

**Aufbau eines
Rasterkraftmikroskopes
für kleine Cantilever**

Diplomarbeit

zur Erlangung des Grades eines

Diplom-Physikers

vorgelegt von

Jörg Martini

Fakultät für Physik

Universität Bielefeld

Bielefeld, September 2003

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, das ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und dabei keine weiteren als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Bielefeld, den 23. September 2003

(Jörg Martini)

Gutachter:

Prof. Dr. Dario Anselmetti

Prof. Dr. Günter Reiss

Abgabedatum der Arbeit: 23. September 2003

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	3
2.1	Rasterkraftmikroskopie	3
2.2	Cantilever	7
2.3	Kraftspektroskopische Messungen	12
2.4	Rauschen	14
2.4.1	Thermisches Rauschen	15
2.4.2	Schrotrauschen	16
2.4.3	$\frac{1}{f}$ -Rauschen	16
2.5	Filter	17
2.6	Laserfokus	20
2.7	Polarisation	21
2.8	Piezokeramiken und kapazitive Sensoren	22
2.9	DNA	25
3	Der Messaufbau	27
3.1	Der prinzipielle Aufbau	27
3.2	Der AFM-Kopf	28
3.2.1	Der Laser	34
3.2.2	Der Polarisationsstrahlteiler	34
3.2.3	Das $\frac{\lambda}{4}$ -Plättchen	35
3.2.4	Der dichroitische Spiegel	35
3.2.5	Das Objektiv	36
3.2.6	Der Quadrantendetektor	36
3.2.7	Die Kamera	36
3.2.8	Der Piezotisch	36

3.2.9	Die Mikrometerschrauben	43
3.2.10	Der Cantileverhalter	43
3.2.11	Die Grundplatte	44
3.3	Die Elektronik	44
3.3.1	Der I-U-Wandler	44
3.3.2	Die Quadrantendetektorelektronik	45
3.3.3	Das Bandpassfilter	45
3.4	Die Software	46
4	Ergebnisse	47
4.1	Bestimmung der Federkonstanten	47
4.2	Kraftspektroskopische Messungen	50
4.3	Kleine Cantilever	54
5	Zusammenfassung und Ausblick	58
	Literaturverzeichnis	61

1 Einleitung

Im Jahr 1986 veröffentlichten Binnig et al. [1] die erste Arbeit über ein Messprinzip, das üblicherweise als "atomic force microscopy" (bzw. "atomic force microscope"), kurz AFM, bezeichnet wird. Seit 1986 hat sich das AFM von einem Forschungsprojekt in ein Standardinstrument zur Oberflächenuntersuchung in Industrie und Forschung entwickelt. Im Laufe dieser Entwicklung hat sich die Handhabung der Rasterkraftmikroskope und die Auswertung ihrer Messergebnisse - nicht zuletzt durch die Entwicklung der Computertechnologie - erheblich vereinfacht, das fundamentale Messprinzip ist jedoch gleich geblieben. Durch die Weiterentwicklung des AFM sind eine Vielzahl von neuen Messmethoden etabliert worden, die auf diesem Messprinzip beruhen. Eine dieser Messmethoden ist die Kraftspektroskopie an Einzelmolekülen. Sie bietet die Möglichkeit, Aussagen über inter- und intramolekulare Kräfte, die auf die untersuchten Einzelmoleküle wirken, zu bestimmen. Insbesondere wird Kraftspektroskopie mit dem AFM seit rund zehn Jahren [2] an einzelnen Biomolekülen betrieben. So wird ein Aspekt des Phänomens "Leben" auf fundamentaler Ebene, der molekularen, untersucht. Die Untersuchung einzelner Moleküle, also gerade keine Ensemblemessungen, erfordert einen gewissen experimentellen Aufwand, der über die Messmöglichkeiten, Qualität der Messung und letztendlich die Aussagekraft der Ergebnisse entscheidet. Daher besteht auch heute noch der Bedarf, die Möglichkeiten der Messungen mit Rasterkraftmikroskopen zu erweitern und zu verbessern. Ein Aspekt der Verbesserungsmöglichkeiten ist die Geschwindigkeit, mit der Oberflächentopografien vermessen werden können, ein anderer ist die Genauigkeit, mit der kraftspektroskopische Untersuchungen durchgeführt werden können. Folgende Überlegungen waren nun Grundlage für das hier vorgestellte AFM:

Bei kraftspektroskopischen Messungen treten Rauscheinflüsse auf, die einerseits durch die Messelektronik und andererseits durch die thermischen Schwingungen des Cantilevers entstehen. Das Frequenzfenster einer rauscharmen Messung zwischen dem $\frac{1}{f}$ -Rauschen und der Resonanzfrequenz des Cantilevers wird in Flüssigkeit recht klein. Bandpassfilter zeigen daher nicht die gewünschten Eigenschaften. Weiterhin lassen sich schnelle Ereignisse in einem durch ein Bandpass gefilterten Signal nicht mehr auflösen, wenn die obere Grenzfrequenz des Bandpasses zu niedrig wird. Daher ist es erstrebens-

wert, Cantilever mit einer möglichst hohen Eigenfrequenz zu benutzen. Kleine (d.h. Breite $< 10 \mu\text{m}$, Länge $< 30 \mu\text{m}$) Cantilever besitzen eine hohe Resonanzfrequenz, sind aber gleichzeitig weich und damit empfindlich genug, um Kraftspektroskopie zu betreiben. Weiterhin besitzen kleine Cantilever einen niedrigeren Koeffizienten der viskosen Dämpfung als große. Die kleinen Cantilever verbiegen sich weniger stark durch den hydrodynamischen Druck, zeigen daher geringere systematische Fehler und brechen folglich erst bei höheren Ziehgeschwindigkeiten. Daher lassen sich mit kleinen Cantilevern Messungen mit höheren Ziehgeschwindigkeiten in Flüssigkeit durchführen. Das Nyquist-Theorem hat auch Gültigkeit für das frequenzunabhängige thermische Rauschen von Cantilevern. Daher bedeutet ein geringerer Koeffizienten der viskosen Dämpfung, dass kleinere Kräfte gemessen werden können [3][4], weil die fundamentale Beschränkung der Kraftauflösung, das thermische Rauschen des Cantilever, kleineren Einfluß auf die Messung hat. Wegen der hohen Resonanzfrequenz von kleinen Cantilevern, lassen sich mit diesen außerdem größere Scangeschwindigkeiten bei der topografischen Messung von Oberflächen erzielen, als mit herkömmlichen Cantilevern.

Diese Gründe motivieren den Wunsch kleine Cantilever für das AFM zu nutzen. Mit kommerziell erhältlichen AFM ist dies jedoch nicht möglich, weil sie einen Laserspotdurchmesser von $> 10 \mu\text{m}$ haben. Eine Messung scheitert daher mit diesen AFM, da ihr Messsignal mit schmalen Cantilevern keine ausreichende Intensität aufweist. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit ein AFM konstruiert, das Messungen mit kleinen Cantilevern erlaubt.

2 Grundlagen

2.1 Rasterkraftmikroskopie

Wie bei allen Arten von SPM (engl.: "scanning probing microscopy", dt.: "Rastersondenmikroskopie") wird auch beim AFM eine Sonde punktweise über eine Oberfläche geführt, um ortsauflösende Aufschlüsse über lokale Oberflächeneigenschaften zu erlangen. Beim AFM wie beim STM (engl.: "scanning tunneling microscope", dt.: "Rastertunnelmikroskop") werden diese Informationen zur Umsetzung in eine Oberflächentopographie genutzt. Mit beiden Methoden lassen sich so einzelne Atome auflösen. Beim SNOM (engl.: "scanning nearfield optical microscope", dt.: "optisches Nahfeldmikroskop") können zusätzlich optische Eigenschaften der Probenoberfläche mit einer Ortsauflösung, die deutlich kleiner ist als die Wellenlänge des verwendeten Lichtes, untersucht werden. Beim AFM wird ein sog. "Cantilever" (engl.: "cantilever", dt.: "Träger", "Ausleger"), also ein kleiner (z.B. Olympus Biolever Typ B: Breite: 30 μm , Länge: 100 μm , Dicke: 180 nm) Hebelarm, der mit einer Spitze am Ende des Hebelarms versehen ist, punktweise über eine Probenoberfläche geführt. Treten die Spitze des Cantilevers und die Oberfläche der Probe - i.A. der Punkt der Oberfläche, der der Spitze am nächsten liegt - in (messbare) Wechselwirkung, so wird dies zur Generierung eines dreidimensionalen Datenpunktes, der die relativen Raumkoordinaten von Cantilever zu Oberfläche enthält, genutzt. Variiert man nun die Koordinate der zwei Raumachsen, die die Richtung der Oberfläche wiedergeben, leicht, so erhält man, nach erneut registrierten Wechselwirkung zwischen Spitze und Oberfläche, einen angrenzenden Datenpunkt. Die Menge aller auf diese Weise generierten Datenpunkte kann nun als Oberflächentopographie der Probe interpretiert werden. Die gewöhnliche Vorgehensweise bei der Generierung der Daten ist nun eine zeilenweise (d.h. Änderung in einer der Raumachsen der Probenoberfläche) Abtastung der Oberfläche. Erst wenn die gewünschte Gesamtlänge einer Zeile erreicht ist, wird die andere Richtungsachse der Oberfläche variiert. Diese Zeilen-Spalten-Abtastung wird als "rastern" oder "scannen" (engl.: "to quickly scan", dt.: "überfliegen") bezeichnet. Die Wechselwirkung zwischen Oberfläche und Spitze wird beim AFM durch eine Verbiegung des Cantilever detektiert. Ursprünglich [1] wurde diese Verbiegung durch einen

Tunnelstrom zwischen einer über dem Cantilever liegenden Metallspitze und dem (elektrisch leitenden) Cantilever gemessen ¹. Andere Messanordnungen sind beispielsweise kapazitive Sensoren, piezoelektrische Messungen und interferometrische Messungen [5] zur Detektion der Verbiegung des Cantilevers. Heute wird üblicherweise [6] ein Laserstrahl auf die Rückseite des Cantilevers fokussiert und die Auslenkung des reflektierten Laserstrahls bei Verbiegung des Cantilevers, durch eine Wechselwirkung zwischen Spitze und Oberfläche, gemessen (s. Abb. 2.1). Diese Messmethode hat sich aufgrund ihrer ausreichenden Genauigkeit, Kostengünstigkeit, gleichzeitigen Messung von Lateral- und Deflektionsignal (s.u.), hohen Dynamik und einfachen Justage durchgesetzt. Der reflektierte Laserstrahl wird auf einen sog. Quadrantendetektor gelenkt. Dieser besteht aus vier lichtempfindlichen Teildetektoren, die jeweils die Intensität des auftreffenden Laserstrahls in einen zu den Intensitäten proportionalen elektrischen Strom umsetzen. Der Detektor ist verstellbar, damit der reflektierte Laserstrahl für jeden neu eingesetzten Cantilever auf die Mitte des Detektors, also auf gleiche Intensitäten des Lasers auf jeder der vier Quadranten des Detektors, eingestellt werden kann.

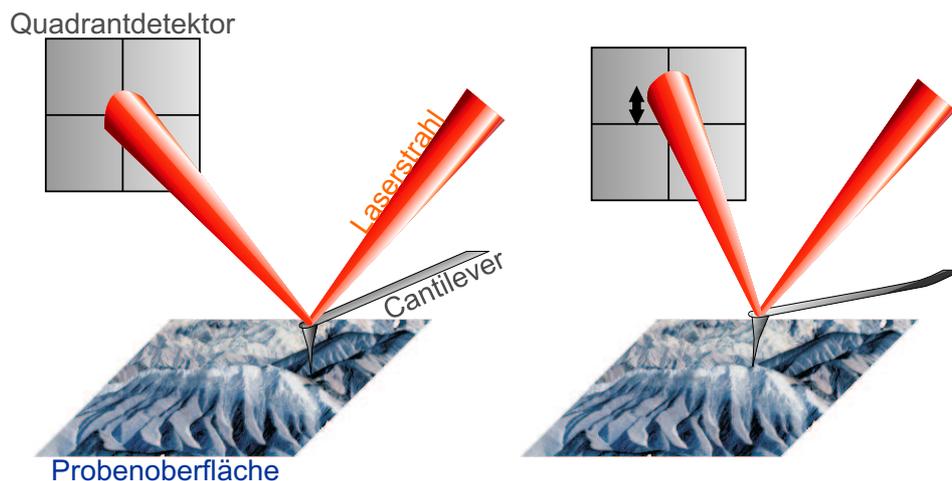


Abbildung 2.1: Messprinzip der Rasterkraftmikroskopie im sog "contact mode"

Zur genaueren Behandlung sollen die Intensitäten der Quadranten mit "A", "B", "C" und "D" (s. Abb. 2.2) bezeichnet werden. Weiterhin definiert man dann die Intensitäten "Top", "Bottom", "Left", "Right", "Lateral", "Sum" und "Deflektion" auf die folgende

¹Dies entspricht der Messmethode von STM, wobei beim STM normalerweise kein Cantilever "zweischengeschaltet" wird, sondern der Tunnelstrom zwischen einer Metallspitze und der Oberfläche direkt gemessen wird. Dabei ist die Beschränkung des Messprinzips auf elektrisch leitende Oberflächen bzw. Proben die größte Einschränkung dieser Messmethode.

Weise:

$$Top = A + B$$

$$Bottom = C + D$$

$$Left = A + C$$

$$Right = B + D$$

$$Lateral = Left - Right = A + C - B - D$$

$$Sum = Top + Bottom = A + B + C + D$$

$$Deflektion = Top - Bottom = A + B - C - D$$

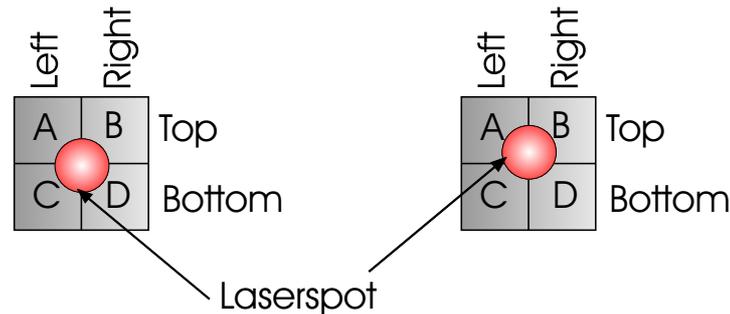


Abbildung 2.2: Laserspot auf dem Quadrantendetektor, links in Mittellage des Cantilevers, rechts bei Verbiegung des Cantilevers

In der Ruhelage des Cantilevers bedeutet dies idealerweise, dass $A = B = C = D$, also dass $Deflektion = 0$ und $Lateral = 0$ sind. Bei einer Verbiegung des Cantilevers senkrecht zur Richtung seiner längsten Achse verändert sich die Position des reflektierten Laserstrahls auf dem Quadrantendetektor derart, dass die Intensitäten Top und Bottom (s. Abb. 2.2) nicht mehr den gleichen Wert haben, also dass $Deflektion \neq 0$ ist. Genauer betrachtet bedeutet (o.B.d.A.) $Deflektion > 0$ eine Verbiegung des Cantilevers von der Oberfläche weg und $Deflektion < 0$ eine Verbiegung des Cantilevers zur Oberfläche hin. Eine Verbiegung des Cantilevers längs seiner längsten Achse, also eine Scherung, bedeutet eine Änderung des Lateral-Signals, also $Lateral \neq 0$. Stellt man sicher, dass der reflektierte Laserstrahl auch bei Auslenkung des Cantilevers vollständig auf der Messfläche des Detektors verbleibt, so gibt das Deflektionsignal ein Maß für die Auslenkung der Spitze des Cantilevers aus seiner Ruhelage. Das Deflektionsignal ist in (guter) erster Näherung direkt proportional zu der Auslenkung des Cantilevers [5][7]. Eine Normierung des Deflektionsignals $\frac{Deflektion}{Sum}$ kann Einflüsse von Intensitätsschwankungen des Lasers reduzieren. Üblicherweise werden Cantilever so eingesetzt, dass ein Winkel von rund 10° zwischen der Längsachse des Cantilevers und der Probenoberfläche entsteht. Dies verhindert, dass der Cantilever bei rauen Proben mit seiner Basis

oder Mittelbereichen des Cantilevers auf der Probe "aufsetzt", anstatt mit der Spitze zu messen. Um "weiche" Proben, z.B. biologische Proben, an Luft zu messen, wird die bisher beschriebene Methode meist nicht verwendet, da die Probe durch die beschriebene Messmethode "zerkratzt" wird. Dies geschieht, weil der stets auf der Probe vorhandene Wasserfilm den Cantilever durch Adhäsion an die Probenoberfläche presst. Eine Alternative zum bisher beschriebenen "contact mode" stellt der sog. "tapping modeTM" dar. Dabei wird der Cantilever über einen Piezo zu Schwingungen nahe seiner Eigenfrequenz angeregt. Tritt der Cantilever nun in Wechselwirkung mit der Oberfläche, so verändert dies seine Resonanzfrequenz. Attraktive Wechselwirkungen verkleinern, repulsive Wechselwirkungen vergrößern die Resonanzfrequenz des Cantilevers. Weiterhin kommt es im Wechselwirkungsfall zu einer Phasenverschiebung zwischen dem den Piezo anregenden Schwingungssignal und dem ebenfalls schwingenden Deflektionsignal. Über eine Phase-locked-loop-Regelung² kann nun der Abstand zwischen Cantileverspitze und Probenoberfläche verhältnismäßig groß gehalten werden und so die Oberflächentopographie ohne Schädigung der Probe aufgenommen werden. Das Messprinzip des AFM bietet aber auch weitere Messmöglichkeiten neben der Bestimmung von Oberflächentopographien. So können beispielsweise kalorimetrische Messungen [8] für kleinste Probenmengen, die Abbildung von magnetischen Domänen einer Probe [9] und veränderte Oberflächenspannungen durch Bindungen an chemisch funktionalisierte Cantilever [10] vorgenommen werden. Außerdem bietet sich die Möglichkeit, Kraftspektroskopie an einzelnen Molekülen vorzunehmen [2][11][12][13][14][15][16], indem die Moleküle an die Oberfläche und an den Cantilever angebunden und auseinander gezogen werden (s. Abb. 2.3). Dabei wird die auf die Moleküle ausgeübte Kraft durch die Federkonstante des Cantilevers und den Ziehweg (s. Gl. 2.13) bestimmt.

In der Wahl der Federkonstante der Messung durch den Cantilever liegt der große Vorteil von kraftspektroskopischen Messungen mit AFM. Diese Größe kann über viele Größenordnungen ($5 \frac{pN}{nm}$ bis $1 \frac{\mu N}{nm}$) variiert werden. Bei der optischen Pinzette, einem anderen kraftspektroskopischen Messprinzip, ist die Wahl der Federkonstante weit weniger frei, so dass nur Kräfte in einem Bereich von 0,1 pN bis 150 pN gemessen werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden intramolekulare kraftspektroskopische Messungen an dem gut bekannten System Poly(dG-dC)-Poly(dG-dC)-DNA vorgenommen, um die Funktionsweise des aufgebauten AFM zu testen.

²Hierbei handelt es sich um eine Regelung über einen Lock-In-Verstärker. Sowohl Verschiebungen in der Eigenfrequenz des Cantilever als auch Phasenverschiebungen zwischen anregender und gemessener Schwingung werden von einem Lock-In-Verstärker als Abweichung vom Integrationsmaximum gemessen.

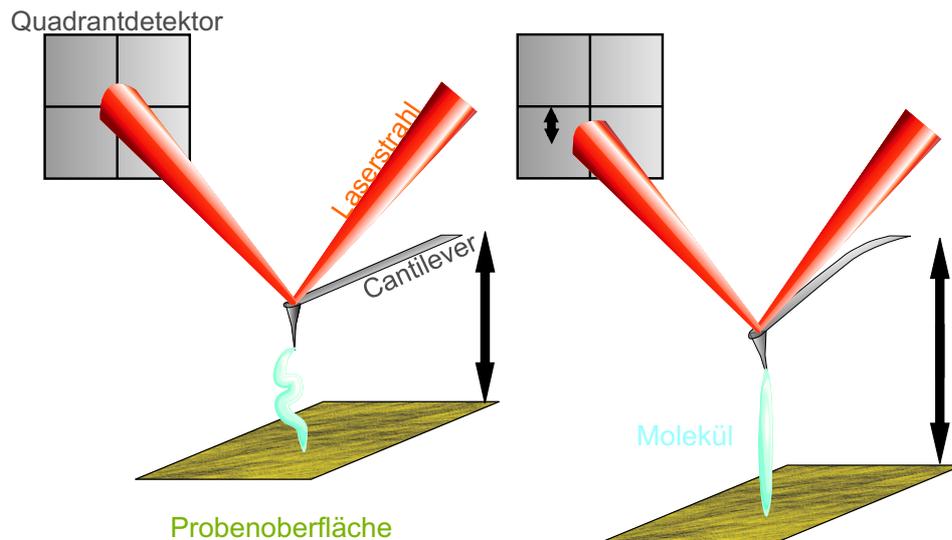


Abbildung 2.3: Das Prinzip von Kraftspektroskopie mit dem AFM

2.2 Cantilever

Bei den Cantilevern handelt es sich heute um mikrofabrizierte Massenprodukte, die je nach Anwendungszweck sehr unterschiedlich ausgeführt sein können. So sind beispielsweise die Spitzenform und -größe entscheidend für die Abbildungseigenschaften³ eines Cantilevers. Die für Spitze oder Cantilever verwendeten Materialien sind entscheidend für die Reflektivität und Polarisations-eigenschaft des Cantilever⁴ und die Möglichkeiten seiner chemischen Funktionalisierung. Außerdem sind zwei weitere wichtige Größen eines Cantilevers materialabhängig: Federkonstante und Resonanzfrequenz. Beide Größen sollen hier behandelt werden. Ein Cantilever kann in erster Näherung als ein eindimensionaler harmonischer Oszillator in Richtung seiner Spitze (s. Abb. 2.4) mit der fundamentalen Resonanzfrequenz f_r angesehen werden.

Die Resonanzfrequenz f_r für balkenförmige Cantilever an Luft lässt sich nach der

³Die gemessene Funktion der Oberflächentopographie ist letztendlich eine Faltung von Spitzenfunktion mit der wahren Oberflächenfunktion. Nur für eine δ -Funktion als Spitzenfunktion, also eine punktförmige (unendlich scharfe) Spitze, entspricht die gemessene Oberflächentopographie der wahren Oberflächentopographie.

⁴Um ausreichende Reflektivität der Cantilever sicherzustellen, ist die Rückseite der meisten Cantilever mit Gold beschichtet. Dies verleiht solchen Cantilevern dann gleichzeitig ein polarisationsneutrales Verhalten.

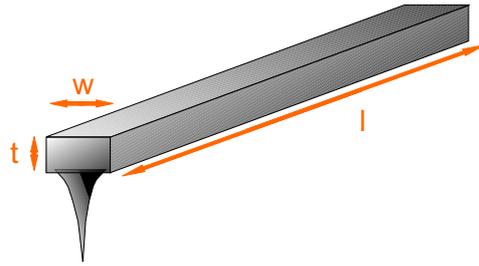


Abbildung 2.4: balkenförmiger Cantilever

Formel berechnen [17]:

$$f_r = \frac{1,02}{2\pi} \sqrt[2]{\frac{E}{\rho}} \left(\frac{t}{l^2} \right) \quad (2.1)$$

Dabei sind: t : Dicke des Cantilevers, l : Länge des Cantilevers, E : Elastizitätsmodul, ρ : Dichte (s. Abb. 2.4). Neben dieser fundamentalen Resonanzfrequenz treten noch Resonanzfrequenzen höherer Ordnung, sowie laterale Resonanzfrequenzen des Cantilevers auf.

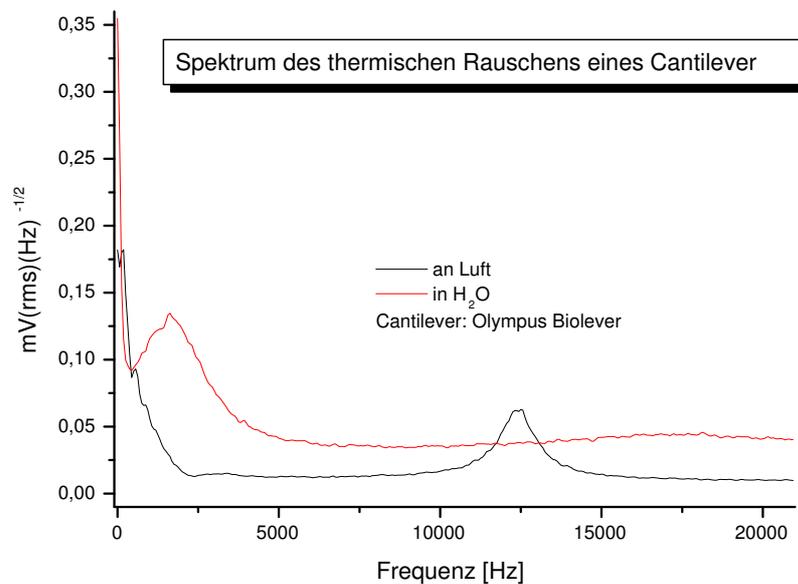


Abbildung 2.5: Spektrum des thermischen Rauschens eines Cantilevers an Luft und in Wasser

Die Güte Q eines Resonators ist definiert als $Q = \frac{f_r}{\Delta f_{1/2}}$. Dabei handelt es sich bei der

Größe $f_{1/2}$ um die volle Frequenzbreite des Resonanzpeaks bei der Hälfte der maximalen Auslenkung des Resonators. Die Q-Werte für Cantilever an Luft betragen $Q < 500$ und für Cantilever im Vakuum $Q < 50000$. Für Messungen der Resonanzfrequenzen von Cantilevern in Flüssigkeit findet man, dass erstens die fundamentale Resonanzfrequenz drastisch sinkt (s. Abb. 2.5), dass zweitens die Güte des Resonators auf Werte um $Q < 10$ sinkt und drittens, dass bei Anregung der Cantilever Resonanzpeaks auftauchen, die der Flüssigkeitszelle zugeschrieben werden können [18]. Wie in [19] gezeigt wurde, kann bei einer Größenordnung der Q-Werte von Cantilevern in Flüssigkeit von $Q < 10$ die Annahme eines harmonischen Oszillators nur als Näherung verstanden werden. Das Absinken der Q-Werte der Cantilever liegt an der viskosen Dämpfung des Cantilevers durch die anwesende Flüssigkeit. Ein Maß für den Einfluß der Dämpfung gibt der Koeffizient der viskosen Dämpfung:

$$R = \frac{k}{2\pi f_r Q} \quad (2.2)$$

Die zweite elementare Größe für Cantilever, ihre Federkonstante k [$\frac{N}{m}$], läßt sich für Balkenfedern wie folgt berechnen:

$$k = \frac{Ew}{4} \left(\frac{t}{l} \right)^3 \quad (2.3)$$

Für kraftspektroskopische Messungen ist die Wahl der Federkonstante von fundamentaler Bedeutung, weil sie auf das gewünschte Messsystem abgestimmt werden muß. Für biologisch interessante Einzelmolekülmessungen kann man generell sagen, dass die Federkonstanten sehr klein ($5 \dots 20 \frac{pN}{nm}$), die Federn also sehr weich sein müssen. Durch die thermische Energie wird ein Cantilever zu Schwingungen angeregt, die sich als Spektrum des Cantilevers (und der Flüssigkeitszelle) messen lassen. Für $Q \gg 1$ und kleine Auslenkungen des Cantilevers kann man ihn als harmonischen Oszillator mit dem folgenden Hamiltonoperator beschreiben [20]:

$$\hat{H} = \frac{p^2}{2m_{eff}} + \frac{1}{2}m_{eff}\omega_0^2 q^2 \quad (2.4)$$

Dabei sind: p : Impuls, m_{eff} : effektive Masse des Cantilevers, ω_0 : Resonanzfrequenz, q : Auslenkung des Cantilevers.

Nach dem Äquipartitionstheorem folgt dann für jede quadratische verallgemeinerte Koordinate der Zusammenhang zwischen themischer Energie und dem Erwartungswert der quadratischen Koordinate, also insbesondere für die mittlere quadratische Auslenkung $\langle q^2 \rangle$:

$$\frac{1}{2}m_{eff}\omega_0^2 \langle q^2 \rangle = \frac{1}{2}k_B T \quad (2.5)$$

Dabei sind: $k_B = 1.3806568 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$: Boltzmannkonstante, T : absolute Temperatur.

Mit dem Zusammenhang $m_{eff}\omega_0^2 = k$ für die Federkonstante folgt nun der Zusammenhang zwischen Federkonstante und mittlerer quadratischer Auslenkung eines Cantilevers:

$$k = \frac{k_B T}{\langle q^2 \rangle} \quad (2.6)$$

Die maximale Auslenkung des Cantilevers in Abhängigkeit von der Frequenz wird durch ein Lorentzprofil [21] wiedergegeben. Dies folgt aus der sog. Langevin Gleichung,

$$\frac{d^2 q}{dt^2} + 2\lambda \frac{dq}{dt} + f_r^2 q = \frac{F}{m_{eff}} e^{ift} \quad (2.7)$$

die einen eindimensionalen harmonischen Oszillator bei Anwesenheit von Reibung und äußerer Anregung der Schwingung beschreibt [22]. Die partikuläre Lösung dieser Gleichung beschreibt die stationäre Schwingung, vernachlässigt also den Einschwingvorgang. Dieser Teil der Lösung gibt daher die Schwingung im thermischen Gleichgewicht wieder. Für die partikuläre Lösung gilt:

$$q(t) = \frac{F}{m_{eff} \sqrt{(f_r^2 - f^2)^2 + 4\lambda^2 f^2}} \cos(ft + \delta) \quad (2.8)$$

Für den Fall kleiner Dämpfung $2\lambda \ll f_r$ geht dann Gl. 2.8 mit $f \approx f_r$ in folgende Gleichung über:

$$\begin{aligned} q(t) &= \frac{F}{m_{eff} \sqrt{((f_r - f)(f_r + f))^2 + 4\lambda^2 f^2}} \cos(ft + \delta) \\ &\approx \frac{F}{m_{eff} \sqrt{((f_r - f)2f_r)^2 + 4\lambda^2 f_r^2}} \cos(ft + \delta) \\ &= \frac{F}{2m_{eff} f_r \sqrt{(f_r - f)^2 + \lambda^2}} \cos(ft + \delta) \end{aligned} \quad (2.9)$$

Das Quadrat der maximalen Auslenkung von Gl. 2.9 hat nun eine Lorentzform. Mißt man nun das Spektrum der zeitabhängigen quadratischen Auslenkung, also die Fouriertransformierte von $q(t)^2$, so ergibt sich wiederum ein Lorentzprofil für die durchschnittliche quadratische Auslenkung $\widetilde{q(f)^2}$, welches durch einen Fit der entsprechenden Messdaten dargestellt werden kann:

$$\widetilde{q(f)^2} = q_0 + \frac{A}{(f_r - f)^2 + B} \quad (2.10)$$

Dabei sind: q_0 : Die konstante Verschiebung des Lorentzprofils⁵, f_r : Resonanzfrequenz des Cantilevers, A, B : Fitkonstanten.

Diese Überlegungen sind Grundlage für eine Berechnung der Federkonstanten k nach Gl. 2.6 durch ein gemessenes Resonanzspektrum eines Cantilevers, da nun für die Berechnung der durchschnittlichen quadratische Auslenkung $\langle q^2 \rangle$ des Cantilevers folgendes Integral herangezogen werden kann:

$$\langle q^2 \rangle = \int_0^\infty (\widetilde{q(f)^2} - q_0) df \quad (2.11)$$

Für jeden benutzten Cantilever ist es bei kraftspektroskopischen Messungen notwendig, seine Federkonstante zu bestimmen, da diese Größe auch bei (vermeintlich) gleichen Cantilevern stark schwankt. Neben der oben beschriebenen und im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Methode, die Federkonstante auf Grundlage des thermischen Rauschens zu bestimmen, ist es ebenfalls möglich, durch die Beladung des Cantilevers mit einer bekannten Zusatzmasse [23] oder mit Hilfe einer Eichfeder mit bekannter Federkonstante [24] k zu bestimmen. Allen Möglichkeiten ist ein Fehler in der Bestimmung der Federkonstanten von ca. 10% gemein. Wie in Abs. 2.7. gezeigt wird, ist es nun erstrebenswert, Cantilever mit möglichst hohen Resonanzfrequenzen zu benutzen. Gleichzeitig sollen diese Cantilever jedoch auch eine kleine Federkonstante für kraftspektroskopische Messungen besitzen. Für ein gegebenes Cantilevermaterial (E, ρ fest) zeigt sich anhand von Gl. 2.1 und Gl. 2.3, dass möglichst schmale, dünne und kurze Cantilever eine gute Wahl für die gegebenen Anforderungen sind. Da die Dicke des Cantilevers fertigungstechnisch nicht wesentlich unter 80 nm liegen kann, bleiben nur noch Breite und Länge der Cantilever als variable Größen. Als Beispiel sollen die bestimmenden Größen zweier Cantilever miteinander verglichen werden:

Olympus Biolever Typ B: Material: Si_3N_4 + Goldbeschichtung (50 nm) mit:

$$w = 30 \mu\text{m}, l = 100 \mu\text{m}, t = 180 \text{ nm} \rightarrow f_r \approx 13 \text{ kHz}, k \approx 6 \frac{\text{pN}}{\text{nm}}$$

EPFL Cantilever : Material: Si_3N_4 mit:

$$w = 4 \mu\text{m}, l = 26 \mu\text{m}, t = 150 \text{ nm} \rightarrow f_r \approx 330 \text{ kHz}, k \approx 6 \frac{\text{pN}}{\text{nm}}$$

Wie diese Beispiele zeigen, lassen sich die gewünschten Anforderungen durch kleine Cantilever erreichen. Mit "klein" sollen von nun an Cantilver mit Breiten $w \leq 10 \mu\text{m}$ und Längen $l \leq 30 \mu\text{m}$ gemeint sein.

⁵Im Fall eines real gemessenen Amplitudenspektrums sind dies alle weißen Rauscheinflüsse, die nicht von der thermischen Bewegung des Cantilevers stammen.

2.3 Kraftspektroskopische Messungen

Anhand von Abb. 2.6 sollen kraftspektroskopische Messungen mit dem AFM, zunächst ein zwischen Cantilever und Oberfläche gebundenes Molekül, erklärt werden.

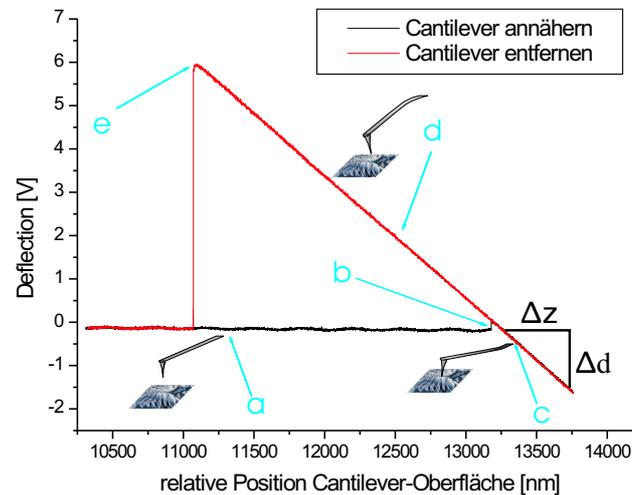


Abbildung 2.6: Prinzip der Annäherung und Entfernung eines Cantilevers an die Probenoberfläche

Anfangs (a) sind Cantilever und Oberfläche weit voneinander entfernt. Der Cantilever befindet sich in seiner Ruheposition, das Deflektionsignal hat bei der Annäherung (schwarze Kurve) einen konstanten⁶ Offset-Wert d_0 , der möglichst nahe bei Null sein sollte. Bei kleinen Entfernungen (b) zwischen Cantilever und Oberfläche werden langreichweitige attraktive (elektrostatische) Kräfte so stark, dass der Cantilever zur Oberfläche "springt", das Deflektionsignal bzw. die Kraft auf den Cantilever steigt. Cantilever und Oberfläche befinden sich jetzt im Kontakt. Mit weiterer Annäherung biegt sich der Cantilever zurück in seine Ruheposition, das Deflektionsignal nimmt seinen Offset-Wert wieder an. Wird dieser Punkt der Annäherung überschritten, so beginnt der Cantilever, sich in die andere Richtung zu verbiegen (c). Dabei sinkt das Deflektionsignal proportional zu der Änderung der relativen Position der Cantileverspitze, da diese von der Probenoberfläche nach oben gebogen wird. Ist der vorgesehene Endpunkt der Annäherung erreicht, wird die Positionsbewegung wieder umgekehrt. Bei der Entfernung von Cantilever und Oberfläche (rote Kurve) folgt das Deflektionsignal zunächst dem Verlauf

⁶Nur das thermische Rauschen sowie Interferenzeinflüsse sind erkennbar.

(c) seiner Annäherung. Die attraktiven Kräfte halten Cantilever und Oberfläche jedoch auch über die ursprüngliche Kontaktentfernung (b) hinaus in Kontakt. Dabei verbiegt sich der Cantilever nach unten (d), das Deflektionsignal steigt an. Wird die Federkraft des Cantilevers größer als die attraktive Kraft zwischen Cantilever und Oberfläche, verlieren sie ihren Kontakt (e). Der Cantilever springt in seine ursprüngliche Lage zurück, das Deflektionsignal nimmt wieder den Offset-Wert d_0 an.

Zur Kalibrierung des Deflektionssignals wird nun der Bereich (c) der Annäherungs-Entfernungskurve genutzt. Die Steigung der Kurve in diesem Bereich kann mit Hilfe von linearer Regression berechnet werden⁷. Der Einfachheit halber soll die Steigung hier nach Abb. 2.6 als

$$m = \frac{\Delta d[\text{V}]}{\Delta z[\text{m}]} \quad (2.12)$$

betrachtet werden. Für die Kraft, die ein Cantilever ausübt, gilt das Hooke'sche Gesetz:

$$\vec{F} = -k\vec{z} \quad (2.13)$$

Dabei sind: \vec{F} : Kraft, \vec{z} : Weg.

Mit der Definition des sog. "Sensorresponse" $s_r = \frac{1}{m}$ und dem Hooke'schen Gesetz steht nun eine Gleichung zur Verfügung, mit deren Hilfe das Deflektionsignal d [V] in eine Kraft umgerechnet werden kann:

$$\left| \vec{F} \right| [\text{N}] = (d - d_0)[\text{V}] s_r \frac{[\text{m}]}{[\text{V}]} k \frac{[\text{N}]}{[\text{m}]} \quad (2.14)$$

Da der Sensorresponse bei jeder kraftspektroskopischen Messungen der eigentlichen Messgrößen Deflektionsignal d und Entfernung z Cantilever-Oberfläche einfach bestimmt werden kann und die Federkonstante k mit Gl. 2.6 bekannt ist, besteht nun mit Gl. 2.14 die Möglichkeit, Kraft-Distanz-Kurven aufzunehmen. Ist ein Molekül zwischen Cantilever und Oberfläche gebunden und wird die Messung in Flüssigkeit durchgeführt, so unterscheidet sich die Messkurve von 2.6. Da Teil (d) der Kurve größtenteils auf Adhäsion des Wasserfilms auf der Oberfläche der Probe und dem Cantilever (und auf elektrostatische Wechselwirkungen) zurückzuführen ist, entfällt dieser Teil der Kurve. Stattdessen werden die Kräfte, die das angebundene Molekül auf den Cantilever ausübt, messbar. Aus dem Verlauf der Kraft-Distanz-Kurve in diesem Bereich lassen sich Rückschlüsse auf die intramolekularen Kräfte des Moleküls ziehen.

⁷Bei den eigentlichen Messungen wird dies auch so getan.

2.4 Rauschen

Neben den thermisch angeregten Resonanzfrequenzen des Cantilevers, welche sich als Schwankungen im Deflektionsignal bemerkbar machen, treten andere Schwankungen im Messsignal auf, die dieses stören. Die Abweichung eines zeitlich aufgelösten (Mess-)Signals von seinem Mittelwert aufgrund stochastischer Schwankungen bezeichnet man als Rauschen. Dabei treten diese Schwankungen in nicht-reproduzierbarer Weise auf, d.h. man kann lediglich Aussagen über die Wahrscheinlichkeit einer Abweichung vom Mittelwert treffen. Bei der folgenden Betrachtung soll der Rauscheinfluss der Elektronik und des Quadrantendetektors erklärt werden, daher lässt sich sagen, dass alle interessanten Einflüsse auf das Rauschen im Messsignal auf eine stochastische Fluktuation der Ladungsträger im betrachteten System zurückzuführen sind. Dies bedeutet, dass die Schwankung des Messsignals durch die Schwingung des Cantilevers kein Elektronikrauschen darstellt, gleichwohl wird dieser Störeinfluss auf das Messsignal mit der selben Methode - dem Filter (Abs. 2.4.) - wie das Elektronikrauschen minimiert. Der Effektivwert der Rauschspannung σ^8 gibt ein Maß für das Rauschen der Elektronik. Betrachtet man die endliche Gesamtleistung P eines Rauschsystems, so ist diese durch folgenden Zusammenhang darstellbar:

$$P = \int_0^\infty W(f)df \quad (2.15)$$

Dabei ist $W(f)$ die Leistungsdichte in Abhängigkeit der Frequenz f . Die Gesamtleistung P wird je nach Bezug auf unterschiedliche Leistungsdichten $W(f)$ in unterschiedlichen Einheiten gemessen. Neben der Stromleistungsdichte $W_I(f)$ [$\frac{\text{A}^2}{\text{Hz}}$] und Frequenzleistungsdichte $W_f(f)$ [$\frac{\text{Hz}^2}{\text{Hz}}$] ist die Spannungsleistungsdichte $W_U(f)$ [$\frac{\text{V}^2}{\text{Hz}}$] eine verbreitete Größe. Daher folgen mit Gl. 2.15 und den unterschiedlichen Leistungsdichten die Interpretationen für die Leistung. Spannungsleistung:

$$P_U = \overline{U}^2 \quad (2.16)$$

Wobei \overline{U}^2 die mittlere quadratische Spannung darstellt. Stromleistung:

$$P_I = \overline{I}^2 \quad (2.17)$$

Wobei \overline{I}^2 den mittlere quadratische Strom darstellt. Ein typisches Rauschspektrum (Abb. 2.7) zeigt Bereiche konstanter Leistungsdichte, das sog. weiße Rauschen, das sog. $\frac{1}{f}$ -Rauschen sowie einen Abfall der Leistungsdichte bei sehr großen Frequenzen, der durch die Forderung endlicher Leistungen begründet ist.

⁸ $\sigma = \sqrt[2]{\sigma^2}$ mit: $\sigma^2 = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T a(t)^2 dt$, $a(t) = A(t) - \overline{A}$. Wobei $A(t)$: Verrauschtes Signal, \overline{A} : Mittelwert des Signals, t : Zeit

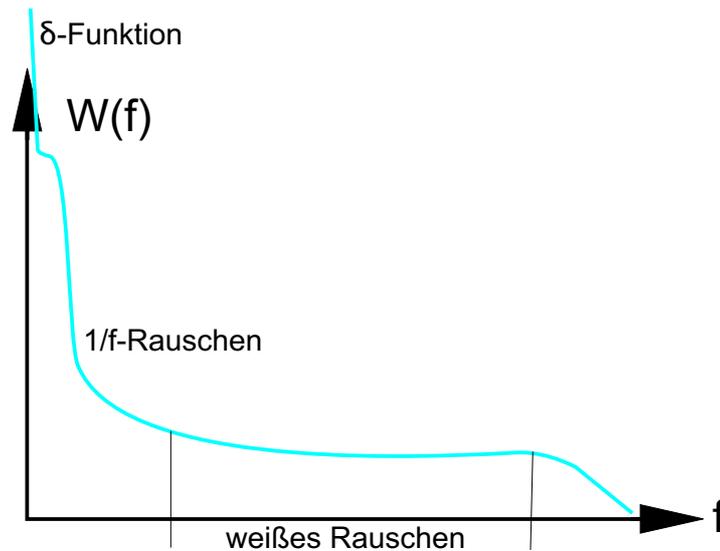


Abbildung 2.7: Typisches Rauschspektrum

Die ebenfalls für $f \rightarrow 0$ eingezeichnete δ -Funktion trägt dem Vorhandensein eines Gleichstromanteils Rechnung, bezieht sich also nicht auf Rauschteile des Spektrums. Drei Arten des Rauschens sollen hier kurz erläutert werden:

2.4.1 Thermisches Rauschen

Eigenbewegungen der Ladungsträger durch thermische Energie in den elektronischen Komponenten bewirken eine Spannungsfluktuation. Dies ist der dominante Einfluß in Leitern und passiven Bauelementen, insbesondere Widerständen. Anhand von Widerständen R soll exemplarisch der Zusammenhang zwischen thermischem Rauscheinfluß und Temperatur gezeigt werden. Die sog. Nyquist-Beziehung formuliert folgende frequenzunabhängige Beziehung: $W_I(f) = 4k_BTR$. $P_U = \overline{U}^2$ Daraus folgt sofort mit Gl. 2.15 und Gl. 2.16:

$$\overline{U}^2 = 4k_BTR\Delta f \quad (2.18)$$

für die mittlere quadratische Spannung bzw. $\overline{U} = \sqrt{4k_BTR\Delta f}$ für den Effektivwert der Spannung. Hierbei ist zu beachten, dass Δf die Bandbreite der Messung bezeichnet, also keine Frequenzabhängigkeit. Weiterhin wird deutlich, dass der Effektivwert der Spannung nur von der absoluten Temperatur und dem Widerstand abhängen. Da der Widerstand von der konkret benutzten Gesamtschaltung abhängt, besteht also der einzige Weg das thermische Rauschen zu vermindern darin, die Elektronik (stark) zu kühlen, oder die Bandbreite der Messung durch Filter zu begrenzen. Daneben hat das

Nyquist-Theorem auch Gültigkeit für das thermische Rauschen eines Cantilevers. Wenn R den Koeffizienten der viskosen Dämpfung bezeichnet (s. Gl. 2.2). Dann stellt Gl. 2.18 eine Gleichung für die mittlere quadratische Abweichung der Kraft dar.

2.4.2 Schrotrauschen

Das Schrotrauschen tritt insbesondere in aktiven Bauelementen (Operationsverstärkern, Transistoren etc.) auf. Die Quantisierung der Ladungsträger führt dazu, dass ein Strom keinen zeitlich konstanten, sondern nur einen zeitlich gemittelt konstanten Wert annimmt, da der Strom "portionsweise", d.h. "stromimpulsweise", fließen muß. Für eine genaue Betrachtung des Schrotrauschens ist es also notwendig, die Geschwindigkeitsverteilung der Ladungsträger über das Zeitintervall, in dem sie zum Strom beitragen, zu kennen. Diese Geschwindigkeitsverteilung ist charakteristisch für unterschiedliche Raumladunggebiete, da dort jeweils unterschiedliche Beschleunigungen auf die Ladungsträger wirken. Gleichförmig beschleunigte Elektronen in einer Vakuumdiode können beispielsweise durch einen sägezahnförmigen Strombeitrag mit der Laufzeit Δt beschrieben werden. Eine Fourieranalyse des Strombeitrages eines am Gesamtstrom beteiligten Ladungsträgers gibt Auskunft über die Frequenzabhängigkeit des Rauschbeitrages. Für Frequenzen $f \ll \frac{1}{\Delta t}$ ⁹ gilt die sog. Schottky-Beziehung: $W_I = 2eI$ (wobei: e : Elementarladung $1.60217733 \times 10^{-19}$ C) aus der mit Gl. 2.15 und Gl. 2.17 für den mittleren quadratischen Rauschstrom (und zwar unabhängig vom zeitlichen Verlauf der Strombeiträge einzelner Ladungsträger) $\bar{I}^2 = 2eI\Delta f$ folgt. Geht man zu anderen Potentialverläufen über, beispielsweise dem p-n-Übergang, so müssen Minoritäts- und Majoritätsladungsträger, also die konkrete Dotierung, sowie die von außen an den Übergang angelegte Spannung betrachtet werden. Damit wird deutlich, dass für eine konkrete Messtechnik die Berechnung des Schrotrauschens fast unmöglich ist. Prinzipiell läßt sich nur sagen, dass geringe Ströme bei der Minimierung des Schrotrauschens hilfreich sind, das Signal-Rausch-Verhältnis jedoch nicht ändern.

2.4.3 $\frac{1}{f}$ -Rauschen

Unter dem Begriff des $\frac{1}{f}$ -Rausches versteht man keinen eigenständig erklärbaren Rauscheinfluß, sondern vielmehr die Summe aller Rauscheinflüsse, die eine $\frac{1}{f}$ -Frequenzabhängigkeit zeigen. Es existiert also nicht ein Erklärungsmodell, sondern vielmehr viele Einzelbei-

⁹Dies bedeutet frequenzunabhängiges, also weißes Rauschen. Nach [25] kann dieser Fall für $f \leq \frac{1}{10\Delta t}$ angenommen werden.

träge, zu denen auch thermisches Rauschen und Schrotrauschen gehören. Einen weiteren wichtigen Beitrag zum $\frac{1}{f}$ -Rauschen stellt das Generations-Rekombinations-Rauschen dar. Dabei werden in Halbleitern Elektron-Loch-Paare generiert und vernichtet. Zunächst bedeutet dies eine Schwankung des Widerstandes des Halbleiters. Beispielsweise in ladungsgesteuerten Feldeffekttransistoren führt dieser Effekt jedoch zu einer unmittelbaren Rauschspannung auf der Source-Drain Verbindung. Da nach einer für den Halbleiter kennzeichnenden Relaxationszeit τ das Elektron-Loch-Paar vernichtet wird, ist diese Größe charakteristisch für den Rauschbeitrag zum Generations-Rekombinations-Rauschen. Nach [26] gilt dann für die frequenzabhängige Leistungsdichte eines Ladungsträgers: $W(f) \sim \frac{1}{1+(f/f_g)^2}$. Da das Generations-Rekombinations-Rauschen durch die Überlagerung von Beiträgen unterschiedlicher Ladungsträger zustande kommt, müssen alle ihre Beiträge berücksichtigt werden. Für den Feldeffekttransistor beschreibt das sog. McWorther-Modell [26] die Gesamtbeiträge und zeigt die $\frac{1}{f}$ -Abhängigkeit der Leistungsdichte.

Da das Rauschspektrum eines Cantilevers charakteristische Frequenzbereiche zeigt (s. Abb. 2.5), in denen es erhöhtes Rauschen ($\frac{1}{f}$ -Gebiet bis ca. 2,5 kHz und Resonanzfrequenz des Cantilevers ca. 12,5 kHz) - also Messfehler - beiträgt, ist es sinnvoll, diese Frequenzbereiche heraus zu filtern. Da zusätzlich der Beitrag der Bandbreite des thermischen Rauschens von Cantilevern [3] und Elektronik in den Messfehler eingeht, ist es sinnvoll, diese Bandbreite für eine Messung auf den interessanten Bereich einzuschränken. Zu diesem Zweck werden elektronische Filter benutzt.

2.5 Filter

Um bestimmte Frequenzen eines elektronischen Messsignals nicht passieren zu lassen, setzt man Filter ein. Als Hochpassfilter bezeichnet man eine Schaltung, die nur Signale mit hohen Frequenzen, d.h. Frequenzen, die größer sind als die sog. Grenzfrequenz f_{gh} , weiterleitet. Tiefpassfilter sind Schaltungen, die nur Frequenzen $f < f_{gt}$ passieren lassen. Bandpassfilter sind eine Hintereinanderschaltung von Hoch- und Tiefpassfilter. Sie leiten nur Frequenzen f weiter, für die $f_{gh} < f < f_{gt}$ gilt¹⁰. Die einfachsten Arten von Filtern sind passive Filter, die mit Hilfe von einem Kondensator und einem Widerstand aufgebaut werden (s. Abb. 2.8).

Die Grenzfrequenzen für diese Filter sind [27] für Hoch- und Tiefpass $f_{gh} = f_{gt} = \frac{1}{2\pi RC}$ (dabei sind R der Widerstandswert und C der Kapazitätswert aus Abb. 2.8). Dabei

¹⁰Weitere Filtertypen sind Notchfilter, Bandsperren und Allpässe

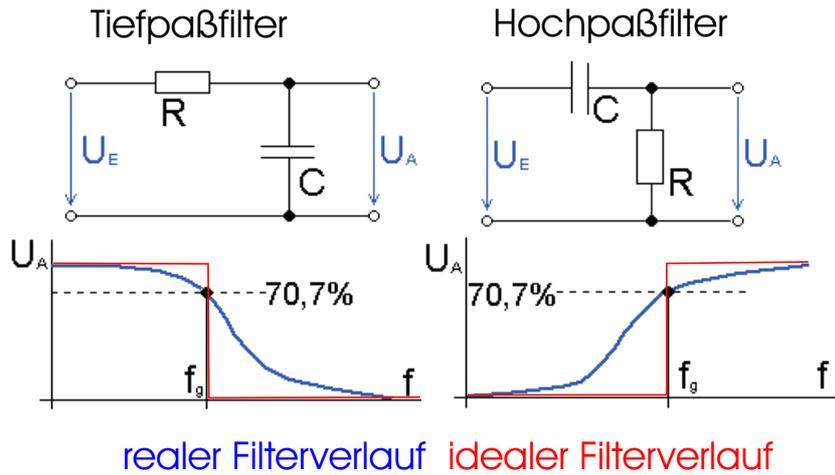


Abbildung 2.8: Passive Hoch- und Tiefpassfilter

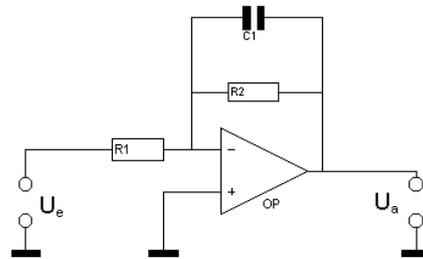


Abbildung 2.9: Tiefpass 1. Ordnung mit Umkehrverstärker

bedeutet der Wert der Grenzfrequenz, dass dort die Verstärkung des Filters gerade $-3dB = 20 \log \frac{U_a}{U_e}$ (mit $\frac{U_a}{U_e} = 0,707$) beträgt. Der entscheidende Nachteil dieser einfachen passiven Filter ist, dass sie für $f \gg f_{gt}$ bzw. $f \ll f_{gh}$ nur mit 20 dB/Dekade abfallen. Dies bedeutet, dass die Filter an ihren Grenzen eben nicht (idealerweise) unendlich steil sind, sondern einen Filterverlauf zeigen (s. Abb. 2.8), der stark vom Idealverlauf abweicht. Einen weiteren Typ von Filter stellen die sog. aktiven Filter (s. Abb. 2.9) dar.

Zunächst besitzen sie die gleiche Filtercharakteristik wie ein passives Filter, jedoch verstärken sie die Ausgangsspannung um den Faktor $-\frac{R_2}{R_1}$ (dabei sind R_1 und R_2 Widerstandswerte aus Abb.2.9). Eine deutliche Verbesserung der Filtercharakteristik kann durch Hintereinanderschaltung mehrerer Filter erreicht werden, welche in der Praxis mit Operationsverstärkern zu sog. aktiven mehrstufigen Filtern¹¹ aufgebaut werden. Dabei

¹¹Mit aktiven Filtern lassen sich Übertragungsfunktionen $A(s_n) = \frac{U_a}{U_e} = \frac{1}{1+a_1s_1+a_2s_2^2+\dots+a_ns_n^n}$ der Filter

sind unterschiedliche Aufbauten¹², wie Butterworth-, Tschebyscheff-, Bessel- und Causerfilter [27] realisierbar. Diese Filter unterscheiden sich in ihren Filtercharakteristiken dahingehend, dass sie unterschiedliche Überschwingverhalten und Steilheiten zeigen. Ein typischer Aufbau von Filtern zweiter Ordnung ist die die sog. "Mehrfachgegenkopplung" (s. Abb. 2.10), mit denen die genannten Filtertypen aufgebaut werden können.

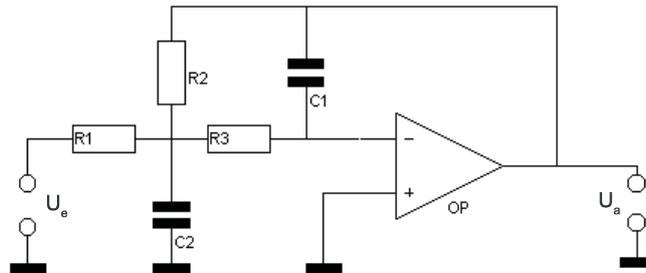


Abbildung 2.10: Aktives Tiefpassfilter zweiter Ordnung mit Mehrfachgegenkopplung

Da für die gewünschte Grenzfrequenz eine genaue Dimensionierung der Widerstände und Kapazitäten erforderlich ist, werden Filteraufbauten vierter, sechster etc. Ordnung dann recht schwierig. Eine Möglichkeit, die Probleme etwas zu vereinfachen, stellen Filterbausteine dar, bei denen die Kapazitäten bereits im IC (engl.: "integrated circuit", dt.: "integrierter Schaltkreis") eingebaut und damit festgelegt sind. Solche Filter¹³ müssen dann von außen nur noch mit den Widerständen beschaltet werden. Will man Filter mit einstellbaren Grenzfrequenzen aufbauen, so bieten sich Filter mit einer sog. "Einfachmitkopplung" [27], Filterbausteine, die bereits festgelegte und binär einstellbare Grenzfrequenzen¹⁴ besitzen oder sog. "Switched-Capacitor-Filter"¹⁵ an. Bei letzteren werden die Kapazitäten der Schaltung durch ein getaktetes Zuschalten fest eingestellter Kapazitäten geregelt. Für die Anwendung eines Bandpassfilters zur Verbesserung der Signalqualität soll Abb. 2.11 als Beispiel dienen. Es zeigen sich insbesondere Probleme der Filterung durch die ungenügende Steilheit¹⁶ und Dämpfung des Hochpassfilters (rot) bei

realisieren, deren Nennerpolynom durch komplexe Beiträge a_m zerlegt werden kann. Dies ist gleichbedeutend damit, dass ein Filter aus mehreren Filterstufen mit den jeweiligen Beiträgen der Polynomzerlegung aufgebaut werden kann.

¹²also unterschiedliche Polynomzerlegungen in der Übertragungsfunktion

¹³z.B. MAX 274, Maxim Integrated Products Inc., Sunnyvale, USA

¹⁴z.B. MAX 270, Maxim Integrated Products Inc., Sunnyvale, USA

¹⁵z.B. LTC 1064, Linear Technology, Milpitas, USA

¹⁶Daher wurde bei den kraftspektroskopischen Messungen auf den Einsatz des Hochpassfilter verzichtet.

Frequenzen $< 2,5$ kHz durch die Schwankungen der Rauschintensität und des Tiefpassfilters (blau) bei Frequenzen $> 2,5$ kHz durch das Absenken des Untergrundrauschens bei gleichzeitigem Nichtverschwinden des Resonanzpeaks.

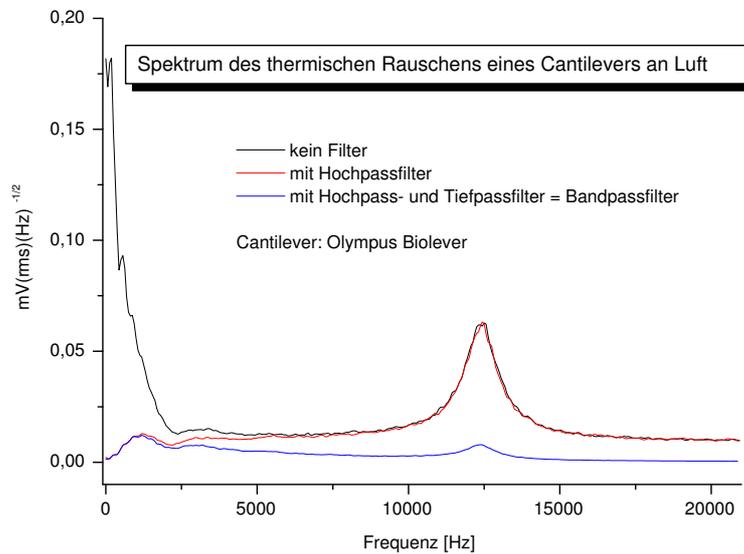


Abbildung 2.11: Filterung des thermischen Rauschspektrums eines Cantilevers

2.6 Laserfokus

Um mit einem Laserstrahl die Rückseite eines Cantilevers zu bescheinigen und ausreichende Intensität des reflektierten Laserstrahls zu erreichen, ist es notwendig, den Laserstrahl zu fokussieren. Häufig werden dazu Diodenlaser benutzt, da diese klein, leicht, ausreichend intensiv und preiswert sind. Ein Nachteil von Laserdioden ist ihre große Strahldivergenz und ein elliptisches Strahlprofil. Wird eine Optik in den Diodenlaser integriert, kann dies kompensiert werden. Bei dem hier verwendeten Diodenlaser ist dies der Fall. Daher soll nun für die TEM_{00} Mode (Gaußprofil) eines Laserstrahls, der durch eine Linse fokussiert wird, die Größe des Laserspots berechnet werden. Dies entspricht in erster Näherung dem realisierten Aufbau.

Für den Durchmesser d_f und die Tiefe d_{of} ($2 \cdot \text{Rayleighlänge}$) eines Laserfokus (s. Abb.

Das gefilterte Signal wich zu stark vom ungefilterten Signal ab.

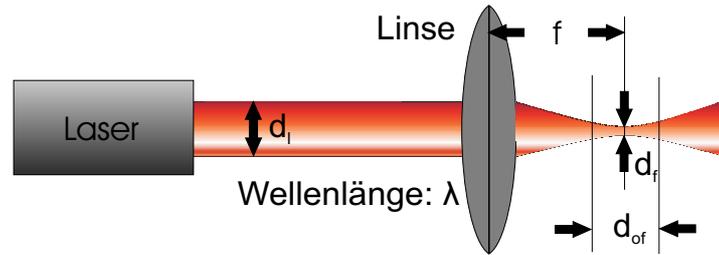


Abbildung 2.12: Fokusgröße eines Laserstrahls, der durch eine Linse gebündelt wird

2.12) gelten nach [28] folgende Beziehungen:

$$d_f = \frac{4\lambda f}{\pi d_l} \quad (2.19)$$

$$d_{of} = \frac{\pi d_f^2}{2\lambda} = \frac{8\lambda f^2}{\pi d_l^2} \quad (2.20)$$

Dabei sind: λ : Wellenlänge des verwendeten Laserlichtes, f : Brennweite der Linse.

Die Rayleighlänge ist dabei die Entfernung der Fokalebene zu einer Ebene senkrecht zur Strahlausbreitungsrichtung, auf der sich der Strahldurchmesser um den Faktor $\sqrt[2]{2}$ verbreitert hat.

2.7 Polarisation

Der elektrische Feldvektor einer Lichtwelle A (rot) steht senkrecht auf der Ausbreitungsrichtung (z) der Welle (s. Abb. 2.13). Der magnetische Feldvektor steht wiederum senkrecht auf dem elektrischen Feldvektor und senkrecht auf der Ausbreitungsrichtung. Ändert der elektrische (und damit der magnetische) Feldvektor seine Richtung im Laufe der Ausbreitung nicht, liegen die elektrischen Feldvektoren also zu jedem Zeitpunkt in einer Ebene (o.B.d.A.: y - z -Ebene), so liegt eine lineare Polarisation der Lichtwelle A vor. Die elektrischen Feldvektoren einer Lichtwelle B (blau) die senkrecht linear zu A polarisiert ist und die selbe Ausbreitungsrichtung (z) hat, liegen auf einer Ebene senkrecht zu der Ebene (x - z -Ebene) der elektrischen Feldvektoren von A. Dabei stellt die Schnittgrade der beiden Ebenen die Ausbreitungsrichtung der Lichtwellen A und B dar. Die elektrischen Feldvektoren der Wellen lassen sich dann folgendermaßen beschreiben: $\vec{A}(t) = \vec{y}_1 A_0 \sin(\vec{k}_A \vec{z}_1 + \omega_A t + \delta_A)$ und $\vec{B}(t) = \vec{x}_1 B_0 \sin(\vec{k}_B \vec{z}_1 + \omega_B t + \delta_B)$. Dabei sind: $\vec{x}_1, \vec{y}_1, \vec{z}_1$: Einheitsvektoren in x -, y - bzw. z -Richtung; A_0, B_0 : maximale Feldstärken der Wellen A und B; \vec{k}_A, \vec{k}_B : Wellenzahlvektoren der Wellen A und B; ω_A, ω_B : Frequenzen der Wellen A und B; δ_A, δ_B : Phasenverschiebungen der Wellen A und B; t : Zeit

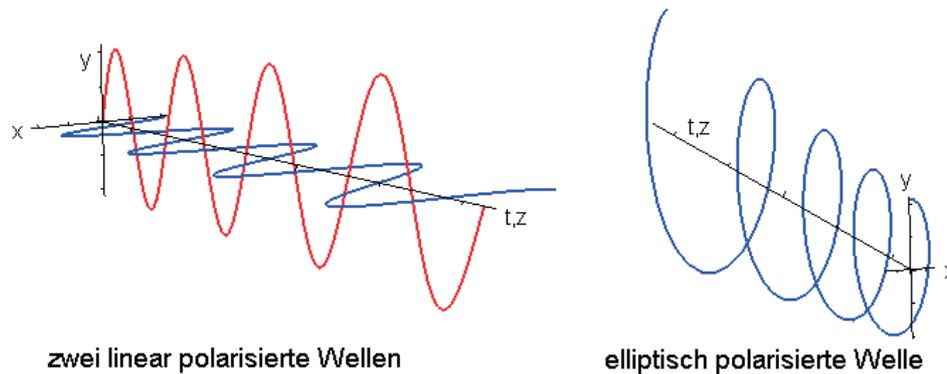


Abbildung 2.13: Polarisation von Lichtwellen, die Abbildung stellt die elektrischen Feldvektoren dar

Die elektrischen Feldvektoren jeder beliebig Lichtwelle C mit der Ausbreitungsrichtung \vec{z}_1 , können nun als Linearkombination von elektrischen Feldvektoren in \vec{x}_1 -Richtung und \vec{y}_1 -Richtung dargestellt werden: $\vec{C}(t) = \vec{y}_1 C_{0y} \sin(\vec{k}_C \vec{z}_1 + \omega_C t + \delta_{C_y}) + \vec{x}_1 C_{0x} \sin(\vec{k}_C \vec{z}_1 + \omega_C t + \delta_{C_x})$ Solche Wellen sind i.A. nicht mehr linear polarisiert. Für den Sonderfall, dass $C_{0y} = C_{0x}$ und $\delta_{C_y} + \delta_{C_x} = \frac{\pi}{2}$ gilt, handelt es sich bei der Welle um eine zirkular polarisierte Welle. Der elektrische Feldvektor einer solchen Welle windet sich schraubenförmig um die Ausbreitungsrichtung. In optisch aktiven Medien kann die Polarisationsrichtung von Lichtwellen geändert werden, indem eine richtungsabhängige Phasenverschiebung der Feldvektoren bewirkt wird. Meist handelt es sich bei optisch aktiven (optisch anisotropen) Materialien um Kristalle, deren unterschiedliche Kristallachsen unterschiedliche Ausbreitungsgeschwindigkeiten des Lichtes zulassen. In sog. " $\frac{\lambda}{4}$ -Plättchen" wird eine linear polarisierte Welle in eine zirkular polarisierte Welle gedreht und umgekehrt. Ebenfalls erwähnt sei der Effekt der Polarisation durch Reflexion. Wird eine Fläche unter seinem sog. "Brewsterwinkel" mit unpolarisiertem Licht bestrahlt, so reflektiert es nur in eine Richtung linear polarisiertes Licht. Das Licht der orthogonalen linearen Polarisationsrichtung tritt durch die Fläche. Dies ist das Prinzip sog. "Polarisationsstrahlteiler".

2.8 Piezokeramiken und kapazitive Sensoren

Unter piezoelektrischen Materialien versteht man solche Materialien, die in einem elektrischen Feld eine makroskopische Deformation zeigen. Umgekehrt generieren sie eine elektrische Spannung, wenn Kraft auf das Material ausgeübt wird. Zur genauen Positionierung im Å-Bereich bieten sich Piezokeramiken an, da sie keinen "stick-slip" (dt.:

”kleben-rutschen”) Effekt zeigen, weil keine mechanischen Reibungseffekte zwischen verschiedenen Bauteilen auftreten. Ein Piezo verändert vielmehr ”aus sich selbst heraus” seine Form. Außerdem werden Piezokeramiken durch ein von außen angelegtes elektrisches Feld zur Ausdehnung oder Kontraktion gebracht. Für die Steuerung der Bewegung ist dies vorteilhaft, da keine aufwändige Signalgeneration¹⁷ stattfinden muß. Ursache für die Deformation von piezoelektrischen Materialien ist eine Verschiebung von Teilen der dielektrischen Elementarzellen des Materials. Dadurch bilden sich permanente Dipol-(Quadrupol...) Momente und Deformationen der Elementarzelle aus. Gruppen von benachbarten Zellen mit gleichen Richtungen der mechanischen und elektronischen Deformation bezeichnet man als Domänen. Oberhalb der Curietemperatur verschwinden sowohl die Domänen (wie beim Ferromagnetismus), als auch die Deformation der Elementarzellen (s.Abb. 2.14).

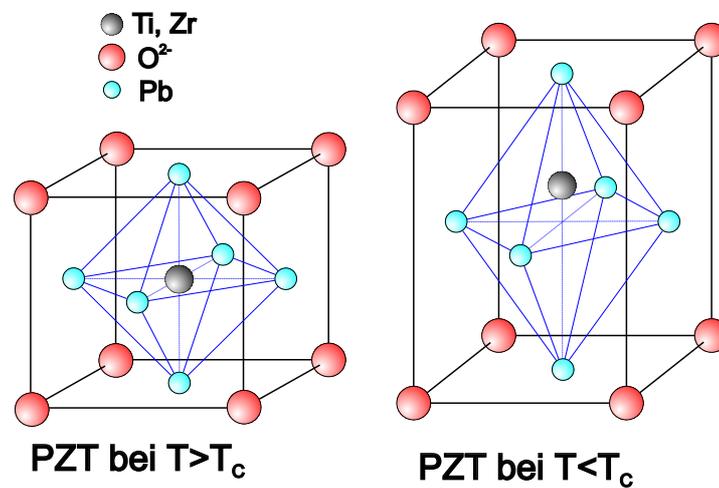


Abbildung 2.14: Elementarzellen von Bleizirkonat-Bleitanat (PZT)

Für die Herstellung von effektiven piezoelektrischen Materialien wird das Ausgangsmaterial über die Curietemperatur des Materials erhitzt. Während des Abkühlungsprozesses wird dann ein hohes elektrisches Feld angelegt, um die Deformation der Elementarzellen und die Domänenbildung im Material zu maximieren. Wird bei einem so polarisierten piezoelektrischen Material nun von aussen ein elektrisches Feld angelegt, so bewirkt dies eine makroskopische Deformation des Materials. Dabei ist die Deformation abhängig von der Größe des Ausgangsmaterials L , der angelegten Feldstärke E sowie der Richtung der angelegten Feldstärke in Bezug auf die ursprüngliche Polarisationsrichtung. Weiterhin gibt eine Größe d_{ij} einerseits die Richtungsabhängigkeit - i gibt

¹⁷wie z.B. bei Schrittmotoren

die Polarisationsrichtung, j die elektrische Feldrichtung von E wieder - und andererseits die Materialabhängigkeit der Ausdehnung wieder. Damit wird die Längenänderung ΔL ausgedrückt durch: $\Delta L \approx E d_{ij} L$ Typischerweise hat das häufig verwendete Bleizirkonat-Bleititanat eine Ausdehnungskoeffizienten von ca. $d_{33} = 500 \frac{pm}{V}$, dabei sind Polarisationsrichtung und Feldrichtung gleich. Die maximale Feldstärke, die an die Materialien angelegt werden darf, beträgt ca. $2000 \frac{V}{mm}$. Damit beträgt die maximale Längenausdehnung eines Piezos ca. 1‰ seiner ursprünglichen Länge. Piezoelektrische Materialien sind empfindlich gegenüber Erhitzung und starken Erschütterungen, da dies die möglichst einheitliche Domänenstruktur zerstören kann. Um die Feldstärken bzw. Spannungen, die für die Ansteuerung der Piezos benötigt werden, in handhabbaren Größen zu halten und gleichzeitig die Verstellwege zu maximieren, kann man die Piezos scheibenweise aufbauen, indem man abwechselnd Elektroden und dünne Piezoschichten aufeinander stapelt und verklebt. Dabei werden die Piezoscheiben abwechselnd in den entgegengesetzten Polarisationsrichtungen untergebracht und die Elektroden später abwechselnd mit zwei unterschiedlichen Spannungen versorgt.

Durch an den Piezo angelegte Spannungen wird die Domänenstruktur des Materials verändert. Dies bedeutet, dass d_{ij} des Materials bei seiner Benutzung als Verstellelement einer ständigen (kleinen) Änderung unterliegt. Diese Änderung ist abhängig von der "Vorgeschichte" der angelegten Spannungen. Daher zeigen Piezomaterialien Hystereseeffekte, d.h. bei einer festen Spannung, die angelegt wird, ist die Längenausdehnung des Piezos abhängig davon, wie er sich zuvor ausgedehnt hat. Eine langsame Polarisation der Domänenstruktur des Piezomaterials bei angelegter konstanter Spannung bezeichnet man als "creep" (engl.: "to creep", dt.: "schleichen"). Auch der creep ändert die Längenausdehnung des Piezos. Diese Effekte machen es notwendig, die Längenausdehnung eines Piezos zu messen (und zu regeln).

Für die Positionskontrolle der Piezos können beispielsweise kapazitive Abstandssensoren verwendet werden. Sie funktionieren nach dem Prinzip des Plattenkondensators, für dessen Kapazität C folgende Abstandsabhängigkeit gilt: $C = \varepsilon_0 \varepsilon_r \frac{A}{d}$. Dabei ist: ε_0 : elektrische Feldkonstante; ε_r : Dielektrizitätszahl des Materials zwischen den Kondensatorplatten; A : Fläche der Kondensatorplatten; d : Abstand der Kondensatorplatten.

Das bedeutet, dass ein Abstandssensor für Piezos gebaut werden kann, indem man eine Platte des Messkondensators fest unterbringt und die andere Platte mit der Verstelleinheit bewegt. Über einen Referenzkondensator können dann kleinste Kapazitätsänderungen, also Abstandsänderungen, gemessen werden. Da bei den kapazitiven Sensoren eine möglichst hohe Auflösung (Å-Bereich) benötigt wird, verlangt dies eine hohe Präzision bei der Fertigung paralleler Kondensatorplatten, Temperaturstabilität der Platten

und auch die Vermeidung von Störkapazitäten auf den Zuleitungen.

2.9 DNA

Die DNA (engl.: "deoxyribonucleic acid", dt.: "Desoxyribonukleinsäure") stellt den "Informationsspeicher" der Zelle dar. Durch sie wird die Synthese und Regulierung der Bestandteile einer Zelle ermöglicht. Das Rückgrat der DNA besteht aus einer Abfolge von Zuckern (Desoxyribose) und Phosphaten, die den 3' und 5'-Kohlenstoff des Zuckers verestern. Der Länge einer sog. "Nukleotidkette" kann in der Natur auf beispielsweise ca. 1m ($2,9 \cdot 10^9$ Nukleotide) beim Menschen anwachsen. Am 1'-Kohlenstoff jedes Zuckers kann zusätzlich eine Purin- oder Pyrimidinbase anbinden. In der Abfolge der Basen, der sog. Primärstruktur, ist der Informationsgehalt der DNA codiert. In DNA kommen vier verschiedene Typen der Basen vor. Dies sind die Purinbasen Adenin und Guanin sowie die Pyrimidinbasen Thymin und Cytosin. Jeweils eine der Purinbasen kann genau an eine komplementäre Pyrimidinbase binden. Diese Paarungen sind Adenin und Thymin mit zwei Wasserstoffbrücken, sowie Guanin und Cytosin mit drei Wasserstoffbrücken. Unter physiologischen Bedingungen liegt DNA in Form einer rechtsdrehenden Doppelhelix als sog. B-DNA vor. Dabei vereinigen sich zwei komplementäre Nukleotidketten in der Form, dass die nach innen gerichteten Basenpaare den Zusammenhalt zwischen den beiden Nukleotidketten bilden, die sich antiparallel um eine gemeinsame Achse winden. Der Durchmesser der Doppelhelix beträgt rund 2 nm, der Verdrehungswinkel zweier aufeinanderfolgenden Basenpaare in Bezug auf ihre Verbindungslinien zu den angebondenen Zuckern beträgt 36° ($34,6^\circ$). Damit sind 10 (10,4) Basenpaare für eine "Schraubenwindung" der Doppelhelix, die eine Steighöhe von 34 nm aufweist, erforderlich [29]. Weitere Formen von DNA sind A-DNA, C-DNA, Z-DNA, die sich teilweise erheblich in den charakteristischen Größen der Doppelhelix unterscheiden, aber immer noch als eine solche vorliegen. Werden von außen Kräfte an die an den Enden fixierte ds-DNA (Doppelstrang-DNA) längs der Helixachse angelegt, so kommt es zu einer Streckung der DNA und schließlich zum Schmelzen der DNA, also einer Trennung der Wasserstoffbrücken zwischen den Basenpaaren. Die gestreckte Form der DNA, die bis zu 170% der Länge der ursprünglichen B-DNA aufweist, wird als S-DNA bezeichnet. Sie bildet sich, in Abhängigkeit der Sequenz der DNA, wenn Kräfte zwischen 40-80 pN an die DNA angreifen [30]. In einer Kraft-Distanzkurve zeigt sich die S-DNA-Konformation als charakteristisches Kraftplateau, welches mit einem steilen linearen Kraftanstieg, dem Schmelzbereich der DNA, endet. Das vollständige Schmelzen der DNA ist bei Kräften von rund 330 pN zu finden. Anschließend ist für höhere Zugkräfte bis ca. 400 pN mit-

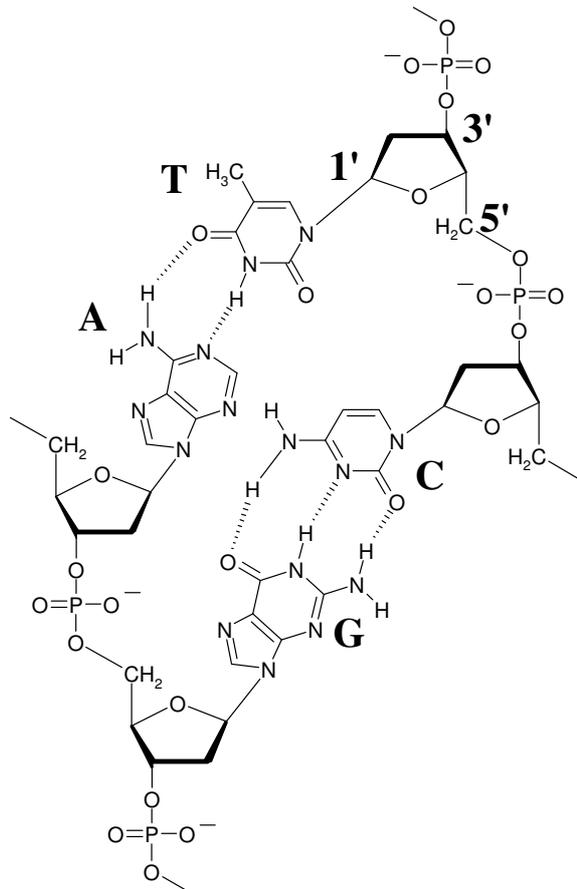


Abbildung 2.15: Struktur der DNA

unter noch eine Streckung der Einzelstrang-DNA (ssDNA) [31] zu finden.

3 Der Messaufbau

3.1 Der prinzipielle Aufbau

In Abb. 3.1 ist der gesamte Messaufbau schematisch dargestellt. Dabei stellt der AFM-Kopf, also die Einheit, die den Cantilever und den Strahlengang des Lasers umfasst, das "Herzstück" des Messaufbaus und dieser Arbeit dar.

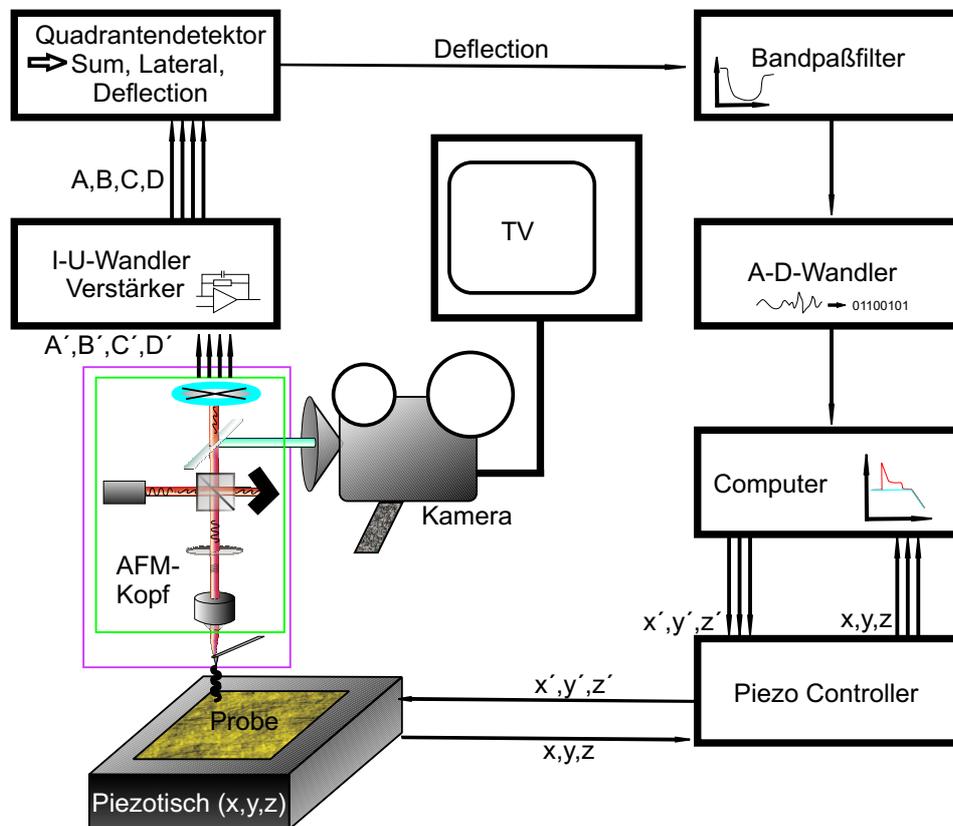


Abbildung 3.1: schematische Darstellung des Messaufbaus

Die vier Messsignale des Quadrantendetektors müssen zunächst in elektrische Spannungen umgewandelt und verstärkt werden. Anschließend werden die vier Signale in der

sog. Quadrantendetektorelektronik durch Summen- und Differenzbildung insbesondere zum zentralen Messsignal - dem Deflektionsignal - verarbeitet. Dieses Signal enthält nun die zur Auswertung notwendigen Informationen über die Auslenkung des Cantilevers zu jedem Zeitpunkt. Das Deflektionsignal wird durch ein elektronisches Bandpassfilter auf die Messkarte des Messcomputers gegeben. Mit dem Messcomputer werden nun die Messdaten über die Auslenkung des Cantilever aufgenommen und gleichzeitig mit den Daten der Position der Probe(noberfläche) korreliert. Die Position der Probenoberfläche wird durch einen kapazitiv geregelten Piezotisch gesteuert. Dabei gibt das Messprogramm des gesamten Aufbaus eine gewünschte dreidimensionale Position der Probe vor. Die Sollposition wird über eine Digital-Analog-Wandlung einer Piezotischsteuerelektronik als drei Spannungswerte vorgegeben. Gleichzeitig regelt die Piezotischsteuerelektronik die Auslenkung der Piezos. Dazu wird diese jeweils kapazitiv gemessen und zusätzlich als drei analoge Spannungen an der Piezotischsteuerelektronik bereitgestellt. Diese Spannungen werden wiederum durch die A-D-Messkarte im Messrechner aufgenommen und erlauben so die Korrelation von Deflektionsignal und Positionssignal.

3.2 Der AFM-Kopf

Für Linsen mit einer Brennweite von rund 10 mm, die benötigt werden, um den Strahl eines Diodenlasers auf einen Durchmesser von rund $4 \mu\text{m}$ zu fokussieren, bieten sich Mikroskopobjektive an. Da Mikroskopobjektive jedoch verhältnismäßig groß sind und Strahlengänge, die stark fokussiert werden, im Strahlenverlauf hinter dem Fokus stark divergieren, bietet es sich an, den Strahlengang des Lasers und das Mikroskopobjektiv orthogonal zum Cantilever zu platzieren. Dadurch behindern Objektiv und Cantileverhalterung einander nicht und das vom Cantilever reflektierte Licht wird vom Mikroskopobjektiv gebündelt auf den Quadrantendetektor gelenkt (s. Abb. 3.2). Das im Rahmen dieser Arbeit konstruierten AFM setzt diese prinzipielle Idee des Aufbaus um. Ähnliche Aufbauten wurden in [7][32][33][18] beschrieben und umgesetzt.

Die Richtungsangaben "x", "y", "z" in diesem Text beziehen sich auf die Richtungen, die in Abb. 3.2 eingezeichnet sind.

Wie in Abs. 2.1. bereits erklärt, wird auch bei dem hier beschriebenen AFM ein Laserstrahl auf einen Cantilever fokussiert. Der vom Cantilever reflektierte Laserstrahl wird auf einen Quadrantendetektor gelenkt, welcher die relativen Intensitäten des reflektierten Laserstrahls auf seinen vier Segmenten als Messsignal zur Verfügung stellt. Dabei wird hier die notwendige Variation des Abstandes zwischen Cantilever und Probenoberfläche sowie die Variation des Messpunktes in x-y-Richtung (das Rastern / Scannen)

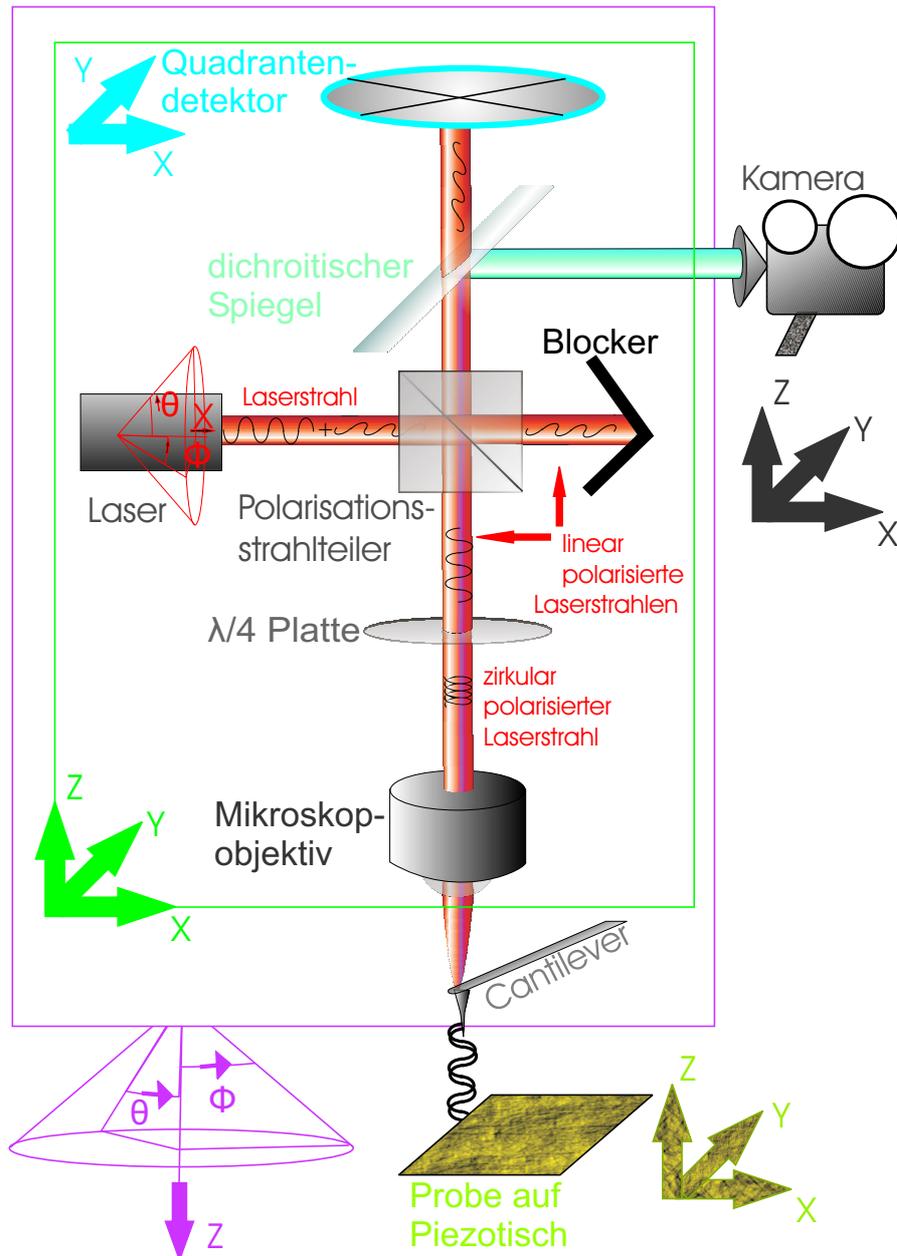


Abbildung 3.2: schematische Darstellung des AFM

durch eine Bewegung der Probenoberfläche umgesetzt. Da das hier vorgestellte Gerät ebenfalls zum Abbilden einer Oberflächentopographie grundsätzlich geeignet ist, obwohl dies nicht im Rahmen dieser Arbeit umgesetzt wurde, werden die dafür notwendigen Eigenschaften des Gerätes hier ebenfalls beschrieben.

Konkret wird bei dem hier konstruierten AFM der Lichtstrahl eines Diodenlasers auf

einen polarisierenden Strahlteilerwürfel gelenkt. Dabei wurde die Halterung des Lasers durch eine Drei-Punkt-Auflage so konstruiert, dass einerseits die Entfernung zwischen Laser und Strahlteiler um ca. 5 mm verändert und andererseits der Raumwinkel zwischen Laserstrahl und der Flächennormalen des Strahlteilers um ca. 10° variiert werden kann.

Der Strahlteiler trennt das einfallende Laserlicht in zwei senkrecht zueinander linear polarisierte Teilstrahlen auf. Einer der Teilstrahlen wird in Richtung des ursprünglich einfallenden Laserstrahls durch den Strahlteilerwürfel transmittiert und anschließend geblockt. Der zweite Teilstrahl wird senkrecht zur ursprünglichen Strahlrichtung reflektiert. Bei diesem linear polarisierte Teilstrahl handelt es sich nun um den eigentlichen Messstrahl. Zunächst tritt der Laser durch ein $\frac{\lambda}{4}$ -Plättchen, in dem die Polarisation des Strahls in eine zirkulare Polarisation gedreht wird. Der zirkular polarisierte Laserstrahl wird danach in einem Mikroskopobjektiv auf den Cantilever fokussiert und vom Cantilever wiederum reflektiert. Dabei trifft der Laserstrahl senkrecht auf den Cantilever (in seiner Mittellage) und wird somit auch senkrecht zu diesem wieder reflektiert. Je nach Auslenkung des Cantilevers liegen einfallender und reflektierter Strahl mehr oder weniger übereinander. In dieser Verschiebung steckt die eigentliche Messgröße. Der reflektierte Strahl wird nun wieder vom Mikroskopobjektiv gesammelt und parallelisiert. Anschließend tritt er wieder durch das $\frac{\lambda}{4}$ -Plättchen, welches seine Polarisationsrichtung in eine lineare Polarisation dreht. Die neue Polarisationsrichtung steht nun durch die zweimalige Drehung um $\frac{\pi}{2}$ senkrecht auf der ursprünglichen Polarisationsrichtung. Dadurch wird der ungehinderte Durchtritt durch den Strahlteiler gewährleistet. Anschließend passiert der Messstrahl einen dichroitischen Spiegel. Dabei tritt der Laser fast (93%) ungehindert durch den Spiegel. Licht der Wellenlänge < 610 nm wird von dem dichroitischen Spiegel jedoch senkrecht zum Strahlengang reflektiert und auf eine Kontrollkamera gelenkt. Das Bild der Kamera dient dazu, die Justage des Laserfokus auf den (gewünschten) Cantilever zu erleichtern, aber auch um die Qualität des Cantilevers und seinen Abstand zur Probenoberfläche zu kontrollieren. Um eine für die Kamera ausreichende Beleuchtung des Cantilever und der Probenoberfläche sicherzustellen, wurden im Bereich der Cantileverhalterung vier weiße Leuchtdioden eingebaut.

Der vom Cantilever reflektierte, parallelisierte und linear polarisierte Messstrahl tritt also ungehindert durch den dichroitischen Spiegel und trifft anschließend auf den Quadrantendetektor. Dabei ist sichergestellt, dass die Querschnittsfläche des Strahls kleiner ist als die Messfläche des Quadrantendetektors, damit die relativen Intensitäten des auftreffenden Laser auf den einzelnen Messflächen tatsächlich Auskunft über eine Veränderung der Strahlage bei Auslenkung des Cantilever geben. Der Quadrantendetektor ist in x-y-Richtung, d.h. senkrecht zur Ausbreitungsrichtung des Lasers, verstellbar, so dass in

der Ruhelage des Cantilever (keine Auslenkung des Cantilevers, kein Kontakt zur Probenoberfläche) die Intensitäten des Lasers auf den vier Quadrantenflächen gleich sind. Die unvermeidlichen Toleranzen der Lage jedes neu eingesetzten Cantilevers machen es erforderlich, die Position des Laserfokus auf jeden Cantilever abzustimmen. Deswegen ist der gesamte Strahlengang des AFM in alle drei Raumrichtungen relativ zu der Lage des eingesetzten Cantilever um je ca. 13 mm verstellbar. Dabei dient die Verstellung der x-y-Position des Laserfokus in der Ebene senkrecht zur Strahlausbreitungsrichtung dazu, den Laserfokus auf die Spitze des Cantilevers einzustellen. Die Verschiebung in z-Richtung, längs der Ausbreitungsrichtung des Lasers, ermöglicht eine Höhenpositionierung (relativ zum Cantilever) des Laserfokus. Diese ist erforderlich, um die Strahlintensität des Lasers möglichst vollständig auf der Spitze des Cantilevers zu sammeln, da im Laserfokus, also dem Punkt mit der kleinsten x-y-Ausdehnung des Laserstrahls, der kleinste Anteil der Strahlintensität am Cantilever vorbeitrifft. Die Signalintensität kann durch die x-y-z-Verstellung also maximiert werden.

Die gesamte Anordnung von Strahlengang, Cantilever und Detektor s. Abb. 3.3 stellt im konkreten Aufbau eine Einheit dar, welche frei stehend relativ zur Scaneinheit positioniert wird. Wie in Abs. 2.1 bereits erwähnt, ist es notwendig, einen Winkel von rund 10° zwischen Cantilever und Probenoberfläche zu gewährleisten. Deswegen ist die Strahlengangeinheit durch ihren Aufbau um diesen Winkel gegen die Horizontale geneigt. Die gesamte Strahlengangeinheit ruht auf drei Mikrometerschrauben, welche fest mit ihr verbunden sind. Die Mikrometerschrauben setzen auf einer Stahlplatte auf, welche fest mit der Scaneinheit verbunden ist. Über diese drei-Punkt-Auflage kann nun der Abstand zwischen Scaneinheit und Strahlengangeinheit um ca. 13 mm variiert werden. Praktisch dient diese Einstellmöglichkeit der groben Annäherung des Cantilevers an die Probenoberfläche. Weiterhin ist so auch eine Variation des Winkels zwischen Cantilever und Probenoberfläche, z.B. zur Minimierung von Interferenzeinflüssen¹, möglich.

Die Scaneinheit besteht im Wesentlichen aus einem Piezotisch, der die relative Positionierung von Cantilever und Probenoberfläche in x-, y- und z-Richtung regelt. Auf den Piezotisch ist noch ein weiterer mechanischer Verstellisch (in x-y-Richtung) geschraubt. Dieser dient dazu, die Probenoberfläche unter dem Cantilever um je ca.

¹Ein Teil des Laserstrahls, der am Cantilever vorbei oder durch ihn hindurch tritt, wird von der Probenoberfläche zurück auf den Detektor reflektiert und interferiert dabei mit dem vom Cantilever reflektierten Laserstrahl. Es zeigt sich dabei ein Interferenzmuster in Form einer mit dem Abstand zwischen Cantilever und Oberfläche variierenden Intensität des Deflektionsignals. Dieses Interferenzmuster wurde mehrfach gemessen und kann zur Bestimmung der genauen Wellenlänge des Lasers herangezogen werden.

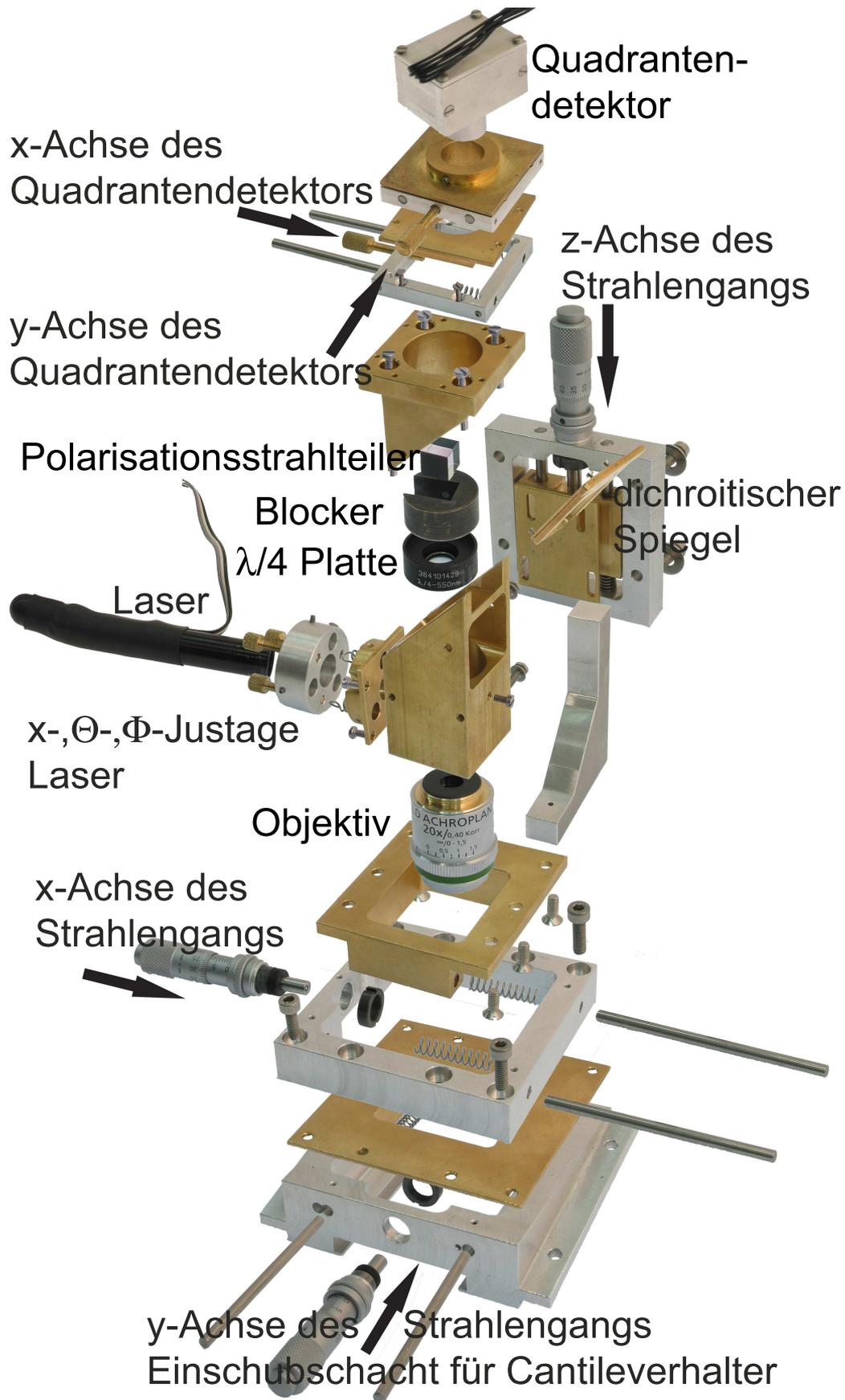


Abbildung 3.3: Explosionsdarstellung des AFM



Abbildung 3.4: AFM incl. Piezotisch und Kamera

5 mm zu verstellen. Interessante Gebiete der Probe können so leichter gefunden werden. Auf dem mechanischen Verstelltisch ist ein ca. 8 mm durchmessender Magnet befestigt, der den eigentlichen Probenhalter darstellt. Proben² werden auf kleine ($d=12$ mm) ferromagnetische Metallplättchen geklebt und dann mittels des Magneten auf dem Piezotisch gehaltert. Der Piezotisch ist von einem Aluminiumrahmen, auf welchem die Stahlunterlage für die Strahlengängeinheit befestigt ist, umgeben. Der Aluminiumrahmen wiederum ist über einen weiteren mechanischen x-y-Verstelltisch, der jedoch nur für eine ältere Version dieses AFM eine Bedeutung hatte, auf einer Marmorplatte befestigt. Die Beobachtungskamera ist über einfaches Stativmaterial mit dem Aluminiumrahmen verbunden (s. Abb. 3.4).

Der gesamte bisher beschriebene Versuchsaufbau ist in einem Schallschutzgehäuse untergebracht, um die Schallempfindlichkeit der Messungen zu dämpfen, also den Einfluß störender Geräusche wie Türen, Schritte oder Sprechen zu verringern. Weiterhin ist der Versuchsaufbau auf einem passiven Dämpfungstisch untergebracht, ebenfalls um Störungen durch Vibrationen klein zu halten.

²Häufig goldbedampfte, rechteckige Glasplättchen (8mm x 8mm) mit inkubierter DNA

3.2.1 Der Laser

Als Laser wurde in diesem Aufbau ein Diodenlaser (Typ: HL11/ld-670-5-MO, LISA laser products OHG, Katlenburg, Deutschland, Schutzklasse: II, Wellenlänge: 670 nm, optische Leistung: < 1mW, Länge: 71 mm, d =11,5 mm, Gewicht: 15 g) verwendet. Durch seine geringe Baugröße kann der Laser gut mit dem gesamten Strahlengang verbunden werden. Aufwändige Justierung vor jeder Messung entfällt somit. Wichtigste Eigenschaften des Lasers sind einerseits seine geringe Strahldivergenz von $\Theta < 0,2$ mrad, welche durch eine eingebaute Optik erreicht werden kann. Diese Optik erlaubt weiterhin, den Fokus des Lasers zwischen 6 cm und ca. 1 m vom Rand des Lasers einzustellen. Für den Betrieb des AFM mit einem zusätzlichen Objektiv, wie es hier beschrieben wird, wurde der längst mögliche Fokusabstand von ca. 1 m gewählt. Betreibt man das AFM jedoch nur für den Einsatz von "normalen" Cantilevern mit einer Breite von $> 15 \mu\text{m}$, wäre es jedoch ebenfalls möglich, auf das Objektiv zu verzichten und den Laser auf eine Fokusslänge von ca. 7 cm ³ einzustellen. Laut offizieller Herstellerangabe betrüge der Fokussdurchmesser dann $10 \mu\text{m}$ ⁴. Ein weiterer Vorteil des gewählten Lasers ist seine regelbare Intensität. Dadurch ist es erheblich leichter möglich, den Laserfokus auf die Cantileverspitze zu justieren, da bei zu hoher Laserintensität die Kontrollkamera übersteuert, d.h. eine orts aufgelöste Intensitätskontrolle des Laserlichtes unmöglich wird, da der gesamte interessante Bildausschnitt weiß dargestellt wird.

3.2.2 Der Polarisationsstrahlteiler

Als Polarisationsstrahlteiler wurde ein DS-Polarisator (Linus Photonics GmbH & Co. KG, Göttingen, Deutschland, 10x10, 633nm, Artikel-Nr.: 335661000) eingesetzt. Entscheidend für die Wahl des Polarisationsstrahlteilers war seine Einbaugröße von 10 mm x 10 mm x 10 mm. Da der Strahldurchmesser des Lasers ca. 4 mm beträgt, ist somit auch beim Durchtritt des reflektierten Strahls durch den Strahlteiler gewährleistet, dass der Strahl nicht durch die Halterung des Strahlteilers gestört wird. Weiterhin ist der Strahlteiler natürlich für die verwendete Wellenlänge von 670 nm geeignet.

³Dies ist die Länge des Strahlengangs im AFM.

⁴Inoffiziell wurde diese Angabe auf Nachfrage jedoch auf $20 \mu\text{m}$ korrigiert. Eine einfache Kontrolle der Fokusgröße bei sehr geringer Intensität des Lasers auf einem AFM-Eichgitter ergab in etwa den gleichen Wert.

3.2.3 Das $\frac{\lambda}{4}$ -Plättchen

Als $\frac{\lambda}{4}$ -Plättchen wurde eine Verzögerungsplatte $\lambda/4$ - 550 nm (Linos Photonics GmbH & Co. KG, Göttingen, Deutschland, Artikel-Nr.:364101429) verwendet. Ebenso wie beim Strahlteiler war auch hier die Einbaugröße und die Eignung für die Laserwellenlänge ausschlaggebend.

3.2.4 Der dichroitische Spiegel

Als dichroitischer Spiegel wurde ein XF2021 von Omegafilters (Omega[®] Optical, Inc., Brattleboro, USA) mit der Beschichtung 630DRLP benutzt. Der Spiegel wurde auf die passende Größe von 16mm x 32mm geschnitten. Die Transmissioncharakteristik des Spiegels ist Abb. 3.5 zu entnehmen.

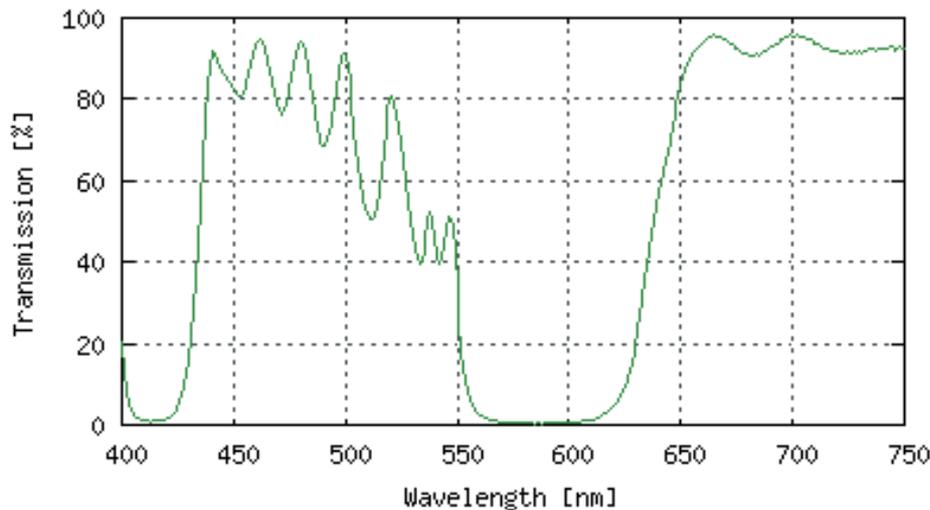


Abbildung 3.5: Transmissionscharakteristik der Beschichtung 630DRLP (Quelle: Omegafilters)

Dort wird insbesondere deutlich, dass der Transmissionsgrad für 670 nm ca. 93% beträgt und somit das Messsignal nicht wesentlich durch den Spiegel bzw. die Beobachtung mit einer Kamera gestört wird. Für evtl. auftretende kritische Messungen, d.h. extrem schwaches Reflektionssignal vom Cantilever (durch z.B. geringe Reflektivität der Cantileveroberfläche oder sehr schmale Cantilever), wurde die Halterung des dichroitischen Spiegel so konstruiert, dass dieser nach der Einstellung des Lasers auf den Cantilever einfach entfernt werden kann.

3.2.5 Das Objektiv

Als Objektiv wurde ein LD "Achromplan" 20x/0,40 Korr. (Artikel-Nr.:440844-0000-000) von Zeiss (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) verwendet. Für diese Wahl war der Arbeitsabstand von 10,2 mm des Objektivs bestimmend, der ausreichend Platz für den Cantileverhalter gewährleistet. Die Brennweite des Objektivs von 8,25 mm fokussiert nach Gl. 2.19 den 4 mm durchmessenden Laserstrahl auf einen Fokusbereich von ca. 1,76 μm , also ausreichend für kleine Cantilever.

3.2.6 Der Quadrantendetektor

Als Quadrantendetektor wurde ein bereits vorhandener Typ verwendet, dessen Bezeichnung und Spezifikationen unbekannt sind. Der Grund für die Wahl dieses Detektors ist seine große runde Messfläche mit einem Durchmesser von ca. 9 mm.

3.2.7 Die Kamera

Als Kamera wurde eine bereits vorhandene SONY (Sony Corporation, Tokyo, Japan) XC-999P CCD Kamera verwendet. Die diagonale Chipgröße beträgt 1/2 Zoll. Die Kamera kann über ihre interne Elektronik direkt an einen ebenfalls vorhandenen Fernseher angeschlossen werden. An die Kamera wurde ein selbst konstruiertes Teleobjektiv angeschlossen. Dieses Objektiv besteht aus zwei achromatischen Linsen (Thorlabs Artikel Nr.: LAC564-A und LBC-320-A) mit den Brennweiten von $f_1 = 60$ mm für Linse 1 und $f_2 = -20$ mm für Linse 2. Der Abstand zwischen Linse 2 und CCD-Chip beträgt ca. 40 mm und der Abstand zwischen Linse 2 und Linse 1 beträgt ca. 45 mm.

3.2.8 Der Piezotisch

Als Piezotisch wurde ein E-517.3CL von PI (Physik Instrumente (PI) GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Die Austeuerung dieses Tisches erfolgt über folgende Steuerelektroniken von PI: E-516, E503.00 und E-509.C3A. Es besteht bei dieser Gerätekombination die Möglichkeit, die Positionsdaten des Tisches analog oder digital vorzugeben und zu kontrollieren. Für die digitale Kommunikation mit einem Computer stehen an der Interfaceelektronik E-516 mehrere Schnittstellen zur Verfügung. Die IEEE488 Schnittstelle ist dabei die geeignetste, da sie die größte Datentransferrate erlaubt. Weiterhin können die Positionsdaten analog vorgegeben und ausgelesen werden. Die analoge Vorgabe der Auslenkung des Piezotisches in x-, y- und z-Richtung erfolgt

über die Vorgabe dreier Spannungen zwischen 0 und +10 V. In der Verstärkerelektronik E503.00 wird zu diesen vorgegebenen Signalen noch einmal je ein am Gerät einstellbarer Spannungswert, also ein Positionsoffset, hinzuaddiert. Legt man von außen also keine Spannung an, so gibt zumindest die interne Spannungsregelung einen festen Wert vor. Die Verstärkerelektronik E503.00 generiert nun drei Spannungen zwischen 0 und +120 V und gibt somit die Positionierung des Tisches vor. Dabei beträgt der maximale relative Verstellweg in x- und y-Richtung je 100 μm und in z-Richtung 20 μm . Die Piezotisch-elektronik E-509.C3A sorgt für die Auslesung der kapazitiven Sensoren des Piezotisches, die aktive Positionsregelung des Tisches⁵ und die Bereitstellung des Positionssignals als Spannungswerte zwischen 0V und +10V. Sowohl die drei Sollspannungen als auch die drei Istspannungen sind (idealerweise) direkt proportional zum absoluten Positionswert.

Eine Messung des Positionssignals bei intern oder extern vorgegebener zeitlich konstanter Positionsspannung (also Position) ergab eine Schwankung (Rauschen peak-peak) von rund ± 1 mV in z-Richtung und $\pm 1,5$ mV in x-y-Richtung um den vorgegebenen Wert. Diese Schwankungen sind laut persönlicher Nachfrage bei PI auf das Rauschen des Positionssignals zurückzuführen. Die tatsächliche Positionsgenauigkeit des Tisches beträgt 1 nm in x-y-Richtung und 0,1 nm in z-Richtung. Will man also eine konstante Position mit dem Tisch anfahren, so bietet es sich an, die digitale Schnittstelle des Piezoreglers zu verwenden und den vorgegebenen Wert als Istwert zu betrachten, oder das Positionssignal digital auszulesen. Die digitale Schnittstelle ist deswegen zu wählen, weil so die Rauscheinflüsse (geschätzt ebenfalls 1 mV) der analogen Eingänge (BNC Kabel + Einkopplung von Störeinflüssen auf der Elektronik) ausgeschaltet werden. Weiterhin besitzt die Steuerelektronik E516 einen 20-Bit A-D-Wandler im Gegensatz zu den im Steuercomputer verwendeten 16 Bit A-D/D-A-Wandlerkarten PCI-6036 E von National InstrumentsTM (Austin, USA). Dies bedeutet, dass der Fehler der Positionsvorgabe von $\frac{10\text{V}}{2^{16}} \approx 150\mu\text{V}$ ($\hat{=}$ 1,5 nm in x-y-Richtung, $\hat{=}$ 0,3 nm in z-Richtung) die tatsächlich erreichbare Genauigkeit des Tisches und der Elektronik bereits beschränkt. Die Messung der Position des Piezotisches beim Anfahren einer konstanten Position über die analoge Schnittstelle des E-516 ist deswegen nicht sinnvoll, weil die hinter der besonders abgeschirmten Regelelektronik eingekoppelten Störeinflüsse die Messung des Positionssignals

⁵Die Regelung des Positionssignals wird als "closed loop" bezeichnet. Im sog. "open loop" Betrieb wird die Regelung ausgeschaltet. Dies bedeutet, dass keine Korrektur des Positionssignals mehr stattfindet. Häufig besteht bei anderen Piezoverstelleinheiten nicht die Möglichkeit die Auslenkung des Piezos zu messen, da sie nicht über Positionssensoren verfügen. Die Piezoposition wird dann entsprechend fehlerhaft nach der Formel Sollwert = Istwert berechnet. Bei kommerziellen AFM ist diese Formel häufig noch durch eine Softwarekorrektur, die die Hysterese des Piezomaterials berücksichtigt, erweitert.

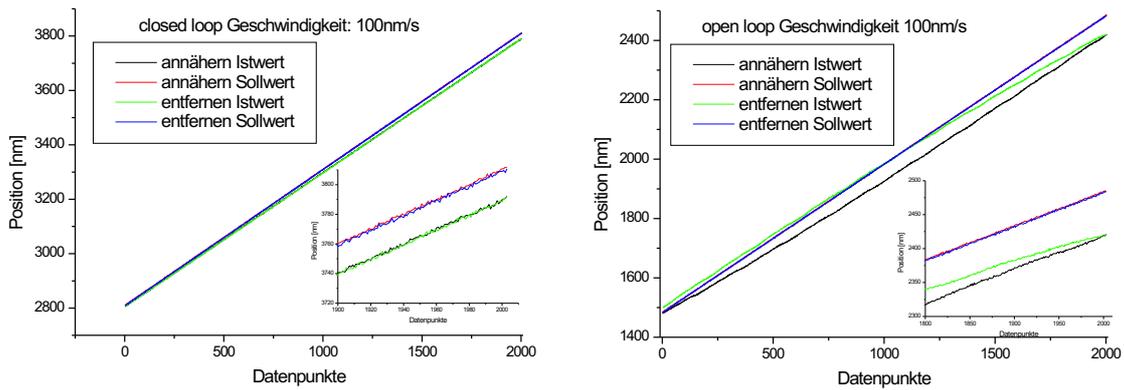


Abbildung 3.6: Hysterese des Piezotisches

wesentlich verschlechtern. D.h. die Messung des Positionssignals ist schlechter als die Positionierung selbst. Dies gilt, wie gesagt, bei zeitlich konstant vorgegebener Position. Die vorgegebene Position wird laut Herstellerangaben nach ca. $t = \frac{1}{3f_r}$ erreicht, wenn man Überschwingungen der Regelelektronik außer Acht läßt. Bei der konkreten Beladung des Tisches von ca. 300 g ergibt sich eine Resonanzfrequenz von $f_r \approx 300$ Hz, so dass die Einstellzeit des Tisches ca. 1 ms beträgt. Diese Einschränkung führt

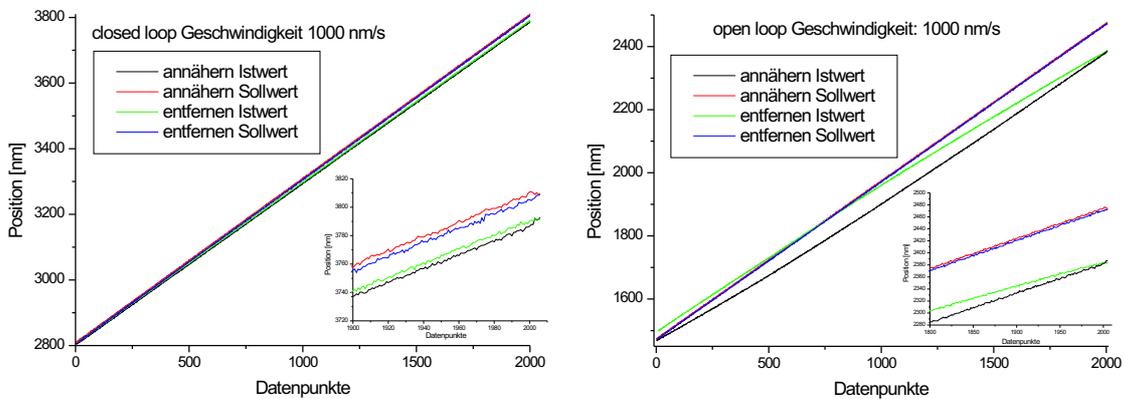


Abbildung 3.7: Hysterese des Piezotisches

nun zu der Betrachtung des dynamischen Verhaltens des Tisches: Allgemein wird vom Hersteller eine höchste Regelfrequenz von $\frac{1}{3}f_r \approx 100$ Hz empfohlen. Da für kraftspektroskopische Messungen häufig eine konstante Verstellgeschwindigkeit des Abstandes

Cantilever-Oberfläche, also hier des Tisches, erforderlich ist, andererseits die Positionsgenauigkeit des Tisches eine Größe ist, die in die Fehler der Kraftmessung eingeht, muß ein Mittelweg zwischen den Messfehlern, die man begeht, gefunden werden. Hält man sich an die Empfehlung der max. Regelfrequenz von 100 Hz, so hat man eine Positionssicherheit von 0,1 nm bei 100 Messungen in der Sekunde. Will man nun eine kraftspektroskopische Messung bei einer Geschwindigkeit von $2000 \frac{nm}{s}$ vornehmen, so bedeutet dies, dass man eine Stufenfunktion der z-Position mit einer Stufenhöhe von 20 nm ($20 \text{ nm} \cdot 100 \text{ Hz} = 2000 \frac{nm}{s}$) vorgeben muß. Dies bedeutet nun, dass der Geschwindigkeitsverlauf keinesfalls mehr als linear angesehen werden kann. Zwischen zwei Stufen wird die Geschwindigkeit sicher höher als $2000 \frac{nm}{s}$ sein und in der Regelungsphase sogar negativ werden. Die entsprechenden Geschwindigkeiten sind von der Hysterese⁶ des Tisches, von den Eigenschaften des Reglers und von der Phasenlage zwischen Regelsignal und Positionssignal abhängig. Diese Überlegungen führen nun zu dem Schluß, dass bei hoher Positionssicherheit von 0,1 nm die Verfahrensgeschwindigkeit auf geschätzte $100 \frac{nm}{s}$ (Stufenhöhe: 1 nm) begrenzt bleibt, also die oben beschriebenen stationären Positionsbetrachtungen gelten. Diese Geschwindigkeitsbegrenzung ist jedoch für dynamische Kraftspektroskopie unbefriedigend, da Geschwindigkeiten, die bis zu einem Faktor 200 höher liegen, gewünscht werden. Folgende Überlegungen, sowie die in Abb. 3.6 bis Abb. 3.9 dargestellten Messungen⁷ sollen die konkrete Steuerung des Piezotisches beleuchten:

1) Man kann das Signal im sog. "open loop" Modus, d.h. ohne Regelung vorgeben. Damit würde die Phasenverschiebung zwischen Regelsignal und Positionssignal entfallen, da eben kein Regelsignal mehr vorhanden wäre. Als Konsequenz würde nur noch die Trägheit und die Nichtlinearität des Piezotisches in den Fehler der Positionierung einfließen. Der Regelkreis reduziert jedoch die Trägheit des Tisches und seine Nichtlinearität, insbesondere wenn er für dynamische Anwendungen ausgelegt ist. Daher ist ein open loop Betrieb ungünstiger, was sich durchweg in allen Vergleichsdarstellungen

⁶Zwischen einem Sollsignal und einer Verstellung des Tisches auf diese Position besteht eine zeitliche Verschiebung sowie eine Nichtlinearität der Position des Tisches. Die genauen Eigenschaften der Hysterese sind von dem entsprechenden Tisch, seiner Beladung und dem vorherigen Verlauf der Positionsvorgabe abhängig.

⁷Alle Messungen wurden über eine analoge Vorgabe der Sollposition und eine analoge Auslesung der Istposition mit der PCI-6036 Multifunktionskarte vorgenommen. Dies bedeutet, dass der durch das Rauschen und die 16-Bit-Genauigkeit der Karte begangene Fehler in diese Messung einfließt. Er drückt sich durch die Stufigkeit der Kurve und durch ihren nicht monotonen Verlauf aus. Die auf der Abszisse eingetragene Größe "Datenpunkte" entsteht durch die Triggerung der Messkarte und ist direkt proportional zur Zeit. Zum Zeitpunkt der Messung war die Regelelektronik nicht auf den dynamischen Betrieb optimiert.

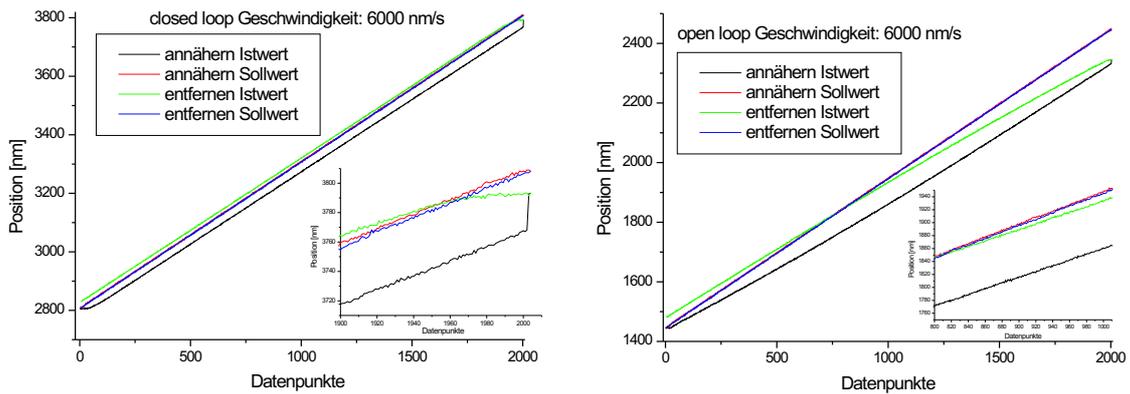


Abbildung 3.8: Hysterese des Piezotisches

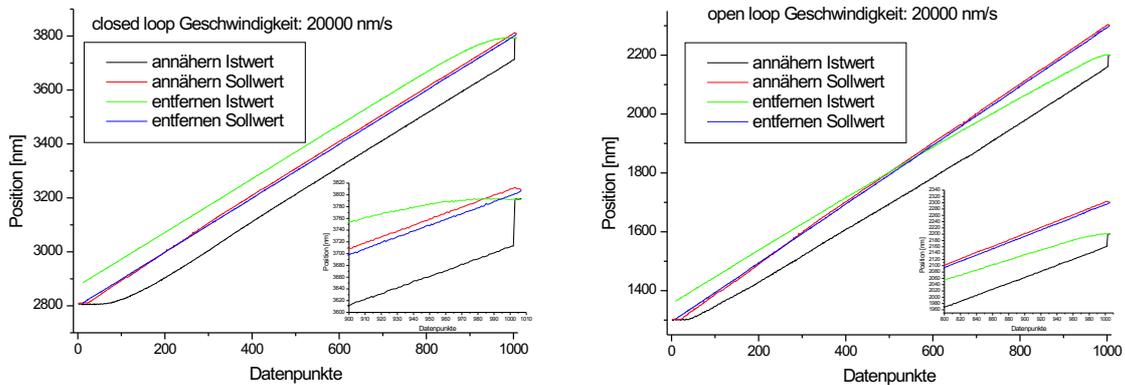


Abbildung 3.9: Hysterese des Piezotisches

(Abb. 3.6 bis Abb. 3.9) zeigt. Die Abweichungen zwischen Soll- und Istwert in den Umkehrpunkten der Tischbewegung, also den Punkten der größten Abweichung, beträgt bei der Geschwindigkeit von $100 \frac{nm}{s}$ schon 60 nm (s. Abb. 3.6) und wächst auf eine Differenz von 120 nm bei einer Geschwindigkeit von $20000 \frac{nm}{s}$ (s. Abb. 3.9). Weiterhin zeigt sich bei allen Weg-Zeit Diagrammen für den open loop Modus, dass die Positionskurven Krümmungen über ihren gesamten Verlauf aufweisen. Dies bedeutet, dass die Tische im gesamten Verfahrbereich nicht mit konstanter Geschwindigkeit fahren. Die Messkurven für den closed loop Betrieb hingegen zeigen erst bei Geschwindigkeiten ab $6000 \frac{nm}{s}$ Krümmungen im Weg-Zeit Diagramm (s. Abb. 3.8). Diese Krümmung ist zusätzlich

nicht im gesamten Verfahrbereich zu finden, sondern nur beim Anfahren und bei der Umkehrung der Fahrtrichtung. Da aber die kraftspektroskopischen Messungen in den mittleren Bereichen des Verfahrweges stattfinden, werden sie also mit der vorgegebenen (paralleler Verlauf von Soll- und Istwert auch bei hohen Geschwindigkeiten s. Abb. 3.8) konstanten Geschwindigkeit durchgeführt. Mit einer Auslegung auf dynamischen Betrieb ist gemeint, dass der Regler insbesondere eine schnelle, dafür weniger genaue Regelung durchführt, also beispielsweise ein stärkeres Überschwingverhalten zeigt. Dies spielt jedoch keine Rolle, da die Genauigkeit der Endposition für kraftspektroskopische Messungen unerheblich ist. Die entsprechende Optimierung des Reglers kann durch Variation der Proportional- und Integralbeträge des Reglers selbst durchgeführt werden.

2) Der Einfluß von Hystereseeffekten ist massen- und geschwindigkeitsabhängig. Daher kann die Abweichung zwischen Soll- und Istwert nur exemplarisch angegeben werden. Bei einer Fahrtrichtungsgeschwindigkeit von $1000 \frac{nm}{s}$ beträgt die Abweichung nach Abb. 3.7 maximal 20 nm im closed loop und 90 nm im open loop Betrieb. Nimmt man diesen Wert als typisch an, so liefert er eine Größenordnung für die Fehler, die bei unregelmäßigen und ungemessenen (\rightarrow Sollwert = Istwert) Piezoauslenkungen bei kraftspektroskopischen Messungen auftreten.

3) Hystereseeffekte lassen sich nur durch sog. "preshaping" (dt.: "Vorformung") des Sollsignals verkleinern. Dabei wird dann ein zeitlicher Positionsverlauf des Piezotisches vorgegeben, der nicht dem tatsächlich gewünschten Positionsverlauf entspricht, sondern der entsprechend der Hysterese des Tisches, der Differenz zwischen Sollsignal und Istsignal, zum Sollsignal hinzuaddiert. Diese Möglichkeit besteht nur, wenn man genaue Kenntnis über die Hysteresekurve bei den unterschiedlichen Geschwindigkeiten und Beladungen besitzt. Wie man anhand von Abb.: 3.6 weiterhin erkennen kann, zeigen Soll- und Istsignal eine leicht unterschiedliche Steigung. Diese Tatsachen machen deutlich, dass es für den Benutzer jedoch nur mit hohem Aufwand möglich ist, ein preshaping für jede einzelne zu fahrende Kurve durchzuführen. Eine einfache Möglichkeit "preshaping" durchzuführen besteht bei neuen Digitalcontrollern E-710 von PI. Diese Controller können die Hysterese des Tisches bestimmen und wie beschrieben selbstständig die Sollvorgabe optimieren.

4) Die Überschreitung der maximalen Regelfrequenz bedeutet eine Vergrößerung des Fehlers der Positionsgenauigkeit. Da die einzige Alternative für größere Stellgeschwindigkeiten bei Einhaltung der Regelfrequenz eine Stufenfunktion des Positionssignals, mit den beschriebenen Konsequenzen, ist, scheidet diese Möglichkeit jedoch für die Kraftspektroskopie aus. Die maximale Bandbreite des Reglers beträgt 3 kHz. Dies bedeutet, dass eine Überschreitung dieser Frequenz, um beispielsweise die Vorgabe der Sollposition

glatter zu gestalten, nicht sinnvoll ist.

5) Die digitale Echtzeit-Vorgabe und -Auslesung der Positionsdaten ist durch die Updaterate des E-516 Interfaces von 20 kHz begrenzt. Es besteht die Möglichkeit, verschiedene Positionskurven digital vorzugeben und per Triggersignal den Befehl zur Ausführung zu geben. Dies wäre die eleganteste Methode, um möglichst nahe an den gewünschten Kurvenverlauf der Istposition zu gelangen. Eine gleichzeitige Auslesung der Istposition wird dann jedoch durch die Tatsache begrenzt, dass der interne A-D-Wandler in einen 8-Bit Auflösungsmodus geschaltet wird, wenn der Kurvenverlauf vorprogrammiert ist.

6) In dem verwendeten Messprogramm besteht die Möglichkeit, die Probe in x-y-Richtung zu verfahren, um interessante Stellen auf der Probe suchen zu können. Da die Positionsgenauigkeit bei analoger Vorgabe der Sollposition in der x-y-Ebene schon durch die Auflösung der D-A-Karte des Messrechners ($\hat{=} 1,5 \text{ nm}$) begrenzt ist, wird die maximale Positionsgenauigkeit des Tisches von 1 nm in x-y-Richtung nicht genutzt. Weiterhin steht zu vermuten, dass Rauscheinflüsse der Leitungen und der Elektronik zu einem "Rühren" der Probenoberfläche relativ zur Cantileverspitze führt. Dies mag zwar vielleicht zu einer höheren Wahrscheinlichkeit einer Bindung eines Moleküls an die Spitze führen, ist aber bei der eigentlichen Messung nicht erwünscht. Der tatsächliche Einfluß des "Rührens" ist nicht bekannt und es besteht kein Grund zur Vermutung, dass dadurch überhaupt Probleme geschaffen werden. Trotzdem besteht eine prinzipielle Verbesserungsmöglichkeit darin, die x-y-Position digital vorzugeben, zumal dies keine zeitkritische Anwendung ist und die x-y-Position für kraftspektroskopische Messungen nicht ausgelesen werden muß.

Die oben dargelegten Überlegungen und Hysteresemessungen zeigen, dass die Wahl eines analog vorgegebenen Signals im closed loop Betrieb eine sinnvolle Wahl für kraftspektroskopische Messungen ist. Insbesondere die Messungen der Hysterese zeigen, dass der Geschwindigkeitsverlauf im interessanten Bereich der kraftspektroskopischen Messungen konstant ist. Da das Positionssignal als Messgröße bereit steht, liefert nur das Rauschen dieser Größe einen Fehler von $\pm 1 \text{ mV}$ ($\hat{=} 2 \text{ nm}$ in z-Richtung). Dieser Fehler wird in den Kraft-Distanzkurven dadurch sichtbar, dass sich die Distanzwerte nicht monoton ändern. Durch Oversampling der Positionswerte⁸ kann dieser Fehler noch weiter reduziert werden. Im Vergleich zu unregelmäßigen Piezos sollten die beschriebenen Fehler jedoch recht klein und wenigstens bekannt sein.

⁸Diese Option wird automatisch zugeschaltet, wenn auch das Oversampling des Deflectionsignals aktiviert wird.

3.2.9 Die Mikrometerschrauben

Als Mikrometerschrauben wurden 148-804 von Mitutoyo (Mitutoyo Meßgeräte GmbH, Neuss, Deutschland) für die x-y-z-Verstellung des Strahlengangs und die Θ - Φ -z-Verstellung (Drei-Punkt-Auflage) des gesamten AFM verwendet. Die Schrauben besitzen eine absolute Ganggenauigkeit von $1\ \mu\text{m}$ auf dem gesamten Verstellweg von 13 mm. Sie sind also gut geeignet für die Justage des Strahlengangs, die eine relative Genauigkeit von ca. $0,5\ \mu\text{m}$ verlangt.

Für die Positionierung des Quadrantendetektors wurden sehr kleine, jedoch genaue Mikrometerschrauben⁹ benötigt. Daher fiel die Wahl auf Thorlabs (Thorlabs Inc., Newton, USA) M3-0,25 mm x 15 mm (Artikel-Nr.: MAS15) Mikrometerschrauben mit den dazugehörigen Gewindehülsen (Thorlabs Artikel- Nr.: N250B2). Die relative oder absolute Genauigkeit der Schrauben kann nicht quantifiziert werden, sie haben sich bei der Einstellung des Quadrantendetektors jedoch bewährt.

3.2.10 Der Cantileverhalter

Wie anhand von Abb. 3.3 erkennbar ist, wird ein Cantileverhalter in einen dafür vorgesehenen Schacht in das AFM eingeschoben. Die Cantilever wiederum werden in den Cantileverhalter eingesetzt. Dazu wurden mehrere Cantileverhalter konstruiert, von denen sich jedoch die einfachste Konstruktion, ein "U"-förmiger Plexiglasrahmen, bewährt hat. Die Cantilever werden an ihrer Basis auf ein 15 mm x 8 mm x 0,8 mm Nickelplättchen geklebt (mit Conrad Sekundenkleber Gel Artikel-Nr.: 24 70 65). Dieses Plättchen wird mit einem Magneten im Halter fixiert. Diese Art der Fixierung erlaubt eine einfache, stabile und recht genaue Vorpositionierung des Cantilevers. Die bisher verwendeten Cantileverhalter wurden allesamt aus Plexiglas gefertigt, um eine elektrische Isolierung für später einzubauende Piezokristalle zur Schwingungsanregung der Cantilever zu gewährleisten. Außerdem sind die Halter groß genug, um Zuleitungskabel für den Piezokristall und elektrische Standardsteckverbinder aufzunehmen.

Zwischen dem Nickelplättchen und dem Magneten wird für Messungen in Flüssigkeit ein Mikroskopierdeckgläschen eingeklemmt. Dieses befindet sich dann bei der Messung ca. 1 mm über dem Cantilever. Da das Deckgläschen und der Cantilever parallel liegen, steht der Laserstrahl senkrecht auf dem Deckgläschen. Dadurch werden Brechungseffekte

⁹Diese wurden in einen sehr kleinen (40 mm x 40 mm x 12 mm) selbst konstruierten x-y-Verstelltisch, der einen grossen Verstellweg von ca. 8 mm x 8 mm erlaubt, eingebaut. Die Grösse des Verstelltisches wurde minimiert, weil sich dieser recht weit vom Schwerpunkt des AFM entfernt befindet und sich Vibrationseinflüsse durch kleine Massen klein halten lassen.

beim Durchtritt des Lasers durch die Grenzflächen Luft-Glas-Flüssigkeit minimiert. Die Flüssigkeit wird durch Adhäsion zwischen der Probenoberfläche und dem Deckgläschen gehalten, d.h. es ist keine seitliche Begrenzung des Flüssigkeitsvolumens vorhanden. Da das Probenvolumen nur von Verbrauchsmaterialien (Probe und Deckgläschen) begrenzt wird und es sich bei den eingebrachten Nickelplättchen ebenfalls um Massenware handelt, ist die Sauberkeit bei Messungen kein Problem. Deckgläschen, Probenunterlagen und Nickelplättchen werden im Ultraschallbad mit Aceton, Ethanol und Milliporewasser gereinigt.

3.2.11 Die Grundplatte

Als Grundplatte wurde eine bereits vorhandene Unterlage eines Veeco-AFM (Veeco Instruments Inc., Santa Barbara, USA) verwendet. Sie besteht aus einer Marmorplatte (300 mm x 200 mm x 50 mm) mit sehr weichen Gummifüßen. Dadurch wird ein vibrationsarmer Aufbau des AFM gewährleistet.

3.3 Die Elektronik

3.3.1 Der I-U-Wandler

Die I-U-Wandlung der Ströme der einzelnen Segmente des Quadrantendetektors erfolgt über ein einfaches aktives Tiefpassfilter nach Abb. 2.9. Das Tiefpassfilter funktioniert nach [27] gleichzeitig als Integrator mit der Zeitkonstanten $\tau = \frac{1}{f_{gt}}$. Als Operationsverstärker wurde ein MC 33079P von Motorola (Motorola GmbH, Wiesbaden, Deutschland) wegen seiner geringen Rauschspannung von $4,5 \frac{nV}{\sqrt{Hz}}$ verwendet. Die Werte der restlichen Bauteile betragen: $R_1 = 56 \Omega$, $R_2 = 560 \text{ k}\Omega$, $C_1 = 2,2 \text{ pF}$. Damit beträgt der Verstärkungsfaktor 10000, die Grenzfrequenz 133 kHz und die Zeitkonstante $\tau = 7,5 \mu s$. Die Wahl der Grenzfrequenz ist durch die zu erwartenden Resonanzfrequenzen der kleinen Cantilever begründet, die in Flüssigkeit nicht wesentlich höher als 100 kHz liegen sollten. Weiterhin sind 100 kHz die maximale obere Grenzfrequenz des Tiefpassfilters, der für dieses Experiment gebaut wurde (s.u.), so dass eine höhere Bandbreite des Detektors nicht erforderlich ist. Mit einer getakteten Leuchtdiode, welche direkt auf den Quadrantendetektor gerichtet war, wurde die berechnete Bandbreite experimentell bestätigt und festgestellt, dass sich keine wesentliche Verkleinerung des Signals bis 100 kHz zeigt. Gleichzeitig konnte jedoch auch festgestellt werden, dass sich die erwartete Deformation (Verzögerung und $\sim (1 - e^{-\frac{t}{\tau}})$ -Anstieg) des Detektorsignals gegenüber

dem angelegten Rechtecksignal einstellte.

3.3.2 Die Quadrantendetektorelektronik

Die Quadrantendetektorelektronik stammt von der Universität Basel¹⁰. Sie dient zur analogen Generierung der Messsignale "Sum", "Lateral" und "Deflektion". Dazu werden die Spannungen der Segmente Quadrantendetektor nach Kap. 1.1 addiert bzw. subtrahiert. Dies erfolgt über Operationsverstärker, die als Summierer bzw. Subtrahierer [27] beschaltet sind. Weiterhin ist eine bis zu 32-fache Verstärkung von Lateral- und Deflektionsignal möglich. Diese Verstärkung erfolgt stufenweise durch eine Verdoppelung des Signals von Stufe zu Stufe, um die Linearität der Verstärkung zu gewährleisten. Das Rauschen der Quadrantendetektorelektronik ist mit ca. $1 \text{ mV}_{peak-peak}$ sehr gering. Das Rauschen von Quadrantendetektor und Quadrantendetektorelektronik beträgt bei eingeschaltetem und auf einen Cantilever fokussierten Laser ca. $10 \text{ mV}_{peak-peak}$ im Deflektionsignal und ca. $3 \text{ mV}_{peak-peak}$ im Summensignal. Anhand von Abb. 2.5 läßt sich das Rauschen der Elektronik zu $12 \frac{\mu\text{V}}{\sqrt{\text{Hz}}}$ im Frequenzfenster zwischen dem $\frac{1}{f}$ -Rauschen (bis ca. 2 kHz) und der Resonanzfrequenz des thermischen Rauschen des Cantilevers (ab ca. 10 kHz) ablesen. Der gesamte Rauschbeitrag ist dann nach Gl. 2.15 von der Bandbreite der Messung abhängig. Bei einem idealen Bandpassfilter mit Grenzfrequenzen von $f_{gh} = 2 \text{ kHz}$ und $f_{gt} = 10 \text{ kHz}$ ließe sich so der Gesamtbeitrag des Rauschens zu ca. 1 mV rms abschätzen. Dies entspricht bei einer typischen Federkonstante von $k = 6 \frac{\text{pN}}{\text{nm}}$ und einem ebenfalls typischen Sensorresponse für einen Olympus Biolever von $s_r = 150 \frac{\text{nm}}{\text{V}}$ einem Fehler von rund 1 pN, der der Elektronik zugeschrieben werden muss. Leider gibt es keine idealen Filter.

3.3.3 Das Bandpassfilter

Als Bandpassfilter für reguläre (d.h. Cantilever mit Breiten $\geq 10 \mu\text{m}$) Cantilever wurde ein bereits vorhandenes Universalfilter benutzt. Bei diesem Filter sind Hoch- und Tiefpassfilter getrennt zuschaltbar und ihre Grenzfrequenzen lassen sich getrennt voneinander zwischen 1 Hz und 11 kHz einstellen. Weiterhin besitzen sie zwei Dämpfungsstufen, -20 dB und -40 dB. Wie man anhand von Abb.2.11 erkennen kann, stellt die Filterung mit diesem Filter zwar eine deutliche Verbesserung des Signals dar, ist aber insbesondere für herkömmliche Cantilever in Flüssigkeit durchaus verbesserungsfähig. Für kleine Cantilever mit hohen Resonanzfrequenzen wurde ein neues Tiefpassfilter ge-

¹⁰Vielen Dank an Roberto Maffiolini, der die Baupläne und einige Bauteile zur Verfügung stellte.

baut, das in Kombination mit dem bereits vorhandenen Hochpassfilter des Universalfilters das gewünschte Bandpassfilter darstellt. Als zentraler IC wurde ein LTC 1064-4 (Linear Technology, Milpitas, USA) gewählt. Dabei handelt es sich um einen switched-capacitor-Filterbaustein, dessen Grenzfrequenz stufenlos zwischen 15 kHz und 100 kHz eingestellt werden kann. Die Dämpfung des Filters ist nicht konstant, sondern von der Grenzfrequenz und der äusseren Beschaltung abhängig. Daher kann sie hier nur exemplarisch angegeben werden. Bei einer Grenzfrequenz von 100 kHz beträgt die Dämpfung bei 200 kHz ca. -92 dB.

3.4 Die Software

Als Messsoftware wurde ein LabVIEWTM (National InstrumentsTM, Austin, USA) Programm benutzt, das für frühere kraftspektroskopische Messungen geschrieben wurde. Dazu wurden einige Änderungen des Programms vorgenommen, um die Positionswerte des Piezotisches auszulesen. Weiterhin wurde das Benutzerinterface verbessert, um den Piezotisch manuell zu verfahren und dabei eine Echtzeit-Kraft-Distanzkurve sichtbar zu machen. Dazu wurde die Benutzung eines Force-Feedback-Joystick als Eingabegerät für die manuelle Verstellung des Piezotisches eingebunden. Ziel dieser Verbesserungen war, eine intuitive Kontrolle über den Piezotisch zu ermöglichen, um so die Wahrscheinlichkeit einer Bindung zu erhöhen. Da außerdem bisher nur die Möglichkeit bestand, komplette Kraft-Distanzkurven aufzunehmen, war es nicht möglich, ein angebundenes Molekül mehrfach zu strecken, ohne es abreißen zu lassen. Mit der neuen Steuerung sollte erreicht werden, dass der Benutzer zuerst ein Molekül "angeln" und dann Ziehwege und -geschwindigkeiten festlegen kann, um so beispielsweise ein Molekül bei mehreren Geschwindigkeiten nacheinander zu ziehen.

4 Ergebnisse

Die Funktionalität des aufgebauten AFM wurde mit kommerziell erhältlichen Cantilevern getestet. Dazu wurden kraftspektroskopische Messungen an einem bekannten biologischen System durchgeführt. Weiterhin wurden Vorversuche mit kürzlich hergestellten kleinen Cantilevern durchgeführt. Die Resultate der Messungen zeigen, dass das aufgebaute AFM für kommerziell erhältliche Cantilever gute kraftspektroskopische Messergebnisse liefert und dass mit kleinen Cantilevern gemessen werden kann.

4.1 Bestimmung der Federkonstanten

Zur Bestimmung der Federkonstanten wurde das Spektrum des thermischen Rauschens der Cantilver [20] an Luft vor oder nach¹ den eigentlichen kraftspektroskopischen Messungen aufgenommen. Um das Spektrum zu bestimmen, muss das Rauschen des Deflektionsignals mit dem Sensorresponse multipliziert werden, um so ein thermisches Spektrum der mittleren quadratischen Auslenkung der Cantilever zu berechnen. Folglich muss auch der Sensorresponse durch eine Deflektion-Distanz-Kurve (s. Abs. 2.3.) ermittelt werden. Dies wurde jeweils vor und nach der Messung des thermischen Spektrums des Cantilvers durchgeführt, um sicherzustellen, dass evtl. aufgetretene Veränderungen des Sensorresponses, beispielsweise durch eine Verschiebung des Laserspots auf dem Cantilver, die Messung nicht verfälschen. Das thermische Spektrum wurde mit einem FFT Spectrum Analyzer Modell SR760 von Stanford Research Systems (Sunnyvale, USA) aufgenommen. Das Deflectionssignal wurde nicht gefiltert, stattdessen wurde das thermische Spektrum erst ab einer Frequenz von 3 kHz aufgenommen, um den 1/f-Rauschanteil der Elektronik abzuschneiden. Weiterhin betrug der Verstärkungsfaktor der Quadrantendetektorelektronik bei allen Messungen eins, um das Rauschen der Elektronik nicht unnötig zu verstärken. Die Fits der Kurven wurden mit MicrocalTM Origin^R 6.0 (Mi-

¹Dabei hat sich herausgestellt, dass eine Kalibrierung vor den Messungen empfehlenswert ist, da nach der Trocknung des TRIS-Puffer oft störende Ablagerungen auf den Cantilevern zurückblieben, oder erfolgreiche Kurven aufgenommen wurden, und der Cantilever dann vor der Kalibrierung zerstört wurde - hauptsächlich ein psychologisches Problem des Experimentators.

crocal Software Inc., Northhampton, USA) durchgeführt. Beispielhaft soll nun die Bestimmung einer Federkonstante eines Olympus Biolever Typ B (OLYMPUS OPTICAL CO., LTD., Tokyo, Japan) gezeigt werden. Die Resonanzfrequenz und die Federkonstante dieses Cantilevers beträgt nominell 13 kHz bzw. $6 \frac{\mu\text{N}}{\text{nm}}$. In Abb. 4.1 lässt sich anhand

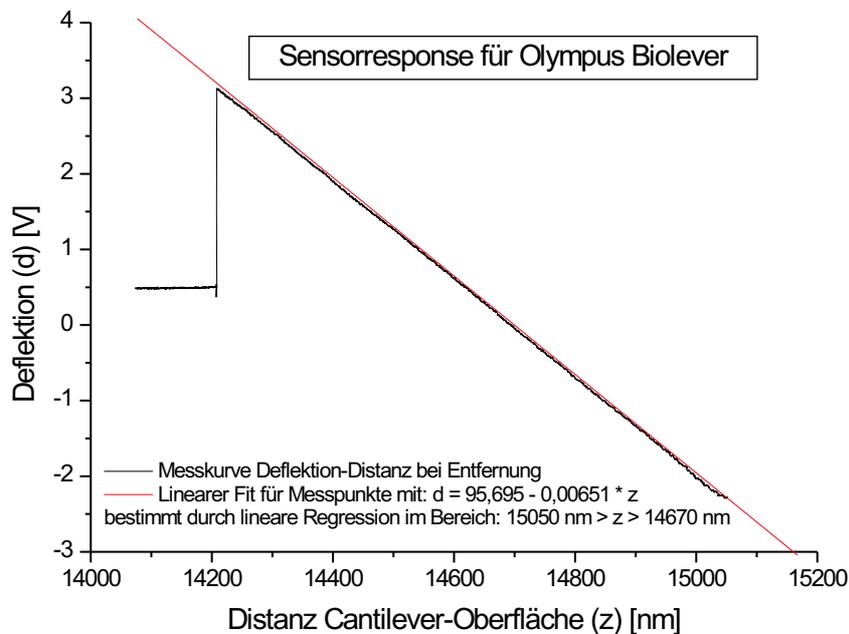


Abbildung 4.1: Bestimmung des Sensorresponses eines Cantilevers

des linearen Fit erkennen, dass der Sensorresponse des Cantilevers recht genau (relativer Fehler der Steigung des linearen Fit $< 0,5 \%$) bestimmt werden kann. Mit der durch lineare Regression bestimmten Steigung der Deflektion-Distanz-Kurve im Kontaktbereich des Cantilevers mit der Oberfläche zwischen $15050 \text{ nm} > z > 14670 \text{ nm}$, kann nach Gl. 2.12 der Sensorresponse zu $sr = 153,610 \pm 0,003 \frac{\mu\text{m}}{\text{V}}$ bestimmt werden. Zur genaueren Bestimmung des Sensorresponses wurden immer mehrere Deflektion-Distanz-Kurven von verschiedenen Punkten auf der Probenoberfläche herangezogen und der Sensorresponse dann durch Mittelung der einzelnen Sensorresponses bestimmt, um Fehler durch lokal unterschiedliche Oberflächentopografien klein zu halten.

Das thermische Leistungsspektrum des selben Cantilevers wurde zwischen 2,5 kHz und 23,625 kHz aufgenommen. Anhand von Abb. 4.2 lässt sich erkennen, dass sich ein Verlauf des Leistungsspektrums entsprechend Gl. 2.8 ergibt. Da die Dämpfung des

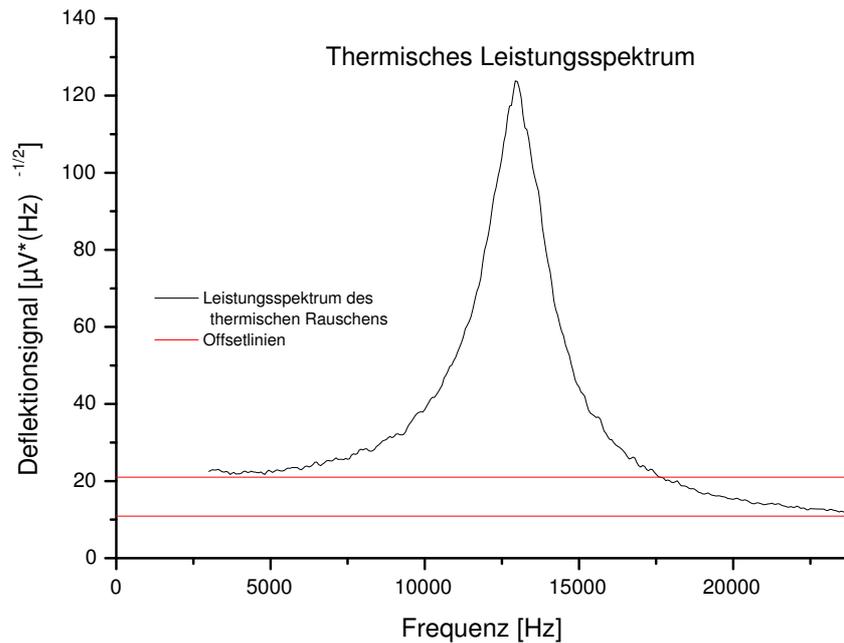


Abbildung 4.2: Spektrum des thermischen Rausches eines Cantilevers

Cantilever jedoch klein ² ist, lässt sich das Quadrat der Leistungsdichte dann nach Gl. 2.9 durch ein Lorentzprofil annähern.

Multipliziert man das Deflektionsignal zusätzlich noch mit dem zuvor bestimmten Senesponse (bzw. dessen Quadrat) so ergibt sich eine Darstellung der mittleren quadratischen Auslenkung des Cantilevers in Abhängigkeit von der Frequenz (s. Abb. 4.3). Diese Kurve kann nun durch ein Lorentzprofil gefittet werden, dessen Fläche leicht bestimmt werden kann. Im vorliegenden Fall ergab sich so eine Fläche von $0,90379 \text{ nm}^2$ unter dem Lorentzprofil, was mit Gl. 2.6 zu einer Federkonstanten von $4,58 \frac{\text{pN}}{\text{nm}}$ für den untersuchten Cantilever führt. Vergleicht man die so bestimmten Werte von Resonanzfrequenz und Federkonstante mit den Herstellerangaben, so stellt man fest, dass sich die gemessene Resonanzfrequenz in guter Übereinstimmung mit dem erwarteten Wert befindet. Die Federkonstante weist jedoch erhebliche Abweichungen von den Herstellerangaben auf. Daher ist es erforderlich, jeden einzelnen Cantilever auf die oben beschriebene Weise zu kalibrieren.

²Dies ist durch die unwesentliche Absenkung der Offsetlinie bei Frequenzen $f > f_r = 13 \text{ kHz}$ gegenüber Frequenzen $f < f_r$ erkennbar. Die Absenkung beträgt ca. $\frac{10 \mu\text{V}}{\sqrt{\text{Hz}}}$.

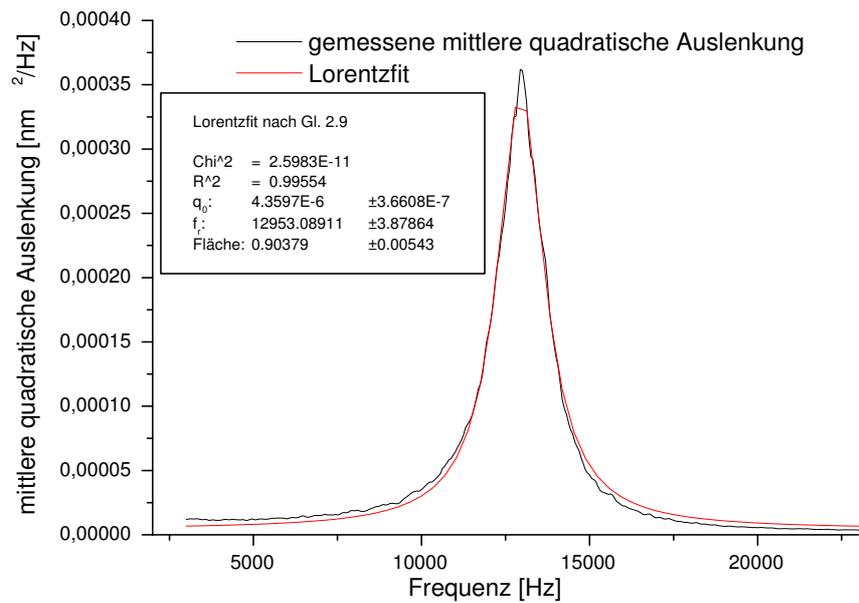


Abbildung 4.3: mittlere quadratische Auslenkung eines Cantilevers

4.2 Kraftspektroskopische Messungen

Als Testsystem für das hier vorgestellte AFM wurde POLY(dG-dC)·POLY(dG-dC) von Amersham Bioscience (Little Chalfont, England), also synthetisch hergestellte DNA mit den alternierenden Basenpaare Guanin-Cytosin, Cytosin-Guanin und einer mittleren Länge von 805 Basenpaare bzw. 920 Basenpaare, verwendet. Je 500 μg der DNA wurden mit 500 μl Tris-Puffer (10 mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,3) gelöst. Ungefähr 10 μl dieser Lösung wurde anschließend auf 8 mm x 8 mm große Glasplättchen, die mit Aceton, Ethanol und Millipore-Wasser gereinigt und anschließend mit einer ca. 40 nm dicken Goldschicht bedampft worden waren, mehrere Stunden inkubiert[31][34]. Anschließend wurde die restliche Lösung mit Tris-Puffer ab gespült und die Messung in Tris-Puffer durchgeführt. DNA bindet (vermutlich durch elektrostatische Wechselwirkung) an die Goldoberfläche und kann (ebenso) an die Spitze des Cantilvers anbinden. Dies sind die Voraussetzungen für eine erfolgreiche kraftspektroskopische Messung von DNA. Cantilever und Probenoberfläche werden nun in dem Messvorgang angenähert und wieder voneinander entfernt und zwar derart, dass auch der Sensorresponse für jede Kraft-Distanz-Kurve bestimmt werden kann. Wenn DNA an die Spitze des Can-

tilevers angebunden ist, zeigt sich dann bei Entfernung von Cantilever und Spitze eine charakteristische Kraft-Distanz-Kurve³ (s. Abb. 4.4).

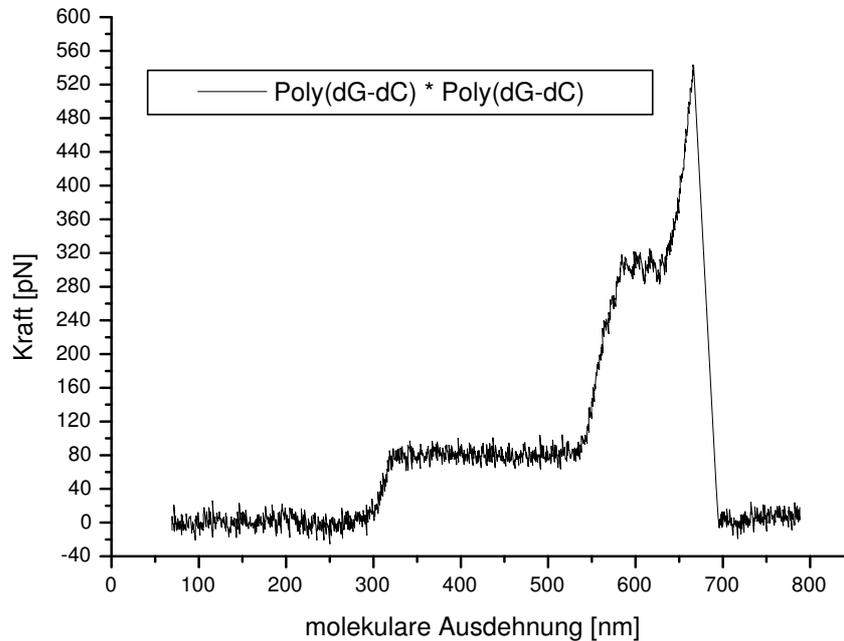


Abbildung 4.4: typische Kraft-Distanz-Kurve von Poly(dG-dC) · Poly(dG-dC) aus [35]

Zunächst wird die gebundene B-DNA solange gezogen, bis sie vollständig gespannt wird. Danach kann sie durch eine konstante Kraft von ca. 75 pN auf ca. 170% ihrer Konturlänge der B-DNA-Form in die S-DNA-Form (engl.: "stretched", dt.: "gestreckt") gestreckt werden. Anschließend setzt das Schmelzen der ds-DNA (engl.: "double strand", dt.: "Doppelstrang") zur ss-DNA (engl.: "single strand", dt.: "Einzelstrang") mit linearem Anstieg der Kraft bis auf 300 pN ein. Die ss-DNA wird bei noch größeren Ausdehnungen dann schließlich noch weiter gestreckt. Dies geschieht wiederum mit linearem Anstieg der Kraft auf ca. 550 pN, bevor die DNA vom Cantilever abreißt und Cantilever und DNA relaxieren. Diese Form der Kraft-Distanz-Kurve ist gut dokumentiert [31][35] und sollte mit dem hier vorgestellten AFM ebenfalls gemessen werden. Um möglichst genaue

³Die Kraft-Distanz-Kurven zeigen die molekulare Ausdehnung der DNA. Dabei wird auf der Abszisse (Distanz) nicht die Oberflächen-Cantilever-Entfernung aufgetragen, sondern von diesem Messwert wird noch die Auslenkung des Cantilevers nach Gl. 2.13 abgezogen, um so die reine Streckung des Moleküls zu betrachten.

Aussagen anhand von Kraft-Distanz-Kurven treffen zu können, ist ein niedriges Rauschen der Kraftwerte erforderlich. Eine Aussage über das Rauschen liefert beispielsweise das Peak-Peak-Rauschen auf den Kraftplateaus der S-DNA in Kraft-Distanz-Kurven. Bei Eckel et al.[35] (s. Abb. 4.4) beträgt dieser Wert rund 25 pN^4 .

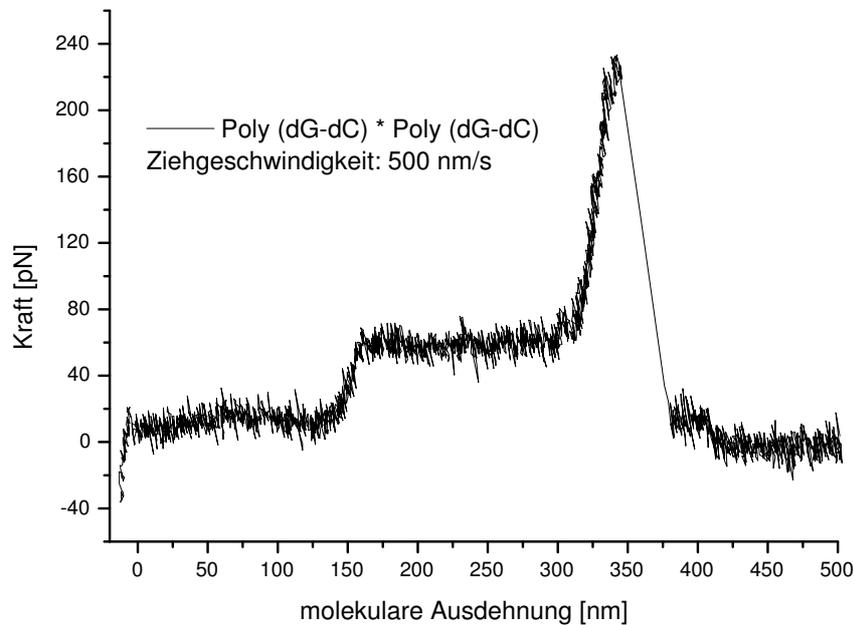


Abbildung 4.5: Kraft-Distanz-Kurve von Poly(dG-dC) · Poly(dG-dC), Federkonstante nominell

Die Abb. 4.5 zeigt eine mit dem aufgebauten AFM erstellte Kraft-Distanz-Kurve. Sie zeigt deutlich den Übergang von B-DNA zu S-DNA. Die Länge der B-DNA beträgt ca. 160 nm, die der S-DNA ca. 130 nm, die S-DNA-Konturlänge beträgt damit also 80% der B-DNA-Konturlänge. Das Plateau konstanter Kraft liegt bei etwa 60 pN, also leicht unter dem erwarteten Wert von 65 pN bis 75 pN. Der Grund für diese Abweichungen von den dokumentierten Werten, könnte an einer zu niedrig angenommenen Federkonstanten von $6 \frac{\text{pN}}{\text{nm}}$ oder an äußeren Einflüssen der Messung (z.B. Ionenstärke, Konzentration des Messpuffers etc.) liegen. Da die Federkonstanten der Cantilever um $\pm 50\%$ der Herstellerangaben schwanken, ist durchaus anzunehmen, dass der verwendete Cantilever tatsächlich eine vom Nominalwert abweichende Federkonstante hatte.

⁴Die Daten wurden mit einem DI MultimodeTM mit modifizierter Kraftspektroskopie-Einheit bei 10-fachem Oversampling generiert.

Somit könnte die Plateauhöhe der S-DNA einen Werte zwischen 65 pN und 80 pN annehmen und mit den erwarteten Werten übereinstimmen. Das Rauschen der Kraftwerte auf dem Plateau beträgt in etwa 25 pN. Der Abriss der DNA erfolgt bei ca. 220 pN bzw. 300 pN, wenn man eine Federkonstante von $8 \frac{\text{pN}}{\text{nm}}$ annimmt, also vor einer Streckung der ss-DNA. Die Abbildungen 4.6 und 4.7 zeigen ebenfalls Kraft-Distanz-Kurven von

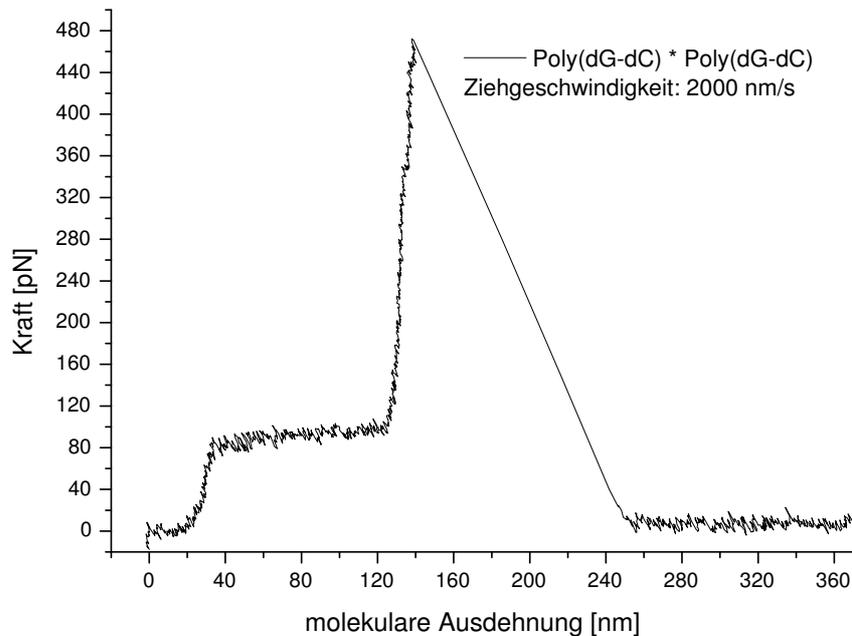


Abbildung 4.6: Kraft-Distanz-Kurve von Poly(dG-dC) · Poly(dG-dC)

Poly(dG-dC)·Poly(dG-dC). In beiden Fällen beträgt die Länge der S-DNA ca. 85 nm, die Länge der B-DNA ist nicht zu ermitteln, da die Streckung der DNA in beiden Kurven direkt nach der Trennung von Cantilever und Probenoberfläche beginnt. Der Grund für das "Verschwinden" der B-DNA-Kontur liegt wohl in der gewählten Messart. Während des Kontaktes zwischen Cantilever und Probenoberfläche, wurde die Oberfläche horizontal verschoben, die vollständige Ausdehnung der B-DNA findet also in horizontaler Richtung statt und kann so in vertikaler Richtung nicht gemessen werden. Der Vorteil dieser Art von Messung ist jedoch eine erheblich höhere Wahrscheinlichkeit der Bindung zwischen DNA und Cantilever. Das Rauschen der Kraftwerte auf dem Kraftplateaus von rund 90 pN beträgt ca. 12 pN. Die Verbesserung der Rauschwerte ist auf die Optimierung des I-U-Wandlers, auf den Einsatz eines Tiefpassfilters ($f_g = 3 \text{ kHz}$, 40

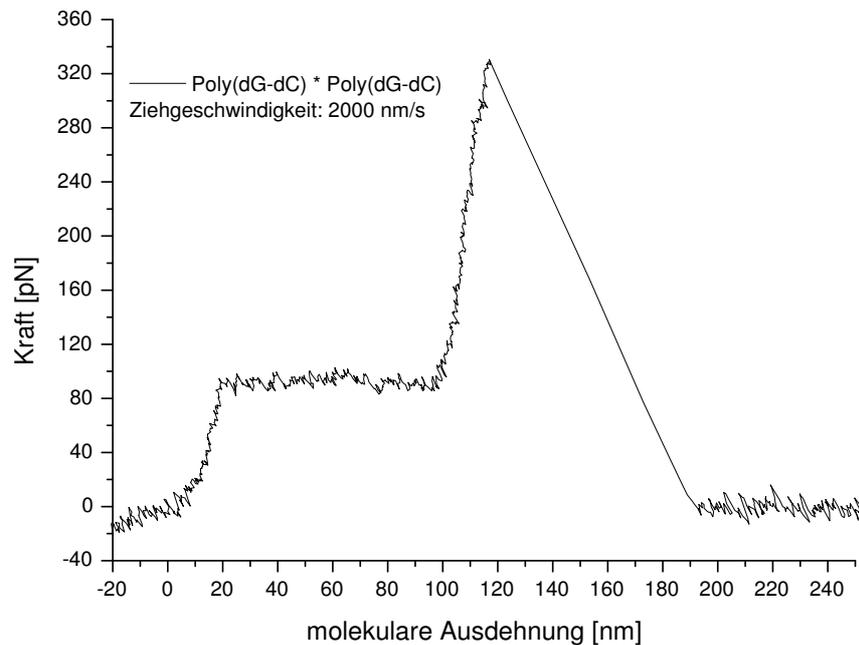


Abbildung 4.7: Kraft-Distanz-Kurve von Poly(dG-dC) · Poly(dG-dC)

dB) und das durchgeführte 8-fache Oversampling der Messwerte zurückzuführen. Da die Ziehgeschwindigkeit bei den Messungen und die Messgeschwindigkeit des A-D-Wandlers letztendlich ausschlaggebend für die Oversamplingrate⁵ ist, würde eine Messkarte, die ein höhere Samplerate als die verwendeten 200 kS/s der NI PCI-6036E erlaubt, bei gleicher Ziehgeschwindigkeit ein verbessertes Rauschen zeigen. Die Kraftwerte des Abrisses der DNA liegen mit 460 pN (s. Abb. 4.6) und 330 pN (s. Abb. 4.7) im Bereich des Schmelzens der ds-DNA. Diese Messungen zeigen, dass mit dem aufgebauten AFM unter Benutzung herkömmlicher Cantilever kraftspektroskopische Messungen ähnlicher oder sogar besserer Qualität, wie die kommerzieller AFM, durchgeführt werden können.

4.3 Kleine Cantilever

Von der EPFL (École Polytechnique Fédérale de Lausanne) wurden kleine (insb. schmale) balkenförmige Cantilever aus Si_3N_4 mit einem Träger aus SU-8 und einer Alumini-

⁵D.h. für die Anzahl der Messwerte über die gemittelt wird.

umbeschichtung für bessere Reflektivität hergestellt und zur Verfügung⁶ gestellt. Die Breite der Cantilever sollte durchweg unter $10\ \mu\text{m}$ liegen. Die Resonanzfrequenzen der Cantilever sollten an Luft über $180\ \text{kHz}$ liegen, wobei ihre Federkonstanten zwischen $1\ \frac{\text{pN}}{\text{nm}}$ und $30\ \frac{\text{pN}}{\text{nm}}$ liegen sollten. Leider trafen diese Cantilever erst wenige Tage vor Beendigung dieser Arbeit ein, so dass nur wenige Erkenntnisse über ihre Beschaffenheit vorliegen. Die eben aufgelisteten Eckdaten entsprechen den Vorgaben, unter denen die Cantilever hergestellt wurden. In wie weit diese Vorgaben umgesetzt wurden, beispielsweise was die Dicke der Cantilever von ca. $150\ \text{nm}$ betrifft, kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht gesagt werden. Erste Messungen der Cantilver mit dem Rasterelektronenmikroskop ergaben, dass ihre Breite tatsächlich unter $10\ \mu\text{m}$ liegt.

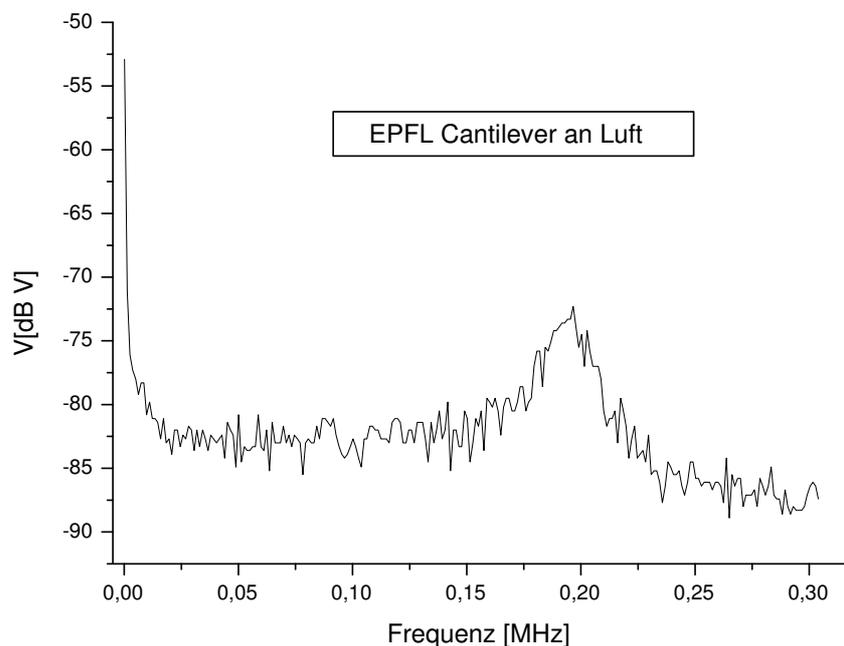


Abbildung 4.8: Spektrum des thermischen Rauschens eines EPFL-Cantilevers

Weiterhin konnte die Resonanzfrequenz eines Cantilevers an Luft zu $197\ \text{kHz}$ bestimmt werden (s. Abb. 4.8). Die Tatsache, dass das thermische Spektrum keinen "schönen" Verlauf zeigt, hat zwei Ursachen. Erstens ist der I-U-Wandler (s. Abs. 3.3.1) nur für Frequenzen bis $133\ \text{kHz}$ geeignet, zeigt also bei der gemessenen Resonanzfrequenz

⁶Herzlichen Dank an die EPFL- Arbeitsgruppe von Jürgen Brugger und insbesondere an Gyuman Kim, Tobias Kramer und Jeroen Steen, die die Cantilever hergestellt haben.

schon Tiefpassfilter-Verhalten. Zweitens stand zur Bestimmung des Spektrums bei hohen Frequenzen nur ein Spektrumanalyzer fragwürdiger Qualität zur Verfügung, der keine definierbare Mittelung über Spektren erlaubt. Der Versuch thermische Spektren der EPFL-Cantilever in Flüssigkeit aufzunehmen, um das Problem zu hoher Resonanzfrequenzen zu umgehen, scheiterte bisher, da die Frequenzen bei sehr kleinen Cantilevern (ca. $6,5 \mu\text{m} \times 15 \mu\text{m}$) wohl immer noch zu hoch lagen und größere Cantilever bei dem Versuch abbrechen, sie in Flüssigkeit zu bringen. Mit sehr kleinen Cantilevern gelang dies jedoch und es konnte zumindest ein Sensorresponse bestimmt werden (s. Abb. 4.9), obwohl die kleinen Cantilever noch keine Spitzen haben.

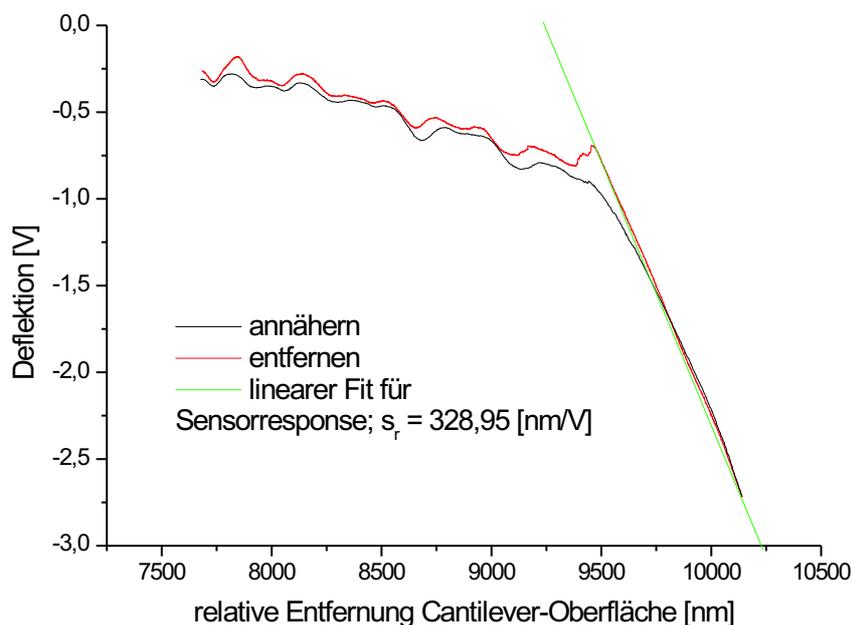


Abbildung 4.9: Sensorresponse eines EPFL-Cantilevers in Wasser

Dieser lag mit $328,95 \frac{\text{nm}}{\text{V}}$ ungefähr doppelt so hoch wie bei den früher verwendeten kommerziell erhältlichen Cantilevern. Der höhere Sensorresponse ist zu erwarten, da sich kurze Cantilever stärker verbiegen als lange, wenn sie um die gleiche Entfernung aus ihrer Ruhelage gebracht werden. Wie anhand von Abb. 4.9 ersichtlich ist, treten deutliche Interferenzerscheinungen im Deflektionsignal in Entfernungsbereichen zwischen 7500 nm und 9500 nm auf. Anders als bei früher gemessenen Interferenzstörungen sind diese jedoch keine regelmäßige Abfolge von Minima und Maxima. Dies deutet darauf hin, dass

sich in diesem Bereich viele Effekte überlagern. Weiterhin fällt bei der Entfernungskurve des Cantilevers in Abb. 4.9 auf, dass der Cantilever an der Oberfläche "kleben" bleibt (s. Abb 2.6). Dies liegt in der Tatsache begründet, dass die schmalen Cantilever noch keine Spitzen haben, diese sollen erst nachträglich bei der EPFL aufgebracht werden. Das Summensignal des Detektors beträgt etwa 25% (ca. 3V) des Summensignals kommerzieller Cantilever. Die oben beschriebenen Messungen von Sensorresponse und Resonanzfrequenz fanden bei einer Verstärkung von eins der Quadrantendetektorelektronik statt, womit gezeigt werden konnte, dass das Ziel, ein AFM für den Einsatz kleiner Cantilever zu konstruieren, erreicht wurde.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein AFM konstruiert, das seine Funktionalität für kraftspektroskopische Untersuchungen mit kommerziell erhältlichen Cantilevern unter Beweis stellen konnte. Dabei liegt der Rauschen der Kraftwerte in der gleichen Größenordnung (≈ 12 pN) wie bei anderen kraftspektroskopischen Messungen mit kommerziell erhältlichen AFM und Cantilevern, tendenziell sogar ein wenig darunter. Das Ziel, Messungen mit kleinen Cantilvern mit diesem AFM zu ermöglichen, ist gelungen, da zumindest prinzipiell fundamentale Größen wie Resonanzfrequenz und Sensorresponse ermittelt werden können. Daneben steht nun ein Messaufbau hoher Flexibilität zur Verfügung, der dazu genutzt werden kann, weiterführende bzw. grundsätzlich neue Messungen mit dem Prinzip des AFM durchzuführen. Nicht zuletzt liegt ein Großteil der Flexibilität des Messaufbaus in der Tatsache, dass jedes Teil des mechanischen Aufbaus selbst konstruiert wurde und damit die einfache Möglichkeit besteht, konkrete neue Anforderungen an den Aufbau durch Änderung oder Duplizierung einzelner Elemente umzusetzen. Obwohl bestimmte Möglichkeiten bzw. Eigenschaften konkret nicht umgesetzt wurden, sind diese Anforderungen doch mit in das Design eingeflossen und sollen nun zusammen mit anderen naheliegenden Änderungen beschrieben werden:

- 1) Sowohl die Halterung der Cantilever, als auch die der Probe erfolgt im konkreten Aufbau durch kleine Magnete. Daher ist das lokale Magnetfeld auf der Probe sicher nicht vernachlässigbar. Beide Halterungen könnten jedoch sehr einfach durch mechanische Klemmvorrichtungen ersetzt werden. Weiterhin handelt es sich bei den die Probe umgebenden Bauteilen des AFM durchweg um nicht-ferromagnetische Materialien. Somit ist es ein Leichtes, magnetfeldarme Messungen von Proben durchzuführen. Diese Eigenschaft kann von kommerziell erhältlichen AFM meist nur durch aufwändige und teure Umbauten erreicht werden.

- 2) Mittelfristig soll das Scannen von Probenoberflächen mit dem AFM möglich werden. Da kleine Cantilever mit hohen Resonanzfrequenzen ein schnelleres Scannen im tapping modeTM erlauben, kann so der Zeitaufwand für Probenuntersuchungen reduziert werden. Letztlich könnten durch schnelles Scannen dynamische Prozesse auf molekularer Ebene [33] quasi als Film erfasst werden.

3) Das hier konstruierte AFM nimmt nur den Raum oberhalb der Probenoberfläche ein. Dadurch ist es einfach möglich, den Raum unterhalb und seitlich der Probe für andere Messungen zu nutzen. So soll in einer erweiterten Version des Versuchsaufbaus das AFM auf ein Umkehrmikroskop gesetzt werden. Sowohl Ramanspektroskopie während des Scannens, als auch die optische Beobachtung der Probe während der Kraftspektroskopie (z.B. an Zellen) sollen so ermöglicht werden.

4) Momentan beträgt der Durchmesser des reflektierten Laserstrahls auf dem Quadrantendetektor ca. 8 mm. Sollte dieser Durchmesser für kleinere Quadrantendetektoren zu groß sein, könnte eine kleine Linse in einer Standardfassung unterhalb des x-y-Verstellisches für den Quadrantendetektor eingesetzt werden. Dies könnte der Fall sein, wenn die Messgeschwindigkeit des Systems durch die Auslesegeschwindigkeit des recht großen Quadrantendetektors begrenzt wird. Ohnehin sollte geprüft werden, ob ein anderer Quadrantendetektor (mit integriertem I-U-Wandler in SMD-Bauweise) evtl. bessere Eigenschaften was Sensitivität, Geschwindigkeit und Rauschen betrifft, aufweist.

5) Das selbst konstruierte Objektiv der Kamera sollte ausgetauscht werden, da die kleinen Cantilever nur unzureichend auf dem Kontrollbildschirm erkannt werden können.

6) Auf Seiten der Messsoftware bestehen Verbesserungsmöglichkeiten, durch eine komplette Implementierung der Joystickkontrolle in das Messprogramm, aber auch durch automatisierte Abfolgen von Messsequenzen. Beim "Spielen" mit dem Joystick hat sich gezeigt, dass die Wahrscheinlichkeit einer Bindung von DNA an die Cantileverspitze erheblich erhöht, wenn man die Probenoberfläche bei leichtem Kontakt zu Cantilever horizontal verfährt. Da der horizontale Verfahrensweg manuell recht willkürlich ist, wäre es besser, automatisch Kreise auf der Oberfläche fahren zu lassen. Dadurch könnte die horizontale Streckung der DNA vermieden bzw. klein gehalten, aber die Bindungswahrscheinlichkeit erheblich erhöht werden. Konsequenterweise wäre dann noch eine automatische Rasterung des gesamten x-y-Scanbereiches von $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ des Piezotisches erstrebenswert. Dabei sollte dann die horizontale Verstellung des Tisches durch eine digitale Vorgabe der Positionsdaten erfolgen. Außerdem wäre eine Sequenz verschiedener Ziehgeschwindigkeiten für eine angebundene DNA im Entfernungsbereich der S-DNA wünschenswert, so dass vor dem Abriss der DNA das Kraftplateau der S-DNA mehrfach ausgemessen werden könnte.

7) Kraftspektroskopische Messungen mit kleinen Cantilevern können momentan noch nicht durchgeführt werden, da die Cantilever noch keine Spitzen haben. Zuerst müssen ohnehin die festgestellten Interferenzeinflüsse beseitigt sowie Sensorresponse und Resonanzfrequenz standardmäßig bestimmt werden können. Ob dies durch bessere Justage der Strahlengänge erreicht werden kann, ist noch unklar. Wegen der kurzen Zeitspan-

ne, in der die Cantilever zur Verfügung standen, müssen die Justagemöglichkeiten erst noch ausgeschöpft¹ und die Verwendung von kleinen Cantilevern mit Spitze getestet werden. Als letztes Mittel der Bekämpfung von Störungen durch Interferenzen steht eine nachträgliche Bearbeitung der Kraft-Distanz-Kurve immer noch zur Verfügung, wenn genauere Justage bzw. größere Winkel zwischen Cantilever und Probenoberfläche dazu nicht ausreichen sollten. Da Annäherungs- und Entfernungskurve des Cantilevers recht genau übereinander liegen (s. Abb 4.9), kann die Annäherungskurve von der Entfernungskurve im Bereich des Nicht-Kontaktes von Cantilever und Oberfläche abgezogen werden. So könnten Interferenzen auf Seiten der Software herausgerechnet werden. Weiterhin besteht die Notwendigkeit, einen guten Spektrumanalyzer zur Verfügung zu haben, um so die Federkonstanten der Cantilever bestimmen zu können. In der Verwendung der nun vorhandenen kleinen Cantilever liegt nun sicher die naheliegendste und interessanteste Aufgabe.

¹Bei der ersten Verwendung von Olympus Biolevern traten ebenfalls Interferenzprobleme auf, die heute durch jeweilige Justage gut gelöst werden können.

Literaturverzeichnis

- [1] G. Binnig, C. F. Quate, and C. Gerber. Atomic force microscope. *Phys.Rev.Lett.*, 56(9):930–933, 1986.
- [2] G. U. Lee, D. A. Kidwell, and R. J. Colton. Sensing discrete streptavidin-biotin interactions with atomic force microscopy. *Langmuir*, 10:354–357, 1993.
- [3] F. Gittes and Ch. F. Schmidt. Thermal noise limitations on micromechanical experiments. *Eur.Biophys.J.*, 27:75–81, 1998.
- [4] M. B. Viani, T. E. Schaffer, A. Chand, M. Rief, H. E. Gaub, and P. K. Hansma. Small cantilevers for force spectroscopy of single molecules. *J.Appl.Phys.*, 86(4):2258–2262, 1999.
- [5] R. J. Colton, A. Engel, J. E. Frommer, H. E. Gaub, A. A. Gewirth, R. Guckeburger, J. Rabe, W. M. Heckl, and B. Parkinson. *Procedures in Scanning Probe Microscopies*. John Wiley and Sons, Inc., 1999.
- [6] G. Meyer and N. M. Amer. Novel optical approach to atomic force microscopy. *Appl.Phys.Lett.*, 53(12):1045–1047, 1988.
- [7] T. E. Schaffer and P. K. Hansma. Characterization and optimization of the detection sensitivity of an atomic force microscope for small cantilevers. *J.Appl.Phys.*, 84(9):4661–4666, 1998.
- [8] R. Berger, H. P. Lang, C. Gerber, J. K. Gimzewski, J. H. Fabian, L. Scandella, E. Meyer, and H.-J. Güntherodt. Micromechanical thermogravimetry. *Chem.Phys.Lett.*, 294(1998):363–369, 1998.
- [9] Y. Martin and H. K. Wickramasinghe. Magnetic imaging by ‘‘force microscope’’ with 1000 Å resolution. *Appl.Phys.Lett.*, 50(20):1455–1457, 1987.

- [10] J. Fritz, M. K. Baller, H. P. Lang, H. Rothuizen, P. Vettiger, G. Meyer, H.-J. Güntherodt, C. Gerber, and J. K. Gimzewski. Translating biomolecular recognition into nanomechanics. *Science*, 288:316–318, 2000.
- [11] G. U. Lee, L. A. Chrisey, and R. J. Colton. Direct measurement of the forces between complementary strands of dna. *Science*, 266:771–773, 1994.
- [12] E.-L. Florin, V. T. Moy, and H. E. Gaub. Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs. *Science*, 264:415–417, 1994.
- [13] U. Dammer, O. Popescu, P. Wagner, D. Anselmetti, H.-J. Güntherodt, and G. N. Misevic. Binding strength between cell adhesion proteoglycans measured by atomic force microscopy. *Science*, 267:1173–1175, 1995.
- [14] U. Dammer, M. Hegner, D. Anselmetti, P. Wagner, M. Dreier, W. Huber, and H.-J. Güntherodt. Specific antigen/antibody interactions measured by force microscopy. *Biophys.J.*, 70:2437–2441, 1996.
- [15] P. Hinterdorfer, W. Baumgartner, H. Gruber, K. Schilcher, and H. Schindler. Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 93:3477–3481, 1996.
- [16] R. Ros, F. Schwesinger, D. Anselmetti, M. Kubon, R. Schäfer, A. Plückthun, and L. Tiefenauer. Antigen binding forces of individually addressed single-chain fv antibody molecules. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 95:7402–7405, 1998.
- [17] D. A. Walters, J. P. Cleveland, N. H. Thomson, P. K. Hansma, M. A. Wendman, G. Gurley, and V. Elings. Short cantilevers for atomic force microscopy. *Rev.Sci.Instr.*, 67(10):3583–3590, 1996.
- [18] T. E. Schaffer, J. P. Cleveland, F. M. Ohnesorge, D. A. Walters, and P. K. Hansma. Studies of vibrating atomic force microscope cantilevers in liquid. *J.Appl.Phys.*, 80(7):3622–3627, 1-10-1996.
- [19] J. E. Sader. Frequency response of cantilever beams immersed in viscous fluids with application to the atomic force microscope. *J.Appl.Phys.*, 84(1):64–76, 1998.
- [20] J. L. Hutter and J. Bechhoefer. Calibration of atomic-force microscope tips. *Rev.Sci.Instr.*, 7:1868–1873, 1993.

- [21] A. Roters and D. Johannsmann. Distance-dependent noise measurements in scanning force microscopy. *J.Phys.:Condens.Matter*, 8:7561–7577, 1996.
- [22] L. D. Landau and E. M. Lifschitz. *Lehrbuch der theoretischen Physik (I) Mechanik*. Akademie Verlag, 7.th edition, 1970.
- [23] J. P. Cleveland, S. Manne, D. Bocek, and P. K. Hansma. A nondestructive method for determining the spring constant of cantilevers for scanning force microscopy. *Rev.Sci.Instr.*, 64(2):403–405, 1993.
- [24] C. T. Gibson, G. S. Watson, and S. Myhra. Determination of the spring constants of probes for force microscopy/spectroscopy. *Nanotechnology*, 7(3):259–262, 1996.
- [25] F. Landstorfer and H. Graf. *Rauschprobleme in der Nachrichtentechnik*. R. Oldenbourg Verlag GmbH, 1981.
- [26] R. Müller. *Rauschen*. Springer-Verlag, 1990.
- [27] U. Tietze and Ch. Schenk. *Halbleiter-Schaltungstechnik*. Springer-Verlag, 1999.
- [28] J. Eichler and H.-J. Eichler. *Laser*. Springer-Verlag, 1998.
- [29] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, and L. Stryer. *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2003.
- [30] S. B. Smith, Y. Cui, and C. Bustamante. Overstretching b-dna: The elastic response of individual double-stranded and single-stranded dna molecules. *Science*, 271:795–799, 1996.
- [31] M. Rief, H. Clausen-Schaumann, and H. E. Gaub. Sequence-dependent mechanics of single dna molecules. *Nat.Struct.Biol.*, 6(4):346–349, 1999.
- [32] M. B. Viani, T. E. Schaffer, G. T. Paloczi, L. I. Pietrasanta, B. L. Smith, J. B. Thompson, M. Richter, M. Rief, H. E. Gaub, K. W. Plaxco, A. N. Cleland, H. G. Hansma, and P. K. Hansma. Fast imaging and fast force spectroscopy of single biopolymers with a new atomic force microscope designed for small cantilevers. *Rev.Sci.Instr.*, 70(11):4300–4303, 1999.
- [33] T. Ando, N. Kodera, E. Takai, D. Maruyama, K. Saito, and A. Toda. A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 98(22):12468–12472, 2001.

- [34] H. Clausen-Schaumann, M. Rief, C. Tolksdorf, and H. E. Gaub. Mechanical stability of single dna molecules. *Biophys.J.*, 78(4):1997–2007, 2000.
- [35] R. Eckel, R. Ros, A. Ros, S. D. Wilking, N. Sewald, and D. Anselmetti. Identification of binding mechanisms in single molecule-dna complexes. *Biophys.J.*, 85:1986–1973, 2003.

Danksagung

Am Ende dieser Arbeit bleibt nur noch, all jenen zu danken, die direkt oder indirekt an ihrer Entstehung und erfolgreichen Fertigstellung beteiligt waren.

Mein Dank gilt Prof. Dr. Dario Anselmetti, der es mir ermöglicht hat, diese Arbeit unter optimalen Bedingungen durchzuführen.

Ich danke auch Prof. Dr. Günter Reiss, der sich bereit erklärt hat, für diese Arbeit als zweiter Gutachter aufzutreten.

Dr. Robert Ros danke ich ganz besonders für die Betreuung und die Hilfe, die er mir in hohem Maße während dieser Arbeit zuteil werden ließ.

Weiterhin danke ich Roberto Maffioli von der Universität Basel der mir die Baupläne der Quadrantendetektorelektronik und einige wertvolle Ratschläge zukommen ließ.

Ebenso danke ich der Arbeitsgruppe von Jürgen Brugger an der École Polytechnique Fédérale de Lausanne, insbesondere Gyuman Kim, Tobias Kramer und Jeroen Steen, die die kleinen Cantilever hergestellt haben.

Der mechanischen Werkstatt der Universität Bielefeld danke ich für die kompetente Hilfe bei der Konstruktion des AFM-Kopfes und für seine Fertigstellung.

Mein Dank gilt außerdem Timo Altensäuer für die Programmierung der Force-Feedback-dll.

Ein Großteil des Gelingens dieser Arbeit ist der angenehmen Arbeitsatmosphäre in der Arbeitsgruppe "Experimentelle Biophysik und angewandte Nanowissenschaften" zu verdanken. Hierfür möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern bedanken. Besonders danke ich Christoph Pelargus für den optischen Beistand, Thanh Tu Duong für die Unterstützung am Computer, Rainer Eckel für die gute Chemie, Andy Sischka für den x-y-Probenstisch, Ralf Wilke für LaTeX-Problemlösungen, Wibke Hellmich für den Fahrdienst, Hermann Kleine für die Versorgung mit Süßigkeiten und allen anderen dafür, dass sie sehr nette Kolleginnen und Kollegen sind.

Last but not least bedanke ich mich bei meinen Eltern und Elizabeth de Renzy für die jahrelange Unterstützung während meines Studiums.