

# Een molecuul als detector van sub-golflengte veldverdelingen

Joost-Anne Veerman, Maria Garcia-Parajo, Kobus Kuipers & Niek van Hulst  
Technische Optica, Faculteit Technische Natuurkunde & MESA<sup>+</sup> Onderzoek  
Instituut, Universiteit Twente, Postbus 217, 7500 AE Enschede

## Trefwoorden:

Single molecule detection, near-field scanning optical microscopy.

## Samenvatting

Optische velden op nanometer schaal zijn slechts te adresseren door bronnen/detectoren met nanometer dimensies. Enerzijds kan men bron- of detector-dimensies verkleinen tot subgolflengte: nabije-veld optische probes, anderzijds kan men moleculen of nanokristallen inzetten om het lokale veld in detecteerbare emissie om te zetten. Hier beschrijven wij de combinatie: individuele moleculen in het lokale optische veld van een nabije-veld probe.

Nabije-veld optische microscopie (*near-field scanning optical microscopy*, NSOM) vereist een nabije-veld probe van hoge kwaliteit met een bronopening die substantieel kleiner is dan de gebruikte golflengte. Recentelijk hebben we hoge definitie NSOM-probes ontwikkeld door middel van etsen met gefocusseerde ionen bundel (*focused ion beam*, FIB) (Veerman *et al.*, 1998). Deze probes geven een "grote" helderheid ( $\sim 1$  microWatt), bij  $< 80$  nm opening ( $\sim 10^4$  W/cm<sup>2</sup>), polarisatie extinctie ratio  $> 1:100$ , een goede rand-scherpte (6 nm) en een vlakker oppervlak dan conventionele NSOM-probes. Een eerste indruk van deze optische nano-bronnen verkrijgen wij door beelden te maken met behulp van een FIB, met verre-veld optische metingen en met een schuif-kracht (*shear force*) microscoop (SFM). De FIB-beelden verschaffen geometrische informatie, en

de verre-veld optische metingen leveren transmissie- en polarisatiekarakteristieken op. Shear force microscopie is een niet eerder gebruikte methode om de grootte van de opening en het oppervlak van de probe te bestuderen (met een ruwheid kleiner dan 1.5 nm).

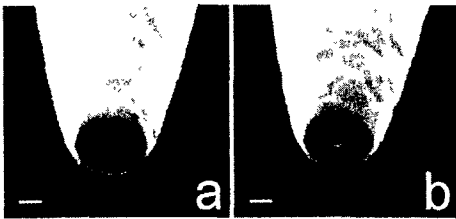
De lokale optische velden hebben wij bepaald met *single molecule imaging* in het nabije veld. Hier demonstreren we het gebruik van individuele moleculen om de volledige driedimensionale optische nabije veld-distributie van de probe te meten met een ruimtelijke resolutie op moleculaire schaal. De *single molecule images* vertonen verschillende intensiteitspatronen, afhankelijk van de orientatie van de moleculen ten opzichte van de probe. Uit de patronen is zowel de positie als de dipool-oriëntatie van de individuele moleculen direct te bepalen. De optische resolutie van de moleculaire patronen wordt niet bepaald door de grootte van de opening, maar door de hoge gradiënt van het optische veld aan de rand van de opening.

## 1. Focused ion beam etsen van NSOM-probes

De optische eigenschappen van Al coated NSOM-fiber-probes kunnen sterk verbeterd worden door deze vanaf de zijkant te etsen met een gefocusseerde ionen bundel (Veerman *et al.*, 1998). Deze behandeling geeft een oppervlak met een scherpe cirkel-symmetrische opening waar geen individuele Al-korrels op zitten. De kleinste opening tot nog toe gefabriceerd is 20 na-

nometer Ook het polarisatie-gedrag van de probes is cirkelsymmetrisch met een polarisatieratio beter dan 1:100. Fluorescentiesignalen van individuele moleculen zijn met de nieuwe probes meer dan een orde-grootte sterker dan voor "conventionele" apertuur probes met dezelfde opening, typisch  $10^6$  photocnts/sec. Met de nieuwe probes kunnen we de tijdsresolutie waarmee de fluorescentie van de individuele moleculen onderzocht wordt opschrijven naar het microsec bereik (100 photocnts/10  $\mu$ s). Hierdoor hebben we voor het eerst met NSOM *real time* quantum sprongen van individuele moleculen tussen singlet en triplet toestand (inter-system-crossing) kunnen volgen (Veerman *et al.*, 1999).

Met het FIB-apparaat kan een afbeelding met hoge resolutie gemaakt worden door secundaire electronen, gegenereerd bij het scannen met de ionenbundel, te detecteren. Op deze manier kunnen de grootte van de opening en dikte van de coating tot op 5 nm nauwkeurig bepaald worden (Veerman *et al.*, 1998). In figuur 1 zijn twee



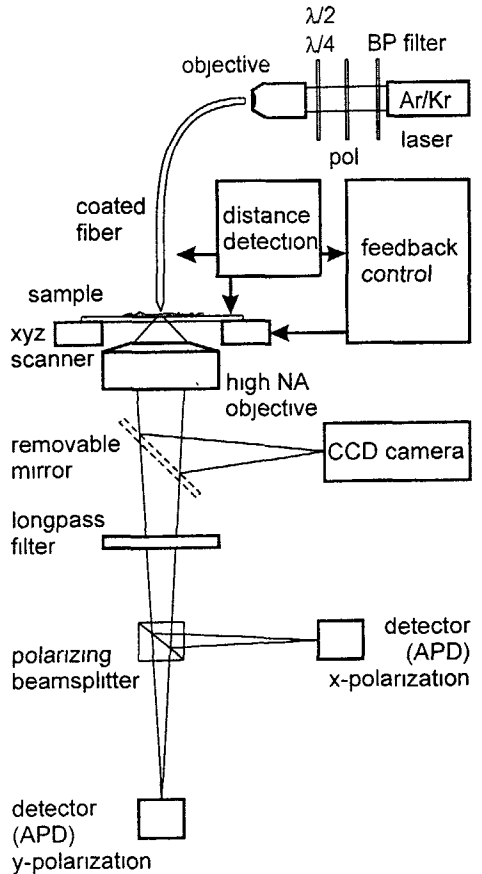
**Figuur 1:** Focused ion beam (FIB) beelden van FIB geëtste NSOM-probes, waarvan de openingen een diameter hebben van (a)  $70 (\pm 5)$  nm en (b)  $45 (\pm 5)$  nm

De probes hebben een vlak eindvlak met cirkelsymmetrische opening en een scherpe glasmetaal overgang  
Schaal: 200 nm.

afbeeldingen te zien van FIB geëtste probes met openingen van respectievelijk  $70 (\pm 5)$  nm (figuur 1a) en  $45 (\pm 5)$  nm (figuur 1b). Let vooral op de scherpe cirkel-

symmetrische randen, het vlakke oppervlak en de gladde aluminium coating vrij van kristallijne korrels.

Voor nabij veld detectie van individuele moleculen wordt de probe in een scannende probe microscoop geplaatst (figuur 2). Het



**Figuur 2:** Schema van een scannende microscoop voor nabij veld detectie van individuele moleculen.

sample met moleculen wordt met nanometer precisie bewogen t.o.v. de probe d.m.v. feedback op de x,y,z posities. Moleculaire fluorescentie wordt via een hoog NA objectief op avalanche photodiodes (APD) afgebeeld. Verschillende polarisatie componenten maken het mogelijk de

excitatie- en emissiepolarisatie te controleren.

## 2. Shear-force microscopy

De ideale NSOM-probe heeft een perfect glad oppervlak om een sample-oppervlak zo dicht mogelijk bij de opening te kunnen plaatsen. De oppervlakteruwheid van conventionele probes, bepaald wordt door de kristalkorrelgrootte van de aluminium coating, is op z'n best  $\sim 20$  nm (Hollars & Dunn, 1998). Dit ruwe oppervlak vergroot de afstand tussen oppervlak en opening, waardoor zowel de optische resolutie als de lokale veldsterkte verminderen. Daarnaast verstoren de korreltjes vaak de omtrek van de opening, hetgeen leidt tot een onregelmatige lokale veldverdeling en een verstoring van de polarisatie, zodanig dat de probe ongeschikt is voor kwantitatieve metingen.

Enige oppervlakte-ruwheid van onze FIB geëtste probes is met de resolutie van een FIB-apparaat ( $\sim 5$  nm) niet te meten. Voor een adequate meting van die ruwheid zou een scanner nodig zijn met sub-nanometer resolutie. Het is echter praktisch onmogelijk om het oppervlak van de probe te scannen met een AFM of STM. Daarom hebben we gekozen voor een alternatieve benadering.

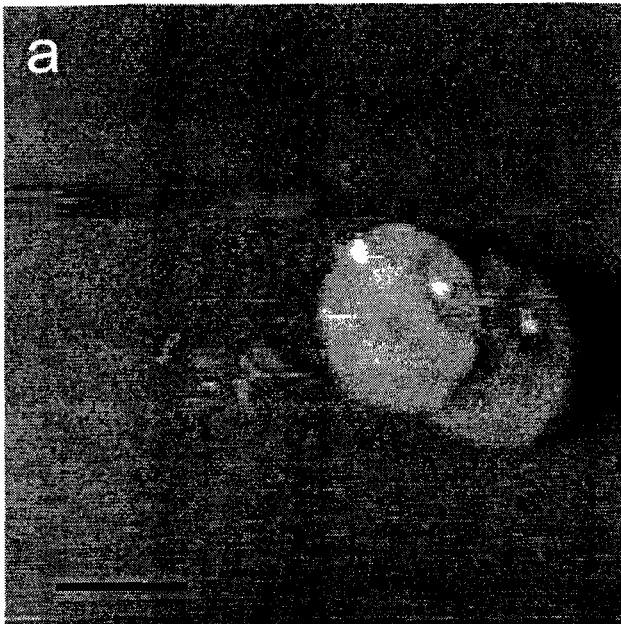
Meestal wordt de schuifkracht gebruikt als een maat om de afstand tussen probe en sample te regelen, wanneer een oppervlak gescand wordt met een NSOM-probe. Wij gebruiken een kwarts kristallijne stemvork (32 kHz) als krachtsensor (*tuning fork shear-force feedback*, Karrai & Grober, 1995) met een hoogteresolutie van typisch 0.1 nm (Ruiters *et al.*, 1997a). Om een FIBbed NSOM-probe ( $\sim 100$  nm opening) te testen hebben we deze, in *shear force feedback*, over een extreem vlakke en dunne polymeerfilm (PMMA) gescand. Een oppervlaktescan is gegeven in figuur 3a. In het algemeen is de resolutie van zo'n scan een convolutie van de vorm van de probe en de topografie van het sample. In dit geval is oppervlakteruwheid van het sample veel

kleiner dan de afmeting van de probe. Dit heeft tot gevolg dat kleine uitsteekselletjes op het sample zich als probes gaan gedragen, die het oppervlak van de NSOM-probe in kaart brengen (zie figuur 3b). Beide cirkels in het rechterdeel van figuur 3a stellen het oppervlak van de NSOM-probe voor. Uit het plaatje blijkt dat de RMS ruwheid van het probe eindvlak minder dan 1.5 nm is. Verder zijn te zien twee kleine deeltjes die blijkbaar aan het oppervlak van de probe zitten en een iets lager gelegen deel van de probe aan de rechterkant.

In het midden van de cirkels is een donker gebied van  $100 (\pm 5)$  nm zichtbaar dat de probe opening voorstelt. Op deze manier kan de grootte van de opening onafhankelijk van de FIB-beelden bepaald worden. De waarden komen uitstekend overeen. Het contrast in dat gebied suggereert dat de glas opening iets lager ligt dan het omliggende oppervlak (ongeveer 2 nm). Hoewel bekend is dat FIB-etsen sterk anisotropisch is, onafhankelijk van het materiaal, kunnen we niet uitsluiten dat het etsen de oorzaak is van het geobserveerde hoogteverschil. Meer waarschijnlijk is het contrast van de probe opening in figuur 3a niet een reëel hoogteverschil, maar een gevolg van het verschil in materiaal tussen de coating (aluminium) en de opening (silica). Het is bekend dat de probe-sample interactiekracht gevoelig is voor chemische sample eigenschappen (Ruiters *et al.*, 1997a). Voor een gegeven kracht stelt de feedback lus bij het hydrofiele glas een grotere afstand in dan bij het metaal.

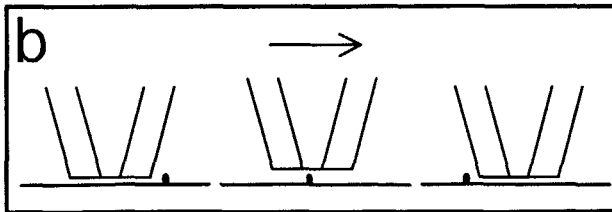
## 3. Metingen met behulp van individuele moleculen

De beste manier om gedetailleerde informatie te verkrijgen over de verdeling in het optische nabije veld rond de opening van een NSOM-probe, is door een enkel fluorescerend molecuul te gebruiken als een lokale detector/emitter (Betzig & Chichester, 1993, Veerman *et al.*, 1998). Een kleurstof molecuul zal alleen worden aangeslagen als het optische elektrische veld een polarisatie component bezit paral-



**Figuur 3:**

Hoogtebeeld (2.4 bij 2.5  $\mu\text{m}$ ) van een dunne PMMA-film, verkregen door de film te scannen met een 100 nm NSOM-probe met shear force-feedback. De twee cirkels zijn hoogtebeelden van het eindvlak van de probe. Deze zijn gemaakt met behulp van kleine uitsteeksels in het filmoppervlak, zoals geïllustreerd in figuur 3b



De donkere stip in het midden van de schijven stelt de probeopening voor. De afbeelding is een onafhankelijke maat voor de grootte van de opening en de ruwheid van het probeoppervlak, die kleiner is dan 1.5 nm.

Schaalstreep: 500 nm

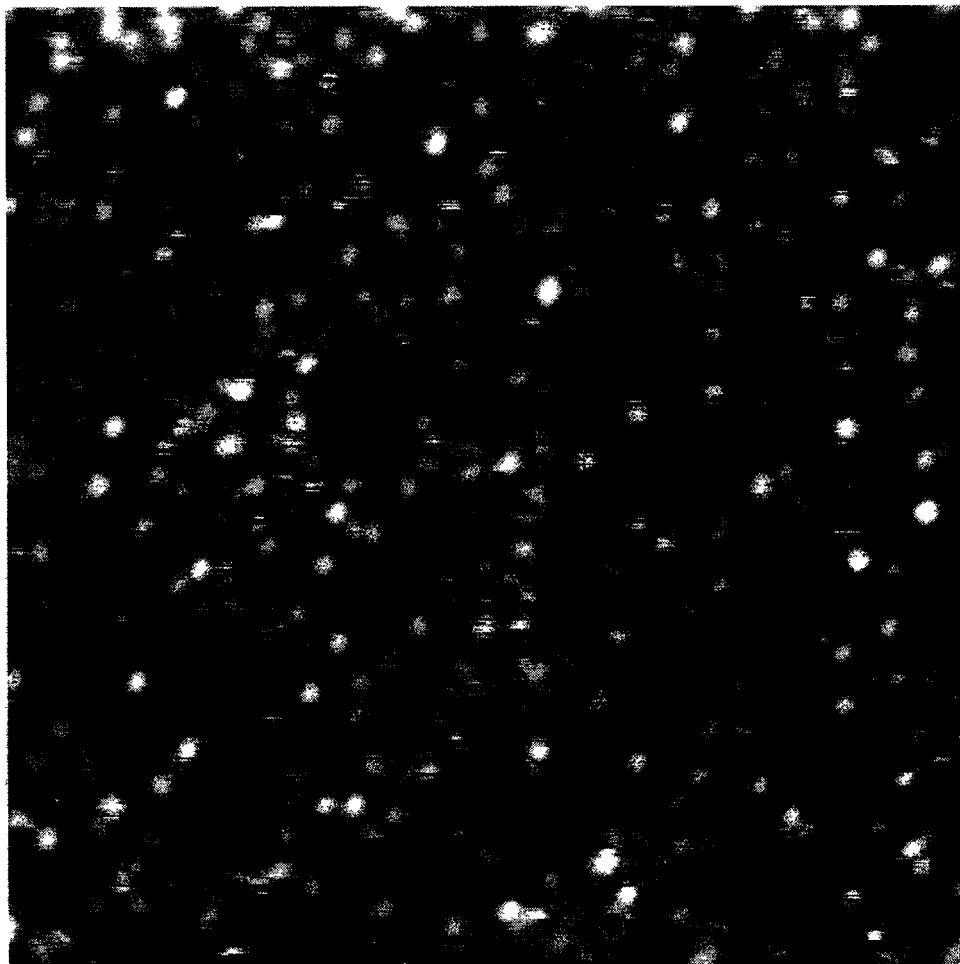
lel aan het absorptiedipoolmoment. Door een kleurstof molecuul met een vaste oriëntatie te bewegen in het nabije veld van de NSOM-probe, wordt de vectoriële component van het lokale elektrische veld in die richting in kaart gebracht met een nauwkeurigheid op subnanometer schaal, uiteindelijk beperkt door de absorptiedoorsnede van het molecuul. We hebben de driedimensionale optische nabije veld verdeling van onze FIBbed NSOM-probes gemeten voor verschillende polarisatietoestanden. De details van de opstelling zijn elders beschreven (Ruiter *et al.*, 1997b). Figuur 4 toont een typische NSOM fluorescentie-afbeelding van enkele honderden ruimtelijk verdeelde, willekeurig verspreide DiIC<sub>18</sub> moleculen. Hierbij werd de probe

van figuur 1a, met een opening van 70 nm, gebruikt, met circulair gepolariseerd licht, zoals gemeten in het verre veld. Dankzij de kleine opening van de probe was het mogelijk om elk molecuul afzonderlijk te exciteren en detecteren. De optische resolutie van verre veld diffractie gelimiteerde methodes (zoals confocale of conventionele wijd-veld microscopie) zou zeker onvoldoende zijn om de moleculen in dit sample ruimtelijk te onderscheiden.

Het meest opvallend echter in figuur 4 zijn de verschillende vormen en intensiteit van de afzonderlijke moleculen. Sommige moleculen worden weergegeven als cirkelvormige punten, terwijl andere op symmetrische of asymmetrische ringen lijken. Dit

betekent dat een molecuul selectieve excitatie ondergaat die een functie is van zijn positie ten opzichte van de opening van de probe. Deze functie verschilt van molecuul tot molecuul en is afhankelijk van de oriëntatie van het moleculaire absorptiedipool-

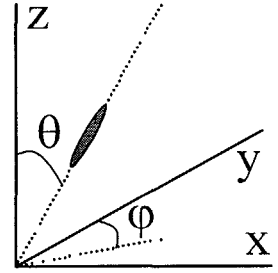
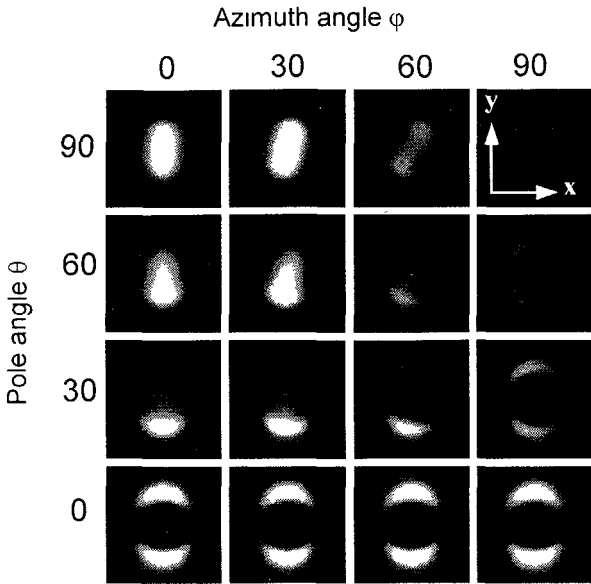
moment in relatie tot de polarisatie van het lokale optische veld. Omdat de moleculen in de PMMA-film willekeurige oriëntaties hebben, kunnen alle mogelijke polarisatiecomponenten van de probe op deze manier gemeten worden.



**Figuur 4:**

NSOM fluorescentiebeeld (4,8 bij 4,8  $\mu\text{m}$ ), verkregen met de 70 nm-probe van figuur 1a. Te zien zijn individuele D1C18 moleculen, ingebed in een 10 nm dunne PMMA-film. Er is circulaire gepolariseerd excitatie gebruikt, zoals gemeten in het verre veld. De moleculen in de afbeelding hebben niet allemaal dezelfde vorm en intensiteit. Dat komt doordat het absorptiedipoolmoment, afhankelijk van de diverse moleculaire oriëntaties, met verschillende polarisatiecomponenten van het optische veld van de probe overlapt.

Schaalstreep 1  $\mu\text{m}$



**Figuur 5:**

Berekende intensiteitspatronen voor een enkel molecuul, dat in verschillende oriëntaties op 15 nm afstand van een 100 nm-probe ligt. De polarisatie-richting van het inkomende licht is lineair langs de y-as. Elk van de afbeeldingen geeft een gebied van 200 bij 200 nm weer. De azimuth-hoek ligt in het vlak van de opening en wordt gemeten vanaf de polarisatie-richting (y). De poolhoek wordt gemeten vanaf de normaal van het vlak van de opening.

Reeds tijdens de 2<sup>e</sup> wereldoorlog publiceerde Hans Bethe (1944) analytische uitdrukkingen voor de distributie van het elektrische veld in een sub-golflengte opening in een metaal scherm, in verband met radar toepassingen (Bouwkamp, 1950ab). Meer recent hebben Novotny *et al.* (1995) numerieke simulaties aan NSOM-probe modellen uitgevoerd. Het vergelijken van deze resultaten met experimentele gegevens is slechts zelden gelukt (Betzig & Chichester, 1993), vanwege de onbekende en ongecontroleerde configuratie van de meeste NSOM-probes. De kwaliteit van de FIBbed NSOM-probes is nu zodanig, dat we de patronen van individuele moleculen van figuur 4 "routine-matig" kunnen waarnemen (Veerman *et al.*, 1998). We hebben de uitdrukkingen van Bethe en Bouwkamp gebruikt om intensiteitspatronen te berekenen, die we

met onze experimentele gegevens konden vergelijken. Figuur 5 laat een serie van zulke berekende patronen zien voor verschillende oriëntaties van een molecuul, dat zich een afstand van 15 nm bevindt van een opening van 100 nm. De polarisatie-richting van het inkomende licht is lineair langs de y-as. Er komen grote variaties in het intensiteitspatroon voor: van een elliptische vorm voor een molecuul dat in het vlak van het sample en langs de polarisatie-richting van de excitatie ligt, tot een dubbele boog voor een molecuul dat loodrecht op het vlak van het sample is georiënteerd. Hierbij moet men bedenken dat de richting loodrecht op het vlak, de z-richting (poolhoek  $\varphi = 0$ ), overeenkomt met de propagatie-richting (*k*-vector) van het licht invallend op de opening. Aan de rand van de opening heeft het lokale veld dus een z-component, evenwijdig aan de oorspronkelijke



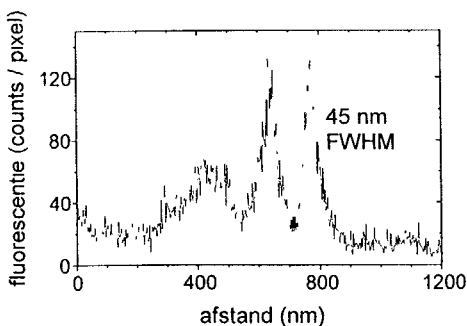
**Figuur 6:**

Serie van drie NSOM-fluorescentie-afbeeldingen van een set  $\text{DiIC}_{18}$ -moleculen ( $1.2$  bij  $1.2 \mu\text{m}$ ), ingebed in een  $10 \text{ nm}$  dunne PMMA-film, gemeten met  $70 \text{ nm}$ -probe van figuur 1a. De excitatie-polarisatie-richting van het gebruikte licht (zoals gemeten in het verre veld) werd gevarieerd van (a) linear langs de verticale as van het plaatje, (b) linear langs de horizontale as, naar (c) circular. Zoals te zien is aan het omcirkelde molecuul, waarvan absorptiedipoolmoment dat loodrecht op het vlak van het sample staat, verandert het intensiteitspatroon van de moleculen in overstemming hiermee. Schaalstreep:  $300 \text{ nm}$

**$k$ -vector** Dit is een typische sub-golflengte effect, waarbij lokaal niet-propagerende velden optreden. De berekende patronen komen sterk overeen met de experimentele patronen die we verkrijgen met de FIB-gemodificeerde probes. In figuur 6a-c zijn in meer detail drie opeenvolgende NSOM-fluorescentie-afbeeldingen te zien die de overeenkomst aantonen. Het zijn afbeeldingen van hetzelfde sample als in figuur 4, gemaakt met de  $70 \text{ nm}$ -probe van figuur 1a. De richting van de verre veld-polarisatie (en dus de elektrische nabije veld-distributie van de probe) was verschillend voor elke afbeelding. Het is duidelijk te zien dat het intensiteitspatroon van de moleculen dienovereenkomstig verandert. De fluorescentie van sommige moleculen gaat aan/uit door de lineaire polarisatie over  $90^\circ$  te draaien. Moleculen georiënteerd loodrecht op het vlak laten een karakteristieke dubbele boog zien, waarvan de maxima met de lineaire polarisatie meedraaien: de locale  $z$  veld component. Deze laatste moleculen, met hun dipool langs de  $k$ -vector, zijn in het verre veld niet te exciteren, tenzij men zeer schuin belicht. De moleculaire patronen laten gedetailleerd de optische nabije veld-distributie van een NSOM-probe

zien, met ruimtelijke resolutie op moleculaire schaal

Het fluorescentiecontrast dat we waarneemen is inderdaad puur optisch van aard. Omdat er geen hoogteverschillen op het sample zijn, wordt het contrast daar niet door beïnvloed (Hecht *et al.*, 1997). Figuur 7 laat het verloop van de fluorescentie zien



**Figuur 7:**

Verloop van de fluorescentie langs de verticale lijn in figuur 6c door één van de ringvormige moleculen. De FWHM optische resolutie is  $45 \text{ nm}$ , een waardie die niet zozeer door de grootte van de opening ( $70 \text{ nm}$ ) bepaald wordt, als wel door de scherpte van de rand van de opening en de afstand tussen molecuul en probe

langs de verticale lijn in figuur 6c. De FWHM van de pieken is 45 nm, een waarde die aanmerkelijk kleiner is dan de grootte van de opening (70 nm). Het is bekend dat hoe scherper de randen van de opening zijn, des te groter de gradiënt is van het elektrische veld en des te uitgesprokener de nabije veld-intensiteitspatronen zijn (Bethe, 1944; Bouwkamp, 1950ab; Novotny *et al.*, 1995). Daarnaast divergeert het veld en vermindert de resolutie bij een toenemende afstand van de probe tot het sample. De effectieve resolutie wordt dus bepaald door zowel de scherpte van de rand van de opening (die uiteindelijk gelimiteerd is door de optische penetratiediepte van 6.5 nm voor aluminium) als de afstand tussen het molecuul en de probe (ongeveer 15 nm).

Een onverwacht resultaat in de afbeeldingen van figuur 4 en 6 zijn de gedetecteerde polarisatie variaties binnen het intensiteitspatroon van een enkel molecuul. Bij een bepaalde oriëntatie van een molecuul verwachten we één bepaalde polarisatie, zoals in figuur 6. Toch nemen we een wijziging in de emissiepolarisatie waar, die afhangt van de positie van het molecuul ten opzichte van de probe. We zijn nu bezig dit effect, dat waarschijnlijk veroorzaakt wordt doordat de probe het dipoolstralingspatroon verstoort, te onderzoeken. Tenslotte is een ander onderwerp van huidig onderzoek de relatieve intensiteit van de signalen voor verschillende moleculen. De berekende afbeeldingen in figuur 5 zijn allemaal genormaliseerd om de intensiteiten van de pieken gelijk te stellen, maar in werkelijkheid kunnen de piekintensiteiten van de verschillende patronen ongeveer twee ordegrottes verschillen. Daarnaast verwachten wij dat de veldgradiënt in z-richting afhangt van x,y: in het hart van de apertuur een veldafname bepaald door de apertuurgrootte (70 nm); aan de rand van de apertuur een veldafname bepaald door de Al penetratiediepte (6.5 nm). We zijn bezig om de relatieve intensiteitsverschillen van de pieken (tussen de cirkel- en de ringvormige patronen) te combineren

met adequate modellen voor de dipoolstralingspatronen.

In conclusie moge het duidelijk zijn dat in bovenstaande experimenten zowel molecuul als nabij veld probe wederzijds iets over elkaar vertellen. Het molecuul kan worden gelocaliseerd met  $\sim 1$  nm nauwkeurigheid. Absorptie/emissie moment oriëntatie kan worden bepaald met enige graden nauwkeurigheid. Met de FIB fabricage-methode kunnen locale veld gradiënten op 6.5–45 nm afstand worden gerealiseerd, bovendien met een veld component parallel aan de inkomende propagatierichting.

We bedanken Bert Otter voor zijn assistentie met de FIB-machine en Agnes Mewe en Martijn van Raaij voor de Nederlandse bewerking van deze tekst. Dit onderzoek is financieel gesteund door de Stichting voor Fundamenteel Onderzoek der Materie (FOM).

## Referenties

- Bethe, H.A. (1944) Theory of diffraction by small holes. *Phys. Rev.* **66**, 163-182.
- Betzig, E. & Chichester, R. (1993) Single molecules observed by near-field scanning optical microscopy. *Science* **262**, 1422-1425.
- Bouwkamp, C.J. (1950) On Bethe's theory of diffraction by small holes. *Philips Res. Rep.* **5**, 321-332; On the diffraction of electromagnetic waves by small circular disks and holes. *Philips Res. Rep.* **5**, 401-422.
- Hecht, B., Bielefeldt, H., Inouye, Y., Pohl, D.W. & Novotny, L. (1997) Facts and artifacts in near-field optical microscopy. *J. Appl. Phys.* **81**, 2492-2498.
- Hollars, C.W. & Dunn, R.C. (1998) Evaluation of thermal evaporation conditions used in coating aluminum on near-field fiber-optic probes. *Rev. Sci. Instr.* **69**, 1747-1752.
- Karrai, K. & Grober, R.D., (1995) Piezoelectric tip-sample distance control for near-field optical microscopes. *Appl. Phys. Lett.* **66**, 1842-1844.



- Novotny, L., Pohl, D.W. & Hecht, B. (1995) Scanning near-field optical probe with ultrasmall spot size. *Opt. Lett.* **20**, 970-972, en referenties daarin.
- Ruiter, A.G.T., Veerman, J.A., van der Werf, K.O. & van Hulst, N.F. (1997) Dynamic behavior of tuning fork shear-force feedback. *Appl. Phys. Lett.* **71**, 28-30.
- Ruiter, A.G.T., Veerman, J.A., Garcia-Parajo, M.F. & van Hulst, N.F. (1997) Single molecule rotational and translational diffusion observed by near-field scanning optical microscopy. *J. Phys. Chem. A* **101**, 7318-7323.
- Veerman, J.A., Otter, A.M. Kuipers, L. & van Hulst, N.F. (1998) High definition aperture probes for near-field optical microscopy fabricated by focused ion beam milling *Appl. Phys. Lett.*, **72**, 3115-3117.
- Veerman J.A., Garcia-Parajo M.F., Kuipers L. & van Hulst N.F. (1999) Single molecule mapping of the optical field distribution of probes for near-field microscopy *J. Microscopy* **192**, 432.
- Veerman, J.A., Garcia-Parajo M.F., Kuipers, L. & van Hulst, N.F. (1999) Time-varying triplet state lifetimes of single molecules. *Phys. Rev Lett.* **83**, in print.