Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen
Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von:
Diplom-Physiker
Thomas Arno Klar
aus: Kösching bei Ingolstadt

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Januar, 2001

Thema

Progress in Stimulated Emission Depletion Microscopy

Gutachter: Priv. Doz. Dr. Stefan W. Hell
Prof. Dr. Josef Bille

Dissertation
submitted to the
Combined Faculties for the Natural Sciences and for Mathematics
of the Rupertus Carola University of Heidelberg, Germany
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

Progress in Stimulated Emission Depletion Microscopy

presented by:

Diplom-Physiker
Thomas Arno Klar
born in: Kösching bei Ingolstadt

Heidelberg, January, 17th, 2001

Referees: Priv. Doz. Dr. Stefan W. Hell
Prof. Dr. Josef Bille

Berichte aus der Physik

Thomas A. Klar

Progress in Stimulated Emission Depletion Microscopy

Shaker Verlag
Aachen 2001

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Klar, Thomas A.:
Progress in Stimulated Emission Depletion Microscopy /
Thomas Klar. Aachen : Shaker, 2001
(Berichte aus der Physik)
Zugl.: Heidelberg, Univ., Diss., 2001
ISBN 3-8265-8972-6

Copyright Shaker Verlag 2001
All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior permission of the publishers.

Printed in Germany.

ISBN 3-8265-8972-6
ISSN 0945-0963

Shaker Verlag GmbH • P.O. BOX 1290 • D-52013 Aachen
Phone: 0049/2407/9596-0 • Telefax: 0049/2407/9596-9
Internet: www.shaker.de • eMail: info@shaker.de

Abstract

This thesis presents the first realization of a fluorescence microscope with a point-spread-function substantially narrowed below 100 nm in all directions by depletion of the fluorescent state at the outer rim of the focus using stimulated emission. As a result, the traditional diffraction limit, set by Ernst Abbe more than 120 years ago, is overcome. Point-spread-functions are obtained that are, compared to a conventional fluorescence microscope, three-fold and six-fold narrower in lateral and axial directions, respectively.

Investigations of bleaching and its dependence on high laser intensities of the depleting beam are performed on several red dyes. A window of intensity is found where depletion of the fluorescent state is already very effective, but bleaching is negligible. The improved resolution is also demonstrated with samples of live bakers yeast and E. coli bacteria.

In addition, the possible use of the stimulated emission depletion microscope as an ultrafast tool for imaging dynamics down to the sub-picosecond range is briefly addressed.

Zusammenfassung

Diese Arbeit stellt die erstmalige Realisierung eines Fluoreszenz-Mikroskops dar, dessen Punktabbildungsfunktion wesentlich, d.h. auf unter 100 nm in allen drei Raumrichtungen, eingengt wird. Das wird erreicht durch Fluoreszenzlöschung mittels stimulierter Emission in den Randbereichen des Fokus. Dadurch wird die traditionelle Beugungsbegrenzung, formuliert von Ernst Abbe vor mehr als hundert Jahren, überwunden. Es werden Punktabbildungsfunktionen, die lateral bis zu dreifach und axial bis zu sechsfach schmäler als die eines konventionellen Fluoreszenzmikroskops sind, gemessen.

Für eine Reihe roter Farbstoffe wird die Verträglichkeit hoher Laserpulsenergien zur Fluoreszenzlöschung mit deren Bleichverhalten untersucht. Es wird ein Intensitätsbereich gefunden, bei dem die Fluoreszenzlöschung bereits sehr effektiv, ein Bleichen jedoch zu vernachlässigen ist. So kann die erhöhte Auflösung auch an lebenden Zellen der Bäckerhefe und an Colibakterien gezeigt werden.

Zusätzlich wird kurz auf die mögliche Verwendung dieses Mikroskops als ultraschnelles bildgebendes Verfahren zur Aufnahme dynamischer Abläufe bis hinab auf einer sub-Pikosekunden Zeitskala eingegangen.

Contents

1 Introduction **9**
1.1 A brief history of modern microscopy 9
1.2 Far-field microscopy still fashionable 11
1.3 Confocal fluorescence microscopy 12
1.3.1 Principles of operation 13
1.3.2 Importance of fluorescence microscopy in biomedical applications 14
1.4 Basic idea 15

2 Stimulated Emission in Microscopy **17**
2.1 Photophysics of dye molecules 17
2.2 Fluorescent molecules as four-level systems 19
2.3 Numerical Calculations 22
2.4 Experimental setup 26
2.5 Experimental verification 28
2.5.1 Establishing the effect 28
2.5.2 Exclusion of photobleaching at moderate peak intensities 30
2.5.3 Nonlinear relationship of STED-power and depletion efficiency 31
2.5.4 Photobleaching at high STED power and short pulses 33
2.6 STED efficiencies of red dyes 38
2.7 STED as a pump-probe technique in microscopy 46

3 Resolution Increase by Offset Beams **51**
3.1 Introduction 51
3.2 Influence of side-maxima on the effective PSF 53
3.2.1 Approaching perpendicularly to $\vec{\mathbf{E}}$-field orientation 53

3.2.2 Approaching parallel to $\vec{\mathbf{E}}$-field orientation 58
3.3 PSF-narrowing and STED-intensity 58
3.4 Applying two laterally offset beams 62

4 Phase Retardation Masks 65
4.1 Horizontally divided phase-retardation masks 66
4.1.1 Using a single STED-beam 67
4.1.2 Two STED-beams in a Mach-Zehnder setup 72
4.2 Circularly shaped phase-retardation masks 75
4.2.1 Three-dimensional PSF narrowing 75
4.2.2 Optical transfer function 79
4.2.3 Imaging live cells using STED-microscopy 82

5 Summary and Outlook 89

List of Abbreviations

4Pi	Type of scanning microscope using two opposing lenses coherently[1, 2, 3]
AFM	Atomic Force Microscope
APD	Avalanche Photo Diode
E. coli	Escherichia coli
det.	detection
Ar^+	Argon-ion (laser)
E-PSF	Effective Point Spread Function
em.	emission
ex., excit.	excitation
fl., fluo.	fluorescence
FWHM	Full Width at Half Maximum
HWHM	Half Width at Half Maximum
HR	High Reflector (dichroic mirror)
I^5M	As 4Pi but wide-field [4, 5, 6]
LB medium	Luria Broth medium
MCS	Multi Channel Scaler
NA	Numerical Aperture of a lens
OPO	Optical Parametric Oscillator
OTF	Optical Transfer Function
PSF	(Intensity) Point Spread Function
SNOM	Scanning Near-Field Optical Microscope
STED	Stimulated Emission Depletion(of the fluorescent state)
STM	Scanning Tunneling Microscope
Ti:Sa	Titanium Sapphire Laser
TTL	Transistor Transistor Logic (electronic standard)