



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Plasmonic enhancement of one-photon- and two-photon-excited single-molecule fluorescence by single gold nanorods

Zhang, W.

Citation

Zhang, W. (2018, June 27). *Plasmonic enhancement of one-photon- and two-photon-excited single-molecule fluorescence by single gold nanorods*. *Casimir PhD Series*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/62864>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/62864>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/62864> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Zhang, Weichun

Title: Plasmonic enhancement of one-photon- and two-photon-excited single-molecule fluorescence by single gold nanorods

Date: 2018-06-28

Samenvatting

Dit proefschrift beschrijft een verzameling experimentele pogingen om de fotoluminescentie van fluorescerende moleculen en quantumdots te versterken met gouden nanostaafjes (gold nanorods oftewel GNR's), alsmede relevante toepassingen hiervan. Er is speciale aandacht besteed aan de interacties tussen individuele emitters en GNR's. Bestudering van een afzonderlijke emitter geeft directe informatie over deze emitter en onthult op deze manier de karakteristieken en gedetailleerde processen van microscopische componenten die schuilgaan onder het macroscopische gedrag van het geheel in een conventionele ensemblemeting. De eerste drie hoofdstukken beschrijven de versterking van één-foton geëxciteerde fluorescentie van individuele moleculen. In de laatste twee hoofdstukken bespreken we de versterking van twee-foton geëxciteerde fluorescentie/luminescentie, waaraan in de literatuur veel minder aandacht wordt besteed. Hieronder vatten we de belangrijkste resultaten per hoofdstuk samen en bespreken we de mogelijkheden voor vervolgonderzoek.

Fluorescerende kleurstoffen die licht uitzenden in het nabije infrarood zijn vooral interessant bij in vivo toepassingen vanwege de afwezigheid van autofluorescentie en een groter doordringend vermogen. Helaas zijn de meeste van deze biocompatibele kleurstoffen zwakke emitters met een laag quantumrendement. Daardoor is het moeilijk om deze stoffen op enkelmoleculair niveau met conventionele enkelmoleculaire fluorescentiemicroscopie in beeld te brengen. In **hoofdstuk 2** beschrijven we hoe we GNR's hebben gebruikt om de fluorescentie van individuele moleculen van een nabij-infrarode kleurstof te versterken. De 'plaatselijke oppervlakte plasmonische resonantie' (localized surface plasmon resonance oftewel LSPR) van deze GNR's ligt in het nabij-infrarode gebied. GNR's met hun LSPR in het nabij-infrarood hebben vaak een hogere versterkingsfactor dan GNR's die resoneren in het spectrum van zichtbaar licht vanwege sterkere plasmonische resonanties en minder verlies in het metaal. In dit hoofdstuk visualiseren we de fluorescentieversterking van individuele moleculen in de buurt van GNR's met behulp van de omkeerbare hybridisatie tussen molecuuldragende DNA-oligomeren en hun complementaire DNA-strengen (transiënte binding). Complementaire DNA-strengen bieden de mogelijkheid om het gewenste doelmolecuul te binden bij de hotspot van de GNR. Wanneer de fluorescentie-intensiteit van één van de kleurstofmoleculen in de buurt van een GNR als functie van de tijd wordt gemeten, zijn deze gebeurtenissen zichtbaar als intensiteitspieken. Daarnaast hebben we ontdekt dat de hete elektronen, die door gefocuste, continue (CW) laserbestraling gegenereerd worden aan het oppervlak van plasmonische structuren, de Au-S binding tussen de DNA-oligomeren en goud kunnen verbreken. Dit hete-elektroneffect was tot nu toe alleen waargenomen met pulslasers.

DNA oligomeer-gebaseerde transiënte binding is een robuuste chemische benadering om de afstand en bindingstijd op efficiënte wijze onder controle te houden. Gecombineerd met plasmonische versterking kan een grote variëteit aan enkelmoleculair onderzoek worden overwogen. We beschrijven hoe we fluorescentie van moleculen op een specifiek punt bij een GNR hebben geobserveerd. In een dergelijke situatie kan de fluorescentieverster-

king onderzocht worden zonder fluctuaties ten gevolge van inhomogeniteiten van het lokale elektrisch veld. Men zou bijvoorbeeld de fluorescentieversterking kunnen onderzoeken van moleculen met verschillende kwantumrendementen doch geplaatst op dezelfde positie ten opzichte van de plasmonische nano-antenne.

In **hoofdstuk 3** laten we zien dat het mogelijk is om de redoxcycli van een enkel molecuul real-time te observeren door de fluorescentie te meten. We hebben afzonderlijke GNR's gebruikt om het fluorescentiesignaal van individuele redoxgevoelige methyleenblauwmoleculen te versterken zodat de elektrochemische eigenschappen van individuele moleculen bestudeerd konden worden. Door een enkel molecuul in de buurt van een GNR te fixeren zijn we in staat geweest om het aan- en uitgaan van de redox-geïnduceerde fluorescentie vast te leggen en te kwantificeren, en daarmee de midpuntpotentiaal van het molecuul te bepalen. De observatietijd van een molecuul wordt alleen beperkt door 'fotobleken' (uitdoven).

Individuele moleculen zijn lokale boodschappers binnen een complex systeem. Onze enkelmoleculaire elektrochemische techniek zou uitgebreid kunnen worden naar chemische en biologische systemen voor het meten van de lokale redoxpotentiaal. Op dit moment moeten metingen worden uitgevoerd in een systeem met een pH waarde van 2, om de midpuntpotentiaal van de elektronmediator overeen te laten komen met die van het methyleenblauw. In de toekomst zou het experimentele ontwerp geoptimaliseerd moeten worden zodat het ook werkt in fysiologische omstandigheden en daarmee toegepast kan worden in biologische systemen.

In **hoofdstuk 4** laten we zien dat GNR's in staat zijn de luminescentie van hetebandabsorptie te versterken. Hetebandabsorptie-geïnduceerde luminescentie laat een anti-Stokesverschuiving zien ten opzichte van de excitatiegolflengte. Op het eerste gezicht lijkt de anti-Stokesemissie veroorzaakt te worden door twee-fotonexcitatie vanwege de grote twee-fotonabsorptiedwarsdoorsnede van het bestudeerde squaraine fluorofoor, maar in werkelijkheid is het een één-fotonproces met een lineair verband tussen emissie-intensiteit en excitatievermogen. De anti-Stokes emissie kan worden geëxciteerd door zowel CW- als femtosecondelasers en de emissie-intensiteit is gelijk bij een gelijk excitatievermogen. Daarnaast hebben we een exponentiële temperatuurafhankelijkheid van hetebandabsorptie waargenomen.

Normaal gesproken is hetebandabsorptie een proces met een laag rendement. Dat komt doordat de optische excitatie moet beginnen bij een hoog vibratieniveau in de grondtoestand, en dat is energetisch niet gunstig. In dit hoofdstuk demonstreren we de haalbaarheid van het versterken van anti-Stokes luminescentie met een plasmonische GNR. In ons onderzoek hebben we een femtosecondelaser gebruikt, maar het zou ook moeten werken met een CW laser waarbij een soortgelijke versterking mag worden verwacht. Dit kan waardevol zijn voor fluorescentiemicroscopie omdat de lage achtergrond van anti-Stokes emissie verkregen kan worden zonder gebruik te hoeven maken van kostbare twee-foton microscopen.

Twee-foton geëxciteerde luminescentie komt vooral van pas bij het afbeelden van biologische monsters vanwege de geringe verstrooiing, groot doordringend vermogen en intrinsieke confocaliteit. Twee-fotonexcitatie zou moeten leiden tot een hogere excitatieversterkingsfactor dan één-fotonexcitatie vanwege het kwadratische verband tussen het excitatievermogen en de fluorescentie-intensiteit. Het is echter moeilijker om (bij enkelmoleculaire) twee-fotongeëxciteerde fluorescentie- / luminescentieversterking te demonstreren, omdat vorminstabiliteit van GNR's bij ultrasnelle laserbestraling het excitatievermogen en daarmee het emissiesignaal van fluoroforen beperkt. Dit is een probleem omdat elke keer

wanneer een GNR van vorm verandert, de versterkingseigenschappen verzwakken vanwege de sterke invloed van de positie van de LSPR op de vorm van de GNR. In **hoofdstuk 5** demonstren we met succes een tienduizendvoudige versterking van twee foton-geëxciteerde luminescentie van individuele quantumdots. Dit is mogelijk geweest dankzij de grotere twee-foton absorptiedwarsdoorsneden van quantumdots, die meestal duizend keer hoger zijn dan die van organische moleculen. De redelijke overeenkomst tussen de experimenteel verkregen versterkingsfactor en numerieke simulaties met behulp van elektromagnetische modellen bevestigt dat de kortstondige verbreding van de plasmonische resonantie door femtoseconde-excitatie geen beperkende factor is voor twee-foton geëxciteerde luminescentieversterking door individuele GNR's en dat een elektromagnetisch model voldoende is om de luminescentieversterking te beschrijven.

Naast fluorescentieversterking van quantumdots is het ook waardevol om de fluorescentie van twee-fotonexcitatie van organische kleurstoffen te versterken vanwege hun kleine afmetingen voor gebruik als labelprobe. In **hoofdstuk 6** bespreken we hoe we het probleem van GNR-ervorming hebben omzeild door de concentratie van moleculen te verhogen, waardoor we het versterkingseffect van een ensemble van moleculen bij een GNR hebben kunnen bestuderen. Metingen aan een enkele GNR hebben het mogelijk gemaakt om de invloed van fluorescentieversterking op de LSPR's van GNR's en het excitatievermogen systematisch te bestuderen. Verder bevestigen de resultaten dat, bij vermogens laag genoeg om geen vervorming te laten optreden, de twee-foton fluorescentieversterking niet merkbaar wordt beïnvloed door de plasmonische verbreding door femtosecondepulsen.

Vervolgonderzoek zou zich kunnen richten op het terugschalen van de huidige experimenten tot enkelmoleculair niveau. Daartoe moet, vanwege de zwakke twee-fotonemissie, een enkel molecuul dichtbij een GNR worden vastgemaakt zodat er genoeg tijd is om emissiefotonen van het molecuul te detecteren. Een veelbelovende optie is de DNA-transiënte bindingstechniek die wordt beschreven in hoofdstuk 2. De achtergrond van de GNR-luminescentie kan zowel spectraal worden gefilterd (door een banddoorlaatfilter) als tijdgebonden (luminescentie van GNR's is veel kortstondiger dan van fluorescente moleculen). Het verbeteren van de fothermische stabiliteit van GNR's door bijvoorbeeld silica coating, zou de vermogensdrempel waarbij vervorming optreedt kunnen verhogen, en daarmee het aantal getelde fotonen van individuele moleculen. Daardoor zou het eenvoudiger zijn om twee foton-geëxciteerde fluorescentieversterking te observeren.

Dit proefschrift toont het potentieel van GNR's voor fluorescentieversterking. Het volgende doel van het project is om de plasmonische versterking uit te breiden naar zwakkere emitters zoals lanthanide-ionen. Twee-fotonexcitatie zal worden gebruikt om toegang te krijgen tot fluoroforen die absorberen in het nabije UV, tussen 300 en 400 nm. We zullen plasmonische resonanties bij rode golflengtes gebruiken voor de excitatieversterking, terwijl de emissieversterking voor de rode luminescentie behouden blijft. Plasmonische versterking zal enkelmoleculaire spectroscopie in potentie beschikbaar maken voor nog zwakkere emitters.

