die FWHM des Anregungs- und STED-Lasers. Gezeigt ist der gewichtete Mittelwert, mit einem Fehler, der sich aus der Regression ergibt.

Wellenlänge [nm]	Achse	FWHM [nm]
640	x	244.3(6)
	y	276.5(5)
	z	637.2(2)
775	x	258.0(5)
	y	291.3(5)
	z	637.1(2)

Tabelle 3: Werte für die FWHM der PSF, wie sie durch die Parameter des Aufbaus vorgegeben sind ($NA = 1.4$). Die optische Schichtdicke $d_{schicht}$ wurde nach Gl. (3) bestimmt mit einem Pinholedurchmesser von $PH = 625$ nm.

Wellenlänge [nm]	FWHM [nm]	$d_{schicht}$ [nm]
640(lateral/axial)	233.14/606.86	1135.4
775(lateral/axial)	282.32/734.87	1208.7

5.2 Tiefendiskriminierung

In Abb. 7 ist der Intensitätsverlauf in Abhängigkeit von der z -Achse entlang der Farbfilmprobe dargestellt. Die Tiefendiskriminierung kann durch die Breite des Intensitätsabfalls abgeschätzt werden. Weil das Plateau der maximalen Intensität nicht exakt konstant ist, wurde für den maximalen Wert der Mittelwert des Plateaus gebildet. Dafür wurde in Abb. 7 nur der Bereich zwischen den eingezeichneten roten Linien benutzt. Die Tiefendiskriminierung entspricht in etwa der Länge nach dem die Intensität auf die Hälfte ihres ursprünglichen Wertes abgefallen ist. In der Abbildung ist dies der Abstand des rechten Randes des Plateaus zur vertikalen gelben Linie. Der so bestimmte Wert ergibt sich zu 532.5 nm.

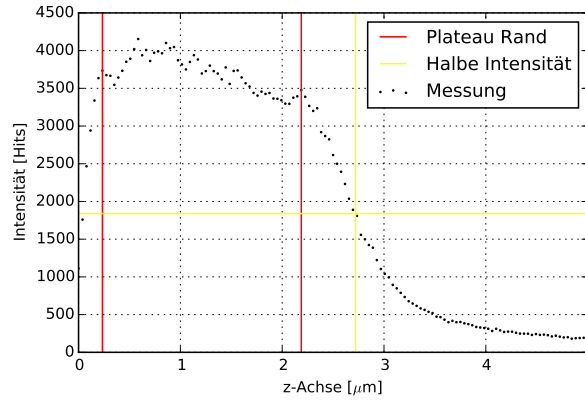


Abbildung 7: Verlauf der gemessenen Intensität beim Scannen des Farbfilms entlang der z -Achse. Die Intensität entspricht der Anzahl der detektierten Photonen im Photomultiplier. Die roten Linien markieren die Grenzen des Plateaus. Die horizontale gelbe Linie beschreibt die Höhe der halben Plateauintensität, und die vertikale gelbe Linie markiert die z -Koordinate bei dem dieser Wert erreicht ist. Aus dem Abstand des Plateaus von der halben Intensität lässt sich die Tiefendiskriminierung abschätzen.

5.3 STED-Auslöschung

Zu quantitativen Beschreibung der Auslöschung der Fluoreszenz durch den STED-Laser wird das Verhältnis der gemessenen Intensität ohne Auslöschung zur Intensität mit Auslöschung berechnet. Aus den Messwerten für die Intensitäten werden die Mittelwerte gebildet, wodurch auch der Effekt der Bleichung der Nanopartikel auf die Messung gemindert wird.

Für die Sättigungsintensität ergibt sich ein Wert von $I_S = 3.2 \text{ MW/cm}^2$. Aus Simulationen ist bekannt, dass die Sättigungsintensität durch diese Messung überschätzt wird. Der reale Wert ist um einen Faktor 0.71 kleiner als der gemessene. Damit erhält man einen Wert von $I_S = 2.272 \text{ MW/cm}^2$.

5.4 Auflösung der STED-Mikroskopie

Zunächst wird der STED-Ring untersucht und das Verhältnis der Maximalintensität zur Intensität in der Mitte des Ringes gebildet. Die Aufnahmen der PSF des STED-Lasers können in Abb. 9 betrachtet werden. Dazu wird der Intensitätsverlauf entlang der Achse durch Minimum und Maximum des Ringes untersucht. Dieser ist in Abb. 10 zu sehen. Es ist zu erkennen, dass die Intensität in der Mitte des Ringes vollständig auf den Wert des Hintergrundes abfällt. In Abb. 10

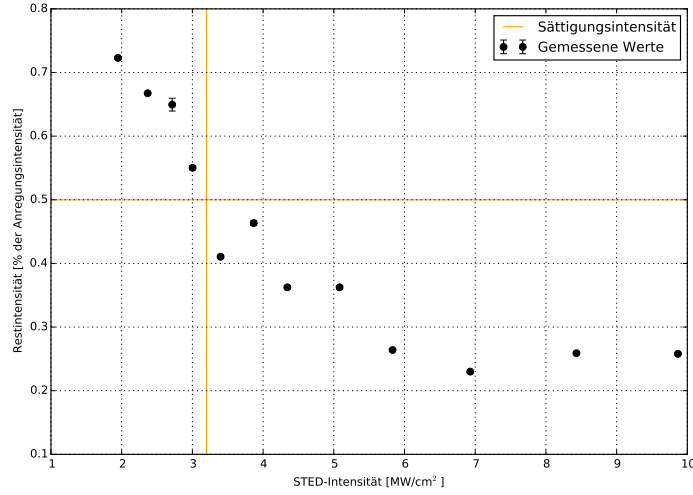


Abbildung 8: Restintensität als Anteil der Anregungsintensität für verschiedene STED-Leistungen. Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Standardabweichung der einzelnen Messungen für eine gegebene STED-Leistung und Beleuchtungsart. Die Messung der Intensität bei Beleuchtung durch den Anregungslaser allein ergibt vier Messwerte je STED-Leistung, und die Messung der Intensität bei gleichzeitiger Beleuchtung mit Anregungs- und STED-Laser liefert zwei Messwerte. Die Sättigungsintensität I_S wurde über Interpolation der Messwerte bestimmt. Der fehlerbehebene Wert liegt bei $I_S = 2.272 \text{ MW/cm}^2$.

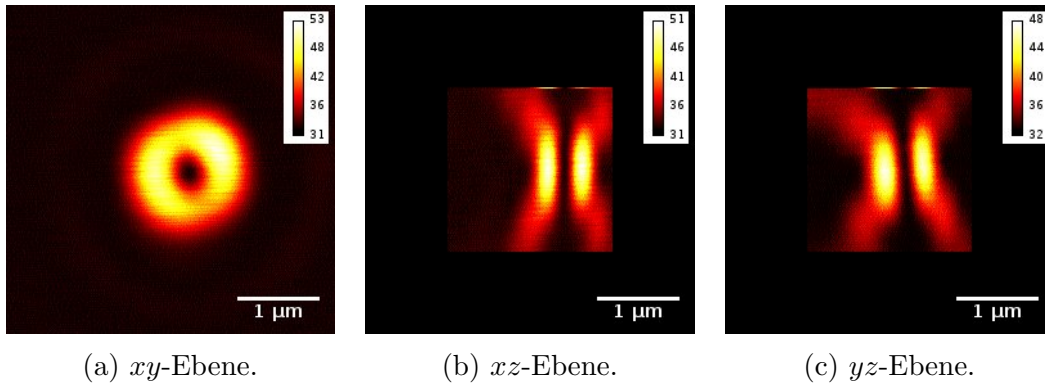


Abbildung 9: Aufnahmen der PSF des STED-Lasers, unter Einsatz der Phasenplatte.

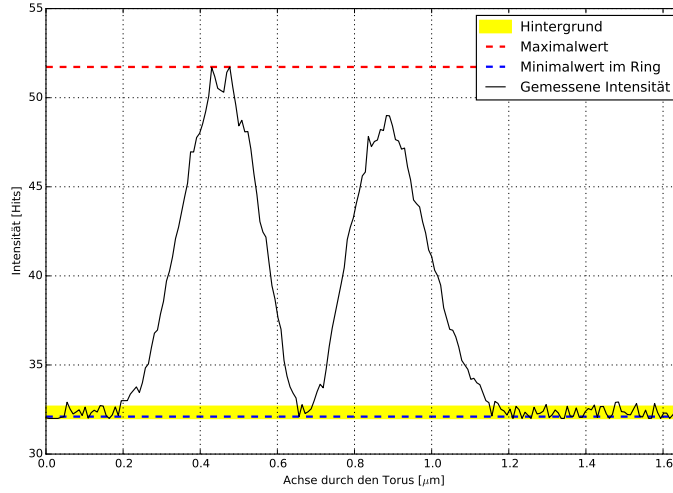


Abbildung 10: Intensitätsverlauf entlang der Achse durch den Maximalwert des Ringes und dem Mittelpunkt. Die Intensität des Minimums entspricht dem Niveau der Intensität außerhalb des Ringes.

ist dieser gelb unterlegt. Die Differenz zwischen Maximum und Minimum beträgt ca. 38 % der maximalen Intensität.

Die Auflösung der STED-Mikroskopie wird unter Verwendung des ImageJ Plugins *MosaicSuite* [2] und der darin befindlichen Funktion PSF-Tool bestimmt. Dieses Werkzeug erlaubt die Bestimmung der FWHM einer Aufnahme oder eines gesamten Aufbaus, durch die Berechnung der PSF, die durch einzelne isolierte Punkte erzeugt wird. Die verwendeten Parameter für das PSF-Tool sind ein Sampling-Radius von 30 px und eine Pixelgröße von 1 μm. Die PSFs mehrerer Nanopartikel wird dann gemittelt und daraus der Mittelwert der FWHMs bestimmt.

Die so bestimmten Werte für die FWHM sind als Funktion der relativen STED-Intensität $\zeta = I_{STED}/I_S$ in Abb. 11 aufgetragen. Ersetzt man in Gleichung (4) den Term $\frac{\lambda}{2NA}$ durch die konofokale Auflösung, und modelliert den Einfluss aller nicht spektroskopischen Parameter auf die Auflösung als einen zur Intensität beitragenden Faktor, so ergibt sich die Funktion (7):

$$d = \frac{d_{konfokal}}{\sqrt{1 + k^2 \zeta}}, \quad (7)$$

Der Fit dieser Funktion an die Messwerte ergibt einen Wert von $k = 0.47(7)$.

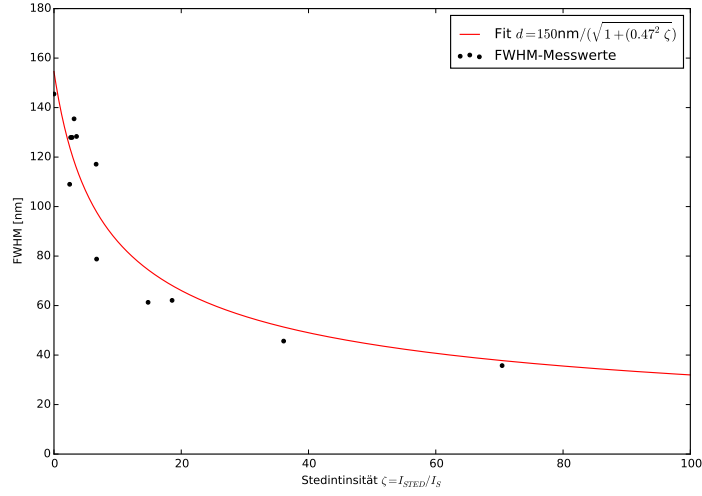
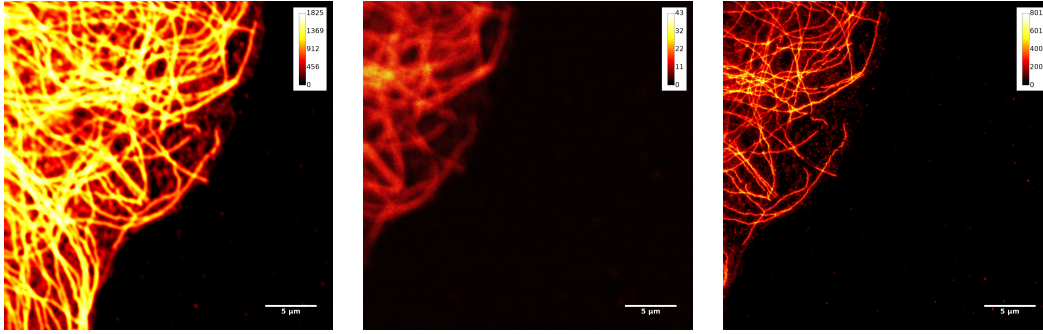


Abbildung 11: FWHM als Funktion der Intensität des STED-Lasers. Der Fit führt zu den Ergebnissen $k = 0.47(7)$ und $d_{konfokal} = 150(10)$ nm.

5.5 Untersuchung der Mikrotubuli

In Abb. 12a bis 12c sind mit dem Aufbau aufgenommene Bilder der Mikrotubuli zu sehen. Mithilfe des PSF-Tools wird auch hier die Auflösung bestimmt. Sie ergibt sich zu $40(8)$ nm. Dies liegt sehr nah an der Größe der Tubulidurchmesser, die ca. 25 nm beträgt.



(a) Anregungslaser allein. (b) STED-Laser allein. (c) Beide Laser.

Abbildung 12: Aufnahmen von Mikrotubuli für unterschiedliche Beleuchtungen.

6 Diksussion

Vergleicht man die theoretisch erwarteten Werte für den Durchmesser der Airyscheibe mit den gemessenen, so stellt man fest, dass die Messung ca. 10 bis 12 % über theoretischen Werten liegt. Dies ist mit Sicherheit verursacht durch die endliche Ausdehnung der Goldbeads, die keine ideale Punkte darstellen.

Eine weitere Abweichung von theoretischen Werten findet man bei Betrachtung der FWHMs der Goldbead-PSFs. Auch hier wird die Ausdehnung überschätzt. Hinzukommt jedoch auch die stark unterschiedliche Ausdehnung in x - und y -Richtung. Die PSF scheint in y -Richtung breiter zu sein als in x -Richtung. Vermutlich handelt es sich bei den Goldbeads auch nicht um perfekte Kugeln, sondern vielmehr um Ellipsoide. Unter Umständen wird das Goldbead auch durch die starke Intensität der Laser während der Messung verformt.

Eine gravierende Abweichung ist bei Betrachtung der FWHM entlang der z -Achse beim STED-Laser zu erkennen. Diese weicht um fast 15 % nach unten von dem erwarteten Wert ab. Dies ist überaus merkwürdig und ein Grund ist nicht offensichtlich.

Eine prinzipielle Schwierigkeit der Bestimmung der Auflösung nach Rayleigh besteht in dem Fit mit der Funktion (5). Die Intensitätsverteilungen scheinen deutlicher der Gauß'schen Funktion zu folgen, als einem erwarteten Interferenzmuster. Demnach ist der Fit einer oszillierenden Funktion an die Messwerte nur eingeschränkt sinnvoll, was auch aus den Ergebnissen für die y -Achse deutlich wird. Die bestimmte Tiefendiskriminierung des Mikroskops lässt sich mit der axialen Auflösung und der optischen Schichtdicke aus Tab. 3 vergleichen. Die experimentell abgeschätzte Tiefendiskriminierung wird im Vergleich zur axialen Auflösung unterschätzt. Allerdings liefert sie überraschend plausible Werte beim Vergleich mit der optischen Schichtdicke. Sie entspricht in etwa der Hälfte von d_{schicht} . Dies

ist theoretisch einsichtlich, wenn man bedenkt, dass eine geglättete Stufenfunktion genau dann auf die Hälfte ihres Maximalwertes sinkt, wenn sie nur zu Hälfte mit der PSF überlappt.

Die Messung der Sättigungsintensität I_S ist zufriedenstellend. Es ist nur anzumerken, dass die Fehler der Messwerte unterschätzt werden, da nur die sich aus dem Mitteln ergebenden Fehler betrachtet werden. Dies ist so auch auf sämtliche Messungen anwendbar, da keine genauen Angaben über die Genauigkeit der Messinstrumente gegeben ist.

Die Form des STED-Doughnuts ist erstaunlich gut zu erkennen in Abb. 9. Auch wenn der Ring unregelmäßigkeiten ausweist, so scheint nach Abb. 10 des Zentrum des Ringes tatsächlich vollständig abgedunkelt zu sein.

Ein größeres Problem ist bei der Messung der Auflösung der STED-Mikroskopie aufgetreten. Mit dem Fit in Abb. 11 wird ein Wert $d_{konfokal} \approx 150$ nm bestimmt. Dieser liegt weit unter den zuvor bestimmten konfokalen Auflösungen von ca. 250 nm für die FWHM. Grund dafür liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit in der Benutzung des PSF Tools. Die benutzten Parameter sind lediglich Schätzungen und können daher zur Abweichung der Messwerte um einen konstanten Faktor führen. Das PSF Tool benötigt um eine korrekte Schätzung der PSF vornehmen zu können eine isolierte Punktquelle im Bild. Aufgrund der hohen Dichte der Nanobeads konnte allerdings gerade bei geringen STED-Intensitäten keine isolierte Punktquelle gefunden werden. Für das Ergebniss k hat dieser Fehler allerdings nur geringen bis keinen Einfluss, da der Fehler nur einen konstanten Faktor verursacht.

Literatur

- [1] <http://imagej.nih.gov/ij/>.
- [2] <http://mosaic.mpi-cbg.de>.
- [3] H Beyer. *Handbuch der Mikroskopie*. VEB Verlag Technik Berlin, 2nd edition edition, 1985.
- [4] Marcus Dyba and Stefan W. Hell. Focal spots of size $\lambda/23$ open up far-field florescence microscopy at 33 nm axial resolution. *Phys. Rev. Lett.*, 88:163901, Apr 2002.
- [5] Haken and Wolf. *Molekülphysik und Quantenchemie*. Springer, 5th edition, 2006.
- [6] Stefan W. Hell. Nanoskopie mit fokussiertem licht. *Physik Journal* 6, 2007.
- [7] E. Wolf M. Born. In *Principles of Optics*. Pergamon, 6th edition edition, 1980.
- [8] C. M. Sparrow. On Spectroscopic Resolving Power. *The Astrophysical Journal*, 44:76, September 1916.

A Anhang: Bestimmung der FWHM

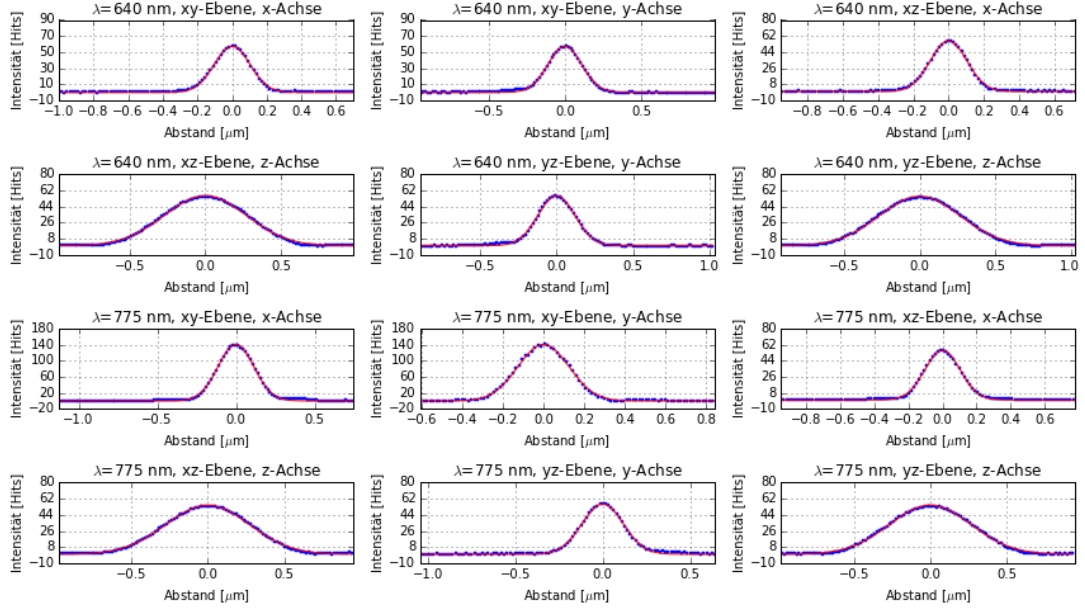


Abbildung 13: Bestimmung der FWHM entlang aller Achsen für die Wellenlängen 640 nm und 775 nm. Die Intensitätsverläufe wurden mit einer Gauß'schen Funktion gefittet, um die Halbwertsbreite $\sqrt{2 \log 2} \sigma$ zu bestimmen.