



Plasmon Assisted Fluorescence Emission: Far-Field Observables and Their Fluctuations

L.A. Langguth

Plasmon assisted fluorescence emission – far-field observables and their fluctuations

Samenvatting:

Fluorescentie is de eigenschap van materie om energie in de vorm van licht te absorberen en vervolgens, met enige vertraging, weer licht uit te stralen, meestal van een iets andere kleur. Fluorescente materialen zijn te vinden in de natuur, bijvoorbeeld in de kwal *Aequorea victoria*, in sommige planten, paddestoelen, en in minerale gesteenten zoals *Fluoriet*, waarvoor het fenomeen 'fluorescentie' het eerst wetenschappelijk beschreven is. Fluorescente materialen zijn een heel belangrijk bestanddeel van de elektrische verlichting waarmee we onze huizen en straten verlichten, met name in TL-buizen, spaarlampen, en witte LED-verlichting. In de levenswetenschappen zijn fluorescente moleculen niet weg te denken, omdat ze het mogelijk maken om functioneel belangrijke onderdelen van levende cellen en organische weefsels selectief te markeren en zichtbaar te maken in afbeeldingen door middel van 'fluorescentie-microscopie'. Welke kleur een fluorofor absorbeert, en uitzendt, en hoe lang dit uitzenden duurt zijn eigenschappen van het molecuul. Bovendien hangen deze eigenschappen af van de omgeving van het molecuul. Met behulp van nanoschaal metaalstructuren die als antenne dienen die gekoppeld kunnen worden aan een fluorofor, is het mogelijk om fluorescentie te beïnvloeden. Zo is het mogelijk fluoroforen sneller, en daarmee helderder te laten stralen, de polarisatie en de bundelrichting van de fluorescentie naar believen vorm te geven, en het spectrum te wijzigen.

Dit proefschrift is onderverdeeld in drie delen, en heeft als centraal thema, hoe verschillende toepassingen van fluorescentie door het gebruik van antennes verbeterd kunnen worden.

Het eerste deel van het proefschrift is toegespitst op het verbeteren van 'fluorescentie correlatie spectroscopie' (FCS) door middel van metalen 'plasmonische' antennes. FCS is een techniek om heel lokaal de mobiliteit te meten van fluorescente moleculen die diffunderen in een oplossing, door middel van het meten van fluctuaties in de fluorescentie intensiteit die optreden wanneer je fluorescentie aanslaat en verzamelt, vanuit een heel nauw focus gemaakt door een hoge numerieke apertuur microscoopobjectief. Deze fluctuaties ontstaan omdat moleculen willekeurig het detectievolume in en uit bewegen door Brownse beweging. In 2003 lieten Levene et al. zien dat ze het detectievolume wel duizendmaal konden verkleinen ten opzichte van dat in de beste microscoop, door FCS te meten in nanoschaal openingen van 50 nm doorsnede in een optisch dikke metaalfilm. In hoofdstuk 2 vatten we eerst samen hoe standaard FCS werkt in het focus van een microscoop. Vervolgens bespreken we de mogelijkheden om detectievolumes te verkleinen met het complement van een nanoschaal gat in een metaalfilm, namelijk een metalen nanodeeltje. Deze metalen 'Mie' bol geeft een complex gevormd detectievolume, met twee 'hot spots' die subgolflengte afmetingen hebben. In hoofdstuk 3 presenteren we een eenvoudig model waarmee FCS in willekeurig gevormde detectievolumes beschreven kan worden. We passen het model toe op het scenario waarin een diffractiegelimiteerd focus met daarin een plasmonische antenne met lokale veldversterking gebruikt wordt. De berekening laat zien wat de eisen aan plasmonische antennes zijn om FCS te verbeteren, en ook wat de beperkingen zijn. Zelfs bij aanzienlijke veldversterking vormt de fluorescentie die als achtergrond aanwezig is door het focus waarmee de antenne beschenen wordt een groot probleem, omdat het de sterke toename van het correlatiecontrast dat door de antenne gerealiseerd wordt grotendeels weer teniet doet.

Het tweede deel van het proefschrift beschrijft hoe de precieze positie van een fluorofor ten opzichte van een nanoschaal antenne zich vertaalt in eigenschappen in het verre veld anders dan de totale in een microscoop te meten intensiteit, zoals de hoekverdeling van licht, de fluorescente levensduur en polarisatie. In Hoofdstuk 4 laten we zien dat op basis hiervan het mogelijk moet zijn om de positie van een molecuul met nanometrische precisie te meten. Hiertoe moeten tegelijk de drie genoemde eigenschappen gemeten worden. Nanometer lokalisatie precisie is binnen bereik, binnen een meting van circa 1 ms integratietijd. Hoofdstuk 5 bediscussieert hoe in dit scenario diffusie van een fluorofor aanleiding geeft tot fluctuaties in meetbare grootheden anders dan intensiteit, waar standaard FCS op gebaseerd is. Fluctuatie correlatie spectroscopie van deze grootheden, dat wil zeggen, van bijvoorbeeld fluorescente levensduur en polarisatie, vermindert de problematiek aangestipt in hoofdstuk 3 sterk. Dat wil zeggen dat deze nieuwe vormen van fluctuatie correlatie spectroscopie veel minder gevoelig zouden moeten zijn voor achtergrond vanuit het focus waarmee de plasmon antenne aangeslagen wordt. Hoofdstuk 5 legt uit hoe het met deze techniek mogelijk moet zijn om volumes van plasmonische hot spots direct te meten. Voorwaarde voor deze meting, zoals bij alle vormen van fluorescentie correlatie spectroscopie, is wel nauwkeurige calibratie van de opstelling met behulp van een standaardoplossing. De reden is dat FCS intrinsiek een tijdschaal meet, en deze pas omgezet kan worden naar een plasmonische lengteschaal als er een bekende diffusieconstante in het spel is, of omgekeerd er pas een diffusieconstante afgeleid kan worden als de lengteschaal vast ligt. Deze lengteschaal is echter moeilijk *onafhankelijk* te bepalen voor een enkele nanoantenne. Hoofdstuk 6 bespreekt een ontwerp voor een plasmonisch antenne substraat waarbij calibratie niet meer nodig is, omdat het substraat bestaat uit een reeks nano-antennes op vaste afstanden van elkaar. Door slimme oriëntatie van de antennes levert dit een kruiscorrelatie op tussen metingen op verschillend gepolariseerde detectoren, die een calibratievrije bepaling van diffusieconstanten toestaat.

Deel drie van dit proefschrift bespreekt twee experimenten die zich toespitsen op de vraag hoe je de hoekverdeling van fluorescent licht van een incoherent ensemble van fluoroforen naar believen vorm geeft. Hoofdstuk 7 presenteert een aanzienlijke verbetering op de klassieke nano-apertuur metingen zoals die voor het eerst door Levene gerapporteerd zijn. In zulke experimenten wordt een groot deel van de fluorescentie niet door de detector verzameld, omdat een groot deel van de fotonen niet het objectief ingestraald wordt, maar aan het metaal gebonden blijven als zogenoemde 'oppervlakteplasmonen'. We laten zien hoe deze fotonen terug gewonnen kunnen worden door kleine periodieke gaatjesroosters te gebruiken die de oppervlaktegolf uitstralen als een nauwe bundel die precies de collectie-optiek in is gericht. Hoofdstuk 8 combineert fluorescentie met het concept 'meta-oppervlak'. 'Meta-oppervlakken' zijn roosters van metalen nano-antennes in een vlak, met een periodiciteit veel kleiner dan de golflengte van licht. In zo'n geval ziet een inkomende golf een effectief homogeen grensvlak, maar met reflectie en transmissie eigenschappen die bijna willekeurig ontworpen kunnen worden. We laten zien hoe een 'meta-oppervlak' met een complexe eenheidscel de verstrooiingsamplitude van verschillende diffractieordes beïnvloedt, en hoe dit zich vertaalt in een asymmetrisch gerichte afstraling van fluorescentie door ensembles van incoherente bronnen.