

## Raman Imaging

# Molekulares Imaging: Raman, CARS und TERS

MICHAEL SCHMITT<sup>1</sup>, CHRISTOPH KRAFFT<sup>2</sup>, JÜRGEN POPP<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>INSTITUT FÜR PHYSIKALISCHE CHEMIE, FRIEDRICH-SCHILLER-UNIVERSITÄT JENA

<sup>2</sup>INSTITUT FÜR PHOTONISCHE TECHNOLOGIEN E. V., JENA

**Raman basierte Imaging-Methoden werden immer populärer in den Lebenswissenschaften, da sie nicht-invasiv und labelfrei sind und Bilder mit chemischem Kontrast d. h. hoher molekularer Selektivität liefern.**

Raman based imaging technologies are becoming more and more popular in life sciences since they are non invasive, labelfree and reveal images with chemical contrast i. e. high molecular selectivity.

■ Molekulare Bildgebungsverfahren erlangen immer mehr an Bedeutung in den Lebenswissenschaften und der Medizin. Hierbei gelingt es besonders optischen Methoden immer weiter in zelluläre und subzelluläre Regionen vorzudringen. Als vorteilhaft hat sich der Einsatz von spektroskopischen Verfahren erwiesen, welche neben Bildinformationen direkten molekularen Kontrast liefern, was die Aufklärung von z. B. Zellfunktionen ermöglicht. So gehört die Fluoreszenzmikroskopie mittlerweile zur Standardausstattung moderner Biologielabors, und nahezu 80 Prozent aller biomedizinischen Mikroskopiestudien werden mittels dieser Methode durchgeführt.

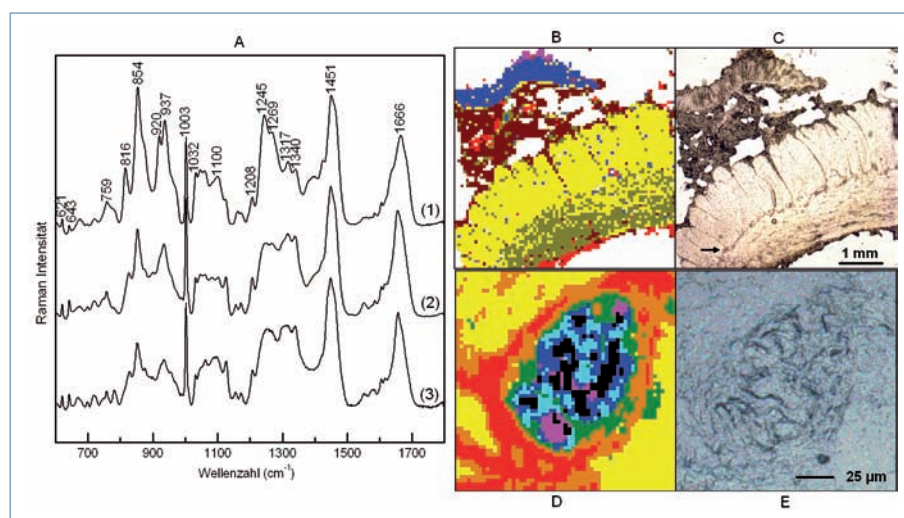
Neben der Fluoreszenzmikroskopie wurden in den vergangenen Jahren zunehmend Raman-basierte Technologien auf biologische bzw. biomedizinische Probleme angewandt. Die Raman-Spektroskopie gehört zu den molekülspektroskopischen Methoden mit dem höchsten Informationsgehalt<sup>[1]</sup> und ergänzt zunehmend etablierte bildgebende Verfahren wie die Fluoreszenzmikroskopie. Bei der Raman-Spektroskopie wird das Probenmaterial mit Laserlicht bestrahlt, wobei das eingestrahlte Licht gestreut wird. Ein geringer Prozentsatz des Streulichts ist durch Molekülschwingungen im Vergleich zum einfallenden Licht frequenzverschoben. Diese Frequenzverschiebungen spiegeln das Schwingungsmuster des Probenmaterials wider und damit deren chemische Zusammensetzung

und molekulare Struktur (**Abb. 1A**). Raman-Technologien sind somit hochspezifisch, da sie einen molekularen Fingerabdruck der Probe liefern. Der besondere Vorteil der Raman-Spektroskopie ist die minimale Probenvorbereitung, da die Proben gewöhnlich so verwendet werden können, wie sie anfallen. Im Vergleich zur Fluoreszenz-Spektroskopie handelt es sich um eine Methode, die ganz ohne externe Marker auskommt. Während die Spezifität der Raman-Methode sehr hoch ist, ist

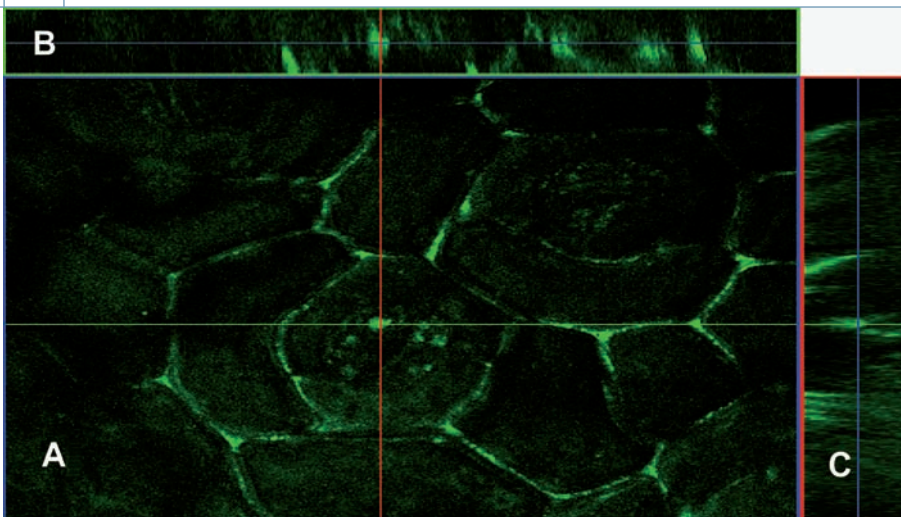
die Sensitivität (d. h. die Signalintensitäten) sehr gering, was die Detektion von niedrig konzentrierten Molekülen erschwert. Um dies zu umgehen, können spezielle Raman-Signal verstärkende Techniken (z. B. CARS, TERS) angewandt werden. Die Kombination Raman-spektroskopischer Technologien mit einem Mikroskop ermöglicht die Aufnahme von Images mit chemischem Kontrast.

### Raman-Mikroskopie

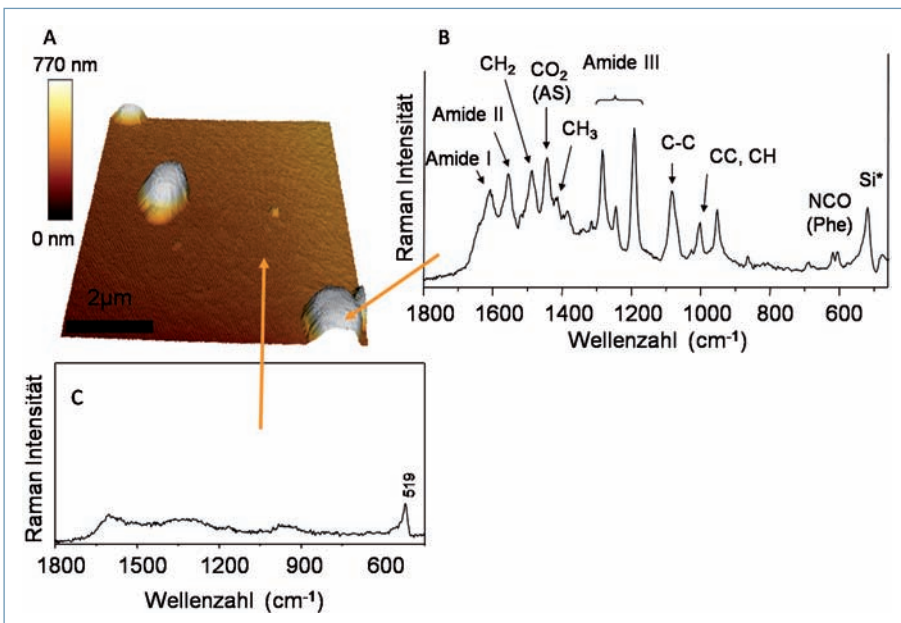
Mithilfe eines Mikroskops wird Anregungslaserlicht auf die Probe fokussiert. Die numerische Apertur des Mikroskopobjektivs und die Wellenlänge bestimmen die Größe des Fokus. Die so genannte Auflösungsgrenze liegt dabei im Bereich von 300 nm. Die Messsignale werden punktwise in Rückstreuung registriert, indem die Probe mit einem motorisierten Tisch positioniert wird. **Abbildung 1** vergleicht Raman-Maps (**B, D**) mit lichtmikroskopischen Aufnahmen eines ungefärbten Dünnschnitts einer Darmprobe (**C, E**). Während **Abbildung 1B** einen Überblick über die Gewebetypen liefert, ermöglicht die geringere Schrittweite in **Abbildung 1D** subzelluläre Details eines Ganglions aufzulösen. Bei der Aufnahmegeschwindigkeit von 100 Spektren pro Stunde waren die Messungen sehr zeitaufwändig. An die Stelle der Probenpräparation z. B. durch Färbung treten mathematische Verfahren der Bildauswertung zur Spektralanalyse und Klassifizierung. Dabei sortiert ein Cluster-Algorithmus die Raman-Spektren hinsichtlich ihrer Ähnlichkeit. Jeder



▲ **Abb. 1:** Raman-Spektroskopie einer getrockneten Darmprobe. **A**, repräsentative Raman-Spektren von Bindegewebe (1), Muskelgewebe (2) und Epithelgewebe (3). **B**, 79 × 79-Raman-Map mit einer Schrittweite von 62 μm. **D**, 59 × 59-Raman-Map mit einer Schrittweite von 2,5 μm. Die Farben in den Raman-Maps entsprechen der Gruppenzuordnung einer Cluster-Analyse. **C**, Der Pfeil in der lichtmikroskopischen Aufnahme zeigt die Position eines Ganglions. **E**, vergrößertes Ganglion aus **C**.



▲ **Abb. 2:** A, CARS-Bild des tangentialen Schnitts einer Blattoberfläche. Es zeigt die räumliche Verteilung der CH-Streckschwingungsozillatoren. Um ein Tiefenprofil der Wachsverteilung im Blatt zu gewinnen, wurden verschiedene optische Schnitte in vertikaler Richtung in z-Schrittweiten von 0,9  $\mu\text{m}$  durchgeführt. B, C, Tiefenprofile der Wachsverteilung entlang der horizontalen und vertikalen Linien aus A.



▲ **Abb. 3:** A, Topografisches AFM-Image von *Staphylococcus epidermidis*. Die Pfeile markieren die Stellen, an denen TERS-Spektren (B, C) mittels eines silberbeschichteten AFM-Cantilevers auf der Bakterienoberfläche aufgenommen wurden.

Klasse wird eine Farbe zugeordnet (z. B. in **Abbildung 1B**: Epithel = blau, Bindegewebe = braun und Muskel = gelb). Auf diese Weise kann zum einen der Aufbau der Probe dargestellt werden. Zum anderen kann das Raman-Spektrum an jedem Punkt ausgewertet werden. Beispielfhaft sind in **Abbildung 1A** Raman-Spektren von Bindegewebe (1), Muskelgewebe (2) und Epithelgewebe (3) dargestellt, die sich deutlich unterscheiden<sup>[2]</sup>.

### CARS-Mikroskopie

Nachteilig bei der klassischen Raman-Methode ist der niedrige Raman-Streuquerschnitt. Daraus resultiert ein relativ großer Zeitbe-

darf, um ein komplettes Raman-Image, wie in **Abbildung 1** gezeigt, aufzunehmen. Es gibt aber vielfältige technologische Ansätze, die Aufnahmezeiten zu verkürzen, mit dem Ziel Raman-Bilder in Echtzeit mit Video-Wiederholungsrate aufzeichnen zu können. Dazu gehören so genannte nicht-lineare Raman-Technologien wie CARS (*Coherent Anti-Stokes Raman Scattering*)-Mikroskopie<sup>[3]</sup>.

Die CARS-Methode beruht auf der Tatsache, dass zwei Laserstrahlen durch eine Probe geschickt werden und dort die Moleküle zu kohärenten In-Phase-Schwingungen anregen. An diesem Ensemble kohärent angeregter Molekülschwingungen wird nun ein dritter

Laser, unter Aussendung eines zu den Anregungslasern blau verschobenen CARS-Signal gestreut. Durch gezieltes Abrastern der Probe lassen sich so 2D- und 3D-CARS-Bilder bestimmter Molekülschwingungen aufzeichnen. CARS-Mikroskopiebilder liefern somit detaillierte chemische Strukturinformationen, da mit der CARS-Spektroskopie Molekülschwingungen wie bei der Raman-Spektroskopie angeregt werden. **Abbildung 2** zeigt CARS-Bilder kutikulärer Wachse in verschiedenen tangentialen Schnitten eines Pflanzenblatts. Abgebildet ist die räumliche Verteilung von CH-Streckschwingungen, die ein charakteristisches Strukturmerkmal der Wachse sind, die aus sehr langen saturierten Acyl-Ketten bestehen. Die Analyse der Wachsverteilung in lebendem Pflanzengewebe erlaubt eine Korrelation zwischen der räumlichen Verteilung der Wachstrukturen und der Funktion der Wachse.

Der Vorteil der CARS-Mikroskopie im Vergleich zur Raman-Mikroskopie ist, dass die resultierenden Raman-Signale bei CARS um mehrere Größenordnungen intensiver als beim klassischen Raman-Effekt sind. Zudem stört Fluoreszenz nicht, da das CARS-Signal blau verschoben zu den Anregungslasern ist. Diesen Vorteilen steht jedoch der Nachteil der kostenintensiven Ausrüstung und des hohen experimentellen Aufwands gegenüber. Um CARS-Signale zu erzeugen, benötigt man hohe Lichtintensitäten und mindestens zwei farblich durchstimmbare Laser, die Piko- bis Femtosekundenpulse ( $10^{-12}$  bis  $10^{-15}$  s) liefern. Technische Fortschritte auf dem Gebiet der Kurzpuls-Lasertechnologien lassen aber in Zukunft kompakte, einfach zu bedienende CARS-Mikroskope erwarten bzw. CARS-Mikroskopie-Add-ons für Standard-Fluoreszenz-Laser-Scanning-Mikroskope.

### TERS

Eine Möglichkeit zur Steigerung der Ortsauflösung besteht in der Kombination von Rasterelektronenmikroskopie (*Atomic Force Microscopy*, AFM) mit Raman-Signal-verstärkenden Verfahren. Als Beispiel sei TERS (*Tip-Enhanced Raman Spectroscopy*) genannt. Dabei wird ein einzelner Silberpartikel an der Spitze eines AFM-Cantilevers gebunden und mit dem Laser des Raman-Mikroskops aktiviert. Durch den so genannten Oberflächenverstärkungseffekt (*Surface-Enhanced Raman Scattering*, SERS)<sup>[4]</sup> werden zum einen die Raman-Signale von Molekülen in der Nähe des SERS-aktiven Partikels verstärkt, zum anderen wird dieser Effekt aufgrund der extrem kleinen

Verstärkungsregion von wenigen Nanometern auf einen sehr begrenzten Bereich beschränkt. Durch die Kombination von SERS mit AFM ist der Durchbruch in Richtung nanometeraufgelöster Raman-Spektroskopie gelungen. **Abbildung 3** zeigt erste TERS-Untersuchungen auf der Oberfläche eines *Staphylococcus epidermidis*-Bakteriums. Diese Untersuchungen erlauben es, detaillierte chemische Informationen von wohl definierten und lokalisierten Bakterienoberflächenstellen mit einer räumlichen Auflösung im Nanometerbereich zu erhalten. Die beobachteten Raman-Moden (**Abb. 3B**) lassen sich hauptsächlich Protein- und Zuckerbestandteilen zuordnen, was die chemische Zusammensetzung einer Bakterienoberfläche widerspiegelt<sup>[5]</sup>.

### Ausblick

Raman-Spektrometer werden mit faser-optischen Sonden gekoppelt, um endoskopische Untersuchungen durchzuführen. Erste Raman-Images an Maushirnen wurden so bereits aufgenommen und ermöglichen die Lokalisierung von Hirnmetastasen<sup>[6]</sup>. Eine Zusammenfassung biomedizinischer Raman-Studien findet sich in [7]. CARS-Mikroskopie und TERS sind relativ neue Verfahren, deren großes Potenzial für *in vivo*-Untersuchungen in den nächsten Jahren weiter erschlossen wird. ■

### Literatur

- [1] Schmitt, M., Popp, J. (2006): Raman spectroscopy at the beginning of the twenty-first century. *J. Raman Spectrosc.* 37: 20–28.
- [2] Krafft, C., Codrich, D., Pelizzo, G., Sergo, V. (2008): Raman and FTIR microscopic imaging of colon tissue: a comparative study. *J. Biophotonics* 1: 154–169.
- [3] Zumbusch, A., Volkmer, A. (2005): Einblick in das Unsichtbare – Nichtlineare optische Phänomene ermöglichen die chemisch selektive Mikroskopie ohne Anfärbung. *Physik J.* 4: 31–37.
- [4] Hering, K., Cialla, D., Ackermann, K., Dörfer, T., Möller, R., Schneidewind, H., Mattheis, R., Fritzsche, W., Rösch, P., Popp, J. (2008): SERS: a versatile tool in chemical and biochemical diagnostic. *Anal. Bioanal. Chem.* 390:113–124.
- [5] Neugebauer, U., Rösch, P., Schmitt, M., Popp, J., Julien, C., Rasmussen, A., Budich, C., Deckert, V. (2006): On the Way to Nanometer-Sized Information of the Bacterial Surface by Tip-Enhanced Raman Spectroscopy. *Chem. Phys. Chem.* 7: 1428–1430.
- [6] Krafft, C., Kirsch, M., Beleites, C., Schackert, G., Salzer, R. (2007): Methodology for fiber optic Raman mapping and FTIR imaging of metastases in mouse brains. *Anal. Bioanal. Chem.* 389: 1133–1142.
- [7] Krafft, C., Sergo, V. (2006): Biomedical applications of Raman and IR spectroscopy to diagnose tissue. *Spectroscopy Int. J.* 20: 195–218.

### Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Jürgen Popp  
 Institut für Photonische Technologien e. V.  
 Albert-Einstein-Straße 9  
 D-07745 Jena  
 Tel.: 0049-3641-206300  
 Fax: 0049-3641-206399  
 juergen.popp@ipht-jena.de

### AUTOREN



#### Jürgen Popp

Chemie-Studium an den Universitäten Erlangen und Würzburg. 1996 Promotion an der Universität Würzburg. Postdoc an der Yale University, New Haven, USA. 2001 Habilitation in Physikalischer Chemie an der Universität Würzburg. 2002 Ruf auf eine C4-Professur für Physikalische Chemie nach Jena. Seit 2006 auch wissenschaftlicher Direktor des Instituts für Photonische Technologien e. V., Jena. Sein wissenschaftliches Hauptinteresse gilt der Bio- und Materialphotonik.



#### Michael Schmitt

Chemie-Studium an der Universität Würzburg. 1998 Promotion, anschließend 20 Monate als Postdoc am National Research Council of Canada in Ottawa. 2001 Rückkehr nach Würzburg, wo er sich 2004 habilitierte. Seit 2005 akademischer Rat in der Arbeitsgruppe von Prof. Popp am Institut für Physikalische Chemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Zu seinen Hauptarbeitsgebieten gehört die Ultrakurzzeitspektroskopie.



#### Christoph Krafft

Bis 1994 Physik-Studium an der Universität Oldenburg, 1998 Promotion an der Humboldt-Universität Berlin. Postdoc an der University of Missouri Kansas City, USA. Ab 2000 Leitung einer Nachwuchsgruppe an der TU Dresden. Einjähriger Forschungsaufenthalt an der Universität Triest, Italien. 2007 Habilitation in Analytischer Chemie an der TU Dresden. Seit 2008 Leitung einer Forschergruppe am Institut für Photonische Technologien in Jena in der Abteilung von Prof. Popp. Sein wissenschaftlicher Schwerpunkt sind bioanalytische Anwendungen von Schwingungsspektroskopie.