



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Plasmonic enhancement of single-molecule fluorescence under one- and two-photon excitation

Lu, X.

### Citation

Lu, X. (2021, December 8). *Plasmonic enhancement of single-molecule fluorescence under one- and two-photon excitation. Casimir PhD Series*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3245677>

Version: Publisher's Version

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3245677>

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

# Samenvatting

Dit proefschrift levert een algemene strategie voor de omgang met het voornaamste obstakel voor optische detectie van een enkel molecuul, namelijk dat het signaal van de meeste moleculen te zwak is in verhouding tot de achtergrond. Wanneer de detectiemethode is gebaseerd op fluorescentie kan de achtergrond efficiënt worden onderdrukt door spectrale filtering omdat de fotonen van de emissie een langere golflengte hebben dan die van de excitatie (ook wel “Stokes-shifted” emissie). Met detectie gebaseerd op plasmonische versterking zijn wij in staat om de helderheid van de fluorescente emissie te vergroten en daardoor de signaal tot ruis verhouding te verbeteren bij enkele molecuul detectie. Hiervoor maken wij gebruik van een enkel kristallijn goud nano staafje (GNS), omdat die een sterke nabij veld versterking heeft en een afstembare plasmonen resonantie. In deze studies onderzoeken wij theoretisch en experimenteel de detectie van fluorescentie versterkt door een enkel GNS of een GNS dimeer. Dit met als doel de detectie van moleculen met ultra zwakke emissie door lage kwantum opbrengst, tot zo laag als  $10^{-4}$ , of van moleculen onder twee-foton excitatie.

## **Een- en twee-foton geëxciteerde fluorescentie versterking: individueel GNS versus GNS dimeren**

Wij beginnen met een theoretische studie van de enkel-molecuul fluorescentie versterking door een individueel GNS en door een GNS-dimeer. Als voorbeeld gebruiken wij altijd staafjes met een diameter van 40 nm en een plasmonen resonantie van 765 nm. In deze studies onderzoeken wij drie verschillende kleurstof moleculen met heel verschillende absorptie en emissie banden. Onder zwakke excitatie kan de fluorescente versterking beschouwd worden als het product van de excitatie en emissie versterking. De simulaties laten zien dat de GNS-dimeer beter presteert, in verhouding tot een enkel GNS, voor zowel de mate van versterking van de excitatie als verkorting van de radiative levensduur. Het is interessant dat de GNS-dimeer ook een veel grotere versterking creëert in de niet-lineaire optische processen zoals bijvoorbeeld twee-foton geëxciteerde fluorescentie. Zoals gepresenteerd in hoofdstuk 2, laten onze simulaties zien dat voor een GNS-dimeer met een tussenruimte van 5 nm de versterkingsfactor voor twee-foton excitatie kan oplopen tot maar liefst  $10^8$ . De invloed van de plasmonen resonantie op de fluorescentie levensduur en de spectrale vorm is vervolgens bestudeerd, voor elke van drie verschillende kleurstofmoleculen. Tot slot laten wij zien dat bij hoge excitatie intensiteit voor zowel een-foton als twee-foton geëxciteerde fluorescentie de versterkingsfactor een gelimiteerd saturatie niveau bereikt in verhouding tot de radiatie versterking die de plasmonische structuren anders kunnen leveren.

## Kwantum opbrengst limieten voor de detectie van een enkel molecuul versterkt door een individueel GNS

Enkel-molecuul detectie technieken gebaseerd op fluorescentie zijn sterk afhankelijk van de emissie van het te onderscheiden molecuul ten opzichte van de achtergrond ruis. Dit werpt limitaties op voor de detectie van moleculen die zwakke emissie eigenschappen bezitten. Door versterking van de fluorescentie, gebruik makend van plasmonische nano structuren, zoals een GNS, kan de enkel-molecuul techniek uitgebreid worden naar meer soorten moleculen. Theoretische analyse geeft de indicatie dat moleculen met een lagere kwantum opbrengst, relatief grotere fluorescentie versterking ondergaan door de grotere emissie versterking. Echter zal het aantal emissie fotonen minder zijn dan bij een molecuul met een hoge kwantum opbrengst. In dit werk onderzoeken wij wat de lagere limiet is van de fluorescentie kwantum opbrengst waarbij enkel-molecuul detectie nog mogelijk is met plasmonisch versterkte fluorescentie door een enkel GNS. Hiervoor hebben we een special kleurstof molecuul ontworpen met een extreem lage kwantum opbrengst van  $10^{-4}$  en een vergelijkbaar grote Stokes-shift van  $3000 \text{ cm}^{-1}$ . Dit is om enkel-molecuul detectie te demonstreren bij fluorescentie versterking. Voor een molecuul met zulke grote Stokes-shift moeten zowel de excitatie als de fluorescentie versterking in beschouwing genomen worden om de beste signaal tot ruis verhouding voor enkel-molecuul detectie te vinden. Gebaseerd op de theoretisch optimale condities wordt experimenteel bevestigd dat enkel-molecuul detectie, van een molecuul met een kwantum opbrengst van  $10^{-4}$ , mogelijk is bij een versterkingsfactor van drie orde groter. Theoretische voorspellingen geven aan dat het signaal van een enkel molecuul met een lage kwantum opbrengst tot wel  $10^{-6}$  detecteerbaar zou kunnen zijn, mits het molecuul lang genoeg in het lokale plasmonische veld verblijft.

## Gecontroleerde synthese van GNS dimeren met uiteinde-aan-uiteinde configuraties

In vergelijking met een enkel metalen nanodeeltje kan de plasmonische koppeling tussen metaal nanodeeltjes de nabij veld versterking in de tussenruimte tussen de deeltjes vergroten, evenals de lokale dichtheid van foton toestanden. Door deze eigenschappen kan een aggregatie van nano deeltjes toegepast worden voor de versterking van ultra zwakke signalen, zoals twee-foton geëxciteerde fluorescentie. Deze signalen zijn normaal te zwak om op enkel molecuul niveau te detecteren, zelfs bij versterking met een enkel GNS. GNS-dimeren genereren enkele geconcentreerde plasmonische gebiedjes zonder dat daar de fluorescencie versterkings factor wordt verkleind. Hierdoor kunnen GNS-dimeer structuren beschouwd worden als de beste plasmon gekoppelde systemen, voor enkel-molecuul fluorescentie versterking. Dit is omdat ze ten eerste voorzien in een enkele locatie voor de fluorescentie versterking, en ten tweede omdat de fotoluminescentie achtergrond bijdrage van een GNS-dimeer klein is in vergelijking met die van multimeer aggregaties van goud deeltjes.

Van alle soorten nanodeeltjes ziet het er naar uit dat het GNS als een van de beste bouwstenen gezien kan worden voor het maken van plasmonische dimeer structuren. Simpelweg vanwege de smalle, intense en afstelbare plasmonen resonantie met licht. Wij passen hier twee strategieën toe voor de synthese van uiteinde-aan-uiteinde GNS-dimeren, waarbij gebruik wordt gemaakt van biotinylerd streptavidin, als moleculaire verbinder. Eerst wordt

een assemblage methode geïllustreerd waarbij goud nano-staafjes en gebiotinyleerde streptavidin in bulk vloeistof samen komen. De gebiotinyleerde streptavidin kan specifiek aan de uiteinden van een GNS binden in de aanwezigheid van de surfactant cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) en daardoor er voor zorgen dat er een monster van uiteinde-aan-uiteinde geassembleerde goud nano-staafjes wordt gevormd. De assemblage wordt gemonitord door het extinctie spectrum te meten van de vloeistof waarin de assemblage plaatsvindt. Daarna worden de geassembleerde structuren gedeponereerd op een dekglas en droog bewaard tussen twee glaasjes. Als tweede strategie presenteren wij GNS-dimeer assemblage direct op een dekglas. Op een schoon dekglas werden eerst individuele goud nano-staafjes geïmmobiliseerd en vervolgens, specifiek aan het uiteinde, gefunctionaliseerd met gebiotinyleerde streptavidin. Daarna hebben de linkers aan de uiteinden van de geïmmobiliseerde goud nano-staafjes de kans om een tweede GNS uit de oplossing te binden, om een dimeer structuur te vormen. Door gedurende de assemblage de twee glaasjes, waartussen het proces plaats vindt, ondersteboven te draaien, kunnen de dimeren worden gescheiden van de onontkoombare multimeer assemblages in de oplossing. Zo verkrijgen wij gezuiverde dimeer structuren op het dekglas. Meer details zijn te vinden in hoofdstuk 4.

## **Twee-foton geëxciteerde enkele molecuul fluorescentie versterking**

Twee-foton geëxciteerde fluorescentie verwijst naar het niet-lineaire optische proces waarbij de emissie van een fluorescent molecuul voort komt uit de absorptie van twee fotonen van identieke frequentie. In vergelijking met een-foton excitatie heeft twee-foton geëxciteerde spectroscopie de voordelen van gereduceerde licht verstrooiing, diepere monster penetratie en intrinsieke optische diepte scheiding. Enkele molecuul detectie van twee-foton geëxciteerde fluorescentie is echter uitdagend door de extreem kleine twee-foton absorptie cross sectie van de meeste moleculen. Hier hebben wij de uiteinde-aan-uiteinde geassembleerde GNS structuren toegepast voor het versterken van enkele molecuul fluorescentie bij twee-foton excitatie. Simulaties laten zien dat voor uiteinde-aan-uiteinde GNS-dimeren met een tussenruimte van 5 nm een totale fluorescentie versterking van  $10^7$  bereikt kan worden in de kleine ruimte tussen de twee goud nano-staafjes. Met behulp van deze versterkingsfactor hebben we succesvol twee-foton geëxciteerde fluorescentie gemeten van een enkel ATTO 610 molecuul.

