

Einzelmoleküldetektion mittels optischer Nahfeldmikroskopie

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Fakultät für Physik

der Universität Bielefeld

vorgelegt von

Carola Haumann

aus Herford

Februar 2005

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Bielefeld, 18. Februar 2005

(Carola Haumann)

Gutachter

Prof. Dr. Dario Anselmetti

Prof. Dr. Günter Reiss

Datum des Einreichens der Arbeit: 18. Februar 2005

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	5
2.1	Optische Nahfeldmikroskopie	5
2.1.1	Das Prinzip	7
2.1.2	Konfigurationen	12
2.1.3	Abstandsregelung	16
2.1.4	Auflösungskriterien	17
2.2	Fluoreszenz	21
2.3	Antikörper	23
2.4	DNA	25
2.4.1	Fluoreszenzmarkierung	27
3	Experimenteller Aufbau	29
3.1	Das optische Nahfeldmikroskop	29
3.2	Beleuchtungseinheit	30
3.3	Raster- und Annäherungseinheit	31
3.4	Detektionseinheit	33
3.5	Abstandsregelung mit Schwingquarzgabel	34
3.6	Vibrationsisolierung	35
3.7	Prinzipieller Messverlauf	36
4	Die Nahfeldsonde	38
4.1	Herstellung der Glasfaserspitze	38
4.1.1	Tube-etching	41
4.2	Aperturherstellung	43
4.2.1	Schattenbedampfen	43

4.2.2	Aufdrücken der Apertur	45
4.2.3	<i>Focused ion beam</i> Technik	46
4.2.4	Chemisches Ätzen der Apertur	46
4.2.5	Festkörperelektrolyse	46
4.2.6	Zusammenfassung	48
5	Aperturerzeugung mittels Festkörperelektrolyse	49
5.1	Der Elektrolyt	49
5.1.1	Hintergrund	49
5.1.2	Herstellung	50
5.1.3	Glasübergangstemperatur	52
5.1.4	Transparenz	53
5.1.5	Oberflächenrauigkeit	54
5.1.6	Die Elektrode	55
5.2	Aperturherstellung	56
5.2.1	Experimenteller Aufbau	57
5.2.2	Zeitliche Entwicklung	59
5.2.3	Ergebnisse	60
6	Probenpräparation	63
6.1	Allgemeines	63
6.1.1	Substrat	63
6.1.2	Funktionalisierung der Substratoberflächen	63
6.2	Nanostruktur	65
6.3	Fluoreszenzproben	69
6.3.1	Einzelne Farbstoffmoleküle	69
6.3.2	Fluoreszierende Kügelchen (Microspheres)	70
6.3.3	Fluoreszenzmarkierte DNA	71
6.3.4	Fluoreszenzmarkierte Antikörper	72
7	Resultate und Diskussion	74
7.1	Sondencharakterisierung	74
7.1.1	Transmissionsmessungen der Fischer-Probe	74
7.1.2	Einzelne Farbstoffmoleküle	78
7.1.3	Fluoreszierende Kügelchen	82
7.2	Biologische Proben	84
7.2.1	Fluoreszenzmarkierte DNA	84

7.2.2	Fluoreszenzmarkierte Antikörper	92
8	Zusammenfassung und Ausblick	93
	Literaturverzeichnis	96
	Glossar	106
	Danksagung	108
	Anhang	110

1 Einleitung

Die optische Wahrnehmung und Untersuchung der ihn umgebenden Dinge und Phänomene gehört für den Menschen zu den wichtigsten Methoden auf dem Weg zum Verständnis der Natur. Mit der Entwicklung der Lichtmikroskopie im 17. Jahrhundert eröffnete sich die Möglichkeit, eine bis dahin verborgene Welt sichtbar zu machen und zu erforschen. Als erster hat Antoni van Leeuwenhoek ein Lichtmikroskop gebaut und wissenschaftlich genutzt. Der Jenaer Physiker Ernst Abbe erarbeitete wesentliche wissenschaftliche Grundlagen zum Bau von Mikroskopen und produzierte diese zusammen mit Carl Zeiss in dessen optischen Werkstätten. Das Lichtmikroskop ist bis heute ein unentbehrliches Instrument in vielen wissenschaftlichen Disziplinen, vor allem bei der Untersuchung biologischer Proben, aufgrund seiner Nichtinvasivität, leichten Handhabung und relativ geringen Kosten. Allerdings ist die, mit konventionellen optischen Methoden erreichbare räumliche Auflösung auf ungefähr die Hälfte der verwendeten Wellenlänge begrenzt. Für das sichtbare Licht liegt diese theoretische Auflösungsgrenze bei 200-300 *nm*, was seinen Einsatz bei vielen Anwendungen, vor allem bei der Untersuchung einzelner, nahe beieinander liegender Moleküle innerhalb eines großen Ensembles, einschränkt.

Für viele Wissenschaftler war es ein lang gehegter Traum einzelne Moleküle mit einer hohen lateralen Auflösung untersuchen zu können. In allen physikalischen, chemischen oder biologischen Lehrbüchern werden individuelle Moleküle zur Erläuterung der Grundprinzipien, wie der Wechselwirkung von Licht mit Materie, chemischen Reaktionen oder Zellprozessen in lebenden Organismen herangezogen. Aber es war viel einfacher einzelne Moleküle zu zeichnen, als sie tatsächlich zu beobachten. Bis zur Mitte der achtziger Jahre basierten die wissenschaftlichen Erkenntnisse auf der Beobachtung des kollektiven Verhaltens großer Molekülensembles.

Diese Einschränkung motivierte die Entwicklung hoch auflösender Techniken zur Detektion einzelner Moleküle, der sogenannten Rastersondenmikroskope (engl. Scanning Probe Microscope, SPM). In einem SPM wird die Wechselwirkung einer Sonde (meist einer sehr feinen Spitze) mit einer Probenoberfläche als Bildkontrast aufgezeichnet. Gleich-

zeitig wird die Spitze rasterförmig über die Probe geführt und man erhält damit eine Messung zu jedem diskreten Rasterpunkt (Pixel), die zu einem Bild zusammengesetzt werden. Die einzelnen Mikroskope werden aufgrund der Natur der Wechselwirkung zwischen Spitze und Probe unterschieden. Das erste Instrument dieser Art war das Rastertunnelmikroskop (engl. Scanning Tunneling Microscope, STM) [1], bei dem der quantenmechanische Tunnelstrom, der zwischen einer Metallspitze und einer ebenfalls leitenden Probe bei Abständen im Angström-Bereich fließt, gemessen wird. Hieraus entwickelten sich weitere Rastersondenverfahren, wie z.B. das Rasterkraftmikroskop (AFM). Bei dieser Methode wird die Kraft zwischen der Probe und einer Spitze gemessen, die an einer Blattfeder (engl. Cantilever) befestigt ist.

Weitere Vertreter hochauflösender Mikroskope sind das Rasterelektronenmikroskop (engl. scanning electron microscope, SEM) und das Transmissionselektronenmikroskop (engl. transmission electron microscope, TEM). Die Einführung und Weiterentwicklung dieser Formen der Mikroskopie brachte einen unglaublichen Gewinn an räumlicher Auflösung, bis hin zur Abbildung einzelner Atome.

Viele dieser hochauflösenden Techniken stellen jedoch hohe Anforderungen an die Probenpräparation und haben die Flexibilität der Arbeitsumgebungen stark reduziert. So muss eine Probe für elektronenmikroskopische Untersuchungen Vakuum geeignet und beim SEM in der Regel leitend sein. Für biologische Proben bedeutet das, dass sie getrocknet und mit einem Metallfilm beschichtet werden müssen. Da die biologischen Präparate meistens aus leichten Elementen bestehen (H, C, N, O, P...), ergibt sich bei Untersuchungen mit dem TEM ein weiteres Problem durch die große Ordnungszahlabhängigkeit des elastischen Streuquerschnitts ($\sim z^{3/2}$), der bei der Abbildung eine tragende Rolle spielt. Daher werden biologische Proben mit amorphen Schweratomsalzen "gefärbt". Die ionoiden Schweratomverbindungen lagern sich an polare Gruppen der biologischen Makromoleküle an und erzeugen aufgrund ihrer stärkeren elastischen Elektronenstreuung einen Kontrast. Obwohl diese Techniken eine Menge wichtiger Strukturdaten biologischer Proben geliefert haben, sind *in vitro* oder dynamische Messungen nicht möglich. Das AFM hingegen ist in der Lage Proben unter Umgebungsbedingungen und sogar in Flüssigkeit zu untersuchen, liefert aber wenig chemische Informationen. Meist enthüllt das AFM topographische Informationen, die bei Proben mit komplizierter Morphologie schwierig zu interpretieren sind. Der Wunsch die hohe Auflösung dieser Techniken mit der Empfindlichkeit, Spezifität und Flexibilität der optischen Techniken zu kombinieren hat zur Entwicklung des optischen Nahfeldmikroskops (engl. Scanning Near-Field Optical Microscope, SNOM) geführt.

Die Grundidee des Apertur-SNOM, die bereits in den 20er Jahren des 20. Jahrhunderts

von E.H. Synge [2] vorgeschlagen wurde, ist es eine spitzenförmige Sonde mit einer Sub-Wellenlängen-Apertur am Ende in unmittelbare Nähe einer Probe zu bringen. Dadurch ist die erreichbare Auflösung nicht durch Beugung auf $\sim \lambda/2$ beschränkt, sondern wird durch den Aperturdurchmesser (typischerweise $\lambda/10$) bestimmt. Vorausgesetzt, dass der Abstand zwischen Sonde und Probe kleiner als der Aperturradius bleibt. Die mit dem SNOM erhaltene optische Information stammt von dem Teil der Probe, der innerhalb des Nahfeldes der Sonde liegt, bei typischen Abständen von wenigen Nanometern.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Fluoreszenzmessungen wurde ein sogenanntes Apertur-Transmissionsnahfeldmikroskop im Beleuchtungsmodus verwendet. Hierbei arbeitet die Sonde als Sub-Wellenlängen-Lichtquelle und die Fluoreszenz der Probe wird nach Transmission durch die Probe und Sammeloptik im Fernfeld detektiert. SNOM ist eine Rastersondentechnik und ermöglicht dadurch die Aufzeichnung der Probentopographie, wobei die laterale Auflösung durch die Spitzegeometrie bestimmt wird. Der Abstand zwischen Sonde und Probe wird mittels Scherkraftregelung auf einen konstanten Wert im Nanometerbereich eingestellt.

Das SNOM bietet für viele Anwendungen deutliche Vorteile gegenüber anderen Techniken der Einzelmoleküldetektion. Zunächst einmal ist die optische Auflösung besser, als bei den beugungslimitierten Fernfeldmethoden. Dies führt zu einer höheren Genauigkeit bei der Lokalisierung und erlaubt die individuelle Beobachtung einzelner Moleküle bei geringeren gegenseitigen Abständen. Das geringe Anregungsvolumen macht SNOM zu einer oberflächensensitiven Technik, reduziert wesentlich das Hintergrundsignal und es werden weniger Moleküle gebleicht. Desweiteren können die optischen Eigenschaften mit der Topographie korreliert werden. Zudem sind SNOM-Messungen sehr sensitiv bezüglich der Orientierung einzelner Moleküle. Die Sonde kann zusätzlich zur Manipulation und Kontrolle der Probe verwendet werden.

Die erste Nahfeldabbildung gelang 1972 Ash und Nicholls [3] mit Mikrometerwellen ($\lambda = 3\text{ cm}$) an einem metallischen Liniengitter. Mit ihrem Aufbau konnten sie in einer Dimension eine Auflösung von einem Sechzigstel der Wellenlänge demonstrieren. Allerdings stand erst durch die Entwicklung des Rastertunnelmikroskops [1] im Jahre 1981 die für die Abstandsregelung der Apertur in einem Bereich von wenigen Nanometern über der Probe erforderliche Technik zur Verfügung. Diese ermöglichte 1984 die ersten Nahfeldmessungen im sichtbaren Wellenlängenbereich durch Pohl et al. [4] und Lewis [5]. Seit diesen Pionierarbeiten wurde viel Energie in die Entwicklung neuer Techniken der Nahfeldmikroskopie [6, 7, 8] investiert. Die Distanzregelung mittels Scherkraftmessung [9] erlaubt inzwischen die Wechselwirkung des Sondennahfeldes mit der Probe und damit eine routinemäßige Auflösung unterhalb der Abbe'schen Beugungsgrenze [9, 10].

1993 gelangen Betzig und Chichester [11] die ersten Beobachtungen einzelner Moleküle mit Hilfe der Nahfeld-Fluoreszenzmikroskopie bei Zimmertemperatur. Bis dahin war die Untersuchung einzelner Moleküle auf tiefe Temperaturen beschränkt. Spätere Anwendungen des SNOM bei der Einzelmoleküldetektion beinhalten FRET-Untersuchungen [12], Einzelmoleküldiffusion und Rotation in einer Polymermatrix [13] und die Detektion fluoreszenzmarkierter DNA-Stränge, sowie des Green Fluorescent Proteins (GFP) [14]. Heutzutage hat sich die Fluoreszenzdetektion und -spektroskopie einzelner Moleküle [13, 15] und Zellen [16] mittels optischer Nahfeldmikroskopie (SNOM) zu einem dynamischen Forschungsgebiet entwickelt. Diese Methode bietet ein hohes Potential für einen großen Bereich an Disziplinen wie Materialuntersuchungen [17], analytische Chemie und Biologie [18].

Ziel dieser Arbeit war die optische Detektion einzelner fluoreszierender Moleküle. Dazu wurde ein optisches Rasternahfeldmikroskop basierend auf einer kommerziellen Raster- und Annäherungseinheit, die in ein inverses optisches Mikroskop integriert wurde aufgebaut. Ein wesentlicher Bestandteil der Arbeit war die Entwicklung einer Technologie zur reproduzierbaren Herstellung von Apertur-Nahfeldsonden auf der Basis optischer Glasfasern. Mittels des SNOM und der selbst hergestellten Sonden wurden Einzelmolekülmessungen an Farbstoffmolekülen in einer Polymermatrix, sowie oberflächenimmobilisierten, fluoreszenzmarkierten DNA-Molekülen durchgeführt.

2 Grundlagen

In diesem Kapitel werden die Grundlagen der Arbeit vorgestellt. Dazu wird zuerst das Prinzip der optischen Nahfeldmikroskopie erläutert und verschiedene Konfigurationen dieses Mikroskoptyps beschrieben. Die Abstandsregelung zwischen Sonde und Probe erfolgt mittels Scherkraftdetektion. Für die Interpretation der Messergebnisse werden verschiedene Auflösungskriterien verwendet, diese werden kurz erläutert. Da in erster Linie fluoreszenzmarkierte Proben gemessen werden sollen, werden die Grundlagen der Fluoreszenz dargestellt. Abschliessend erfolgt eine Vorstellung der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten biologischen Proben.

2.1 Optische Nahfeldmikroskopie

Die beugungsbedingte Auflösungsgrenze der konventionellen Mikroskopie geht aus der Größe des Punktes hervor, auf die ein Lichtstrahl mit einer Linse fokussiert werden kann. Im Fokuspunkt bildet der Strahl eine symmetrische Struktur konzentrischer Ringe, die sogenannten Airy-Scheibchen. Die Dimensionen der Airy-Scheibchen wurden 1873 erstmals von Ernst Abbe [19] detailliert beschrieben. Nach Abbe ist der Abstand d , vom Punkt größter Intensität in der Mitte des zentralen Maximums, zum ersten Minimum der Intensität gegeben durch

$$\Delta x \approx 0.61(\lambda_0/n\sin\theta) \quad (2.1)$$

wobei λ_0 die Vakuum-Wellenlänge, n der Brechungsindex des umgebenden Mediums und θ der Öffnungswinkel des fokussierenden Elements ist. Der Nenner in Gleichung 2.1 wird als *Numerische Apertur* (NA) bezeichnet :

$$NA = n\sin\theta \quad (2.2)$$

Sie ist ein Maß für das Lichtsammelvermögen einer Linse oder eines Linsensystems. Die NA kann bei modernen Objektive, die in Medien mit hohem Brechungsindex arbeiten,

Werte bis 1.4 erreichen. Nachdem nun das Intensitätsprofil des fokussierten Lichtstrahls beschrieben werden kann, stellt sich die Frage der optischen Auflösung. Wie nah können zwei Objekte beieinander sein und trotzdem noch durch ein, mit Linsen arbeitendes, optisches System aufgelöst werden?

Hierzu wird das Rayleigh-Kriterium herangezogen, das besagt, dass zwei Objekte dann aufgelöst werden können, wenn ihr Abstand mindestens dem in Gleichung 2.1 gegebenen entspricht. Nimmt man eine heute erreichbare *Numerische Apertur* von 1.4 an, so kann Gleichung 2.1 auf $\Delta x = \lambda/2$ vereinfacht werden. Die maximal erreichbare Auflösung entspricht also in etwa der Hälfte der verwendeten Wellenlänge und liegt für sichtbares Licht bei 200-300 nm.

Diese Beschränkung war schon lange bekannt und führte dazu, dass nach alternativen Wegen zum Erreichen einer höheren Auflösung gesucht wurde. Bereits in den 20er Jahren des 20. Jahrhunderts schlug E.H. Syng [2] einen neuen Typ von optischen Mikroskopen vor, um die Beugungsgrenze zu umgehen. Diese visionäre Veröffentlichung bildet die Grundlage aller modernen SNOMs. Obwohl technisch damals noch nicht realisierbar, war seine Idee erstaunlich einfach.

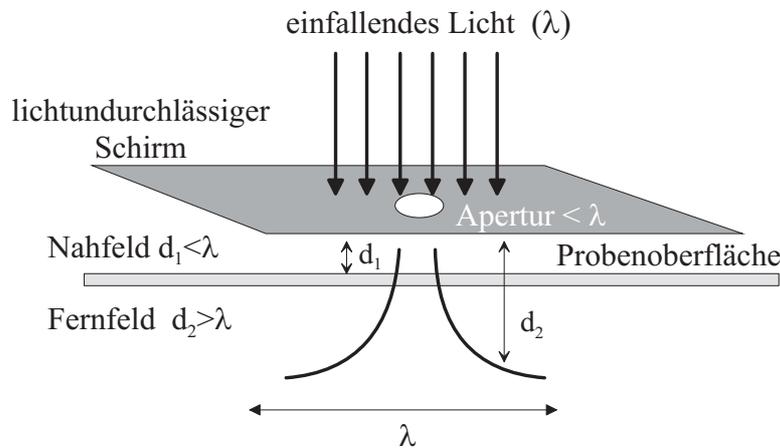


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung von Synges Idee.

Eine Auflösung unterhalb der Beugungsgrenze lässt sich folgendermassen erreichen: Einfallendes Licht fällt durch ein kleines Loch in einem undurchsichtigen Schirm. Der Durchmesser des Lochs ist kleiner als die Wellenlänge des Lichts. Platziert man den Schirm sehr nah über einer Probe, so ist das Licht gezwungen mit der Probe zu wechselwirken, bevor es gebeugt wird.

Synge schlug vor, ein Loch mit einem Durchmesser kleiner als die verwendete Wellenlänge in einem lichtundurchlässigen Schirm als Mikroskopapertur zu verwenden. Wenn man nun die Rückseite dieses Schirmes mit einer starken Lichtquelle beleuchtete, so würde das durch das Loch hindurchtretende Licht von den Dimensionen des Lochs begrenzt werden. Brächte man nun diesen Schirm in die unmittelbare Nähe einer Probe, so könnte das aus der Apertur tretende Licht ein Objekt abbilden, bevor es gebeugt und damit die Auflösung verschlechtert würde. Der schematische Aufbau dieser Idee ist in Abb.2.1 gezeigt. Die Umsetzung scheiterte jedoch damals an den technischen Anforderungen. Die Aperturherstellung, eine geeignete Beleuchtungsquelle, sowie die Proben-Handhabung und Abstandsregelung waren wohlbekannt, aber zu dieser Zeit unlösbare Probleme. Erst durch die Entwicklung des Rastertunnelmikroskops [1] (im Jahre 1981) stand die für die Abstandsregelung der Apertur in einem Bereich von wenigen Nanometern über der Probe erforderliche Technik in Form piezoelektrischer Translatoren zur Verfügung. Diese ermöglichte 1984 die ersten Nahfeldmessungen im sichtbaren Wellenlängenbereich durch Pohl et al. [4] und Lewis [5].

Obwohl sie immer noch nicht vollständig zur Routine geworden sind, werden hochauflösende optische Messungen mit dem SNOM inzwischen bei vielen Fragestellungen von der Festkörperphysik bis zur Biologie eingesetzt.

2.1.1 Das Prinzip

Mit einem optischen Nahfeldmikroskop ist man in der Lage, eine räumlich höhere optische Auflösung zu erreichen, als aufgrund der Abbe'schen Beugungsgrenze möglich ist. Zur Realisierung eines Apertur-SNOM greift man auf die Idee von Synge zurück und schickt Licht durch eine Apertur, deren Durchmesser sehr viel kleiner ist als die Wellenlänge λ der verwendeten Strahlung. Die hohe Auflösung des SNOM begründet sich vor allem in der grossen Lokalisierung des elektromagnetischen Feldes in der engsten Umgebung (Abstand bis zur Größenordnung von λ) der Apertur, dem sogenannten Nahfeld. Dort beobachtet man keine Beugungserscheinungen.

Mit zunehmendem Abstand von der Apertur erfolgt der Übergang ins Fernfeld, wobei die Beugung zunächst durch den Fresnel-Formalismus und dann durch die Fraunhofer-Näherung beschrieben wird [20].

Im Zusammenhang mit der Rastersondenmikroskopie wird allgemein vom Nahfeld einer Sonde und deren Wechselwirkung mit einer Probe gesprochen, ohne dass damit ein bestimmtes physikalisches Phänomen gemeint wäre. Die Begriffe des optischen Nah- und Fernfeldes stammen jedoch aus der klassischen Optik, wo sie das Beugungsverhalten einer

Blende und die Strahlungscharakteristik eines elektromagnetischen Dipols beschreiben. Um einer möglichen Verwechslung dieser Begriffe vorzubeugen, werden die klassischen Begriffe kurz erläutert.

Bei der Berechnung der Beugung einer Lichtwelle an einem Spalt oder einer Lochblende wird abhängig von dem Abstand von Beugungsquelle und Beobachter zwischen der Fresnel- und Fraunhofer-Beugung unterschieden [20]. Der Gültigkeitsbereich der Fresnelbeugung beginnt mit einem Abstand weniger Wellenlängen hinter der Lichtquelle. Mit zunehmender Entfernung vom beugenden Objekt erfolgt der Übergang in das Fernfeld. Dies ist der Gültigkeitsbereich der Fraunhofer-Näherung.

Fourieranalyse des optischen Nahfeldes

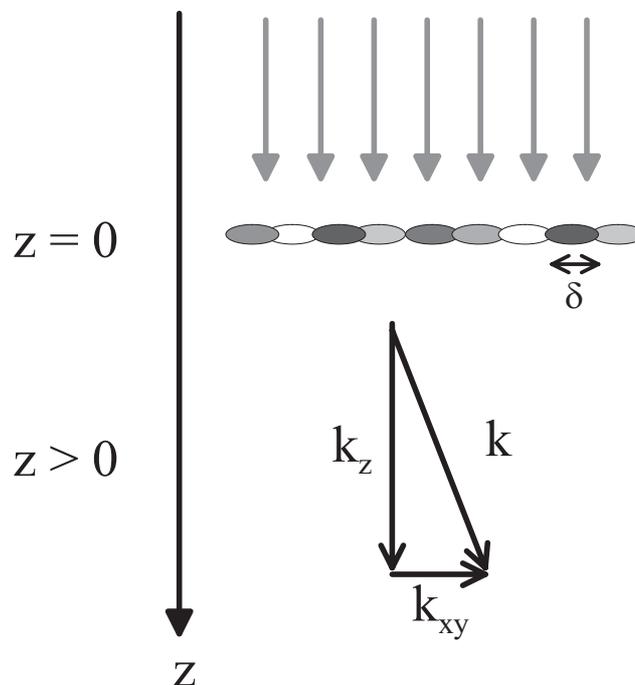


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Beleuchtung eines Objektes. Ein Objekt der Größe δ am Ort $z = 0$ wird aus dem Halbraum mit $z < 0$ beleuchtet. Ebenfalls dargestellt ist das Verhältnis der entsprechenden Wellenvektoren zueinander.

Liegt die Quelle eines monochromatischen elektromagnetischen Feldes in dem Halbraum mit $z < 0$ (Abb.2.2), so lässt sich dieses Feld für $z = 0$ beschreiben durch [21]:

$$\mathbf{E}(\mathbf{R}) = \frac{1}{2\pi} \iint \mathbf{F}(\mathbf{k}_{xy}, z=0) e^{i\mathbf{k}_{xy}\mathbf{r}} d\mathbf{k}_{xy} \quad (2.3)$$

mit $\mathbf{R} = (x, y, 0)$, $\mathbf{k}_{xy} = (\mathbf{k}_x, \mathbf{k}_y)$ und $\mathbf{r} = (x, y, 0)$. Das Feld besitzt ein zweidimensionales Fourierspektrum $\mathbf{F}(\mathbf{k}_{xy}, z)$ mit den realen Wellenvektoren \mathbf{k}_{xy} , die parallel zur Ebene $z = 0$ liegen. Das elektrische Feld $\mathbf{E}(\mathbf{R})$ für $z > 0$ muss die Helmholtz-Gleichung erfüllen:

$$(\nabla^2 + \mathbf{k}^2)\mathbf{E}(\mathbf{R}) = 0 \quad (2.4)$$

Hieraus ergibt sich mit $|\mathbf{k}| = 2\pi/\lambda$ eine lineare Differentialgleichung 2. Ordnung zur Entwicklung der Fourierkomponenten $\mathbf{F}(\mathbf{k}_{xy}, z)$:

$$\left(\frac{d^2}{dz^2} + \mathbf{k}^2\right)\mathbf{F}(\mathbf{k}_{xy}, z) = 0 \quad (2.5)$$

Für die z -Komponente des Wellenvektors \mathbf{k}_z gilt:

$$\mathbf{k}_z = \sqrt{\mathbf{k}^2 - \mathbf{k}_{xy}^2} \quad (2.6)$$

Bei einer Beleuchtung aus dem Halbraum $z < 0$ ergibt sich dann für das Feld im Bereich $z > 0$ folgende allgemeine Lösung [22]:

$$\mathbf{E}(\mathbf{R}) = \frac{1}{2\pi} \iint \mathbf{A}_1(\mathbf{k}_{xy}) e^{i\mathbf{k}_z z} e^{i\mathbf{k}_{xy}\mathbf{r}} d\mathbf{k}_{xy} \quad (2.7)$$

Diese Gleichung stellt ein Spektrum von ebenen Wellen der Form $\mathbf{A} e^{i\mathbf{k}\mathbf{r}}$ dar, mit der Amplitude $\mathbf{A}_1(\mathbf{k}_{xy})$ und den Wellenvektoren $\mathbf{k} = (\mathbf{k}_{xy}, \mathbf{k}_z)$. Mit Gleichung 2.3 für $z = 0$ ergibt sich am Ort $z = d$ des Detektors:

$$\mathbf{E}(x, y, d) = \frac{1}{2\pi} \iint \mathbf{F}(\mathbf{k}_{xy}, 0) e^{i(\mathbf{k}_{xy}\mathbf{r} + \mathbf{k}_z d)} d\mathbf{k}_{xy} \quad (2.8)$$

Die Struktur- und Größeninformationen über ein Objekt, welches sich in der Ebene $z = 0$ befindet, sind in den Wellenvektoren \mathbf{k}_{xy} enthalten. Hierbei korreliert ein großer Wert von $|\mathbf{k}| = 2\pi/\delta$ mit einer kleinen Objektgröße δ und umgekehrt [23].

Es lassen sich nun zwei Fälle unterscheiden:

(a) \mathbf{k}_z ist reell. Dieses ist gleichbedeutend mit $|\mathbf{k}| > |\mathbf{k}_{xy}|$. Hieraus folgt $2\pi/\lambda > 2\pi/\delta$ bzw. $\delta > \lambda$. Daher können die Fourierkomponenten nur Strukturinformationen in der Feldverteilung enthalten, die größer sind als die Wellenlänge λ . Es liegt eine propagierende Welle vor, die sich in Richtung \mathbf{k} ausbreitet.

(b) Anders sieht die Situation aus, wenn \mathbf{k}_z imaginär ist. Dieses hat zur Folge, dass die

Amplitude des elektromagnetischen Feldes exponentiell in Richtung z abnimmt. Dies ist der sogenannte evaneszente (verschwindende) Anteil des Feldes, der exponentiell mit der Entfernung vom Objekt abnimmt. Für die Wellenvektoren gilt $|\mathbf{k}| < |\mathbf{k}_{xy}|$. Hieraus folgt $2\pi/\lambda < 2\pi/\delta$ bzw. $\delta < \lambda$. Damit können Strukturinformationen über Objekte bei $z = 0$ detektiert werden, die kleiner als λ sind. Aufgrund der exponentiellen Abnahme lassen sich diese jedoch nur in unmittelbarer Nähe des Objektes bestimmen.

Es ist also möglich durch Untersuchung des evaneszenten elektromagnetischen Feldes Strukturen abzubilden, die kleiner als die verwendete Wellenlänge sind. Die Nahfeldsonde erzeugt in diesem Fall durch die Wechselwirkung mit dem lokalen evaneszenten Feld eine propagierende Welle, deren Amplitude derjenigen des evaneszenten Feldes entspricht.

Theorie der Abbildung im Nahfeld

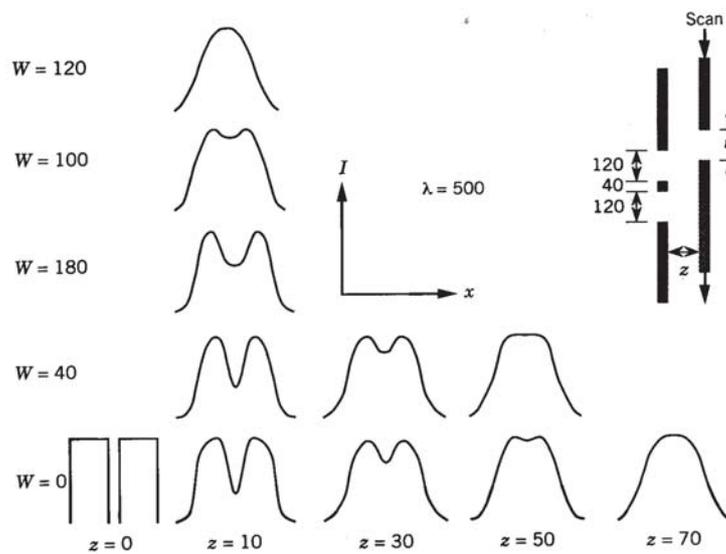


Abbildung 2.3: Intensitätsverteilung

Berechnete Intensitätsverteilung $I(x)$ für ein Objekt in einem Nahfeldinstrument, bestehend aus einem Objekt (Doppelspalt) und einer Nahfeldsonde (Blende) nach [24]. Die Nahfeldsonde mit einer Aperturgröße W wird im Abstand z vom Doppelspalt gerastert. Alle Abmessungen in Nanometer.

Um die Intensitätsverteilung von realen Objekten in einem Nahfeldmikroskop qualitativ abschätzen zu können, kann man folgendes einfaches zweidimensionales Modell

betrachten. Ein Doppelspalt stellt das zu untersuchende Objekt dar. Dieser wird homogen mit monochromatischem Licht von der Rückseite beleuchtet. Als Nahfeldsonde dient eine kreisförmige Blende, deren Durchmesser kleiner als die Wellenlänge des verwendeten Lichtes ist. Diese Blende kann lateral vor der Probe bewegt werden, was dem Rastervorgang eines Nahfeldmikroskops entspricht. Hinter der Blende befindet sich der Detektor. Um die Intensitätsverteilung am Detektor zu erhalten, wird das elektromagnetische Feld am Detektor in Fourierkomponenten am Doppelspalt und der Blende entwickelt. Details der Rechnung sind in [25, 26] wiedergegeben. Auf diese Weise erhält man die in Abb. 2.3 gezeigte Intensitätsverteilung.

Das Objekt wird nur für den Fall exakt, d.h. ohne Ausschmieren der Ränder, abgebildet, dass der Abstand zwischen Blende und Doppelspalt gleich Null ist und der Durchmesser der Blende gegen Null geht. Die Abbildung des Objektes wird mit zunehmendem Blendendurchmesser und zunehmenden Abstand zwischen Blende und Objekt immer unschärfer. Dies sind auch für die reale Nahfeldmikroskopie die entscheidenden Faktoren, die die erreichbare Auflösung beeinflussen. Die Blende bzw. die Nahfeldsonde bewirkt eine Umwandlung der evaneszenten Feldanteile in propagierende Wellen, die im Fernfeld vom Detektor registriert werden können [25, 26].

Das optische Nahfeld

Das Nahfeld tritt nicht nur bei Aperturen mit einem kleinerem Durchmesser als der Wellenlänge des Lichts auf, sondern auch bei anderen Strukturen, wie z.B. einem oszillierenden Dipol.

Die Berechnung der Feldverteilung in der Nähe einer Apertursonde kann über Modellnäherungen erfolgen. Erste brauchbare, auf eine Nahfeldsonde übertragbare, Berechnungen stammen von Bethe [27] und wurden durch Bouwkamp [28] verfeinert. Vereinfachend wurde die Transmission einer senkrecht einfallenden ebenen Welle durch eine kreisrunde Apertur berechnet, die sich in einem perfekt leitenden Metallschirm verschwindender Dicke befindet. Von derselben idealen Apertur ausgehend berechnet Betzig das Profil des Nahfeldes [29].

Die von Betzig berechneten Profile sind in Abb. 2.4 dargestellt. Die Halbwertsbreiten der Feldprofile wurden für drei Aperturgrößen ($w=200, 100$ und 50 nm) berechnet. Die Daten zeigen, dass die räumliche Verteilung des Nahfeldes direkt hinter der Apertur eine starke Abhängigkeit vom Abstand zur Apertur zeigt. Obwohl die hier gezeigten Daten für ein ideales System berechnet wurden, dass in vieler Hinsicht von einem rea-

len SNOM-Aufbau abweicht, unterstreichen sie die Notwendigkeit, die Nahfeldsonde in unmittelbare Nähe zur Probe zu bringen.

Die Berechnung des Feldes einer realen Apertur ist nur noch numerisch möglich. Um zu aussagekräftigen Ergebnissen zu kommen, ist es entscheidend, dass die Wechselwirkungen mit der Probe berücksichtigt werden. Verwendete Simulationen sind z.B. die Multiple-Multipol-Methode (MMP) oder die Finite-Differenzen-Zeit-Domänen-Methode [24].

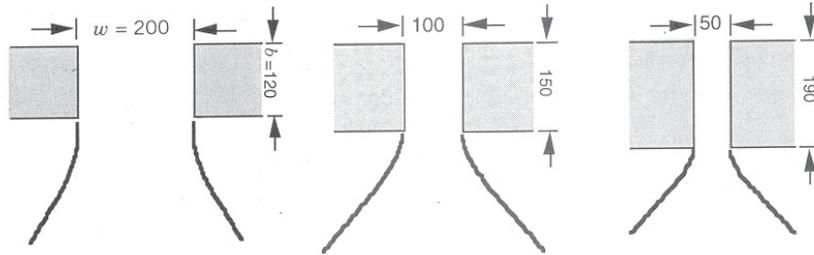


Abbildung 2.4: Schematische Feldverteilung hinter einer idealen Apertur in einem perfekt leitenden endlichen dicken Schirm, nach [24, 29].

Eine ebene Welle beleuchtet die Apertur von oben und tritt unten aus der Apertur wieder aus. Gezeigt wird die Halbwertsbreite der Feldverteilung für jeweils drei unterschiedliche Aperturdurchmesser (w) und Schirmdicken (b). Alle Abmessungen in Nanometer.

2.1.2 Konfigurationen

Die Anzahl der möglichen SNOM-Konfigurationen scheint nur durch die Phantasie der Entwickler der Nahfeldmikroskope begrenzt zu sein. Dieses Kapitel gibt einen Überblick über die derzeit verwendeten SNOM-Konfigurationen und Sondentypen.

Abbildung 2.5 zeigt sechs der gebräuchlichsten, auf Glasfasern als Nahfeldsonde basierenden Betriebsmodi. Bei den Konfigurationen (a)-(e) handelt es sich um Apertursonden. Bei (f) wird eine unbedampfte Glasfaser verwendet. Wird das SNOM im Sammelmodus (a) betrieben, so wird die Probe aus dem Fernfeld beleuchtet und damit einer relativ großen Lichtintensität ausgesetzt. Besser geeignet für Fluoreszenzmessungen ist daher der weit verbreitete Beleuchtungsmodus (b), bei dem die Probe mit einer Apertursonde beleuchtet und das Licht nach Wechselwirkung mit der Probe im Fernfeld detektiert wird. Dies verhindert das vorzeitige Ausbleichen der Farbstoffe. Da im Rah-

men dieser Arbeit Fluoreszenzmessungen an Biomolekülen durchgeführt wurden, wurde diese Konfiguration des SNOM gewählt.

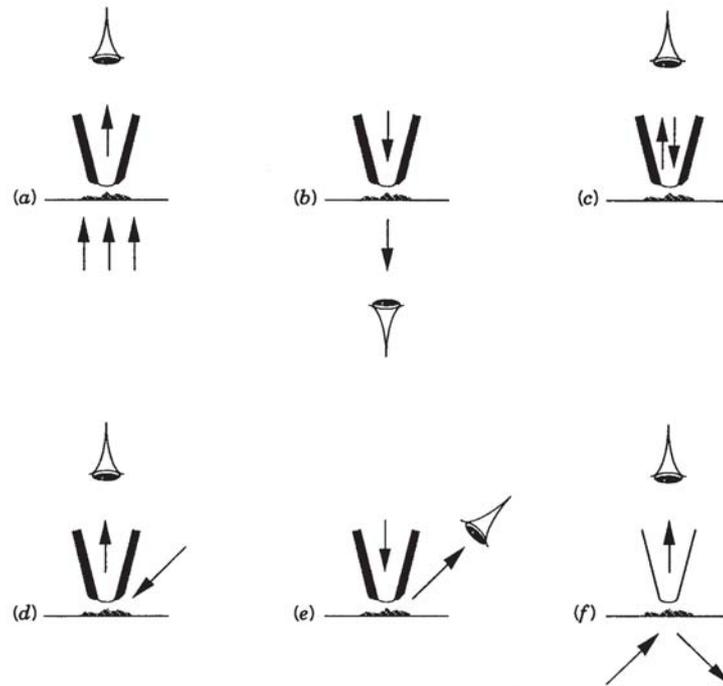


Abbildung 2.5: Gebräuchlichste Konfigurationen des SNOM nach [24].

- (a) *Beleuchtung aus dem Fernfeld, Detektion mit der Nahfeldsonde in Transmission.*
- (b) *Beleuchtung mit der Nahfeldsonde, Detektion im Fernfeld in Transmission.*
- (c) *Beleuchtung und Detektion mit der Nahfeldsonde in Reflexion.*
- (d) *Beleuchtung aus dem Fernfeld, Detektion mit der Nahfeldsonde in Reflexion.*
- (e) *Beleuchtung mit der Nahfeldsonde, Detektion im Fernfeld in Reflexion.*
- (f) *Beleuchtung der Probe von unten aus dem Fernfeld unter einem Winkel, der zur Totalreflexion führt, Detektion mit der nicht metallisierten Nahfeldsonde.*

Bei Messungen an nicht transparenten Proben, wie z.B. Halbleitern, muss oft eine Konfiguration gewählt werden, die in Reflexion arbeitet (c-e). Diese Konfigurationen

sind apparativ aufwändiger, wenn ein Großteil des reflektierten Lichtes detektiert werden soll. Wird die Nahfeldsonde sowohl für die Beleuchtung, als auch für die Detektion verwendet, kann auf einen Teil der Optik in der Nähe der Probe verzichtet werden. Dadurch wird der Bau von kompakteren Rastereinheiten möglich. Das Licht muss aber hierbei die Spitze zweimal passieren und die Lichtausbeuten sind aufgrund der kleinen Transmission der Spitze sehr gering. Bei der Konfiguration mit der unbedampften Glasfaser (f) wird die Probe von unten unter einem stumpfen Winkel bestrahlt, so dass Totalreflexion auftritt. Die Grenz- und Stetigkeitsbedingungen der Maxwell-Theorie verlangen einerseits, dass sich die Strahlung in die Probe hinein ausbreitet. Andererseits darf diese jedoch keine Energie transportieren, da das Licht total reflektiert wird. Es bildet sich ein *evaneszentes* Feld. Durch die Wechselwirkung mit der Nahfeldsonde wird die evaneszente in propagierende Strahlung umgewandelt und kann damit im Fernfeld detektiert werden. Mit diesem Aufbau können besonders gut lichtführende Strukturen, z.B. Wellenleiter, untersucht werden. Auf eine externe Beleuchtung kann verzichtet und der interne Lichtfluss in den Strukturen abgebildet werden [30].

Apertursonden

Die meisten Apertursonden werden aus einem spitzen transparenten Dielektrikum, z.B. einer angespitzten Glasfaser hergestellt. Diese wird so mit einem Metall beschichtet, dass nur an der Spitze eine kleine Öffnung -die Apertur- bleibt. Die Auflösung einer Apertursonde ist für kleine Abstände zur Probe durch den Aperturdurchmesser gegeben. Bei Fluoreszenzmessungen kann eine Auflösung von 50-100 nm realisiert werden. Da die Intensität des evaneszenten Feldes [27] mit der sechsten Potenz des Aperturradius abnimmt, gibt es eine intensitätsabhängige untere Grenze für den Aperturdurchmesser und damit für die mit Apertursonden erreichbare Auflösung. Die Lichtausbreitung in einem metallischen Wellenleiter ist unterhalb eines gewissen Durchmessers (ca. $\lambda/2n$, mit n =Brechungsindex des lichtleitenden Mediums) nicht mehr erlaubt (Cut-off). Im vordersten Spitzenbereich fällt daher die Intensität exponentiell ab. Für eine hohe Transmission sollte dieser Bereich möglichst kurz sein, die Spitze sollte also einen großen Öffnungswinkel besitzen. Die Transmission einer typischen 100 nm Spitze liegt bei 10^{-3} bis 10^{-6} . Eine geringe Transmission kann nicht durch Erhöhen der eingekoppelten Lichtintensität kompensiert werden, da ab einigen mW die Gefahr der Sondenzerstörung (und Schädigung der Probe) durch die Wärmeentwicklung in der Sonde besteht.

Apertur-Cantilever

Modifizierte Cantilever aus der Kraftmikroskopie werden ebenfalls in einigen SNOM-Konfigurationen eingesetzt [31]. Vorteilhaft ist, dass sich durch Photolithographie, Ätz- und Depositionsschritte eine grosse Stückzahl von Cantilevern mit Apertur gleichzeitig mikrofabrizieren lässt. Dabei werden z.B. Siliziumnitrid-Cantilever mit einer Metallummantelten Apertur an der Spitze versehen. Der Einsatz von Siliziumnitrid als Ausgangsmaterial ermöglicht aufgrund des höheren Brechungsindex ($n = 2.35$ bei $\lambda = 633 \text{ nm}$) eine höhere Intensität an der Spitze im Vergleich zu Glasfasern [32]. Das Licht wird entweder von oben auf die Apertur fokussiert, oder durch eine Wellenleiterstruktur zur Spitze transportiert. Es gibt eine Reihe von technischen Realisierungsmöglichkeiten, ein umfassender Überblick ist in Referenz [33] gegeben.

Streusonde

Eine solche untere Grenze der Auflösung existiert nicht für aperturlose Sonden. Realisiert werden können diese Sonden durch Ausnutzung der Streuung an der Sonde. Das gestreute Licht wechselwirkt mit der Probenoberfläche und wird im Fernfeld detektiert. Die Hauptprobleme bei dieser Konfiguration sind zum einen die geringen Intensitäten, da die Streuintensität nach Rayleigh proportional zur vierten Potenz des Teilchenvolumens ist, und zum anderen die Separation des Nahfeldanteils vom ebenfalls gestreuten Hintergrundlicht.

Bei der von Zenhäusern et al. [34, 35] verwendeten Methode wird daher interferometrisch die Phasenverschiebung detektiert, welche das an einer Cantileverspitze gestreute Licht nach Transmission durch eine Probe erfährt. Die Spitze besteht aus einem Dielektrikum oder aus Metall. Wird die Polarisation parallel zur Spitzenachse gewählt, so kommt es zu einer Feldüberhöhung an der Spitze [36]. Bringt man die Streusonde in die Nähe eines flachen Objektes, so wechselwirkt die durch das optische Feld verursachte Ladungsverteilung in der Spitze mit ihrem Spiegelbild im Objekt, das wiederum von der dielektrischen Funktion $\epsilon(\omega)$ der Probe abhängt. Dies bewirkt eine starke Abhängigkeit des an dem System Spitze-Probe gestreuten Laserlichts von $\epsilon(\omega)$ und vom Spitzen-Proben Abstand. Mit diesem Sondentyp kann eine laterale optische Auflösung, abhängig vom Krümmungsradius der Spitze, von typischerweise 10-20 nm erreicht werden. Sie liegt also deutlich höher als die mit einem Apertur-SNOM erreichbaren Auflösung von ca. 50 nm.

Der Einsatz dieser Art von Sonden für die Fluoreszenzmikroskopie ist durch die Feldüberhöhung an der Spitze, die einer Fokussierung entspricht, zwar möglich, jedoch verursacht die Beleuchtung eines grossen Probenareals Probleme. Die Farbstoffmoleküle in

der Umgebung werden zu stark gebleicht und erzeugen zudem einen hohen Hintergrund. Daher war die die Abbildung einzelner Farbstoffmoleküle mit einer Streusonde bisher nur mit schlechteren Auflösungen als mit einer Apertursonde möglich.

2.1.3 Abstandsregelung

Bereits Synge [2] stellte fest, dass sich die Sub-Wellenlängen Apertur in unmittelbarer Nähe zur untersuchten Probe befinden muss. Nachfolgende theoretische Studien des elektromagnetischen Nahfeldes einer Apertur zeigen, dass es mit zunehmender Entfernung von der Apertur stark divergiert [27, 29].

Daher musste ein Rückkopplungsmechanismus (engl. feedback) entwickelt werden, der für einen konstanten Abstand der Sonde zur Probe während des Rastervorganges sorgt. Experimentell wurde dies auf unterschiedliche Weise realisiert. Basierend auf dem Rastertunnelmikroskop benutzen manche eine Elektronen-Tunnelstrom Rückkopplung [37, 38]. Nachteilig hierbei ist, dass man auf leitfähige Proben beschränkt und diese Methode daher für biologische Anwendungen ungeeignet ist.

In der PSTM (photon scanning tunneling microscopy)- Konfiguration benutzt man zur Abstandsregelung die exponentiell vom Abstand abhängige Intensität bei der frustrierten Totalreflexion [39, 40, 41, 42]. Die Nahfeldsonde wird dabei so über die Probe geführt, dass die detektierte Intensität konstant bleibt.

Ein weiterer Ansatz für die Abstandsregelung ist die Nutzung von AFM Cantilevern [7, 8, 31, 43]. Hierbei ist die Abstandsregelung auch bei nichtleitenden Proben und sogar in Flüssigkeit möglich. Diese Methode konnte sich lange Zeit nicht durchsetzen, da die Nahfeldsonden nicht reproduzierbar hergestellt werden konnten. Inzwischen gibt es aber sogar kommerzielle Instrumente (z.B. von der Firma WiTec), die qualitativ gute Apertur-Cantilever benutzen. Alternativ werden gebogene Glasfaserspitzen als Cantilever ähnlich dem dynamischen AFM-Modus eingesetzt [44]. Die gebogene Spitze schwingt mit einer Frequenz von 10 bis 40 kHz und einer Amplitude von 20 bis 80 nm vertikal zur Probe. Der Abstand wird durch die Schwingungsdämpfung beim Annähern an die Probe geregelt.

Die am weitesten verbreitete Methode zur Abstandsregelung in der optischen Nahfeldmikroskopie ist die Scherkraftregelung (engl. shear-force). Eine Glasfaserspitze schwingt mit einer Amplitude von einigen nm lateral zur Probenoberfläche. Bei Annäherung der Sonde an die Probe tritt eine Schwingungsdämpfung ein, die eine Regelung auf einen konstanten Abstand während des Rastervorganges erlaubt. Die Popularität dieser Methode erklärt sich zum einen daraus, dass man modifizierte Glasfasern als Sonden ver-

wenden kann, die im Vergleich zu anderen Methoden immer noch am effektivsten Licht im Nahfeld emittieren oder detektieren. Zum anderen ermöglicht die Scherkraftmessung eine vom optischen Nahfeld unabhängige Abstandsregelung auf allen Arten von Oberflächen und ist, unter gewissen Voraussetzungen, wie bei AFM-Messungen in Flüssigkeit möglich [45, 46].

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Scherkraft-Abstandsregelung zu realisieren. Experimentell entwickelt wurde sie gleichzeitig von Betzig und Toledo-Crow [9, 47]. Die Anregung der lateralen Schwingung der Glasfaser Spitze erfolgt mit einem piezoelektrischen Element. Zur Detektion der Schwingungsamplitude wurde bei Betzig das aus der Spitze emittierte Licht verwendet bzw. bei Toledo-Crow ein interferometrisches Verfahren eingesetzt. Die Bestimmung der Schwingungsamplitude durch optische Messmethoden weist aber erhebliche Nachteile auf.

Wegen des hohen Justieraufwandes und unerwünschten Streulichtes sind Methoden entwickelt worden, die ohne die optische Detektion der Schwingungsamplitude auskommen. Dabei wird eine Glasfasersonde so auf die Seite einer Quarzgabel aufgeklebt, dass ihr Ende weniger als 1 mm übersteht [48, 49]. Die Eigenfrequenz dieses gekoppelten Systems ist leicht gegenüber dem der Quarzgabel verschoben. Die Quarzgabel wird entweder mechanisch durch einen Piezo oder direkt elektrisch zur Resonanz angeregt. Bei einer Krafteinwirkung der Probe auf die Sondenspitze ändern sich Phase und Amplitude des Stroms durch die Quarzgabel. Alternativ kann das System durch eine Rückkopplung so angeregt werden, dass es immer in der Resonanzfrequenz schwingt. Dann verursacht eine Krafteinwirkung auf die Spitze eine Änderung der Resonanzfrequenz.

Die physikalischen Effekte, die die Dämpfung der Schwingung beim Annähern der Sonde an die Probenoberfläche verursachen, sind bis heute noch nicht endgültig geklärt. Als mögliche Ursachen bei Messungen an Luft werden direkte mechanische Kontakte [50] mit dabei auftretender elastischer Verformung angenommen. Dies ist aber nur bei großen Schwingungsamplituden entscheidend und erklärt nicht die Scherkräfte bei sehr kleinen Amplituden (einige pm), wie sie von Grober und Karrai [51, 52] gemessen wurden. Eine andere mögliche Ursache sind Reibungs- bzw. Kapillarkräfte [53] beim Eintauchen der Spitze in einen auf der Probe vorhandenen Flüssigkeitsfilm. Allerdings treten auch Scherkräfte im Vakuum [51] und bei sehr tiefen Temperaturen (1.8 K) auf.

2.1.4 Auflösungskriterien

Ein entscheidender Vorteil eines optischen Nahfeldmikroskops gegenüber einem konventionellen optischen Fernfeldmikroskop ist die Erhöhung der lateralen Auflösung. Diese

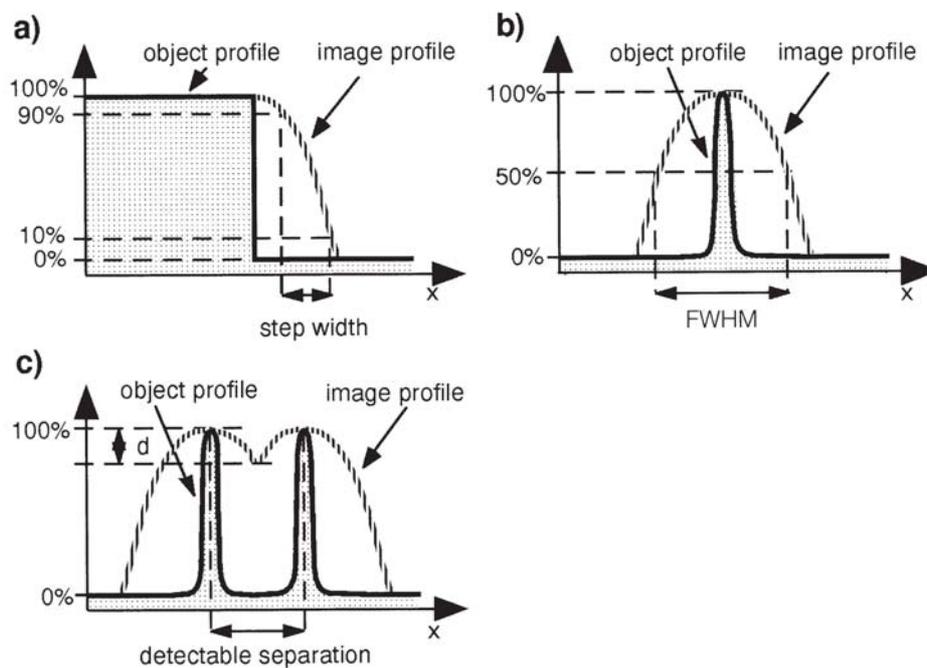


Abbildung 2.6: Definition der Auflösung für verschiedene Fälle [54].

a) 10 % zu 90 %-Kriterium für eine Kante, b) für ein einzelnes Objekt (FWHM: full width at half maximum (Halbwertsbreite)), c) für zwei trennbare Objekte (beim Rayleigh-Kriterium ist $d= 19\%$).

ist daher der meistdiskutierte Parameter bei der Beurteilung von nahfeldoptischen Bildern. Hinzu kommt, dass mit dem optischen Bild bei den meisten Proben gleichzeitig die Topographie mitgemessen werden kann. Die Möglichkeit der Korrelation dieser voneinander unabhängigen Signale fehlt bei der konventionellen Fernfeldmikroskopie. In diesem Kapitel werden verschiedene Auflösungskriterien vorgestellt, die zur Auswertung der gemessenen Bilder in Kap.7 verwendet werden.

Die in Kap.2.1 vorgestellte Definition der Auflösung in der Fernfeldmikroskopie über das Rayleigh-Kriterium lässt sich in dieser Form nicht auf die optische Nahfeldmikroskopie übertragen. Der Unterschied, der letztendlich auch das grössere Auflösungsvermögen ausmacht, besteht darin, dass beim SNOM die Beugung keinen auflösungsbestimmenden Einfluss mehr hat. Die im Fernfeld detektierte Intensitätsinformation wird nur durch die Wechselwirkung des Sonden-Nahfelds mit der Probe erzeugt.

Prinzipiell ist wegen des seriellen Aufzeichnungsverfahrens in der Rastersondenmikro-

skopie, bei dem die Information für jeden Punkt der Probe einzeln ausgelesen wird, die Auflösung durch die Pixeldichte des entstandenen Bildes eingeschränkt. Eine allgemeingültige Auflösung kann aber bei der Rastersondenmikroskopie nicht angegeben werden, da bei Messungen kleiner Bereiche die Auflösungsgrenze durch die Sondenform und die Art der Wechselwirkung festgelegt wird. In der optischen Nahfeldmikroskopie ist generell zu bedenken, dass es zu einer Wechselwirkung zwischen Nahfeldsonde und Probe kommen kann. Wie beim Rasterkraftmikroskop findet bei der Abbildung eine Faltung der Spitze mit der Probe, bzw. der räumlichen Struktur des Nahfeldes der Apertur mit den optischen Eigenschaften der Probe statt. Dies muss bei der Interpretation der Aufnahmen berücksichtigt werden. Ist in einem Bild eine Struktur erkennbar, deren räumliche Dimension die Beugungsgrenze unterschreitet, so ist nur dann von hoher Auflösung zu sprechen, wenn sie einer bekannten Probenstruktur zugeordnet werden kann. Der entscheidende Parameter für die Auflösung eines Apertur-SNOM ist die Aperturgröße, d.h. die Auflösung kann immer nur für eine konkrete Sonde bestimmt werden. Für eine selbstleuchtende, d.h. fluoreszierende Probe ist es jedoch möglich, die Auflösung noch weiter zu steigern. Das von Betzig [55] vorgestellte Modell beruht darauf, dass die Punktverteilungsfunktion (engl. point spread function) eines einzelnen fluoreszierenden Moleküls bestimmt werden kann. Dies ist die Antwort eines Mikroskops auf eine Punktlichtquelle. Die Lage des Zentrums dieser Funktion lässt sich mit weitaus höherer Genauigkeit bestimmen, als es die Trennung zweier solcher Strukturen nach dem Rayleigh-Kriterium zulassen würde.

Der in der Literatur am häufigsten gefundene Ansatz zur Bestimmung der Auflösung ist die Vermessung von Proben, deren interner Aufbau und optische Eigenschaften bekannt sind. Es wird dabei überprüft, ob die Größe einzelner Strukturen, deren Abstand oder deren räumliche Verteilung in der Nahfeldaufnahme korrekt wiedergegeben werden.

Oft findet man in der Literatur Angaben zur erreichten Auflösung, die sich aus der Kantenschärfe (Abb.2.6a) ergibt. Die Vermessung der Kantenschärfe erfolgt üblicherweise zwischen dem 10 %- und dem 90 %-Abfallpunkt. Dieses Verfahren ist jedoch nur dann zulässig, wenn es sich um eine extrem scharfe Kante mit verschiedenen optischen Eigenschaften auf beiden Seiten handelt. Es kann ausserdem nicht auf andere Strukturen der Probe und auf die Trennbarkeit zweier gleichartiger Punkte angewendet werden. Anwendung findet es bei vorher genau bekannten Teststrukturen, wie z.B. der Fischer-Probe [56], und wird daher in Kap.6.2 zur Bestimmung der optischen Auflösung verwendet.

Eine andere häufig verwendete Methode ist die Bestimmung der Halbwertsbreite (engl. FWHM: full width at half maximum) des Intensitätssignals einzelner Strukturen (z.B. eine Erhöhung oder Vertiefung, Abb.2.6b)). Die ermittelte Auflösung gilt auch hier nur

für diesen Fall und ist nicht auf andere Strukturen übertragbar.

Als dritte Möglichkeit zur Bestimmung der Auflösung einer SNOM-Aufnahme wird analog zum Rayleigh-Kriterium der kleinste auffindbare Abstand zweier gleichartiger Strukturen bestimmt (Abb.2.6c)). Hier genügt bereits ein kleines lokales Minimum zwischen zwei Maxima (bzw. ein lokales Maximum zwischen zwei Minima). Allerdings muss der physikalische Ursprung dieser Modulation bekannt sein, um z.B. die Einwirkung von Interferenzen aus dem Fernfeld auszuschliessen. Einschränkend wirkt auch in diesem Fall das Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Leider sind selten sowohl die Probe, als auch die Sonde so gut bekannt, dass solche Betrachtungen angestellt werden können. Auch bei derselben Testprobe kann dennoch die Verwendung verschiedener Sonden unterschiedlich hohe Auflösungen erzeugen, da es bei einer anderen Sonde zu unterschiedlichen Wechselwirkungen kommen kann.

Prinzipiell ist es wichtig auf ein ausreichend gutes Signal-zu Hintergrund-Verhältnis zu achten, da das Blinken einzelner Moleküle und das allgemeine Rauschen sonst zu einer Überschätzung der Auflösung führen kann.

Topographie-Artefakte

Auch der Abstand zwischen Nahfeldsonde und Probe hat einen wichtigen Einfluss auf die Auflösung und damit auf die Bildinformation. In vielen Veröffentlichungen konnte gezeigt werden, dass die Auflösung mit abnehmendem Abstand zunimmt. Der Abstand beeinflusst aber nicht nur die Auflösung, sondern kann sogar den Informationsgehalt der optischen Nahfeldaufnahme beeinflussen bzw. verfälschen.

Beim SNOM unterscheidet man zwei Betriebsmodi. Erstens den Modus *konstanter Kraft*, bei dem mittels Scherkraftregelung der Abstand zwischen Sonde und dem unmittelbar darunter liegenden Probenort konstant gehalten wird. Ändert sich die Topographie und damit der Abstand, so erfolgt eine über einen Regelkreis gesteuerte Stellbewegung der Sonde. Zweitens den Modus *konstanter Höhe*, bei dem keine vertikale Stellbewegung erfolgt und der Abstand sich entsprechend der Topographie ändert. Dieser Modus ist aber nur für sehr flache Proben bekannter Topographie geeignet und birgt immer das Risiko, die Sonde zu beschädigen.

Besonders empfindlich auf Topographieartefakte ist der Modus *konstanter Kraft*, im schlechtesten Fall repräsentiert die Nahfeldmessung lediglich das optische Auslesen der Spitzenbewegung. Ein deutlicher Hinweis hierfür ist eine hohe Korrelation zwischen Strukturen in der topographischen und optischen Abbildung. Der Einfluss des Artefakts hängt von der jeweiligen Probe und der gewählten experimentellen Konfiguration ab.

Beachtet man jedoch folgende Punkte bei Messungen mit konstanter Kraft, so können Artefakte ausgeschlossen werden [57]:

- Für das gesamte Bild sollten topographische und nahfeld-optische Strukturen unkorreliert sein. Insbesondere darf die optische Struktur, mit der die Auflösung bestimmt wird, keine Entsprechung im Topographiebild haben.
- Existieren korrespondierende Strukturen, müssen diese räumlich gegeneinander verschoben sein. Das deutet auf unterschiedliche Wechselwirkungen hin, da sie von verschiedenen Punkten der Sonde ausgehen.
- Artefakte können ebenfalls ausgeschlossen werden, wenn die optische und topographische Auflösung unterschiedlich hoch sind.

2.2 Fluoreszenz

Der Fluoreszenzkontrast in der Nahfeld-Optik beruht auf der Fähigkeit von Atomen und Molekülen, Licht einer bestimmten Wellenlänge oder eines Wellenlängenbereichs zu absorbieren und nach einer typischen Zeit von bis zu 10^{-8} s wieder in Form einer elektromagnetischen Strahlung mit niedrigerer Energie (Stokes-Verschiebung) bzw. höherer Wellenlänge in alle Raumrichtungen abzustrahlen. Die fehlende Energie wird als thermische Energie dissipiert. Bei einer vollständigen Umwandlung in thermische Energie spricht man von Fluoreszenzlöschung (engl. quenching). Durch Reaktion eines Farbstoffmoleküls mit einem Sauerstoffradikal oder Ionisierung durch weitere Absorptionen kann der elektronische Zustand der Moleküle so stark verändert werden, dass eine Abstrahlung bzw. auch weitere Absorption im optischen Bereich nicht mehr möglich ist. Diese Zerstörung des Farbstoffs wird als Ausbleichen (engl. bleaching) bezeichnet.

Grundlage der Fluoreszenzmikroskopie ist die Wechselwirkung elektromagnetischer Strahlung mit Materie. Absorbiert ein Molekül elektromagnetische Strahlung, führt das zur Anregung von Übergängen zwischen den elektronischen Energieniveaus des Moleküls. Die einfallende Strahlung hebt ein Elektron aus einem energetisch niedrigen in ein energetisch höheres Orbital, was zu einem angeregten, energiereicheren Zustand des Moleküls führt.

Der Vorgang der Fluoreszenz lässt sich schematisch im Jablonski-Diagramm darstellen (Abb.2.7). Meist ist der Grundzustand der Moleküle ein Singulettzustand (antiparallele Spinanordnung) und wird mit S_0 bezeichnet. Bei Triplettzuständen (T) koppeln die

(parallelen) Elektronenspins zu einem Gesamtspin von eins. Aus dem angeregten Zustand relaxieren große Moleküle strahlungslos und relativ schnell (innerhalb von ps) in den untersten angeregten Zustand S_1 .

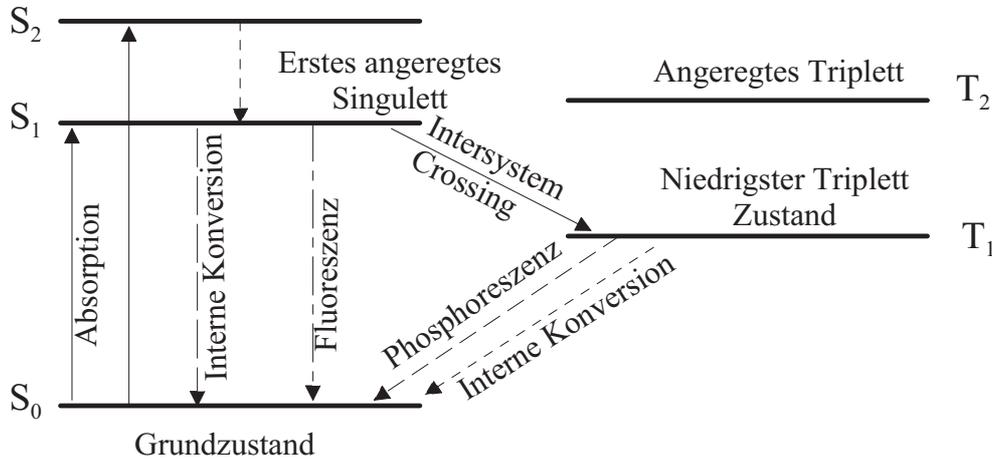


Abbildung 2.7: Illustration der Elektronenübergänge in Molekülen (Jablonski Diagramm).

Beim Übergang von S_1 (oder T_1) zu S_0 kann elektromagnetische Strahlung emittiert werden (Lumineszenz). Tritt dabei ein Wechsel zwischen Singulett- und Tripletzustand auf (Intersystemcrossing) ist der Übergang eigentlich spinverboten, deshalb langlebig ($10^{-6} s - 10^6 s$) was Phosphoreszenz genannt. Erfolgt der Übergang von einem angeregten Singulettzustand in den Singulettgrundzustand, so spricht man von Fluoreszenz.

In der konventionellen optischen Mikroskopie macht man sich die Fluoreszenz zum Markieren bestimmter Probenstrukturen zunutze. Dafür wurde eine Vielzahl von organischen Substanzen entwickelt, die die unterschiedlichsten Wellenlängen absorbieren und emittieren. Wird die Probe mit Licht einer bestimmten Wellenlänge beleuchtet und diese Wellenlänge mittels passender Filter vor dem Detektor aus dem Strahlengang entfernt, so sind nur die fluoreszent markierten Bereiche sichtbar. Dies ist besonders in der biologischen Forschung interessant, da spezielle Biomoleküle mit Fluoreszenzmarkern versehen werden und dann Bindungsstudien mit anderen (ebenfalls fluoreszenzmarkierten) Biomolekülen durchgeführt werden können.

Jedes fluoreszierende Molekül besitzt zwei charakteristische Spektren, das Absorptions- und das Emissionsspektrum. Diese Spektren lassen sich mit Hilfe von Fluoreszenzspektrometern an den in Lösung vorliegenden Farbstoffen messen.

Absorptionsspektrum: Die Intensität eines Lichtstrahls wird bei Durchtritt durch

eine Farbstofflösung in Abhängigkeit von der Wellenlänge geschwächt. Das Licht wird teilweise absorbiert. Das Ausmaß der Intensitätsabnahme hängt von der Konzentration c des Farbstoffs, der Weglänge x des Lichtstrahls durch die Lösung und dem Extinktionskoeffizienten ε ab und wird durch das *Lambert-Beersche* Gesetz beschrieben [58]:

$$A_\lambda = -\log I/I_0 = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot x \quad (2.9)$$

Hierbei ist A_λ die Absorption bei der Wellenlänge λ , I_0 und I sind die Intensitäten des monochromatischen Lichtes vor und nach Durchtritt durch die Lösung. Der stoffspezifische Extinktionskoeffizient ε ist abhängig von der Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes. Das vollständige Absorptionsspektrum erhält man durch Messung der Absorption für verschiedene Wellenlängen.

Emissionsspektrum: Zur Bestimmung des Emissionsspektrums wird der Farbstoff im Absorptionsmaximum angeregt. Ein Detektor analysiert in Abhängigkeit von der Wellenlänge die Intensität des Fluoreszenzlichtes. Diese ist unter anderem von der Temperatur, Art des Lösungsmittels, pH-Wert und Strukturänderungen des fluoreszierenden Moleküls abhängig.

Neben dem Extinktionskoeffizienten und der Intensität des Anregungslichtes beeinflusst auch die *Quantenausbeute* (engl. quantum yield) die Fluoreszenzintensität. Unter der Quantenausbeute versteht man das Verhältnis zwischen Anzahl an emittierten und absorbierten Lichtquanten:

$$\Phi_F = \frac{\text{Zahl der emittierten Photonen}}{\text{Zahl der absorbierten Photonen}} \leq 1 \quad (2.10)$$

Quantenausbeuten werden vor allem von Energieverlusten durch Wärmestrahlung oder photochemischen Reaktionen beeinflusst. Demzufolge ist eine höhere Quantenausbeute mit einer größeren Fluoreszenzintensität verbunden.

2.3 Antikörper

Antikörper sind Proteine, sogenannte Immunglobuline (Ig), die bei Wirbeltieren eine entscheidende Rolle im Immunsystem spielen. Sie sind in der Lage, spezifisch eine sehr große Anzahl verschiedenster körperfremder Substanzen, sogenannte Antigene, zu erkennen. Die hier verwendeten Antikörper der IgG-Klasse sind symmetrisch, y-förmig gebaut und bestehen aus zwei leichten (Molmasse 25 kD), und zwei schweren (Molmasse 50 kD), durch Disulfidbrücken miteinander verbundenen Peptidketten (Abb.2.8). Sie werden abgekürzt als L (light)- und H (heavy)-Ketten bezeichnet. Die beiden Antigen-bindenden Stellen befinden sich an den Spitzen des “Ypsilons“ und werden

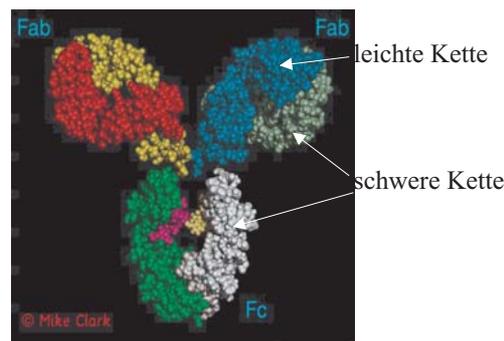


Abbildung 2.8: 3D-Struktur des Immunglobulin G.

F_{ab} : Antigen bindende Stellen. F_c : Bindungsstelle für die körpereigene Immunabwehr

als F_{ab} ($F = \text{Fragment}, ab = \text{Antigenbindung}$), die Bindungsstellen für die körpereigene Immunabwehr am unteren Ende als F_c bezeichnet. Insgesamt hat ein IgG-Molekül eine Molekularmasse von 150 kD und eine Größe von etwa 10 nm.

In dieser Arbeit sollen die IgGs fluoreszent bei einer Anregungswellenlänge von 532 nm detektiert werden. Daher müssen sie mit einem Farbstoff markiert werden, der bei dieser Wellenlänge angeregt wird. Die verwendeten Antikörper sind kommerziell erhältliche Ziege-Anti-Kaninchen IgGs (engl. goat anti-rabbit IgG antibodies), die bereits mit dem Farbstoff Alexa 532 markiert (kovalent verknüpft) sind. Jedes Proteinmolekül bindet maximal 6 Farbstoffmoleküle. Das Absorptions- und Fluoreszenzspektrum der mit Alexa 532 markierten Antikörper ist in Abb.2.9 gezeigt.

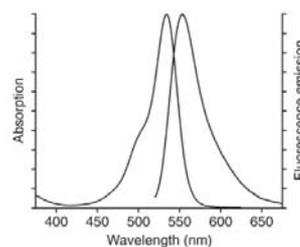


Abbildung 2.9: Absorptions- und Emissionsspektrum von Alexa 532, gebunden an IgG. (Quelle: www.probes.com)

2.4 DNA

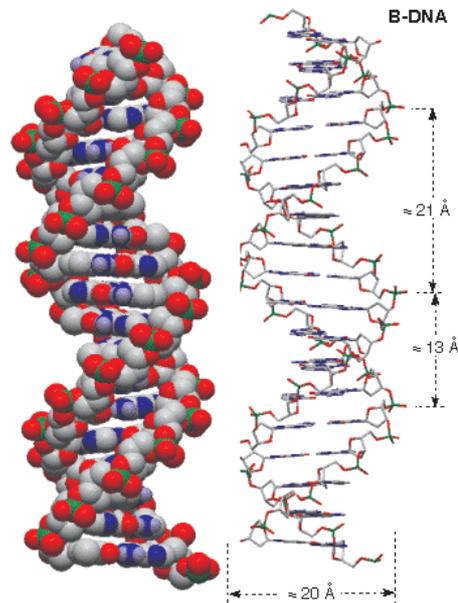


Abbildung 2.10: Kalotten- und Stabmodell der B-DNA.

Die nach innen gerichteten Basen bilden mit dem außen liegenden Zucker-Phosphatrückgrat das Polymermolekül. (Quelle: www.oci.unizh.ch/edu/lectures/material/AC_BII)

Die DNA (Deoxyribonucleic Acid) ist das bekannteste in der Natur vorkommende Polymermolekül. Sie ist der Träger der Erbinformation. Die Fähigkeit der Informationsspeicherung ist dabei in ihrer Basensequenz begründet.

Ein Nukleotid besteht aus einem Zucker, der 2-Desoxyribose, der am 5'-C-Atom mit Phosphat verestert ist, sowie einer am 1'-C-Atom angekoppelten Base. Zwei der Basen - Adenin und Guanin- sind Derivate des *Purins*, die beiden anderen - Cytosin und Thymin - leiten sich vom *Pyrimidin* ab. Der Einfachheit halber werden die Nukleotide nach ihren Basen benannt. Einzelsträngige ssDNA erhält man durch Veresterung der 3'-OH-Gruppe der Desoxyribose des einen Nukleotids mit der sauren Hydroxylgruppe der Phosphatgruppe eines anderen Nukleotids [59]. Ein Ende der Kette hat eine freie Hydroxylgruppe am 3'-Ende, das andere eine Phosphateinheit am 5'-Ende. Zwei antiparallel um eine gemeinsame Achse gewundene ssDNA-Stränge bilden die doppelsträngige dsDNA. Diese Doppelhelix wird durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen stabilisiert.

Die Basen der DNA sind in aperiodischer Folge angeordnet. Durch die Basensequenz der einen Kette wird jedoch die Sequenz der anderen Kette festgelegt. Dabei paart A ausschließlich mit T über zwei und G mit C über drei Wasserstoffbrückenbindungen. A und T, bzw. G und C sind komplementäre Basen, sie bilden *Basenpaare*.

Zwei komplementäre Polymerstränge winden sich um eine gemeinsame Achse und bilden dabei eine Doppelhelix mit konstanten geometrischen Abmessungen. Komplementär heißt, daß sich vier verschiedene Monomereinheiten, die Nukleotide mit den Basen (Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G) und Cytosin (C)), paarweise nur so anordnen, daß A mit T und G mit C paart. Bei der Zellteilung wird der Doppelstrang wieder in Einzelstränge getrennt, so daß den zwei Tochterzellen je eine exakte Einzelstrangkopie vorliegt. Durch Enzyme, sogenannte Polymerasen wird jeder Einzelstrang in einer Zelle wieder zu einem Doppelstrang vervollständigt. Abb.2.10 zeigt ein Kalotten- sowie Stabmodell der DNA, und in Abb.2.11 ist ein Ausschnitt aus der Strukturformel dargestellt.

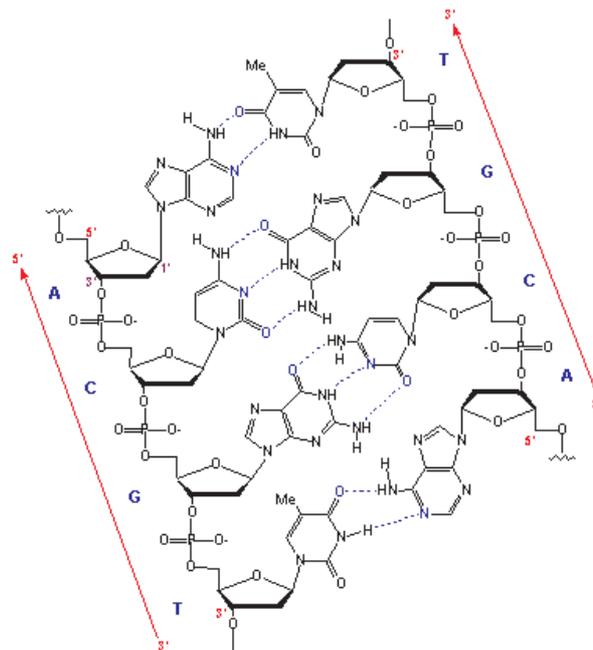


Abbildung 2.11: Ausschnitt aus der DNA-Strukturformel.

Zwei antiparallele, komplementäre Polymerstränge bilden die dsDNA. Guanin (G) paart dabei nur mit Cytosin (C) über drei und Adenin (A) mit Thymin (T) über zwei Wasserstoffbrückenbindungen. (Quelle: www.oci.unizh.ch/edu/lectures/material/AC_BII)

Unter physiologischen Bedingungen liegt die DNA in der B-Konformation (Watson-Crick-Helix) vor und ist durch folgende Parameter gekennzeichnet [59]:

- Durchmesser der Helix $\approx 2.37 \text{ nm}$
- Abstand benachbarter Basenpaare $\approx 0.34 \text{ nm}$
- rechtshändig um 36° gegeneinander verdreht, d.h Periodizität von 10 bp bzw. 3.4 nm
- Persistenzlänge von $30 \text{ nm} \leq l_p \leq 60 \text{ nm}$

In dieser Arbeit wurde sogenannte λ -DNA verwendet. Dabei handelt es sich um das Genom des λ -Bakteriophagen, der das Bakterium *Escherichia coli* (*E.coli*) befällt. Bakteriophagen (Phagen) sind Viren, die sich nur in Bakterien vermehren. Viren sind parasitische Nucleoprotein-Komplexe. Im einfachsten Fall bestehen sie aus einem DNA-Molekül und einer Proteinhülle. λ -DNA besteht aus 4.6 Millionen Basenpaaren und hat eine Konturlänge von $16.2 \mu\text{m}$. Phagen können entweder die Wirtszelle zerstören oder ihre DNA in das Bakteriengenom integrieren.

2.4.1 Fluoreszenzmarkierung

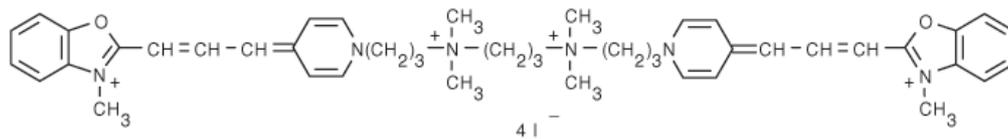


Abbildung 2.12: POPO-3 Strukturformel (Quelle: www.probes.com).

In dieser Arbeit sollen die λ -DNA-Moleküle als fluoreszierende Einzelmolekülproben untersucht werden. Da die DNA bei der verwendeten Anregungswellenlänge von 532 nm nicht fluoresziert, muss sie ebenfalls mit einem Farbstoff markiert werden. Aufgrund seiner hohen Quanteneffizienz von 0.46 (www.probes.com) und der bis zu 1000fach erhöhten Fluoreszenz im gebundenen Zustand wurde POPO-3 (Strukturformel s. Abb.2.12) als Fluoreszenzfarbstoff ausgewählt. In Abb.2.13 ist das Absorptions- und Emissionsspektrum von POPO-3 gezeigt.

POPO-3 ist ein Farbstoff, der Interkalationskomplexe mit doppelsträngigen Nukleinsäuren bildet. Interkalatoren sind flache aromatische Ringe, die sich zwischen die Basen der DNA einschieben können. Aufgrund seiner Struktur interkaliert POPO-3 sogar zweimal

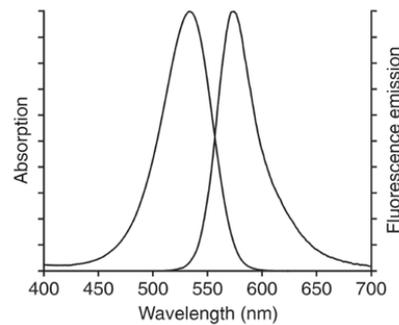


Abbildung 2.13: Absorptions- und Emissionsspektrum von POPO-3-interkalierter DNA. (Quelle: www.probes.com)

in die DNA und ist daher ein sogenannter Bisinterkalator. In Abb.2.14 ist die Interkalation von TOTO-1, eines Farbstoffes, der zu der gleichen Serie wie POPO-3 gehört, gezeigt. Die sich bildenden Komplexe sind sehr stabil und zusätzlich durch ionische Wechselwirkungen zwischen positiv geladenen Gruppen am Interkalator und dem negativ geladenen Phosphatrückgrat stabilisiert. Die Interkalation induziert eine Strukturänderung in der Doppelhelix. Durch die Interkalation des Farbstoffes ändert sich die Persistenzlänge der DNA (66 nm) ([60]) und die Konturlänge von $16.5 \mu\text{m}$ auf ca. $20 \mu\text{m}$ [61].

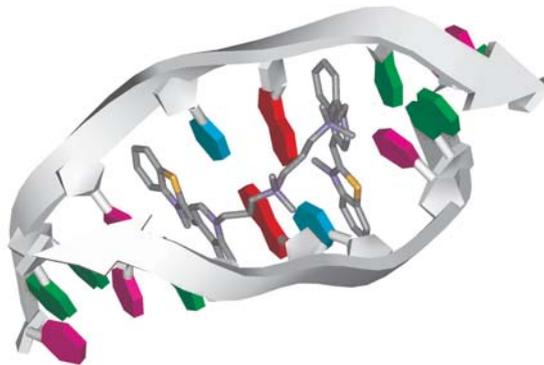


Abbildung 2.14: Simulierte Interkalation des mit POPO-3 verwandten TOTO-1 Moleküls in DNA.

3 Experimenteller Aufbau

3.1 Das optische Nahfeldmikroskop

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein optisches Transmissions-Nahfeldmikroskop aufgebaut, das in Abb.3.1 schematisch dargestellt ist.

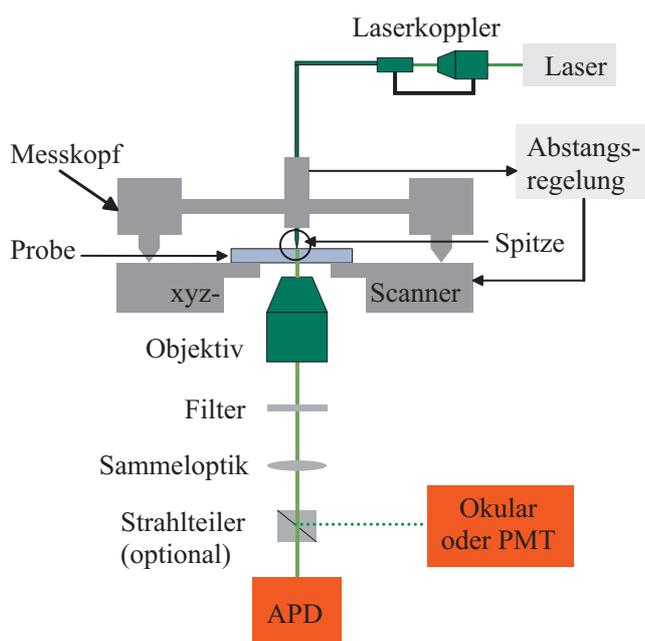


Abbildung 3.1: Experimenteller Aufbau des SNOM.

Laserlicht der Wellenlänge 532 nm wird über einen Laserkoppler in das Ende der SNOM-Sonde eingekoppelt. Die Sonde wird am Messkopf oberhalb der Probe befestigt. Die Probe wird gerastert. Als Lichtdetektor dient entweder eine Avalanche Photodiode (APD), oder ein Photomultiplier (PMT).

Der experimentelle Aufbau besteht aus folgenden Grundkomponenten:

- Beleuchtungseinheit:
 - Laser als Lichtquelle mit Faserkoppler und evtl. Filter
 - Glasfaser als Nahfeldsonde
- Raster- und Annäherungseinheit
 - Inverses optisches Mikroskop
 - Abstandsregelung mittels Scherkraftdetektion
 - Piezoelemente für den Rastervorgang
 - Steuerelektronik
- Detektionseinheit
 - Sammeloptik (mit Filtern)
 - Lichtdetektor: wahlweise Avalanche Photodiode (APD), oder Photomultiplier (PMT)
- Vibrationsisolierung des gesamten Aufbaus

Bei der Durchführung einer optischen Nahfeldmessung müssen folgende Prozesse durchgeführt werden: Rasterbewegung, Abstandskontrolle, Aufnahme und Speicherung aller notwendigen Messwerte. Diese Prozesse werden über das Messprogramm WSxM und die zugehörige Messelektronik (Nanotec Electronica) gesteuert und verarbeitet.

3.2 Beleuchtungseinheit

Als Lichtquelle dient ein Dioden gepumpter Neodym: YAG (Yttrium-Aluminium-Granat)-Laser (CrystaLaser GCL-025-L, USA), der normalerweise Licht der Wellenlänge $\lambda = 1064\text{ nm}$ emittiert. Dieses wird frequenzverdoppelt, so dass Licht der Wellenlänge $\lambda = 532\text{ nm}$ das Lasermodul verlässt. Das Laserlicht mit einer Wellenlänge von $\lambda = 532\text{ nm}$ und einer Ausgangsleistung von 25 mW wird über ein Objektiv und einen Laserkoppler in eine Monomodeglasfaser (FS-SN-3224, 3M, CH) eingekoppelt, an deren anderem Ende sich die Nahfeldsonde befindet. Die optische Auflösung wird durch die Aperturgröße dieser Sonde bestimmt. Die Nahfeldsonde besteht aus dem angespitzten, mit Silber beschichteten Ende der Faser mit einer Apertur an der Spitze. Auf die Herstellung und

Eigenschaften dieser Nahfeldsonde wird in den Kapiteln 4 und 5 näher eingegangen. Zwischen Laser und Objektiv können Grau- und Linienfilter eingebaut werden. Mit Hilfe der Graufilter kann die Intensität angepasst werden, bevor das Licht in die Faser eingekoppelt wird. Der Linienfilter ist für die Unterdrückung des langwelligen Hintergrundlichts im Laserstrahl (Fundamentalmode des Lasers: $\lambda = 1064 \text{ nm}$) bei Fluoreszenzmessungen notwendig.

3.3 Raster- und Annäherungseinheit



Abbildung 3.2: Rastertisch

Der Proben-Rastertisch ist auf einem inversen optischen Mikroskop befestigt.

In den meisten SPM Instrumenten rastern piezoelektrische Kristalle entweder die Sonde oder die Probe. Beim SNOM ist die Rasterung der Probe vorzuziehen, da die Sonde dann relativ zur Sammeloptik fix bleibt und somit ein konfokaler Aufbau möglich wird. Die verwendete Proben-Rastereinheit (Abb.3.2) mit zugehörigem SNOM-Messkopf ist ein von der Firma Triple-O entwickelter und im Laufe dieser Arbeit verbesserter Prototyp, der in das inverse optische Mikroskop (Zeiss Axiovert-100) integriert wurde. Durch Betrachten der Probe im optischen Mikroskop kann ein geeignetes Probenareal ausgewählt werden. Hierzu wird der Rastertisch durch Motoren in x- und y-Richtung verfahren. Die Probe wird durch die Nahfeldsonde beleuchtet, und das transmittierte Licht anschliessend mit der Optik des inversen Mikroskops gesammelt.

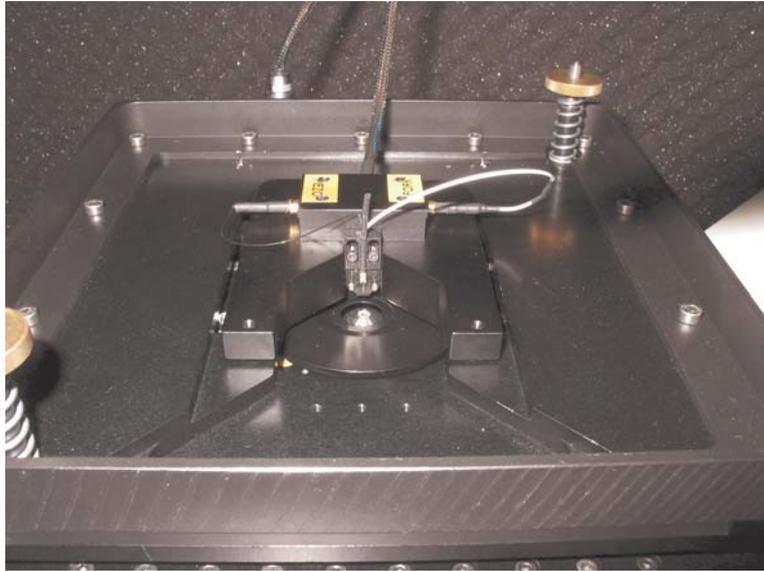


Abbildung 3.3: SNOM-Messkopf.

Mittels einer Platine wird die Nahfeldsonde am Messkopf befestigt und oberhalb der Probe positioniert.

Um Nahfeldmessungen durchführen zu können, muss die Probe innerhalb des Nahfeldes der Sub-Wellenlängen Apertur positioniert werden. Außerdem muss der Abstand Probe-Sonde während des Rasterns unterhalb der Apertur konstant gehalten werden. Dazu ist eine Abstandskontrolle wichtig. Es wird ein Messkopf (Abb.3.3) benutzt, der aus einer Befestigungseinheit für die Sonde und einer Abstandskontrolle mittels Scherkraftmessung einer Quarzgabel besteht.

Die Nahfeldsonde wird mittels einer Platine, die gleichzeitig zur Übertragung des Quarzgabelsignals dient, an dem Messkopf befestigt. Hinter der Platine befindet sich eine piezoelektrische Keramik, die die Quarzgabel zur Schwingung anregt. Der Messkopf liegt mit drei Auflagepunkten auf einem Rahmen oberhalb des x-y-Rastertisches, auf dem der Probenhalter mittels zweier Magneten fixiert wird. Mit Hilfe von drei am Rastertisch befestigten Motoren erfolgt sowohl die Grobannäherung, als auch die schrittweise Feinannäherung. Hierbei werden die drei Z-Piezos vollständig zurückgezogen, während die Motoren einen Schritt fahren. Anschliessend fahren die Piezos wieder vollständig aus, bis ein vorher eingestellter Sollwert erreicht ist. Der Messkopf kann zusammen mit dem Probenhalter manuell mittels zweier Mikrometerschrauben ebenfalls in x- und y-

Richtung verschoben werden. Hierdurch ist die Positionierung der Nahfeldsonde genau über der optischen Achse des inversen Mikroskops möglich.

3.4 Detektionseinheit

Das SNOM ist in ein inverses optisches Mikroskop (Zeiss Axiovert-100, D) integriert. Dies ermöglicht, die Probe optisch zu begutachten und die Sonde entsprechend zu positionieren. Um eine möglichst optimale Detektionseffizienz zu erreichen ist die Sonde konfokal zur APD auf der optischen Achse fixiert, während die Probe unterhalb der Sonde in x-,y- und z-Richtung bewegt wird. Das transmittierte Licht wird von einem Objektiv mit möglichst hoher numerischer Apertur gesammelt, um einen großen Raumwinkel zu erfassen. Der Einsatz eines Ölimmersionsobjektivs ist nicht möglich, da sonst die mechanische Kopplung der gerasterten Probe zum Objektiv eine einwandfreie Abstandsregelung verhindern würde. Das hier verwendete Objektiv hat eine numerische Apertur von $NA = 0.65$ (CP-Achromat 40 x, Zeiss). Nach Transmission durch einen Fluoreszenzfilter (Bandpassfilter: HQ 575/50, AF , D) zur Unterdrückung des Anregungslichts wird das das eingesammelte Licht auf den Detektor fokussiert.

Die Detektion des SNOM Signals repräsentiert die letzte Phase der Aufnahme des optischen Signals einer Probe. Die meisten SNOM-Systeme verwenden entweder einen Photomultiplier (PMT), eine charge-coupled-device-Kamera (CCD) oder eine Avalanche Photodiode (APD). Die Wahl des Detektors beeinflusst wesentlich das Signal-zu-Hintergrund Verhältnis der optischen Bilder. Bei dem hier verwendeten Aufbau wird ein PMT (H 5784, Hamamatsu, D) für die Messung des transmittierten Lichtes für teilweise lichtdurchlässige Proben, wie z.B. die Fischer-Probe verwendet. Für Fluoreszenzmessungen und speziell bei der Einzelmoleküldetektion muss hingegen eine hohe Photonenausbeute und eine gute Hintergrundunterdrückung gewährleistet sein. Daher wird das Fluoreszenzlicht mit einer APD (SPCM-AQR-13, Perkin Elmer, Dunkelrate $\leq 250/s$) detektiert. Da diese Dioden einen Puls für jedes detektierte Photon ausgeben, benötigen sie eine Zähl Elektronik, um ein Spannungssignal zu liefern, welches der detektierten Lichtmenge proportional ist und von der Messsoftware verarbeitet werden kann. Eine solche Elektronik wurde für die vorhandene APD entwickelt und in der Elektronikwerkstatt gebaut. Die ca. $100 \mu m$ schmale aktive Fläche der APD bietet den Vorteil der räumlichen Filterung und somit eine Unterdrückung des Streulichtes, erfordert aber eine sehr sorgfältige Justage.

3.5 Abstandsregelung mit Schwingquarzgabel

Die Scherkraft zwischen der mit einer Schwingquarzgabel gekoppelten Sonde und der Probe dient als abstandsabhängiges Regelsignal während des Rasterns. Das gekoppelte System wird dabei zu einer Schwingung bei seiner Resonanzfrequenz angeregt. Das Sondenende ist so ausgerichtet, dass die Schwingung parallel zur Probenoberfläche erfolgt. Durch Wechselwirkung der Sonde mit der Probenoberfläche wird die Schwingung abstandsabhängig gedämpft. Amplitude, Phase und Resonanzfrequenz des schwingenden Systems ändern sich. Diese Signale können als Regelsignal zur Abstandskontrolle verwendet werden. Der Arbeitsabstand Sonde-Probe liegt typischerweise im Bereich einiger nm bis 10 nm.

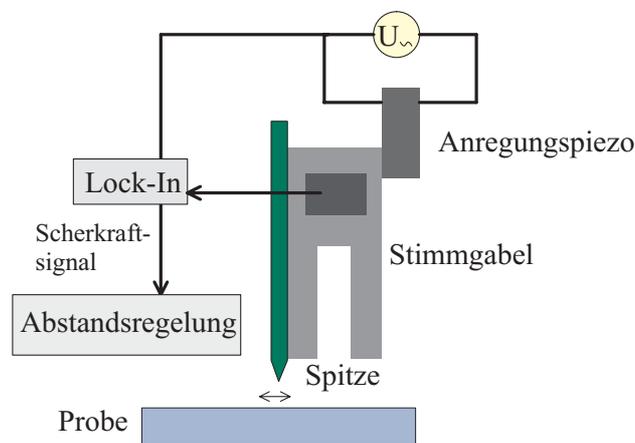


Abbildung 3.4: Abstandskontrolle mittels Scherkraftmessung einer Schwingquarzgabel.

Die Detektion der Schwingungsamplitude der Glasfaser erfolgt mit Hilfe eines Schwingquarzes in Form einer Stimmgabel unter Ausnutzung des piezoelektrischen Effektes und ist schematisch in Abb 3.4 dargestellt¹. An eine Seite der Quarzgabel wird die Glasfaser mit Sekundenkleber festgeklebt, so daß die eigentliche Spitze ca. 1 mm über die Gabel hinausragt. Der Schwingquarz wird mit Hilfe einer piezoelektrischen Keramik (im Folgenden als Schwingpiezo bezeichnet) mechanisch zu Schwingungen mit seiner Resonanzfrequenz angeregt. Die Resonanzfrequenz der hier verwendeten kommerziell erhält-

¹Diese Methode wurde erstmals von Karrai et al. [48] vorgestellt.

lichen Schwingquarze² beträgt 32,768 kHz und wird durch das Ankleben der Glasfaser zu höheren Frequenzen (bis 43 kHz) verschoben. Die Verschiebung zu höheren Frequenzen wird auf den Einfluss des Klebers und der Glasfaser und damit eine Versteifung des Systems zurückgeführt.

Als Regelsignal dient bei diesem Aufbau die Änderung von Amplitude und Phase des in der Quarzgabel erzeugten Stroms, die mittels eines Lock-in Verstärkers aufgezeichnet werden. Einer der entscheidenden Parameter bei der Abbildung der Topographie ist die Dämpfung der Schwingungsamplitude, die als Sollwert bei der Messung eingestellt wird, um einen konstanten Abstand einzuhalten. Misst man am Lock-In Verstärker z.B. als Amplitude der freien Schwingung einen Wert von ca. 1.7 V, liegt ein geeigneter Sollwert bei 1.6 V. Die Dämpfung ist dabei ein Maß für die Kraft zwischen Sonde und Probe. Ist die Dämpfung zu hoch, kommt es zu einem schnellen Verschleiss der Nahfeldsonde. Andererseits wird die Topographie nicht korrekt abgebildet, wenn die Dämpfung zu niedrig eingestellt ist, da dann die Regelung zu langsam und instabil ist und die Sonde sogar zum Teil vollständig von der Probe abgehoben wird.

3.6 Vibrationsisolierung

Bei der Beseitigung störender Vibrationen müssen zwei Effekte berücksichtigt werden. Zunächst muss der gesamte Aufbau vor externen Erschütterungen abgeschirmt werden. Als zweites muss das Mikroskop so konstruiert werden, dass interne Vibrationen den Messvorgang nicht ungünstig beeinflussen. Der zweite Punkt wurde bei der Konstruktion der kommerziellen Rastereinheit berücksichtigt.

Zu Beginn dieser Arbeit befand sich das Mikroskop im dritten Stockwerk, was eine sehr aufwändige Vibrationsisolierung aufgrund der Gebäudeschwingungen nötig machte. Zusätzlich zu einem aktiven, piezogeregelten Dämpfungstisch (Herzan MOD-1) wurde noch ein passiver Dämpfungstisch benötigt, um messen zu können. Trotzdem wirkten sich Störungen, wie z.B. Schritte auf dem Flur sehr störend auf die Messungen aus. Daher wurde das Mikroskop in einen ebenerdigen Raum verlegt. Der Aufbau wurde danach leicht abgewandelt. Zwei durch Styroporplatten getrennte Marmorplatten wurden auf vier massiven Füßen befestigt. Darauf wurde der aktive Tisch positioniert. Der neue Aufbau des Mikroskops ist in Abb 3.5 zu sehen. Der Metallkasten mit der Schaumstoffschicht innen dient dazu, das Mikroskop vor Schall und Umgebungslicht zu schützen.

²z.B. von Farnell

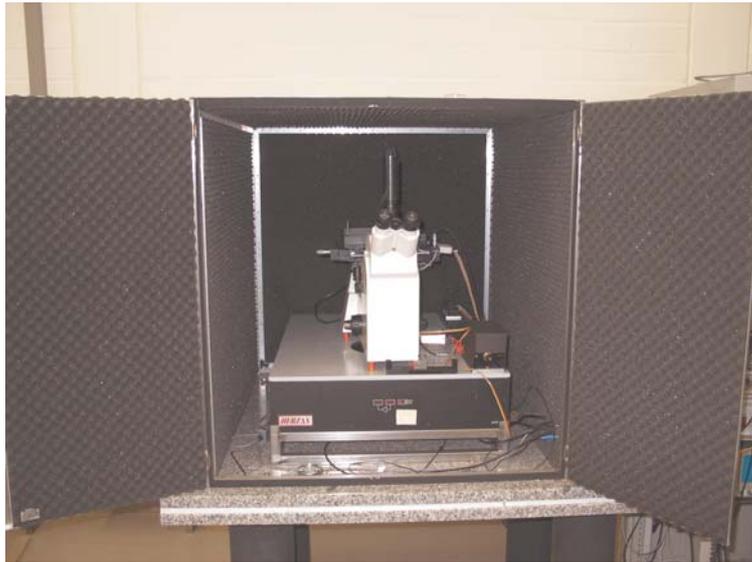


Abbildung 3.5: Vibrationsisolierung

Der SNOM-Aufbau wird durch einen aktiven Dämpfungstisch in Kombination mit einem schweren Marmortisch vor Vibrationen geschützt. Der innen mit Schaumstoff verkleidete Metallkasten kann ganz geschlossen werden und isoliert den Aufbau vor Schall und Umgebungslicht.

3.7 Prinzipieller Messverlauf

Bevor die zu untersuchende Probe auf dem Probenhalter fixiert und in das SNOM eingebaut wird, wird sie grob optisch begutachtet, um eine geeignete Probenstelle zu finden. Anschliessend wird die eingebaute Probe mit dem inversen Mikroskop näher untersucht und mittels eines x-y-Verschiebetisches positioniert. Hat man einen geeigneten Probenbereich gefunden, wird als nächstes die auf dem Messkopf befestigte Nahfeldsonde oberhalb der Probe eingebaut. Ist die Resonanzfrequenz (typische Werte liegen zwischen 33 und 34 kHz) gefunden, muss der Sollwert, bis zu dem der Oszillator (Quarzgabel mit Faserspitze) gedämpft werden soll, eingestellt werden. Dieser wird so eingestellt, dass sein Wert ca. 0.1 V kleiner ist als der Amplitudenwert der freien Schwingung. Hiernach erfolgt die softwaregesteuerte Grobannäherung der Nahfeldsonde mittels drei Motoren. Ist der Sollwert erreicht, wird die Annäherung automatisch abgebrochen. Die Sonde sollte möglichst so weit angenähert sein, dass die drei z-Piezos ungefähr bis zur Hälfte ausgefahren sind. Ist dies nach der Grobannäherung noch nicht der Fall, kann mittels einer schrittweisen Annäherung weiter angefahren werden. Hierbei fahren die Motoren

nur einen kurzen Schritt, während die Piezos komplett zurück gezogen sind. Nach der Motorbewegung werden die Piezos so weit wieder ausgefahren, dass der Sollwert erreicht wird.

Als nächstes müssen die Parameter der Scherkraftdetektion so eingeregelt werden, dass die Topographie der Probe gut wiedergegeben wird. Die einzustellenden Parameter sind zum einen die Kenngrößen des Regelkreises (Proportional- und Integralverstärker) und der Sollwert für die Dämpfung. Die empfindlichen Größen sind hierbei der Proportionalverstärker und der Sollwert. Geeignete Anfangswerte sind dabei $P = 30$ und $I = 0.3$; der Wert des Proportionalverstärkers muss immer um einen Faktor 100 höher liegen, als der des Integralverstärkers. Ein gutes Maß für die Qualität der Oberflächenabbildung ist die Übereinstimmung bei Hin- und Rückscan einer Zeile. Ein weiteres Indiz ist das Fehlersignal. Hierbei handelt es sich um die Differenz zwischen dem Ist- und Sollwert im Regelkreis. Sind die Werte für die Verstärker zu hoch, kommt es zu Eigenschwingungen des Regelkreises. Diese sind im Fehlersignal deutlich zu erkennen. Sind sie zu niedrig, so ist die Regelgeschwindigkeit zu langsam, so dass die Topographie nicht mehr richtig erfasst wird. Ein guter Scherkraftkontakt ist wichtig für ein optimales optisches Ergebnis. Um Schäden an der Nahfeldsonde während der Vorbereitungen zur optischen Aufnahme zu vermeiden, wird diese wieder einige μm von der Probe zurückgezogen. In das andere Ende der Sonde wird über einen Faserkoppler das Laserlicht eingekoppelt. Die Apertur wird fokussiert und mittels eines Verschiebetisches und eines Rasters im Okular mittig zur optischen Achse ausgerichtet. Des Weiteren müssen die entsprechenden Filter eingesetzt und der Strahlengang zum Detektor freigeschaltet werden. Nach der erneuten Annäherung der Sonde wird der Detektor eingeschaltet und bei zurückgezogenem Piezo die Apertur so nachjustiert, dass möglichst viel Licht auf den Detektor trifft. Anschliessend wird der Piezo ausgefahren, die Scherkraft-Parameter nachgeregelt und mit der simultanen Aufnahme des topographischen und optischen Bildes begonnen. Abschliessend werden die Bilder mit dem Messprogramm nachbearbeitet.

4 Die Nahfeldsonde

Die wichtigste und empfindlichste Komponente eines SNOM bildet die optische Nahfeldsonde. Die noch immer am häufigsten verwendete Sonde ist die angespitzte und mit einem Metall (Aluminium, Silber) bedampfte Glasfaser, die am äußersten Ende eine Apertur besitzt. Erwünschte Eigenschaften einer solchen Apertursonde sind hohe Lichtintensität, durch große Öffnungswinkel, eine gut definierte runde Apertur, kein Lichtverlust durch Pinholes im Metallmantel und eine hohe optische Zerstörungsschwelle. Die Herstellung von Glasfaser-Apertursonden konnte bisher noch nicht automatisiert werden, die einzelnen Schritte werden per Hand durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Halter konstruiert, mit dem man 8 Spitzen zugleich ätzen und bedampfen kann, ohne sie zwischendurch ausbauen zu müssen. Dadurch wird die Gefahr die Spitzen zu beschädigen verringert.

In die Entwicklung von mikrofabrizierten Sonden wurde in den letzten Jahren viel Zeit und Mühe investiert, aber nur wenige der entwickelten Designs sind heutzutage kommerziell erhältlich oder werden bereits experimentell eingesetzt.

4.1 Herstellung der Glasfaserspitze

Der Aufbau einer angespitzten optischen Glasfaser wird in Abb 4.1 dargestellt. Eine wellenleitende Glasfaser besteht aus zwei konzentrischen Quarzglaszylindern. Der Kern wird von einem Medium mit kleinerem Brechungsindex umgeben, dem sogenannten Mantel (engl. Cladding). Wird Licht in die Faser eingekoppelt, so wird die Lichtwelle im Kern, durch Totalreflexion an der Grenzschicht von Kern und Cladding, geführt.

Ist der Durchmesser des Kerns relativ groß, so werden mehrere Moden geführt (Multimodefasern). In einem SNOM werden fast nur Monomodefasern verwendet, bei denen der Kerndurchmesser so weit reduziert ist, dass nur noch die Grundmode geführt wird. Die Intensität der Grundmode ist im Mittelpunkt der Faser, aufgrund des gaussförmigen Strahlprofils, am größten. Die höheren Moden haben ihr Maximum teilweise nicht

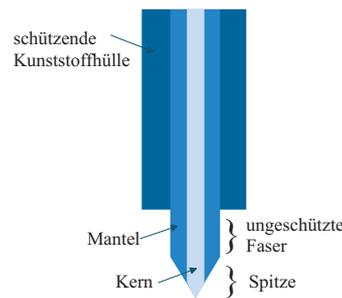


Abbildung 4.1: Aufbau einer optischen Glasfaser.

Der Kern der Glasfaser besitzt einen höheren Brechungsindex als der ihn umgebende Mantel.

im Mittelpunkt der Faser. Aus diesem Grund und weil in der Faserspitze jede Multimodefaser aufgrund der Verjüngung des Kerns zur Monomodefaser wird, finden in der optischen Nahfeldmikroskopie nur Monomodefasern Anwendung [24].

Man hat verschiedene Methoden zum Anspitzen des Glases entwickelt. Eine gängige Methode ist das adiabatische Ziehen von optischen Fasern bei gleichzeitigem Erhitzen mit einem CO_2 Laser [62, 63]. Die Form der Spitze kann durch Veränderung der Ziehparameter (Erwärmungszeit, Ziehkraft, Verzögerungszeit) beeinflusst werden. Alternativ kann Glas auch durch Säuren wie Flusssäure (HF) geätzt werden. Das Ätzen mit Flusssäure kann unter Umgebungsbedingungen durchgeführt werden und führt zu konischen Spitzenformen. Obwohl man beim Umgang mit HF spezielle Vorsichtsmaßnahmen treffen muss, weil HF schwere Verletzungen verursachen kann, ist diese Methode weit verbreitet.

Bei der sogenannten *Turner-Methode* wird die vom Cladding befreite nackte Glasfaser in ein HF-Bad getaucht, das von einer organischen Schutzschicht bedeckt ist [64]. Aufgrund der Oberflächenspannung der Flüssigkeit bildet sich ein Meniskus an der Grenzschicht zwischen Luft, Glas und HF. Durch Veränderung des Kontaktwinkels zwischen Säure und Glas während des Ätzprozesses wird der Faserdurchmesser verkleinert und eine Spitze erzeugt.

Vergleicht man die beiden Methoden, so zeigt sich, dass keine von beiden die gewünschte Spitzenform liefert [65, 66]. Die Öffnungswinkel gezogener Spitzen sind zu klein, was zu einer reduzierten Lichttransmission führt. In Abb.4.2 sind REM-Aufnahmen einer geätzten (a)) und einer gezogenen (b)) Spitze gezeigt. Die gezogene Spitze weist einen ungefähr drei mal kleineren Öffnungswinkel (12°), als die geätzte (30°) auf. Dies wird

problematisch, wenn die Aperturen immer kleiner werden [67], da eine geringe Transmission zu einem schlechten Signal-zu-Hintergrund Verhältniss führt. Mit der *Turner-Methode* geätzte Spitzen haben eine sehr raue Oberfläche, da der Prozess sehr empfindlich auf Umgebungseinflüsse wie Vibrationen, Temperaturänderungen usw. reagiert. Diese Rauigkeit und eine Asymmetrie der Spitzen wird für beim Bedampfen mit Metall entstehende Pinholes und eine schlecht definierte Apertur verantwortlich gemacht. Der Öffnungswinkel und damit auch die Transmission der Faser kann aber durch leichtes Verändern der Ätzbedingungen drastisch verbessert werden [67]. Ein weiterer Vorteil des Ätzens ist, dass man im Gegensatz zum Ziehen mehrere Fasern gleichzeitig bearbeiten kann.

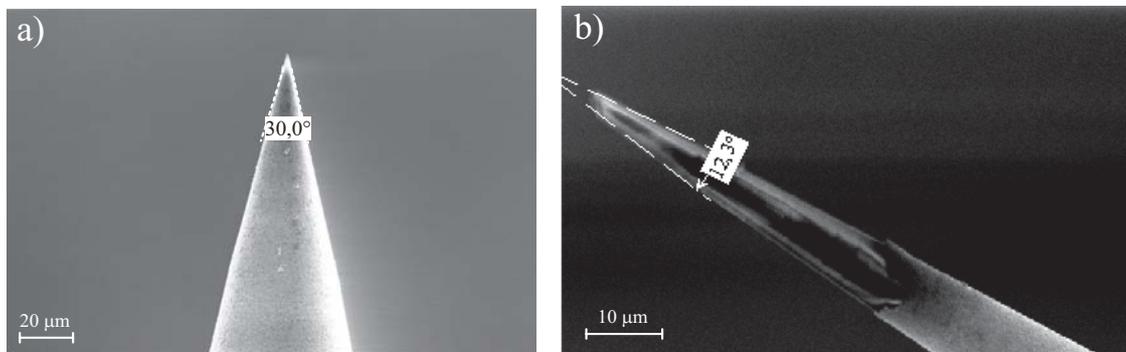


Abbildung 4.2: REM-Bilder zweier angespitzter Glasfasern.

Seitenansichten einer geätzten a) und einer gezogenen Spitze b). Der Öffnungswinkel der geätzten Spitze beträgt ca. 30° , der der gezogenen hingegen nur ca. 12° .

Mit Hilfe einer neu entwickelten Methode, dem sog. *tube-etching* (engl. Röhren-Ätzen), wurden diese Probleme gelöst [68, 69]. Die Verbesserung besteht darin, dass das Quarzglas innerhalb des Polymer Mantels geätzt wird. Folglich findet der ganze Ätzprozess innerhalb eines sehr kleinen und wohldefinierten Volumens statt. Diese Methode wurde zur Erzeugung der Glasfaserspitzen verwendet und wird im folgenden Kapitel erläutert.

4.1.1 Tube-etching

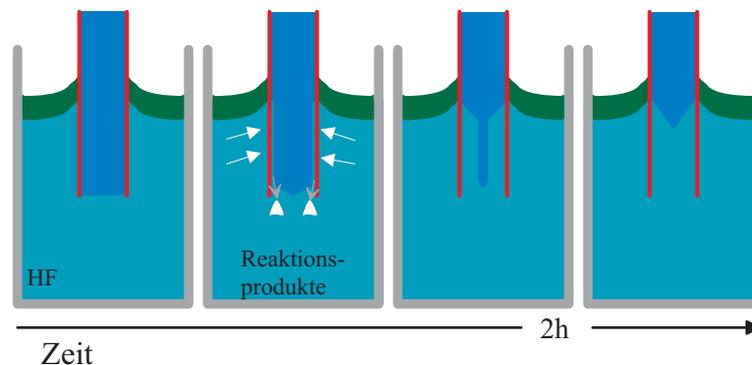


Abbildung 4.3: Tube-etching Prozess.

Die Glasfaser wird innerhalb ihres für HF permeablen Mantels geätzt.

Als Ätzlösung wird 40% Flußsäure (engl. hydrofluoric acid, HF) (purissimum, Fluka) verwendet. Eine dünne Schutzschicht aus N-Octane verhindert das Verdampfen der Flußsäure und schützt somit den Faserhalter vor Korrosion. Die Zusammensetzung der Glasfaser beeinflusst wesentlich die Spitzenbildung. Kleine Unterschiede im Glasmaterial, Dotierungen oder Inhomogenitäten, spielen eine wesentliche Rolle während des Ätzprozesses. Besonders geeignet [70] für diese Methode der Spitzenherstellung ist eine single-mode Faser von der Firma 3M (FS-SN-3224), deren Mantel von der Flußsäure nicht angegriffen wird, für diese aber permeabel ist. Die Spitzenbildung innerhalb des Mantels ist bisher noch nicht vollkommen verstanden. Die Permeabilität des Mantels für HF spielt aber eine wesentliche Rolle.

In Abb. 4.3 wird gezeigt, wie die Spitze während des Ätzprozesses entsteht. HF diffundiert durch den permeablen Mantel der Glasfaser hindurch und greift das Glas von allen Seiten an. Gleichzeitig entsteht am unteren Ende eine Spitze, da die äusseren Regionen der Faser schneller, als die inneren geätzt werden. Vermutlich ist Konvektion der entscheidende Parameter für diesen Prozess [69]. Durch Diffusion und Konvektion entsteht die Spitze an der äusseren Meniskusseite (oberhalb des Meniskus ist kein HF mehr vorhanden, das diffundieren könnte). Sobald die Spitze gebildet wurde, wird der Ätzprozess nur noch durch Konvektion weitergeführt.

Nachdem die endgültige Spitzenform erreicht ist werden die Fasern mit Milliporewasser gespült, danach muss der Polymer-Mantel bis ca. 1 cm hinter der Spitze entfernt werden. Dies kann durch mechanisches Abziehen, oder durch eine zweite Ätzlösung aus

heisser konzentrierter Schwefelsäure (H_2SO_4) realisiert werden. Werden die Spitzen in ca. 80°C heisse Schwefelsäure eingetaucht, so wird der Mantel innerhalb weniger Sekunden durch die heftige Einwirkung der Säure aufgelöst. Durch den Spülvorgang sind die Fasern feucht, wenn sie in die Schwefelsäure eingetaucht werden, was zur Bildung von Bläschen führt. Dies führt zu einer recht rauen Oberfläche und kann Probleme bei dem anschliessenden Bedampfen mit einem Metallmantel verursachen. Vermeiden kann man diese Bläschenbildung beim Eintauchen, indem man die Fasern nach dem Spülen durch vorsichtiges Abblasen mit Stickstoff trocknet. Damit möglichst keine Reste des Mantels am Glas hängen bleiben, lässt man die Spitzen ca. 30 min in der Schwefelsäure stehen. Alternativ kann man den Mantel mit einer Pinzette mechanisch abstreifen, nachdem das Polymer zuvor durch ein Lösungsmittel wie Aceton oder Chloroform aufgeweicht wurde. Allerdings liegt hierbei die grösste Schwierigkeit darin, jeden Kontakt mit der Spitze und damit deren Beschädigung zu vermeiden.

Mit dem speziell konstruierten Faserhalter (Abb.4.4) kann der gesamte Ätzprozess und das anschliessende Bedampfen mit einem Metallmantel für acht Spitzen gleichzeitig durchgeführt werden, ohne dass sie zwischendurch ausgebaut werden müssen. Dies vermindert das Risiko der Beschädigung. Trotz der etwas schlechteren Oberflächenqualität bei der Behandlung mit Schwefelsäure, ist diese Methode daher vorzuziehen.

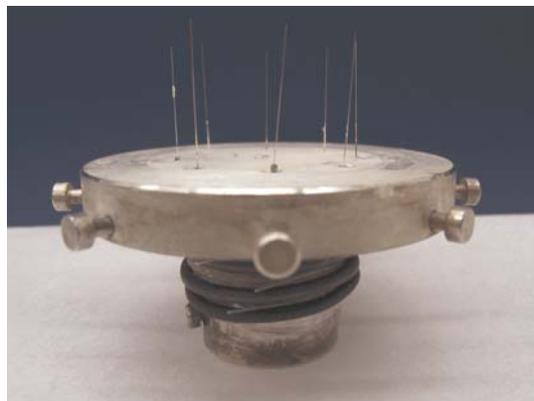


Abbildung 4.4: Faserhalter.

Im selbstgebauten Faserhalter können 8 Spitzen gleichzeitig geätzt und anschliessend bedampft werden. Die ca. 1 m langen Faserenden werden um den unteren Teil des Halters gewickelt und mit Gummiringen fixiert, da der Halter während des Bedampfens rotiert.

Der gesamte Ätzprozess wird im Reinraum durchgeführt, um die Verschmutzung der Glasoberfläche durch Staubpartikel zu minimieren. Zudem ist der Umgang mit HF nicht nur für den Experimentator, sondern auch für die Umgebung gefährlich und muss daher unter besonderen Sicherheitsvorkehrungen durchgeführt werden. Anschliessend werden die Fasern in Milliporewasser getaucht und sobald wie möglich weiterverarbeitet.

4.2 Aperturherstellung

Nachdem die Glasfaser angespitzt wurde, muss ein Metallmantel auf die Spitze aufgebracht werden, um eine Apertur herzustellen, die viel kleiner als die verwendete Wellenlänge ist. Dafür gibt es verschiedene Möglichkeiten. Entweder dampft man das Metall so auf, dass dabei schon eine Apertur entsteht, oder man erzeugt in einem zweiten Schritt eine Apertur auf einer vollständig bedampften Spitze. In diesem Kapitel werden verschiedene Methoden der Aperturherstellung vorgestellt und deren Vor- und Nachteile diskutiert.

4.2.1 Schattenbedampfen

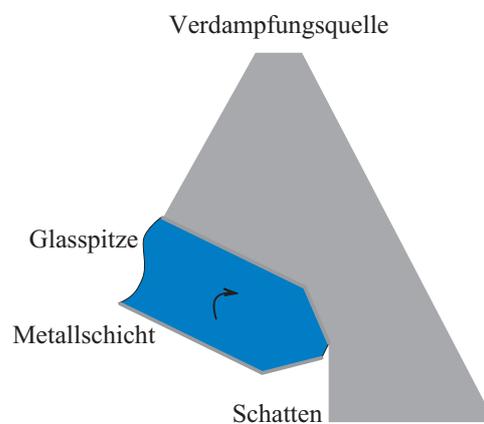


Abbildung 4.5: Bedampfungsgeometrie des Metall-Beschichtungsprozesses.

Die Bedampfung erfolgt in einem kleinen Winkel relativ zur Bedampfungsquelle. Durch den Abschattungseffekt wird am Ende der Spitze eine kleine Apertur erzeugt.

Bei dieser weit verbreiteten Methode werden die Fasern in einem bestimmten Winkel relativ zu einer Verdampfungsquelle rotiert (Abb. 4.5). Dazu wird der Faserhalter mit

den frisch geätzten Fasern in einer Verdampfungsanlage (BALTEC, MED 020) auf einen kleinen Motor so montiert, dass die Faserenden in einem Winkel von ca. 30° von der Verdampfungsquelle wegzeigen. Die Verdampfungsquelle besteht aus einem, mit Aluminium gefüllten Wolframschiffchen in einem evakuierten Glaszylinder ($p = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mbar}$). Durch einen hohen Strom ($I = 120 \text{ A}$ bei $U = 4 \text{ V}$) wird das Metall verdampft und auf den rotierenden Fasern abgeschieden. Die Bedampfungsrate und Schichtdicke wird mithilfe eines Schwingquarzes gemessen. Zur Berechnung der notwendigen Metalldicke werden die Spitzen näherungsweise als Zylinder angesehen, daher muss die gemessene Schichtdicke noch durch π geteilt werden, um den tatsächlich auf den Spitzen aufgedampften Wert zu ermitteln.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst das Schattenbedampfen verwendet um Apertursonden herzustellen. Die Methode ist gut geeignet um gleichzeitig mehrere Spitzen recht kostengünstig herzustellen. Allerdings sind zwischen zwei Bedampfungsprozessen weder Aperturform noch -durchmesser reproduzierbar und meist nicht einmal von Spitze zu Spitze, wenn sie gleichzeitig in einem Halter bedampft wurden.

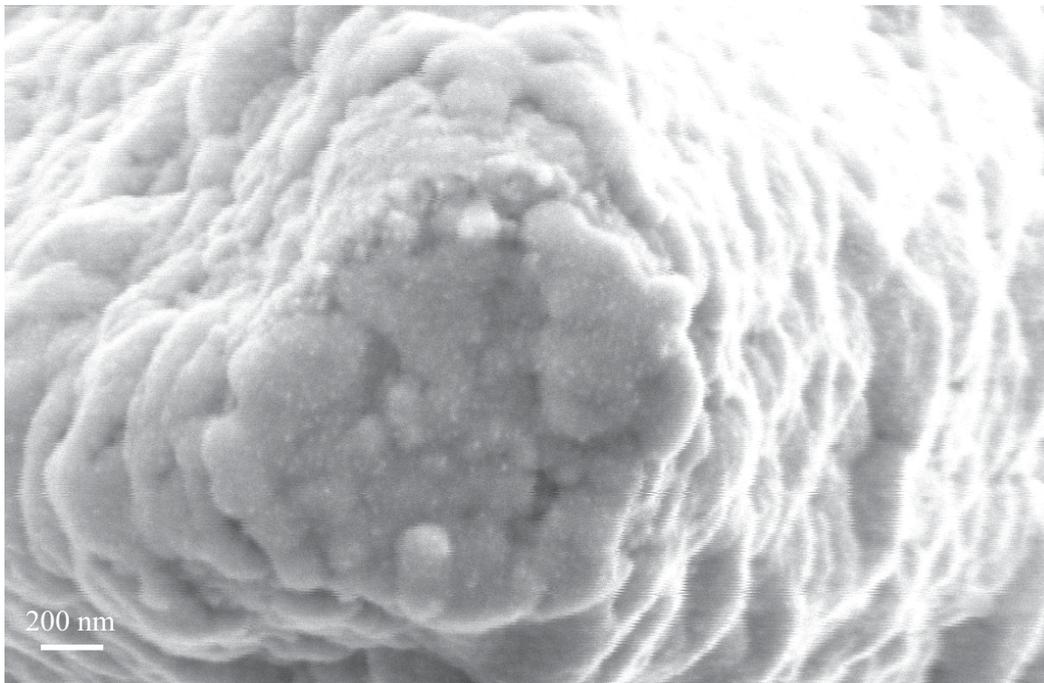


Abbildung 4.6: Körnerbildung an der Endfläche einer mit Aluminium schattenbedampften Spitze. Die Apertur wird durch grössere Körner verdeckt und ist nicht erkennbar.

Ein anderes Problem des Bedampfens mit Metall ist die Rauigkeit der Oberfläche. Wenn das Metall beginnt, auf der Glasoberfläche zu kondensieren, bilden sich kleine Metallkörner. Druck, Sauerstoffgehalt, die Art des Metalls, die Bedampfungsrate und der Aufdampfwinkel spielen eine entscheidende Rolle bei der Bildung dieser Körner [71]. Die tatsächliche Schichtdicke betrug bei den aluminiumbedampften Spitzen meist ca. 450 nm (Eindringtiefe bei $\lambda = 496$ nm: 6.7 nm, [72]), aufgrund der großen Rauigkeit der Aluminiumoberfläche. Bei der später verwendeten Bedampfung mit Silber konnte die Schichtdicke trotz der etwas höheren Eindringtiefe (Eindringtiefe bei $\lambda = 496$ nm: 12.8 nm, [72]) auf ca. 350 nm reduziert werden, ohne dass es zu pinholes im Metallmantel kam. Die Bedampfung mit Silber führt nämlich zu einer wesentlich glatteren Oberfläche, als bei Aluminium.

Flache Aufdampfwinkel (relativ zur Spitzenoberfläche) erzeugen eine rauhere Oberfläche. Daher ist das Spitzenende oft sehr rau und die Apertur schlecht definiert. Dies führt zu unerwünschten Artefakten bei der Aufnahme des optischen Bildes [57], da der Abstand Sonde-Probe vergrößert wird [73]. Abb. 4.6 zeigt die elektronenmikroskopische Aufnahme einer mit dieser Methode aluminiumbedampften Spitze. Die Endfläche der Spitze ist rau und asymmetrisch, die Apertur ist nicht erkennbar, da sie von grösseren Körnern verdeckt wird.

4.2.2 Aufdrücken der Apertur

In frühen Arbeiten schlugen D. W. Pohl *et al.* vor, eine vollständig mit Metall zugedampfte, undurchsichtige Spitze auf eine Probenoberfläche zu drücken und dadurch eine Apertur aufzupressen [4]. Es wurden damit kleine Aperturdurchmesser von ca. 80 nm erreicht und zusätzlich waren die Spitzenenden flach. Die Methode wird heute immer noch, trotz der geringen Reproduzierbarkeit, verwendet [74]. Verbessert wurde diese Art der Aperturherstellung dadurch, dass die Spitze mittels eines Piezo auf eine Glasoberfläche gedrückt wird, während gleichzeitig Laserlicht in die Faser eingekoppelt und die transmittierte Lichtintensität während des Öffnungsprozesses beobachtet wird. Bei Erreichen einer gewünschten Intensität wird der Prozess beendet [75]. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass die Endfläche der Spitzen durch das Aufdrücken verbreitert und damit die topographische Auflösung verschlechtert wird.

4.2.3 Focused ion beam Technik

Eine undurchsichtige, metallisierte Spitze kann alternativ durch einen fokussierten Ionenstrahl (engl. focused ion beam) aufgebohrt werden. Eingeführt wurde diese Methode von Baida *et al.* [76], gefolgt von Muranishi *et al.* [77] und Lacoste *et al.* [78]. Die Technik wurde später von Veerman *et al.* [73] verbessert. Eine solchermassen hergestellte Sonde ist aufgrund einer gut definiert Apertur mit einem flachem Spitzenende, ihrem Polarisationsverhalten, sowie ihren Abbildungseigenschaften in der Lage, hochauflösende Fluoreszenzmessungen z.B. an einzelnen Molekülen durchzuführen [73]. Der grösste Nachteil dieser Methode ist, dass die Kosten für die Herstellung einer einzelnen Spitze unverhältnismässig hoch sind und diese Technik damit für eine kommerzielle Nutzung wenig attraktiv ist.

4.2.4 Chemisches Ätzen der Apertur

Als weitere Methode zur Herstellung einer Aperturspitze wird von Saiki *et al.* [79] das Wegätzen des Metallmantels mit einer $KI \cdot I_2$ Lösung vorgestellt. Dabei wird die Spitze derart mit einem Acrylharz bedeckt, dass das äußerste Ende frei bleibt. Wird die Spitze dann in die Ätzlösung getaucht, so wird nur das Metall entfernt, das nicht vom Harz geschützt wird. Auf diese Art konnten Aperturdurchmesser von 80 bis 200 nm erreicht werden, was für die meisten Anwendungen allerdings zu groß ist.

4.2.5 Festkörperelektrolyse

D. Mulin *et al.* [80] schlugen 1997 vor, Festkörperelektrolyse zwischen einer silberbedampften Glasspitze und einem elektrolytischen Glas dazu zu benutzen eine Nano-Apertur zu erzeugen. Elektrolyse ist eine geeignete und naheliegende Methode, um eine Metallummantelung von einem Substrat zu entfernen. Allerdings ist ein flüssiger Elektrolyt ungeeignet, da sich an der Grenzfläche von Lösung, Luft und Substrat ein Meniskus bildet. Im Bereich des Meniskus würde dann das gesamte Metall entfernt werden. Benutzt man einen Festkörperelektrolyten, so vermeidet man dieses Problem und entfernt nur das Metall am untersten Ende der Spitze.

Die elektrolytische Zelle wird dadurch gebildet, dass man eine Spannung zwischen der silberbedampften Nahfeldsonde (Anode) und einer auf den Festkörperelektrolyten aufgedampften Gegenelektrode (Kathode) anlegt. Das Prinzip der elektrolytischen Erosion ist in 4.7 dargestellt. Die Schwierigkeit bei dieser Methode besteht darin, den Kontakt zwischen Spitze und Elektrolyt während der Metallablösung aufrecht zu erhalten. Mulin

et al. bewegten die silberbedampfte Spitze mittels eines piezo-elektrischen Stellmotors solange zum Elektrolyten, bis ein ein plötzlicher Stromfluss auftrat. War eine Lage Silber entfernt, so musste die Spitze erneut Richtung Elektrolyt bewegt werden, bis wieder Strom floss. Bei diesem Experiment war es schwierig den Erosionsprozess im richtigen Moment zu stoppen, nämlich dann, wenn die Apertur gerade beginnt sich zu öffnen. Die dermaßen hergestellten Sonden waren tatsächlich so weit entmetallisiert, dass die nackte Glasfaser aus dem Metallmantel einige nm herausragte. Solch eine Spitzenform ist nicht geeignet für hochauflösende SNOM Bilder.

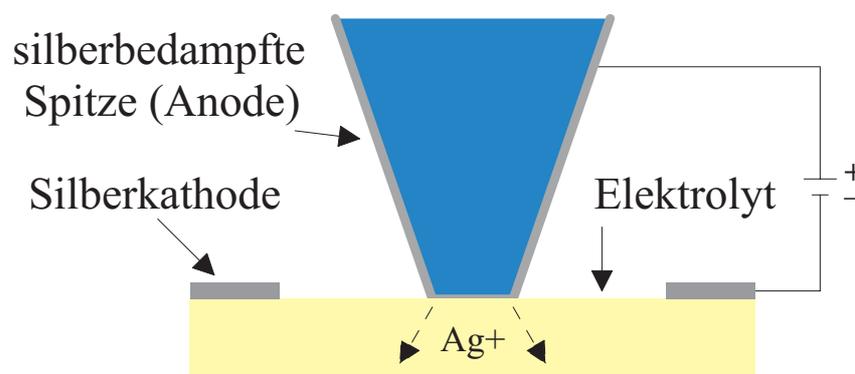


Abbildung 4.7: Prinzip der elektrolytischen Erosion.

Silberionen wandern von der Spitze (Anode) zur Kathode.

Diese vielversprechende Methode wurde von A. Bouhelier *et al.* [81] weiterentwickelt, indem sie sowohl den Ionenstrom, als auch das transmittierte Licht während des Öffnungsprozesse kontrollieren. Dadurch erhält man reproduzierbar Sonden mit Aperturen um 50 nm und flachen Endflächen. Die oben beschriebenen Kontaktprobleme wurden gelöst, indem eine Abstandskontrolle über eine Feedback-Elektronik integriert wurde, die eine kontinuierliche Annäherung ermöglicht, ohne dabei die Spitzen zu beschädigen. Die Experimente wurden mit einem selbstgebauten SNOM durchgeführt, in das man statt der Probe den Festkörperelektrolyten einbaute. Die Abstandskontrolle erfolgte über Messung der Scherkraft einer Quarzgabel, auf der die Spitze aufgeklebt war. Gleichzeitig wurde der Ionenstrom gemessen, der während des Öffnungsprozesses konstant gehalten wurde, um so ein gleichmässiges und kontrolliertes Öffnen der Spitzen zu ermöglichen.

4.2.6 Zusammenfassung

Alle bis heute entwickelte Methoden zur Herstellung von Apertursonden für die optische Nahfeldmikroskopie leiden unter der relativ geringen Reproduzierbarkeit guter Spitzen, wie z.B. die weitverbreitete Technik des Schattenbedampfens [82], oder benötigen sehr teures Equipment, wie die focused ion beam Technik [73]. Die von D. Mulin vorgeschlagene Methode hingegen ist vielversprechend, aber noch verbesserungsbedürftig. Elektrolyse ist eine naheliegende Methode, um Metall zu transportieren. Benutzt man dann noch einen Festkörperelektrolyten, so kann man die aktive Fläche zusätzlich auf einen kleinen Punkt beschränken.

Eine verbesserte Version von Mulins Vorschlag wurde durch einen neu entwickelten, eigenständigen experimentellen Aufbau realisiert und wird im folgenden Kapitel beschrieben. Dieser ermöglicht eine präzise Kontrolle des Demetallisierungsprozesses und damit der Aperturgröße.

5 Aperturerzeugung mittels Festkörperelektrolyse

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Methode der Aperturerzeugung basiert auf den Eigenschaften von Festkörperelektrolyten. Diese, auch bekannt als schnelle Ionenleiter, stellen eine Materialklasse dar, die im festen Aggregatzustand eine hohe Ionenleitfähigkeit besitzen. Hierdurch ist ein Materialtransport über die Leitung der entsprechenden Ionen möglich. Ihre Geschichte geht bis 1834 zurück, als Michael Faraday eine hohe elektrische Leitfähigkeit von PbF_2 bei hohen Temperaturen aufzeigte. Bei der Leitfähigkeit wird zwischen elektronischer und elektrolytischer (oder ionischer) unterschieden, wobei nur bei der letzteren auch ein Materialtransport stattfindet. Ionenleitende Festkörper können dabei ebenso große ionische Leitfähigkeiten erreichen wie Salzschnmelzen oder Elektrolytlösungen. Dies setzt eine inhomogene Zusammensetzung der Gitterstruktur voraus, in der manche Atome eine flüssigkeitsähnliche Mobilität besitzen, während andere auf ihren regulären Gitterplätzen bleiben [83, 84].

5.1 Der Elektrolyt

5.1.1 Hintergrund

Es existieren sowohl kristalline, als auch gläsern amorphe Festkörperelektrolyten. Zu den kristallinen gehören Alkalimetallhalogenide und Silberhalogenide. Die am besten untersuchten amorphen Elektrolyten sind die Oxidgläser. Im festen Zustand zeigen Ionen wie H^+ , Li^+ , Na^+ , Cu^+ , Ag^+ , F^- , Cl^- und O^{2-} die höchsten elektrolytischen Leitfähigkeiten [85]. Allerdings erreichen die meisten Festkörperelektrolyten ihre hohe Leitfähigkeit erst bei sehr großen Temperaturen. Vor allem Sauerstoffionenleiter, wie z.B. $\text{ZrO}_2 \cdot \text{Y}_2\text{O}_3$ weisen Leitfähigkeiten $\geq 0.1 \Omega^{-1} \text{cm}^{-1}$ erst bei 1000°C auf [86]. Einige Glasphasen, die auf AgI basieren, zeigen dagegen schon bei Zimmertemperatur eine

hohe Ag^+ -Leitfähigkeit. Zudem eignet sich Silber gut zum Beschichten von Glasfasern und zeigt eine geringe spektrale Eindringtiefe des Lichtes über den gesamten Spektralbereich. Aus einer großen Auswahl von Silber-basierten Festkörperelektrolyten werden in dieser Arbeit Silberiodid-Silbermetaphosphat $\text{AgPO}_3 \cdot \text{AgI}$ verwendet, da das daraus hergestellte Elektrolytglas transparent genug für optische Anwendungen ist. Dieses Glas zeigt ausserdem eine große Leitfähigkeit für das Silberkation Ag^+ und ist gleichzeitig ein schlechter Elektronenleiter. Bei einer Temperatur von 25°C liegt die Ionenleitfähigkeit bei $1.5 \cdot 10^{-3} \Omega^{-1}\text{cm}^{-1}$, wohingegen die Elektronenleitfähigkeit auf unter $10^{-9} \Omega^{-1}\text{cm}^{-1}$ geschätzt wird [80]. Dieser amorphe Festkörperelektrolyt ist also gut geeignet, um die Spitze der Nahfeldsonde durch Entfernen des Metalls zu öffnen. Zudem ist die Herstellung mit gängigen Labormitteln relativ einfach zu bewerkstelligen.

In Ionenkristallen steht die Leitfähigkeit im Zusammenhang mit Art und Anzahl der Ionen- und Fehlordnungsstellen im Gitter. Die Ionenleitung erfolgt durch Anlegen eines äusseren Feldes. Allerdings ist der Zusammenhang zwischen der ungeordneten Struktur eines Glases und seiner hohen Ionenleitfähigkeit schon bei Zimmertemperatur sehr komplex. Man vermutet, dass die Dotierung mit AgI das für die Ag^+ -Ionen verfügbare freie Volumen vergrößert und so zu einer höheren Leitfähigkeit führt. Tatsächlich sind die Dotierungsatome nicht direkt am Glasformungsprozess beteiligt, sondern vergrössern den Abstand zweier Segmente der Phosphatkette im Falle von AgPO_3 als Wirtsglas. Dadurch werden Leitungsbahnen gebildet, die die Ionenleitung begünstigen [87]. Alternative Dotierungssubstanzen wie AgBr und AgCl wurden untersucht, aber AgI scheint das Glasnetzwerk am besten auszudehnen [88]. Die Ionenleitfähigkeit hängt stark von der Konzentration der Dotierungssubstanz ab. Eine hohe I^- Konzentration ist nötig, um das freie Volumen zu vergrößern und damit die Leitfähigkeit zu erhöhen, kann aber auch die Glasbildung begrenzen und zur Kristallisierung von AgI führen [87]. Für das hier untersuchte System $(\text{AgI})_x(\text{AgPO}_3)_{1-x}$ kann oberhalb eines Molenbruchs von $x \approx 0.58$ das Glasnetzwerk nicht mehr ausgebildet werden.

5.1.2 Herstellung

Das $(\text{AgI})_x(\text{AgPO}_3)_{1-x}$ Glas kann aus kommerziell erhältlichen Produkten hergestellt werden. Die Dotiersubstanz Silberiodid AgI (Nr.: 10217, Sigma Aldrich) wird zu dem Netzwerk bildenden Silbermetaphosphat AgPO_3 (CAS#13465 – 96 – 8, City Chemical, USA) in einem äquimolaren Verhältnis hinzugegeben ¹. Die beiden Substanzen werden

¹Molekulargewicht: 234.77 g/mol für AgI und 186.84 g/mol für AgPO_3 .

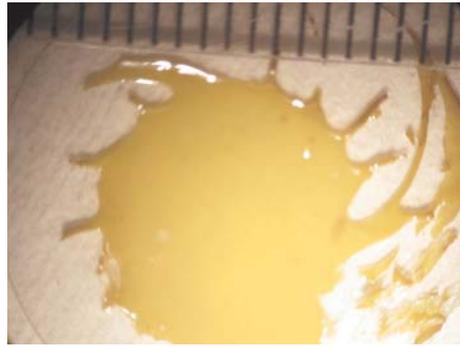


Abbildung 5.1: Glasförmiger Elektrolyt.

Die flache Elektrolytscheibe wird durch Spincoaten des heißen Glasgemischs hergestellt. Der Abstand zweier Striche auf der Skala beträgt 1 mm.

dann vorsichtig in einem Schmelztiegel zu einem homogenen Pulver vermischt. Anschliessend wird dieses Pulver in einem Ofen bei 650°C für ca. 45 min geschmolzen.

Glas entsteht, wenn eine Schmelze so schnell abkühlt, dass sich keine kristalline Struktur ausbilden kann. Das bedeutet, dass sich bei der Entstehung von festem Glas aus einer Schmelze die Geschwindigkeiten der Kristallkeimbildung und die des Kristallwachstums so zueinander verhalten müssen, dass sich zwar Kristallkeime bilden können, aber das Erstarren der Schmelze sich auf einer kleineren Zeitskala abspielt als das eigentliche Kristallwachstum.

Um das schnelle Abkühlen zu gewährleisten und einen dünnen (einige $100\mu\text{m}$) Elektrolyten mit glatter Oberfläche herzustellen, wird ein Tropfen des geschmolzenen $(\text{AgI})_{0.5}-(\text{AgPO}_3)_{0.5}$ Gemischs in die Mitte eines rotierenden Deckgläschens getropft. Das flüssige Gemisch wird dabei innerhalb weniger Sekunden fest. Wichtig ist dabei die richtige Rotationsgeschwindigkeit zu wählen, damit das Glas blasenfrei und dünn genug wird, dabei aber immer noch ein zusammenhängendes Plättchen bildet. Es wurde ein selbst gebauter Spincoater benutzt, bei dem sich die Geschwindigkeit per Hand von 500 U/min bis 2000 U/min regeln lässt. Die besten Resultate ließen sich erzielen, indem man den heißen (ca. 600°C) Tropfen bei einer niedrigen Umdrehungszahl auftropfte und dann schnell bis zur maximalen Geschwindigkeit hochregelte. Idealerweise entsteht ein gelblich-transparentes Glasplättchen mit einer glatten, blasenfreien Oberfläche. In Abb. 5.1 ist ein solcher Elektrolyt gezeigt. Typischerweise haben die Elektrolyten einen Durchmesser von einigen mm und eine Dicke von einigen hundert μm .

5.1.3 Glasübergangstemperatur

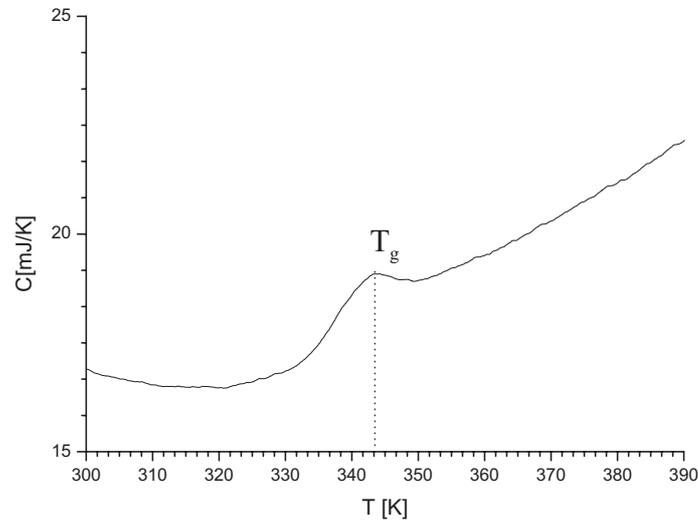


Abbildung 5.2: Differential Scanning Calorimetry (DSC) eines Elektrolyten. Aufgetragen ist die gemessene Wärmekapazität C_p gegenüber der Temperatur bei einer Heizrate von $10\text{K}/\text{min}$ (durchgeführt in der Arbeitsgruppe von Prof. Kitzerow (Universität Paderborn)). Der Peak bei $T_g = 344\text{K}$ und der Anstieg der Wärmekapazität ist charakteristisch für einen Glasübergang [89, 90].

Der amorphe Zustand eines Glases kann durch die Bestimmung der Glasübergangstemperatur charakterisiert werden. Wird eine Flüssigkeit schlagartig abgekühlt, kann keine Kristallisation stattfinden und die Flüssigkeit befindet sich in einem unterkühlten flüssigen Zustand. Wird diese Flüssigkeit erneut erhitzt, bis die Glasübergangstemperatur erreicht wird, so findet ein Übergang vom amorphen zum flüssigen Zustand statt, der sogenannte Glasübergang.

Von Gibbs und DiMarzio wurde ein Modell des Glasübergangs für Polymermoleküle entwickelt, die aus langen Kohlenstoffketten mit starren, gerichteten Bindungen unter festen Bindungswinkeln sowie variablen Seitengruppen bestehen [91, 92]. Da das in dieser Arbeit verwendete Metaphosphat eine ähnliche Kettenstruktur aufweist, kann diese Theorie zur Beschreibung des Glasübergangs verwendet werden. Man betrachtet hierbei die Freiheitsgrade der Rotation um Einfachbindungen. Beim Abkühlen gehen diese Freiheitsgrade sukzessive in die energetisch niedrigsten erreichbaren Zustände

über, was bei fortschreitender Abkühlung immer stärker die Wahlmöglichkeiten zwischen verschiedenen Konfigurationen des Gesamtmoleküls, also seine Flexibilität, einschränkt: Es wird zunehmend schwieriger für die Moleküle, Gitterplätze im Kristall einzunehmen, und die Konfigurationsentropie wird bei endlicher Temperatur Null. Insoweit ähnelt der Glasübergang einem Phasenübergang zweiter Ordnung nach der Ehrenfest-Klassifikation. Die erwähnte Schwierigkeit in der Packung der Kettenmoleküle hat aber auch kinetische Konsequenzen, sie bewirkt nämlich eine Steigerung der Viskosität sowie der Relaxationszeiten. Beim Glasübergang spielen also kinetische und thermodynamische Effekte eine Rolle, man sagt auch, der Glasübergang „überdeckt“ einen echten Phasenübergang zweiter Ordnung.

Die Änderung der Wärmekapazität charakterisiert den thermodynamischen Aspekt eines Glasübergangs. Wenn während eines Abkühlungsprozesses ein Freiheitsgrad aus dem thermodynamischen Gleichgewicht gerät, dann tragen Fluktuationen der mit diesem Freiheitsgrad verknüpften totalen Entropie S nicht mehr zur Wärmekapazität C_p bei (k =Boltzmann-Konstante):

$$\overline{\Delta S^2} = kC_p \quad (5.1)$$

Daher muss der Glasübergang bei sinkender Temperatur immer mit einer Abnahme der Wärmekapazität verknüpft sein.

In kalorimetrischen Experimenten (engl. Differential Scanning Calorimetry; DSC 2, Perkin Elmer, D) kann die Änderung der Wärmekapazität C_p mit steigender Temperatur gemessen werden. Ein Kalorimeter arbeitet nach dem adiabatischen Prinzip, die Probe wird thermodynamisch von der Umgebung isoliert. Die Messung erfolgt bei langsamer, stetiger Erwärmung. Aus der Auftragung der Wärmekapazität gegen die Temperatur kann die Glasübergangstemperatur bestimmt werden.

DSC-Messungen der Elektrolyten zeigen, dass der Übergang bei Temperaturen zwischen 320 K und 350 K stattfindet. Diese Ergebnisse stimmen mit den in der Literatur [93, 89] angegebenen Werten überein. Die in Abb.5.2 gezeigte DSC-Messkurve eines Elektrolyten zeigt den für einen Glasübergang typischen Verlauf mit einem Glasübergang bei $T_g = 344$ K. Diese Messungen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Kitzerow (Universität Paderborn) durchgeführt.

5.1.4 Transparenz

Die Transparenz der Elektrolyten wurde mittels eines Spektrometers (Lambda 25 UV/VIS Spectrometer, Perkin Elmer, D) untersucht und ist in Abb.5.3 gezeigt. Es wurden zwei 500 μm dicke Elektrolyten untersucht, wobei der eine (durchgezogene Linie) direkt

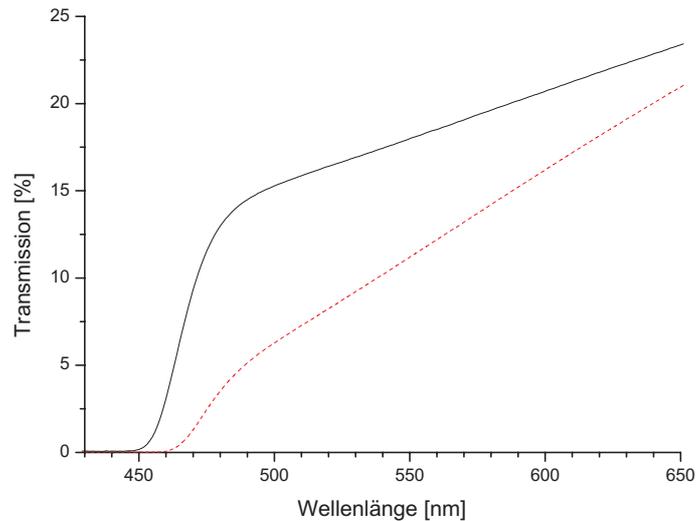


Abbildung 5.3: Transmission zweier $500 \mu m$ dicken Elektrolyten.

Die durchgezogene Kurve zeigt die Transmission eines frisch hergestellten, die gestrichelte Kurve die eines sieben Monate alten Elektrolyten in Abhängigkeit von der Wellenlänge.

nach seiner Herstellung und der zweite nach siebenmonatiger Lagerung unter Umgebungsbedingungen vermessen wurde. Die Transmission bei der im Aufbau verwendeten Wellenlänge von 532 nm liegt für den frischen Elektrolyten bei 17 % und für den gealterten nur noch bei 9 %. Wie fast alle Silbersalze neigt auch der Festkörperelektrolyt zur photochemischen Zersetzung; hierbei wird elementares Silber gebildet. Dieser Prozess verläuft analog zum photographischen Prozess in Filmen.

Durch eine unterschiedliche Transmission der Elektrolyten würde sich die Sensitivität der elektrolytischen Zelle und damit die Aperturgröße ändern. Daher wurden stets frisch hergestellte, oder in einem evakuierten Exsikkator im Dunkeln gelagerte Elektrolyten zur Aperturherstellung verwendet.

5.1.5 Oberflächenrauigkeit

Die Oberfläche der Elektrolyten sollte möglichst glatt und frei von Verunreinigungen sein, um einen guten Kontakt während des Öffnungsprozesses zu ermöglichen. Daher wurde die Oberfläche der Elektrolyten mit einem AFM (Bioscope, Nanoscope IIIa, Vee-

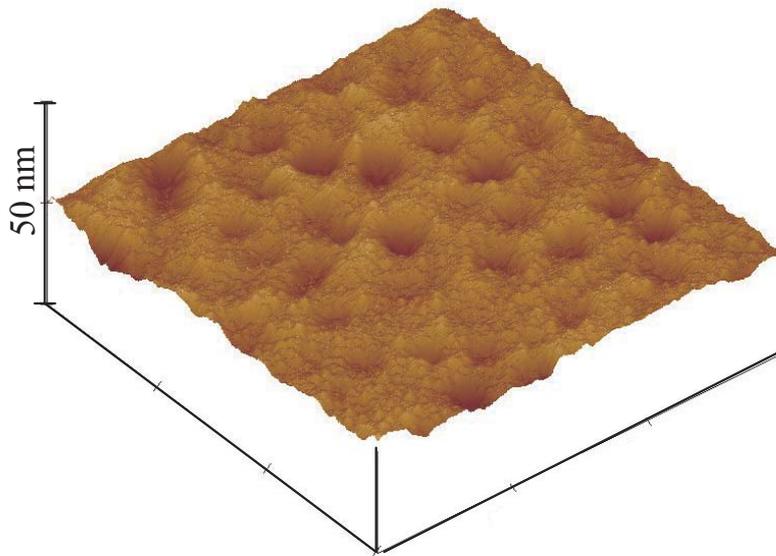


Abbildung 5.4: AFM-Rauhigkeitsmessung eines Elektrolyten.

Dreidimensionale Darstellung der Elektrolytoberfläche (Kantenlänge: $1.5\ \mu\text{m}$, Höhenskala: $10\ \text{nm}$).

co Instruments, USA) untersucht und die effektive Rauigkeit (RMS = Root mean square roughness) bestimmt. Abb.5.4 zeigt die drei-dimensionale Darstellung der Elektrolytoberfläche bei einer Höhenskala von $10\ \text{nm}$. Die Oberfläche besitzt eine effektive Rauigkeit von nur $2.1\ \text{nm}$. Das sorgt für einen guten Kontakt der gesamten Spitzenendfläche mit dem Elektrolyten und somit das gleichmässige Abtragen der Silberionen von der Spitze. Dieses ermöglicht die Fabrikation von Nahfeldsonden, die eine sehr flache und ebene Spitze aufweisen.

5.1.6 Die Elektrode

Ebenfalls entscheidend für die Eigenschaften der elektrolytischen Zelle ist die Wahl der Elektrode. Als Material bietet sich hierbei Silber an, da so von der Gegenelektrode die gleichen Ionen wieder mitgenommen werden können, die von der Nahfeldsonde abgetragen werden. Auf diese Weise (identische Elektrodenmaterialien) ist das elektrische Potential der Zelle gleich Null. Eine Elektrode aus Silberfolie ist für diesen Zweck ungeeignet, da die kleine Kontaktfläche mit dem Elektrolyten zu einem schlechten Stromfluss führen würde. Daher wurde hier die Elektrode durch thermisches Verdampfen von Sil-

ber auf den Elektrolyten aufgebracht. Die Mitte des Elektrolyten wird mit einer aus Aluminiumfolie hergestellten Maske bedeckt, so dass eine möglichst ringförmige Elektrode aufgedampft wird. Ist die Elektrode annähernd ringförmig, können die Silberionen isotrop von der Spitze, die möglichst in der Mitte des Elektrolyten plaziert wird, zur Kathode wandern. Die Schichtdicke der Silberelektrode beträgt üblicherweise 200-300 nm. Abb. 5.5 zeigt den Elektrolyten aus Abb.5.1 mit aufgedampfter Silberelektrode.



Abbildung 5.5: Der Elektrolyt aus Abb.5.1 mit aufgedampfter Silberelektrode.

Es ist sehr wichtig, den fertigen Elektrolyten vor Verunreinigungen durch H_2O und O_2 zu schützen, um Störströme zu vermeiden. Oxidation beeinträchtigt zudem die elektrochemischen Eigenschaften des Silbers und verschlechtert damit die elektrolytische Effizienz.

5.2 Aperturherstellung

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass der Festkörperelektrolyt $(AgI)_{0.5}(AgPO_3)_{0.5}$ sehr gut für den Materialtransport von Silber geeignet ist. Er besitzt alle Eigenschaften, die zur Erzeugung einer Apertur auf der Spitze einer Nahfeldsonde nötig sind. Die Transparenz des Elektrolyten im Wellenlängenbereich des verwendeten Lasers (532 nm), ermöglicht während des Öffnungsprozesses die Messung der von der Nahfeldsonde emit-

tierten Lichtintensität. Dies ist der Kontrollparameter zur Erzeugung von Aperturen einer bestimmten Größe.

Nachdem eine geeignete Methode zur Fabrikation der Nahfeldsonden gefunden war, musste geklärt werden, wie diese experimentell umgesetzt werden sollte. Wichtige Punkte hierbei waren die zu verwendende Abstandsregelung, Realisierung der elektrolytischen Zelle, Wahl einer günstigen Zellspannung und der zu erwartende Stromfluss.

Die experimentelle Umsetzung in Form der neu entwickelten Erosionsbox wird im folgenden Kapitel erläutert.

5.2.1 Experimenteller Aufbau



Abbildung 5.6: Erosionsbox mit zugehöriger Elektronik.

Es wurde ein vom Nahfeldmikroskop unabhängiger Aufbau realisiert, dessen Abstandsregelung auf der Messung des Tunnelstroms zwischen Spitze und Elektrolyt basiert. Diese neue Methode bietet entscheidende Vorteile gegenüber der Integration der Aperturöffnung in das SNOM [93], da die Abstandsregelung via Tunnelstrom sehr viel stabiler als über die Scherkraft ist. Zudem ist der Aufbau relativ kostengünstig, da weder ein Computer zur Steuerung, noch eine fokussierende Optik benötigt wird.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Erosionsbox zur Aperturherstellung bei Nahfeldsonden ist in Abb. 5.6 zusammen mit der zugehörigen Elektronik abgebildet. Die

Elektronik beinhaltet (von links nach rechts) die Regelung und Aufzeichnung der Piezobewegung, die Aufzeichnung des Lichtsignals vom PMT und die Motorsteuerung zur Grobannäherung. Der Aufbau ist in eine verschließbare Metallbox integriert, um den Öffnungsprozess vor störenden elektromagnetischen Feldern, akustischen Störungen und Hintergrundlicht zu schützen. Die Nahfeldsonde ist direkt an einem z-Piezo (P-810.10, PI) befestigt. Die Grobannäherung an den Elektrolyten erfolgt über einen DC-Getriebemotor (M 1616 C, Faulhaber), der eine Mikrometerschraube antreibt. Unterhalb der Sonde befindet sich der Photomultiplier (PMT: H 5784, Hamamatsu) zur direkten Kontrolle der von der Sonde emittierten Lichtintensität.

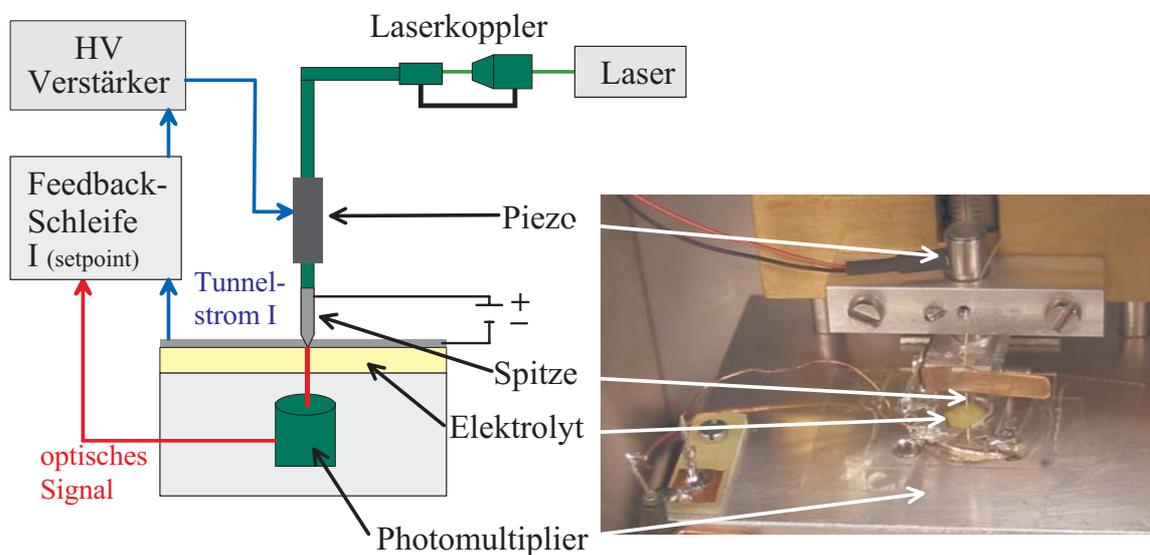


Abbildung 5.7: Schematischer Aufbau zur Aperturerstellung.

Der schematische Aufbau ist in Abb.5.7 gezeigt. Die elektrolytischen Zelle besteht aus einem dünnen Plättchen des Festkörperelektrolyten, der als Ionenleiter für die Silberionen dient und der aufgedampften ringförmigen Silberelektrode. Diese wird mit dem negativen Pol der Spannungsquelle kontaktiert. Zum anderen dient die angespitzte und mit Silber bedampfte Nahfeldsonde als positive Elektrode. Zwischen den beiden Elektroden wird eine Spannung von 200 mV angelegt. Über den Tunnelstrom wird der Abstand geregelt. Bei dem Regler handelt es sich um einen analogen PI-Regelkreis (PI: Proportional Integral), dessen Verstärkung und Dämpfung über Potentiometer einstellbar ist.

Eine grobe Annäherung der am Piezo befestigten Spitze erfolgt mit dem Getriebemotor. Sobald die Elektronik einen vorher definierten Sollwert von 10 pA detektiert, stoppt der Motor und der Piezo übernimmt die weitere Regelung. Dieser Sollwert ist ein experimentell ermittelter Wert, bei dem ein stabiler Tunnelstrom fließt, die Sonde jedoch weit genug von der Elektrolytoberfläche entfernt ist, um keinen mechanischen Schaden zu nehmen. Der Piezo regelt während des Öffnungsprozesses auf einen vorgegebenen Tunnelstrom.

Nun beginnt der Erosionsprozess und die Silberionen bewegen sich von der Spitze über den Elektrolyten zur Gegenelektrode. Folgende Reaktionen finden statt, für die Anode (Spitze):



und für die Kathode (Elektrolyt):



Vermutlich erfolgt dieser Materialtransport über einen stets auf dem Elektrolyten vorhandenen Wasserfilm. Da Material von der Spitze abgetragen wird, muss die Abstandsregelung die Spitze in einem gleichbleibenden Abstand zum Elektrolyten halten, d.h. der Piezo wird weiter ausgefahren, um den Tunnelstrom konstant zu halten. Diese kontinuierlich Annäherung wäre durch die Scherkraftregelung gar nicht möglich, da die Schwingung der Spitze durch den geringen Abstand zum Elektrolyten zu stark gedämpft würde, um die Abstandsregelung noch zu ermöglichen. Der Photomultiplier detektiert das aus der Apertur austretende Licht. Der Öffnungsprozess wird durch Zurückziehen des Piezos gestoppt, sobald der PMT einen vorher eingestellten Schwellenwert der Lichtintensität misst. Die Wahl der richtigen Schwellen-Intensität bestimmt dann die Größe der Apertur im Bereich zwischen 50 bis 100 nm .

5.2.2 Zeitliche Entwicklung

Die zeitliche Entwicklung des Öffnungsprozesses kann über ein LabView Programm aufgezeichnet werden und ist in Abb. 5.8 gezeigt. Die Graphen zeigen den Tunnelstrom und die vom PMT gemessene Lichtintensität, jeweils gegenüber der Zeit aufgetragen. Zu Beginn ist die Spitze noch einige mm vom Elektrolyten entfernt und der Stromwert schwankt um das Hintergrundsignal. Der Piezo ist voll ausgefahren, während der Motor die Spitze in Richtung Elektrolyt fährt. Nach $t = 185\text{ s}$ gibt es erste Kontakte und 6 s später wird der Schwellenwert von 10 pA erreicht. Der Piezo wird zurückgezogen und

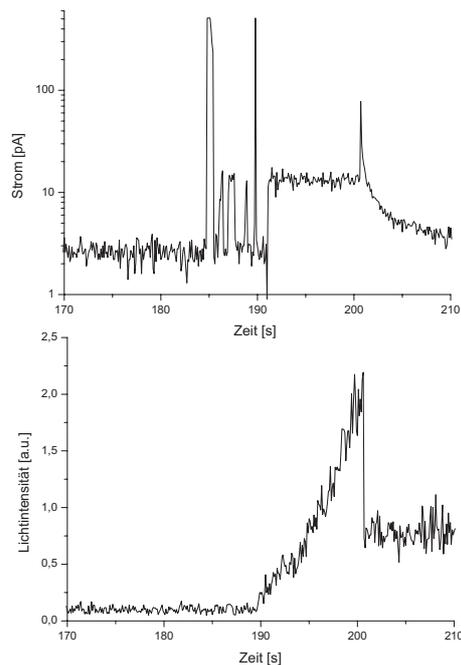


Abbildung 5.8: Zeitliche Entwicklung der Aperturöffnung.

Der Tunnelstrom und das Lichtsignal sind gegen die Zeit aufgetragen.

die Motorbewegung gestoppt. Die Elektronik regelt nun die Piezobewegung so, dass ein konstanter Strom von 10 pA während des Öffnungsprozesses fließt.

Der Öffnungsprozess beginnt, was deutlich am Anstieg der Lichtintensität zu beobachten ist. Nach weiteren 10 s wird der Kontakt zwischen Spitze und Elektrolyt durch Zurückziehen des Piezos unterbrochen, gekennzeichnet durch den Abfall des Stromsignals. Damit ist der Öffnungsprozess beendet und die fertige Apertursonde kann ausgebaut werden.

5.2.3 Ergebnisse

Die fertigen Apertursonden werden stichprobenartig durch elektronenmikroskopische Aufnahmen kontrolliert, denn nur so kann die geometrische Aperturgröße exakt bestimmt werden. Routinemässige Kontrollen werden nicht durchgeführt, denn jede Untersuchung im SEM birgt auch noch ein Risiko, die Spitze zu beschädigen. Abb.5.9a zeigt eine silberbedampfte Spitze vor dem Öffnungsprozess. Die Oberfläche ist vollständig mit

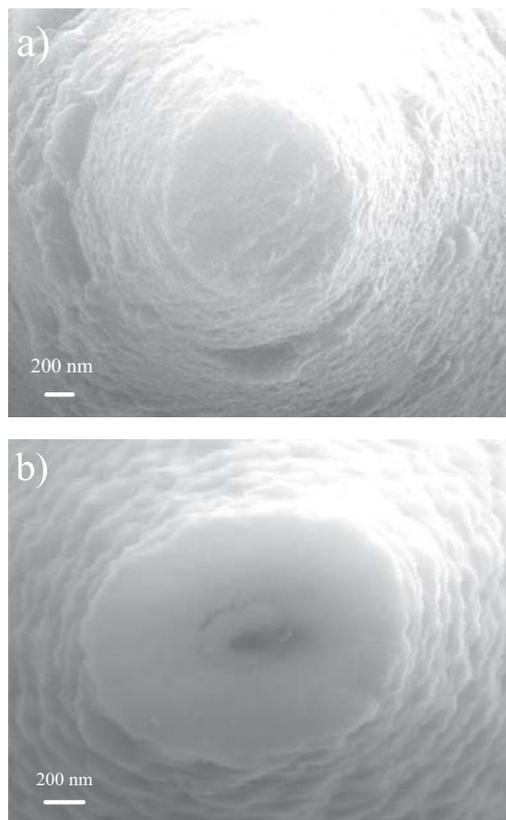


Abbildung 5.9: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer SNOM-Sonde vor a) und nach b) dem Öffnungsprozess.

a) es ist keine Apertur erkennbar. b) die Sonde besitzt eine Apertur mit einem Durchmesser von $\sim 90 \text{ nm}$, zu erkennen als dunkler Punkt, umgeben von einer flachen Endflächen.

Silber (Schichtdicke ca. 350 nm) bedeckt, es sind keine Öffnungen im Metallmantel zu erkennen.

In Abb.5.9b ist eine Sonde nach dem Öffnungsprozess gezeigt. In der Mitte der flachen Endfläche ist als dunkler Punkt eine runde Apertur mit einem Durchmesser von $\sim 90 \text{ nm}$ zu erkennen. Die im Rahmen dieser Arbeit reproduzierbar hergestellten SNOM-Apertursonden weisen flache Endflächen mit Aperturdurchmessern im Bereich von $50\text{-}90 \text{ nm}$ auf (Abb.5.10). Es konnten auch kleinere Aperturdurchmesser realisiert werden, allerdings waren diese für Fluoreszenzmessungen an Einzelmolekülen ungeeignet, da die abgestrahlte Lichtintensität zur Anregung der Fluoreszenz zu gering war.

Die Rauigkeit der Sondenendflächen ist geringer als bei den meisten anderen Techniken.

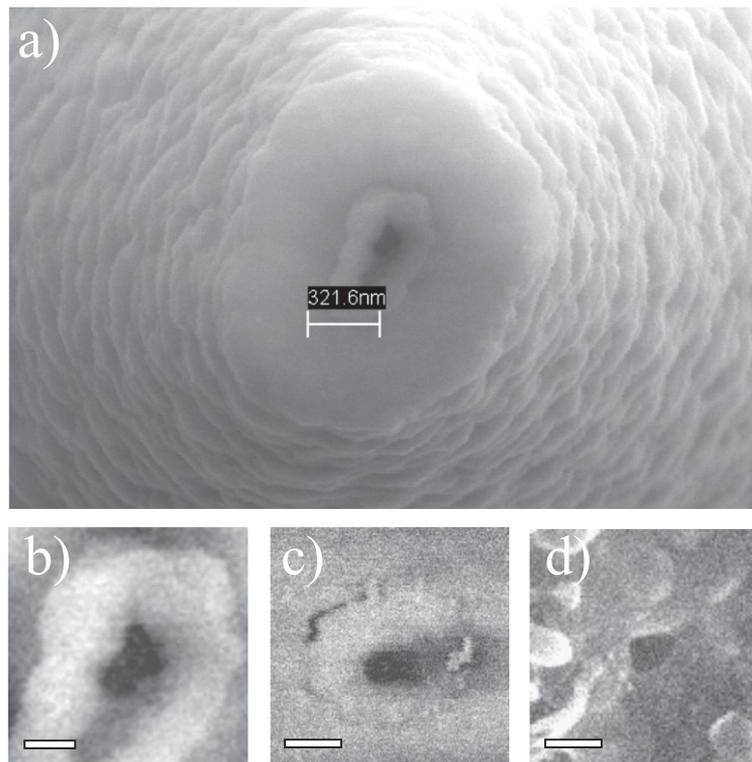


Abbildung 5.10: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von drei routinemässig hergestellten SNOM-Sonden.

Die Sonden haben Aperturen mit Durchmessern $\leq 100 \text{ nm}$ umgeben von flachen Endflächen. b) zeigt eine Nahaufnahme von a), in c) und d) sind die Aperturen von zwei weiteren Sonden abgebildet. Die Skala in b) bis d) entspricht 100 nm . Der Aperturdurchmesser der in d) gezeigte Sonde beträgt nur 60 nm .

Nur mit der *focused ion beam* Technik hergestellte Spitzen besitzen noch glattere Endflächen. Hierbei befreit ein Ionenstrahl das Sondenende von Staub und hochstehenden Metallclustern [73]. Es wurde immer wieder vermutet, dass Topographie-Artefakte vielfach durch die Rauigkeit der Spitze und der Probe verursacht werden [57, 94, 95], daher ist es sehr wichtig, dass die Sondenenden möglichst flach sind. Zusätzlich ermöglicht es eine flache Spitze, näher an die Probenoberfläche heranzukommen, und erhöht damit die Nahfeldwechselwirkungen [96].

6 Probenpräparation

6.1 Allgemeines

6.1.1 Substrat

Um mit dem SNOM Biomoleküle abbilden zu können, sind sehr flache Substratoberflächen nötig, deren Rauigkeit kleiner als die Molekülgröße ist. Da das SNOM in Transmission betrieben wird, muss das Substrat für die Proben zusätzlich lichtdurchlässig sein. Ein Substrat, das diese Bedingungen erfüllt, ist Glas. Zur Herstellung der Proben werden Deckgläschen der Dicke 0.2 mm mit einem Durchmesser von 20 mm verwendet. Glas hat die amorphe Struktur einer erstarrten Flüssigkeit, die nur eine Nahordnung, jedoch im Gegensatz zu Kristallen keine Fernordnung besitzt. Glas besteht aus Silikationen, die aus SiO_4 -Tetraedern mit eingelagerten Metallkationen aufgebaut sind. Die Oberflächenchemie von Glas wird in erster Linie durch die Silanol-Gruppen (Si-OH) bestimmt, weshalb in wässrigen Lösungen Glas auch negativ geladen ($-\text{OH} \rightarrow -\text{O}^- + \text{H}^+$) und hydrophil ist.

Sowohl zur Herstellung der verwendeten Puffer, als auch für die verschiedenen Reinigungsschritte wird Reinstwasser von Milli-Q (Millipore, USA) verwendet.

Für gute Resultate ist es wichtig, dass das Glassubstrat extrem sauber ist. Die Deckgläschen wurden im Ultraschallbad nacheinander mit Aceton, Ethanol und Millipore-Wasser gereinigt und mit Stickstoff trocken geblasen. Anschliessend wurden sie im UV-Reiniger durch zweiminütiges Beglimmen hydrophilisiert.

6.1.2 Funktionalisierung der Substratoberflächen

Die Substratoberflächen werden nach der Reinigung noch zusätzlich funktionalisiert, um Biomoleküle immobilisieren zu können. Zur Funktionalisierung von Oberflächen kann man Silane aufbringen, deren Kopfgruppen die chemischen Eigenschaften bestimmen.

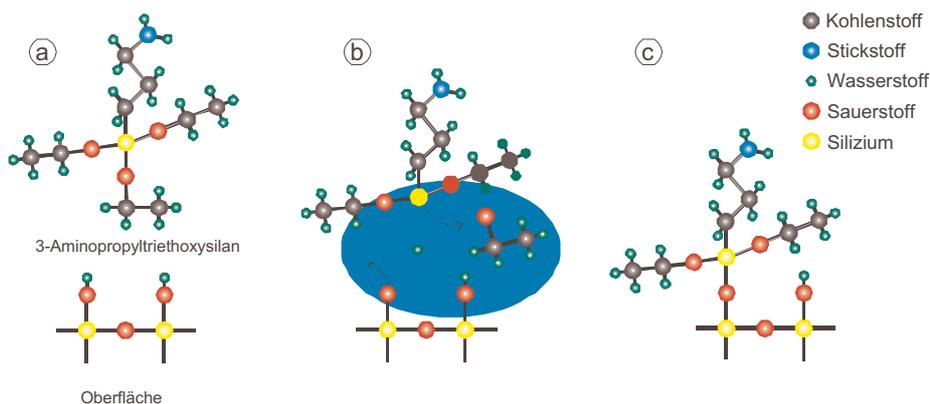
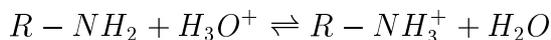


Abbildung 6.1: 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES).

Chemische Struktur von APTES (a), das durch eine Reaktion mit einer Hydroxy-Gruppe der Oberfläche (b) kovalent an die Oberfläche bindet (c).

Die Silane reagieren mit den Silanol-Gruppen und binden kovalent an die Oberfläche (Abb.6.1). Die kleinste Distanz zwischen den aktiven Silanol-Gruppen beträgt 6-7 Å. In dieser Arbeit wurde 3-Aminopropyltriethoxysilan ((C₂H₅O)₃SiC₃H₆NH₂; APTES, Sigma, D) benutzt, um die Oberfläche durch Protonierung der Aminogruppe durch die Gleichgewichtsreaktion



positiv zu laden. Für die Reaktion ist die Anwesenheit von Wasser notwendig [97, 98]. Für die Funktionalisierung der Glasoberfläche mit APTES gibt es verschiedene Möglichkeiten. Man kann z.B. die Oberfläche für einige Minuten in eine 2% ige APTES/Toluol Lösung eintauchen und anschliessend mit Toluol spülen. Die so funktionalisierten Oberflächen sind allerdings sehr rau, daher wurde das APTES in dieser Arbeit aus der Gasphase abgeschieden [99]. Die gereinigten Deckgläschen wurden dafür in einen Exsikkator ca. 5 cm oberhalb eines mit einigen ml APTES betropften Uhrglases positioniert. Der Exsikkator wird bis ca. 10 mbar abgepumpt, hierbei muss der Druck so langsam abgesenkt werden, dass es nicht zu einer schnellen Verdampfung und Aerosolbildung kommt. Würde zu schnell oder zu stark abgepumpt, so würde Nebelbildung eine rauhe Oberfläche verursachen. Nachdem die Glasplättchen ca. 30 min bedampft wurden, wurde der Exsikkator belüftet und die Proben entnommen. H. Kleine konnte in seiner Doktorarbeit zeigen, dass das APTES sowohl auf Glas-, wie auch auf Glimmeroberflächen seine Eigenschaften mit der Zeit unter Umgebungsbedingungen verändert (Abb.6.2 aus [97]).

Je nach Luftfeuchtigkeit war die Probe nach 1 bis 48 Stunden zu alt, um verlässlich Biomoleküle binden zu können. Daher wurden die Proben immer unmittelbar nach dem Funktionalisieren auf die Glasplättchen aufgebracht.

Die so funktionalisierten Oberflächen eignen sich sowohl zur Immobilisierung von DNA-Molekülen, als auch von Antikörpern.

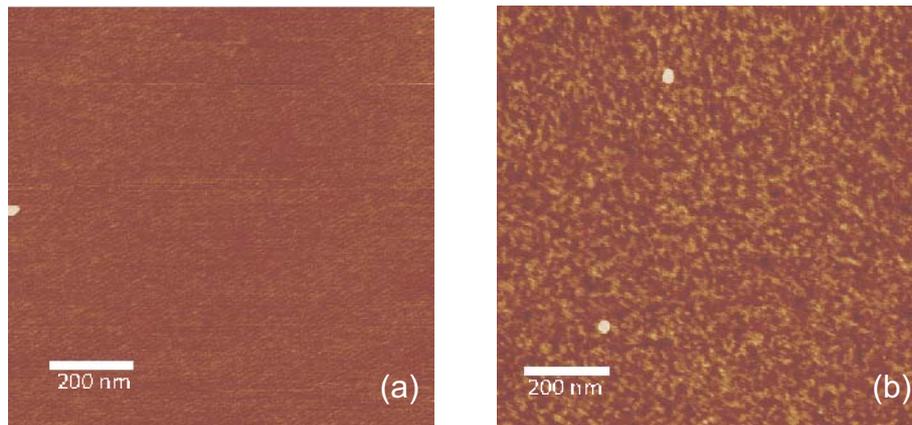


Abbildung 6.2: AFM-Aufnahme von silanisiertem Glimmer aus [97].

(a) Glimmer kurz nach dem Silanisieren. (b) Der gleiche Glimmer nach 4 Tagen. Auf der Oberfläche ist deutlich die Bildung von Domänen zu erkennen.

6.2 Nanostruktur

Nanostrukturen sind sehr nützlich zur Bestimmung der Abbildungseigenschaften eines Rastersondenmikroskops. Diese Eigenschaften hängen auf der einen Seite von der aktuellen Sonde und auf der anderen Seite von der Elektronik und den Rasterelementen ab. Während die grundlegenden Eigenschaften des Mikroskops einmal charakterisiert und kalibriert werden können und sich danach nicht mehr grundlegend ändern sollten, ändert sich die Güte der Auflösung von Sonde zu Sonde. Sogar für eine Sonde und dieselbe Probe können sich die Eigenschaften während des Abbildens ändern. Daher ist es wichtig, die Sonden systematisch zu charakterisieren. Zu diesem Zweck sollte solch eine Testprobe einfach zu handhaben sein. Ist die genaue Geometrie der Nanostrukturen bekannt, so kann die aktuelle Form der Sonde (Apertur) aus der optischen Abbildung bestimmt werden.

Eine für das SNOM geeignete periodische Transmissions-Nanostruktur ist eine Aluminiumstruktur auf einer Glasoberfläche, die sogenannte Fischer-Probe [100]. Diese wird hergestellt, indem eine Monolage Latex-Kügelchen (hexagonal dichteste Kugelpackung) mit einem Durchmesser von 450 nm auf ein Deckgläschen aufgebracht werden [101]. Danach wird das Gläschen mit Aluminium bedampft und die Kügelchen zum Schluss im Ultraschallbad abgespült.

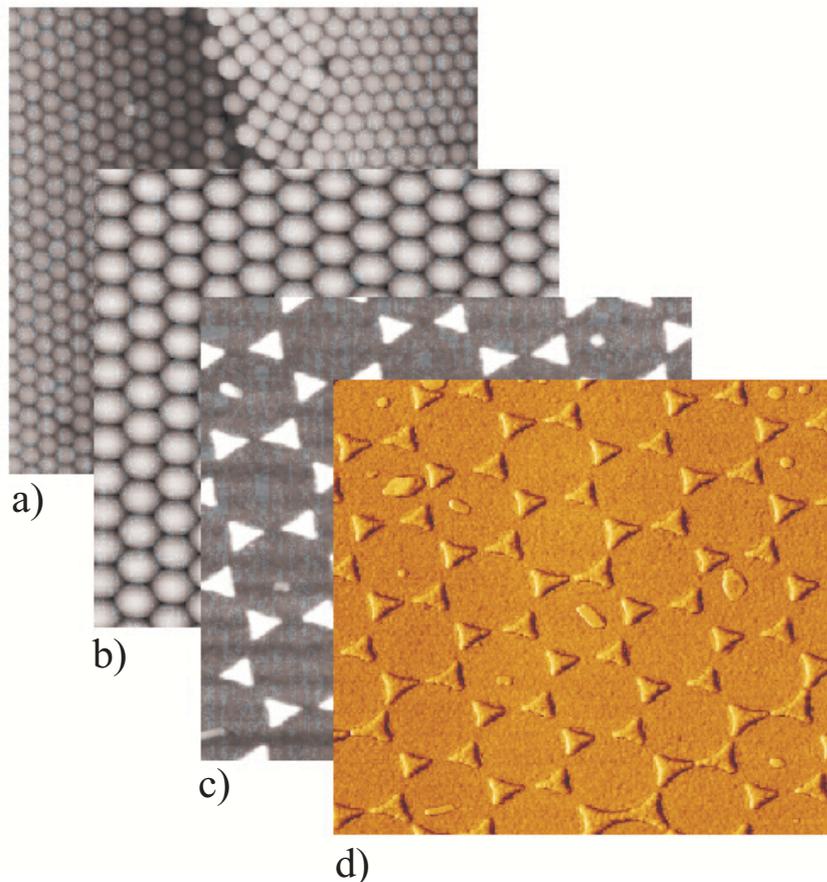


Abbildung 6.3: Herstellung der Fischer-Probe (Quelle: www.kentax.de).

a) Monolage (links) und Doppellage (rechts) von auf einem Deckgläschen absorbierten 450 nm Kügelchen. b) Metallfilm und Separation der Monolagen-Bereiche. c) Probe nach dem Entfernen der Kügelchen (AFM Höhenkontrast ca. 15 nm). d) Phasenkontrastbild gemessen im AFM Tappingmodus.

Abb.6.3 zeigt die einzelnen Schritte. Man erhält dann eine Glasoberfläche mit hexagonal angeordneten dreieckigen Metallinseln (Höhe ca. 15 nm), was schematisch in Abb.6.4 dargestellt ist. Um die Größe der Metallinseln abzuschätzen, wird die Höhe eines gleichseitigen Dreiecks als Standard benutzt. Die Länge dieser Höhe beträgt $h = (\sqrt{3} - 3/2)d \approx 0.23 d$, wobei d der Kugelradius ist. Für die $d = 450\text{ nm}$ Latexkugeln ist damit diese Höhe $h \approx 100\text{ nm}$.

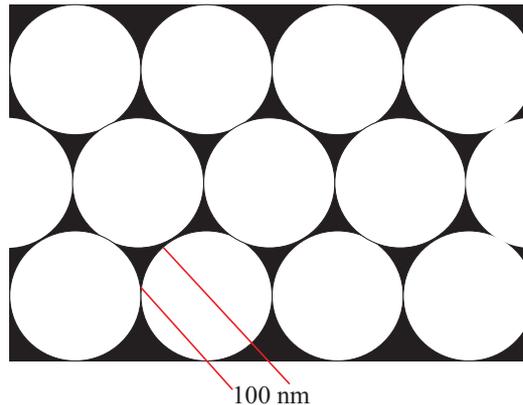


Abbildung 6.4: Schematische Darstellung der Aluminium-Teststruktur.

Der Metallfilm ist hexagonal, entsprechend der Zwischenräume zwischen den 450 nm Latexkugeln, angeordnet.

In Abb.6.5 ist ein mit dem SNOM aufgenommenes Topographiebild der Fischerprobe zu sehen. Die hexagonal angeordneten dreieckigen Al-Inseln werden deutlich wiedergegeben, an manchen Stellen sind größere Al-Felder zu erkennen, die auf Fehlstellen in der ehemaligen dichtesten Kugelpackung der Latexkugeln zurückzuführen sind. Die Größe der Metallinseln wird mit $h \approx 100\text{ nm}$ korrekt wiedergegeben.

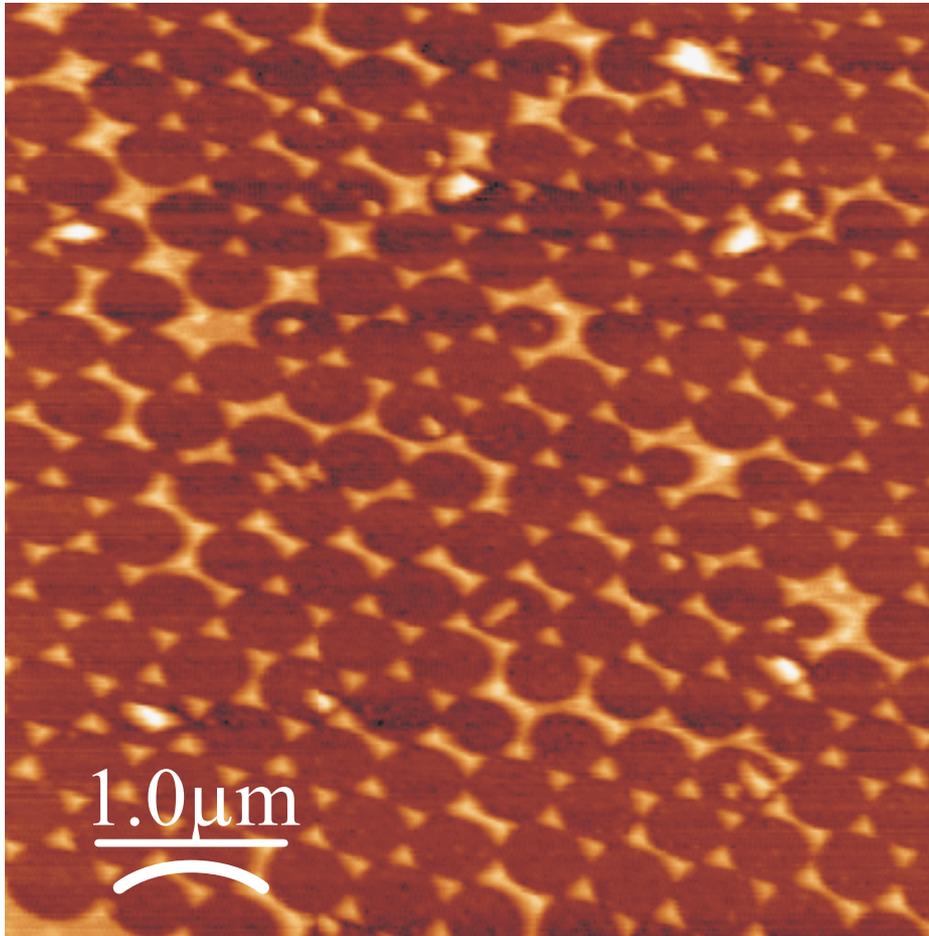


Abbildung 6.5: Scherkraftmessung der Aluminium-Teststruktur ($5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$, 512×512 Pixel, Höenskala = 100 nm).

Die dreieckigen Al-Inseln (hell) und die Glasflächen, auf denen sich die Kugeln beim Bedampfen befanden, sind deutlich aufgelöst.

6.3 Fluoreszenzproben

Die Sondencharakterisierung ist auch mittels fluoreszierender Proben möglich. Diese Proben sollten folgende Anforderungen erfüllen:

- stark fluoreszieren
- langsam gebleicht werden
- kleine Dimensionen, zum Testen hoher Auflösungen
- entweder ein klares Topographiesignal, dies ermöglicht die Korrelation von Fluoreszenz und Topographie
- oder keine Topographie (ebene Probe), dann kommt es nicht zu Topographieartefakten

Zur Charakterisierung der elektrolytisch hergestellten Apertursonden wurden daher zum einen Kügelchen verwendet, die stark fluoreszieren und ein deutliches Topographiesignal liefern (siehe Kap.6.3.2). Zum anderen Einzelmoleküle, die eine minimale Ausdehnung haben, was sie sehr geeignet zur Bestimmung der optischen Auflösung macht (siehe Kap.6.3.3 und 6.3.1).

6.3.1 Einzelne Farbstoffmoleküle

Als stabile Einzelmolekülproben gelten in Polymerfilme eingebettete Farbstoffmoleküle, da sie dem Luftsauerstoff weniger ausgesetzt sind. Die hier verwendete Probe besteht aus Rhodamin 6G-Farbstoffmolekülen (R6G, # 83697, Fluka, D) eingebettet in Polyvinylalkohol (PVA). Abb.6.6a zeigt die Struktur des R6G-Moleküls und b) das Absorptions- und Emissionsspektrum. Das Anregungs- bzw. Emissionsmaximum liegt bei 528 nm bzw. 550 nm. Der Farbstoff wurde mit 532 nm Laserlicht angeregt. Eine Lösung von R6G in Methanol wurde so zu einer 1 wt% Lösung von PVA ($7.2 \times 10^{-4} \text{ g/mol}$) in 1:1 Methanol-Wasser hinzugefügt, dass die Konzentration der R6G-Moleküle 1 nM relativ zum PVA Volumen war [102, 103]. Diese Lösung wurde dann im Spincoater bei 400 U/min (30 s) auf ein gereinigtes Deckgläschen aufgeschleudert. Der solchermaßen hergestellte Polymerfilm weist eine Dicke von ca. 30 nm auf.

Diese Probe hat den Vorteil, dass es nicht zur Beeinflussung des optischen Signals durch die Topographie kommt. Man kann also die "rein"optische Auflösung bestimmen. Allerdings kann man bei dieser Probe nicht das Fluoreszenzsignal mit der Topographie korrelieren.

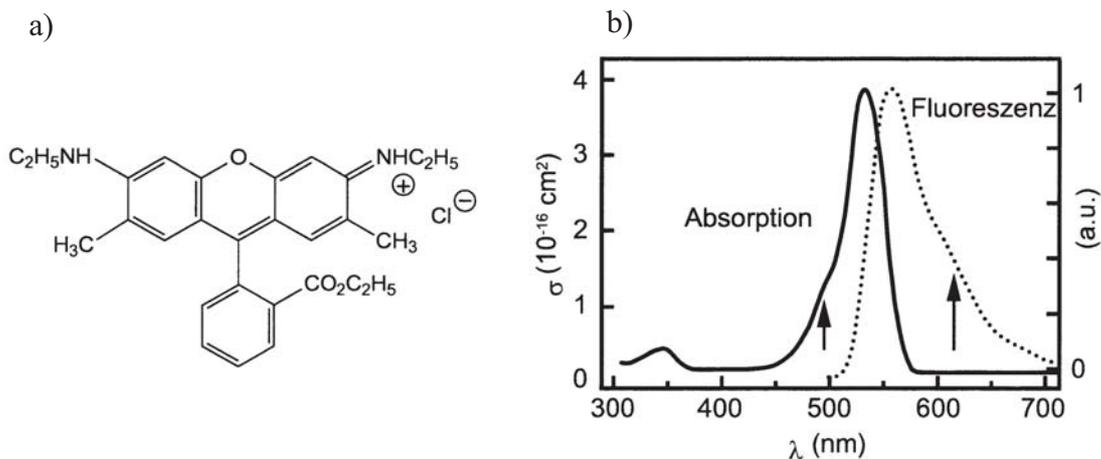


Abbildung 6.6: a) Strukturformel, b) Absorptions- und Emissionsspektrum von R6G.

6.3.2 Fluoreszierende Kügelchen (Microspheres)

Fluoreszierende Kügelchen (Fluorescent Microspheres F8784 Nile Red (535/575), Molecular Probes, [104]) werden auf einem gereinigten Deckgläschen verteilt. Die Farbstoffe, mit denen die Kügelchen markiert sind, sind in verschiedenen Wellenlängenbereichen anregbar. Die in dieser Arbeit verwendeten haben ein Anregungs- bzw. Emissionsmaximum von 530 nm und 640 nm. Der Farbstoff wurde mit 532 nm Laserlicht angeregt. Die Durchmesser der Kügelchen streuen, entgegen den Herstellerangaben von 20 nm, im Bereich von 3-30 nm (siehe AFM-Aufnahme, Abb.6.7). Diese Größenordnung entspricht typischerweise biologischen Makromolekülen. Solche Kügelchen mit einer breiten Größenverteilung sind zur Charakterisierung von Sonden gut geeignet. Sowohl die optische, als auch die topographische Auflösung läßt sich anhand der Halbwertsbreite kleiner Kügelchen, deren Durchmesser deutlich kleiner als die Auflösung ist, bestimmen. Große Kügelchen enthalten dagegen mehr Farbstoff und geben ein deutlich helleres Signal. Anhand großer Kügelchen läßt sich auch der Fernfeldanteil abschätzen: Kleine Kügelchen werden vollständig vom Nahfeld beleuchtet, große dagegen nur an ihrer Oberfläche. Zur Herstellung der Proben werden die gereinigten Deckgläschen benutzt. Um die Kügelchen zu fixieren, werden 40 μl einer 0.5 mg/ml konzentrierten Lösung von Rinderserumalbumin (BSA) auf das Deckgläschen gegeben und nach zwei Minuten mit Stickstoff trocken geblasen. Das BSA ist als Klebstoff notwendig, da die Kügelchen sonst von der Sonde auf der Oberfläche verschoben werden. Auf die BSA-Schicht werden 100 μl einer

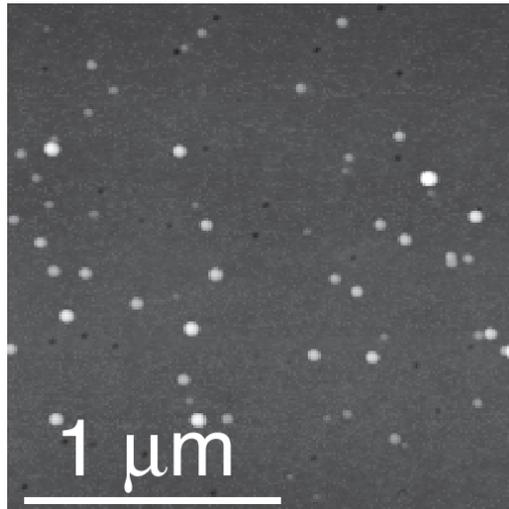


Abbildung 6.7: AFM-Aufnahme von fluoreszierenden, auf Glas fixierten Kügelchen (aus [75]).

Normalerweise sollten die Kügelchen einen Durchmesser von ca. 20 nm haben, aber es sind auch deutlich kleinere zu erkennen.

auf 0.02% Festkörpergehalt verdünnten Lösung von Fluoreszenzkügelchen aufgebracht. Da das BSA die Glasoberfläche wieder hydrophob gemacht hat und sich die Lösung nicht richtig auf der Oberfläche verteilt, wurde der Tropfen mit der Pipettenspitze etwas auseinander gestrichen. Nach einer Minute wurde die Lösung, bis auf die immobilisierten Kügelchen, mit Stickstoff vom Deckglaschen geblasen.

6.3.3 Fluoreszenzmarkierte DNA

Zur Herstellung der DNA-Proben wird die λ -DNA-Stammprobe (Promega, USA) 1:200 mit TE-Puffer (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH=8.0) verdünnt. Als interkalierender Farbstoff wird POPO-3 (P-3584, 1 mM Lösung in Dimethylformamid (DMF), Molecular Probes, D) verwendet. Die POPO-3-Stammlösung wird mit dem TE-Puffer 1:1000 auf eine $1 \mu\text{M}$ Konzentration verdünnt.

Immobilisierung

Die DNA-Moleküle werden durch inkubieren auf der silaniserten Glasoberfläche immobilisiert. Dabei werden $0.5 \mu\text{l}$ der DNA-Lösung auf ein silanisertes Deckglaschen pipettiert und die Probe auf einen Gummiring in einer wassergefüllten Schale gelegt. Bei

geschlossenem Deckel wird die Probe ca. 10 min stehen gelassen. Da in dem Gefäß die Luftfeuchtigkeit sehr hoch ist, kann der Tropfen nicht verdunsten, weshalb nur der Teil der DNA an die Oberfläche bindet, der während der Einwirkzeit mit der Oberfläche wechselwirken kann. Der nicht gebundene Rest und die Salze des Puffers werden mit Milliporewasser abgespült und die Probe anschliessend mit Stickstoff trocken geblasen. Die DNA wird hierbei durch die Anlagerung der im Puffer enthaltenen Ionen am Rückgrat der DNA leicht gestreckt.

Nun wird ein Tropfen der POPO-Lösung auf die immobilisierte DNA aufgebracht und ca. 3 min inkubiert. Zum Schluss wird die Probe noch einmal mit Milliporewasser gespült und mit Stickstoff trocken geblasen.

6.3.4 Fluoreszenzmarkierte Antikörper

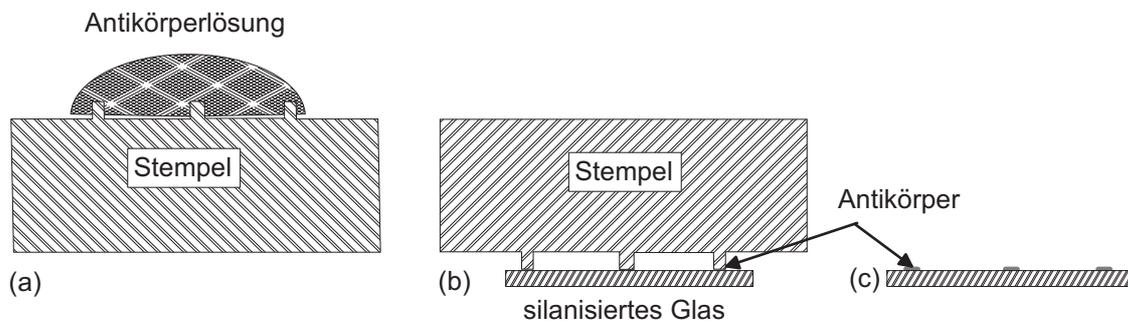


Abbildung 6.8: Lokalisierte Immobilisierung.

Zur Herstellung von Oberflächen mit separierten IgG-Feldern wird ein Tropfen der Antikörperlösung auf einem Polymerstempel mit regelmässiger Linienstruktur inkubiert (a). Die nicht gebundenen Moleküle und Reste der Pufferlösung werden mit Milliporewasser abgespült. Die auf den hochstehenden Stempelstrukturen gebundenen IgG-Moleküle werden dann auf eine silanisierte Glasoberfläche gestempelt (b). Man erhält eine Probe mit linienförmig lokalisierten Antikörpern.

Nach den Transmissions-Testmessungen zur Charakterisierung der Spitzen und des gesamten Aufbaus wurden ebenfalls Fluoreszenzmessungen an mit Alexa 532 markierten Antikörpern (Immunglobulin G (Goat Anti-Rabbit IgG), A-11009, Molecular Probes, D) durchgeführt. Um eine biologische Fluoreszenzprobe mit definierten geometrischen Strukturen herzustellen, wurde eine Methode auf der Grundlage der Mikro-

Stempeltechnik (engl. Micro Contact Printing, MCP) [105] verwendet. Dazu werden $10\ \mu\text{l}$ einer 1:100 mit Phosphatpuffer (pH=7.0) verdünnten IgG-Lösung ($13\ \mu\text{M}$) auf einen Polymerstempel aus Poly-Dimethyl-Siloxan (PDMS; Sylgard 184, Dow Corning, D) pipettiert, so dass die Lösung die Stempeloberfläche bedeckt (Abb.6.8(a)).

Die Stempelherstellung erfolgt durch PDMS-Abformung einer CD-Struktur (Spurbreite $1.6\ \mu\text{m}$, pit-Breite $0.6\ \mu\text{m}$). Das zu Beginn noch nicht vernetzte Vorpolymer (engl. base) des PDMS wurde im Verhältnis 1 : 10 mit dem für die Vernetzung zuständigen Vernetzer (engl. curing agent) gründlich verrührt. Anschliessend wird das Gemisch über eine CD-Struktur (ohne Schutzschicht) gegossen und für ca. 15 Minuten stehen gelassen, damit die entstandenen Gasbläschen entweichen können. Verbleibende grössere Gasbläschen werden durch vorsichtiges Abblasen mit Stickstoff beseitigt. Die Polymerisation erfolgt dann für 3 Stunden in einem Ofen bei 75°C . Danach kann das ausgehärtete Polymer von der CD-Oberfläche abgelöst werden und in Stempel zurecht geschnitten werden.

Die Antikörper werden ca. 45 min auf der Stempeloberfläche inkubiert, dabei wird der Stempel auf einen Gummiring in einer mit Wasser gefüllten Schale gelegt, um das Verdunsten des Wassers zu verhindern. Anschliessend wird der Stempel mit dem Phosphatpuffer und Milliporewasser gespült und mit Stickstoff trocken geblasen. Der Stempel wird über einem silanisierten Glasplättchen positioniert und mit dem Substrat durch sein eigenes Gewicht und Adhäsionskräfte für ca. 1 s in Kontakt gebracht (Abb.6.8(b)). Man erhält auf diese Weise eine linienförmig lokalisierte Probe für das SNOM (Abb.6.8(c)), bei der das topographische und optische Signal einander leicht zugeordnet werden können. Die gestempelten Flecken bestehen aus einer Monolage eng gepackter Proteine mit einer Größe von $10\ \text{nm}$.

7 Resultate und Diskussion

Um die Qualität der elektrolytisch hergestellten Apertur-Nahfeldsonden zu bestimmen, wurden zunächst Messungen an verschiedenen Testproben durchgeführt. Einzelmolekülmessungen an R6G-Molekülen in einer Polymermatrix und fluoreszent markierter DNA zeigen die guten Abbildungseigenschaften der Nahfeldsonden. Grundsätzlich wurden alle Messungen im Modus *konstanter Kraft* vorgenommen. Aufgrund der geringen Lichtintensität wurde bei den Fluoreszenzmessungen generell die APD als Detektor verwendet.

7.1 Sondencharakterisierung

7.1.1 Transmissionsmessungen der Fischer-Probe

Das erste Experiment, das mit dem in dieser Arbeit verwendeten Mikroskop durchgeführt wurde, sollte dessen Funktionsfähigkeit beweisen und die Charakterisierung der elektrolytisch hergestellten Sonden ermöglichen. Daher wurden zunächst Transmissionsmessungen an der in Kapitel 6.2 beschriebenen periodischen Aluminium-Teststruktur durchgeführt und damit das optische Auflösungsvermögen der Sonden bestimmt. Aufgrund der hohen Lichtintensität bei diesen Messungen wurde der PMT als Detektor verwendet. Bei SNOM-Messungen hält man den Abstand Sonde-Probe normalerweise auf einem konstanten Wert, um zusammen mit dem optischen Bild simultan ein Topographiebild der Probe zu erhalten. Da das Topographiesignal seinen Ursprung in einer komplett anderen physikalischen Wechselwirkung zwischen Probe und Sonde hat als das optische Signal, erwartet man nicht, dass das optische und Topographiesignal die gleiche Auflösung zeigen. Hecht et al. [57] konnten zeigen, daß viele veröffentlichte SNOM-Aufnahmen, bei denen das doch der Fall war, durch Topographieartefakte beeinflusst wurden.

In Abb.7.1 ist eine typische Aufnahme der Teststruktur mit einer elektrolytisch hergestellten Sonde zu sehen. Das linke Bild zeigt die Topographie und das rechte das

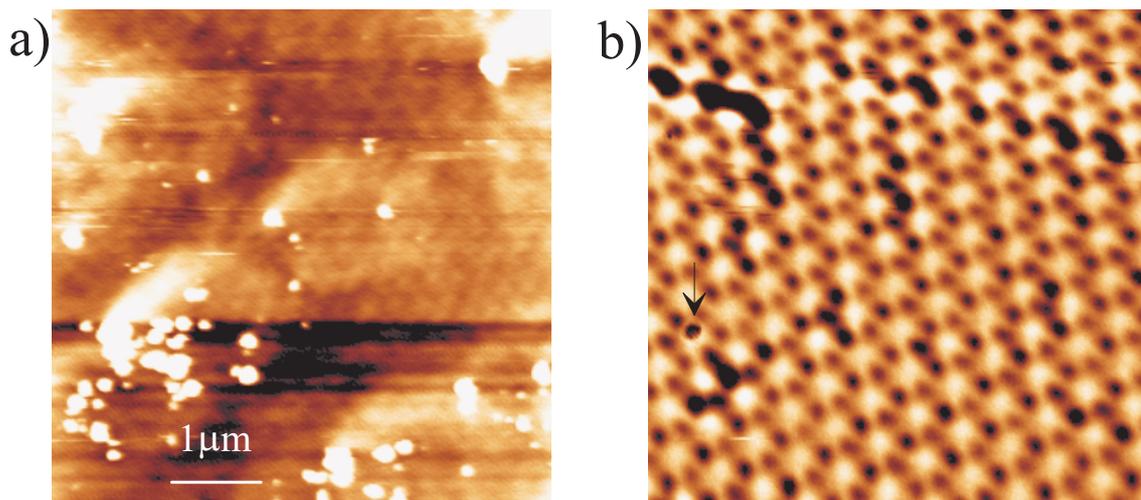


Abbildung 7.1: Aufnahme mit einer optisch hoch auflösenden Sonde.

Dreieckige Al-Inseln auf einer Glasoberfläche. a) Topographie und das simultan gemessene b) Transmissionsbild. An der mit einem Pfeil gekennzeichneten Stelle ist in b) ein Topographieartefakt zu sehen.

entsprechende Transmissionsbild. Die Auflösung des Topographiebildes ist, begründet durch eine nicht sehr scharfe Spitze, ziemlich schlecht, man erkennt gerade noch hexagonal angeordnete Partikel, die von mehreren größeren Partikeln (hell) auf der Oberfläche überdeckt werden. Das Transmissionsbild hingegen zeigt eine gute Auflösung, die offensichtlich in den meisten Bereichen nicht von der Topographie beeinflusst wird. Nur an wenigen Stellen, wie z.B. an der mit dem Pfeil gekennzeichneten (Abb.7.1b), scheint es sich um ein Topographieartefakt, vermutlich hervorgerufen durch einen Schmutzpartikel (Abb.7.1a), zu handeln. Deutlich erkennt man die hexagonal angeordneten Al-Inseln (dunkel), wobei allerdings die Dreiecksform durch den Einfluss der Apertur zu einem Punkt verwaschen wurde. An manchen Stellen sind größere dunkle Bereiche zu erkennen, diese sind auf Fehlstellen in der dichtesten Kugelpackung der Latexkugeln und dadurch entstandene größere Metallbereiche zurückzuführen.

Um das optische Auflösungsvermögen einer Sonde für die Al-Teststruktur bestimmen zu können wird ein Ausschnitt aus Abb.7.1b verwendet. Abb.7.2a zeigt den verwendeten Ausschnitt und den zugehörigen Querschnitt. Eine weit verbreitete Methode zur Bestimmung der Auflösung ist das sogenannte 10% – 90% Kanten-Kriterium (siehe Kap.2.1.4). Die so bestimmte optische Auflösung dieser Sonde für diese Messung der Teststruktur ist besser als 90 nm.

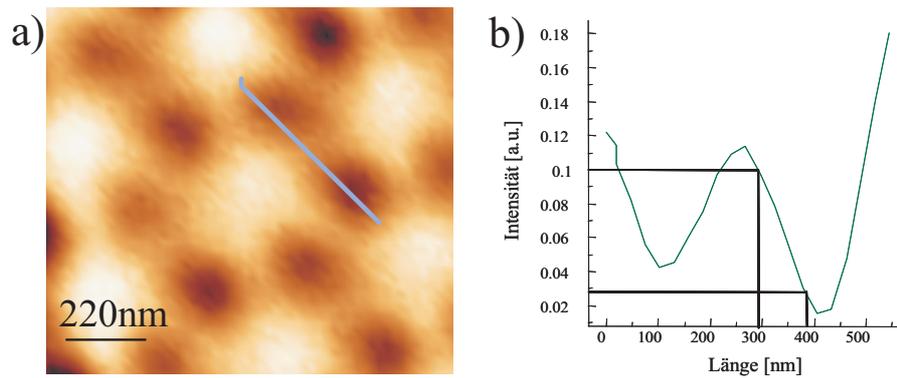


Abbildung 7.2: Bestimmung des optischen Auflösungsvermögens einer Sonde. a) Ausschnitt aus Abb.7.1a. b) Zu a) gehöriger Querschnitt. Der Querschnitt entspricht dem in a) mit einer Linie gekennzeichneten Bereich. Die mit Hilfe des 10% – 90% Kanten-Kriterium bestimmte optische Auflösung ist besser als 90 nm.

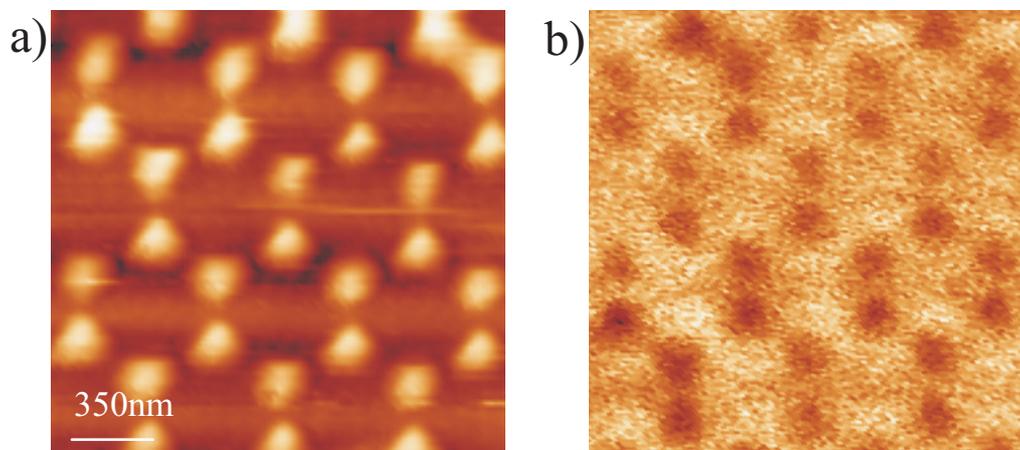


Abbildung 7.3: Aufnahme mit einer topographisch hoch auflösenden Sonde. Hier ist die topographische Auflösung a) sogar besser als die optische b).

Manche Sonden liefern nicht nur eine gute optische, sondern auch eine gute -oder sogar bessere- topographische Auflösung. Abb.7.3 zeigt wiederum eine Aufnahme der Teststruktur, aber mit einer anderen Sonde. Die topographische Auflösung dieser Sonde ist gut, die dreieckige Form der Al-Inseln wird in den meisten Fällen gut wiedergegeben. Die optische Auflösung dieser Sonde ist hingegen schlechter, als die der bei Abb.7.3 verwendeten Sonde. Die hexagonale Anordnung der Inseln ist zwar deutlich zu erkennen, aber die meisten werden kreisförmig dargestellt. In diesem optischen Bild sind keine Topographieartefakte erkennbar.

7.1.2 Einzelne Farbstoffmoleküle

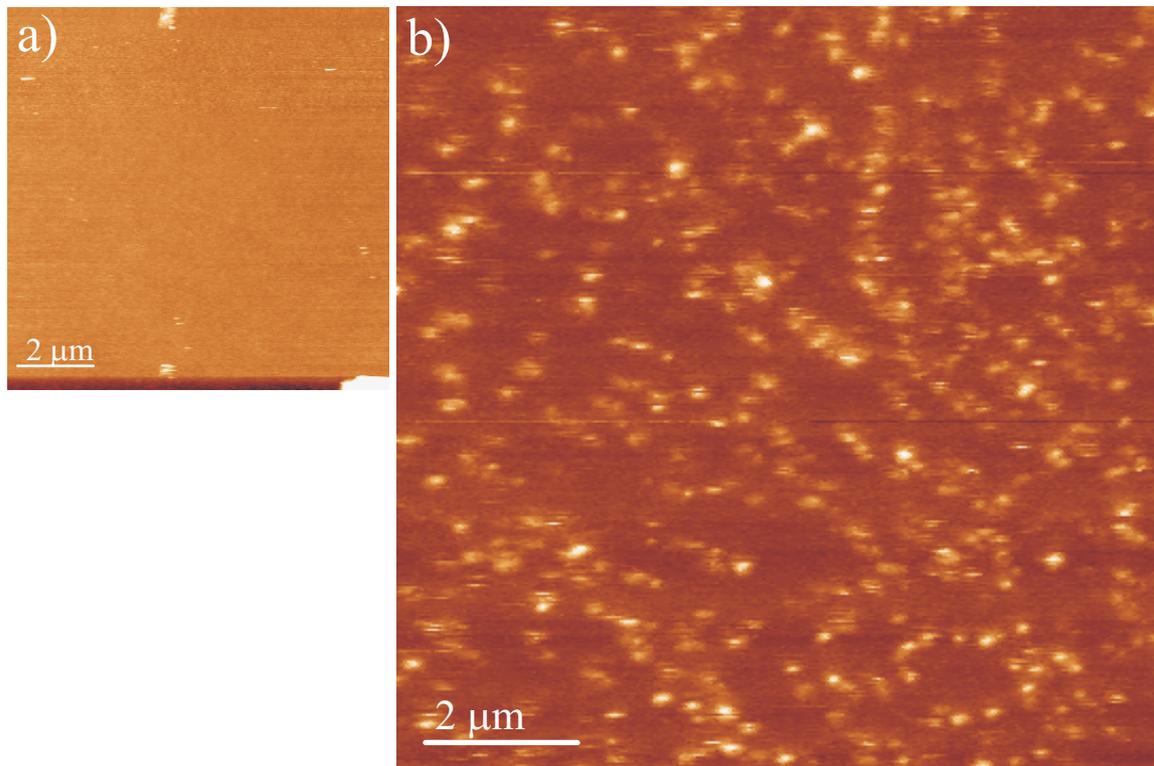


Abbildung 7.4: a) Topographie (verkleinert) und b) Fluoreszenzbild einzelner R6G-Moleküle, eingebettet in einen PVA-Film ($10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$).

a) Das Topographiebild zeigt die glatte Oberfläche des Polymerfilms. b) Jeder der hellen Punkte rührt von der Fluoreszenzemission eines individuellen Moleküls her. Signalintensitäten variieren zwischen $12000\ \text{c/s}$ und $32000\ \text{c/s}$ bei einem konstanten Hintergrund von $6000\ \text{c/s}$.

Die Fluoreszenz einzelner R6G-Moleküle aus einem Probenbereich von $(10\ \mu\text{m})^2$ eingebettet in einen 30 nm dicken PVA-Film (Probenherstellung siehe Kap.6.3.1) ist in Abb.7.4b gezeigt. Das simultan mitgemessene Topographiebild a) enthält keine Zusatzinformation, da die PVA-Filme sehr glatt sind.

Im Bild erscheinen die R6G-Moleküle nicht in ihrer wahren Größe, sondern in einer der Feldverteilung an der SNOM-Spitze entsprechenden Dimension. Die Halbwertsbreiten liegen zwischen 40 nm und 200 nm, mit einer mittleren Halbwertsbreite von $(75 \pm 37)\ \text{nm}$ (für die Bestimmung des Mittelwertes wurde die Halbwertsbreite von 40 einzelnen

Molekülen zugrunde gelegt). In der 3-dimensionalen Darstellung des Fluoreszenzbildes (Abb.7.5) sind die unterschiedlichen Formen und Höhen der Einzelmolekülpeaks gut zu erkennen. Das Bild eines Moleküls entspricht einer Faltung der Feldverteilung an der Spitze mit dem Moleküldipol. Tatsächlich kann solch ein Molekül als Abtastsonde für das elektrische Feld der SNOM-Spitze herangezogen werden [11, 13, 73].

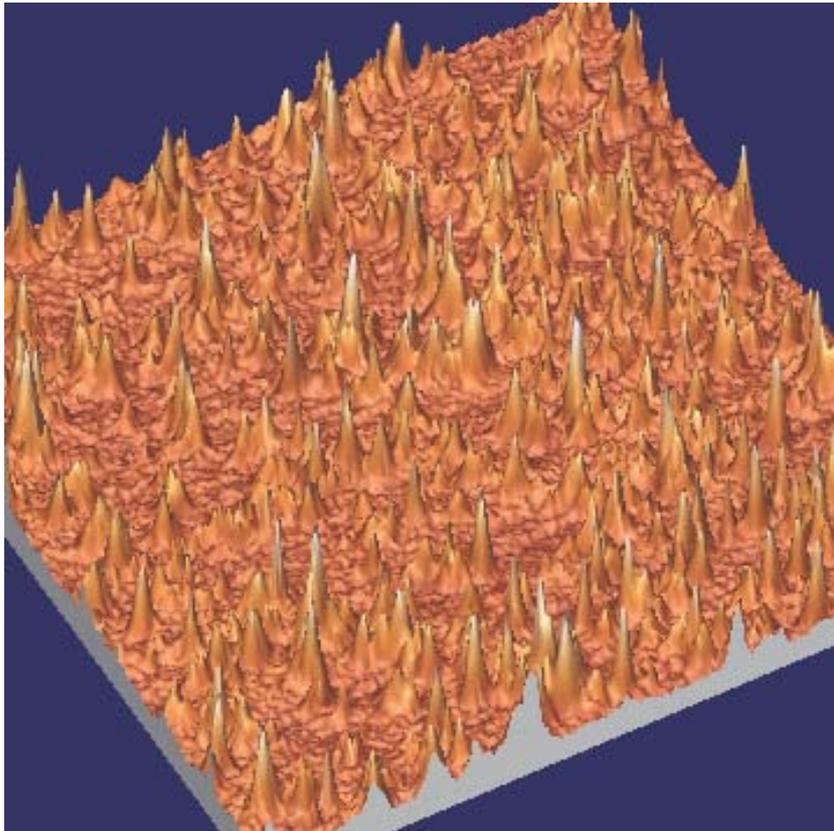


Abbildung 7.5: 3-dimensionale Darstellung des Fluoreszenzbildes aus Abb.7.4b.

Auffallend sind die unterschiedlichen Intensitäten der Moleküle in Abb.7.4b. Die hellsten Moleküle haben eine Intensität von 32000 c/s^1 , durchschnittliche Helligkeiten liegen bei 21000 c/s . Die Hintergrundfluoreszenz stellt bei dieser Messung kein großes Problem dar und lag im Fall von Abb.7.4 bei 6000 c/s . Damit beträgt das Signal-zu-Hintergrund Verhältnis für diese $5 : 1$ für die hellsten Peaks und $3.5 : 1$ für Peaks mittlerer Helligkeit.

¹ $c/s = \text{counts/sekunde}$

Der Intensitätsunterschied hat verschiedene Ursachen. Einerseits haben die in den Polymerfilm eingebetteten Moleküle unterschiedliche Abstände zur SNOM-Spitze und damit variiert die Kopplung des Moleküldipols an das Anregungsfeld. Andererseits spielt auch die Orientierung des Moleküldipols relativ zum Anregungsfeld eine große Rolle. An einigen Molekülen sind Effekte wie Photobleichen, d.h. plötzliches Erlöschen zu erkennen. Dies bestätigt, dass es sich bei den Lichtflecken tatsächlich um Einzelmoleküle handelt. Bei mehreren Molekülen ist es sehr unwahrscheinlich, dass alle gleichzeitig bleichen. Vielmehr sollte in diesem Fall die Fluoreszenzintensität in Stufen abnehmen und nicht abrupt auf die Hintergrundhelligkeit abfallen.

Die Fluoreszenzsignale dieser Moleküle sehen wie abgeschnittene Scheiben aus. Manche Moleküle können durch Diffusion oder Rotation in der PVA-Schicht ihre Orientierung zum Anregungsfeld verändern und dadurch erlöschen oder durch Reorientierung wieder “angehen“[106]. PVA bildet bei Zimmertemperatur keine feste Matrix, sondern muss eher als ein weiches Knäuel aus Polymerketten angesehen werden. Durch thermische Anregung bewegen sich diese Ketten und drehen dabei die Farbstoffmoleküle mit oder verschieben sie an einen anderen Ort. Die leichte Streifigkeit in den Bildern kann auf diese reversiblen Zustandsänderungen der Moleküle zurückgeführt werden.

Bei Einzelmolekülen können noch weitere Effekte auftreten. Einzelmoleküle zeigen oft sogenanntes Blinken, das sind zeitweise Fluktuationen ihrer Fluoreszenzintensität. Das Blinken wird generell als Übergang des Moleküls in einen metastabilen Anregungszustand interpretiert, aus dem es nach einer gewissen Verweildauer wieder in den ursprünglichen Zustand zurückkehrt. Ist die Lebensdauer dieses metastabilen Zustands kürzer als die Verweildauer der Sonde auf einem Pixel, so äußert sich das Blinken im Bild nur durch ein erhöhtes Rauschen. Andernfalls zeigt sich das Blinken durch dunkle Streifen in den Einzelmolekülmustern.

Diese interessanten Einzelmoleküleffekte sind in Abb.7.6 gezeigt. Es handelt sich dabei um Ausschnitte aus Abb.7.4. Die Bilder in a) bis c) zeigen nach unten plötzlich abgeschnittene Molekülmuster. Dies läßt auf ein Bleichen des Moleküls schließen, oder eine irreversible Orientierungsänderung des Farbstoffmoleküls in der Polymermatrix. In der zweiten Zeile von Abb.7.6 (d bis f) erkennt man von Streifen durchzogene Einzelmolekülmuster. Diese lassen sich durch reversible Bewegungen des Farbstoffmoleküls, oder Übergänge in metastabile Anregungszustände erklären. Bei Abb.7.6g ist das Molekülmuster nach oben hin scharf abgeschnitten, dieses Molekül scheint plötzlich “angegangen“ zu sein. Das letzte Bild (h) zeigt noch einmal zwei verschiedene Einzelmoleküleffekte. Das obere Molekül bleicht aus und das untere zeigt in der Mitte einen Streifen.

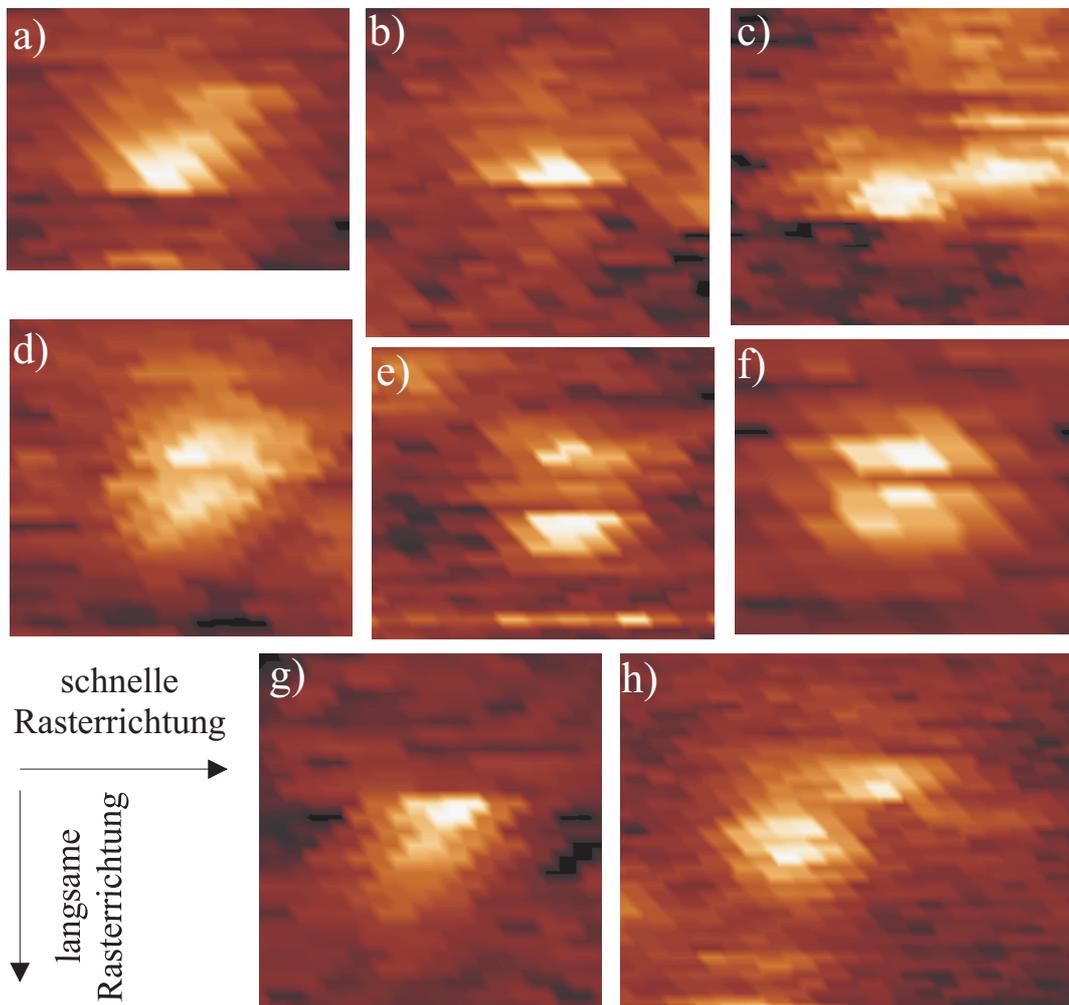


Abbildung 7.6: Bleichen und Blinken einzelner Moleküle.

a) bis c): Das Ausbleiben der Fluoreszenz (Bleichen oder vorübergehende Zustandsänderung) während des Rasterns läßt die Moleküle wie abgeschnittene Scheiben aussehen. d) bis f): Die Fluoreszenzmuster weisen unterschiedlich breite dunklere Streifen auf, was auf Umorientierung der Moleküle in der Polymermatrix oder metastabile Anregungszustände schliessen läßt. g) Das Molekül geht plötzlich "an" (die Scheibe ist oben abgeschnitten). h) Das obere Molekül zeigt Bleichen und das untere Blinken.

7.1.3 Fluoreszierende Kügelchen

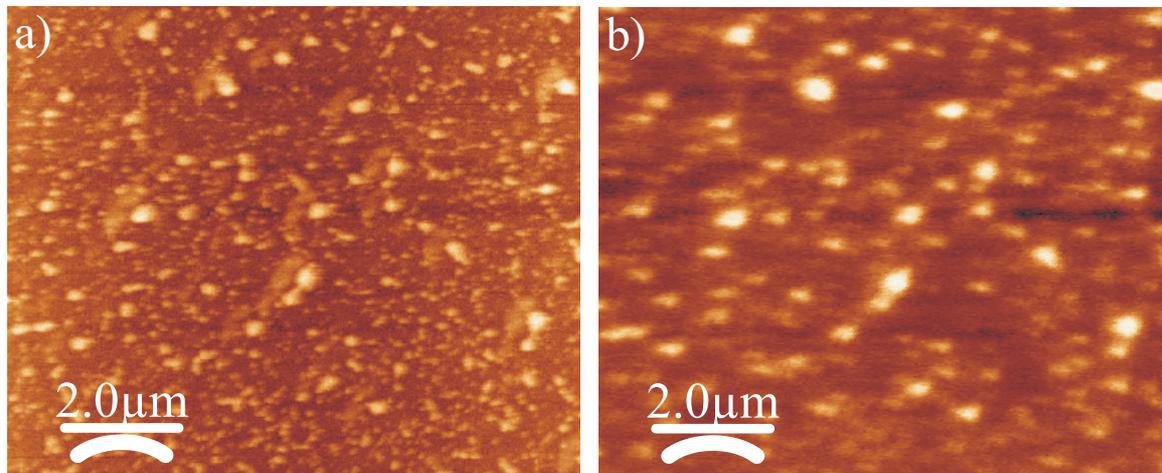


Abbildung 7.7: Übersichtsaufnahme fluoreszierender Kügelchen
($10\ \mu\text{m} \times 8\ \mu\text{m}$).

a) *Topographie* (Höhe: ca. $35\ \text{nm}$) und simultan gemessenes b) *Fluoreszenzbild*
(Kugeldurchmesser ca. $30\ \text{nm}$).

Abb.7.7 zeigt eine Übersichtsaufnahme fluoreszierender Kügelchen auf einem Deckglas. Die Probe ist sehr dicht mit Kügelchen belegt, die sich teilweise zu Clustern mit einem Durchmesser bis zu $400\ \text{nm}$ zusammengeslossen haben. Im Topographiebild lassen sich viel feinere Strukturen erkennen, als im optischen Bild.

Das optische Bild wird deutlich durch die Topographie beeinflusst. Die hellen Flecken im optischen Bild haben die gleichen Koordinaten wie die grossen Kugelcluster im Topographiebild. Dies Kluster verhindern zudem, dass die tieferliegenden einzelnen Kügelchen mit dem Nahfeld angeregt werden, da die Spitze dafür zu weit entfernt war. Desweiteren erkennt man in Abb.7.7b, dass die Fluoreszenzsignale der Kügelchen in horizontaler Richtung langgezogen sind. Dieses Artefakt wurde vermutlich durch eine schlitzförmige Apertur verursacht.

Eine Bestimmung der Auflösung macht bei dieser Sonde und Probe aufgrund der in Kap.2.1.4 beschriebenen Bedingungen keinen Sinn, da das optische Bild zu stark durch die Topographie beeinflusst wird.

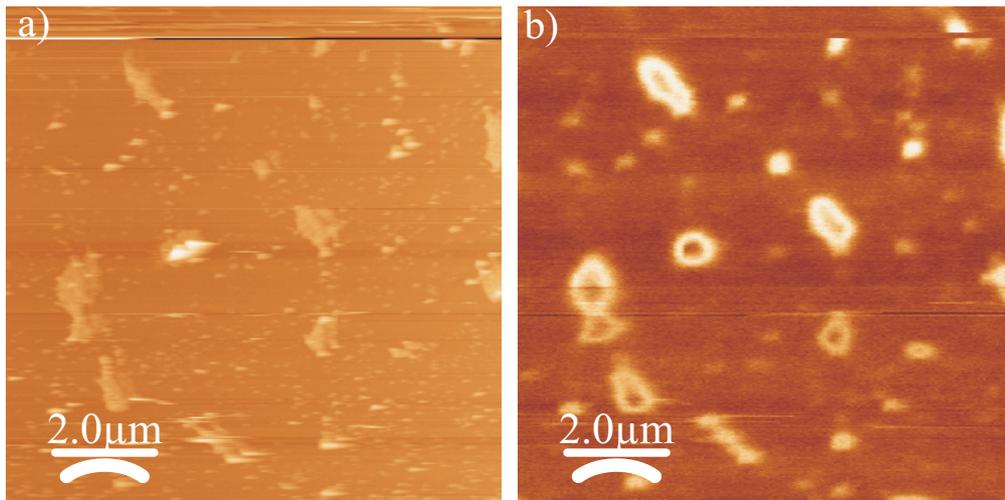


Abbildung 7.8: Fluoreszierende Kügelchen ($10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$).

a) Topographie (Höhe: ca. 35 nm) und simultan gemessenes b) Fluoreszenzbild.

Abb.7.8 zeigt eine andere Aufnahme der Kügelchen. Sie haben sich zum Teil zu noch größeren Clustern zusammengeschlossen. Dadurch bedingt ist in Abb.7.8b ein lästiges Artefakt zu sehen. In den Bereichen hoher Fluoreszenz sind dunkle Flecken in der Mitte zu erkennen. Diese werden durch die Zähllektronik der APD hervorgerufen, die hier an ihre Zählgrenze ($100\,000 \text{ c/s}$) gestossen ist. Die Intensität wird an diesen Stellen des Bildes invertiert.

7.2 Biologische Proben

7.2.1 Fluoreszenzmarkierte DNA

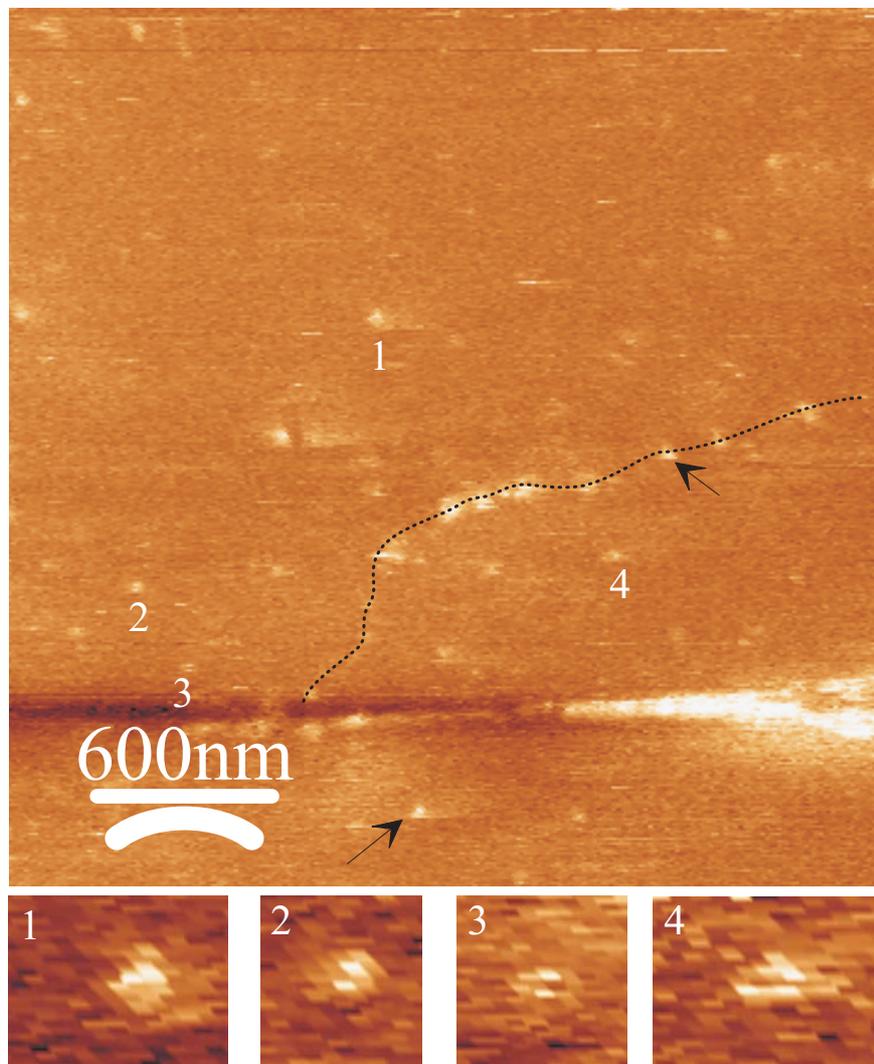


Abbildung 7.9: Einzelne Farbstoffmoleküle entlang eines DNA-Strangs. Fluoreszenzbild. Durch die gestrichelte Linie ist ein DNA-Strang markiert, dem die korrespondierenden Einzelmolekülmuster zugeordnet werden können. Einige typische Einzelmolekülmuster sind aus dem Fluoreszenzbild herausgesucht und vergrößert dargestellt. An den mit den Pfeilen gekennzeichneten Stellen ist außerdem jeweils das Bleichen eines Einzelmoleküls zu erkennen.

Abb.7.9 zeigt eine SNOM-Aufnahme der mit POPO-3 interkalierten λ -DNA, bei der die gleichen Einzelmolekülmuster wie bei der RG6-Probe zu erkennen sind. Die Herstellung dieser Probe wurde in Kap.6.3.3 beschrieben. Einzelne Muster lassen sich gut mit der Topographie eines DNA-Stranges korrelieren, was durch die gestrichelte Linie im Fluoreszenzbild angedeutet wird. Weitere typische durch Blinken hervorgerufene Einzelmolekülmuster wurden aus dem Fluoreszenzbild herausgesucht und vergrößert dargestellt (1 bis 4). Die Muster haben unterschiedliche Orientierungen, so dass ein Spitzenartefakt ausgeschlossen werden kann. Auch das plötzliche Bleichen einzelner Farbstoffmoleküle ist bei dieser Messung zu beobachten und für zwei Moleküle mit Pfeilen gekennzeichnet.

Diese Aufnahme wurde mit derselben Nahfeldsonde, die bei der Messung der R6G-Probe (Abb.7.4) verwendet wurde, durchgeführt. Die beste Auflösung einzelner Moleküle ist bei beiden Proben mit ca. 40 nm ungefähr gleich gut. Die hellsten Moleküle haben in Abb.7.4 eine Intensität von 20000 c/s , durchschnittliche Helligkeiten liegen bei 12500 c/s . Die Hintergrundfluoreszenz liegt bei dieser Messung bei 8000 c/s und wird vermutlich durch tiefer liegende interkalierte Farbstoffmoleküle verursacht. Nicht an DNA gebundene POPO-3 Moleküle fluoreszieren ca. 1000-fach schwächer als im gebundenen Zustand und tragen damit nur unwesentlich zum Hintergrund bei. Damit beträgt das Signal-zu-Hintergrund Verhältnis $2.5 : 1$ für die hellsten Peaks und $1.5 : 1$ für Peaks mittlerer Helligkeit. Das ist zwar etwas schlechter als bei der R6G-Probe (hier waren die Verhältnisse $5 : 1$ für die hellsten Peaks und $3.5 : 1$ für Peaks mittlerer Helligkeit), ist aber immer noch gut genug um einzelne Moleküle identifizieren zu können.

In Abb.7.10 ist eine neue Aufnahme der DNA-Probe mit einer anderen Sonde zu sehen. Die Probe ist zum Teil sehr dicht mit DNA-Molekülen belegt. Manche der hellen Flecken im Topographiebild (a) haben eine Höhe von ca. 40 nm , was auf stark verknäulte DNA-Moleküle hindeutet. Nur vereinzelt sind einzelne Stränge zu erkennen. Entsprechend hoch ist die Fluoreszenz (b) in den dicht belegten Bereichen.

Ein interessanter Effekt ist bei der nächsten Aufnahme (Abb.7.10c) zu beobachten. Sie wurde im Anschluss an eine Aufnahme mit einem kleineren Messbereich ($3\text{ }\mu\text{m} \times 3\text{ }\mu\text{m}$) durchgeführt und zeigt einen Ausschnitt der Probe, bei der aus dem vorherigen Bereich zentrisch wieder herausgezoomt wurde. Im Fluoreszenzbild ist in der Mitte deutlich ein dunklerer rechteckiger Bereich zu erkennen, der dem Messbereich der vorhergehenden Aufnahme entspricht. An dieser Stelle sind die in der DNA interkalierten POPO-3 Moleküle zum Teil gebleicht worden.

Dieses Bild zeigt sowohl Bereiche hoher als auch geringer Auflösung. Die unterschiedliche Auflösung innerhalb einer Messung lässt sich durch die verschiedene Orientierung der

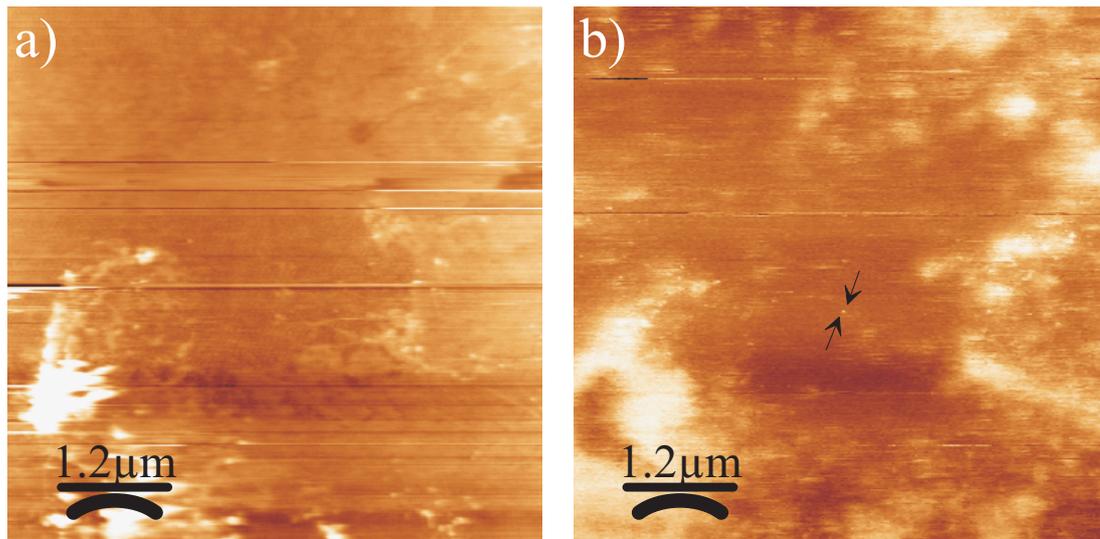


Abbildung 7.10: Selektives Ausbleichen von Farbstoffmolekülen.

a) Topographie und das korrespondierende Fluoreszenzbild b) ($6\ \mu\text{m} \times 6\ \mu\text{m}$). In der Mitte des Fluoreszenzbildes ist deutlich ein dunkles Rechteck zu sehen, das dem Messbereich ($3\ \mu\text{m} \times 3\ \mu\text{m}$) einer vorhergehenden Aufnahme entspricht.

Einzelmoleküle erklären. Je nachdem wie die Dipolmomente der Moleküle relativ zum Dipolmoment der Sonde orientiert waren, verändert sich die Anregungseffizienz und damit die Auflösung. Das Molekül wird am stärksten angeregt, wenn sein Dipolmoment parallel zur Polarisationsrichtung der Spitze liegt und am schwächsten für die Richtung senkrecht dazu.

Die Auflösung kann durch Bestimmen der Halbwertsbreite einer einzelnen Struktur bestimmt werden. Dazu wird ein Profil durch die in Abb.7.10b mit Pfeilen gekennzeichnete Struktur gelegt. Das entsprechende Profil ist in Abb.7.11 (oben) zu sehen. Die optische Auflösung beträgt hier 22 nm (Halbwertsbreite). Gleichzeitig wurde an der analogen Stelle im Topographiebild ebenfalls ein Profil entnommen (Abb.7.11 (unten)). Der Peak entspricht vermutlich einem DNA-Strangfragment, in dem das fluoreszierende Molekül interkaliert ist und ist um ca. 50 nm gegenüber dem optischen Peak verschoben. Die topographische Auflösung (Halbwertsbreite) beträgt 32 nm. Die wirkliche Breite der DNA-Stränge (ca. 3 nm) wird also nur unzureichend wiedergegeben. Das liegt daran, dass das gemessene Bild einer Faltung aus Spitze und Probe entspricht. Die tatsächliche Höhe der λ -DNA von $\approx 2.37\ \text{nm}$ wird dagegen mit gemessenen ca. 3 nm gut reproduziert. Die Bestimmung der Auflösung (optisch und topographisch) ist hier sinnvoll und zulässig, da die korrespondierenden Strukturen räumlich gegeneinander verschoben sind

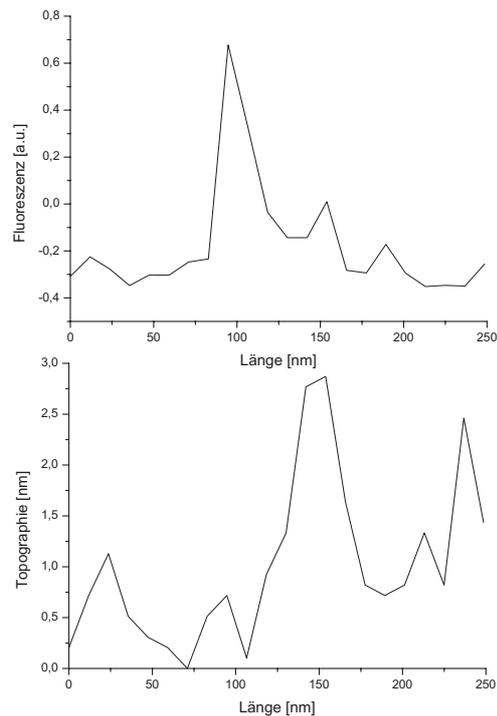


Abbildung 7.11: Halbwertsbreite eines einzelnen POPO-3 Moleküls.

Optisches Profil durch den in Abb.7.10b mit Pfeilen gekennzeichneten Bereich (oben). Die Halbwertsbreite des hohen Peaks beträgt 22 nm. Das untere Profil wurde an der gleichen Stelle des Topographiebildes entnommen. Hier hat der hohe Peak eine Halbwertsbreite von 32 nm und ist um ca. 50 nm gegenüber dem optischen verschoben.

und eine unterschiedlich hohe Auflösung zeigen.

Zur Bestimmung der Auflösung weiterer Strukturen wurde ein Ausschnitt aus Abb.7.10b vergrößert, der in Abb.7.12 gezeigt ist. Entlang der durch die Pfeile gekennzeichneten Linie wurde das gezeigte Profil gelegt. Die Peaks zeigen Halbwertsbreiten von 20 nm bis 42 nm. Zusätzlich lässt sich der Abstand der gut separierbaren Peaks (1) und (2) zu 45 nm bestimmen. An der entsprechenden Stelle im Topographie-Bild (Abb.7.10a) ist ein DNA-Strang erkennbar, dem die Einzelmolekülpeaks zugeordnet werden können.

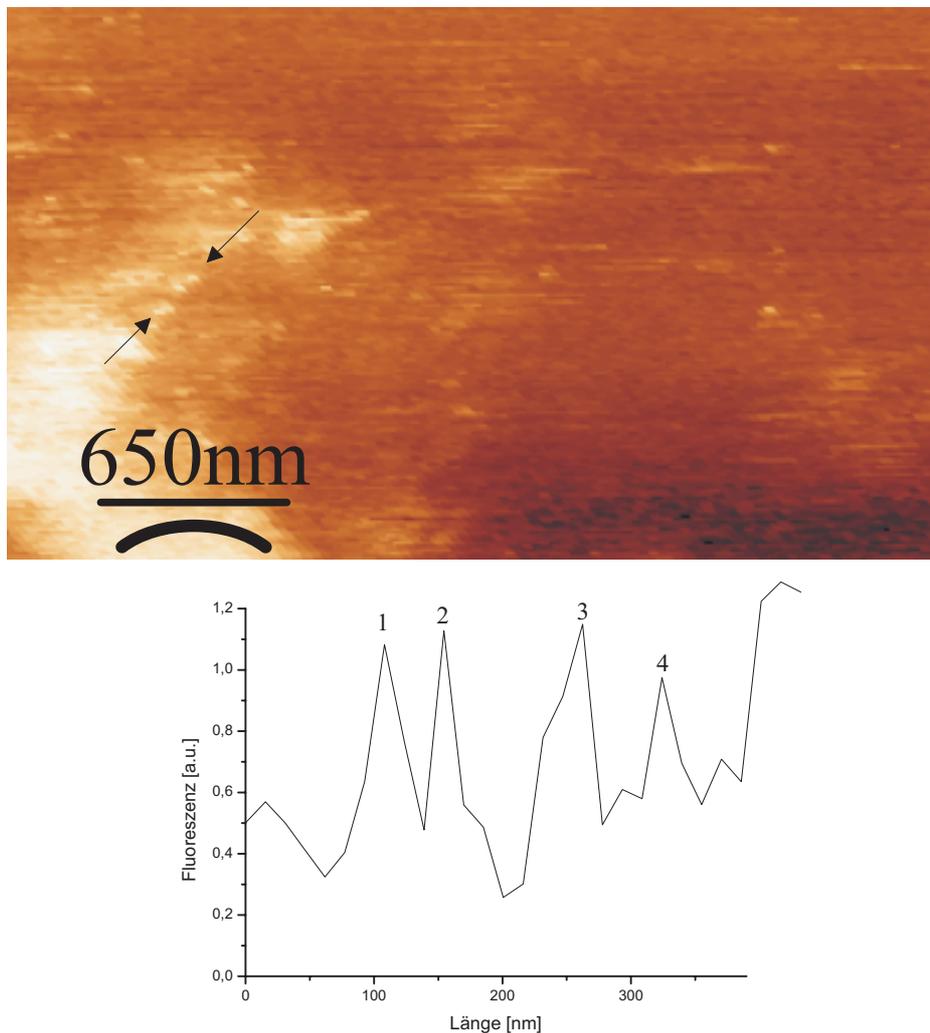


Abbildung 7.12: Einzelmolekülaufösung.

Ausschnitt aus Abb.7.10. Das Profil wurde entlang einer Linie genommen, die durch die Pfeile angedeutet ist. Die Auflösung der vier gezeigten Peaks kann mittels der Halbwertsbreite bestimmt werden: 26 nm (1), 20 nm (2), 42 nm (3) und 22 nm (4). Der Abstand der beiden gut separierbaren Peaks (1) und (2) beträgt 45 nm.

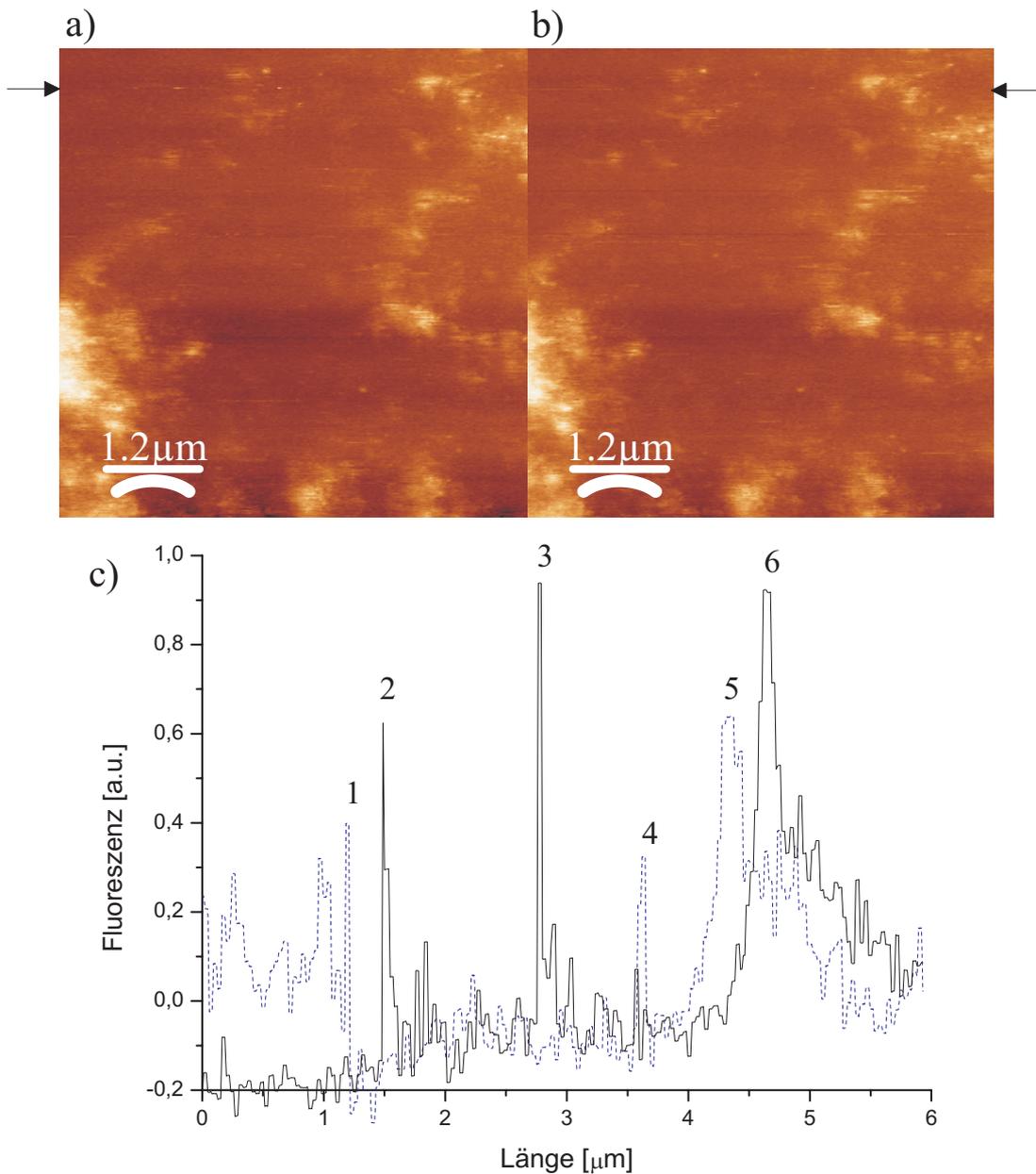


Abbildung 7.13: Abhängigkeit der Auflösung von der Rasterrichtung.

Neue Aufnahme der DNA Probe. Verglichen wird das optische (a) Hin- und (b) Rückbild der gleichen Zeile (schnelle Rasterrichtung von links nach rechts). Die gezeigten Profile c) wurden entlang der durch die Pfeile gekennzeichneten Linie gelegt (durchgezogen: hin, gestrichelt: zurück).

In Abb.7.13 ist eine weitere Aufnahme der DNA Probe gezeigt. Bei dieser Aufnahme wurde das a) Hin- und b) Rückbild der schnellen Rasterrichtung (von links nach rechts) getrennt aufgezeichnet. Vergleicht man die beiden Bilder, kann man verschiedene Effekte beobachten. Dazu wurde ein Profil entlang der durch die Pfeile gekennzeichneten Linie gelegt (durchgezogen: hin, gestrichelt: zurück). Verschiedene Peaks tauchen in beiden Bildern auf, sie sind allerdings gegeneinander verschoben. Peak 1 (Rückbild) ist um ca. 300 nm gegenüber dem entsprechenden Peak 2 des Hinbildes nach links verschoben und die Fluoreszenzintensität hat um ca. 0.2 a.u. abgenommen. Der gleiche Effekt ist bei Peak 5 (Rückbild) und seinem analogen Peak 6 aus dem Hinbild zu beobachten. Der Intensitätsunterschied beträgt hier sogar 0.34 a.u.. Die Verschiebung der Peaks bezüglich der schnellen Rasterrichtung ist auf die Hysterese des Rasterpiezos zurückzuführen. Die Intensitätsabnahme der Peaks kann aus einer unterschiedlichen Neigung der Nahfeldsonde beim Hin- und Rückrastern resultieren. Durch einen damit verbundenen Abstandsunterschied würde das gleiche Molekül verschieden effizient angeregt. Peak 3 aus dem Hinbild ist im Rückbild nicht wiederzufinden, dieses Molekül wurde vermutlich vollständig gebleicht. Peak 4 hingegen war auf dem Hinbild nicht zu erkennen, hierbei könnte es sich um ein blinkendes Molekül handeln, das erst beim Zurückrastern "an" war. Alle diese Effekte sind aus der Literatur [107] bekannte Einzelmolekülphänomene.

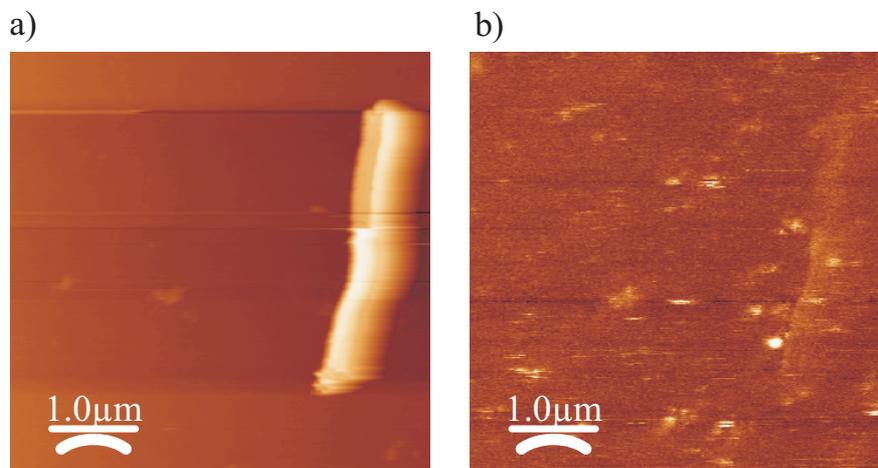


Abbildung 7.14: Topographieartefakt.

a) Topographie und b) Fluoreszenzbild (schnelle Rasterrichtung: von links nach rechts). Das optische Bild wird deutlich durch eine grosse topographische Struktur beeinflusst.

Wie stark das optische Bild durch Topographieartefakte beeinflusst werden kann, ist in Abb.7.14 zu beobachten. Es handelt sich um dieselbe DNA-Probe wie bei den vorhergehenden Messungen, nur Probenort und Sonde sind neu. Auf der rechten Seite des Topographiebildes ist eine grosse Struktur mit einer Länge von ca. $3.5\ \mu\text{m}$ zu erkennen. Diese Struktur beeinflusst die optische Aufnahme erheblich. An der entsprechenden Stelle erkennt man gut die Umrisse der topographischen Störung. An der linken Seite der Struktur ist die Sonde näher an der Probe dran und diese wird stärker beleuchtet als auf der rechten Seite (schnelle Rasterrichtung: von links nach rechts). D.h. durch den kleineren Arbeitsabstand wird die Probe vom Nahfeld beleuchtet, was zu hellern und schärferen Einzelmolekülflecken führt. Die Abstandsregelung der Spitze ist hier zu langsam, um der Topographie folgen zu können. Betrachtet man nur das optische Bild, so könnte der Eindruck einer langen, stark fluoreszierenden Struktur entstehen. Tatsächlich wird diese Intensitätserhöhung aber nur durch die veränderte Topographie hervorgerufen.

7.2.2 Fluoreszenzmarkierte Antikörper

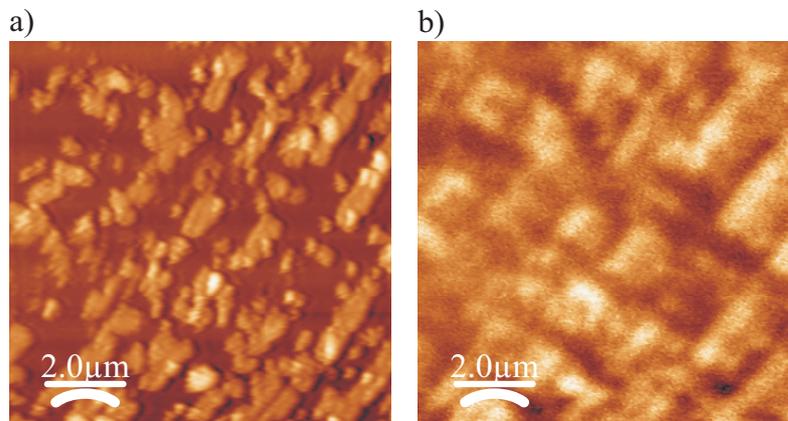


Abbildung 7.15: Übersichtsaufnahme ($10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$) einer Monolage gestempelter IgGs (fluoreszent markiert mit Alexa 532), immobilisiert auf einer silanisierten Glasoberfläche.

a) Topographie und simultan gemessenes b) Fluoreszenzbild. Die Linienbreite der gestempelten Strukturen beträgt $1.6\ \mu\text{m}$, die Höhe ca. $10\ \text{nm}$.

Abb.7.15 zeigt eine Übersichtsaufnahme einer gestempelten IgG-Probe (fluoreszent markiert mit Alexa 532), die auf einer silanisierten Glasoberfläche immobilisiert wurden. Die Herstellung der Probe wurde in Kap.6.3.4 erläutert. Das in Abb.7.15a gezeigte Topographiebild wurde simultan mit dem SNOM-Fluoreszenzbild b) aufgenommen. Die gestempelten Bereiche sind auf beiden Bildern deutlich zu erkennen. An manchen Stellen im Topographiebild sind höhere Strukturen zu erkennen, die auf mehrere übereinanderliegende IgG-Lagen zurückzuführen sind. Die topographische Auflösung ist wesentlich besser als die optische.

Allgemein lassen sich Topographie und Fluoreszenzbild gut korrelieren, auch wenn das optische Bild um ca. $180\ \text{nm}$ gegenüber dem topographischen verschoben ist. Dies ist ein häufig auftretender Effekt bei SNOM-Messungen. Er kann durch eine kleine hervorstehende Spitze auf der SNOM-Sonde erklärt werden, die gegen die Apertur leicht verschoben ist und das topographische Bild erzeugt. Diese Spitze ist vermutlich auch für die bessere Qualität des Topographiebildes verantwortlich. Zugleich verhindert sie, dass die Apertur nah genug an die Probe herankommt, um eine gute nahfeldoptische Auflösung zu erzeugen.

8 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde ein optisches Rasternahfeldmikroskop (SNOM) aufgebaut, dessen Raster- und Annäherungseinheit in ein konventionelles inverses optisches Mikroskop integriert wurde. Durch diesen Aufbau können Proben mittels der Fernfeldoptik charakterisiert und die zu untersuchenden Probenorte lokalisiert werden. Mit dem SNOM ist dann ein "Zoomen" auf eine interessante Stelle möglich und nicht-beugungsbegrenzte optische Messungen können ohne einen Wechsel des Mikroskops durchgeführt werden. Das SNOM wird im Beleuchtungsmodus betrieben, bei dem die Probe lokal mittels einer Glasfaser beleuchtet wird. Um ein möglichst hohes Signal-zu-Hintergrund Verhältnis zu erhalten hat der Aufbau einen konfokalen Strahlengang. Die Abstandsregelung zwischen Sonde und Probe erfolgt über die Scherkraftregelung mit einer Quarzgabel. Zu den optischen Wechselwirkungen, die als Kontrastmechanismen eingesetzt werden können, zählt neben der einfachen Absorption auch die Fluoreszenz.

Einer der wichtigsten Bestandteile eines SNOM ist die optische Nahfeldsonde. Die fehlende Reproduzierbarkeit bei deren Herstellung stellt immer noch ein grosses technologisches Problem dar. Daher lag ein Hauptaugenmerk in dieser Arbeit auf der Entwicklung einer Methode zur Herstellung qualitativ hochwertiger optischer Aperturnahfeldsensoren für Einzelmolekülmessungen an fluoreszenzmarkierten biologischen Proben. Es wurde ein eigenständiger Aufbau realisiert, mit dem die kontrollierte Aperturerstellung mittels Festkörperelektrolyse gelang. Es konnten dabei Aperturdurchmesser im Bereich von 50-100 nm hergestellt werden. Dies gelang durch die Kontrolle des Ionenstroms und damit der Demetallisierungsrate mittels eines Regelkreises. Die Beobachtung des abgestrahlten Lichts während des Öffnungsprozesses ermöglicht die Abschätzung des Aperturdurchmessers.

Bei der Apertursonde im Beleuchtungsmodus wird das Objekt nur lokal beleuchtet, so dass aufgrund des geringen Hintergrundsignals die Detektion einzelner fluoreszierender Moleküle möglich ist. Zudem werden Umgebungsmoleküle weniger stark gebleicht als bei der Fernfeldmikroskopie. Die guten Abbildungseigenschaften dieser Sonden wurden

durch Messungen verschiedener Proben demonstriert. Transmissions-Messungen an einer periodischen Aluminium-Nanostruktur zeigten bereits eine optische Auflösung von 90 nm.

Die Abbildung einzelner, in eine Polymermatrix eingebettete R6G-Moleküle mit einer optischen Auflösung von 40 nm war ein wesentlicher Schritt hin zum eigentlichen Ziel, nämlich die elektrolytisch hergestellten Nahfeldsonden auf oberflächenimmobilisierte, fluoreszenzmarkierte Biomoleküle anzuwenden. Dies konnte durch Messung von einzelnen mit POPO-3 fluoreszenzmarkierten DNA-Molekülen, die auf einer silanisierten Glasoberfläche immobilisiert waren, realisiert werden. Dabei wurden typische Einzelmoleküleffekte wie Bleichen und Blinken beobachtet. Bei diesen Messungen wurde eine laterale Auflösung von topographisch 32 nm und optisch 22 nm demonstriert. Hierbei konnte die Beeinflussung des optischen Signals durch die Topographie ausgeschlossen werden. Das Hintergrundsignal ist bei den Fluoreszenzmessungen ausreichend gering, um klar einzelne Farbstoffmoleküle abzubilden. Diese zeigen typische Einzelmolekülmuster, die vermutlich von der Orientierung des Dipolmomentes des jeweiligen Moleküls abhängen.

Mittels eines optischen Nahfeldmikroskops gelingen optische Abbildungen mit einer räumlichen Auflösung deutlich unterhalb der Beugungsgrenze. Zusätzlich ist jedes optische Bild mit einem korrespondierenden Topographiebild verbunden. Daher kann ein SNOM als eine Art spezielles AFM angesehen werden, das zur gleichen Zeit zwei völlig verschiedene, aber komplementäre Kontrastmechanismen liefert. Dies ist zum einen der optische Kontrast (z.B. Fluoreszenzanregung) und zum anderen ein rein mechanischer Kontrast (z.B. Scherkraft). Der optische Kontrast eröffnet die Möglichkeit für substanzspezifische Mehrfarbenabbildung, lokale optische Spektroskopie und für Einzelmoleküldetektion.

Allerdings gibt es auch Nachteile dieser Technik, die berücksichtigt werden sollten. Wie jede Rastersondentechnik ist das SNOM intrinsisch oberflächensensitiv, was wichtige Konsequenzen hat: 1) Eine hohe Auflösung kann nur in unmittelbarer Nähe der Oberfläche erreicht werden. 2) Merkmale im optischen Bild, die ebenfalls in der Topographie erscheinen, müssen mit besonderer Vorsicht interpretiert werden, da sie sehr wahrscheinlich durch die Topographie hervorgerufen werden. 3) Zum einen war die Herstellung von Aperturspitzen z.B. durch das Schattenbedampfen bisher wenig reproduzierbar. Dieses Problem wird durch die in dieser Arbeit beschriebene Herstellungsmethode wesentlich verbessert. 4) Zum anderen reagiert die Apertur sehr empfindlich auf mechanische Beschädigung.

Die einfache und reproduzierbare Herstellung der Apertur-Nahfeldsensoren mittels Fest-

körperelektrolyse eröffnet viele Möglichkeiten für eine Weiterentwicklung der SNOM-Sonden. Aufgrund ihrer flachen Endflächen und kontrollierten Aperturgröße bilden sie eine ideale Basis für neue Sondentypen, etwa die von H.Frey *et al.* [108, 109] entwickelte sogenannte “tip-on-aperture“-Sonde (TOA-Sonde). Diese Sonde vereint die Vorteile der Apertursonde mit denen der Streusonde, indem eine scharfe Metallspitze am Rand einer Apertur über deren Nahfeld beleuchtet wird. Dies ermöglicht eine hohe Topographieauflösung kombiniert mit optischer Einzelmoleküldetektion.

Die in dieser Arbeit hergestellten Sonden sind auch für Messungen an Biomolekülen unter physiologischen Bedingungen (wässrige Lösung) geeignet. Zu diesem Zweck ist die Entwicklung eines dafür geeigneten SNOM-Messkopfes geplant, der an die Messbedingungen in Flüssigkeit angepasst wird.

Das Prinzip der elektrolytischen Aperturerzeugung lässt sich auch auf andere SNOM-Konfigurationen anwenden. So lassen sich auf diese Weise ebenfalls die in Kap.2.5 beschriebenen Apertur-Cantilever herstellen. Durch die Verbindung eines Cantilever-SNOM mit der Kraftspektroskopie wären dann künftig Experimente möglich, die die Einzelmolekülmanipulation mit Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopietechniken, wie z.B. FRET (fluoreszenter resonanter Energietransfer) verbinden. So ließen sich etwa durch eine Kombination Kraftspektroskopie/FRET Fragestellungen zu Konformationsänderungen von DNA bei der sequenzspezifischen Bindung von Proteinen (z.B. Transkriptionsregulatoren) adressieren. Dazu würde man nahe der Bindestelle Donor- und Akzeptormoleküle anbringen und den Abstand optisch über FRET kontrollieren während man das DNA-Molekül durch eine externe Kraft auseinander zieht. Eine andere interessante Fragestellung wäre z.B. die mechanische Entfaltung eines an beiden Enden markierten Proteins. Auch Bindungsstudien mittels FRET-Spektroskopie zwischen am Cantilever gebundenen DNA-Molekülen und oberflächenimmobilisierten Proteinen, die mit geeigneten Donor- bzw. Akzeptormolekülen markiert wurden, sind eine mögliche Anwendung.

Literaturverzeichnis

- [1] G. Binnig, H. Rohrer, Ch. Gerber, and E. Weibel. Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Phys. Rev. Lett.*, 49(1):57, 1982.
- [2] E. H. Synge. *Phil. Mag.*, 6:356–362, 1928.
- [3] E. A. Ash and G. Nicholls. Super-resolution aperture scanning microscope. *Nature*, 237:510–512, 1972.
- [4] D. W. Pohl, W. Denk, and M. Lanz. Optical stethoscopy: imagerecording with resolution $\lambda/20$. *Appl. Phys. Lett.*, 44(7):651–653, 1984.
- [5] A. Lewis, M. Isaacson, A. Harootunian, and A. Muray. Development of a 500 Å spatial-resolution light-microscope. *Ultramicroscopy*, 13:227–231, 1984.
- [6] D. W. Pohl. Near-field optics: light for the world of nano-scale science. *Thin Solid Films*, 264:250–254, 1995.
- [7] H. Heinzelmann, T. Lacoste, T. Huser, H. J. Güntherodt, B. Hecht, and D. W. Pohl. Instrumental developments and recent experiments in near-field optical microscopy. *Thin Solid Films*, 273:149–153, 1996.
- [8] R. Eckert, J. M. Freyland, H. Gersen, H. Heinzelmann, G. Schürmann, W. Noell, U. Staufer, and N. F. de Rooij. Near-field fluorescence imaging with 32 nm resolution based on microfabricated cantilevered probes. *Appl. Phys. Lett.*, 77(23):3695–3697, 2000.
- [9] E. Betzig, P. L. Finn, and J. S. Weiner. Combined shear force and near-field scanning optical microscopy. *Appl. Phys. Lett.*, 60(20):2484, 1992.
- [10] J. K. Trautman, E. Betzig, J. S. Weiner, D. J. DiGiovanni, T. D. Harris, F. Hellman, and E. M. Gyorgy. *J. Appl. Phys.*, 71(10):4659, 1992.

-
- [11] E. Betzig and R. J. Chichester. Single molecules observed by near-field scanning optical microscopy. *Science*, 262:1422–1425, 1993.
- [12] T. Ha, T. Enderle, D. F. Ogletree, D. S. Chemla, P. R. Selvin, and S. Weiss. Probing the interaction between two single molecules: fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93(13):6264–6268, 1996.
- [13] M. A. Bopp, A. J. Meixner, G. Tarrach, I. Zschokke-Gränacher, and L. Novotny. Direct imaging single molecule diffusion in a solid polymer host. *Chem. Phys. Lett.*, 263:721–726, 1996.
- [14] M. F. Garcia-Parajo, J. A. Veerman, G. M. J. Segers-Nolten, B. G. de Grooth, J. Greve, and N. F. van Hulst. Visualising individual green fluorescent proteins with a near field optical microscope. *Cytometrie*, 36:239–246, 1999.
- [15] N. F. van Hulst, J. A. Veerman, M. F. Garcia-Parajo, and L. Kuipers. Analysis of individual (macro)molecules and proteins using near-field optics. *J. of Chem. Phys.*, 112(18):7799–7810, 2000.
- [16] T. Enderle, T. Ha, D. S. Chemla, and S. Weiss. Near-field fluorescence microscopy of cells. *Ultramicroscopy*, 71:303–309, 1998.
- [17] J. Ferber, U. C. Fischer, N. Hagedorn, and H. Fuchs. *Appl. Phys. A*, 69:581, 1999.
- [18] A. J. Meixner and H. Knepe. Scanning near-field optical microscopy in cell biology and microbiology. *Cell. mol. Biol.*, 44(5):673–688, 1998.
- [19] E. Abbe. *Archiv f. Mikroskop.*, 9:413, 1873.
- [20] D. Meschede. *Optik, Licht und Laser*. Teubner Studienbücher. 1999.
- [21] J.-J. Greffet and R. Carminati. Image formation in near-field optics. *Prog. Surf. Sci.*, 56:133–237, 1997.
- [22] B. Hecht. *Forbidden light scanning near-field optical microscopy*. Thesis/dissertation, Universität Basel, 1996.
- [23] T. Lacoste. *Optische Rasternahfeld-Mikroskopie mit Polarisationskontrast*. Thesis/dissertation, Universität Basel, 1997.

- [24] M. A. Paesler and P. J. Moyer. *Near-field optics*,. John Wiley and Sons, wiley-interscience edition, 1996.
- [25] C. Girard, J. M. Vigoureux, F. Depasse, and Gira. Superresolution of near-field optical microscopy defined from properties of confined electromagnetic waves. *Appl. Optics*, 31(16):3036–3045, 1992.
- [26] J. M. Vigoureux and D. Courjon. Detection of nonradiative fields in light of the heisenberg uncertainty principle and the rayleigh criterion. *Appl. Optics*, 31(16):3170–3177, 1992.
- [27] H. A. Bethe. Theorie of diffraction by small holes. *Phys. Rev.*, 66(7):163–182, 1944.
- [28] C. J. Bouwkamp. On bethe’s theory of diffraction by small holes. *Philips Res. Rep.*, 5:321–332, 1950.
- [29] E. Betzig, A. Harootunian, A. Lewis, and M. Isaacson. Near-field diffraction by a slit: implications for superresolution microscopy. *Appl. Optics*, 25(12):1890–1900, 1986.
- [30] H. Gersen, J. P. Korterik, N. F. van Hulst, and L. Kuipers. Tracking ultrashort pulses through dispersive media: Experiment and theory. *Phys. Rev. E*, 68:026604–1–026604–10, 2003.
- [31] E. Oesterschulze, O. Rudow, C. Mihalcea, W. Scholz, and S. Werner. Cantilever probes for snom applications with single and double aperture tips. *Ultramicroscopy*, 71:85–92, 1998.
- [32] W. Noell, M. Abraham, K. Mayr, A. Ruf, J. Barenz, O. Hollricher, O. Marti, and P. Güthner. Micromachined aperture probe tip for multifunctional scanning probe microscopy. *Appl. Phys. Lett.*, 70(10):1236–1238, 1997.
- [33] E. Oesterschulze. Recent developments of probes for scanning probe microscopy. *Advances in Imaging and Electron Physics*, 118:129–206, 2001.
- [34] F. Zenhausern, M. P. O’Boyle, and H. K. Wickramasinghe. Apertureless near-field optical microscope. *Appl. Phys. Lett.*, 65(13):1623–1625, 1994.
- [35] F. Zenhausern, Y. Martin, and H. K. Wickramasinghe. Scanning interferometric apertureless microscopy: Optical imaging at 10 angstrom resolution. *Science*, 269:1083–1085, 1995.

-
- [36] L. Novotny, E. J. Sanchez, and X. Sunney Xie. Near-field optical imaging using metal tips illuminated by higher-order hermite-gaussian beams. *Ultramicroscopy*, 71:21–29, 1998.
- [37] U. Dürig, D. W. Pohl, and F. Rohner. Near-field optical-scanning microscopy. *J. Appl. Phys.*, 59(10):3318–3327, 1986.
- [38] A. Harootunian, E. Betzig, M. Isaacson, and A. Lewis. Super-resolution fluorescence near-field scanning optical microscopy. *Appl. Phys. Lett.*, 49(11):674–676, 1986.
- [39] R. C. Reddick, R. J. Warmack, and T. L. Ferrell. New form of scanning optical microscopy. *Phys. Rev. B*, 39(1):767–770, 1989.
- [40] D. Courjon, K. Sarayedine, and M. Spajer. Scanning tunneling optical microscopy. *Opt. Comm.*, 71(1,2):23–28, 1989.
- [41] M. A. Paesler, P. J. Moyer, C. J. Jahncke, C. E. Johnson, R. C. Reddick, R. J. Warmack, and T. L. Ferrell. Analytical photon scanning tunneling microscopy. *Phys. Rev. B*, 42(10):6750–6753, 1990.
- [42] R. C. Reddick, R. J. Warmack, D. W. Chilcott, S. L. Sharp, and T. L. Ferrell. Photon scanning tunneling microscopy. *Rev. Sci. Instr.*, 61(12):3669–3677, 1990.
- [43] M. H. P. Moers. *Near-field optical microscopy*. Thesis/dissertation, Universiteit Twente, 1995.
- [44] H. Muramatsu, N. Chiba, T. Umemoto, K. Homma, K. Nakajima, T. Ataka, S. Ohta, A. Kusumi, M. Fujihira, and . Development of near-field optic/ atomic-force microscope for biological materials in aqueous solutions. *Ultramicroscopy*, 61:265–269, 1995.
- [45] P. J. Moyer and S. B. Kämmer. High-resolution imaging using near-field scanning optical microscopy and shear force feedback in water. *Appl. Phys. Lett.*, 68(24):3380–3382, 1996.
- [46] A. Mannelquist, H. Iwamoto, G. Szabo, and S. Zhifeng. Near-field optical microscopy with a vibrating probe in aqueous solution. *Appl. Phys. Lett.*, 78(14):2076–2078, 2001.

- [47] R. Toledo-Crow, P. C. Yang, Y. Chen, and M. Vaez-Iravani. Near-field differential scanning optical microscope with atomic force regulation. *Appl. Phys. Lett.*, 60(24):2957–2959, 1991.
- [48] K. Karrai and R. D. Grober. Piezoelectric tip-sample distance control for near field optical microscopes. *Appl. Phys. Lett.*, 66(14):1842–1844, 1995.
- [49] K. Karrai and R. D. Grober. Piezo-electric tuning fork tip-sample control for near-field optical microscopes. *Ultramicroscopy*, 61:197–205, 1995.
- [50] M. J. Gregor, P. G. Blome, J. Schöfer, and R. G. Ulbrich. Probe-surface interaction in near-field optical microscopy: The nonlinear bending force mechanism. *Appl. Phys. Lett.*, 68(3):307–309, 1996.
- [51] K. Karrai and I. Tiemann. Interfacial shear force microscopy. *Phys. Rev. B*, 62(19):13174–13181, 2000.
- [52] R. D. Grober, J. Acimovic, J. Schuck, D. Hessman, P. J. Kindlemann, J. Hespanha, A. Morse, K. Karrai, I. Tiemann, and S. Manus. Fundamental limits to force detection using quartz tuning forks. *Rev. Sci. Instr.*, 71:2776–2780, 2000.
- [53] F. F. Froehlich and T. D. Milster. Mechanical resonance behaviour of near-field optical microscope probes. *Appl. Phys. Lett.*, 70(12):1500–1502, 1997.
- [54] R. Guckenberger. Resolution assessment. In R. J. Colton, A. Engel, J. E. Frommer, H. E. Gaub, A. A. Gewirth, R. Guckenberger, W. M. Heckl, B. Parkinson, and J. Rabe, editors, *Procedures in scanning probe microscopies*, book chapter 1.1.3.23, pages 44–48. John Wiley and Sons, 1998.
- [55] E. Betzig. Proposed method for molecular optical imaging. *Opt. Lett.*, 20:237, 1995.
- [56] T. Held, S. Emonin, O. Marti, and O. Hollricher. Method to produce high-resolution scanning near-field optical microscope probes by beveling optical fibers. *Rev. Sci. Instr.*, 71(8):3118–3122, 2000.
- [57] B. Hecht, H. Bielefeldt, Y. Inouye, and D. W. Pohl. Facts and artifacts in near-field optical microscopy. *J. of Appl. Phys.*, 81(6):2492–2498, 1997.
- [58] W. Schmidt. *Optische Spektroskopie*. VCH Verlag, Weinheim, 1994.

-
- [59] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, and L. Stryer. *Biochemie*. Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, 5 edition, 2003.
- [60] S. R. Quake, H. Babcock, and S. Chu. The dynamics of partially extended single molecules of dna. *Nature*, 388:151–154, 1997.
- [61] M. D. Wang, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, and S. M. Block. Stretching dna with optical tweezers. *Biophys. J.*, 72:1335–1346, 1997.
- [62] E. Betzig, J. K. Trautman, T. D. Harris, J. S. Weiner, and R. L. Kostelak. Breaking the diffraction barrier: Optical microscopy on a nanometric scale. *Science*, 251:1468–1470, 1991.
- [63] G. A. Valaskovic, M. Holton, and G. H. Morrison. Parameter control, characterization, and optimization in the fabrication of optical fiber near-field probes. *Appl. Optics*, 34(7):1215–1228, 1995.
- [64] D. R. Turner. Etch procedure for optical fibers. Patent, 1983.
- [65] P. Hoffmann, B. Dutoit, and R. P. Salathe. Comparison of mechanically drawn and protection layer chemically etched optical fiber tips. *Ultramicroscopy*, 61:165–170, 1995.
- [66] P. Moar, F. Ladouceur, and L. Cahill. Numerical analysis of the transmission efficiency of heat-drawn and chemically etched scanning near-field optical microscopes. *Appl. Optics*, 39(12):1966–1972, 2000.
- [67] L. Novotny, D. W. Pohl, and B. Hecht. Scanning near-field optical probe with ultrasmall spot size. *Opt. Lett.*, 20(9):970–972, 1995.
- [68] P. Lambelet, A. Sayah, M. Pfeffer, C. Philipona, and F. Marquis-Weible. Chemically etched fiber tips for near-field optical microscopy: A process for smoother tips. *Appl. Optics*, 37(31):7289–7292, 1998.
- [69] R. M. Stöckle, C. Fokas, V. Deckert, R. Zenobi, B. Sick, B. Hecht, and U. P. Wild. High-quality near-field optical probes by tube etching. *Appl. Phys. Lett.*, 75(2):160–162, 1999.
- [70] B. Sick. *Single molecules as sensitive Probes in high-resolution optical microscopy*. Thesis/dissertation, ETH Zürich, 2001.

- [71] C. W. Hollars and R. C. Dunn. Evaluation of thermal evaporation conditions used in coating aluminum on near-field fiber-optic probes. *Rev. Sci. Instr.*, 69(4):1747–1752, 1998.
- [72] H.-J. Hagemann, W. Gudat, and C. Kunz. Optical constants from the far infrared to the x-ray region: Mg, al, cu, ag, au, bi, c and al₂o₃. Report, 1974.
- [73] J. A. Veerman, A. M. Otter, L. Kuipers, and N. F. van Hulst. High definition aperture probes for near-field optical microscopy fabricated by focused ion beam milling. *Appl. Phys. Lett.*, 72(24):3115–3117, 1998.
- [74] T. Saiki and K. Matsuda. Near-field optical probe optimized for illumination-collection hybrid mode operation. *Appl. Phys. Lett.*, 74(19):2773–2775, 1999.
- [75] H. G. Frey. *Eine hochauflösende optische Nahfeld-Sonde für Fluoreszenzmessungen an biologischen Proben*. Thesis/dissertation, 2004.
- [76] F. Baida, D. Courjon, and G. Tribillon. Combination of a fiber and silicon nitride tip as a bifunctional detector; first results and perspectives. In D. W. Pohl and D. Courjon, editors, *Near-Field Optics*, NATO ASI, pages 71–78. Kluwer Academic, 71 edition, 1993.
- [77] M. Muranishi, K. Sato, S. Hosaka, A. Kikukawa, T. Shintani, and K. Ito. Control of aperture size of optical probes for scanning near-field optical microscopy using focused ion beam technology. *Jpn. J. Appl. Phys. , Part 2*, 36(7B):L 942–L 944, 1997.
- [78] T. Lacoste, T. Huser, R. Prioli, and H. Heinzelmann. Contrast enhancement using polarization-modulation scanningnear-field optical microscopy (pm-snom). *Ultramicroscopy*, 71:333–340, 1998.
- [79] T. Saiki, S. Mononobe, and M. Ohtsu. Tailoring a high-transmission fiber probe for photon scanning tunneling microscope. *Appl. Phys. Lett.*, 68(19):2612–2614, 1996.
- [80] D. Mulin, D. Courjon, J.-P. Malugani, and B. Gauthier-Manuel. Use of solid electrolytic erosion for generating nano-aperture near-field collectors. *Appl. Phys. Lett.*, 71(4):437–439, 1997.

-
- [81] A. Bouhelier, J. Toquant, H. Tamaru, H. J. Güntherodt, and D. W. Pohl. Electrolytic formation of nanoapertures for scanning near-field optical microscopy. *Appl. Phys. Lett.*, 79(5):683–685, 2001.
- [82] G. A. Valaskovic, M. Holton, and G. H. Morrison. Parameter control, characterization, and optimization in the fabrication of optical fiber-near-field probes. *Appl. Optics*, 34(7):1215–1228, 1995.
- [83] M. B. Salamon, editor. *Physics of superionic conductors*, volume 15 of *Topics in current physics*. 1979.
- [84] P. J. Gellings and H. J. M. Bouwmester, editors. *The CRC Handbook of Solid State Electrochemistry*. Solid state chemistry. 1997.
- [85] P. Hagenmuller and V. Van Gool, editors. *Solid Electrolytes: General Principles, Characterization, Materials, Applications*. Materials Science and Technology. Academic Press, 1978.
- [86] C. H. Hamann and W. Vielstich. *Elektrochemie*. Wiley-VCH, 3 edition, 1998.
- [87] J. D. Wicks, L. Börjesson, G. Bushnell-Wye, W. S. Howells, and R. L. McGreevy. Structure and ionic conduction in (agi)x(agpo3)1-x glasses. *Phys. Rev. Lett.*, 74(5):726–729, 1995.
- [88] J. Swenson and L. Börjesson. Correlation between free volume and ionic conductivity in fast ion conducting glasses. *Phys. Rev. Lett.*, 77(17):3569–3572, 1996.
- [89] K. Krasowski, J. E. Garbarczyk, and M. Wasiucioneck. Ionic conductivity of glass-ceramic composites in the agi-ag2o-v2o5 system. *phys. stat. sol. (a)*, 2:381–389, 2001.
- [90] C. A. Angell and W. Sichina. Thermodynamics of the glass transition: empirical aspects. In M. Goldstein and R. Simha, editors, *The glass transition and the nature of the glassy state*, Annals of the New York academy of science, pages 53–67. 279 edition, 1976.
- [91] J. H. Gibbs. In *Modern Aspects of the vitreous state*, book chapter 7. Butterworths, 1 edition, 1960.
- [92] M. Goldstein. Statistical thermodynamics of configurational properties. In M. Goldstein and R. Simha, editors, *The glass transition and the nature of the*

- glassy state*, Annals of the New York academy of science, pages 68–77. 279 edition, 1976.
- [93] A. Bouhelier. *Nano Optics: From surface plasmon point source to its nano-fabrication*. Thesis/dissertation, Universität Basel, 2001.
- [94] C. Girard and D. Courjon. The role of scanning mode in near-field optical microscopy. *Surface Science*, 382:9–18, 1997.
- [95] P. J. Valle, J.-J. Greffet, and R. Carminati. Optical contrast, topographic contrast and artifacts in illumination-mode scanning near-field optical microscopy. *J. Appl. Phys.*, 86(1):648–656, 1998.
- [96] B. Hecht, H. Bielefeldt, D. W. Pohl, L. Novotny, and H. Heinzelmann. Influence of detection conditions on near-field optical imaging. *J. of Appl. Phys.*, 84(11):5873–5882, 1998.
- [97] H. Kleine. *Ladungstransport durch DNA*. Thesis/dissertation, Universität Bielefeld, 2004.
- [98] A. A. Golub, A. I. Zubenko, and B. V. Zhmud. g-aptcs modified silica gels: The structure of the surface layer. *J. Colloid Interf. Sci.*, 179:482–487, 1995.
- [99] A. Bensimon, A. Simon, A. Chiffaudel, V. Croquette, F. Heslot, and D. Bensimon. Alignment and sensitive detection of dna by a moving interface. *Science*, 265:2096–2098, 1994.
- [100] U. C. Fischer and H. P. Zingsheim. Submicroscopic pattern replication with visible light. *J. Vac. Sci. Technol.*, 19:881, 1981.
- [101] U. C. Fischer. Latex projection patterns. In R. J. Colton, A. Engel, J. E. Frommer, H. E. Gaub, A. A. Gewirth, R. Guckenberger, W. M. Heckl, B. Parkinson, and J. Rabe, editors, *Procedures in scanning probe microscopies*, book chapter 1.1.2.2, pages 10–11. John Wiley and Sons, 1998.
- [102] R. Zondervan, F. Kulzer, S. B. Orlinskii, and M. Orrit. Photoblinking of rhodamin 6g in poly(vinyl alcohol): Radical dark state formed through the triplet. *J. Phys. Chem. A*, 107:6770–6776, 2003.
- [103] R. Zondervan, F. Kulzer, M. A. Kol’chenko, and M. Orrit. Photobleaching of rhodamine 6g in poly(vinyl alcohol) at the ensemble and single-molecule levels. *J. Phys. Chem. A*, 108:1657–1665, 2004.

-
- [104] C. Höppener, D. Molenda, H. Fuchs, and A. Naber. Simultaneous topographical and optical characterization of near-field optical aperture probes by way of imaging fluorescent nanospheres. *Appl. Phys. Lett.*, 80(8):1331–1333, 2002.
- [105] A. Bernard, E. Delamarche, H. Schmid, B. Michel, H. R. Bosshard, and H. Biebuyck. Printing pattern of proteins. *Langmuir*, 14(9):2225–2229, 1998.
- [106] M. A. Bopp. *Optische Rasternahfeldmikroskopie an evaneszenten Wellen und einzelnen Farbstoffmolekülen*. Thesis/dissertation, Universität Basel, 1996.
- [107] W. E. Moerner and D. P. Fromm. Methods of single-molecule fluorescence spectroscopy and microscopy. *Rev. Sci. Instr.*, 74(8):3597–3619, 2003.
- [108] H. G. Frey, F. Keilmann, A. Kriele, and R. Guckenberger. Enhancing the resolution of scanning near-field optical microscopy by a metal tip grown on an aperture probe. *Appl. Phys. Lett.*, 81(26):5030–5032, 2002.
- [109] H. G. Frey, S. Witt, K. Felderer, and R. Guckenberger. High-resolution imaging of single fluorescent molecules with the optical near-field of a metal tip. *Phys. Rev. Lett.*, 93(20):200801, 2004.

Glossar

AFM	Atomic Force Microscope (Rasterkraftmikroskop)
AgPO ₃ -AgI	Silberiodid-Silbermetaphosphat
APD	Avalanche-Photodiode
APTES	3-Aminopropyltriethoxysilan
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserum-Albumin)
CCD	Charge-coupled-device-Kamera
C_p	Wärmekapazität bei konstantem Druck
DMF	Dimethylformamid
DNA	Deoxy-NucleicAcid (DNS: Desoxyribonucleinsäure)
DSC	Differential Scanning Calorimetry (Kalorimetrie)
ϵ	Extinktionskoeffizient
FWHM	full width at half maximum (Halbwertsbreite)
FRET	fluoreszenter resonanter Energietransfer
HF	Hydrofluoric acid (Flusssäure)
S	Entropie
Ig	Immunglobulin (Antikörper)
IgG	Immunglobulin der Klasse 'G'
k	Boltzmann-Konstante: $k = 1.380658 \cdot 10^{-24} \text{ J/K}$

$\lambda - DNA$	Genom des λ -Bakteriophagen
λ	Wellenlänge
λ_0	Vakuum-Wellenlänge
MCP	Micro Contact Printing (Mikro-Stempeltechnik)
n	Brechungsindex
NA	Numerische Apertur: $NA = n \cdot \sin\theta$
PDMS	Poly-Dimethyl-Siloxan
Φ_F	Quantenausbeute (engl. quantum yield)
PMT	Photomultipliertube
PVA	Polyvinylalkohol
R6G	Rhodamin 6G
SEM	Scanning electron microscope (Rasterelektronenmikroskop)
θ	Öffnungswinkel
SNOM	Scanning Near-Field Optical Microscope (optisches Nahfeldmikroskop)
SPM	Scanning Probe Microscope (Rastersondenmikroskop)
STM	Scanning Tunneling Microscope (Rastertunnelmikroskop)
T	Temperatur
TEM	Transmission electron microscope (Transmissionselektronenmikroskop)
TOA	“tip-on-aperture“-Sonde

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei dieser Arbeit direkt und indirekt unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Dario Anselmetti, der mir die Möglichkeit und Motivation gegeben hat in seiner Arbeitsgruppe meine Doktorarbeit durchzuführen.

Prof. Dr. Günter Reiss danke ich für seine freundliche Bereitschaft das Zweitgutachten zu erstellen, sowie die Möglichkeit das SEM seiner Arbeitsgruppe zur Sondencharakterisierung zu benutzen. Diese Messungen wurden meist von Dr. Karsten Rott durchgeführt, dem ich dafür herzlich danke.

Meinem Betreuer Priv.-Doz. Dr. Robert Ros danke ich für die Einführung in die Rasterkraftmikroskopie, sowie für wertvolle Diskussionen, praktische Tips und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Herrn Dr. Dieter Pohl (Universität Basel) danke ich für die Möglichkeit in seinem Labor einen ersten Einblick in die optische Nahfeldmikroskopie erhalten zu haben, sowie in Zusammenarbeit mit seinem Doktoranden Dipl.-Phys. Julien Toquant die Herstellung der Festkörperelektrolyten zu erlernen. Julien gilt ausserdem mein besonderer Dank für die schnelle Beantwortung aller Fragen.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Dr. Thorsten Röder (ehem. AG Prof. Kitzerow, Universität Paderborn) bedanken, der mir nicht nur am Anfang der Doktorarbeit SNOM-Sonden zur Verfügung gestellt hat, sondern mir während der ganzen Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand und für das Korrekturlesen trotz der inzwischen weiten Entfernung. Ebenfalls vielen Dank für die Durchführung der DSC-Messungen der Elektrolyten.

Bei Dipl. Ing. Christoph Pelargus möchte ich mich für die Hilfe bei der Realisierung der Elektrolytbox zur Aperturherstellung, sowie bei der Lösung vieler technischer Probleme bedanken.

Dr. Heinrich Frey danke ich für seine unermüdliche Unterstützung im Labor während des letzten halben Jahres dieser Arbeit, sowie für viele fruchtbare Diskussionen und das Korrekturlesen.

Des weiteren möchte ich mich bei Dipl.-Chem. Rainer Eckel für seine geduldige Hilfe bei allen chemischen Fragen (besonders zur Festkörperelektrolyse) und das Korrekturlesen bedanken. Dipl.-Phys. Volker Walhorn danke ich für die Durchführung der Rauigkeitsmessung der Elektrolyten, Dr. Alexandra Ros für die Aufnahme in ihr Büro, sowie die vielen angeregten Gespräche (nicht nur über Chemie). Mein herzlicher Dank gilt Dipl.-Phys. Wibke Hellmich und Dipl.-Phys. Thanh Tu Duong für ihre Freundschaft, viele Diskussionen und die praktische Hilfe im Laboralltag. Vielen Dank auch an Dr. Katja Tönsing für die Einführung in die Pufferherstellung und die Beantwortung vieler chemischer Fragen. Dank an Kai Leffhalm für die Unterstützung bei allen Computerfragen, Dr. Hermann Kleine (Kekse und stete Hilfsbereitschaft) und Dipl.-Phys. Jörg Martini für den gemeinsamen Kampf mit den Tücken der Bedampfungsanlage, sowie Gabi Krome für die Lösung vieler administrativer Probleme. Allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe *Experimentelle Biophysik und Angewandte Nanowissenschaften* danke ich für praktische Hilfe, Diskussionen und die stets angenehme Arbeitsatmosphäre.

Dank auch an die Mitarbeiter der Elektronik- und der Mechanik-Werkstatt für die gute Zusammenarbeit, insbesondere Wolfgang Gronemeyer für die Annahme aller technischen Zeichnungen und deren erstaunliche Realisierung.

Meinen Eltern möchte ich ganz besonders herzlich danken, die mit ihrer Unterstützung und Geduld diese Arbeit erst ermöglicht haben.

Anhang

Wissenschaftliche Publikationen

1. **C. Haumann**, J. Toquant, Ch. Pelargus, H.G. Frey, R. Ros, D.W. Pohl and D. Anselmetti. Stand-alone device for the electrolytic fabrication of SNOM aperture-probes. *Rev. Sci. Instr.*, **76** (3), 033702 (2005).

Konferenzbeiträge

1. **C. Haumann**, Ch. Pelargus, R. Ros and D. Anselmetti. Optische Nahfeldmikroskopie (SNOM) an Biomolekülen. *Deutsche Physikerinnentagung*, 7.-10. November 2002, Tübingen. (Vortrag)
2. **C. Haumann**, Ch. Pelargus, R. Ros and D. Anselmetti. Electrolytic fabrication and testing of SNOM aperture-sensors. *SPM Workshop*, 24.-26. September 2003, Mainz. (Vortrag)
3. **C. Haumann**, Ch. Pelargus, R. Ros and D. Anselmetti. Electrolytic fabrication of SNOM aperture-sensors. *DPG Frühjahrstagung*, 8.-12. März 2004, Regensburg (Poster).
4. **C. Haumann**, Ch. Pelargus, R. Ros and D. Anselmetti. A Novel stand-alone device for the electrolytic fabrication of SNOM aperture-probes. *SPM Workshop*, 6.-8. September 2004, Bielefeld (Poster).