

2. ábra. GaN és rokon anyagainak rácsparaméterei, tiltott sáv szélessége és az ebből készíthető LED hullámhossza


fokkal működnek (wall plug efficiency, az emittált fénytelsítmény és a felvett elektromos teljesítmény hányadosa), hanem élettartamuk közelíti a 100 000 órát. Mindez óriási energiamegtakarítást tesz lehetővé, mert a felhasznált elektromos energia kb. 25%-a világításra fordítódik. Természetesen mindezt olcsón kell előállítani. Az elmúlt néhány évben Prof. Sir Colin Humphreys csapata a Cambridge Universityn sikerrel növesztett GaN LED szerkezeteket 6" átmérőjű Si szeletekre, amik a legolcsóbb hordozók. Ezt a technológiát sikerrel optimalizálta és átadta a Plessey-nek, ami most egyszerre 7 db ilyen szeletre növeszti a LED szerkezeteket.

A LED-es világítás látványos felhasználási területe az autók lámpáiban megjelent és igen gyorsan terjedő LED-es, sőt újabban lézeres világítás. Ezek nemcsak igen fényesek és hatékonyak, hanem mivel ezeknek az áramfelvétele kicsi, így végső soron környezetvédelmi szempontból is előrelépést jelentenek.

Látjuk, hogy a díjazottak eredményei az optoelektronikán belül meghaladták a LED témakörét. Ugyanakkor utat nyitottak más, nem optoelektronikai eszközöknek is, mint pl. a nagyfrekvenciás, nagyteljesítményű tranzisztorok. A kétlépcsős növesztési technológia, a jó minőségű, egykristály GaN rétegek nélkül ezek nem készülhettek volna el. Márpedig a GaN alapú HEMT (High Electron Mobility Transistor) szerkezetek is igen fontosak, ezek mintegy 160 GHz-ig használhatóak és kb. 50 W/mm teljesítménysűrűséget (ahol mm-ben a gate hosszát értjük) érnek el a legújabb fejlesztésekben, és 8–10 W/mm-es értékkel kereskedelmi forgalom-

ban is kaphatóak. Ezekben az eszközökben egy GaAlN/GaN határfelületen (újabban rácsillesztett InAlN/GaN határfelületen) kétdimenziós elektrongáz keletkezik, és a töltéshordozók mozgékonyága igen nagy. Ezek az eszközök miniatürizálják a távközlést és a teljesítményelektronikát. Bár a szokásos nagy bonyolultságú Si processzorokat és áramköröket a GaN soha nem fogja helyettesíteni (költség okokból), de a nagyfrekvenciás alkalmazásokban új lehetőségeket nyitnak. A nagyon magas teljesítmény miatt jelenleg az egyik legérdekesebb kutatás-fejlesztés pontosan az ilyen eszközök hődisszipációját akarja megoldani nagyon jó hővezető anyagok, pl. gyémánt, vagy grafén felhasználásával.

A CVD növesztett gyémánt technológia is óriásiit kell, hogy fejlődjön ehhez. Jelenleg  $\text{cm}^2$ -nél kisebb darabkák (szeletek) érhetők el egykristály formájában, nagyon jó minőségben. Léteznek már legalább 2" átmérőjű gyémánt szeletek is, ezek azonban legfeljebb kitüntetett orientációval rendelkeznek, de alapvetően polikristályosak. Jósolni nem szeretnék, de lehet, hogy a gyémánt növesztése és adalékolása terén is átéljük azt a fantasztikus fejlesztési korszakot a következő 20 évben, amit a GaN terén is nehéz lett volna előre jósolni.

Talán ismert az a sajtóvisszhang, ami szerint Holonyákot mint a LED feltalálóját, érdemtelenül mellőzte a Nobel-díj Bizottság. Az indoklás kiterjesztésével a fenti szempontokra (eszközökre) ez a vita elkerülhető lett volna. Meglátásom szerint a három díjazott megérdemelten kapta az elismerést, és az indoklásban felsoroltnál sokkal több érdemet szerzett. 

„Hiszem, ha látom”, tartja a hétköznapi „H”mondás és gondolkodásmód. Valóban, a látható érvek mindennél meggyőzőbbnek tűnnek. Nincs ez máshogy a természettudományokban sem. A természet, illetve a természet belső szerkezetének képekben való megjelenítése, vagyis leképezése hatékonyan járult hozzá működésének feltáráshoz, és forradalmasította a legtöbb tudományterületet. A fénymikroszkóp XVII. századi kifejlesztése és elterjedése óta (1. ábra) a modern fizika, kémia, biológia, anyagtudomány és orvostudomány elengedhetetlen eszközévé vált.

A korai fénymikroszkópia azt sugallta, hogy a természet mikroszkopikus felépítésének megismerésében nem várhatók korlátok. A XIX. század végére azonban *Ernst Abbé* és *Lord Rayleigh* (2. ábra) munkásságának köszönhetően kiderült, hogy a fénymikroszkóp feloldóképességének elméleti korlátai vannak, vagyis a fénymikroszkóppal nem alkothatunk tetszőlegesen részletgazdag képet.

Az Abbé megfogalmazta híres képlet (1. egyenlet) közel másfél évszázada áthághatatlan elméleti korlátot jelentett a mikroszkópos leképezés számára. A fénymikroszkópia technikai fejlődése alig néhány évtized alatt, 1900-ra már el is érte ezt az elméleti korlátot, amely így gyakorlati korláttá is vált. Jóllehet a XX. században számos próbálkozás történt az Abbé-féle feloldási határ megerősökölésére vagy megkerülésére, alapvető elméleti és gyakorlati áttörést csak az utóbbi mintegy másfél évtized kutatási és fejlesztési munkája eredményezett. Nem véletlen és légből kapott tehát a Svéd Királyi Akadémia döntése, mely szerint a 2014. évi Nobel-díjat a másfél évszázados paradigma megváltoztatásáért adományozta.

## A 2014. évi kémiai Nobel-díj

A Svéd Királyi Akadémia 2014. október 8-án hirdette ki döntését a kémiai Nobel-díjról. Ennek értelmében 2014-ben a kémiai Nobel-díjban *Eric Betzig*, *Stefan W. Hell* és *William E. Moerner* részesültek a szuperfelbontású fluoreszcencia mikroszkópia kidolgozásáért (3. ábra). Vajon kik is ezek a tudósok, és mi az a szuperfelbontású fluoreszcencia mikroszkópia?

*Eric Betzig* amerikai állampolgár, 1960-ban született a Michigan állambeli Ann Arborban. Doktori fokozatát 1988-ban szerezte a Cornell Egyetemen. Már ekkor a feloldási határ leküzdése érdekelt, és a közeli mező fizikájával foglalkozott. A New Jersey állambeli Murray Hill AT&T Bell Laboratóriumban a közeli mező pásztázó fénymikroszkóp kifejlesztésében ért el jelentős eredményeket. 1993-ban elsőként alkotott nagyfelbontású képet egyedi fluoreszcens molekulákról szobahőmérsékleten. Ké-

KELLERMAYER MIKLÓS

# A mikroszkópos feloldási korlát áttörése



Eric Betzig



Stefan W. Hell



William E. Moerner

 3. ábra. A 2014. évi kémiai Nobel-díj nyertesei<sup>3</sup>

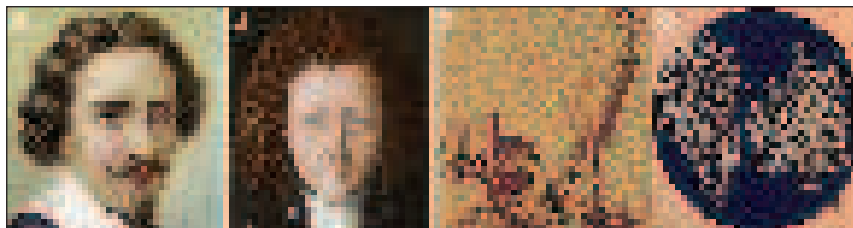
sőbb felismerte a fényaktiválható fluoreszcens fehérjemolekulákban rejlő lehetőségeket, így jutott el a PALM mikroszkópia (photoactivation light microscopy) kifejlesztéséhez. 2005 óta a Howard Hughes Medical Institutes Janelia Farm intézményében csoportvezető.

*Stefan W. Hell* német állampolgár, 1962-ben született Aradon. Doktori fokozatát 1990-ben szerezte a Heidelbergi Egyetemen. 1993 és 1996 között a finn-

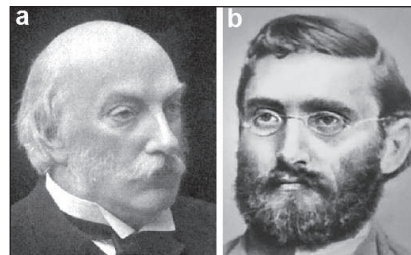
országi Turku Egyetemen dolgozott, ahol lefektette a STED (stimulated emission depletion) mikroszkópia elméleti alapjait. 1997-től a Max Planck Intézet (Biofizikai Kémia, Heidelberg) munkatársa, majd igazgatója, ahol a STED mikroszkópia megépítését, továbbfejlesztését és számos alkalmazását valósította meg.

*William E. Moerner* amerikai állampolgár, 1953-ban született a kaliforniai Pleasantonban. Doktori fokozatát 1982-ben

szerezte a Cornell Egyetemen. 1989-ben elsőként mérte meg egyetlen, mélyfagyasztott kondenzátumban csapdázott molekula abszorpciós spektrumát. 1997-ben megfigyelte, hogy a zöld fluoreszcens fehérjemolekula (GFP, green fluorescent protein) pislog, azaz véletlenszerűen kialszik (sötét állapotba kerül), majd visszatér fluoreszcenciájára. Ugyancsak kimutatta, hogy a GFP-t egy rövid hullámhosszú fényvel való megvilágítással irányítottan is ki lehet hozni



1. ábra. a) Zacharias Jansen (1580–1638) holland szemüveggészítő mester, az első összetett fénymikroszkóp megalkotója.<sup>1</sup> b) Robert Hooke (1635–1703) angol természetfilozófus, a mikroszkópalkalmazás úttörője.<sup>2</sup> c) Robert Hooke mikroszkópja. d) A parafa mikroszkópos képe, Robert Hooke rajza. A parafa sejtszerkezete (celluláris szerkezete) alapján nevezzük az élővilág legkisebb szerkezeti és működési egységét „sejtnek”



2. ábra. a) Lord Rayleigh<sup>3</sup> (1842–1919) és b) Ernst Abbé<sup>4</sup> (1840–1905) ismerték fel, hogy a fénymikroszkóp feloldóképességének elméleti korlátja van

sötét állapotából. Később ez a megfigyelés vált a lokalizációs mikroszkópiák alapjává. Jelenleg a Stanford Egyetem professzora.

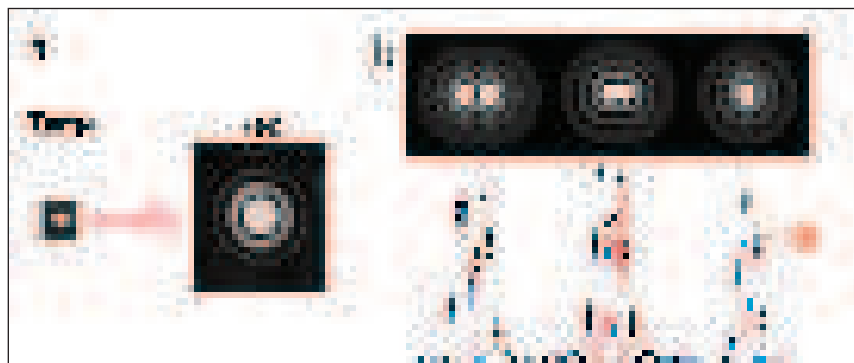
### Szuperfelbontású fluoreszcencia mikroszkópia

A szuperfelbontású fluoreszcencia mikroszkópia jelentősége abban rejlik, hogy mintegy megerőszkolja az immár közel másfél évszázados elméleti és gyakorlati optikai feloldási határt, és nanométeres, molekuláris feloldást tesz lehetővé. A XIX. században Ernst

történt arra, hogy a feloldási határt valamilyen módon áttörjük. Az *Ernst Ruska* (6a. ábra) által az 1930-as években kifejlesztett elektronmikroszkópban például a rendkívül kis hullámhossz miatt jelentősen jobb, akár atomi feloldás érhető el. Biológiai minták esetében azonban az elektronmikroszkóp alkalmazásának rengeteg hátránya van a szükségszerű mintafixálás, dehidráció és speciális festési eljárások miatt. Elektronmikroszkópban élő sejtek egyáltalán nem vizsgálhatók, és a fixált sejteken a molekuláris képletek fajlagos, specifikus megjelölése különle-

hullámelhajlás alapján alkotunk képet, hanem egy hegyes tüvel tapogatjuk le a minta felületét. A pásztázó tüsszondás mikroszkópok feloldását így nem az alkalmazott hullám hossza, hanem a letapogató szonda görbületi sugara korlátozza, és akár atomi felbontás érhető el. Mivel azonban a képet felületi letapogatással nyerjük, a minta belső szerkezetét nem tudjuk feltárni. Az első pásztázó tüsszondás mikroszkóp a pásztázó alagúteffektus mikroszkóp volt, de ezt nem sokkal követte az atomerőmikroszkóp kifejlesztése. Érdekesség, hogy Ernst Ruska, Gerd Binnig és Heinrich Rohrer ugyanazon alkalommal, 1986-ban fizikai Nobel-díjban részesült.

Az Abbé-féle fénymikroszkópos feloldási korlát leküzdésében igazán jelentős áttörést az idei Nobel-díjasok munkássága hozott. A 2014. évi kémiai Nobel-díj háttérben voltaképpen három fontos felfedezés és fejlesztés húzódik: a) szuperfelbontású fluorofór-sokaság mikroszkópia, b) egyedi molekula fluoreszcencia spektroszkópia, és c) szuperfelbontású egyedi fluorofór mikroszkópia. Mind-egyikben közös a *fluoreszcencia* jelensége. A fluoreszcencia fénykibocsátással járó relaxációs folyamat, amely során egy gerjesztett állapotú molekuláris rendszer visszatér alap energiaállapotába



4. ábra. A fénymikroszkópos feloldási határ problémája. a) Az elhajlási korong. b) Képpontok átfedése és összemosódása a feloldási határon belül elhelyezkedő tárgypontok esetén

Abbé (1873) és Lord Rayleigh (1896) ismerték fel, hogy hullámelhajlási, azaz diffrakciós okok miatt egy tárgyról hullámok, például fény segítségével alkotott kép nem lehet tetszőlegesen részletgazdag. Ennek oka az, hogy egy pontszerű tárgy (mint egy optikai rács pontja vagy egy pontszerű fényforrás) képe kiszélesedett folt, úgynevezett elhajlási korong (4a. ábra). Ha a tárgypontok az elhajlási korong méreténél közelebb kerülnek egymáshoz, akkor a képek alapján nem különíthetők el (4b. ábra). A mikroszkópos feloldásnak tehát elméleti és gyakorlati határa van ( $d_{\min}$ ), és ez a feloldási határ az alkalmazott hullámhosszával ( $\lambda$ ) összemérhető:

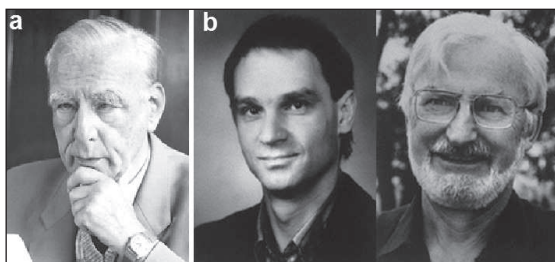
$$d_{\min} = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}, \quad (1)$$

ahol  $n$  az optikai közeg törésmutatója,  $\alpha$  pedig a leképező rendszer nyílásszöge. A feloldási határ látható fény, azaz a fénymikroszkópia esetében 0,2  $\mu\text{m}$ -nek adódik. Ilyen feloldással sejtorganelumok még vizsgálhatók, de ennél kisebb képletek, például vírusrészcékék és egyedi molekulák már nem különíthetők el egy bonyolult sokaságban (5. ábra).

A XX. században számos erőfeszítés



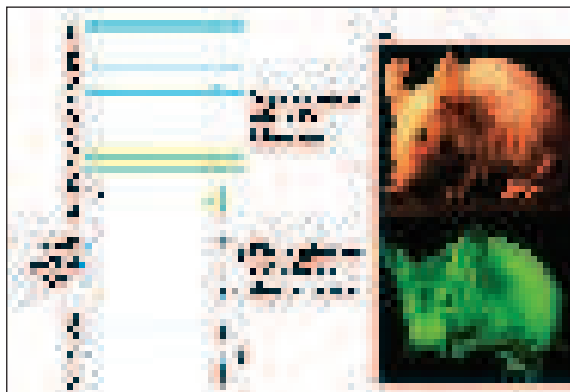
5. ábra. Az Abbé-féle mikroszkópos feloldási határ illusztrálása a biológiai struktúrák hierarchiájában<sup>5</sup>



6. ábra. a) Ernst Ruska (1906–1988) német kutató, az első elektronmikroszkóp megalkotója. b) Gerd Binnig (1947–) német és Heinrich Rohrer (1933–2013) svájci kutatók, a pásztázó tüsszondás mikroszkópok kifejlesztői<sup>6</sup>

ges módszereket igényel. A *Gerd Binnig* és *Heinrich Rohrer* (6b. ábra) által kifejlesztett pásztázó tüsszondás mikroszkópokban teljesen új alapokra helyeződik a mikroszkópos képalkotás, ugyanis nem

(7a. ábra). A gerjesztés hagyományosan nagyenergiájú (rövid hullámhosszú) fényvel történik, bár egyéb fizikai és kémiai gerjesztési mechanizmusok is léteznek. A relaxáció során kibocsátott fény hullámhossza nagyobb, mint a gerjesztő fény (például kék gerjesztő fény esetén zöld a kibocsátott fény). Fluoreszcenciára alkalmas festékmolekulák a *fluorofórok*, amelyek között találunk nagyszámú szerves kismolekulát és fehérjéket is. A fluoreszcens fehérjék archetipusa a zöld fluoreszcens fehérje (GFP), amelyet genetikai módosítással célszervezetekbe juttathatunk (7b. ábra). Mára a fluoreszcens fehérjék széles arzenálja áll rendelkezésre, melyek segítségével élő sejtek belsejében követhetők a biomolekuláris kölcsönhatások és fejlődéstani folyamatok.



7. ábra. a) A fluoreszcencia jelensége egy molekuláris rendszer energetikai sémáján bemutatva.<sup>7</sup> b) Zöld fluoreszcens fehérjét (GFP) a szöveteiben kifejező *nude* (meztelen) egér természetes megvilágításban (felső kép) és kék gerjesztő fényben (alsó kép)<sup>8</sup>

### Szuperfelbontású fluorofór-sokaság mikroszkópia

A szuperfelbontású fluorofór-sokaság mikroszkópia alapja *Stefan W. Hell* azon felismerése, hogy egy diffrakciólimitált fókuszpont által gerjesztett molekulásokaság, amelynek kiterjedését tehát az elhajlási korong határozza meg, mérete csökkenthető úgy, hogy a fókuszpont szélein elhelyezkedő gerjesztett állapotú molekulákat stimulált emisszió segítségével mintegy kimerítjük, kioltjuk, vagyis depletáljuk. Mindezt úgy lehet megvalósítani, hogy a gerjesztő fénynyalábra azal koncentrikus, gyűrű alakú kioltó fénynyalábot vetítünk (8. ábra). Ez tehát a STED mikroszkópia alapja. A kioltó fény intenzitásának ( $J$ ) növelésével elméletileg korlátlanul csökkenthető feloldási határ:

$$d_{\min} = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha \sqrt{1 + J/J_s}}, \quad (2)$$

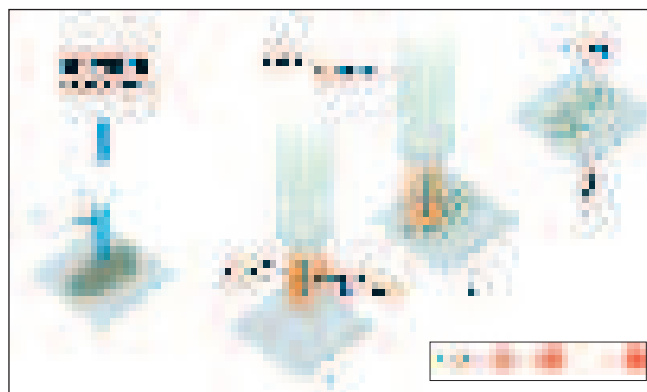
ahol  $J_s$  a gerjesztő fény intenzitása. A gyakorlatban szuperponált gerjesztő és kioltó lézernyaláb pásztázza végig a mintát pontról pontra, és az így csökkentett méretű gerjesztési térfogatból összegyűjtött fénypontokból rekonstruálódik a nanométeres feloldású kép. Mivel a leképezés pásztázó lézernyalábbal történik, a STED mikroszkópban eleve adott egy konfokális mikroszkóp, mellyel a vizsgálendő területről előzetes képet alkoshatunk (9a. ábra). STED mikroszkópiás munkaállomást a Leica Microsystems gyárt és forgalmaz (9b. ábra).

### Egyedi molekula fluoreszcencia spektroszkópia

Kémiai tudásunk nagy része olyan kísérletekből származik, amelyekben molekulásokaságot vizsgálunk, mint például egy kémcsőnyi vagy küvétányi vegyületet egy spektroszkópiás mérés során. Hatalmas előrelépést jelentett a *W.E. Moerner* által elindított egyedi molekula fluoreszcencia spektroszkópia, amely kísérletesen is rámutatott az egyedi molekulák szintjén megnyilvánuló sztochasztikus, véletlenszerű jelenségekre és folyamatokra, mint például a fluoreszcens festékmolekulák pislogása (*blinking*) (10a. ábra).

Az egyedi molekula fluoreszcencia mára szinte önálló tudományterület-

során rejtve maradnak. *W. E. Moerner* 1997-ben felfedezte, hogy bár a 488 nanométeres fényvel gerjeszthető GFP-molekula egy idő után kiég, és sötét állapotba kerül, 405 nanométeres fényvel ismét aktiválható (10b. ábra). Ez a jelenség azt a lehetőséget hordozza, hogy egy fluoreszcens molekula állapotát tetszés szerint tudjuk megváltoztatni, vagyis ki- és bekapcsolhatjuk. *Eric Betzig* 1995-ben azt az elméleti lehetőséget vetette fel, hogy ha az egyedi molekulák közötti távolság nagyobb, mint 0,2  $\mu\text{m}$ , azaz a molekulák a feloldási határon kívül helyezkednek el, akkor pozíciójukat sokkal pontosabban meghatározhatjuk, mint a feloldási határ. Sőt, ha a molekulák egymástól eltérő tulajdonságúak, például különböző színűek, akkor a pozíciójukat még olyan esetben is pontosan meghatározhatjuk, ha egymáshoz közel helyezkednek el. Ekkor arra van szükség, hogy egymás után két különböző képet alkossunk, amelyek mindegyikén csak az egyik molekula látszik. Csak jóval később, 2005-ben jött rá, hogy az elkülönítendő molekuláknak nem is kell különböző színűeknek lenni; az is elegendő, ha időben máskor fluoreszkálnak. Mindez megvalósítható úgy, hogy először az egyik molekulát bekapcsoljuk, majd kikapcsolása után a másikat kapcsoljuk be. A lényeg, hogy egyetlen képpont feltétlenül csak egyetlen fluoreszcens molekulát tartalmazzon. A fluoreszcencia-aktiválás alapján kidolgozott mikroszkópia a PALM (11. ábra).



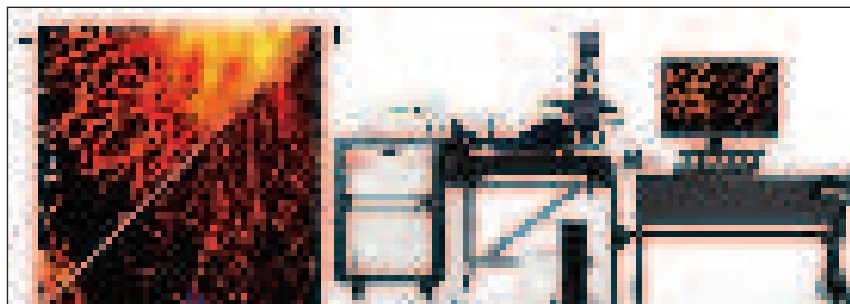
8. ábra. A STED mikroszkópia alapja. *Betétábra*: a kioltó (vörös) fény intenzitásának növelésével csökken a gerjesztési térfogat (zöld)<sup>5</sup>

té nötte ki magát. Segítségével egyedi molekulák biofizikai viselkedése követhető, és olyan folyamatok mechanizmusait fedhetjük fel és érthetjük meg, amelyek a molekulásokaság vizsgálatá-

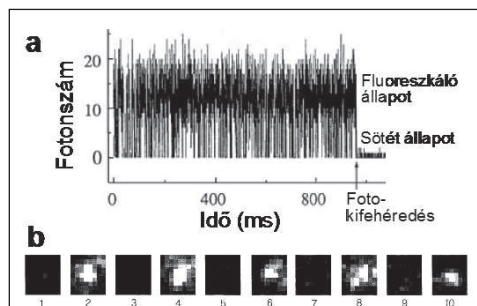
### Szuperfelbontású egyedi fluorofór mikroszkópia

A feloldóképesség növekedésének alapja az, hogy a molekula képére kétdimenziós Gauss-görbe illeszthető, amelynek

9. ábra. a) Fluoreszcensen megjelölt mikrotubuláris rendszer konfokális, illetve STED mikroszkópos képe.<sup>9</sup> b) A Leica Microsystems STED mikroszkópos munkaállomása<sup>10</sup>



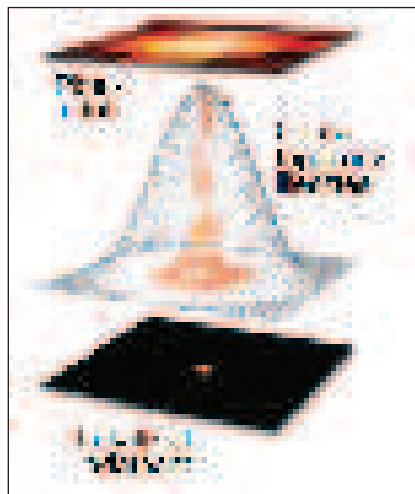




10. ábra. a) Egyedi fluorofórmolekula pislogása, véletlenszerű ingadozása egy fluoreszkáló és egy sötét állapot között, állandó gerjesztő megvilágítás során.<sup>11</sup> A fotokifehéredési lépéssel a fluorofór végérvényesen a sötét állapotba kerül. b) A GFP-molekula kapcsolászerűen visszahozható a sötét állapotból 405 nm-es aktíváló fényvel (páros képkockák)<sup>12</sup>

középpontja a fotonszám ( $N$ ) függvényében pontosabban kiszámítható, mint az intenzitásprofil félérték-szélessége:

$$d_{\min} = \frac{1}{\sqrt{N}} \frac{\lambda}{2n \sin \alpha} \quad (3)$$

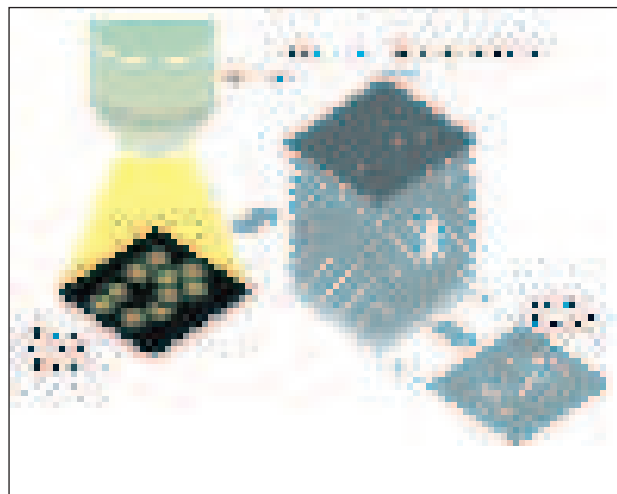


11. ábra. A PALM mikroszkópia alapja. a) Egy fluoreszcens molekula pozíciójának meghatározása. b) Képrekonstrukció a PALM mikroszkópiában<sup>5</sup>

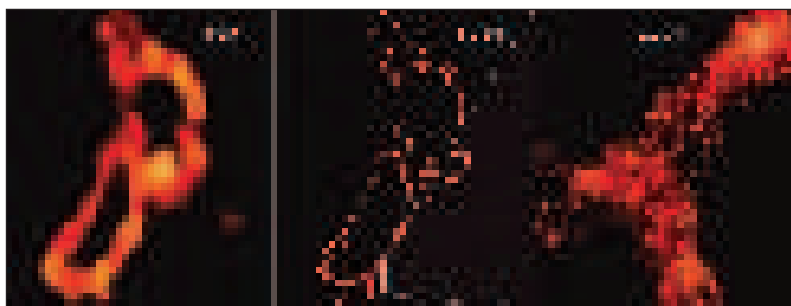
A gyakorlatban ismétlődő fotoaktívációs és fotokifehéritési ciklusok során gyűjtjük a fénypontadatokat, amely alapján nanométeres feloldású szuperkép kiszámítására kerül sor (11. ábra). A PALM-mal rokon módszer a STORM (stochastic optical reconstruction microscopy). A PALM segítségével jelenleg néhány nanométeres feloldás érhető el az XY-síkban, amely rendkívül látványos részletgazdagság-növekedést eredményez mikroszkópos felvételeken (12. ábra). Mivel azonban az adatgyűjtés rendkívül időigényes, hiszen aktív-

vációs és fotokifehéritési ciklusok sorozatával készül egy-egy felvétel, jelenleg fixált mintákon történnek a mikroszkópos vizsgálatok, és ekkor is különösen kell ügyelni arra, hogy a minta térben ne tolódjon el (például termikus okok miatt).

A szuperfelbontású mikroszkópiák története alig néhány évre tekint vissza, de a közel másfél évszázada fennálló mikroszkópos feloldási határ áttörésével jelentős paradigmaváltást idéz-



tek elő. A segítségükkel útnak indult nanoszkópia különleges bepillantást enged a természet molekuláris dimenziójú felépítésébe és működésébe. A módszer további fejlesztésének legfontosabb irányvonalait a háromdimenziós szuperrezolúció és képrekonstrukció, az élő sejtekben történő mérések lehetősége, illetve a valós idejű videofelvételek jelentik. Nem fér hozzá kétség, hogy a nanoszkópia további fejlődésével az élő sejt működéséről valóban látványos felfedezéseknek leszünk tanúi.



12. ábra. Fluoreszcens fehérjével (kaede) konjugált lizoszomális transzmembrán-fehérje (CD63) COS7 sejtben hagyományos (bal oldal) és PALM mikroszkópos felvételen (középső és jobb oldal)<sup>13</sup>

### Hivatkozások

1. <http://www.history-of-the-microscope.org/hans-and-zacharias-jansen-microscope-history.php>
2. [http://en.wikipedia.org/wiki/Robert\\_Hooke](http://en.wikipedia.org/wiki/Robert_Hooke)
3. [http://en.wikipedia.org/wiki/John\\_William\\_Strutt,\\_3rd\\_Baron\\_Rayleigh](http://en.wikipedia.org/wiki/John_William_Strutt,_3rd_Baron_Rayleigh)
4. <http://www.mikroskopie.de/pfad/bildentstehung/eins.html>
5. [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2014/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2014/)
6. [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/physics/laureates/1986/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1986/)
7. Damjanovich S., Fidy J., Szöllősi J. Orvosi biofizika. Medicina Könyvkiadó Zrt, Budapest, 2007.
8. Hoffman, R.M. Imaging in mice with fluorescent proteins: from macro to subcellular. *Sensors* **8**, 1157-1173, 2008.
9. <http://www.abberior.com/products/productlist/cat/sted-resolft/prod/abberior-star-635/>
10. <http://www.leica-microsystems.com/discoversuperres/>
11. Xie, S., Trautman, J.K. Optical studies of single molecules at room temperature. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **49**, 441-480, 1998.
12. Dickson, R.M., Cubitt, A.B., Tsieng, R.Y., Moerner, W.E. On/off blinking and switching behavior of single molecules of green fluorescent protein. *Nature* **388**, 355-358, 1997.
13. Betzig, E., Patterson, G.H., Sougrat, R., Lindwasser, O.W., Olenych, S., Bonifacio, J.S., Davidson, M.W., Lippincott-Schwartz, J., Hess, H.F. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* **313**, 1642-1645, 2006.