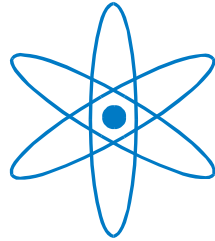


PHYSIK-DEPARTMENT



Eine hochauflösende optische Nahfeld-Sonde für
Fluoreszenzmessungen an biologischen Proben

Dissertation

von

Heinrich Gotthard Frey



TECHNISCHE UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Technische Universität München
Max-Planck-Institut für Biochemie

Eine hochauflösende optische Nahfeld-Sonde für Fluoreszenzmessungen an biologischen Proben

Heinrich Gotthard Frey

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Physik der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. M. Kleber

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.- Prof. Dr. E. Sackmann, emeritiert
2. Hon.- Prof. Dr. W. Baumeister

Die Dissertation wurde am 12.02.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Physik am 22.06.2004 angenommen.

Inhalt

	Inhalt	1
1.	Einleitung	3
2.	Optische Nahfeldmikroskopie - ein Überblick	6
2.1	Konventionelle Lichtmikroskopie - Bildentstehung und Auflösung	6
2.2	Prinzip und Methoden der Nahfeldmikroskopie	8
2.2.1	Die Apertursonde	9
2.2.2	Die Streusonde	11
2.2.3	Die Photonen-Tunnel-Mikroskopie (PSTM)	12
2.3	Anforderungen an ein SNOM für biologische Anwendungen	13
3.	Experimenteller Aufbau	17
3.1	Die Beleuchtungseinheit	18
3.2	Die Detektionseinheit	18
3.3	Die Raster- und Annäherungseinheit	19
3.4	Die Erschütterungsdämpfung	20
4.	Abstandsregelung durch Scherkraftmessung mit einer Quarzgabel	23
4.1	Scherkraftmethode zur Abstandsregelung	23
4.2	Quarzgabeln mit fester Anregung als Kraftsensor	25
4.3	Der Frequenzgang und Empfindlichkeit der Quarzgabelabstandsregelung	26
4.4	"Holzmuster"-Artefakt	29
4.5	Messung der Schwingungsamplitude einer Quarzgabel	30
4.6	Scherkraft-Abstands-Regelung in Wasser	32
5.	Die Tip-On-Aperture (TOA) Sonde	38
5.1	Die Idee der TOA-Sonde: Die Vereinigung des Streu-SNOM mit dem Apertur-SNOM	38
5.2	Die Sondenherstellung	39
5.2.1	Herstellung von Glasfaserapertursonden	39
5.2.2	Herstellung von EBD-Spitzen und ihre Bearbeitungsmöglichkeiten	45
5.2.3.	Herstellung der TOA-Sonde aus einer Apertursonde	47
6	Fluoreszenzproben für die Sondencharakterisierung	50
6.1	Fluoreszierende Kügelchen (Microspheres)	50
6.2	Einzelmolekülproben	52

7	Messungen mit der TOA-Sonde	55
7.1	Entwicklungsschritte zur TOA-Sonde	55
7.2	Charakterisierung der TOA-Sonde anhand der Testproben	57
7.2.1	Messungen an fluoreszierenden Kügelchen	57
7.2.2	Messungen an Einzelmolekülproben	62
8.	Modell zur TOA-Sonde und Auswertung der Daten	69
8.1	Einkoppeln des Lichts der Apertur in die Metallspitze	69
8.2	Modelle zur Erklärung der Muster in Einzelmolekülabbildungen	72
8.2.1	Berechnung der Einzelmolekülbilder nach dem Antennenmodell mit der Multi-Dipol-Methode	74
8.2.2.	Berechnung der Einzelmolekülbilder nach dem Kugelspitzenmodell	78
8.3	Bestimmung der Position und Orientierung einzelner Cy-3-Farbstoffmoleküle in Messungen mit Hilfe des Modells	81
8.4	Übertragbarkeit des Modells auf andere Farbstoffmoleküle	84
8.5	Zusammenfassung der Ergebnisse der Modellrechnungen	87
9.	Ausblick zur Weiterentwicklung und Anwendung der TOA-Sonde	88
10.	Zusammenfassung	90
	Literatur	92
Anhang 1	Herleitung der Signalübertragung einer Quarzgabel aus dem Ersatzschaubild	98
Anhang 2	Spektren der fluoreszierenden Kügelchen (Microspheres)	103
Anhang 3	Berechnung der Antennenfelder mit der Multiple-Dipol-Methode	104
Anhang 4	Die Lebensdauer des angeregten Zustandes eines Fluoreszenzmoleküls in der Nähe reflektierender Oberflächen	108
Anhang 5	Feldverlauf an der Metallspitze nach der Rechnung mit der Multiple-Dipol-Methode	110
Anhang 6	Spiegeldipole an Ebenen und Kugeln	111
Anhang 7	Abstrahlung in den vom Mikroskopobjektiv erfaßten Raumwinkel beim Spitzenkugelmodell	114
Anhang 8	Das Spitzenkugelmodell mit Glimmerunterlage	116
	Danksagung	119

1. Einleitung

Dem Naturwissenschaftler stehen heute verschiedene mikroskopische Methoden zur Struktur- und Funktionsaufklärung von Biomolekülen zur Verfügung: Elektronenmikroskopie, Rasterkraftmikroskopie, Rastertunnelmikroskopie und optische Mikroskopie. Jede dieser Techniken hat ihre Vor- und Nachteile.

Unter diesen Methoden erlauben nur die Rasterkraftmikroskopie und die optische Mikroskopie, unter natürlichen Bedingungen zu arbeiten und somit Prozeßabläufe direkt zu beobachten. Einzelmolekülmessungen sind dabei besonders vielversprechend, da sie detaillierte Informationen über *individuelle* Reaktionswege der einzelnen Moleküle geben, die in den herkömmlichen Methoden der Biochemie, bei denen nur Mittelwerte über viele Einzelprozesse gemessen werden können, verloren gehen.

Rasterkraftmikroskopie (atomic force microscopy, AFM) ist eine vielbenutzte Einzelmolekültechnik für die Untersuchung der Struktur und Dynamik biologischer Systeme unter physiologischen Bedingungen. Obwohl die Rasterkraftmikroskopie hochaufgelöste Topographiebilder liefert, ist die Aussagekraft der gemessenen Bilder jedoch oft begrenzt, da die individuellen Untereinheiten makro-molekularer Komplexe oft nicht zuverlässig identifiziert werden können.

In der Lichtmikroskopie werden spezifisch gebundene Fluoreszenzmarker verwendet, um Objekte zu markieren. Dabei gibt es Techniken, die erlauben, das Fluoreszenzlicht einzelner Farbstoffmoleküle zu detektieren [1, 2], so daß die Störung des zu untersuchenden Systems durch die Markierung möglichst klein gehalten werden kann. Die auf Abbildung durch Linsen beruhenden herkömmlichen Lichtmikroskopietechniken - auch deren moderne Varianten wie die konfokale Lasermikroskopie - haben jedoch nur eine beugungsbegrenzte Auflösung und geben keine Information über die Topographie des Objekts.

Dagegen ist die optische Rasternahfeldmikroskopie ein abbildendes Verfahren, mit dem diese Nachteile überwunden werden können. Beim optischen Rasternahfeldmikroskop ("scanning nearfield optical microscope", SNOM) [3, 4] wird eine Sonde mit wenigen nm Abstand über das Objekt gerastert und damit - für Fluoreszenzanwendungen - dieses lokal beleuchtet. Dabei kann eine Auflösung von ungefähr der lateralen Sondengröße erreicht werden. Beim Rastern wird der Sonden-Probenabstand durch eine AFM-ähnliche auf Kraftwechselwirkungen

beruhende Methode konstant gehalten und dabei ein Topographiesignal registriert. Das SNOM erlaubt also im Prinzip, die hochauflösende Rasterkraftmikroskopie mit einem optischen Kanal auszustatten, der die Unterscheidung fluoreszenzmarkierter Einzelobjekte ermöglicht.

Um jedoch wirklich von den Vorteilen profitieren zu können, muß die Technik des SNOM noch optimiert werden. Bisher erlaubt nur das Apertur-SNOM (und Varianten davon) im Beleuchtungsmodus Einzelmolekülfluoreszenzdetektion mit ausreichendem Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis. Die Apertursonde ist in der Regel eine spitze zulaufende mit Metall beschichtete Glasfaser, die am vordersten Ende eine Öffnung in der Metallschicht hat, die sog. Apertur. Über diese Apertur wird die Probe lokal beleuchtet. Die Apertursonde hat jedoch den Nachteil, daß sie in der Regel an der Spitze mehrere 100 nm breit ist, so daß sie als Topographiesonde nur eine unzureichende Topographieabbildung erlaubt. Das Topographiebild hat daher oft eine schlechte Auflösung und ist bezüglich des optischen Bildes verschoben. Ein weiterer Nachteil der Apertursonde ist, daß die erreichbare optische Auflösung typischerweise auf 50 nm bis 100 nm beschränkt ist [4]. Da typische biologische Molekülkomplexe im Größenbereich von 10 nm bis 20 nm liegen, ist aber auch eine entsprechende Auflösung notwendig, wenn dicht benachbarte Moleküle noch einzeln erkannt werden sollen.

Ziel dieser Doktorarbeit war es, ein Fluoreszenz-SNOM, das insbesondere auch für biologische Anwendungen geeignet ist, zu entwickeln. Dazu mußten die Regelung des Sonden-Proben-Abstandes und die Eigenschaften der Sonde den speziellen Anforderungen gemäß verbessert werden.

Insbesondere wurde eine neuartige Sonde entwickelt, bei der eine kurze (ca. 160 nm lange) Metallspitze auf dem Rand der Apertur einer Apertursonde angebracht wird. Das bereits durch die Apertur auf die Aperturumgebung eingeschränkte Licht wird durch Feldüberhöhung am Spitzenende der Metallspitze weiter konzentriert.

Durch diese neue Sonde, die "Tip-On-Aperture"- (TOA-) Sonde, werden die Nachteile der Apertursonde überwunden:

Sowohl die optische als auch die topographische Auflösung der TOA-Sonde wird hauptsächlich durch den Krümmungsradius der Metallspitze bestimmt. Es wurde gezeigt, daß Auflösungen von mindestens 16 nm erreichbar sind. Dabei werden sowohl das optische Signal als auch das topographische Signal durch das vorderste Ende der Metallspitze erzeugt, so daß die beiden Signale im Rahmen der Auflösung vom gleichen Punkt herrühren.

Es wurde entdeckt, daß einzelne Fluoreszenzmoleküle, die mit dem durch eine Metallspitze fokussierten Feld abgebildet werden, ein von der Orientierung des Moleküls abhängiges Muster zeigen, das mit einem einfachen Modell erklärt werden kann.

Aus diesem Fluoreszenzmuster eines Einzelmoleküls kann auf die Ausrichtung des Dipolmoments des Moleküls zurückgeschlossen werden.

Dies gibt zusätzliche wertvolle Informationen für Anwendungen: Denn werden die Farbstoffmoleküle starr an eine Untereinheit eines Molekülkomplexes gebunden, so kann aus dem Fluoreszenzmuster nicht nur auf die Position der Untereinheit geschlossen werden, sondern auch auf ihre Orientierung.

Mit dieser Arbeit wird der Grundstein für ein hochauflösendes Rasternahfeldfluoreszenzmikroskop für biologische Anwendungen gelegt.

2. Optische Nahfeldmikroskopie - ein Überblick

Dieses Kapitel soll die Auflösungsbegrenzung der klassischen Lichtmikroskopie und die Überwindung dieses Limits durch die Nahfeldmikroskopie aufzeigen und in die verschiedenen Methoden der Nahfeldmikroskopie einführen.

2.1 Konventionelle Lichtmikroskopie - Bildentstehung und Auflösung

Die erreichbare laterale Auflösung eines Mikroskops ist der Mindestabstand, den zwei Punkte eines Objekts haben müssen, damit sie mit dem Mikroskop noch getrennt gesehen werden können. Die Auflösung eines Mikroskops wird nach der Helmholtz'schen Theorie durch Beugung an der Aperturblende des verwendeten Objektivs beschränkt.

Wird ein punktförmiges Objekt durch ein Linsensystem abgebildet, so hat die Intensitätsverteilung des Beugungsmusters (Fraunhofer'sche Beugung an einer kreisförmigen

Blende) in der Bildebene die Form: $I(r) = I(0) \frac{2J_1\left(\frac{kar}{R}\right)}{\left(\frac{kar}{R}\right)^2}$, wobei J_1 die Besselfunktion erster

Ordnung, $k = \frac{2\pi n}{\lambda}$ die Wellenzahl, n der Brechungsindex des Materials zwischen Objekt und Objektiv, a der Radius der Aperturblende, r der Abstand des Meßpunktes zum Fokus in der Fokusebene und R der Abstand des Meßpunktes zum Mittelpunkt der Aperturblende ist. zur Veranschaulichung sind die Größen in Abb. 2.1. dargestellt.

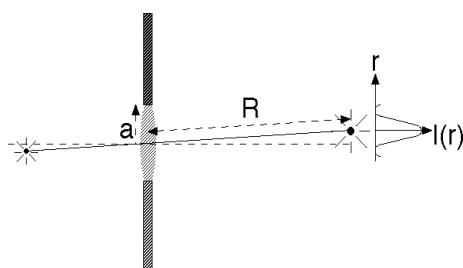


Abb. 2.1 Abbildung eines leuchtenden Punktes durch eine Linse. Durch Beugung am Rand der Blende, die den Strahlengang begrenzt, hat der Bildpunkt eine verbreiterte Intensitätsverteilung. a Radius der Blende, R Abstand des Meßpunktes zum Mittelpunkt der Aperturblende, r Abstand des Meßpunktes zum Fokus in der Fokusebene.

Das Bild eines aus inkohärent leuchtenden Bildpunkten bestehenden Objekts erhält man durch Faltung einer idealen Abbildung mit der Punktverwaschungsfunktion $I(r)$.

Die Punktverwaschungsfunktion $I(r)$ hat ihr erstes Minimum neben dem zentralen Maximum für $r = 1,22 \cdot \frac{R \cdot \lambda}{2 \cdot a \cdot n} \approx 0,61 \cdot \frac{\lambda}{NA}$, wobei $NA = n \cdot \sin \alpha \approx \frac{a \cdot n}{R}$ (α ist der halbe Öffnungswinkel des Objektivs). Nach dem Rayleigh-Kriterium gelten zwei inkoherent leuchtende Objekte als auflösbar, wenn das Maximum der Intensitätsverteilung des einen Bildpunktes in das erste Minimum der Intensitätsverteilung des anderen Bildpunktes fällt, wenn also die Objekte noch den Abstand $d_{\min} = 0,61 \cdot \frac{\lambda}{NA}$ haben.

Wie kann nun die Auflösung in der konventionellen Lichtmikroskopie verbessert werden?

1) Durch die Verwendung ultravioletten Lichts kann die Wellenlänge verkleinert werden. In der Praxis ist das jedoch meistens nicht möglich, da ultraviolettes Licht von vielen Stoffen stark absorbiert wird.

2) Die numerische Apertur kann vergrößert werden, indem der Raum zwischen dem Objektiv und dem Objektträgergläschen mit einem Immersionsöl gefüllt wird. Spezielle Immersionsölobjektive erreichen numerische Aperturen von bis zu $NA \approx 1,4$.

3) Die Punktverwaschungsfunktion kann durch verschiedene Techniken geschärft werden.

a) Bei der konfokalen Lasermikroskopie wird ein Laserstrahl durch ein Objektiv auf einen Punkt fokussiert und damit die Probe lokal beleuchtet. Das beleuchtete Objekt wird mit einem weiteren Objektiv (das aber auch dasselbe wie das Beleuchtungsobjektiv sein kann) auf eine Lochblende abgebildet. Die Lochblende ist so positioniert, daß sie nur Licht aus dem beleuchteten Fleck auf einen Detektor durchläßt. Ein Bild wird erzeugt, indem der Leuchtfleck Punkt für Punkt gegenüber der Probe verschoben wird und dabei das resultierende Signal des Detektors abgespeichert wird.

Durch das serielle Abbilden ist die Punktverwaschungsfunktion des Gesamtsystems das Produkt der Punktverwaschungsfunktionen der einzelnen Abbildungen mit den jeweiligen Objektiven. Sie hat dadurch steilere Flanken und erlaubt somit eine höhere Auflösung.

b) Durch Ausnutzen nichtlinearer Effekte, z.B. Fluoreszenz mit Zweiphotonenabsorption kann auch eine schärfere Punktverwaschungsfunktion erreicht werden. Hier ist die Punktverwaschungsfunktion das Quadrat der Punktverwaschungsfunktion für Einphotoneneffekte. Dies bringt meistens jedoch keinen Vorteil für die Anwendung, da beim

gleichen Farbstoff die doppelte Wellenlänge verwendet werden muß, was die Punktverwaschungsfunktion entsprechend verbreitert.

Bei einer Kombination einer speziellen konfokalen Mikroskopie besonders hoher numerischer Apertur, der 4 π -konfokalen Mikroskopie, mit der Zweiphotonenanregung wurde eine räumliche Auflösungen von 100 μm bei einer Wellenlänge von 810 μm demonstriert [5].

2.2 Prinzip und Methoden der Nahfeldmikroskopie

In diesem Kapitel soll erklärt werden, wie unter Ausnutzung der Nahfelder an einem Objekt eine höhere laterale optische Auflösung erreicht werden kann.

Zerlegt man das elektrische Feld der Frequenz ω in der Nähe eines Objekts in seine räumliche Fourierkomponenten $\vec{E}(r,t) = \int \vec{E}_{\vec{k}} e^{i\vec{k}\cdot\vec{r}} e^{i\omega t} d\vec{k}$, so erhält man unter der Berücksichtigung der Helmholtz-Gleichung $\nabla^2 \vec{E}_{\vec{k}} + |\vec{k}|^2 \vec{E}_{\vec{k}} = 0$ die Dispersionsrelation $k_x^2 + k_y^2 + k_z^2 = |\vec{k}|^2 = \left(\frac{2\omega}{c}\right)^2$.

Durch örtliche Variationen der optischen Eigenschaften des Objekts hat das Feld in seiner Nähe laterale Ortsfrequenzen k_x und k_y . Für Komponenten mit $k_x^2 + k_y^2 > \left(\frac{2\omega}{c}\right)^2$ ist $k_z^2 = \left(\frac{2\omega}{c}\right)^2 - k_x^2 - k_y^2 < 0$ und die Komponenten können vom Objekt weg propagieren und im Fernfeld direkt gemessen werden.

Für Komponenten mit hoher lateraler Auflösung ist $k_z^2 = \left(\frac{2\omega}{c}\right)^2 - k_x^2 - k_y^2$ jedoch negativ, also k_z imaginär. Diese Feldkomponenten mit hohen lateralen Ortsfrequenzen fallen deshalb exponentiell mit dem Abstand z zur Probe ab und sind daher ortsgebunden. Sie werden als evaneszentes Feld bezeichnet.

Möchte man diese Komponenten mit den feinen lateralen Objektinformationen messen, so muß man eine Sonde mit der Dimension $d \ll \lambda_j$ ($j = x, y$) in einen Abstand $a \ll \lambda_z$ zum Objekt bringen und dadurch die evaneszenten Felder in propagierende Felder umwandeln. Diese können dann im Fernfeld gemessen werden.

Äquivalent kann man auch eine kleine Lichtquelle als Sonde verwenden, die dicht an das zu untersuchende Objekt gebracht wird. Je nach den lokalen optischen Eigenschaften des Objekts werden durch das Objekt die evaneszenten Felder dieser Sonde in propagierende Felder umgewandelt, die dann im Fernfeld gemessen werden können.

Bilder werden erzeugt, indem die Nahfeldsonde Punkt für Punkt zeilenweise über einen rechteckigen Bereich der Probe gerastert wird und dabei das zu jedem Bildpunkt gehörige Nahfeldsignal gemessen und abgespeichert wird. Die Nahfeldsonde wird dabei durch eine meistens auf Scherkraftmessungen beruhende Abstandsregelung auf einige nm Abstand zur Probe gehalten.

Insgesamt wurden je nach Anforderungen der verschiedenen Anwendungen eine ganze Reihe von Sonden und Betriebsmodi entwickelt. Die wichtigsten sollen nun vorgestellt werden.

2.2.1 Die Apertursonde

Die Verwendung kleiner Aperturen (Durchmesser $D \ll \lambda$) zur Umgehung des Beugungslimits wurde schon 1928 von Synge vorgeschlagen [6]. Im sichtbaren Bereich des Spektrums konnte diese Idee aber erst 1984 von Pohl et al. und Lewis et al. umgesetzt werden [7, 8].

Die Apertursonde wird heute meistens aus einem spitzten transparenten Dielektrikum - z.B. einer spitz zulaufenden Glasfaser - hergestellt. Das Dielektrikum wird mit Metall beschichtet. Nur an der Spitze bleibt eine kleine Öffnung - die Apertur. Die Sonde kann im sogenannten Beleuchtungsmodus als kleine Lichtquelle verwendet werden, mit der die Probe lokal beleuchtet wird. Dazu wird (Laser-)Licht in das Dielektrikum eingespeist und das durch die Probe transmittierte Licht gemessen. Im Sammelmodus wird lokal Licht einer leuchtenden Probe - oder einer in Transmission beleuchteten Probe - über die Sonde eingesammelt und auf einen Detektor geleitet. Beim Reflexionsmodus wird die Probe über die Apertur beleuchtet und das Licht auch wieder eingesammelt. Dieser Modus ist besonders für stark absorbierende Proben geeignet.

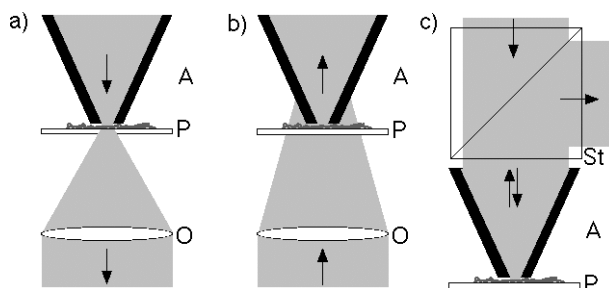


Abb.2.2: Meßmodi des Apertur-SNOM:

a) Beleuchtungsmodus, b) Sammelmodus c) Reflexionsmodus

Die Bezeichnungen stehen für A: Apertursonde, P: Probe, O: Objektiv, St: Strahlteilerwürfel.

Für Fluoreszenzanwendungen ist der Beleuchtungsmodus am besten geeignet. Beim Sammelmodus werden die Fluoreszenzfarbstoffe durch die großflächige Beleuchtung zu schnell gebleicht und beim Reflexionsmodus geht zu viel Fluoreszenzlicht verloren.

Die Auflösung der Apertursonde ist für kleine Abstände zur Probe durch den Durchmesser der Apertur vorgegeben, die für Fluoreszenzanwendungen im Bereich $50 \mu\text{m} \text{ bis } 100 \mu\text{m}$ realisiert werden kann. Die Apertur - und damit die erreichbare Auflösung - kann nicht beliebig verkleinert werden, da die Transmission sehr stark mit dem Aperturdurchmesser abnimmt. Die Lichtausbreitung in einem metallischen Wellenleiter ist unterhalb eines gewissen Durchmessers (ca. $\lambda/2n$, n ist der Brechungsindex des lichtleitenden Mediums) nicht mehr erlaubt (Cut-Off). Im vordersten Spitzenbereich einer Apertursonde fällt deshalb die Intensität exponentiell ab [4, 9]. Für eine hohe Transmission sollte dieser Bereich möglichst kurz sein, die Spitze sollte also einen großen Öffnungswinkel besitzen [10]. Die Transmission einer typischen $100 \mu\text{m}$ Apertur liegt bei 10^{-3} bis 10^{-6} . Eine geringe Transmission kann nicht durch Erhöhen der eingespeisten Lichtleistung kompensiert werden, da ab einigen mW die Gefahr der Zerstörung der Sonde (und Schädigung der Probe) durch die Wärmeentwicklung in der Sonde besteht.

Die Berechnung der Feldverteilung in der Nähe einer Apertursonde kann über Modellnäherungen erfolgen. Erstmals wurde die Transmission durch eine kleine Blende von Bethe [11] berechnet und später von Bouwkamp [12] verfeinert. Dabei wurden starke Vereinfachungen gemacht: Es wurde die Transmission einer senkrecht einfallenden ebenen Welle durch eine kreisrunde Apertur in einer ebenen Metallblende aus idealem Metall mit verschwindender Dicke berechnet. Trotz der starken Vereinfachungen können die qualitativen Ergebnisse auf die Transmission durch Apertursonden übertragen werden, wie Messungen gezeigt haben [13]. Inzwischen wurden jedoch von einer Reihe an Arbeitsgruppen verfeinerte Nahfeldberechnungen an Aperturspitzen durchgeführt [14-18]. An den Aperturrändern gibt es in Polarisationsrichtung Bereiche mit einer besonders hohen elektrischen Feldstärke, wobei das elektrische Feld dort näherungsweise senkrecht zur Blendenebene steht. Wird daher mit einer Apertursonde eine Fluoreszenzprobe abgebildet, deren Ausdehnung klein gegen den Aperturdurchmesser ist, so zeigt das detektierte optische Bild zwei Intensitätsspitzen [19] - entsprechend dieser beider Bereiche besonders hoher Intensität.

Durch Spezialapertursonden kann die Auflösung verbessert werden. Es wurde z.B. gezeigt, daß an einer dreieckigen Apertur bei richtiger Wahl der Polarisation nur noch an einer Aperturkante hohe Feldstärken auftreten [20]. Dadurch wird die Punktverwaschungsfunktion der Sonde schmaler.

2.2.2 Die Streusonde

Die von Zenhausern et al. vorgeschlagene Streusonde ist eine Spitze aus einem Dielektrikum oder aus Metall, die mit einem fokussierten Laserstrahl beleuchtet wird [21]. Die Polarisation des Strahls wird dabei parallel zur Spitzenachse gewählt. Dabei kommt es zu einer Feldüberhöhung an der Spitze [22].

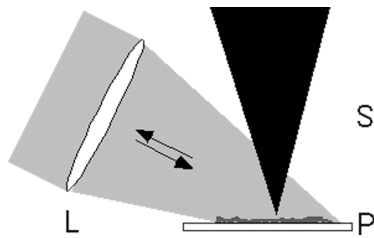


Abb. 2.3: Meßprinzip des Streu- SNOM.

Eine Metallspitze wird mit fokussiertem Licht beleuchtet. Das vom System Spitze/Probe gestreute Licht wird auf einen Fotodetektor gesammelt.

Bezeichnungen: L: Linse, P: Probe, S: Spitze.

Wird die Streusonde in die Nähe eines flachen Objekts gebracht, 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.

Da die laterale optische Auflösung dieser Sonde durch den Krümmungsradius der Spitze gegeben ist, kann eine laterale Auflösung von typischerweise $10\text{--}20\text{ nm}$ erreicht werden [23-26]. Dies ist deutlich besser als Auflösung, die beim Apertur-SNOM erreichbar ist.

Da der fokussierte Laserstrahl beugungslimitiert ist und daher nicht nur das vorderste Ende der Streusonde beleuchtet, sondern auch einen größeren Bereich aus der Spitzenumgebung, gibt es einen Streuhintergrund, der viel höher als das Nahfeldstreusignal ist. Um das Nahfeldsignal von diesem starken Streuhintergrund zu trennen, müssen Modulationstechniken verwendet werden [27-29]. Dabei wird der Sonden-Proben-Abstand harmonisch variiert. Wegen der starken nichtlinearen Abstandsabhängigkeit der Nahfelder werden höhere Harmonische der Modulationsfrequenz des Sonden-Probenabstandes im Streusignal erzeugt, zu denen wegen ihrer geringeren Abstandsabhängigkeit die Fernfelder nur wenig beitragen.

Durch die Feldüberhöhung an der Spitze - die einer Fokussierung entspricht - könnte die Streusonde auch zur Fluoreszenzmikroskopie verwendet werden. Hier verursacht aber wieder die großflächige Beleuchtung der Spitzenumgebung Probleme. Während des Abbildens werden zu viele der Farbstoffmoleküle in der Probenumgebung gebleicht. Fluoreszenzmoleküle können typischerweise nur 10^5 bis einige 10^6 Fluoreszenzzyklen durchlaufen, bevor sie durch eine chemische Reaktion bleichen [30]. Außerdem erzeugen die beleuchteten Farbstoffmoleküle einen großen Fluoreszenzhintergrund, der mit seinem Rauschen das Signal aus dem Spitzenbereich verdeckt. Dies kann verbessert werden, indem durch die nichtlineare Zweiphotonenanregung der Hintergrund verkleinert wird [3, 31]. Bei der Zweiphotonenanregung ist die Anregungswahrscheinlichkeit proportional zur 4. Potenz der Feldstärke, wohingegen bei normaler Einphotonenanregung die Wahrscheinlichkeit proportional zum Quadrat der elektrischen Feldstärke ist. Die Feldüberhöhung durch die Spitze gegenüber der Feldstärke der Hintergrundsbeleuchtung wirkt sich bei der Zweiphotonenanregung also wesentlich stärker aus. Trotzdem war bis jetzt mit dem Streu-SNOM die Abbildung einzelner Fluoreszenzmoleküle sehr schwierig und wenn sie erreicht wurde, dann nur mit einer Auflösung schlechter als beim Apertur-SNOM.

Unsere Nahfeldsonde, die in Kapitel 5 genauer beschrieben wird, ist eine Streusonde, bei der die Spitze durch evaneszente Felder einer Apertur beleuchtet wird. Dadurch ist die Hintergrundsbeleuchtung reduziert, so daß die Abbildung einzelner Fluorophore vereinfacht wird.

2.2.3 Die Photonen-Tunnel-Mikroskopie (PSTM)

Vollständigkeitshalber sei noch die Photonen-Tunnel-Mikroskopie von Reddick et al. genannt [32]. Hier wird die zu untersuchende Probe auf ein Prisma aufgebracht, das unter einem Winkel größer als der Grenzwinkel zur Totalreflexion beleuchtet wird. An der Grenzfläche des Prismas entsteht eine rein evaneszente Feldverteilung, die durch die Probe modifiziert wird. In dieses evaneszente Feld taucht man die Spitze einer nicht beschichteten Glasfasersonde ein, in der das lokale evaneszente Feld in eine propagierende Mode konvertiert wird, die am Faserende in einen Detektor angekoppelt werden kann. Der hier ausgenutzte Effekt des optischen Tunnelns hat dem Verfahren den Namen gegeben. Diese Technik hat den Vorteil einfacher Sondenherstellung.

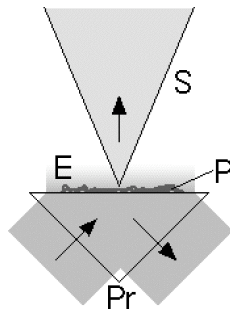


Abb. 2.4: Prinzip des Photonentunnel-Mikroskops:

Die Probe P auf dem Prisma Pr wird durch das evaneszente Feld E beleuchtet, das entsteht, wenn man Licht so in das Prisma einstrahlt, daß es auf der Oberseite die Bedingungen für Totalreflexion erfüllt. Die Glassonde S wandelt das lokale evaneszente Feld in propagierendes Licht um und führt es der Detektion zu.

Da gleichzeitig die gesamte Probe beleuchtet wird eignet sich das Verfahren schon wegen des starken Bleichens nicht für Fluoreszenzmikroskopie.

Außer den hier beschriebenen Sonden gibt es noch Spezialsonden, wie z.B. Apertursonden mit (leicht) zugepöppelter Apertur [33], Apertursonden mit aufgesetztem Metallpartikel [15, 34], die "Tetraederspitze"[35] oder die Einzelmolekülsonde [36], auf die hier nicht weiter eingegangen werden soll.

2.3 Anforderungen an ein SNOM für biologische Anwendungen

Wie schon in der Einleitung erwähnt wurde, erlaubt das Rasterkraftmikroskop (AFM) das Arbeiten in naturähnlicher Umgebung biologischer Moleküle, nämlich in Pufferlösung, im Gegensatz zu den sonst üblichen hochauflösenden Methoden wie Röntgenbeugung oder Elektronenmikroskopie. Der große Nachteil des AFM ist jedoch, daß ähnliche Objekte, deren Details zu klein sind um ausreichend aufgelöst zu werden, nicht identifiziert werden können. Dazu wäre oft ein zusätzliches materialspezifisches Signal hilfreich.

Der optische Kanal eines SNOM kann ein solches zusätzliches materialspezifisches Signal liefern. Dies wird am einfachsten mit Fluoreszenz erreicht, da damit Einzelmoleküldetektion möglich ist. Man verwendet selbst fluoreszierende Objekte, wie z.B. das Protein GFP (Green Fluorescent Protein), oder Objekte, die mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert sind.

Bei einem SNOM für biologische Anwendungen sollten daher die nützlichen Eigenschaften des Rasterkraftmikroskops wie hohe Topographieauflösung und hohe Kraftempfindlichkeit erhalten bleiben, aber zusätzlich sollte das materialspezifische Fluoreszenzsignal detektiert werden können.

Zusammengefaßt ergeben sich für ein SNOM für biologische Anwendungen folgende Ansprüche:

- 1) Für den Sonden-Proben-Abstand muß eine Regelung verwendet werden, die Arbeiten in Pufferlösung erlaubt. Es sollten auf möglichst einfache Weise Chemikalien in die Pufferlösung zugegeben werden können.
- 2) Diese Abstandsregelung sollte mit möglichst kleinen Kräften ($\leq 100\text{ pN}$) auskommen, bei denen die meist weichen biologischen Komplexe nicht zerstört werden. Dabei sollte das Rauschen der Abstandsregelung genügend gering sein, um in z-Richtung eine Auflösung im Ångstroem-Bereich zu erlauben
- 3) Die SNOM-Sonde sollte eine möglichst scharfe Spitze haben, um Topographieabbildungen mit einer Auflösung im Bereich weniger nm zuzulassen.
- 4) Die SNOM-Anordnung muß ein ausreichend gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis erreichen, um die Detektion einzelner Fluoreszenzmoleküle zu erlauben.
- 5) Für manche Anwendungen ist eine möglichst hohe optische Auflösung notwendig, um dichtgepackte Objekte einzeln erkennen zu können.
- 6) Für dynamische Anwendungen ist eine gute Zeitauflösung notwendig.

Die Ansprüche schließen sich teilweise gegenseitig aus und es müssen Kompromisse geschlossen werden. Jetzt soll etwas genauer auf den Stand der Technik eingegangen werden.

Zu 1) und 2): Für das Arbeiten in Pufferlösung gibt es beim Rasterkraftmikroskop (AFM) bewährte Methoden, wie den Kontakt- oder den Tappingmodus.

Das Grundprinzip des Rasterkraftmikroskops ist eine scharfe Spitze an einem Federbalken (Cantilever). Eine Verbiegung des Cantilevers wird durch die Richtungsänderung eines an ihm reflektierten Laserstrahls mittels einer Vierquadrantendiode detektiert.

Beim Kontaktmodus wird die Kraft auf die Sondenspitze anhand der Verbiegung des Cantilevers gemessen. Die Verbiegung des Cantilevers wird beim Rastern durch einen Regelkreis konstant gehalten.

Beim Tappingmodus wird der Cantilever in seiner Resonanzfrequenz angeregt und per Laser die Schwingungsamplitude gemessen. Beim Annähern an die Probe nimmt die Schwingungsamplitude durch Dämpfung und Resonanzverschiebung ab. In Pufferlösung hat man aufgrund der starken Dämpfung nur eine geringe Güte (Q -Faktor) des Cantilevers. Durch die Verwendung von Cantilevern mit kleinen Federkonstanten läßt sich trotzdem eine ausreichende Kraftempfindlichkeit erreichen. Der Vorteil dieser Methode ist, daß man geringere laterale Kräfte auf die Probe ausübt und daher die Gefahr, Objekte zu verschieben, geringer ist.

Diese Techniken lassen sich direkt auf gewisse SNOM-Anordnungen übertragen: Es gibt Cantilever (z.B. von der Firma WITEC), die eine hohle Aperturspitze haben, in die ein Laserstrahl fokussiert werden kann. Andere Gruppen (z.B. die Firma Nanonics) arbeiten mit Glasfasersonden, deren vorderstes Ende um fast 90° gebogen ist, so daß sie horizontal eingespannt die Form eines Cantilevers haben. Da SNOM-Cantilever oder diese gebogenen Glasfasersonden größer und steifer als normale AFM-Cantilever sind, muß dabei mit einer deutlich geringeren Kraftempfindlichkeit gerechnet werden. SNOM Cantilever und gebogene Glasfasersonden sind inzwischen kommerziell erhältlich.

Die häufigste Abstandsregelung bei SNOMs mit Glasfasernsonden beruht auf der Scherkraftmessung. Dabei regt man die Sonde zu einer horizontalen, also zur Probenoberfläche parallelen, Schwingung an. Beim Annähern an die Probe tritt eine Art "Reibungskraft" auf, die die Schwingung dämpft und die Resonanzfrequenz des schwingenden Systems verschiebt. An Luft kann eine hohe Kraftempfindlichkeit von wenigen pN erreicht werden [37]. In Pufferlösung kann aber wegen der starken Dämpfung nur in dünnen Flüssigkeitsschichten gearbeitet werden.

Zu 3) ,4) und 5):

Zur Zeit wird nur mit der Apertursonde und ein paar speziellen Abwandlungen davon, wie z.B. der zgedampften Aperturspitze, im Beleuchtungsmodus das ausreichende Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis erreicht, um Einzelmolekülabbildungen zu ermöglichen. Diese Sonde hat jedoch wegen der Metallummantelung ein stumpfes Ende, was in der Regel eine nur sehr schlechte Topographieabbildung erlaubt. Außerdem ist die optische Auflösung in der Regel schlechter als 50nm . Oft sind das optische und topographische Bild zueinander verschoben, da ein Metallkorn der Ummantelung zufällig am weitesten vorne heraussteht. Dies ist vor allem bei dynamischen Prozessen störend, da nicht gleichzeitig das optische und topographische Signal vom gleichen Objekt detektiert werden kann.

Deshalb wurde in dieser Arbeit eine definierte Spitze auf die Apertursonde aufgesetzt, um eine scharfe Spitze zu haben, die mit dem optischen Signal zusammenfällt. In dieser Arbeit wird gezeigt, daß mit dieser Sonde auch eine höhere optische Auflösung erreicht wird.

Für ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis ist eine gute Streulichtunterdrückung und eine hohe Quantenausbeute der Fluoreszenzdetektion notwendig. Die Streulichtunterdrückung kann durch eine konfokale Anordnung der SNOM-Sonde mit einer Lochblende erreicht werden.

Für eine hohe Auflösung ist eine gute Schwingungs- und Schallunterdrückung notwendig. Diese Themen werden im nächsten Kapitel über den Versuchsaufbau diskutiert.

Zu 6): Bei der zeitlichen Auflösung gibt es verschiedene Aspekte. Über die Lebensdauer des angeregten Zustandes eines Farbstoffes kann man Aussagen über seine direkte Umgebung machen. Dafür ist ein gepulster Laser und sehr schnelle Elektronik notwendig.

Andere Ansprüche an den Versuchsaufbau werden gestellt, wenn Reaktionen in der Probe Intensitätsschwankungen verursachen und diese damit verfolgt werden sollen. Hier ist ein hohes optisches Signal mit möglichst wenig Rauschen notwendig. Dabei kann das Rauschen unterschiedliche Ursachen haben - z.B. kann es durch ein hohes Hintergrundsignal oder durch Blinken (zeitliches Aussetzen der Fluoreszenz durch Anregung eines metastabilen Zustandes) des Farbstoffesmoleküls [30] verursacht werden.

Für die Anwendung ist vor allem auch eine hohe zeitliche Auflösung des Topographiesignals kritisch, da diese die Rastergeschwindigkeit begrenzt. Typische Rastergeschwindigkeiten liegen im Bereich $0,5 \mu\text{m/s}$. So dauert die Aufnahme eines Bildes von z.B. 512×512 Bildpunkten und $1 \mu\text{m}$ Seitenlänge 17 bis 34 Minuten.

3. Experimenteller Aufbau

Der schematische Aufbau des in dieser Arbeit aufgebauten Transmissions-SNOM ist in Abb. 3.1 gezeigt.

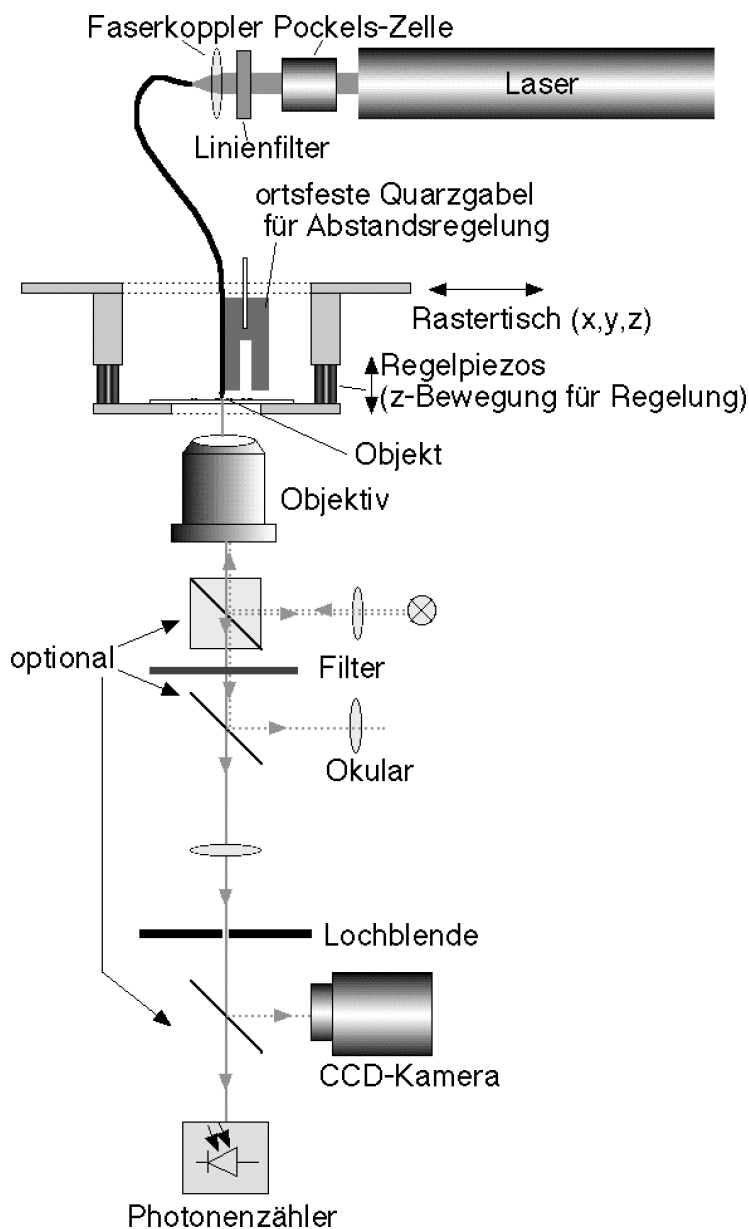


Abb. 3.1 Experimenteller Aufbau des SNOM: Transmissions-SNOM mit Glasfaser-Sonde und Quarzgabelscherkraft-Abstandsregelung auf einem invertierten Fluoreszenzmikroskop.

Die Sonde ist ortsfest, die Probe wird bewegt. Eine Lochblende ist konfokal mit der Sonde angeordnet, um das Hintergrundlicht zu minimieren.

Der Aufbau setzt sich aus drei Hauptkomponenten zusammen: der Beleuchtungseinheit, der Detektionseinheit und der Rastereinheit.

3.1 Die Beleuchtungseinheit

Licht eines polarisierten Argon-Krypton-Ionenlasers (Stabilite 2018-RM, Spectra-Physics) wird über ein Objektiv in eine Monomode-Glasfaser (FS-SN-3224, 3N) eingekoppelt. Zwischen Laser und Objektiv können Graufilter, Linienfilter, $\lambda/2$ - und $\lambda/4$ -Plättchen und eine Pockels-Zelle positioniert werden. Durch die Graufilter kann die Intensität angepaßt werden. Der Linienfilter ist für die Unterdrückung des langwelligen Hintergrundlichts im Laserstrahl bei Fluoreszenzmessungen notwendig. Durch Verdrehen der $\lambda/2$ - und $\lambda/4$ -Plättchen und durch Ändern der Spannung an der Pockels-Zelle kann die Polarisation des Lichts an der Sonde verändert werden. Allerdings wird die Polarisation des Lichts auf dem Weg durch die Glasfaser, die durch das Verbiegen doppelbrechend ist, auf eine unbekannte Weise verändert. Das Licht dieser Faser wird durch einen Faser-Faser-Koppler (siehe Abb. 3.2), der im Übersichtsbild nicht eingezeichnet ist, in die Faser mit der Sondenspitze eingekoppelt. Mit der Sonde wird die Probe lokal beleuchtet.

3.2 Die Detektionseinheit

Die Detektionseinheit ist wesentlich an einem guten Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis der Messungen beteiligt. Für Einzelmolekülmessungen muß eine hohe Photonenausbeute und eine gute Hintergrundsunterdrückung erreicht werden.

Das SNOM ist auf ein invertiertes Fluoreszenzmikroskop gebaut. Das transmittierte Licht wird mit einem Objektiv größtmöglicher numerischer Apertur eingesammelt, um einen möglichst großen Raumwinkel zu erfassen. Leider kann kein Ölimmersionsobjektiv verwendet werden, da sonst die mechanische Kopplung der gerasterten Probe zum Objektiv zu groß wird und deshalb die Abstandsregelung nicht mehr korrekt arbeitet. Deshalb beträgt die maximale numerische Apertur 0,95. Nach Transmission durch einen Fluoreszenzfilter zur Unterdrückung des Anregungslichts wird das eingesammelte Licht auf eine Lochblende fokussiert (siehe auch Abb. 3.4). Die Größe der Lochblende wird so gewählt, daß gerade das gesamte von der Sonde kommende Licht transmittiert wird. Auf diese Weise kann effizient z.B. durch Spalten eindringendes Streulicht unterdrückt werden. Diese konfokale Anordnung der Sonde mit der Lochblende ist jedoch nur möglich, wenn die Sonde ortsfest ist und statt dessen die Probe gerastert wird. Schließlich wird das Fluoreszenzlicht mit einer Avalanche Photodiode (SPCM-AQR-1X, Laser Components GmbH, Dunkelrate ≈ 1000 /s) detektiert.

Mittels einer Beleuchtung und dem konventionellen Mikroskop kann ein Übersichtsbild der Probe gewonnen und die Sonde positioniert werden.

Statt auf die Photodiode kann das Licht auf die CCD-Kamera geleitet werden. Damit wird die Positionierung der Sonde bezüglich der Lochblende und der Photodiode wesentlich erleichtert.

3.3 Die Raster- und Annäherungseinheit

Um den konfokalen Strahlengang zu ermöglichen, ist die Sonde ortsfest und die Probe wird mit einem Piezo Nanopositioniertisch ("PI-Tisch", Piezo Nanopositioniersystem P-517.3CL XYZ, Physik Instrumente) bewegt (siehe Abb. 3.2 und Abb 3.3). In x- und y-Richtung kann die Probe damit 100 μm , in z-Richtung 20 μm verschoben werden. Um möglichst geringe Driften zu gewährleisten und Nichtlinearitäten auszuregulieren, ist der Positioniertisch mit kapazitiven Positionsmessern und mit Regelschleifen ausgestattet. Da diese Regelkreise jedoch Positionsrauschen verursachen, sollten sie für Aufnahmen höchster lateraler oder vertikaler Auflösung ausgeschaltet werden. Bei den Aufnahmen dieser Arbeit waren die lateralen Regelkreise immer eingeschaltet.

Da die Resonanzfrequenz des Tisches von ca. 500 Hz für eine schnelle Abstandsregelung des Sonde-Proben-Abstands zu niedrig ist, wird die Regelbewegung mit vier zusätzlichen Piezostapeln ("Regelpiezos") durchgeführt.

Wie schon in Kapitel 2.2 erwähnt wurde, werden Bilder erzeugt, indem die Probe in einem rechteckigen Bereich bezüglich der Sonde gerastert wird. Dabei wird in einer Ecke des Rechtecks begonnen und die Probe längs einer Seite des Rechtecks hin- und herbewegt. Nachdem man zum Ausgangspunkt der zeilenweisen Bewegung zurückgekehrt ist, wird die Probe um die Breite eines Bildpunktes in Richtung der anderen Seite des Rechtecks verschoben und dort die zeilenweise Bewegung wiederholt. Man erhält auf diese Weise zwei Bilder bei einer vollständigen Rasterbewegung, eines bei der zeilenweisen Vorwärtsbewegung und eines bei der zeilenweisen Rückwärtsbewegung. Bei ausgeschalteter Positionsregelung des PI-Tisches zeigt die zeilenweise Rasterbewegung eine Hysterese. Wegen der resultierenden nichtlinearen Verzerrungen der beiden Bilder können sie nicht überlagert werden. Bei eingeschalteter Positionsregelung sind die beiden Bilder dagegen nur ein paar Bildpunkte zueinander verschoben und können korreliert werden. Dadurch läßt sich das Rauschen des Gesamtbildes verringern.

In dieser Arbeit wird die zeilenweise Bewegung "schnelle Rasterbewegung" und die dazu senkrechte Bewegung "langsame Rasterbewegung" genannt.

Das Annähern und laterale Vorpositionieren ist durch Motoren möglich (siehe Abb. 3.2). Da beim Annähern nur ein Stützpunkt von insgesamt drei bewegt wird, verkippt dabei die Probe.

Angenähert wird am einfachsten manuell. Dazu wird die z-Position des PI-Tisches auf 0 gestellt (größter Abstand) und die Sondenspitze mit einem Objektiv hoher N.A. scharf abgebildet. Dann wird das Objektiv etwas nach unten verstellt, so daß das Bild leicht unscharf wird. Nun wird die Probe so lange mit Hilfe des Motors hochgefahren, bis sie scharf abgebildet wird. Sie hat dann typischerweise einige μm Abstand. Bis zu $20\mu\text{m}$ kann man dann vollends mit dem PI-Tisch annähern. Dabei ist die Scherkraftabstandsregelung eingeschaltet, so daß man die Sonde nicht beschädigt.

3.4 Die Erschütterungsdämpfung

Mit zunehmender Größe eines Aufbaus wird er in der Regel erschütterungsempfindlicher. Die Resonanzfrequenzen unerwünschter mechanischer Schwingungen des Aufbaus nehmen ab. Sie kommen dadurch in den störenden Frequenzbereich von 1Hz bis 300Hz .

Bei unserem Aufbau muß wegen der konfokalen Anordnung die Probe statt der Sonde gerastert werden. Die Probe - auf ein Deckgläschen aufgebracht - ist jedoch größer als die Glasfaser Spitze mit Quarzgabel. Außerdem muß die Probe leicht gewechselt werden können. Dies verlangt einen geräumigeren Aufbau, der leider erschütterungsempfindlicher ist.

Deshalb ist eine besonders aufwendige Erschütterungsdämpfung notwendig, damit Gebäudeschwingungen nicht übertragen werden. Dabei hat sich ein doppelstufiges Federsystem bewährt (siehe Abb. 3.4). Der Geräteraahmen ist an vier Gummiseilen (Bungee Seile, 78cm Länge, jeweils 23 Bänder à 40 Fasern) an einem Stahlkreuz an der Zimmerdecke aufgehängt und das Mikroskop steht auf einer Marmorplatte, die mit vier Schubkarrenschlächchen ($2.6 \times 185 \times 3.0 \times 4 \text{mm}$) gegen den Geräteraahmen gefedert ist. Die auffälligsten Resonanzen der Aufhängung liegen bei $1,6\text{Hz}$ (vertikale Grundschiwingung), bei $2,9\text{Hz}$ (laterale Torsionsschiwingung Stahlkreuz gegen Geräteraahmen) und bei 6Hz (vertikale Schwiwingung). Diese liegen also schon im störenden Frequenzbereich.

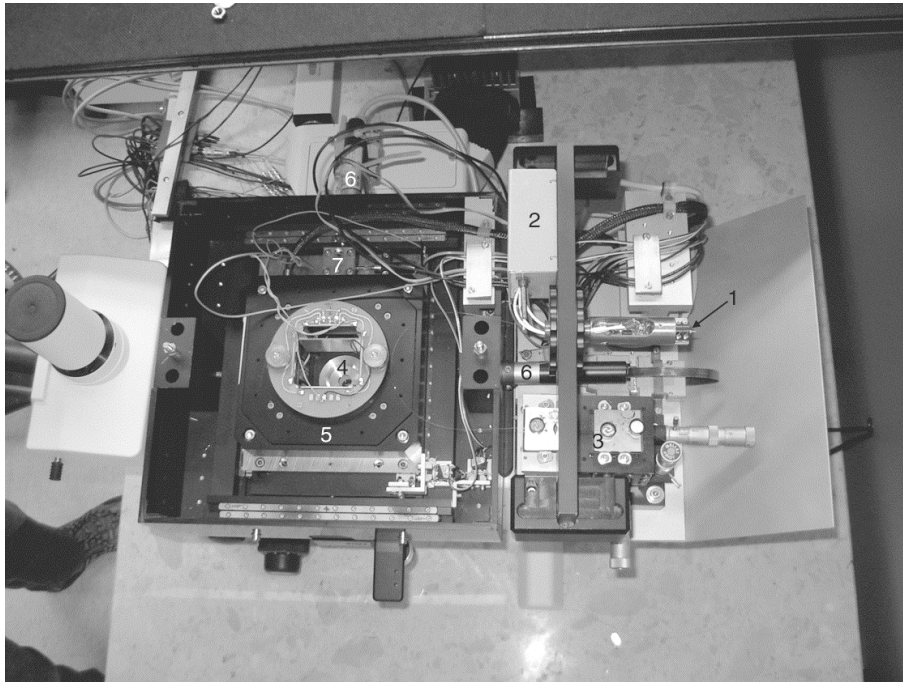


Abb. 3.2 Blick von schräg oben auf den SNOM-Aufbau mit geparkter "Brücke". Die Quarzgabel (1) und der Vorverstärker (2) des Quarzgabeldetektors sind auf eine Brücke montiert. 3: Faser-Faser-Koppler. 4: Probesteller. 5: Rastertisch. 6: Motoren zur lateralen Grobpositionierung. 7: Motor und Getriebe zur Grobannäherung. Beim Annähern wird nur ein Stützpunkt von drei verlassen, so daß die Probe verkippt.

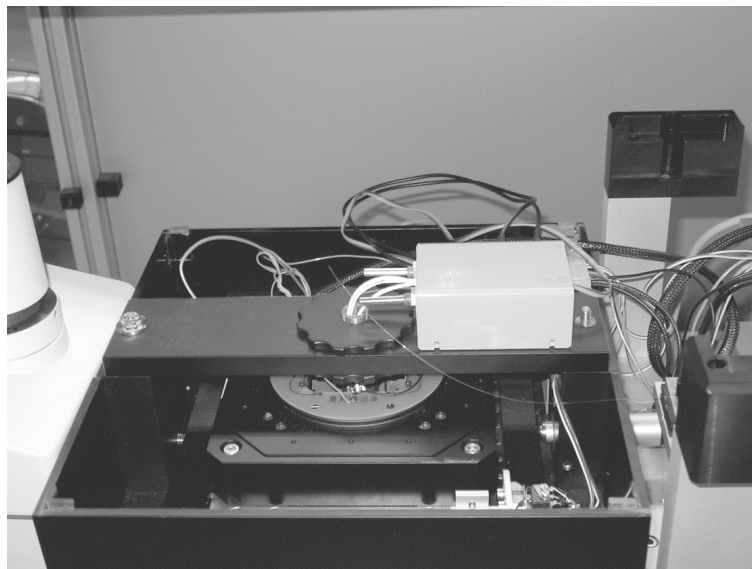


Abb. 3.3 Blick von schräg oben auf den SNOM-Aufbau mit aufgesetzter Brücke

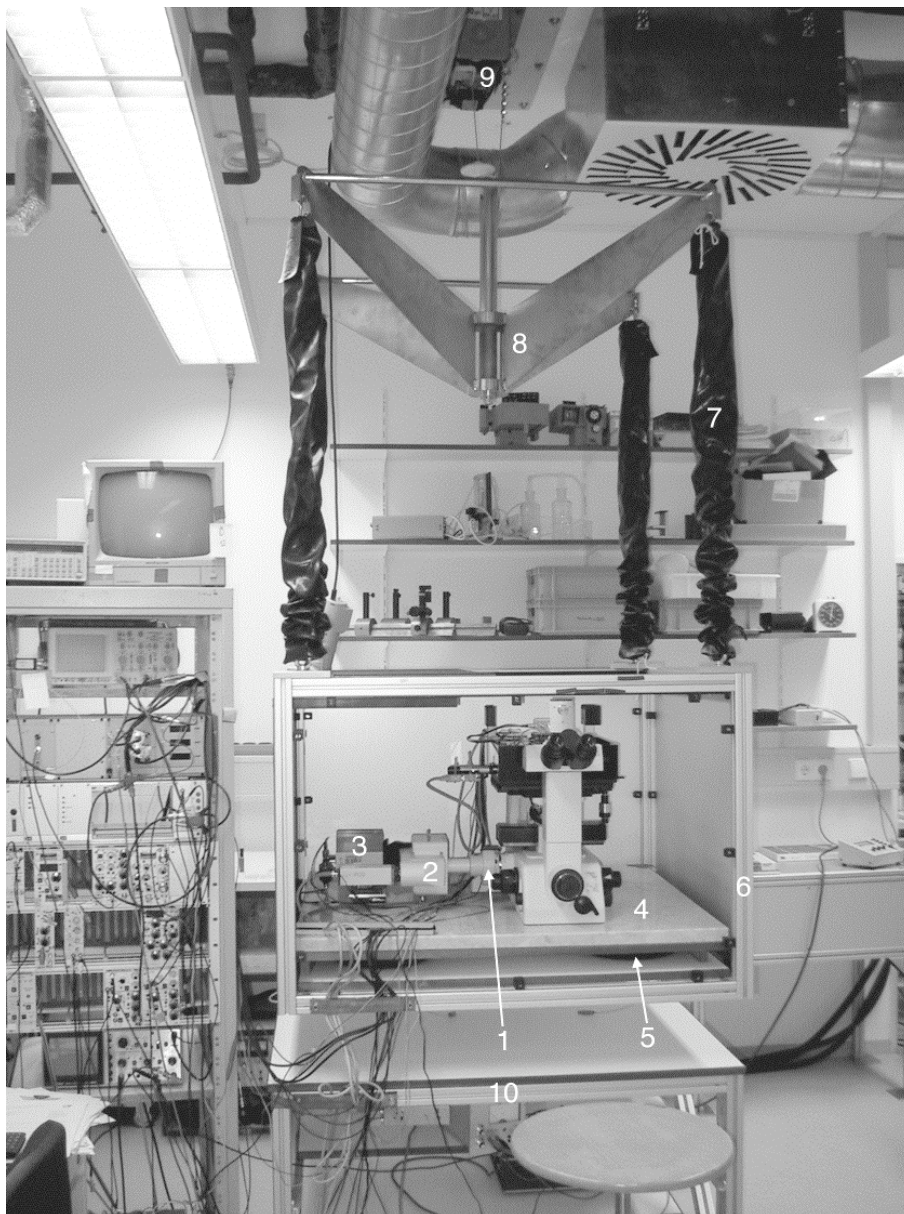


Abb 3.4 Fotografie des gesamten SNOM-Aufbaus mit Aufhängung

1: Verstellbare Lochblende für die konfokale Abbildung. 2: schaltbarer Strahlteiler mit Filter: Das Licht kann auf die CCD-Kamera oder die Avalanche-Photodiode (3) gelenkt werden.

Der ganze Aufbau steht auf einer Marmorplatte (4). Diese ist auf Schubkarrenschlächche (5) gegen den Aluminiumrahmen (6) gelagert. Der Rahmen ist mit schallisolierenden Platten bestückt und an Gummiseilen (7) an einem Stahlkreuz (8) an einer Seilwinde (9) an der Decke aufgehängt. Wenn nicht gemessen wird, müssen die Gummiseile entspannt und dazu der Rahmen auf dem Tisch (10) abgestellt werden.

4 Abstandsregelung durch Scherkraftmessung mit einer Quarzgabel

4.1 Scherkraftmethode zur Abstandsregelung

Bei der Scherkraftmessung wird ein mit der Sonde gekoppeltes System zu einer Schwingung in der Nähe einer Resonanz des Systems angeregt. Dabei wird die Fasersonde senkrecht zur Probenoberfläche ausgerichtet, so daß das Sondenende horizontal, also parallel zur Probenoberfläche schwingt. Durch Wechselwirkung der Faserspitze mit der Probe wird die Schwingung gedämpft und die Resonanzfrequenz des Systems verändert, in der Regel erhöht. Diese Signale können zur Abstandsregelung verwendet werden. Bei der Scherkraftmethode liegt typischerweise der geregelte Abstand zwischen Spitze und Präparat im Bereich weniger nm bis einiger 10 μ m.

Bei der Abstandsregelung eines Apertur-SNOM für Untersuchungen an festen Präparaten ist die Scherkraft-Abstandskontrolle die meistbenutzte Technik. Sie ist bei Glasfasernsonden besonders geeignet, da Glasfasern in Längsrichtung sehr steif sind und sich deshalb nicht zur Normalkraftdetektion eignen.

Der physikalische Effekt, der die Scherkräfte bewirkt, ist noch unklar. Wahrscheinlich ist es ein Zusammenwirken mehrerer Effekte. Beim Arbeiten in Luft ist eine Wasserkontaminationsschicht daran beteiligt, da die Scherkräfte von der Luftfeuchtigkeit abhängen [38-40]. Dabei werden zur Erklärung der Kräfte auch geordnete Wasserschichten in Betracht gezogen [40]. Wasserschichten sind jedoch nicht die einzige Ursache, denn es treten auch Scherkräfte im Vakuum [37, 41, 42] und bei sehr tiefen Temperaturen (1,8 K) auf [43]. Es gibt Veröffentlichungen, in denen die Scherkräfte durch Eindringen der Spitze in den repulsiven Kraftbereich des Präparats erklärt werden [44, 45]. Dies mag für große Schwingungsamplituden ein entscheidender Effekt sein, kann aber die Scherkräfte bei sehr kleinen Schwingungsamplituden nicht erklären: Bei Messungen von Grober und Karrai [37, 46] mit einer Schwingungsamplitude von nur einigen pm verläuft der durch Scherkräfte verursachte Amplitudenabfall beim Annähern über einen Bereich von etwa 10 μ m.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Scherkraft-Abstandsregelung zu verwirklichen: Die Scherkrafttechnik wurde gleichzeitig von Betzig und Toledo-Crow [47, 48] entwickelt. Dabei wurde das über die Halterung hinausragende Ende der Sonde mit einem Piezo

mechanisch zur Eigenresonanz angeregt und die Schwingungsamplitude optisch detektiert. Wegen des Justieraufwands und unerwünschten Streulichts sind aber auch Methoden entwickelt worden, die ohne Licht auskommen. Dazu wird eine Glasfasersonde auf einen Piezo oder eine Quarzgabel [49] geklebt, so daß die Faser weniger als $1\ \mu\text{m}$ übersteht. Das ganze System hat eine Eigenfrequenz, die nur leicht gegen die Eigenfrequenz des Piezos oder der Quarzgabel verschoben ist. Das System wird mechanisch oder direkt elektrisch [50, 51] nahe der Resonanzfrequenz zum Schwingen angeregt.

Das System kann dabei mit einer festen Frequenz und Amplitude durch einen externen Oszillator angetrieben werden. Bei einer Krafteinwirkung durch die Probe auf die Spitze ändern sich Phase und Amplitude des Stroms durch die Quarzgabel. Oder das System wird durch eine Rückkopplung so angeregt, daß es immer in der aktuellen Resonanzfrequenz schwingt - dann ändert sich die Frequenz bei einer Krafteinwirkung auf die Spitze.

Bei unserem Aufbau wurde die Glasfaser auf eine $100\ \text{kHz}$ -Quarzgabel geklebt, die direkt elektrisch durch einen externen Oszillator mit fester Frequenz und fester Spannungsamplitude angetrieben wurde. Der Strom durch die Quarzgabel, durch einen Stromvorverstärker und einen Lock-In-Verstärker verstärkt, wird als Regelsignal verwendet. Dieser Aufbau ist besonders einfach zu verwirklichen. Abb. 4.1 zeigt die Abstandsabhängigkeit der Lock-In-Verstärkerausgänge vom Proben-Spitzen-Abstand bei einer metallisierten Sonde auf einer Glasprobe an Luft.

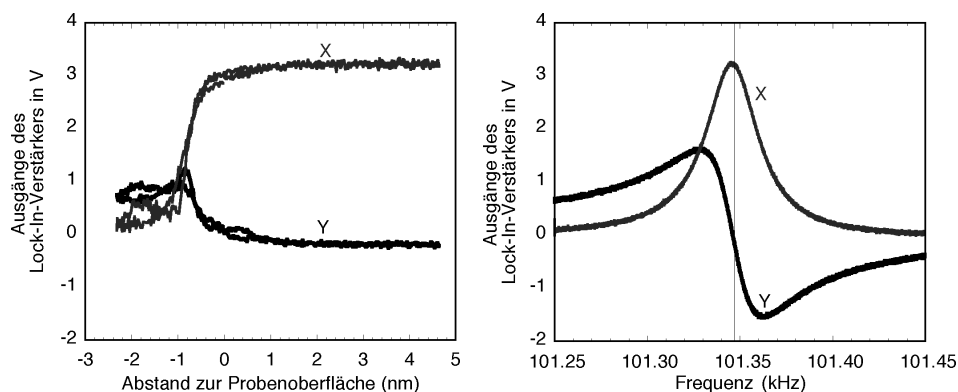


Abb. 4.1 Links: Typische Spitzen-Proben-Abstandsabhängigkeit der Lock-In-Ausgänge. Die Schwingungsamplitude beträgt ca. $0,5\ \mu\text{m}$ ($100\ \text{kHz}$ Spannungsamplitude beim Vorverstärkerausgang). Der Nullpunkt der x-Achse ist willkürlich gewählt - hier bei einer Resonanzfrequenzverschiebung von $1,5\ \text{kHz}$.

Rechts: Die Resonanzkurve der Quarzgabel, mit der links die Abstandsabhängigkeit aufgenommen wurde. Bei $101\ 347,5\ \text{Hz}$ (senkrechte Linie) wurde der Quarz für die Abstandsregelung angeregt.

4.2 Quarzgabeln mit fester Anregung als Kraftsensor

Die Quarzgabel kann durch ein elektrisches Ersatzschaubild beschrieben werden. Dies vereinfacht das Verständnis der Quarzgabel als Kraftsensor.

Die Quarzgabel ist ein mechanischer Schwinger, dessen mechanische Auslenkung durch den piezoelektrischen Effekt mit der Ladung gekoppelt ist. Ein mechanischer Schwinger wird durch die Differentialgleichung $m\ddot{x} + \zeta\dot{x} + kx = F$ beschrieben. Ein elektrischer Reihenschwingkreis aus einer Kapazität, einer Induktivität und einem Widerstand wird durch die analoge Differentialgleichung $L\ddot{Q} + R\dot{Q} + \frac{Q}{C} = U$ beschrieben. Daher läßt sich das elektrische Verhalten einer Quarzgabel durch folgendes elektrisches Ersatzschaubild beschreiben:

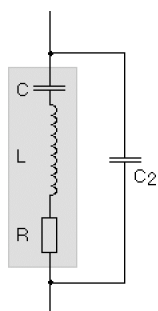


Abb 4.2 Ersatzschaltung einer Quarzgabel. Der grau hinterlegte Teil beschreibt den mechanischen Schwinger. C_2 ist eine Parallelkapazität durch die Elektroden.

Der linke Teil der Schaltung beschreibt den mechanischen Schwinger und C_2 ist die Kapazität der Kontakte.

Mit einem Umwandlungsfaktor ζ lassen sich die mechanischen und elektrischen Größen im mechanischen Ersatzschaubild in einander umrechnen:

$$U = \zeta F, \quad I = \frac{v}{\zeta}, \quad R = \zeta^2 \zeta, \quad \frac{1}{C} = \zeta^2 k, \quad L = \zeta^2 m$$

Für kleine Q-Faktoren oder außerhalb der Resonanz wird der Strom durch die Parallelkapazität dominiert. Man kann aber diesen Parallelstrom durch eine geeignete Schaltung kompensieren (siehe Abb. 4.3).

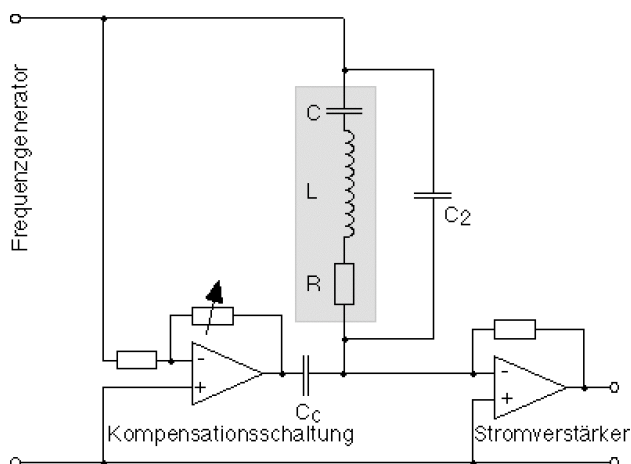


Abb. 4.3 Kompensationsschaltung der Parallelkapazität und Vorverstärkerschaltung.
Die Verstärkung der Kompensationsschaltung wird so gewählt, daß der Strom durch C_c gerade so groß wie der Strom durch C_2 ist, aber mit umgekehrtem Vorzeichen.

Für eine kleine Eingangsimpedanz des Stromverstärkers (verglichen mit der Impedanz der Quarzgabel) kann der Strom durch C_2 gut kompensiert werden und das Gesamtersatzschaubild kann auf das mechanische Ersatzschaubild reduziert werden.

Da die Eingangsimpedanz des Stromverstärkers nicht 0 ist, sollte die Kapazität C_c möglichst klein ($< 100 \text{ pF}$) gehalten werden, da sie sonst das Signal am Verstärkereingang kurzschließt.

4.3. Der Frequenzgang und Empfindlichkeit der Quarzgabelabstandsregelung

Für eine schnelle Regelung ist es wichtig, daß die Regelverstärkung hoch eingestellt werden kann. Dafür ist es günstig, nur Elemente mit einem möglichst breiten Frequenzgang in der Regelschleife zu haben. Deshalb soll hier das Ergebnis eines einfachen Modells für den Frequenzgang und die Empfindlichkeit eines Quarzgabelsensors diskutiert werden.

Im Anhang I wird der Frequenzgang und die Empfindlichkeit eines Quarzgabelsensors mit anschließendem Lock-In-Verstärker für kleine Höhenbewegungen aus der Soll-Höhe anhand des Ersatzschaubilds des Quarzgabelsensors hergeleitet. Dabei wurde der Sonderfall betrachtet, daß die Quarzgabel gerade bei ihrer Resonanzfrequenz im angenäherten Zustand

$$\varnothing_0 = \frac{\varnothing_0}{2\varnothing} = \sqrt{\frac{1}{LC}} \text{ angeregt wird.}$$

Es zeigt sich dabei, daß alle Ausgänge des Lock-In-Verstärkers (Amplitude A , Phase φ , $X = A \cdot \cos \varphi$ und $Y = A \cdot \sin \varphi$) den gleichen Frequenzgang $\frac{1}{1 + i\sqrt{3} \frac{\omega}{\omega_0}}$ haben, nämlich den eines

einfachen Tiefpaßfilters.

Hier ist ω die Frequenz der Höhenbewegung, $\frac{\omega}{\omega_0} = \frac{\sqrt{3}\omega_0^2 CR}{2} = \frac{\sqrt{3}\omega}{2m} = \frac{\omega_0}{2q}$ die

Grenzfrequenz des resultierenden Tiefpasses und $q = \frac{1}{\sqrt{3}\omega_0 CR}$ der Q-Faktor der Resonanz

des angenäherten Quarzes. Es zeigt sich, daß die Ausgänge A und X des Lock-In-Verstärkers nur auf die dämpfenden und die Ausgänge Y und φ nur auf die konservativen Kräfte empfindlich sind.

Der Quarz mit anschließendem Verstärker wirkt sich also insgesamt wie ein Tiefpaß aus. Dabei ist der zusätzliche einstellbare Tiefpaß des Lock-In-Verstärkers (also die Zeitkonstante des Lock-In) noch nicht berücksichtigt. Da weitere Bauelemente im Regelkreis zu einer zusätzlichen Phasenschiebung führen, wie z.B. der Rastertisch (Resonanz bei ca. 500 kHz) oder der Tiefpaß des Lock-In-Verstärkers, kann die Regelverstärkung nicht beliebig vergrößert werden, da sonst der Regelkreis zu schwingen anfängt. Um schnell regeln zu können, ist es daher günstig, wenn die Grenzfrequenz des Quarzgabelsensor-Tiefpasses möglichst hoch ist. Dafür muß die Dämpfung groß und die effektive Masse des schwingenden Systems möglichst klein sein.

Für die Regelung stehen noch zwei freie Parameter zur Verfügung - die Anregungsspannung U und der Sollwert der relativen Amplitudenabnahme S (falls die Signale X oder A des Lock-In-Verstärkers verwendet werden) bzw. der Sollwert der Frequenzverschiebung $\Delta\omega$ der Resonanzfrequenz beim Annähern an den Arbeitspunkt (falls das Signal Y verwendet wird). Die relative Amplitudenabnahme S ist hier als Verhältnis der Amplitude in der Resonanz bei großem Sonden-Proben-Abstand zur Amplitude in der Resonanz im Regelabstand definiert.

Wird die von Karrai [37] gemessene exponentielle Abstandsabhängigkeit der dämpfenden und konservativen Kräfte vorausgesetzt, so kann die Abhängigkeit der Arbeitsruhelage z_0 von S bzw. $\Delta\omega$ angegeben werden.

Es sei $\Delta R = \alpha_1 e^{\alpha_1 z}$, $\frac{1}{C} = \alpha_2 e^{\alpha_2 z}$ (mit $\alpha_1 = 4,02 \mu\text{m}$ und $\alpha_2 = 2,90 \mu\text{m}$ für eine Goldspitze auf Graphit [37]).

Dann gilt für die Höhe des Arbeitsabstand (Ruhelage):

$$z_0 = \frac{1}{\varpi_1} \ln \frac{S \varpi_1}{(1 \varpi S) R} \text{ für die Regelung mit } X \text{ oder } A, \text{ bzw.}$$

$$z_0 = \frac{1}{\varpi_2} \ln \frac{C \cdot \varpi \cdot \varpi_2}{2 \varpi \varpi} \text{ für die Regelung mit } Y.$$

Der Arbeitsabstand ist unabhängig von der Anregungsspannung der Quarzgabel. Er nimmt mit abnehmendem S bzw. mit zunehmender Resonanzfrequenzverschiebung $\varpi \varpi$ ab. Die dabei

auf die Probe ausgeübte Scherkraft $F = F_d + i \cdot F_k = \left(\frac{S \varpi 1}{S} + i \frac{2 \varpi \varpi \cdot k}{\varpi^2 \cdot \varpi} \right) \frac{U}{\varpi}$ nimmt aber

betragsmäßig zu.

Die Empfindlichkeit der Kraftmessung kann durch die Signale X und Y bei einer periodischen z -Bewegung der Amplitude R_z und Frequenz ϖ ausgedrückt werden, bezogen auf die mittlere (zeitliche gemittelte) ausgeübte Kraft F :

$$\frac{X(t)}{F} = \frac{1}{2 \cdot \varpi \cdot (1 + i \cdot \frac{2 \cdot S \cdot \varpi \varpi \cdot k}{(S \varpi 1) \cdot \varpi^2 \cdot \varpi})} \left(\frac{1}{\varpi} \frac{S}{S \varpi 1} \varpi \frac{\varpi \cdot \varpi_1 \cdot R_z}{1 + i \sqrt{3} \frac{\varpi}{\varpi_{\frac{1}{2}}}} e^{i(\varpi t + \varpi)} \right)$$

$$\frac{Y(t)}{F} = \varpi \frac{1}{2 \cdot \varpi \cdot \left(\frac{(S \varpi 1) \cdot \varpi^2 \cdot \varpi}{2 \cdot S \cdot \varpi \varpi \cdot k} + i \right)} \cdot \frac{\varpi \cdot \varpi_2 \cdot R_z}{1 + i \sqrt{3} \frac{\varpi}{\varpi_{\frac{1}{2}}}} e^{i(\varpi t + \varpi)}$$

Für eine hohe Empfindlichkeit muß ϖ möglichst groß sein. Das entspricht einer großen Spannung bei einer kleinen Kraft auf die Quarzgabel. Für eine hohe Empfindlichkeit muß außerdem die Dämpfung ϖ möglichst klein sein. Die Größe der relativen Amplitudenabnahme S und der Resonanzfrequenzverschiebung spielen nur eine Rolle, wenn gleichzeitig dämpfende und konservative Kräfte auftreten, also wenn gleichzeitig $S \ll 1$ und $\varpi \varpi \gg 1$ sind. Die Anregungsspannung U geht nicht in die Empfindlichkeit ein. Bei konstantem Proben-Spitzenabstand bewirkt eine größere Spannung U ein größeres Signal aber auch größere Kräfte. Da für eine hohe Topographieauflösung die Schwingungsamplitude klein und der Arbeitsabstand nicht zu groß sein darf, ist es im Zweifelsfall günstiger, eine kleinere Anregungsspannung und zum Ausgleich eine kleinere relative Amplitudenabnahme S bzw. eine größere Frequenzverschiebung zu wählen, um ein ausreichend großes Signal zu erhalten. Bei den Messungen dieser Arbeit wurde der Y-Ausgang des Lock-In-Verstärkers zur Abstandsregelung bei Resonanzfrequenzverschiebung $\varpi \varpi = \frac{\varpi \varpi}{2 \varpi} \varpi 1 \text{ Hz}$ und einer Schwingungsamplitude von ungefähr $1 \varpi \varpi \varpi \text{ m}$ verwendet.

Ein Arbeitspunkt außerhalb der Resonanzfrequenz erhöht die Bandbreite der Kraftdetektion [52, 53].

Dämpfende und konservative Kräfte haben jedoch einen sehr unterschiedlichen Phasengang, was die Wahl der richtigen Phase des Lock-In-Verstärkers kritisch macht.

Das Rauschen einer Quarzgabel ist von Grober ausführlich diskutiert worden [46].

4.4 "Holzmuster"-Artefakt

Wird ein *digitaler* Frequenzgenerator verwendet, so ist zu beachten, daß in der Regel das Verhältnis des internen Takts des Generators zur gewählten Ausgangsfrequenz nicht aufgeht. Dann kann der Frequenzgenerator nur im Mittel die gewünschte Frequenz liefern, im Kurzzeitbereich kommt es immer wieder zu Abweichungen der Phase, die durch kurzzeitige Frequenzänderungen wieder kompensiert werden. Diese Frequenz- bzw. Phasenschwankungen liegen - je nach geforderter Ausgangsfrequenz - in verschiedenen Frequenzbereichen. Für langsame Frequenzschwankungen können die zugehörigen Stromschwankungen direkt über die Frequenzabhängigkeit der Impedanz berechnet werden.

Die Impedanz der Quarzgabel in der Nähe der Resonanzfrequenz ω_0 ist

$$Z(\omega_0 + \Delta\omega) \approx R(1 + i\sqrt{3} \frac{\Delta\omega}{\omega_0^{1/2}}).$$

Eine kleine Frequenzabweichung um $\Delta\omega$ von der Resonanzfrequenz wirkt sich auf die Signale X und Y auf folgende Weise aus:

$$Y(\omega_0 + \Delta\omega) = \text{Im}(I(\omega_0 + \Delta\omega)) = \text{Im}\left(\frac{U}{Z(\omega_0 + \Delta\omega)}\right) \approx \frac{U}{2R} \frac{\sqrt{3} \frac{\Delta\omega}{\omega_0^{1/2}}}{\sqrt{1 + 3 \frac{\Delta\omega^2}{\omega_0^2}}} \approx \frac{\sqrt{3}U \cdot \Delta\omega}{2\omega_0^2 \cdot \omega_0^{1/2}}$$

statt $Y(\omega_0) = 0$.

$$X(\omega_0 + \Delta\omega) = \text{Re}(I(\omega_0 + \Delta\omega)) = \text{Re}\left(\frac{U}{Z(\omega_0 + \Delta\omega)}\right) \approx \frac{U}{R} \frac{1}{\sqrt{1 + 3 \frac{\Delta\omega^2}{\omega_0^2}}} \approx \frac{U}{R} = X(\omega_0).$$

Das Y-Signal überträgt die Frequenzschwankungen, das X-Signal dagegen weitgehend nicht. Diese Schwankungen können sich beim Regeln mit dem Y-Signal bei einer ungeschickten Wahl der Generatorfrequenz, bei der solche langsame Frequenzschwankungen auftreten, als "Holzmuster" zeigen (siehe Abb. 4.4). Das Muster läßt sich dabei auf folgende Weise erklären: Da die Periodendauer der Rasterbewegung längs einer Spalte und zurück nicht genau das Vielfache der Periodendauer der Schwankungen ist, verschiebt sich die Phasenlage

der Schwankungen von Spalte zu Spalte. Dadurch kommt es im Bild zu geneigten Streifen. Da der Rechner nach einer Rasterbewegung längs einer Spalte unregelmäßig lange Pausen einlegt, ist die Phasenänderung zwischen zwei Spalten nicht konstant. Daher ändert sich die Neigung der Streifen.

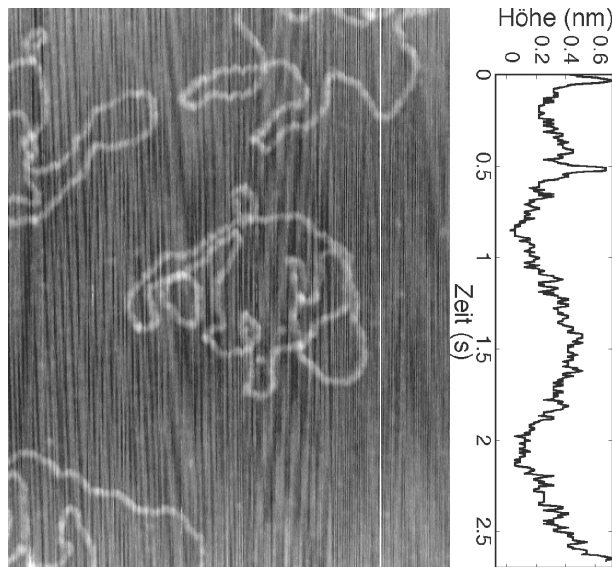


Abb. 4.4 Scherkräfteabbildung von DNA auf Glimmer mit "Holzmuster"-Artefakt.

Die schnelle Rasterrichtung ist vertikal, die Seitenlänge des Bildes in diese Richtung 1 μ m. Um geringe Höhenunterschiede trotz leichter Drift in z-Richtung sehen zu können, ist das Bild "geflattet", d.h. es wurde von jeder Spalte ihre Ausgleichsgerade abgezogen.

Durch Frequenzschwankungen des verwendeten Frequenzgenerators kam es zu dem Streifenmuster im Hintergrund ("Holzmuster"). Zum Regeln wurde das Y-Signal bei der Resonanzfrequenz des Quarzes verwendet. Das Schaubild rechts zeigt den zeitlichen Höhenverlauf längs der im Bild weiß markierten Linie. Die Höhenschwankung mit ca. 0,8 Hz ist deutlich erkennbar.

4.5 Messung der Schwingungsamplitude einer Quarzgabel

Die Schwingungsamplitude der Quarzgabel kann auf folgende Weise gemessen werden:

Der Quarz mit der Glasfasersonde wird dicht über einer Probe angeordnet, die an einer Kante abrupt von transparent zu undurchsichtig übergeht (z.B. ein Glas das teilweise mit einem Metallfilm bedeckt ist). Wird die Sonde senkrecht zur Kante der Probe bewegt, so wird die Apertur der Sonde von der Probe mehr oder weniger verdeckt. Da es nur auf die relative Position der Spitze zur Probe ankommt, kann die resultierende Änderung der Intensität durch

ein definiertes Verschieben der Probe bei ortsfester Glasfasersonde geeicht werden. Der Strahlengang ist in Abb. 4.5 veranschaulicht.

Bei unseren Messungen wurde eine metallische Lochmaske auf einem Deckgläschen verwendet. Um ein großes Signal zu bekommen, sollte die Glaserfaser möglichst nur einige $100\ \mu\text{m}$ von der Probe entfernt sein, damit der Fokus des auf die Faser eingestellten Objektivs in der Höhe der Probe noch möglichst klein ist. Der Quarz sollte gegenüber der Kante der Probe so orientiert sein, daß die Schwingungsrichtung senkrecht zur Kante steht. Die Eichbewegung muß in Schwingungsrichtung des Quarzes erfolgen, sonst müssen die Bewegungen ineinander umgerechnet werden.

Das Eichen geschieht bei einer niedrigen Frequenz ($5\ \text{kHz}$), weil der Rastertisch einen starken Frequenzgang hat. Da die Schwingungsamplitude des Quarzes bei dessen Resonanzfrequenz (ca. $101\ \text{kHz}$) gemessen wird, müssen Signale bei sehr verschiedenen Frequenzen miteinander verglichen werden. Deshalb muß der Frequenzgang des Photomultipliers ermittelt und herausgerechnet werden. Dies geschieht, indem die Intensität des Lasers durch eine Pockels-Zelle moduliert wird und diese Modulation bei beiden Frequenzen gemessen wird. Da die Pockels-Zelle einen hohen Frequenzgang hat, kann so der Frequenzgang des Photomultipliers kontrolliert werden.

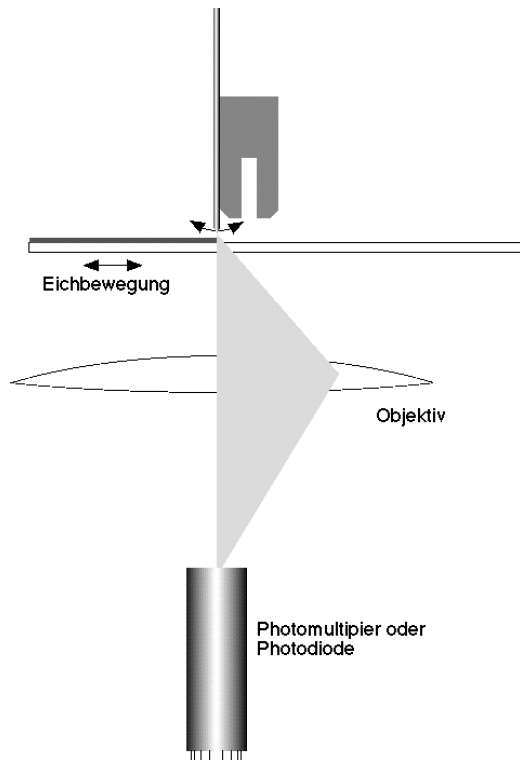


Abb. 4.5 Lichtweg bei der Messung der Schwingungsamplitude einer Quarzgabel.

Die Amplitude des durch die Pockels-Zelle modulierten Lichts fällt beim Wechsel der Frequenz von 5 MHz auf 101 kHz auf ca. 0.9 des ursprünglichen Werts ab.

Es wurden gemessene Signalhöhen bei 10 nm bis 50 nm Bewegungsamplitude des Rastertisches mit Signalhöhen beim Anlegen eines Wechselspannungssignals von 5 V bis 145 V an den Quarz bei seiner Resonanzfrequenz verglichen. Es ist günstiger, die Ausgangsspannung des Vorverstärkers als Referenz zu verwenden, da sie für kleine Eingangsspannungen am Quarz und einer gut eingestellten Kompensation der Parallelkapazität des Quarzes unabhängig von der Güte des Quarzes ist. Die Ergebnisse lassen sich somit auf andere Quarzgabeln gleicher Bauart übertragen. Dabei ergibt sich für die Ausgangsspannung des verwendeten Stromvorverstärkers eine Eichkonstante von $k = 9.31 \frac{\text{nm}_{\text{pp}}}{\text{V}_{\text{pp}}}$. Wählt man also die an den Quarz angelegte Spannung so niedrig, daß die

Ausgangsspannung des Vorverstärkers kleiner 0.1V_{pp} ist, so ist die Schwingungsamplitude kleiner als 0.5 nm. Ein typischer Wert für die Schwingungsamplitude der Topographiebilder dieser Arbeit ist ca. 1 nm.

4.6 Scherkraft-Abstands-Regelung in Wasser

Die Übertragung der Scherkraft-Abstands-Regelung in Luft mit einer Quarzgabel auf die Abstandsregelung in Wasser oder wäßriger Lösungen bereitet einige Probleme:

Da die Kontakte auf der Quarzoberfläche angebracht sind, würden diese beim Eintauchen in eine leitfähige Lösung kurzgeschlossen.

Außerdem ist in Wasser die Quarzgabel sehr stark gedämpft, wodurch ihre Empfindlichkeit stark reduziert wird.

Trotzdem wurde von Rensen versucht, mit ganz in Wasser eingetauchter Quarzgabel Scherkräfte zu detektieren [54]. Dazu wurden die Elektroden auf der Quarzgabel mit Elektrolack isoliert und der Quarz extern zum Schwingen angeregt, also nur als auslenkungssensitive Stromquelle betrieben. Der Quarz kann allerdings nicht intern getrieben werden, da der kapazitive Parallelstrom über Lack und Wasser zu groß ist, so daß das eigentliche Signal im Rauschen untergeht. Es wurde eine Güte von 62 erreicht, die bei einer harten Probe zur Abbildung ausreicht. Da die Elektroden weitgehend kapazitiv über den Lack mit dem Wasser kurzgeschlossen sind und wegen der geringen Güte (in Luft erreicht man zum Vergleich typischerweise Güten von 1000 bis 2000), erreicht man nur ein ungünstiges Signal-zu-Rausch-Verhältnis, was das Abbilden weicher und sehr flacher Proben erschwert.

Außerdem kann der Quarz so nur in reinem Wasser und nicht in ionischen Lösungen betrieben werden, da sonst das Signal ganz kurzgeschlossen wird [55].

Deshalb ist es günstiger, in dünnen Wasserschichten zu arbeiten, wobei der Quarz außerhalb des Wassers bleibt.

Dünne Wasserschichten können auf verschiedene Weise verwirklicht werden [55, 56], z.B., indem sich der Quarz in einem nach oben gasdicht abgeschlossenen, mit Luft gefüllten Röhrchen befindet und nur die Spitze der Glasfaser über den unteren Rand des Röhrchens heraussteht [56] (siehe Abb. 4.6 a). Oder es wird in einem kleinen Loch durch Kapillarkräfte ein dünner Wasserfilm gehalten, der durch Zufluß aus einem Wasserreservoir in konstanter Höhe gehalten wird [57]. Letzterer Weg wurde auch in dieser Arbeit eingeschlagen.

Die Idee dabei war, die Kapillarkräfte zwischen einer Glimmerscheibe und der hydrophilen Probe auszunutzen, um in einem Loch im Glimmer eine dünne Wasserschicht zu erzeugen (siehe Abb. 4.6 b).

Dazu wird eine Glimmerscheibe frisch gespalten und mehrere Stunden bei Zimmertemperatur in ein Gefäß gelegt, das mit n-Hexadecyltrichlorosilan-Dampf gefüllt ist. Der Dampf reagiert mit der Glimmoberfläche und bildet einen stark hydrophoben Film. Anschließend wird der Glimmer gespalten, so daß er eine hydrophile und eine hydrophobe Seite besitzt. In den Glimmer wird ein Loch mit $0,3\text{--}0,5\text{ }\mu\text{m}$ Durchmesser gebohrt. Der Glimmer wird dann mit der hydrophilen Seite durch eine Feder leicht von oben auf die hydrophile Probe gepreßt, und an den äußeren Rand die wäßrige Lösung gegeben. Durch Kapillarkräfte wird die Lösung in den Spalt zwischen Glimmer und Probe gezogen und füllt auch das gebohrte Loch. Da die Oberseite des Glimmers hydrophob ist, tritt die Lösung nicht auf die Oberseite des Glimmers aus. Durch unterschiedliche Dicke des Glimmerplättchens, unterschiedliche Aufpreßkraft auf den Glimmer und unterschiedlichen Druck der wäßrigen Lösung (erzeugt durch hydrostatischen Druck und durch Oberflächenspannungen) kann ein gewünschter Wasserstand in dem Loch erreicht werden. Der Durchmesser des Lochs darf nicht zu groß gewählt werden, da bei größeren Löchern der Wasserfilm im Loch dazu neigt, bei niedrigem Flüssigkeitsstand ganz aufzureißen.

Auf diese Weise sind leicht Schichtdicken von nur $40\text{ }\mu\text{m}$ Flüssigkeitsstand zu erreichen. Die Schichtdicke wurde gemessen, indem in dem invertierten Mikroskop das Objektiv zuerst auf die Grenzfläche Wasser/Luft scharf gestellt wurde und dann auf die Grenzfläche Probenglas/Wasser und dabei die Distanz gemessen wurde, um die das Objektiv dabei abgesenkt werden mußte. Zur Berechnung der Schichtdicke muß die dabei gemessene Hubhöhe mit n^{-1} multipliziert werden (dies gilt nur näherungsweise für achsnahe Strahlen).

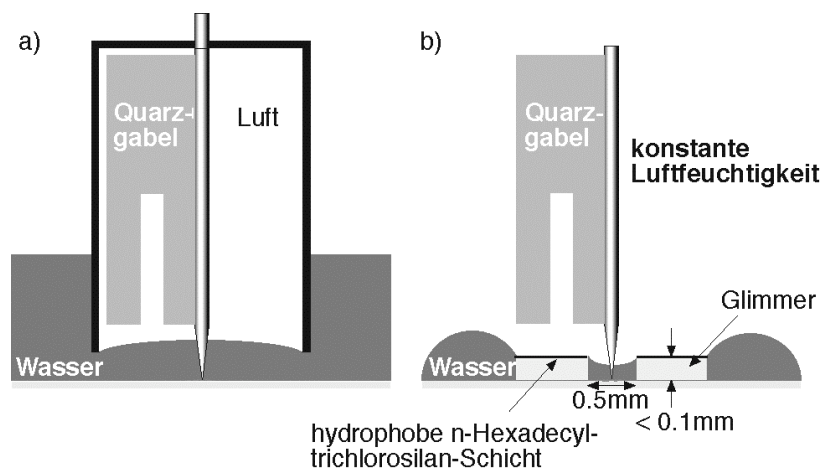


Abb. 4.6 Abstandsregelung mit Quarzgabeln in dünnen Wasserschichten. a) In luftgefülltem Röhrchen. b) In einem dünnen Wasserfilm in einem Loch in einer Glimmerscheibe.

Taucht man eine Glasfasersonde in die Flüssigkeitsschicht ein, so hängt die Eintauchtiefe nicht nur von der Schichtdicke des Wasserfilms ab, sondern auch von den Oberflächeneigenschaften der Sonde. Bei einer hydrophilen Sonde, z.B. einer nicht bedampften Glassonde, steigt das Wasser an der Sonde hoch und sie wird stärker gedämpft. Dagegen ist eine mit Chrom und anschließend mit Aluminium bedampfte Glasfaser eher hydrophob, so daß sich die Flüssigkeitsoberfläche an der Sonde nach unten durchwölbt und die Faser weniger tief in die Lösung eintaucht und dadurch weniger gedämpft wird.

Es ist daher sinnvoll, eher hydrophobe Sonden zu wählen.

Wichtig ist, über dem Wasser eine hohe (ca. 50%–70%) und vor allem stabile Luftfeuchtigkeit zu halten.

Ausreichend hoch sollte die Luftfeuchtigkeit sein, um die Verdunstung des Wassers möglichst gering zu halten. Verdunstet Wasser, so ändert sich der Wasserstand und die Krümmung der Oberfläche des Wasservorrats am Glimmerrand und dadurch der Wasserdruck, was zu einer Veränderung des Wasserstands im Loch führt. Außerdem ändert sich bei einer wäßrigen Lösung dadurch die Salzkonzentration im dünnen Wasserfilm. Allerdings darf die Luftfeuchtigkeit nicht zu hoch sein, da bei sehr hoher Luftfeuchtigkeit (> ca. 80%) ein zusätzlicher, dem Quarz parallel geschalteter Strom auftritt. Da bei unserem Aufbau der Vorverstärker jedoch ebenso der hohen Luftfeuchtigkeit ausgesetzt war, konnte leider nicht festgestellt werden, an welchem Bauelement dieser Parallelstrom auftritt.

Es ist wichtig, daß die Luftfeuchtigkeit stabil ist, da die Güte der Quarzgabel und ihre Resonanzfrequenz stark von der Luftfeuchtigkeit abhängen (Abb. 4.7). Bei Quarzgabeln mit angeklebter Glasfaser ist dieser Effekt noch deutlich stärker.

Da beim Abbilden die Frequenzänderung der Resonanz typischerweise zwischen dem abgehobenen Zustand und dem angenäherten Zustand in der Größenordnung von einem Hertz gewählt wird, um die Kräfte auf die Probe gering zu halten, sind die Änderungen der Resonanzfrequenzen durch eine Luftfeuchtigkeitsänderung im Verhältnis dazu sehr groß. Deshalb sind in der Nähe der Quarzgabel Luftströmungen, die Schwankungen in der lokalen Luftfeuchtigkeit erzeugen, unbedingt zu vermeiden.

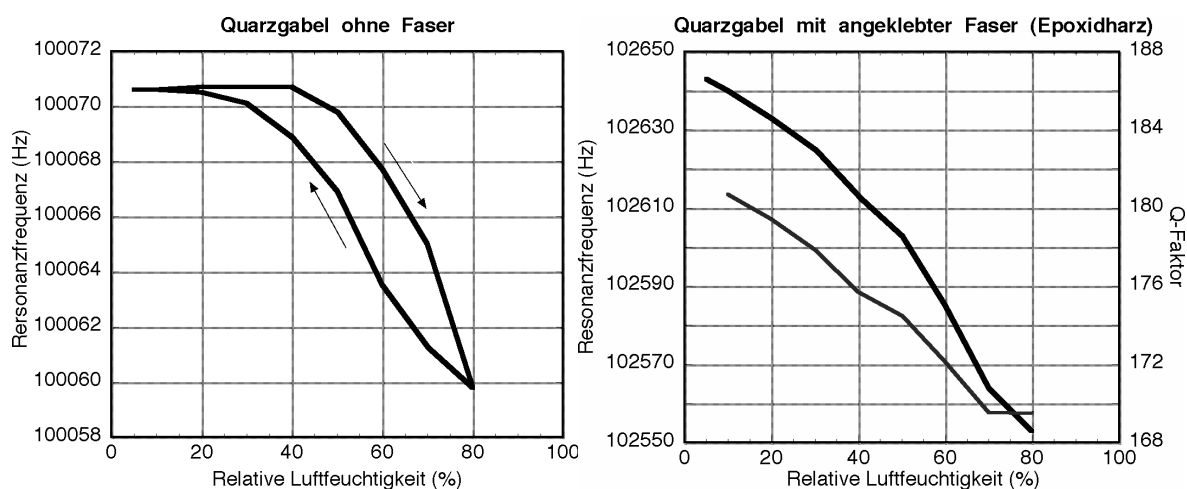


Abb. 4.7 Messungen der Abhängigkeit der Resonanzfrequenz bzw. des Q-Faktors von der Luftfeuchtigkeit.

Links: Quarzgabel ohne Glasfaser. Beim Ändern der Luftfeuchtigkeit durchläuft die Resonanzfrequenz eine Hystereseurve.

Rechts: Bei einer Quarzgabel mit aufgeklebter (Zweikomponentenkleber) Glasfaser ist die Abhängigkeit von der Luftfeuchtigkeit noch größer. Diese Messung wurde bei hoher Luftfeuchtigkeit begonnen. Die obere Kurve ist die Abhängigkeit der Resonanzfrequenz, die untere Kurve die des Q-Faktors. Die Meßwerte wurden jeweils ca. 10 Minuten nach dem Verändern der Luftfeuchtigkeit ermittelt.

Die folgenden drei Resonanzkurven (siehe Abb. 4.8) eines Quarzes mit metallisierter Sonde verdeutlichen die Größenordnung der Effekte beim Betreiben einer Quarzgabel an dünnen Wasserschichten: Beim Ändern der Luftfeuchtigkeit von 25% auf ca. 50% bis 60% sank die Resonanzfrequenz um 49 Hz und die Güte um 13%, beim Eintauchen der metallisierten Glasfaserspitze in eine 42 µm tiefe Wasserschicht bis fast zur Berührung des Bodens änderte sich dagegen die Resonanzfrequenz nur um 1 Hz und die Güte nur um 6%. Beim Arbeiten

an solch dünnen Wasserschichten ist die Konstanthaltung der Luftfeuchtigkeit noch wichtiger als die Konstanthaltung des Flüssigkeitstandes.

Bei dickeren Wasserschichten nimmt die Bedeutung des Flüssigkeitstandes jedoch schnell zu.

Bei einer Messung eines Quarzes in einer 287 μm tiefen Wasserschicht war die Gesamtfrequenzverschiebung gegenüber trockener Luft bereits 159 Hz .

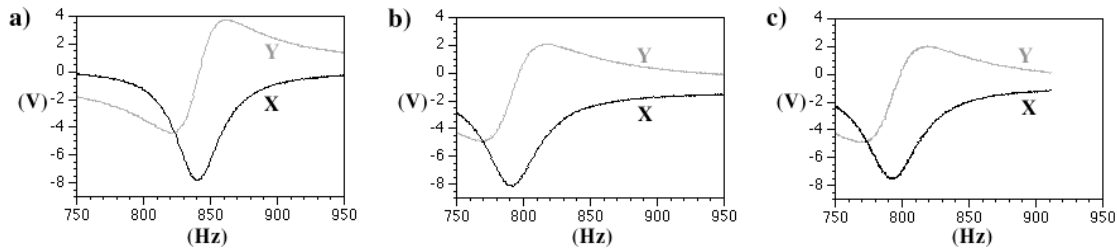


Abb. 4.8 Resonanzkurven einer Quarzgabel mit angeklebter metallisierter Glasfaser. X und Y sind die Ausgänge des Lock-In-Verstärkers. Zur klareren Darstellung sind auf der x-Achse nur die 3 letzten Ziffern der Frequenz angegeben; es müssen noch 101 kHz addiert werden.

a) Messung an Luft bei 25% Luftfeuchtigkeit.

Resonanzfrequenz 101 kHz 840 Hz , $Q = 1000$.

b) Messung an Luft bei 50 bis 60% Luftfeuchtigkeit.

Resonanzfrequenz 101 kHz 791 Hz , $Q = 1064$.

c) Messung bei einer eingetauchten Sonde in eine 42 μm dicke Wasserschicht bei 50 bis 60% Luftfeuchtigkeit.

Resonanzfrequenz 101 kHz 92 Hz , $Q = 1069$.

Es wurden Näherungskurven einer EBD-Spitze ("electron beam deposited tip", siehe Kapitel 5.2.2) zur Glimmeroberfläche in Wasser und an Luft verglichen (Abb. 4.9).

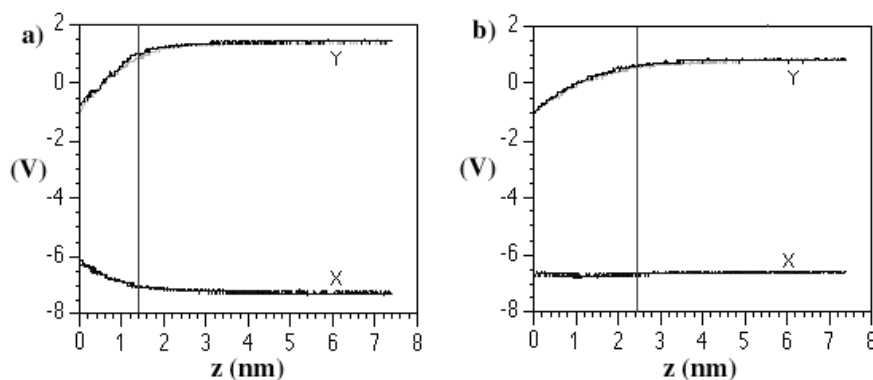


Abb. 4.9 Näherungskurven einer Quarzgabel mit einer Sonde mit EBD-Spitze auf Glimmer. a) an Luft, b) in Wasser. Der Nullpunkt der z-Skala ist willkürlich gewählt. Die vertikale Linie markiert den Abstand mit 1 Hz Frequenzverschiebung. Die Näherungskurve an Luft ist steiler, zeigt dafür aber Ansätze von Instabilitäten und Hysterese.

An Luft zeigt die Näherungskurve Schwankungen, die wahrscheinlich durch Eindringen der Spitze in den Wasserfilm, der sich auf der hydrophilen Glimmeroberfläche bildet, verursacht wird. Diese Schwankungen treten in Wasser nicht auf, da die ganze Spitze schon in Wasser eingetaucht ist. Die Näherungskurve in Wasser ist flacher, was zu einem größeren Höhenrauschen beim Abbilden in Wasser führt.

Abb. 4.10 zeigt eine Aufnahme einer Glasfläche in Wasser, in der kleine Löcher sind.

Das Bild zeigt, daß mit der Methode dünner Wasserschichten Unterwasseraufnahmen möglich sind.

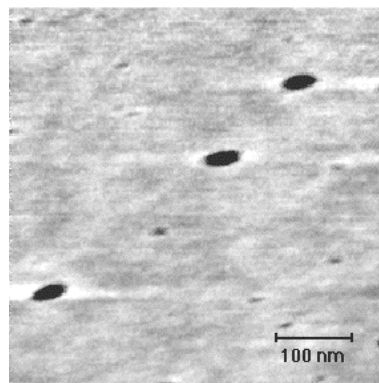


Abb. 4.10 Aufnahme einer Glasfläche mit Löchern, die mit einer Wasserschicht bedeckt ist. Die Löcher sind durch eine laterale Drift während der Aufnahme leicht verzerrt. Die vertikale Drift wurde durch einen Hochpaßfilter wegkompensiert. Schnelle Rasterichtung: horizontal.

Die beschriebene Methode hat jedoch zwei große Nachteile. Der erste Nachteil ist, daß durch das ungünstige Verhältnis von Oberfläche zu Volumen sich durch Verdunstung rasch die Konzentration in der dünnen Wasserschicht ändert und möglicherweise Salze ausfallen.

Die zweite Schwierigkeit ist das Zugeben von Chemikalien in die Flüssigkeit während des Abbildens. Gibt man sie dem äußeren Flüssigkeitsvorrat zu, so wird es eine längere und schlecht definierte Zeit brauchen, bis sie das Loch im Glimmer erreicht hat.

5. Die Tip-On-Aperture (TOA) Sonde

In diesem Kapitel wird eine neue SNOM-Sonde beschrieben, die die hohe optische und topographische Auflösung der Streusonde mit der guten Hintergrundunterdrückung der Apertursonde vereint.

5.1 Die Idee der TOA-Sonde: Die Vereinigung des Streu-SNOM mit dem Apertur-SNOM

Wie schon in Kapitel 2.2 beschrieben, hat die Apertursonde im Beleuchtungsmodus eine besonders geringe Hintergrundbeleuchtung und somit auch nur eine geringe dadurch verursachte Hintergrundfluoreszenz. Sie ermöglicht damit die Abbildung fluoreszierender Einzelmoleküle.

Andererseits ist sie wegen der Metallbeschichtung breit und hat deshalb nur eine geringe Topographieauflösung. Das optische Bild ist oft gegenüber dem topographischen verschoben, da ein Metallkorn der Abschirmung und nicht die Apertur als vorderste Spitze wirkt. Außerdem ist die optische Auflösung, die dem Aperturdurchmesser entspricht, in der Regel schlechter als 50 nm .

Dagegen hat die Streusonde sowohl optische als auch topographische Auflösungen, die ungefähr dem Spitzenradius entsprechen und es können daher höhere Auflösungen von nur wenigen nm erreicht werden. Hier wirkt der vorderste Spitzenbereich der Sonde sowohl topographisch als auch optisch als abbildendes Element und daher sind die beiden resultierenden Bilder idealerweise nicht zueinander verschoben. Die Streusonde hat jedoch für Fluoreszenzmessungen den großen Nachteil, daß die gesamte Spitzenumgebung mit dem Anregungslicht beleuchtet wird, was zu einem starken Fluoreszenzhintergrund und zum Ausbleichen der beleuchteten Farbstoffmoleküle führt.

Die Idee der TOA-Sonde ist, eine scharfe, kurze Metallspitze an den Rand einer Apertursonde zu setzen und diese über die Nahfelder der Apertur zu beleuchten. Wird die Polarisation des Beleuchtungslichts so gewählt, daß die Metallspitze in einem Bereich mit maximaler Feldkomponente längs der Spitze steht, so wird in der Metallspitze ein Längsstrom erzeugt, der am Spitzende eine Ladungsanhäufung verursacht. Dadurch kommt es wie bei der Streusonde zu einer Feldüberhöhung am Spitzenende, die zur Lichtfokussierung verwendet

werden kann. Die TOA-Sonde hat gegenüber der normalen Streusonde jedoch den Vorteil, daß eine kleinere Umgebung der Spitze beleuchtet wird. Außerdem wird die Spitze durch ein - zumindest weitgehend - evaneszentes Feld beleuchtet, das mit dem Abstand zur Apertur stark abnimmt. Das hohe Beleuchtungsfeld am Fuß der Metallspitze - verglichen mit dem Beleuchtungsfeld am Ende der Metallspitze - verursacht einen vergleichsweise starken Längsstrom und dadurch auch ein starkes Spitzenfeld. Daher wird insgesamt eine höhere effektive Feldüberhöhung am Spitzeneende erreicht als bei einer gleichmäßigen Beleuchtung.

Im Kapitel 7.2.2 wird anhand von Messungen gezeigt, daß mit der TOA-Sonde einzelne Fluoreszenzmoleküle abgebildet werden können. Dabei kann eine Auflösungen besser als $16\mu\text{m}$ erreicht werden. Die Topographie- und Fluoreszenzabbildungen sind im Rahmen der Auflösung nicht zueinander verschoben. Die TOA-Sonde vereint also die Vorteile der Apertursonde mit denen der Streusonde.

5.2 Die Sondenherstellung

Die Sondenherstellung ist in drei Unterkapitel gegliedert. Die Grundlage der TOA-Sonde ist die Apertursonde, deren Herstellung im Kapitel 5.2.1 beschrieben wird. Das Wachsen von EBD-Spitzen und deren Bearbeitung wird in 5.2.2 beschrieben und schließlich in 5.2.3 das Herstellen einer TOA-Sonde aus einer Apertursonde.

5.2.1 Herstellung von Glasfaserapertursonden

Zur Herstellung von Apertursonden aus Glasfasern, muß zunächst eine Glasfaser scharf gespitzt werden. Dann wird sie mit Metall bedampft und - falls das nicht schon automatisch durch den Aufdampfprozeß geschieht - muß an der Faserspitze eine Apertur geöffnet werden.

Zum Glasfaserschärfen werden in der Literatur verschiedene Zieh- [58, 59] und Ätzverfahren [60, 61] oder Kombinationen davon [62] vorgestellt.

Beim Ziehen werden die Fasern mit definierten Parametern lokal bis auf die Erweichungstemperatur erhitzt (meistens durch einen fokussierten CO_2 Laser) und dann auseinandergezogen und abgekühlt. Dabei können Glasspitzen mit nur einigen $10\mu\text{m}$ Krümmungsradius und sehr glatter Oberfläche hergestellt werden. Ein Nachteil dabei ist die Schwierigkeit, Spitzen mit kleinem Spitzenradius und gleichzeitig großem Öffnungswinkel (typischerweise $< 40^\circ$, [59]) herzustellen.

In einem Hohlleiter kann sich Licht nur oberhalb eines Minstdurchmesser, dem Cut-Off-Durchmesser, ausbreiten. Ist der Durchmesser geringer, so fällt die Intensität mit der zurückgelegten Strecke exponentiell ab. Daher ist bei einer Apertursonde - einem konisch zulaufenden Hohlleiter - ein großer Öffnungswinkel für eine hohe Transmission wichtig, um den Cut-Off-Bereich kurz zu halten [59, 63]. Gezogene Fasern mit ihrem kleinen Öffnungswinkel haben daher meistens eine geringe Transmission.

Bei den Ätzverfahren wird dagegen das Glas mit HF-haltigen Ätzlösungen geätzt. Je nach Technik sind auch große Öffnungswinkel möglich, wodurch die Transmission dieser Fasern meistens größer als bei gezogenen Fasern ist. Die Oberfläche der geätzten Fasern ist dagegen oft rauher [64] als beim Ziehen, so daß die Gefahr von Lecks größer ist und die Spitzen mit einer dickeren Metallschicht bedampft werden müssen. Manche Gruppen polieren daher ihre geätzten Spitzen vor dem Bedampfen [65].

In dieser Arbeit wurden zwei Ätzverfahren verwendet, das Tube-Etching-Verfahren [61] und das Ätzen mit selektiven Ätzlösungen [60].

1. Das Tube-Etching-Verfahren

Die Single-Mode-Glasfaser (FS-SN-3224, 3M) wird mitsamt der Kunststoffhülle in 40%iger Flußsäure - gegen Ausdünstungen mit Iso-Oktan überschichtet - bei Zimmertemperatur eingetaucht. Innerhalb von ca. zwei Stunden bildet sich von selbst eine Spitze, die - wie in Abb. 3.1 illustriert - bleistiftartig konisch zuläuft. Die Ätzdauer ist nicht von großer Bedeutung, da bei längerem Ätzen die Faser nur zurückgeätzt wird, aber die Spitzenform erhalten bleibt. Beim Ätzen muß also nur eine Mindestdauer eingehalten werden.

Die Kunststoffhülle muß nachträglich entfernt werden. Dies kann erreicht werden durch Eintauchen in CH_2Cl_2 , wodurch die Kunststoffhülle weich wird und nach 1 Minute mit einer Pinzette abgezogen werden kann. Die Vorgehensweise beim Abziehen ist in Abb. 3.1 dargestellt. Oder man kann die Hülle entfernen, indem man die Faserenden in heiße (dicht unter Siedetemperatur) konzentrierte Schwefelsäure eintaucht, wo die Hülle sich auflöst [61].

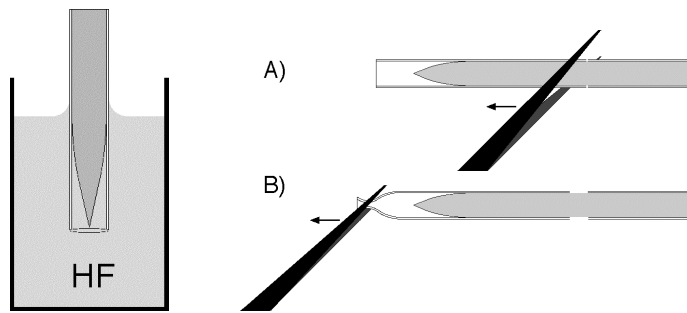


Abb. 3.1 Tube-Etching-Verfahren: Das linke Bild zeigt, wie die Glasfaser in ihrer Kunststoffhülle in Flußsäure geätzt wird.

Das Schema rechts zeigt, wie nach dem Ätzen die Kunststoffhülle entfernt werden kann. Nach einer Minute Einweichen in CH_2Cl_2 wird die Kunststoffhülle wie in A) eingerissen und dann wie in B) abgezogen.

Beim Tube-Etching gibt es folgende Probleme:

- Oft brechen die vordersten Spitzenenden ab.
- Am Spitzenende setzten sich gerne Verunreinigungen ab, was später zu Lecks in der Metallummantelung führt.
- Die Öffnungswinkel liegen ungefähr bei 25° – 30° , stumpfere Winkel wären günstiger.

2. Ätzen mit selektiven Ätzlösungen

Diese Methode wurde zuerst von Ohtzu [60] an Ge-dotierten Glasfasern angewandt. Diese haben eine starke Eigenfluoreszenz und sind deshalb nur schlecht für Fluoreszenzanwendungen geeignet. Die Methode ließ sich jedoch auf eine Faser (FS-SN-3224, 3M) mit geringer Eigenfluoreszenz übertragen.

Glasfasern haben einen Kern, der aus einem Glas mit höherem Brechungsindex als der des umgebenden Glases hergestellt ist. Bei der selektiven Ätz-Methode wird ausgenutzt, daß sich an einer senkrecht abgeschnittenen Faser von selbst eine Spitze bildet, wenn eine Ätzlösung verwendet wird, die den Kern der Faser langsamer ätzt als das den Kern umgebende Glas. Diese Spitze hat eine Basisbreite so groß wie der Durchmesser des Kerns, und der Öffnungswinkel φ der Spitze wird durch das Verhältnis der Ätzgeschwindigkeiten des äußeren Glases $v_{\text{außen}}$ zum Glas des Kerns v_{Kern} bestimmt:
$$\sin \frac{\varphi}{2} = \frac{v_{\text{Kern}}}{v_{\text{außen}}}.$$

In der Praxis darf der Sockel des den Kern umgebenden Glases nicht zu breit sein, damit beim Abbilden mit der Sonde auch noch bei einer leichten Verkippung aus der Vertikalen die Spitze der tiefste Punkt der Sonde bleibt. Deshalb wird der Radius der Faser in einem ersten

Ätzschritt mit einer schnell ätzenden Lösung verkleinert. Dazu wird Faser 100min bei Zimmertemperatur in einer Mischung aus 40% HF, 40% NH₄F und H₂O im Verhältnis zu 1:1:1 geätzt. Die Lösung ätzt das umgebende Glas eher langsamer als den Kern. Der anfängliche Durchmesser von 125µm der Faser wird dabei auf ca. 60µm reduziert. Es ist jedoch zu beachten, daß der Durchmesser der Faser nur im Bereich der vordersten ca. 100µm der Faser auf den Minimaldurchmesser verringert wird, da sonst die Faser zu biegsam wird und das Scherkräftsignal nur noch schlecht überträgt. Da mit abnehmendem Durchmesser der Miniskus niedriger wird, muß die Faser zunächst etwas tiefer eingetaucht und regelmäßig überprüft werden, ob die Faser noch in die Ätzlösung eintaucht.

In einem zweiten Ätzschritt wird die Spitze erzeugt. Dabei wird das Glasfaserende mindestens 3min bei Zimmertemperatur in einer Mischung im Verhältnis 1:1:10 geätzt. Diese Lösung ätzt insgesamt sehr viel langsamer, ätzt dafür aber den Kern noch langsamer als seine Umgebung, so daß eine Spitze erzeugt wird. Der Durchmesser der Glasfaser wird dabei auf ca. 15-30µm verringert.

Dieses Ätzverfahren hat den Vorteil, daß Spitzen mit großem Öffnungswinkel (für die angegebene Lösung ca. 70-80°, siehe Abb. 5.2) erzeugt werden. Außerdem setzen sich eventuelle Verunreinigungen aus der Lösung nicht an der Spitze ab, sondern schon an dem die Spitze umgebenden Plateau, wo sie weniger stören.

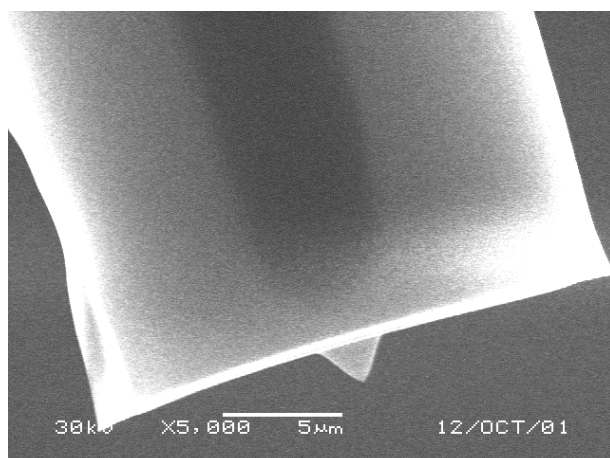


Abb. 5.2 Mit der selektiven Ätzmethode geätzte Spitze.

Bedampfen und Aperturerzeugung:

Um die zugespitzte Faser optisch zu isolieren, wird sie rotierend im Hochvakuum (nominell ca. $5 \cdot 10^{-6}$ Torr) mit Metall bedampft. Das Aufdampfen einer dünnen Chromschicht von nur wenigen nm verbessert die Haftung der folgenden Metallschichten. Für die Herstellung

normaler Apertursonden ist die Verwendung von Aluminium als eigentliche Metallschicht am günstigsten. Denn Aluminium reflektiert unter den uns zu Verfügung stehenden Metallen am besten sichtbares Licht und weist die geringste Eindringtiefe auf. Für die Herstellung der TOA-Probe eignet sich Gold besser, da Gold im Rasterelektronenmikroskop einen guten Kontrast zu Glas abgibt und daher die Apertur gut zu sehen ist. Dies ist für das Positionieren der EBD-Spitze (siehe Kapitel 5.2.2) sehr wichtig. Bei Aluminium reicht eine Schichtdicke von ca. 100nm (Eindringtiefe bei 496nm Wellenlänge: $6,7\text{nm}$, [66]), bei Gold von 150nm – 200nm (Eindringtiefe bei 496nm Wellenlänge: 21nm , [66]). Für eine gegebene Transmission müssen die Schichtdicken wegen der Körnigkeit und eventueller Löcher deutlich dicker als der berechnete Wert sein.

Bei gezogenen oder durch Tube-Etching hergestellten Fasern ist es eine gängige Methode, die Apertur dadurch zu erzeugen, daß die Metallbeschichtung seitlich, leicht schräg von hinten aufgedampft wird und dadurch die vorderste Spitze abgeschattet bleibt. Ein Nachteil dabei ist, daß die aufgedampfte Metalldicke und der Aufdampfwinkel genau eingehalten werden müssen, um einen bestimmten Aperturdurchmesser zu reproduzieren. Außerdem hat diese Methode den Nachteil, daß sich beim Aufdampfen auch in Spitzennähe Metallkörner bilden – dies wird dort sogar durch den flachen Aufdampfwinkel begünstigt. Metallkörner am Aperturrand sind für die Abbildungseigenschaften der Sonde sehr störend, da sie den Abstand zwischen der Sonde und der Probe vergrößern [67, 68]. Zuletzt ist diese Methode für Spitzen, die nach dem selektiven Ätzverfahren hergestellt wurden, nicht anwendbar, da der ganze Spitzenbereich durch den breiten Sockel abgeschattet ist.

Deshalb wurde hier vorgezogen, die Spitzen von der Seite und von vorne zu bedampfen, so daß sie komplett geschlossen sind, und anschließend durch Aufpressen mittels eines Piezos auf eine Glasoberfläche zu öffnen. Dabei wird Laserlicht in die Faser eingekoppelt und die transmittierte Intensität beobachtet. Das Aufpressen wird bei Erreichen einer gewünschten Intensität gestoppt.

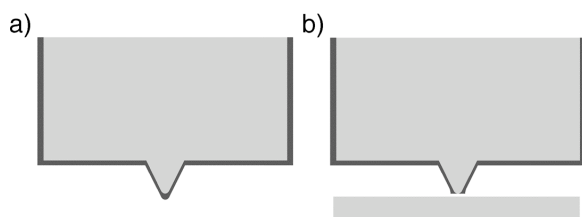


Abb 5.3 a) Querschnitt durch eine mit Metall vollständig zugedampfte Spitze.
b) Das Prinzip des Öffnens einer Apertur durch Aufdrücken an einer Glasfläche.

Für die Herstellung der TOA-Sonde ist wesentlich, daß die Apertur gut im Rasterelektronenmikroskop zu erkennen ist und daß die Umgebung der Apertur flach ist. Diese Bedingungen sind für mit Gold bedampfte Fasern, deren Apertur durch Freidrücken erzeugt wurde, erfüllt, wie in den Abbildungen 5.4 und 5.5 gezeigt wird.

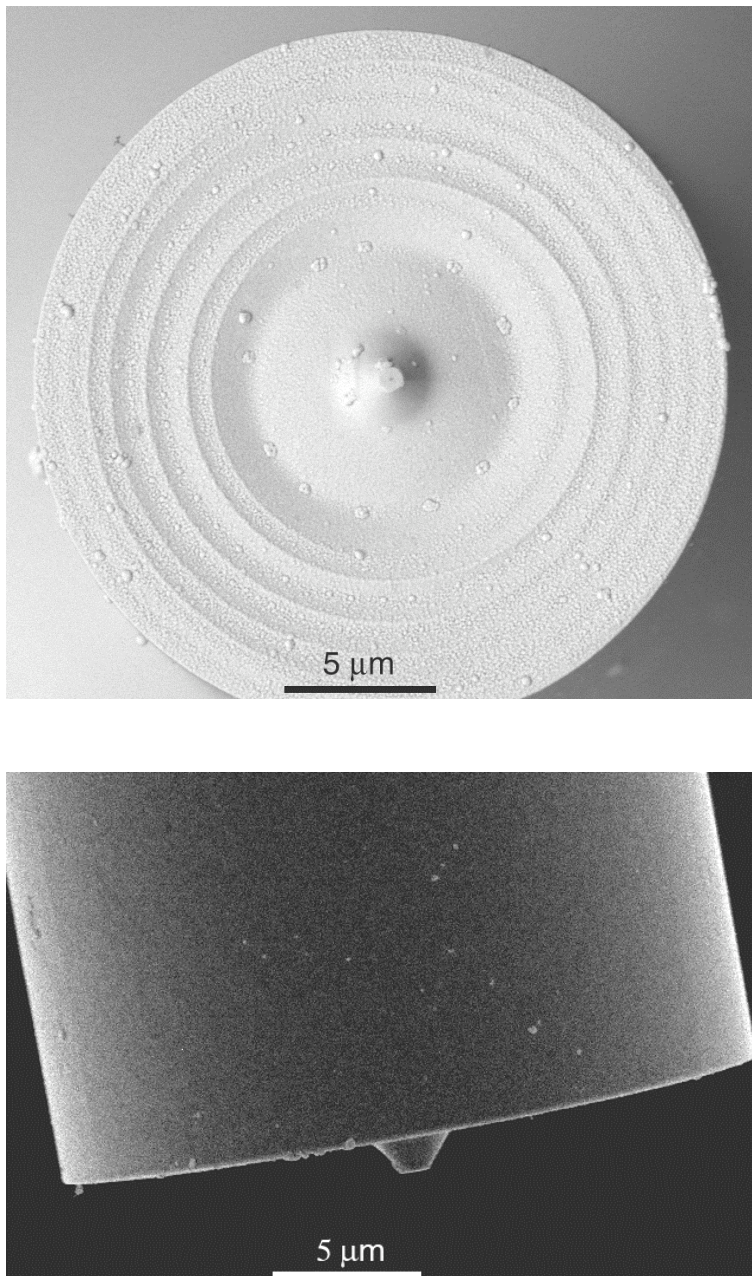


Abb 5.4 Ansicht einer nach dem selektiven Ätzverfahren hergestellten, mit Gold bedampften und anschließend freigedrückten Spitze. Oben: Aufsicht. Der kleine schwarze Punkt in der Mitte (nur andeutungsweise zu sehen) ist die Apertur. Unten: Seitenansicht.

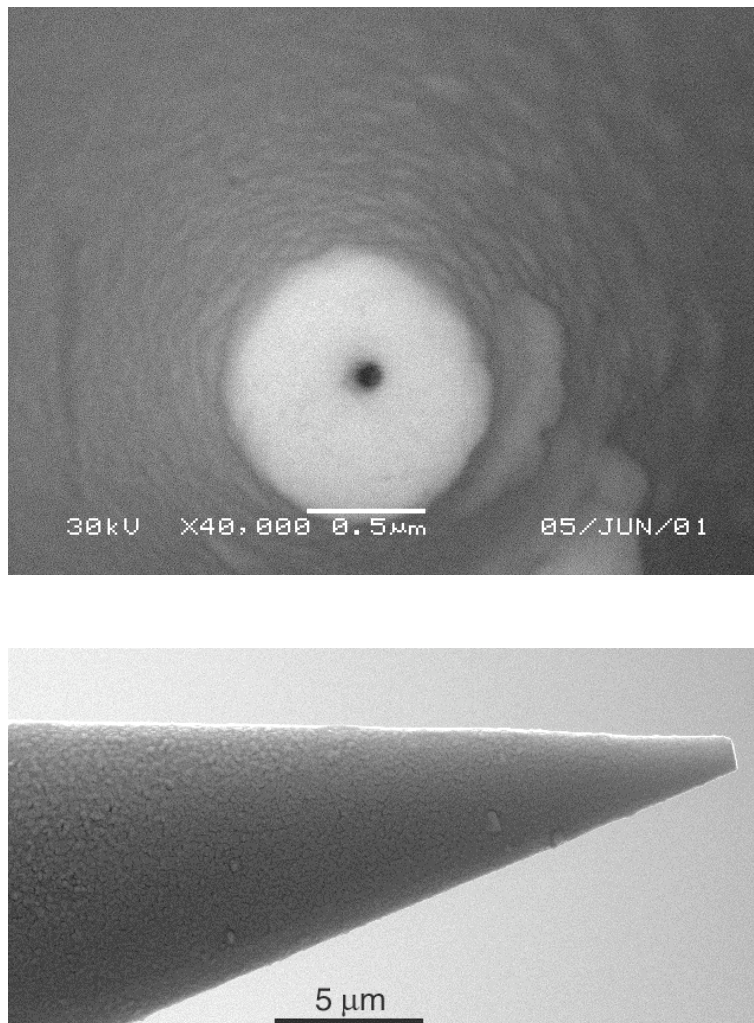


Abb 5.5 Ansicht zweier nach dem Tube-Etching Ätzverfahren hergestellten, mit Gold bedampften und anschließend freigedrückten Spitzen. Oben: Aufsicht. Die klar erkennbare Apertur hat einen Durchmesser von $100\mu\text{m}$. Unten: Seitenansicht.

5.2.2 Herstellung von EBD-Spitzen und ihre Bearbeitungsmöglichkeiten

Für die TOA-Sonde soll eine Metallspitze an den Rand der Apertur einer Apertursonde positioniert werden. Leider kann eine solche kleine Metallspitze nicht direkt hergestellt werden. Aber es kann eine hauptsächlich aus Kohlenstoff bestehende EBD- (Electron-Beam-Depositioned) Spitze [69] im Rasterelektronenmikroskop aufgewachsen werden und diese nachträglich durch Bedampfen mit einer Metallschicht überzogen werden. Dieses Unterkapitel befaßt sich mit der Herstellung und den Bearbeitungsmöglichkeiten solcher EBD-Spitzen.

EBD-Spitzen werden hergestellt, indem im Rasterelektronenmikroskop (REM) der fokussierte Elektronenstrahl für mehrere Sekunden an einer Stelle positioniert wird. Dabei werden organische Spurenstoffe, die entlang der Oberfläche der Probe diffundieren oder sich aus dem Restgas absetzen, fixiert, so daß eine hauptsächlich aus Kohlenstoff bestehende Spitze wächst.

Das Material der EBD-Spitzen hat gute mechanische Eigenschaften. Es hat ein Youngsches Modul von $0,54 \times 10^{11} \text{ Pa}$, was nahe dem Wert $E = 0,67 \times 10^{11} \text{ Pa}$ von diamantartigem Kohlenstoff liegt [70]. Es ist ein elektrischer Isolator.

Für die Herstellung von möglichst scharfen EBD-Spitzen müssen die richtigen Parameter eingestellt werden. Wichtig ist, daß der Elektronenstrahl so gut wie möglich fokussiert ist. Die Beschleunigungsspannung darf nicht zu klein sein, da sich sonst der Elektronenstrahl nicht gut genug fokussieren läßt. Für hohe Beschleunigungsspannungen hat sich an unserem REM (JEOL 5600) jedoch gezeigt, daß (vermutlich durch austretende Sekundärelektronen) am Fuß der EBD-Spitze ein breiter Sockel wächst. Deshalb wurde zum Spitzenwachstum eine mittlere Beschleunigungsspannung von 8 kV gewählt. Die schärfsten Spitzen erhält man, wenn die geringste "Spotsize" und damit der geringste Strom gewählt wird. Das Aufwachsen einer 100 nm langen Spitze dauert an unserem REM typischerweise 3 min . Während dieser Zeit darf der Elektronenstrahl bezüglich des Objekts nicht driften, auf das die EBD-Spitze gewachsen werden soll. Sonst wird die Spitze entsprechend schräg. Die Wachstumsgeschwindigkeit ist stark von den Oberflächeneigenschaften der Probe und vom Zustand des Mikroskops abhängig. Sie kann sich z.B. beim Wechseln des Filaments ändern. Ist die Wachstumsgeschwindigkeit zu klein, so kann sie durch künstliches Verschmutzen der Oberfläche beschleunigt werden. (Z.B.: Zum Wachsen von Spitzen auf SNOM-Cantilevern der Firma WITEC wurden diese in dieser Arbeit auf eine saugfähige Unterlage gelegt und mit 2 Tropfen ölverschmutztem Azeton (1 Tropfen Öl auf 40 ml Aceton) übergossen, das man verdunsten ließ).

Zur Kontrolle, wird nach dem Spitzenwachsen ein Aufsicht aufgenommen. Dabei ist wichtig, daß die EBD-Spitze möglichst schonend abgebildet wird (nur ein Bild mit kleinster Spotsize und höchstens 3000 -facher Vergrößerung). Sonst wird die EBD-Spitze durch die beim Abbilden aufwachsenden Kontaminationen unnötig verbreitert.

EBD-Spitzen von 100 nm bis 200 nm Länge haben typischerweise einen Spitzenradius von 12 nm , wie die Abbildung im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) zeigt (siehe Abb. 5.6).

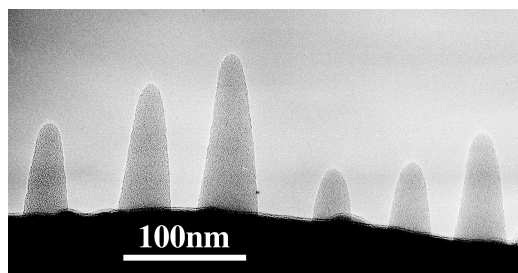


Abb. 5.6 Transmissionselektronenaufnahme (EM420, Philips) einer Reihe EBD-Spitzen

Die Spitzen können durch Ätzen in einem Sauerstoffplasma [71] oder durch Zerstäuben der Oberfläche mit einem Ar-Atom-Strahl in einer Neutralteilchendünnungsanlage weiter geschärft werden. Bei letzterem werden die EBD-Spitzen um ihre Längsachse rotiert und gleichzeitig unter 85° von vorne (also fast senkrecht von der Seite) mit dem Teilchenstrahl bestrahlt. Allerdings ist das Material der EBD-Spitzen im Nanometerbereich inhomogen, so daß beim Bestrahlen die Oberflächenrauigkeit der Spitzen zunimmt. Dies begrenzt die durch Bestrahlen zu erreichende Schärfe. Es lassen sich Krümmungsradien bis ca. 300 nm erreichen (Abb. 5.7).

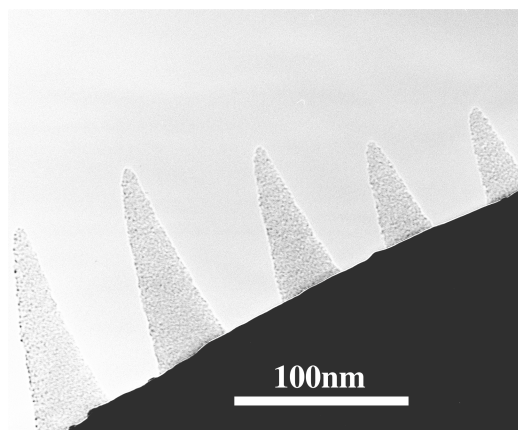


Abb. 5.7 Eine Reihe gesputterter EBD-Spitzen. EBD-Spitzen in 7 nm , 6 nm , 5 nm , 4 nm und 3 nm gewachsen und in der Neutralteilchendünnungsanlage 2 min bei einer Beschleunigungsspannung von 30 kV und einem Strom von $0,5\text{ mA}$ abgesputtert.

5.2.3. Herstellung der TOA-Sonde aus einer Apertursonde

Es wird eine ca. 150 nm lange EBD-Spitze in der Mitte einer ca. $200\text{ nm} \times 300\text{ nm}$ Apertur einer Apertursonde aufgewachsen [72]. Diese wird mit einer dünnen Schicht Cr als Haftvermittler

und einer ca. $20\text{--}30\text{nm}$ dicken Al-Schicht unter 45° von vorne bedampft. Die alte Apertur wird dabei größtenteils zgedampft, nur der Schatten der EBD-Spitze bleibt frei. Die metallisierte EBD-Spitze befindet sich dadurch automatisch an einem der Enden der neuen, jetzt spaltförmigen Apertur. Herstellung und Aussehen sind in den Abbildungen 5.8–5.10 illustriert.

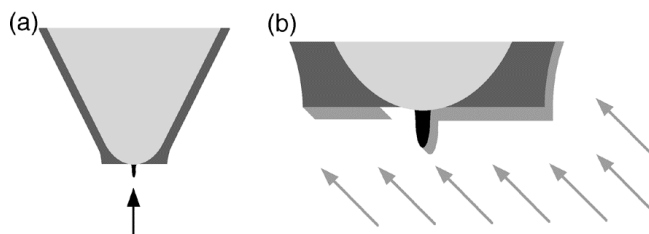


Abb. 5.8 Schematische Schritte zur Herstellung einer TOA-Spitze:

a) Auf die Aperturmitte wird mit dem REM eine EBD-Spitze aufgewachsen. b) Die Spitze wird einseitig unter 45° von vorne bedampft. Die alte Apertur wird größtenteils zgedampft. Durch Abschattung durch die EBD-Spitze entsteht eine neue längliche Apertur. Die Spitze steht asymmetrisch an einem Ende dieser neuen Apertur.

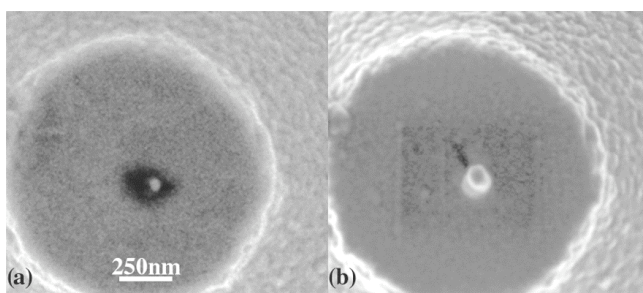


Abb. 5.9 a) Aufsicht auf eine Apertursonde mit weit geöffneter Apertur (dunkler Fleck), auf die eine EBD von 170nm Länge aufgewachsen ist. b) Die gleiche Sonde nach schrägem Bedampfen von vorne mit 3nm Cr und 33nm Al. Man erkennt die neue Apertur, die durch den Schattenwurf beim Bedampfen entsteht. Sie ist als dunkler Strich von der EBD-Spitze weg zu sehen.

Das dunkel Rechteck im Hintergrund besteht aus Kontaminationen, die beim Abbilden aufgewachsen wurden. Auch der Durchmesser der metallisierten EBD-Spitze erscheint durch Kontaminationen deutlich verbreitert. Um die dünne Al-Schicht sichtbar zu machen, muß mit kleinen Beschleunigungsspannungen (hier $1,5\text{kV}$) gearbeitet werden. Das Bild ist geglättet und der Kontrast ist für die Grautöne der Apertur nichtlinear verstärkt.

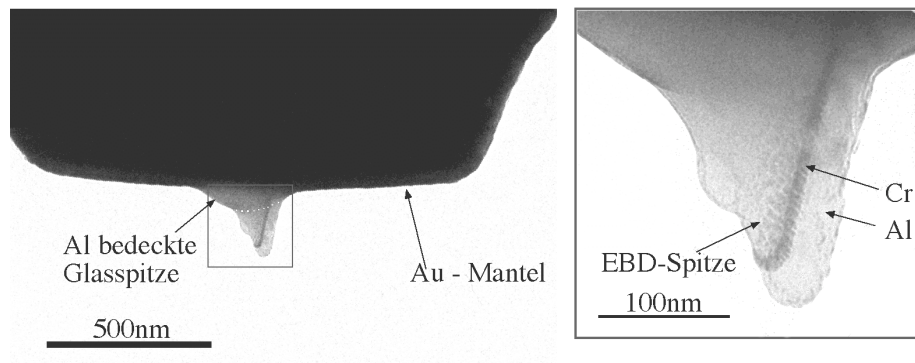


Abb.5.10 Seitenansicht einer bedampften TOA-Spitze aufgenommen im Transmissionselektronenmikroskop. Durch das starke Aufdrücken ragt das Ende der Glasspitze aus der Goldummantelung heraus. Deutlich zu erkennen ist die auf diese Erhöhung gesetzte EBD-Spitze. Auf der EBD-Spitze sind die von unten-rechts-hinten aufgedampften Cr- und Al-Schichten klar zu sehen. Der Krümmungsradius der Metallspitze ist $25\mu\text{m}$.

6. Fluoreszenzproben für die Sondencharakterisierung

Zum Testen unbekannter Spitzen sind Probe am besten geeignet, die

- stark fluoreszieren,
- nur langsam gebleicht werden,
- kleine Dimensionen haben, damit auch hohe Auflösungen getestet werden können,
- ein klares Topographiesignal geben, damit Fluoreszenz und Topographie korreliert werden können.

Hier wurden zwei Sorten von Testproben verwendet:

1) Fluoreszierende Kügelchen (Microspheres) geben ein besonders starkes Fluoreszenzsignal und ein hohes klares Topographiesignal.

2) Einzelmoleküle haben eine minimale Ausdehnung, was sie besonders günstig zur Ermittlung der optischen Auflösung macht.

6.1 Fluoreszierende Kügelchen (Microspheres)

Fluoreszierende Kügelchen ("Microspheres" Molecular Probes, [19]) werden auf einer Glasoberfläche verteilt. Topographisch haben sie eine Größe von $50\text{ nm} \times 30\text{ nm}$, was typischen biologischen Makromolekülen entspricht. Die Fluoreszenzintensität einer gelb fluoreszierenden $20\text{ nm} \times 10\text{ nm}$ Kugel entspricht ca. 180 Fluorescein-Farbstoff-Molekülen (nach der Produktinformation von Molecular Probes). Die Kügelchen sind mit Farbstoffen in verschiedenen Wellenlängenbereichen erhältlich. In dieser Arbeit wurden Kügelchen mit Anregungs- und Emissionsmaxima bei $505\text{ nm} / 515\text{ nm}$ (gelb), $565\text{ nm} / 580\text{ nm}$ (orange) und $580\text{ nm} / 605\text{ nm}$ (rot) verwendet. (Die Spektren werden im Anhang 2 gezeigt.) Die Farbstoffe wurden mit den Linien 488 nm , 514 nm bzw. 568 nm des Argon-Krypton-Ionenlasers angeregt und das Fluoreszenzlicht mit 520 nm , 550 nm bzw. 590 nm Langpaßfilter herausgefiltert.

Die Größenverteilung der mit unterschiedlichen Farbstoffen versetzten Kügelchen ist sehr unterschiedlich: Während die gelben Kügelchen meistens 30 nm Durchmesser haben, streuen die Durchmesser der roten und orangen Kügelchen im Bereich von $30\text{ nm} \times 30\text{ nm}$ (siehe AFM-Abbildung 6.1). Kügelchen mit einer breiten Größenverteilung sind zur Charakterisierung von Sonden besser geeignet. 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 helleres Signal. Anhand großer Kügelchen läßt sich auch der Fernfeldanteil abschätzen: Kleine Kügelchen werden vollständig vom Nahfeld beleuchtet, große dagegen nur an ihrer Oberfläche. Andererseits durchsetzt das Fernfeld bei beiden Größen das ganze Volumen der Kügelchen (siehe auch Abb. 7.6).

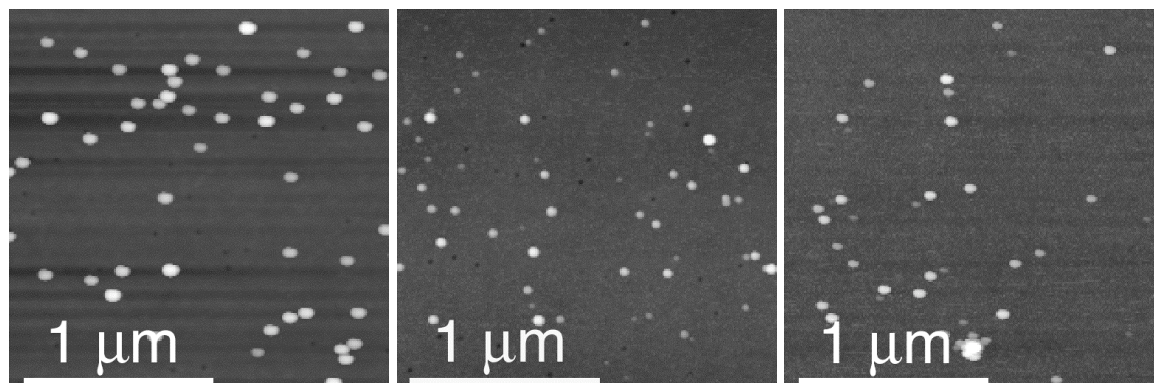


Abb. 6.1 AFM Aufnahmen von Kügelchen mit BSA auf Glas fixiert. Von links nach rechts: gelbe, orange und rote Kügelchen. Die Bilder wurden mit derselben AFM-Spitze aufgenommen. Man beachte die unterschiedlichen Größenverteilungen der Kügelchen in den verschiedenen Proben. Höhenbereich: 36 nm.

Für Testproben wurde ein 20 mm × 20 mm großes Deckglas im Plasmareiniger durch zweiminütiges Beglimmen hydrophil gemacht. 40 µl einer 0,5 mg/ml konzentrierten Lösung von Rinderserumalbumin (BSA) wurde auf das Deckglas gegeben und nach zwei Minuten mit Stickstoff trocken geblasen. Schließlich wurden 100 µl auf 0,02% Festkörpergehalt verdünnte Lösung von Fluoreszenzkügelchen auf die Deckglas aufgebracht. Da das Deckglas durch das BSA wieder hydrophob geworden ist und deshalb die Lösung dazu neigt, auf dem Deckglas abzupearlen, wurde der Tropfen mit der Pipettenspitze auf der Oberfläche etwas auseinandergestrichen. Nach einer Minute wurde die Lösung mit Stickstoff vom Deckglas geblasen.

Die BSA-Schicht soll als Klebstoff wirken, um die fluoreszierenden Kügelchen zu fixieren. Ohne BSA wurden diese Kügelchen teilweise selbst im Tapping-AFM an Luft auf der Glasoberfläche verschoben.

6.2 Einzelmolekülproben

Einzelmolekülproben stellen einen hohen Anspruch an Hintergrundunterdrückung und Quantenausbeute, weil Fluorophore im Mittel nur einige 10^5 – 10^6 Photonen aussenden, bevor sie gebleicht werden [30]. Weil die Fluorophore im Vergleich zu der erreichbaren Auflösung klein sind, sind Einzelmolekülproben ideal zur Vermessung der Felder an einer Spitze und zur Bestimmung der Auflösung der Spitze. Da die Anregung proportional zum Quadrat der zum Absorptionsdipolmoment des Fluorophores parallelen elektrischen Feldkomponente ist, ist das Bild eines Farbstoffmoleküls in der Regel von der Orientierung abhängig.

Als besonders photostabile Einzelmolekülttestproben gelten in Polymethylmethacrylat (PMMA) eingegossene Farbstoffmoleküle, da sie dem Luftsauerstoff weniger ausgesetzt sind. Nach [73] bleicht ein Teil der Moleküle zwar weiterhin schnell, es gibt aber auch Moleküle, die wesentlich länger fluoreszieren.

Die hier verwendete Testprobe wurde durch "spin coating" einer Dil-C18 enthaltenden PMMA-Lösung auf einem Deckgläschen hergestellt. Dabei wurde die Konzentration der Farbstoffe mit 10^{-8} M so gewählt, daß ca. 10 Moleküle μm^2 in der $15\ \mu\text{m}$ dicken PMMA-Schicht zu finden sind. (Das Präparat wurde von J.-A. Veerman aus der Gruppe von N. van Hulst hergestellt und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Bei den Messungen dieser Arbeit war die Probe schon mehrere Jahre alt, was auf das Bleichverhalten der Farbstoffe eventuell einen negativen Einfluß hat.) Für die Anregung der Moleküle wurde die $514\ \mu\text{m}$ Linie eines Ar^+ -Lasers verwendet. Der Extinktionskoeffizient bei dieser Wellenlänge ist mit $1.3 \cdot 10^6\ \text{m}^{-1}\text{M}^{-1}$ ausreichend hoch. Die große Distanz der Anregungswellenlänge von $514\ \mu\text{m}$ zum Emissionsmaximum bei $565\ \mu\text{m}$ ist für die Separation des Fluoreszenzlichts vom Anregungslicht vorteilhaft. Hier wurde ein Langpaßfilter (OG 550, Schott) mit einer cut-off-Wellenlänge von $550\ \mu\text{m}$ verwendet.

Diese Probe hat jedoch den Nachteil, daß die Topographie nicht mit dem Fluoreszenzbild korreliert werden kann.

Deshalb wurden auch Testproben verwendet, bei denen DNA mit fluoreszierenden Molekülen markiert wurde. Hier kann die Topographie der DNA mit der Position der einzelnen Farbstoffe verglichen werden.

DNA mit Cy-3-Molekülen an den Enden:

DNA Moleküle von 1000 Basenpaare wurden nach dem PCR-Verfahren hergestellt, wobei ein DNA-Vektor als Kopiervorlage und ein vektorspezifischer Forward- und ein Reverse-Primer, die am 5'-Ende mit Cy-3 markiert waren, verwendet wurden. Das PCR-Produkt wurde nach Standardverfahren gereinigt. Abb. 6.2 zeigt das Absorptions- und Emissionsspektrum der Cy-3 Moleküle mit der verwendeten Anregungslinie und dem Durchlaßbereich des verwendeten Filters.

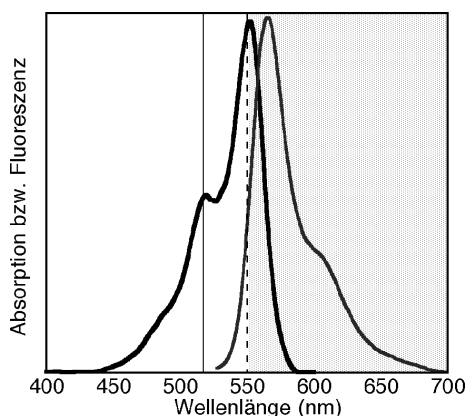


Abb. 6.2 Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von Cy-3-Farbstoffmolekülen. In den Einzelmolekülmessungen wurden die Cy-3-Moleküle mit der 514 nm Linie (durchgezogene Linie) eines liniengefilterten Argon-Krypton-Ionenlasers angeregt und zur Detektion wurde ein 550 nm Langpaßfilter (Schottglas) verwendet. Der Durchlaßbereich des Langpaßfilters ist grau getönt.

Die Anregung ist zwar nicht mehr im Optimum aber der große Abstand zur Grenzfrequenz des Langpaßfilters erleichtert die Unterdrückung des Anregungslichts.

DNA mit TOTO1:

DNA von 4000 Basenpaaren wurde mit dem interkalierenden Farbstoff TOTO1 im Verhältnis 5:1 (Basenpaare/Farbstoffmoleküle) angesetzt. Farbstoffmoleküle, die sich nicht in DNA einlagern, fluoreszieren nur sehr schwach und verlieren innerhalb einer Stunde ihre Fluoreszenz komplett.

Die TOTO1-Farbstoffmoleküle wurden bei den Messungen mit der 488 nm-Linie eines liniengefilterten Argon-Krypton-Ionenlasers angeregt. Das Fluoreszenzlicht wurde mit einem 520 nm Langpaßfilter herausgetrennt.

Herstellung der DNA-Testproben:

Dünne, frisch gespaltene Glimmerscheiben (mit ca. 2cm^2 Oberfläche) wurden mit $20\text{ }\mu\text{l}$ einer wässrigen $400\text{ }\mu\text{M}$ NiCl_2 Lösung vorbehandelt. Nach 2h wurde die Lösung mit Filterpapier abgesaugt und ein $30\text{ }\mu\text{l}$ Tropfen der markierten DNA aufgebracht. Nach 10h wurde die Probe mit ultrareinem Wasser abgewaschen und mit Stickstoff trocken geblasen. Zur mechanischen Stabilität wurde die Glimmerscheibe auf ein Deckgläschen gelegt und an den Rändern mit Tesafilm aufgeklebt. Zur Kontrolle des Belegungsgrades, der leider stark schwankt, wurde vor den SNOM-Messungen eine AFM-Aufnahme gemacht.

7. Messungen mit der TOA-Sonde

7.1 Entwicklungsschritte zur TOA-Sonde

Vor Entwicklung des oben beschriebenen Verfahrens zur Herstellung der TOA-Sonde wurden die Abbildungseigenschaften folgender Anordnungen getestet:

1) Es wird eine ca. 150 μm lange EBD-Spitze in der Mitte bzw. am Rand einer ca. 100 μm Apertur aufgewachsen.

Ergebnis: Die Spitze hat eine gute topographische Auflösung (siehe Abb. 7.1 links). Die schlechte Auflösung (ca. 400 μm) der optische Abbildung (Abb. 7.1 rechts) entspricht der einer normalen Apertursonde bei dem großen verwendeten Arbeitsabstand von ca. 150 μm (Länge der EBD-Spitze).

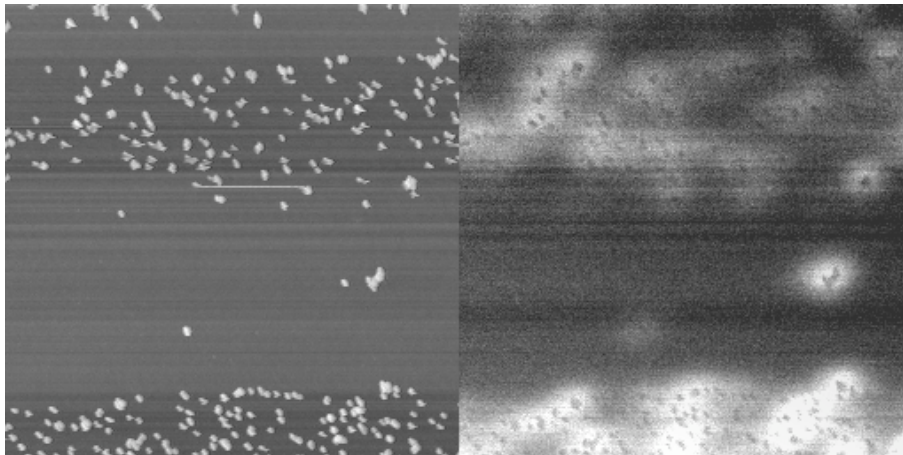


Abb. 7.1 Topographische (links) und optische (rechts) Abbildung (4 μm \times 4 μm) von gelb fluoreszierenden Kügelchen (ca. 30 μm Durchmesser, $\lambda = 488 \text{ nm}$), aufgenommen mit einer Apertursonde, bei der eine EBD-Spitze in der Mitte der Apertur gewachsen war. Die optische Auflösung (Halbwertsbreite des Lichtflecks eines Kügelchens) ist wegen des großen Arbeitsabstands nur 400 μm . Deutlich zu sehen sind starke Höhenartefakte.

Die Probe war sehr inhomogen belegt, die Ränder der dicht belegten Bereiche verlaufen hier nur zufälligerweise parallel zur schnellen Rasterrichtung (also von links nach rechts).

Es fällt auf, daß die Fluoreszenzintensität abfällt, wenn die EBD-Spitze über ein fluoreszierendes Kügelchen hinweggeführt wird. Dies ist hier ein Höhenartefakt: Befindet sich die EBD-Spitze über dem Kügelchen, so wird die Sonde durch die Abstandsregelung angehoben. Dadurch vergrößert sich der Abstand der Apertur zum fluoreszierenden Kügelchen. Wegen der starken Abstandsabhängigkeit der Beleuchtungsintensität der Apertur,

führt dies zu einem kleineren optischen Signal. Die nicht metallisierte EBD-Spitze wirkt offensichtlich nur als Abstandshalter, aber nicht als optische Antenne.

2) Es wird wie in 1) eine ca. 150 μm lange EBD-Spitze am Rand einer ca. 100 μm Apertur aufgewachsen. Diese wird aber mit einer dünnen Schicht Cr als Haftvermittler und ca. 20 μm Al unter 90° zur Spitzenachse - also genau senkrecht von einer Seite - bedampft.

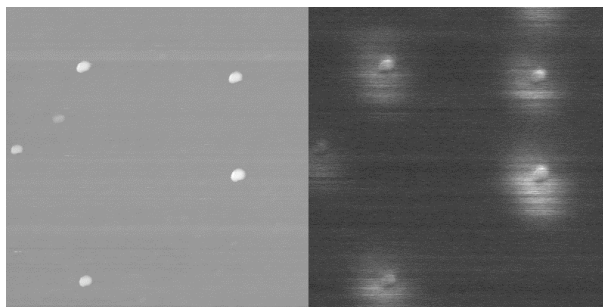


Abb. 7.2 Topographische (links) und optische (rechts) Abbildung (20 μm \times 20 μm) gelb fluoreszierender Kügelchen (ca. 30 μm Durchmesser, $\lambda = 488 \text{ nm}$), aufgenommen mit einer Apertursonde, bei der eine von der Seite metallisierte EBD-Spitze am Rand der Apertur positioniert war. Im optischen Bild sieht man bei jedem Kügelchen einen verwaschenen Fleck, der von der Beleuchtung mit der Apertur herrührt und einen scharfen Fleck in Größe der topographischen Abbildung der Kügelchen.

Schnelle Rasterrichtung: horizontal.

Ergebnis (siehe Abb. 7.2): Wie in 1) erhält man wieder einen breiten Fleck, der durch Licht von der Apertur der Sonde erzeugt wird. Zusätzlich erhält man aber, abhängig von der Polarisation der Beleuchtung, eine Signalerhöhung, wenn die Spitze über einem fluoreszierenden Kügelchen ist.

3) Es wird eine ca. 150 μm lange EBD-Spitze in die Mitte einer ca. 200 μm Apertur aufgewachsen. Diese wird mit einer dünnen Schicht Cr als Haftvermittler und ca. 20 μm Al von der Seite unter Rotation bedampft. Die Spitze ist also näherungsweise rotationssymmetrisch.

Ergebnis: Wie in 1) erhält man wieder einen breiten Fleck durch Aperturbeleuchtung und ein Fluoreszenzminimum, wenn die Spitze über einem Kügelchen ist. Es handelt sich dabei wahrscheinlich wieder um ein Höhenartefakt. Eine andere Erklärungsmöglichkeit für das Minimum könnte auch Löschen ("quenching") der Fluoreszenz [74] durch die Metallspitze oder eine Art Abschattung durch die Spitze sein. Eine Signalerhöhung unter der Spitze wie in

2) tritt nicht auf. Diese Messung läßt vermuten, daß dafür eine asymmetrische Anordnung der Spitze zur Apertur notwendig ist.

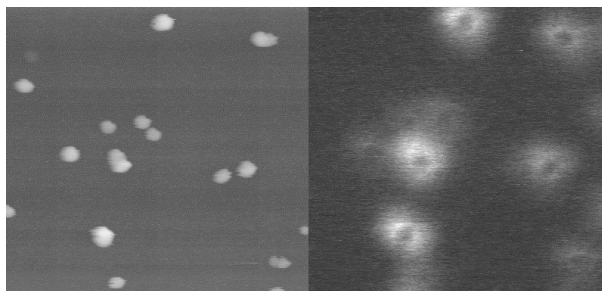


Abb. 7.3 Topographische (links) und optische (rechts) Aufnahme ($200\text{nm} \times 200\text{nm}$) gelb fluoreszierender Kügelchen (ca. 30nm Durchmesser, 13488nm), aufgenommen mit einer Apertursonde, bei der eine metallisierte EBD-Spitze in der Mitte der Apertur positioniert war. Im optischen Bild sieht man bei jedem Kügelchen einen verwaschenen Fleck, der von der Beleuchtung mit der Apertur herrührt. Ist die Spitze über einem Kügelchen, so nimmt deren Fluoreszenz ab. Schnelle Rasterrichtung: horizontal.

Diese Messungen legen nahe, daß für gute optische Effekte die aufgesetzte Spitze metallisch und asymmetrisch am Rand der Apertur positioniert sein muß. Beides wird in dem im Kapitel 5.2.3 beschriebenen Verfahren automatisch erreicht, indem die wirksame Apertur durch den Schattenwurf der EBD-Spitze beim Bedampfen entsteht.

7.2 Charakterisierung der TOA-Sonde anhand der Testproben

7.2.1 Messungen an fluoreszierenden Kügelchen

Werden mit der in Kapitel 5.2.3 beschriebenen TOA-Spitze rot fluoreszierende Kügelchen abgebildet, so erhält man bei richtig gewählter Beleuchtungspolarisation starke Signale, wenn sich die Spitze über den Kügelchen befindet. Abbildung 7.4 zeigt zum Vergleich die Topographie, in der die Farbstoffkügelchen als Erhöhung detektiert werden, und das zugehörige Fluoreszenzbild.

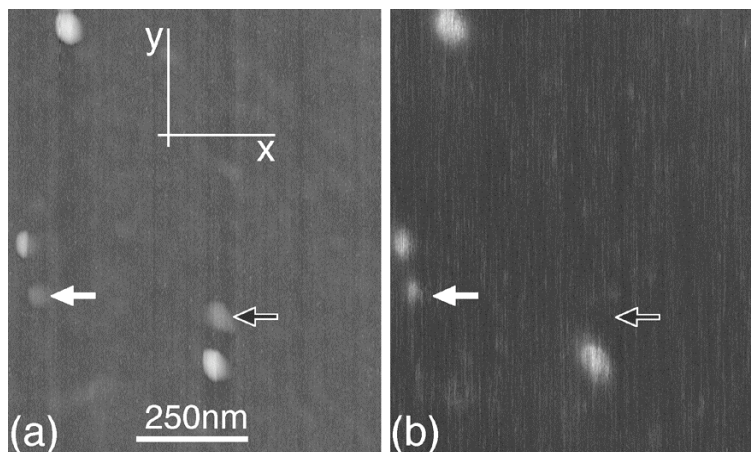


Abb. 7.4 Aufnahme von rot fluoreszierenden Kügelchen (nomineller Durchmesser $20\mu\text{m}$)

a) Topographie (Höhenbereich $32\mu\text{m}$); b) Fluoreszenz.

Der schwarze Pfeil im Topographiebild zeigt auf eine topographische Erhöhung, die im optischen Bild kein zugehöriges Signal hat. Der weiße Pfeil zeigt auf eine niedrigere Erhöhung, die aber im optischen Bild ein deutliches zugehöriges Signal hat.

Schnelle Rasterrichtung: von oben nach unten. Langsame Rasterrichtung: von links nach rechts.

Die kleinste topographische Erhebung (weißer Pfeil) ist $5\mu\text{m}$ hoch und hat Halbwertsbreiten von $40\mu\text{m}$ bzw. $37\mu\text{m}$, wobei - wie bei den anderen Erhebungen auch - die linke Kante steil und die rechte Kante etwas flacher abfällt. Es handelt sich bei der Erhebung um ein Kügelchen mit ca. $5\mu\text{m}$ Durchmesser und die gemessene Breite und Form werden durch die Spitzenform verursacht. Den meisten topographischen Erhebungen läßt sich im Fluoreszenzbild einen Flecken ähnlicher Größe zuordnen. Diese optischen Bilder der Kügelchen sind gegenüber den topographischen Abbildungen etwas nach links verschoben (leicht zu erkennen an dem Kügelchen, das am weitesten links liegt), was aus der asymmetrischen Beleuchtung und Spitzenform resultieren könnte. Eine topographische Erhebung (mit dem schwarzen Pfeil markiert) hat keinen entsprechenden hellen Fleck im optischen Bild. Offensichtlich fluoresziert dieses Objekt nicht. Dies zeigt aber auch, daß die hellen Flecke nicht nur durch die Höhenbewegung induziert sind.

Schnittbilder durch den kleinsten Fleck (weißer Pfeil) zeigen eine Halbwertsbreite von $25\mu\text{m}$ in x-Richtung und $38\mu\text{m}$ in y-Richtung. Diese hohe optische Auflösung kann nicht mit der Größe der Apertur erklärt werden, die hier mindestens $70\mu\text{m}$ lang und $30\mu\text{m}$ breit war

(Spitze aus Abb. 5.9) und außerdem mindestens 170 nm (Länge der Spitze aus REM- und TEM-Bildern; hier nicht gezeigt) Abstand zur Probe hatte.

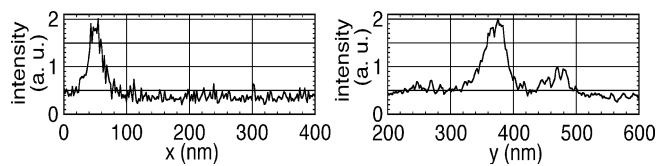


Abb. 7.5 Orthogonale Querschnitte durch den kleinen mit einem weißen Pfeil versehenen Fluoreszenzfleck in Abbildung 7.4. Die gemessene Halbwertsbreite in x-Richtung ist 25 nm und in y-Richtung 380 nm.

Um besonders große und stark fluoreszierende Kügelchen kann ein Hof mit ca. 400 nm Halbwertsbreite gesehen werden (Abb. 7.6), der von der direkten Beleuchtung durch die Apertur verursacht wird. Die Erklärung dafür, daß bei großen Kügelchen die direkte Beleuchtung durch die Apertur besser zu erkennen ist als bei kleinen Kügelchen, wurde schon in Kapitel 6.1 gegeben.

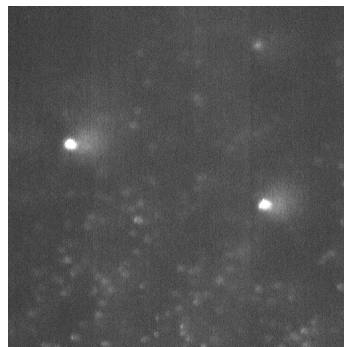


Abb. 7.6 Optische Übersichtsaufnahme mit der gleichen Spitze wie in Abb. 7.4. Der Bildbereich ist 500 nm x 500 nm. Das Bild wurde im Konstanthöhenmodus aufgenommen, also mit ausgeschalteter Abstandsregelung bei einer leicht angehobenen Sonde. Die schnelle Rasterrichtung geht wieder von oben nach unten und die langsame von links nach rechts. Wegen des größeren Abstands erscheinen die fluoreszierenden Kügelchen unschärfer als in Abb. 7.4. Die Spitze berührt nur die höchsten Stellen der Probe. Da die Rasterebene zur Oberfläche etwas geneigt ist, ist der Abstand der Spitze zu den fluoreszierenden Kügelchen auf der Bildunterseite geringer als in der Bildoberseite. Deutlich zu erkennen ist ein verwaschener Fleck mit ca. 400 nm Halbwertsbreite rechts von den beiden besonders hellen Kügelchen.

Daß das Feld an der Spitze tatsächlich auf ein sehr kleines Volumen eingeschränkt ist, läßt sich anhand von Abstandskurven der Fluoreszenz über einem Kügelchen nachweisen. Die Intensität fällt bei $5\ \mu\text{m}$ Abstand bereits auf die Hälfte ihres Maximalwerts ab (Abb. 7.7).

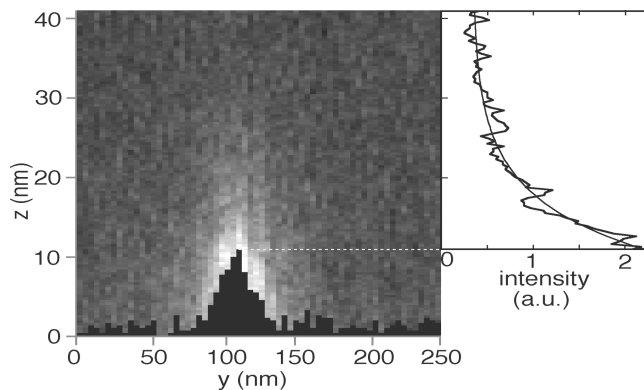


Abb. 7.7 Entlang einer Linie über eine fluoreszierende Kugel hinweg wurde die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Spitzenhöhe gemessen und als Grauwert dargestellt. Die schwarze Struktur ist die Topographie. Die Erhöhung in der Topographie rührt von einem Farbstoffkügelchen mit ca. $10\ \mu\text{m}$ Durchmesser her. Die Fluoreszenz fällt stark mit dem Abstand zwischen Spitze und Kügelchen ab. Die Kurve rechts zeigt die Abstandsabhängigkeit der Fluoreszenz über der höchsten Stelle der Kugel. Die Abstandsabhängigkeit der Intensität eines Dipols - eine Näherung für das Spitzenfeld - wurde angepaßt (glatte Kurve).

Dieses Abstandsverhalten stimmt gut mit dem üblichen Dipollmodell der Streusonde überein. Dort wird die Sonde durch eine Kugel mit einem Radius ersetzt, der dem Krümmungsradius der Sondenspitze entspricht. Die elektromagnetischen Felder der Sonde lassen sich dann näherungsweise durch die Felder eines im Kugelmittelpunkt gelegenen Dipols annähern [75-77]. Zur Berechnung des Intensitätssignals wird davon ausgegangen, daß die Dipolmomente der Farbstoffmoleküle zufällig verteilt sind. Dann ist die Fluoreszenz proportional zu der Anregungsintensität. Außerhalb der Spitze entlang der Spitzenachse fällt dann die elektrische Intensität proportional zu $((a+z)^{-6} + k^2(a+z)^{-4})$ ab, wobei z der Probenabstand der Spitze, $k = 2\pi/\lambda$ und a der Spitzenradius ist. Paßt man diese Kurve an den gemessenen Intensitätsverlauf an (Abb. 7.7), so erhält man für den Spitzenradius $a \approx 35\ \mu\text{m}$, was mit der topographischen Auflösung und dem Spitzendurchmesser im TEM gut übereinstimmt. Bei Messungen an Einzelmolekülen wird sich jedoch zeigen, daß dieses Modell zu sehr vereinfacht ist und daß das Löschen ("quenching") der Fluoreszenz durch strahlungslose Übertragung der Anregungsenergie des Farbstoffmoleküls an die Metallspitze, berücksichtigt werden muß.

Schaut man Abb. 7.4 genau an, so fällt auf, daß im optischen Bild der Fleck der Kugel am weitesten rechts an seinem oberen Rand schärfer aussieht als an seinem unteren Rand. Dies ist ein Rasterartefakt: Das Bild wurde bei einer Rasterbewegung von oben nach unten aufgenommen. Die Abstandsregelung reagiert etwas zeitlich verschoben. Auf der oberen Seite der Kugel kommt die Spitze der Kugel besonders nah, auf der unteren Seite ist der Abstand der Spitze zur Kugel größer. Die starke Abstandsabhängigkeit der Beleuchtungsintensität bewirkt dann den optischen Effekt.

Das Einkoppeln des Lichts in die Spitze zeigt - wie für diese asymmetrische Anordnung zu erwarten - eine starke Polarisationsabhängigkeit. Es läßt sich eine Polarisation finden, bei der (fast) keine Signalveränderung festgestellt werden kann, wenn die Spitze über einer fluoreszierenden Kugel ist (Abb. 7.8).

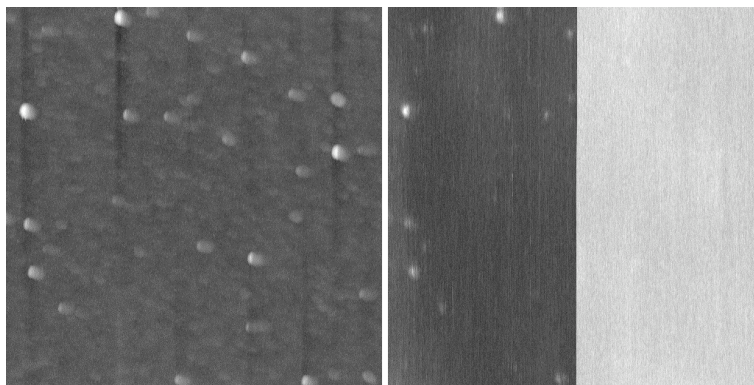


Abb. 7.8 Aufnahme von fluoreszierenden Kügelchen mit einer TOA-Sonde. Links Topographie und rechts Fluoreszenz. Die Aufnahme soll die Polarisationsabhängigkeit demonstrieren.

Die schnelle Rasterrichtung vertikal, die langsame von links nach rechts. Bei der Aufnahme wurde zunächst eine Polarisation gewählt, bei der man einen guten Kontrast im optischen Bild erhält. In der Bildmitte wurde die Polarisation so verändert, daß der optische Kontrast minimal ist. Das Hintergrundsignal steigt an und es gibt kaum Fluoreszenzintensitätserhöhungen über den Kügelchen.

Auch das von der Apertur stammende Hintergrundssignal ist stark polarisationsabhängig, da die Apertur mehr oder weniger schlitzförmig ist. (Das Seitenlängenverhältnis des Schlitzes variiert, je nachdem wie nahe die EPD-Spitze zum Rand der ursprünglichen Apertur steht und wie weit deshalb der Schattenwurf der EBD-Spitze beim Bedampfen auf die ursprüngliche Apertur fällt). Ein Schlitz hat eine höhere Transmission bei einer Beleuchtung mit einer Polarisation senkrecht zum Schlitz als bei einer Polarisation parallel zum Schlitz [78]. Leider

ist es schwierig, die wirkliche Beleuchtungspolarisation der Apertur einer Glasfaser zu bestimmen, da eine gebogene Glasfaser doppelbrechend ist und daher die Polarisation des eingespeisten Lichts auf unbekannte Weise verändert. Die Polarisation des Lichts nach Austritt aus der Apertur ist auch wenig aussagekräftig, da eine Schlitzblende ja polarisierend wirkt.

Die genaue Polarisationsabhängigkeit könnte daher am besten an einer TOA-Spitze auf einem SNOM-Cantilever vermessen werden, bei dem Licht in eine hohle Pyramide mit einem Loch in der Spitze als Apertur eingespeist wird.

In Kapitel 8.1 wird das Einkoppeln der Aperturfelder in die Metallspitze anhand eines Modells demonstriert werden. An einer beleuchteten Apertur treten an den Aperturrändern Bereiche mit besonders starker elektrischer Feldkomponente in z-Richtung auf. Diese befinden sich an den sich gegenüber liegenden Rändern in Polarisationsrichtung der Beleuchtung. Wählt man die Beleuchtungspolarisation an einer TOA-Spitze so, daß die Metallspitze in solch einem Bereich liegt, so wird in dieser durch die z-Felder ein Strom in ihrer Längsrichtung verursacht, so daß an der Spitze hohe elektrische Feldstärken auftreten.

7.2.2 Messungen an Einzelmolekülproben

Es ist zunächst nicht klar, ob die TOA-Sonde zur Einzelmoleküldetektion geeignet ist, da die aus der Apertur kommende Hintergrundbeleuchtung einen störenden Hintergrund verursacht, und da die Metallspitze möglicherweise die Fluoreszenz des Farbstoffs unterdrückt, also nichtstrahlende Übergänge der Anregungsenergie an das Metall ermöglicht. Dadurch könnte auch die Zahl der emittierten Photonen vor dem Photobleichen stark verringert werden.

Das Photobleichen von Fluorophoren kann verringert werden, wenn der Fluorophor vor Sauerstoff geschützt wird [73]. Deshalb wurde die TOA-Sonde zunächst an Einzelmolekülen, eingebettet in PMMA, getestet (siehe Kapitel 6.2). Im Topographiebild zeigt sich, daß der PMMA-Film ziemlich zerklüftet ist (Abb.7.9).

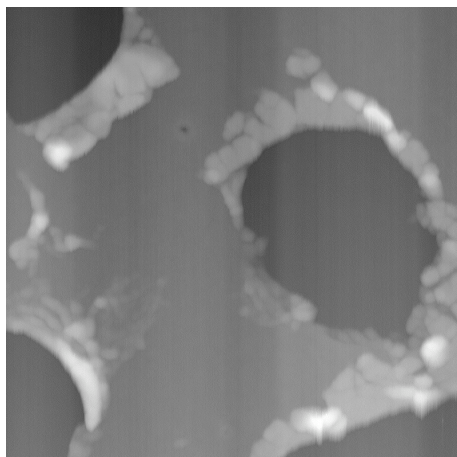


Abb. 7.9 Topographie der PMMA-Einzelmolekülprobe aufgenommen mit der TOA-Spitze. Der zerklüftete PMMA-Film ist $15\ \mu\text{m}$ dick. An den Rändern ist er aufgeworfen und deutlich dicker. In den Löchern ist die Oberfläche der Glasunterlage zu sehen.

Schnelle Rasterrichtung: von oben nach unten. Langsame Rasterrichtung: von links nach rechts. Seitenlänge: $2\ \mu\text{m}$

Abbildung 7.10 zeigt die simultan zur Topographie gemessene Fluoreszenz. Das Bild zeigt helle Flecken, die in den Bereichen lokalisiert sind, auf denen nach dem Topographiebild die PMMA-Schicht noch vorhanden ist. Manche der Flecken erscheinen nur als Halbkreis oder als Streifen. Dies wird durch Photobleichen einzelner Moleküle während des Abbildens erklärt und gilt als Bestätigung, daß es sich bei den Lichtflecken tatsächlich um einzelne Moleküle handelt. Bei mehreren Molekülen wäre es sehr unwahrscheinlich, daß alle gleichzeitig bleichen. Die Fluoreszenzintensität würde daher in Stufen abnehmen und nicht abrupt auf die Hintergrundhelligkeit abfallen. Jeder helle Fleck ist also Licht eines einzelnen Moleküls. Die Bilder wurden mit einer Rastergeschwindigkeit von $3,5\ \mu\text{s}/\text{Pixel}$ aufgenommen. Die Hintergrundintensität liegt bei $16\ 000\ \text{Photonen}/\text{s}$ bis $50\ 000\ \text{Photonen}/\text{s}$ und ist auf der PMMA-Schicht höher als in den Löchern. Die Signale der hellsten Moleküle reichen bis zu $150\ 000\ \text{Photonen}/\text{s}$. Integriert man über die Fläche der 4 hellsten Moleküle und zieht man den lokalen Hintergrund ab, so erhält man ein Gesamtsignal von $9\ 000$ bis $23\ 000$ detektierte Photonen pro Molekül und Bild (Hin- oder Rücklauf).

Auffallend ist die unterschiedliche Intensität der Moleküle. Ursache dafür ist ihre unterschiedliche Orientierung, ihre unterschiedliche Tiefe in der PMMA-Schicht von $15\ \mu\text{m}$ Dicke und ihre unterschiedliche Umgebung. Eine unterschiedliche Tiefe in der PMMA-Schicht bewirkt einen unterschiedlichen Abstand der Moleküle zur Spitze. Tiefer liegende Moleküle sind in einem schwächeren Feld und fluoreszieren deshalb schwächer, erscheinen

aber auch unschärfer. Die Breite der Bilder der Moleküle (die Halbwertsbreite der schmalsten Einzelmolekülbilder ist hier 20nm) entspricht nicht der Größe der Moleküle, sondern der Feldverteilung an der Spitze, die von den punktförmig (Punktdipol) zu denkenden Molekülen abgetastet wird. Wie sich zeigen wird, kann ein einzelnes Molekül bei entsprechender Orientierung auch ein Muster mit zwei Maxima erzeugen.

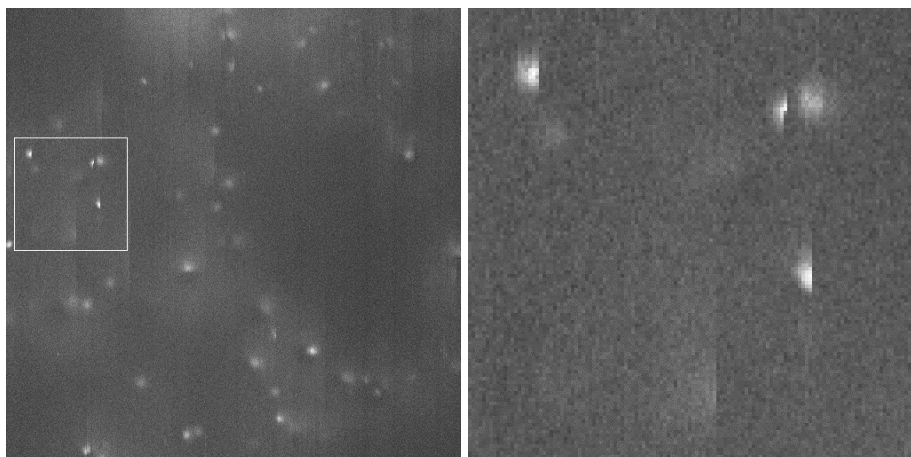


Abb. 7.10 Fluoreszenzbild der PMMA-Probe mit DIL-C 18 Molekülen. Das rechte Bild ist eine Vergrößerung des eingerahmten Ausschnitts. Die zugehörige Topographie ist in Abb. 7.9 gezeigt. Jeder helle Fleck (bzw. jedes Paar dicht benachbarter Flecke) ist Licht von einem einzelnen Molekül. Die schnelle Rasterrichtung geht von oben nach unten und die langsame von links nach rechts. Einige der Moleküle im vergrößerten Bereich leuchten gleichmäßig, bis die Fluoreszenz plötzlich abrupt aufhört - die Moleküle wurden photogebleicht.
Seitenlänge: Hauptbild $2\text{ }\mu\text{m}$, Vergrößerung $500\text{ }\mu\text{m}$

Da die Farbstoffmoleküle in PMMA eingebettet sind, kann die Position der einzelnen Farbstoffmoleküle nicht anhand der Topographie ermittelt und mit der Fluoreszenz verglichen werden. Deshalb wurden nun auch Proben untersucht, bei denen die Topographie direkt mit der Optik korreliert werden kann:

1. DNA mit dem interkalierenden Farbstoff TOTO1 und
2. DNA-Stränge, an deren Enden kovalent Cy-3-Moleküle gebunden sind.

Die Farbstoffe sind dabei, wie bei einer Messung zur Klärung biologischer Fragestellungen, dem Luftsauerstoff voll ausgesetzt.

Abb. 7.11 zeigt eine Messung an DNA, die mit TOTO1 gefärbt ist. In der Fluoreszenzaufnahme erhält man Bilder von Einzelmolekülen, die den Bildern der DIL C-18 Moleküle in PMMA ähneln. Es treten jedoch häufiger (bei fast allen Molekülen) Bleichereignisse auf. Die hellen Flecke sind, wie zu erwarten war, längs der DNA-Stränge verteilt.

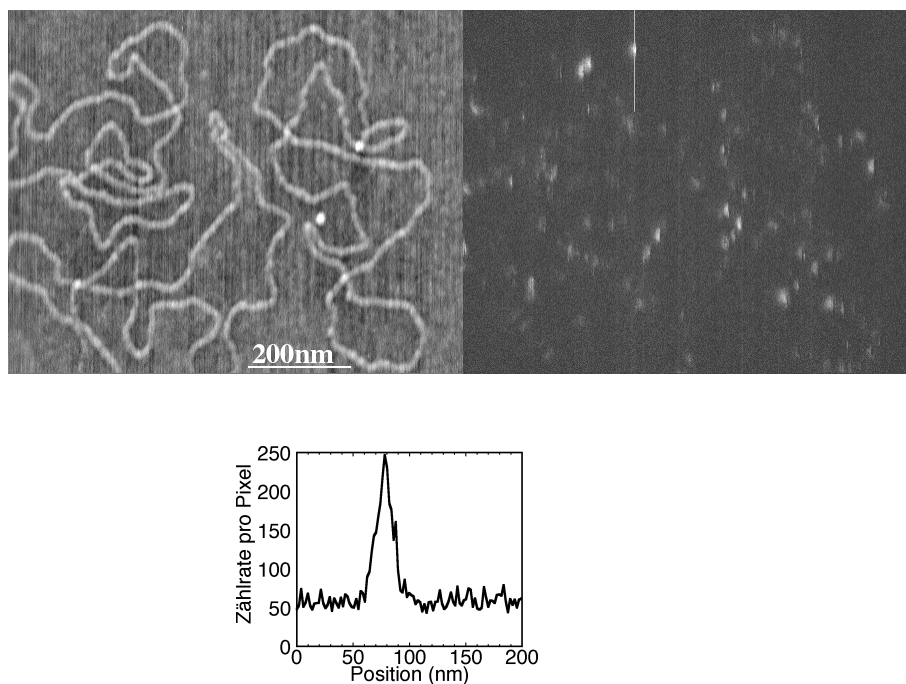


Abb. 7.11 Aufnahme der mit TOTO1 markierten DNA auf Glimmer

links oben: Topographie, rechts oben: Fluoreszenzbild, unten: Querschnitt durch das optische Signal längs der Linie im Fluoreszenzbild.

Die Bilder zeigen ähnliche Auflösung in Optik ($16\ \mu\text{m}$ Halbwertsbreite) und Topographie ($15\ \mu\text{m}$ Halbwertsbreite der DNA). Die Fluoreszenzstrukturen der Einzelmoleküle sind entsprechend dem Topographiebild längs der DNA verteilt.

Schnelle Rasterrichtung: vertikal. Langsame Rasterrichtung: von links nach rechts.

Diese Messung demonstriert eine ausgesprochen gute optische Auflösung von $16\ \mu\text{m}$. Durch Überlagern vom optischen Bild mit dem Topographiebild kann gezeigt werden, daß bei der TOA-Sonde Optik und Topographie im Rahmen der Auflösung korrelieren.

Bei der Messung an der DNA, an deren Enden Cy-3-Moleküle gebunden sind, zeigt sich ein neuer Effekt. Man erhält für fast jedes Einzelmolekül ein Muster aus zwei Maxima. Daß es sich dabei um Einzelmoleküle handelt, kann man wieder an Bleichereignissen erkennen. Die Muster haben unterschiedliche Orientierung, so daß ein Doppelspitzenartefakt ausgeschlossen

werden kann. Die Halbwertsbreite der einzelnen Signalspitzen ist nur 10 nm . Dies demonstriert wieder eine sehr hohe Auflösung.

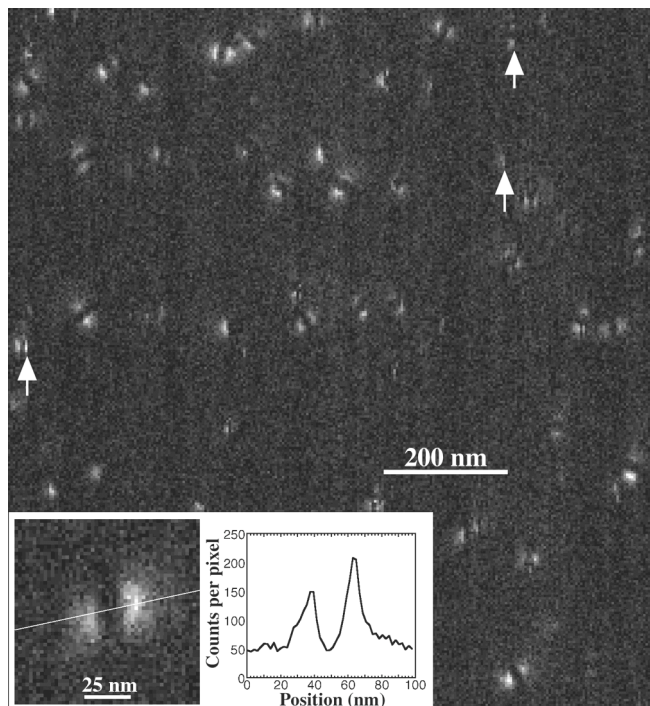


Abb. 7.12 Fluoreszenzbild von einzelnen Cy-3-Molekülen, die meistens als Doppelmaxima erscheinen. Die Pfeile zeigen auf Moleküle, die von einer Zeile zur nächsten bleichen. Das eingefügte Bild zeigt ein vergrößertes Bild eines Farbstoffmoleküls zusammen mit einem Schnittbild (drei-Linien-gemittelt) längs der Linie. Die Halbwertsbreite der beiden Maxima ist nur 10 nm . Das Bild wurde mit der gleichen Spitze wie Abb. 7.11 aufgenommen.

Schnelle Rasterbewegung: vertikal. Langsame Rasterbewegung: von links nach rechts.

Das Auftreten dieser Doppelmaxima konnte mit verschiedenen TOA-Spitzen reproduziert werden, z.B. zeigt Abbildung 7.13 eine Messung mit einer etwas breiteren Spitze an einem gleichartigen Objekt. Dort fällt auf, daß nicht alle Muster einander ähnlich sind. In der Vergrößerung sind verschiedene typische Einzelmolekülmuster zusammengestellt.

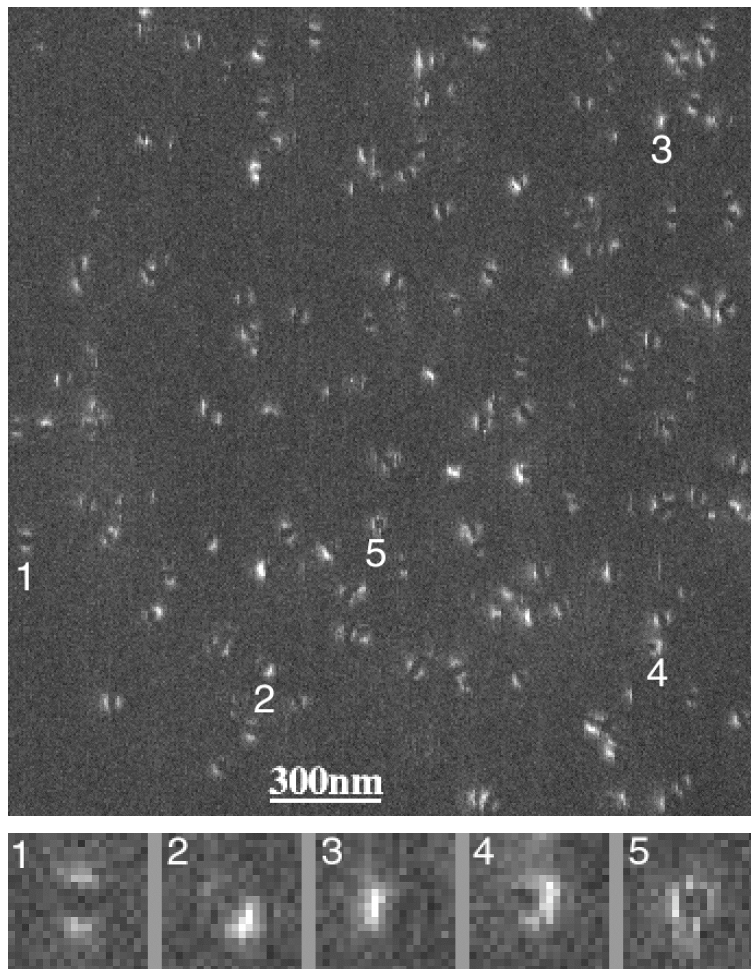


Abb. 7.13 Typische Einzelmolekülmuster

Einige typische Einzelmolekülmuster sind aus dem Übersichtsbild herausgesucht und vergrößert dargestellt (Seitenlänge der vergrößerten Bilder: 117 nm).

Schnelle Rasterrichtung: vertikal. Langsame Rasterrichtung: von links nach rechts

Mit dem Apertur-SNOM wurden schon ähnliche Fluoreszenzmuster bei der Abbildung von Einzelmolekülen beobachtet [13, 79, 80], allerdings mit größerer räumlicher Ausdehnung. Die dort gegebene Erklärung trifft auch auf die in dieser Arbeit gemessenen Muster zu: Die Einzelmoleküle zeigen die Feldverteilung an der Sonde an. Allerdings hat die TOA-Sonde eine andere Feldverteilung als eine Apertursonde.

Die unterschiedlichen Muster innerhalb einer Aufnahme - wie in Abb. 7.13 - lassen sich dann durch die unterschiedliche Orientierung der Einzelmoleküle erklären. Dies wird im nächsten Kapitel anhand eines Modells gezeigt.

Zum Abschluß dieses Kapitels sollen hier die wichtigsten Ergebnisse der Messungen an den Testproben noch einmal zusammengefaßt werden:

- Wird am Rand einer Apertur eine metallbedampfte EBD-Spitze positioniert, so gibt es an dieser Spitze eine Feldüberhöhung. Damit kann in Publikationen bisher unerreicht hohe Auflösung erreicht werden (16 μ m).
- Die Feldüberhöhung an der Spitze hängt stark von der Polarisierung des Beleuchtungslichts ab.
- Das Feld an der Spitze hat eine sehr starke Abstandsabhängigkeit (Halbwertsabstand ca. 5 μ m).
- Einzelne Farbstoffmoleküle können mit einer Metallspitze abgebildet werden.
- Einzelne Cy-3-Moleküle ergeben von ihrer Orientierung und Spitzen-Probenabstand abhängige Muster.

8. Modell zur TOA-Sonde und Auswertung der Daten

In diesem Kapitel werden zwei Modelle für die TOA-Sonde behandelt. Im ersten Modell geht es um das Einkoppeln des Lichts der Apertur in die Metallspitze und im zweiten Modell darum, wie sich die Muster der Cy-3-Einzelmolekülproben erklären lassen.

8.1 Einkoppeln des Lichts der Apertur in die Metallspitze

Um zu verstehen, wie die Felder der Apertur in die Metallspitze einkoppeln, wurde ein stark vereinfachtes Modell aufgestellt. Die Metallspitze wurde auf einen zylinderförmigen Stab, der mit einer Halbkugel endet und vollständig aus Aluminium ($\epsilon = 34,5$ bei 496nm [66]) besteht, reduziert. Diese steht auf einer ideal leitenden Ebene mit einer runden Apertur, die von einer senkrecht einfallenden ebenen Welle beleuchtet wird. Die Felder an der Metallspitze wurden mit der Multiple-Dipol-Methode [81], einer Abwandlung der Multiple-Multipol-Methode (MMP), berechnet.

Die **Multiple-Dipol-Methode** (MDP-Methode):

Es sei eine Anordnung gegeben, bei der sich ein Körper aus Material 1 mit einer räumlich konstanten komplexen dielektrischen Funktion ϵ_1 in einer Umgebung aus Material 2 mit einer räumlich konstanten dielektrischen Funktion ϵ_2 befindet. Dann können die elektrischen und magnetischen Felder im Körper durch die (elektrodynamischen) Felder (mit der Wellenzahl $k = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_1}$) von Dipolen angenähert werden, die außerhalb des Körpers entlang der Oberfläche des Körpers verteilt sind. Die elektromagnetischen Felder in der Umgebung werden durch die Felder (mit $k = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_2}$) von Dipolen entwickelt, die innerhalb des Körpers entlang seiner Oberfläche verteilt sind. Dadurch sind die Maxwellgleichungen innerhalb und außerhalb des Körpers automatisch erfüllt. Die Dipole werden so gewählt, daß die Randwertbedingungen auf Meßpunkten, die über die Oberfläche verteilt sind, möglichst gut erfüllt werden. Genaue Details zur Rechnung finden sich im Anhang 3.

Wegen des großen Rechenaufwandes, wurden hier nur die Felder, die durch Ströme in der Metallspitze erzeugt wurden, mit der MDP-Methode berechnet. Die Felder der Apertur

wurden hier nach der Näherung von Bouwkamp [12] bestimmt und das Rückwirken der Spitze auf die Apertur nicht berücksichtigt.

Die Feldberechnung von Bouwkamp ist eine Näherungsrechnung, bei der das Nahfeld einer Apertur in einer ideal leitenden verschwindend dünnen Ebene berechnet wird, wenn eine linear polarisierte ebene Welle senkrecht auf die Aperturebene einfällt.

Abbildung 8.1 zeigt die elektrischen Felder an einer runden Apertur mit 50 nm Durchmesser nach der Näherung Bouwkamp. An den Rändern der Apertur in Polarisationsrichtung des Beleuchtungslichts gibt es jeweils ein Maximum der zur Aperturebene senkrechten elektrischen Feldkomponente. Dagegen ist das elektrische Feld über der Aperturmitte parallel zur Aperturebene polarisiert und hat die gleiche Polarisationsrichtung wie das Beleuchtungslicht.

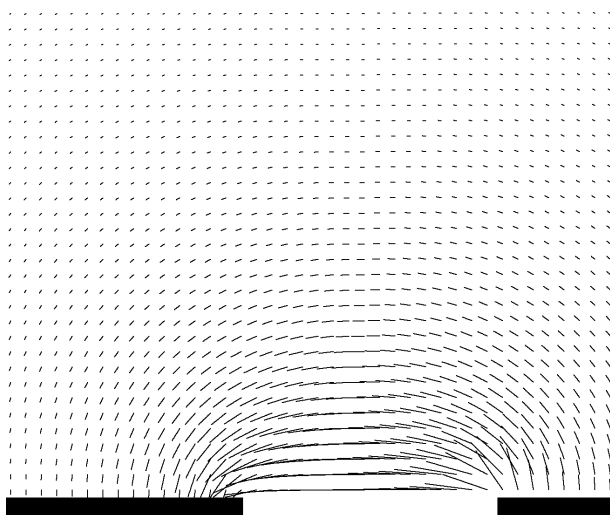
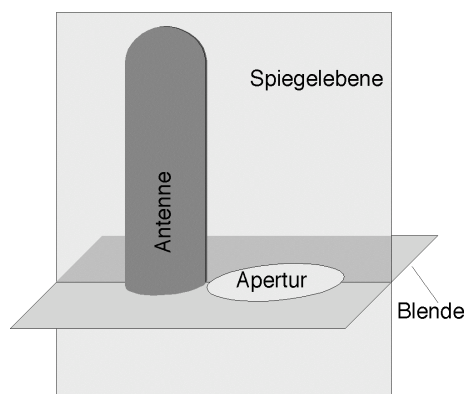


Abb. 8.1 Feld an einer Apertur berechnet nach der Näherung von Bouwkamp [12]. In dieser Näherung ist das Feld rein imaginär. Der Betrag der Feldstärke ist proportional zur Länge der Striche, die Richtung ist durch die Orientierung der Striche gegeben. Durchmesser der Apertur: 50 nm, Wellenlänge: 496 nm.

Stellt man die Metallspitze auf die leitende Fläche nahe dem Rand der Apertur, so definieren die Achse der Metallspitze und der Mittelpunkt der Apertur eine Ebene, bezüglich der die Anordnung spiegelsymmetrisch ist.



Wählt man die Polarisation des senkrecht auf die Aperturblende einfallenden Lichts parallel zu der Spiegelebene, so steht die Metallspitze in einem der Gebiete mit starker vertikaler elektrischer Feldkomponente. Dadurch wird in der Metallspitze ein Längsstrom erzeugt, der wiederum durch die Ladungsanhäufung am Spitzenende hohe Nahfelder verursacht. Abbildung 8.2 zeigt die nach der MDP-Methode berechneten Felder längs der Symmetrieebene des Aufbaus. Bei dieser Polarisation ist auch die Beleuchtung symmetrisch* und es treten deshalb in der Symmetrieebene nur elektrische Feldkomponenten parallel zur Symmetrieebene auf.

Wird dagegen die Polarisation des Beleuchtungslichts um 90° gedreht, so wird eine spiegelsymmetrische Anordnung antisymmetrisch* beleuchtet. Die resultierenden elektrischen Felder sind auch antisymmetrisch zur Spiegelebene. In der Symmetrieebene treten daher nur elektrische Feldkomponenten senkrecht zu ihr, also auch senkrecht zur Richtung der Metallspitze, auf. Daher gibt es in diesem Fall an der Spitze auch keine Feldkonzentration.

Es ist also wesentlich, die richtige Polarisation bei der Beleuchtung zu wählen, um eine Feldüberhöhung an der Metallspitze zu bekommen. Dies ist auch mit den Messungen in Übereinstimmung (siehe z.B. Abb. 7.8).



* Für einen Punkt \vec{r} sei \vec{r}' der Spiegelpunkt bei der Spiegelung an einer Ebene mit dem normierten Normalenvektor \hat{n} . Das elektrische Feld \vec{E} wird hier als symmetrisch zu dieser Spiegelebene bezeichnet, wenn für alle Punkte \vec{r} gilt: $\vec{E}(\vec{r}') = \vec{E}(\vec{r}) + 2(\hat{n} \cdot \vec{E}(\vec{r}))\hat{n}$.

Das elektrische Feld \vec{E} wird hier als antisymmetrisch zu dieser Spiegelebene bezeichnet, wenn für alle Punkte \vec{r} gilt: $\vec{E}(\vec{r}') = 2(\hat{n} \cdot \vec{E}(\vec{r}))\hat{n} - \vec{E}(\vec{r})$.

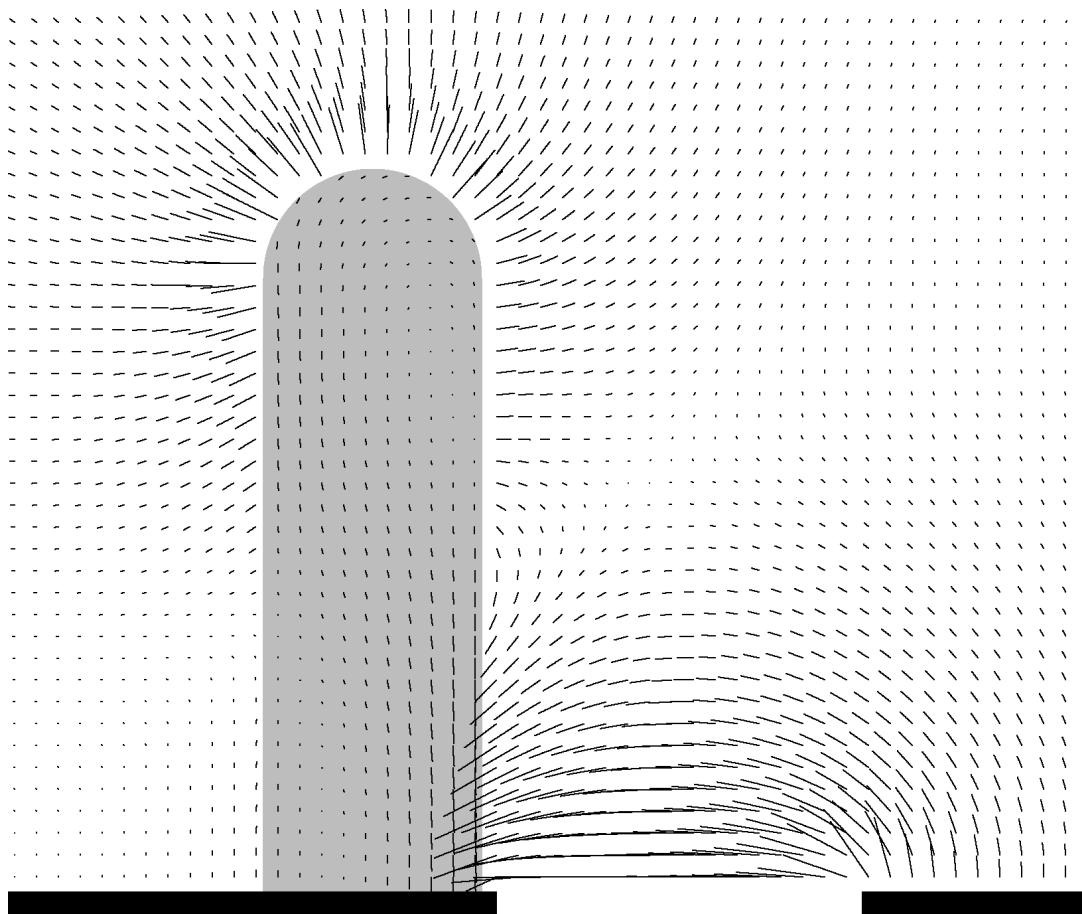


Abb. 8.2 Feldverlauf der TOA-Sonde

Das Bild zeigt den Imaginärteil der elektrischen Feldstärke. Der Betrag der Feldstärke ist proportional zur Länge der Striche, die Richtung ist durch die Orientierung der Striche gegeben. Die runde Apertur mit $50\ \mu\text{m}$ Durchmesser beginnt $2\ \mu\text{m}$ rechts von der $99\ \mu\text{m}$ langen Metallspitze. Wellenlänge $496\ \mu\text{m}$.

Die Metallspitze in Abb. 8.2 wurde mit nur $99\ \mu\text{m}$ Länge etwas kürzer als typischerweise in den Experimenten (ca. $170\ \mu\text{m}$) gewählt, da der Arbeitsspeicherplatzbedarf mit Länge der Spitze stark ansteigt und der vorhandene Speicherplatz bei dieser Länge bereits nahezu voll ausgeschöpft war.

8.2 Modelle zur Erklärung der Muster in Einzelmolekülabbildungen

Zur Erklärung der Muster in Einzelmolekülabbildungen (Abb. 7.12 und 7.13) müssen drei Gesichtspunkte berücksichtigt werden:

1. Die Anregung des Farbstoffmoleküls.

2. Veränderung der Fluoreszenzlebensdauer durch den strahlungslosen Energieübertrag an die Metallspitze und durch die veränderte (meist erhöhte) Abstrahlung durch die Antenne. Normalerweise wird die Fluoreszenzlebensdauer verkürzt, kann aber auch durch Unterdrückung der Abstrahlung verlängert werden. Strahlungslose Prozesse konkurrieren mit der Fluoreszenz und können diese unterdrücken ("quenching").
3. Die durch die Metallspitze veränderte Abstrahlung des Moleküls in den Raumwinkel, der durch das Objektiv erfaßt wird.

Es wird dabei vereinfachend angenommen, daß das Emissionsdipolmoment parallel zum Absorptionsdipolmoment steht. Dies trifft bei manchen Farbstoffmoleküle nur näherungsweise zu.

In der Literatur wurden schon vor den Messungen dieser Arbeit Fluoreszenz-Muster für Abbildungen einzelner Fluoreszenzmoleküle mit dem Feld einer Spitze vorhergesagt. Dabei wurde jedoch nur die Anregung [22] oder nur die Abstrahlung [82] berücksichtigt.

Da Anregung und Emission inkohärente Prozesse sind, können sie getrennt berechnet werden.

Dies kann analog zu den Feldberechnungen aus Kapitel 8.1 anhand des Antennenmodells berechnet werden. Diese Rechnungen brauchen aber sehr viel Zeit, so daß auch ein stark vereinfachtes Modell eingeführt werden soll, mit dem die Muster der Einzelmolekülbilder qualitativ berechnet werden können. Außerdem hat dieses vereinfachte Modell den Vorteil, daß es auch auf sehr kleine Abstände Spitzen-Probenabstände angewandt werden kann. Die Rechnungen mit dem Antennenmodell haben dagegen den Nachteil, daß bei dem hier verwendeten Ansatz ein Mindestabstand von ca. 4λ der Spitze zum Farbstoffmolekül eingehalten werden muß, damit die Randwertbedingungen mit ausreichender Genauigkeit in Molekülnähe erfüllt werden können. Der Vergleich der Rechenergebnisse mit den Messungen läßt aber vermuten, daß der minimale Spitzen-Farbstoffmolekül-Abstand bei den Messungen an Cy-3-Molekülen 2λ oder weniger betrug.

8.2.1. Berechnung der Einzelmolekülbilder nach dem Antennenmodell mit der Multiple-Dipol-Methode

Es soll hier mehr das Prinzip solcher Rechnungen dargestellt werden. Deswegen wird der Einfluß des Glimmers in dieser Rechnung vernachlässigt. Der Unterschied zwischen Anregungswellenlänge $\lambda = 496 \text{ nm}$ und der Wellenlänge des Fluoreszenzlichts wird auch nicht berücksichtigt; das Aluminium wird daher wieder mit dem komplexen $\epsilon = 34,5 + i9,21$ beschrieben.

1. Anregung eines Farbstoffmoleküls

Die Anregung des Farbstoffmoleküls ist proportional zum Quadrat der elektrischen Feldkomponente, die parallel zum Dipolmoment des Farbstoffmoleküls ist.

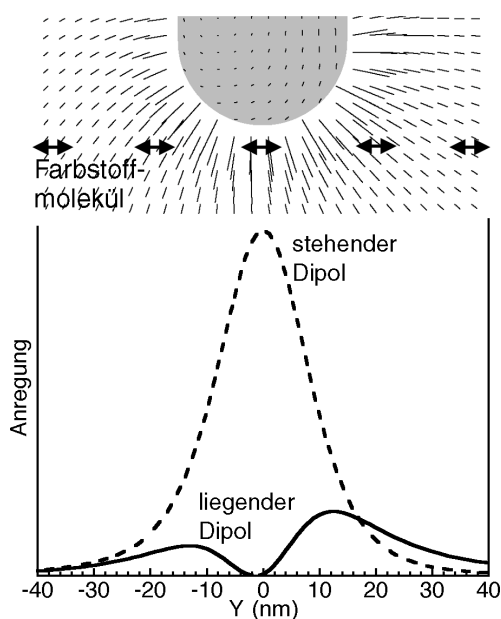


Abb. 8.3 Oben: Das Feld unter einer Spitze. Die Doppelpfeile sollen ein Farbstoffmolekül mit liegendem Dipolmoment in verschiedenen Positionen symbolisieren. Die Anregung des Farbstoffmoleküls ist proportional zum Quadrat der elektrischen Feldkomponente, die parallel zum Dipolmoment des Farbstoffs ist. Sie hängt stark von der Orientierung und Position des Farbstoffs gegenüber der Spitze ab. Das Schaubild zeigt die berechnete Positionsabhängigkeit der Anregung eines Farbstoffmoleküls mit liegendem bzw. stehendem Dipolmoment, das sich $4 \mu\text{m}$ unterhalb der Spitze befindet.

Die Anregung eines in der Probenebene liegenden Moleküls zeigt zwei Maxima (Abb. 8.3), da die größte zum Dipolmoment des Farbstoffmoleküls parallele Komponente des Spitzenfeldes bei einer gewissen lateralen Distanz zur Spitze auftritt. Hier bei der Rechnung ist das Spitzenfeld durch die einseitige Beleuchtung der Spitze auch asymmetrisch zur Spitzenachse, was zu zwei unterschiedlich hohen Maxima führt. Für eine längere Metallspitze wird eine kleinere Asymmetrie erwartet.

Die Verbindungslinie der Maxima zeigt die Orientierung des Moleküls innerhalb der Probenebene. Ein Farbstoff mit senkrechtem Dipolmoment wird durch die senkrechte Komponente des Spitzenfeldes angeregt und daher direkt unter der Spitze am stärksten. Für geneigte Farbstoffe ergibt sich ein asymmetrisches Muster mit einem Maximum oder zwei Maxima für die Abhängigkeit der Anregung von der Spitzenposition.

2. Veränderung der Fluoreszenzlebensdauer

Kommt ein Farbstoffmolekül dicht an eine Metalloberfläche, so kann es seine Anregungsenergie direkt strahlungslos an das Metall weitergeben. Dadurch wird die Lebensdauer des angeregten Zustands verkürzt [81, 83] und durch den zusätzlichen konkurrierenden Zerfallskanal die Abstrahlung unterdrückt. Diese Fluoreszenzauslöschung ("quenching") hängt stark vom Abstand zur Metalloberfläche ab.

Im Falle eines Farbstoffmoleküls mit vertikal orientiertem Dipolmoment fällt die stärkste Anregung mit dem kleinsten Abstand zwischen der Spitze und dem Farbstoff und somit dem stärksten Auslöschung zusammen. Deshalb wird ein Farbstoffmolekül mit senkrechtem Dipolmoment im Fluoreszenzbild für sehr kleine Spitzen-Probenabstände nicht eine einfache Scheibe sondern eine ringförmige Struktur ergeben.

Abbildung 8.4 zeigt eine Fluoreszenzaufnahme der gleichen Moleküle bei zwei verschiedenen Spitzen-Probeabstände. Beim linken Bild mit geringem Spitzen-Probenabstand erscheint das helle Molekül nur als Sichel. Dies läßt sich dadurch erklären, daß das Molekül schräg orientiert ist, so daß es zwar nur eine Position maximaler Anregung gibt, diese aber gegenüber der Molekülposition etwas nach links verschoben ist. Daher ist auf der rechten Seite des Flecks der geringste Spitzen-Molekülabstand. Die Fluoreszenz wird dort vollständig durch die Metallspitze ausgelöscht.

Bei der um $6,5\mu\text{m}$ höher abgehobenen Spitze ist der Auslösch-Effekt dagegen wesentlich geringer und das Molekül erscheint als fast runder Fleck.

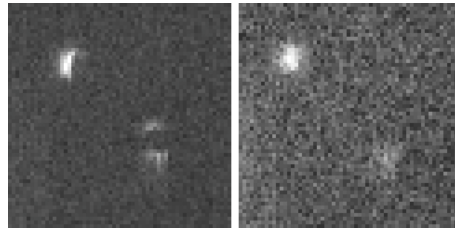


Abb. 8.4 Abstandsabhängigkeit der Einzelmolekülmuster

Fluoreszenzbilder zweier Cy-3-Moleküle in Scherkraft-Kontakt (links) und $6,5\mu\text{m}$ weiter von der Oberfläche abgehoben (rechts). Bei der Aufnahme der Bilder war bei der Vorwärtsbewegung der schnellen Rasterbewegung (vertikal) die Regelung eingeschaltet, für die Rückbewegung wurde die Regelung ausgeschaltet und die Sonde angehoben. Das im angenäherten Bild sichelförmige helle Molekül links oben ergibt im abgehobenen Bild einen nahezu runden Fleck. Im angenäherten Bild ist die Fluoreszenz des geneigten Moleküls auf der rechten Seite fast vollständig ausgelöscht, im abgehobenen Bild spielt die Fluoreszenzauslöschung nur noch eine untergeordnete Rolle.

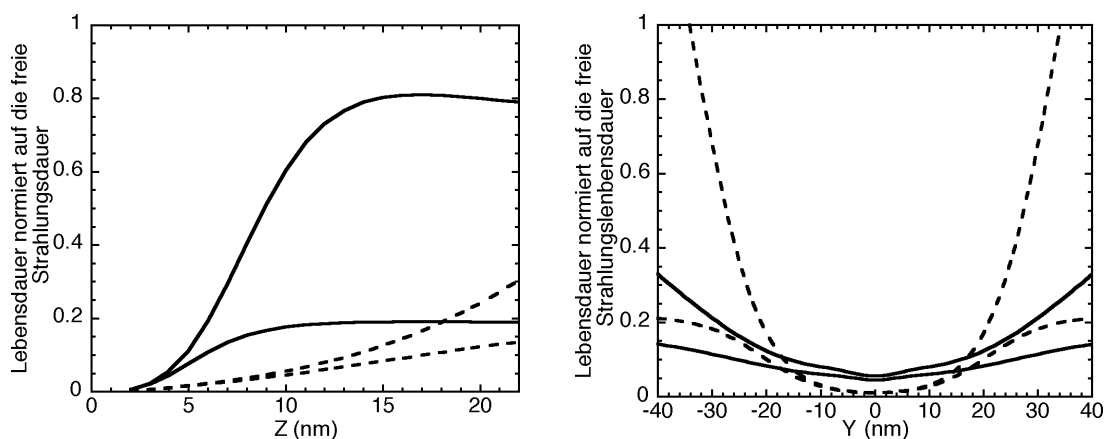


Abb. 8.5 Die Lebensdauer eines Farbstoffmoleküls normiert auf die Abstrahlungsdauer eines freien Farbstoffmoleküls in Abhängigkeit von der Position. Das linke Schaubild zeigt die Abstandsabhängigkeit auf der Symmetrieachse unterhalb der Spitze und das rechte Schaubild die seitliche Positionsabhängigkeit bei einem vertikalen Abstand von $4\mu\text{m}$. Die durchgezogenen Kurven zeigen jeweils die Werte für einen liegenden Dipol, die gestrichelten die eines stehenden Dipols. Dabei ist die obere Kurve für eine Quanteneffizienz 1 berechnet (es gibt also keine inneren Verluste im Molekül) und die untere Kurve für eine Quanteneffizienz 0,2. Die asymptotischen Werte für unendlichen Abstand (also freies Molekül) sind entsprechend 1 bzw. 0,2. Wird die Abstrahlung durch die Antenne unterdrückt, so kann die Lebensdauer sogar größer als die freie Lebensdauer werden.

Für nicht zu hohe Feldstärken (die spontane Emission \gg induzierte Emission) kann die Veränderung der Fluoreszenzlebensdauer klassisch [83] anhand einer schwingenden Ladung

beschrieben werden, auf die das an der Metalloberfläche reflektierte elektrische Feld zurückwirkt (siehe Anhang). Dabei wird die Gesamtänderung der Lebensdauer des angeregten Zustandes bestimmt - es geht hier auch die Veränderung der Dämpfung durch eine veränderte Abstrahlung ein.

3. Abstrahlung in das Mikroskopobjektiv

Durch die Antenne wird die Abstrahlung des Fluoreszenzmoleküls positionsabhängig verstärkt oder unterdrückt. Dies ist in Abbildung 8.6 dargestellt.

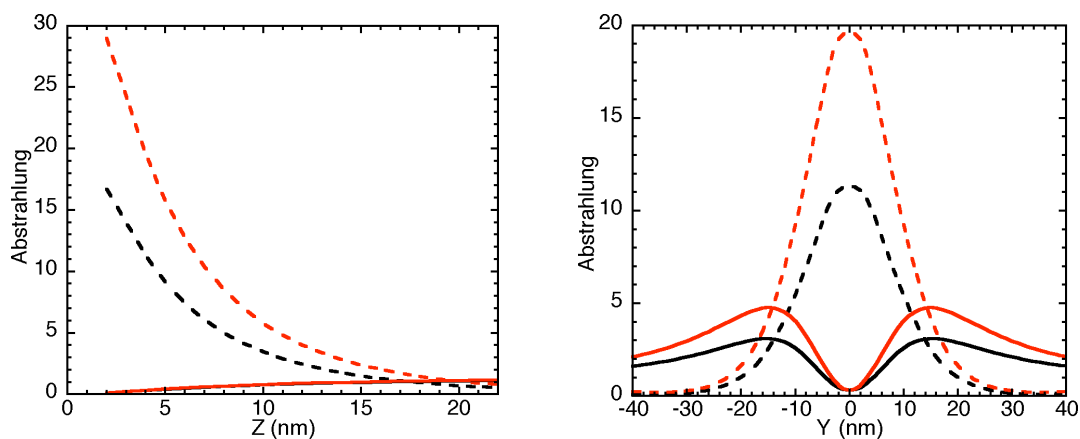


Abb. 8.6 Abstrahlung des Farbstoffmoleküls in das Objektiv ($NA = 0,95$) - normiert auf die gesamte Abstrahlung eines freien Moleküls - in Abhängigkeit von der Farbstoffposition. Das linke Schaubild zeigt die Abstandsabhängigkeit auf der Symmetrieachse unterhalb der Spitze und das rechte Schaubild die seitliche Positionsabhängigkeit bei einem vertikalen Abstand von 4λ . Die durchgezogenen Kurven zeigen jeweils die Werte für einen liegenden Dipol, die gestrichelten die eines stehenden Dipols. Dabei beschreibt die obere Kurve jeweils die Gesamtabstrahlung und die untere Kurve die Abstrahlung in den vom Objektiv erfassten Raumwinkel.

Die detektierte Fluoreszenz ergibt sich als Produkt aus den positionsabhängigen Größen Anregung, Lebensdauer und Abstrahlung. Abbildung 8.7 zeigt die so berechnete Positionsabhängigkeit der Fluoreszenz.

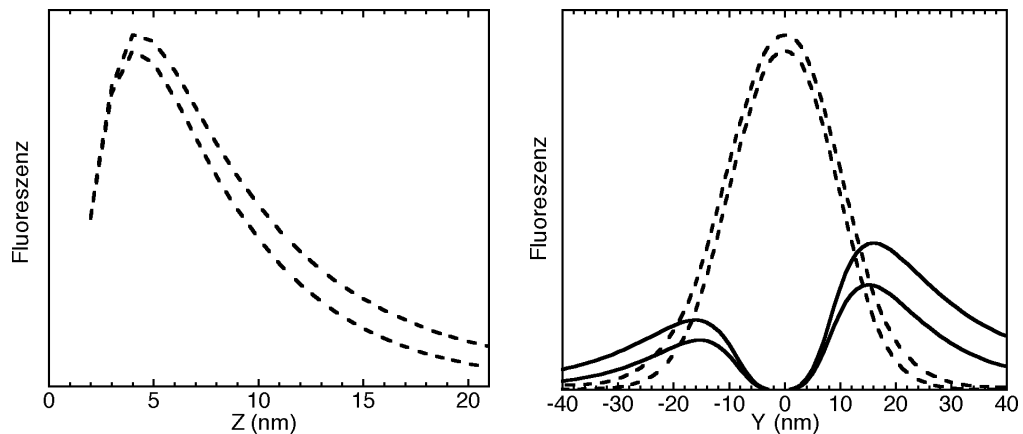


Abb. 8.7 Fluoreszenzsignal des fluoreszierenden Moleküls in Abhängigkeit der Spitzenposition. Das linke Schaubild zeigt die Abstandsabhängigkeit auf der Symmetrieachse unterhalb der Spitze und das rechte Schaubild die seitliche Positionsabhängigkeit bei einem vertikalen Abstand von 4λ . Die durchgezogene Kurven zeigen die Werte für einen liegenden Dipol, die gestrichelten die eines stehenden Dipols. Dabei ist jeweils die obere Kurve wieder für eine Quanteneffizienz 1 berechnet und die untere Kurve für eine Quanteneffizienz 0,2. Eine Quanteneffizienz von 0,2 ist für einen realen Farbstoff realistischer, (z.B. hat Cy-5 eine Quanteneffizienz von 0,28, [84]).

8.2.2. Berechnung der Einzelmolekülbilder nach dem Kugelspitzenmodell

Da die bisher vorgestellten Rechnungen sehr viel Zeit brauchen, soll hier ein stark vereinfachtes Modell eingeführt werden, mit dem die Muster der Einzelmolekülbilder qualitativ berechnet werden können. Dabei wird ausgenutzt, daß die Nahfelder eine sehr starke Abstandsabhängigkeit haben. Daher ist es vor allem wichtig, die Felder in Spitzennähe halbwegs richtig zu simulieren. Bei größeren Abständen braucht das verwendete Modell die Felder nicht korrekt zu beschreiben.

Wie in der Literatur zum aperturlosen SNOM üblich [24, 29, 85], kann die Antenne durch eine Kugel ersetzt werden, die an die Spitzenkrümmung der Antenne angepaßt ist. Da alle Abstände klein gegen die Wellenlänge sind, kann quasielektrostatisch gerechnet werden.

Die Anregung des Farbstoffmoleküls ist proportional zum Quadrat der Feldkomponente, die parallel zum Dipolmoment des Farbstoffmoleküls ist. Das elektrische Feld unter der Metallspitze wird hier nun durch einen in Antennenrichtung zeigenden Punktdipol, der in der Mitte der Spitzenkugel sitzt, simuliert. Dies ist eine für das Streu-SNOM häufig verwendete Näherung [75-77], die aber nur sehr grob ist, wie ein Vergleich mit dem Spitzenfeld der

Rechnung aus Kapitel 8.1 zeigt (siehe dazu Anhang 5). Eine Punktladung würde den Feldverlauf genauer beschreiben.

Das Nahfeld des Farbstoffmoleküls in der Nähe der Spitzenkugel läßt sich näherungsweise mit einem Spiegeldipol in der Spitzenkugel (Anhang 6) beschreiben. Die Fluoreszenzauslöschung kann dann anhand von Anhang 4 mit dem durch den Spiegeldipol am Ort des Dipols verursachten Feld berechnet werden. Zur Berechnung der Abstrahlung werden das Dipolmoment des Farbstoffs und des Spiegeldipols addiert und die emittierte Intensität über den durch den vom Objektiv erfaßten Raumwinkel integriert (Anhang 7). Diese berechnete Abstrahlung hat gegenüber der genaueren Rechnung aus Kapitel 8.2.1 einen zu flachen Verlauf. Wegen der geringeren Abstrahlung ist auch die Strahlungsdämpfung kleiner, was zu einer größeren Abhängigkeit des Signals von der inneren Dämpfung des Farbstoffmoleküls, und damit der Quanteneffizienz, führt.

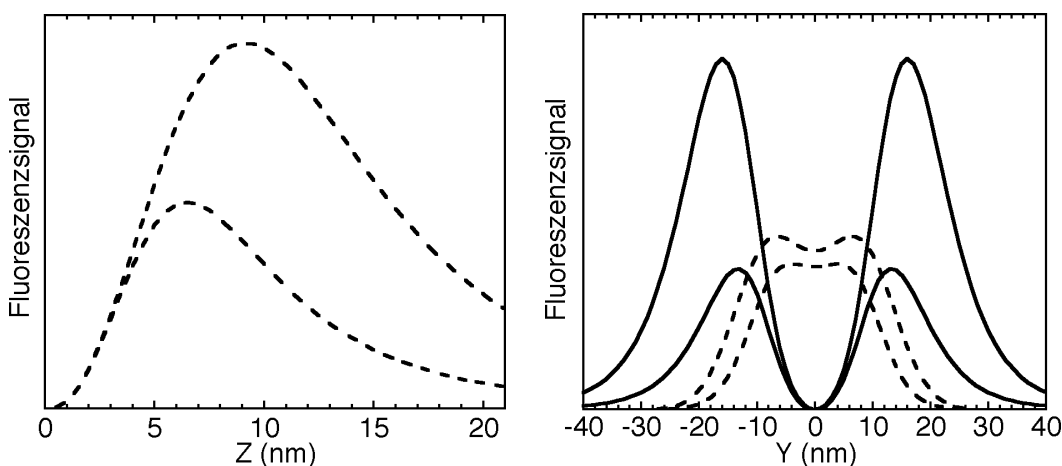


Abb 8.8 Gesamtfluoreszenzsignal des fluoreszierenden Moleküls in Abhängigkeit der Spitzenposition nach dem Spitzenkugelmodell ohne Glimmerunterlage. Das linke Schaubild zeigt die Abstandsabhängigkeit auf der Symmetrieachse unterhalb der Spitze und das rechte Schaubild die seitliche Positionsabhängigkeit bei einem vertikalen Abstand von $4\mu\text{m}$. Die durchgezogenen Kurven zeigen jeweils die Werte für einen liegenden Dipol, die gestrichelten die eines stehenden Dipols. Dabei ist jeweils die obere Kurve wieder für eine Quanteneffizienz 1 berechnet und die untere Kurve für eine Quanteneffizienz 0,2. Spitzenradius: $15\mu\text{m}$.

Deshalb gibt das Kugelspitzenmodell nur den groben Verlauf der Positionsabhängigkeit des Fluoreszenzsignals von der Sonde wieder (vergleiche Abb.8.7 und 8.8).

Ein Vorteil des Kugelmodells ist, daß relativ einfach die Glimmerunterlage durch eine Folge von Spiegeldipolen im Glimmer und in der Spitzenkugel mit in das Modell aufgenommen

werden kann (Anhang 8). Um gleichzeitig sowohl die Randwertbedingungen der Glimmeroberfläche als auch der Spitzenkugel zu erfüllen, müssen zu allen Spiegeldipolen im Glimmer bzw. in der Spitzenkugel auch deren Spiegeldipole in der Spitzenkugel bzw. dem Glimmer eingeführt werden.

Da die Rechnungen sowieso nur grobe Abschätzungen sind, wurden hier zur Vereinfachung jeweils nur der erste Spiegeldipol des Spitzendipols, des Farbstoffdipols und dessen Kugel-Spiegeldipols im Glimmer berücksichtigt. Folgende Abbildung 8.9 illustriert die Auswirkung des Glimmers auf die Einzelmolekülmuster.

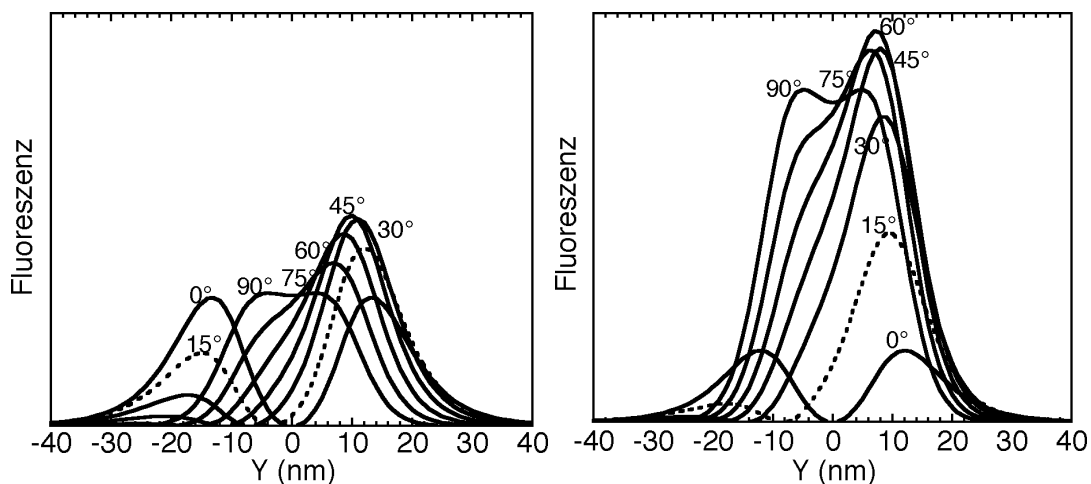


Abb. 8.9 Vergleich der Fluoreszenzsignale eines fluoreszierenden Moleküls in Abhängigkeit der Spitzenposition nach dem Spitzenkugelmodell mit (rechts) und ohne (links) Glimmerunterlage. Die Muster sind für ein um die x-Achse gekipptes Molekül in 15°-Schritten für die Quanteneffizienz 0,2 berechnet.

Die Verkippungswinkel aus der Ebene sind angegeben. Durch die Glimmerunterlage werden bei der Anregung die vertikalen Feldkomponenten verstärkt und die horizontalen verkleinert. Bei der gleichen Neigung ist das Fluoreszenzmuster daher asymmetrischer, das Molekül erscheint stärker geneigt. Dies ist z.B. gut an den Kurven eines um 15° aus der Ebene verkippeten Dipols zu sehen (punktierte Kurven).

Spitzenprobenabstand: 4 nm, Spitzenradius: 15 nm.

Mit diesem vereinfachten Modell lassen sich die Strukturen aus Abb. 7.13 sehr gut erklären, wie man in Abbildung 8.10 sehen kann. Die Parameter des Modells wurden dabei so angepaßt, daß die Rechnung möglichst gut mit der Messung übereinstimmt.

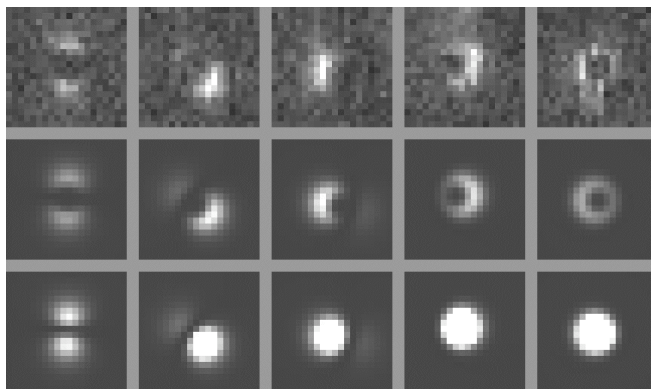


Abb. 8.10 Vergleich der gemessenen und gerechneten Fluoreszenzmuster unterschiedlich geneigter Farbstoffmoleküle.

Obere Zeile: Messungen. Mittlere Zeile: Modellrechnungen angepaßt an die Messungen. Neigungswinkel: 0° , 14° , 20° , 49° und 68° . Spitzenradius: $22\ \mu\text{m}$. Untere Zeile: Modellrechnungen mit gleichen Parametern wie in der mittleren Zeile, jedoch ohne Fluoreszenzauslöschung durch die reduzierte Lebensdauer des angeregten Zustands. Die Fluoreszenzauslöschung spielt bei der Erklärung der Muster eine wesentliche Rolle. Da die für diese Messung verwendete Sonde das Abstandssignal nur sehr schlecht an die Quarzgabel übertragen hat, weil sie sehr biegsam war, wurde die Messung wahrscheinlich in Sonden-Proben-Kontakt aufgenommen. Bildgröße: $117\ \mu\text{m}$.

Durch die gute Übereinstimmung der gemessenen und gerechneten Muster darf man sich nicht darüber hinwegtäuschen lassen, daß in der Rechnung sehr grobe Näherungen gemacht wurden. Es kann daher aus diesem Fit nicht quantitativ auf Lebensdaueränderungen, Feldüberhöhungen oder den Spitzenprobenabstand zurückgeschlossen werden und der Durchmesser der Spitzenkugel kann nur grob bestimmt werden. Mit diesem Modell kann jedoch die Orientierung und Position von Einzelmolekülen mit hoher Genauigkeit detektiert werden.

8.3 Bestimmung der Position und Orientierung einzelner Cy-3-Farbstoffmoleküle in Messungen mit Hilfe des Modells

Durch Anpassen des Modells kann die Position und Orientierung einzelner Farbstoffmoleküle ermittelt und direkt mit dem Topographiebild korreliert werden, da derselbe Bereich der Spitze zugleich das optische und das topographische Bild erzeugt. In Abbildung 8.11 ist dies an Hand von DNA demonstriert, an deren Enden Cy-3-Moleküle gebunden sind.

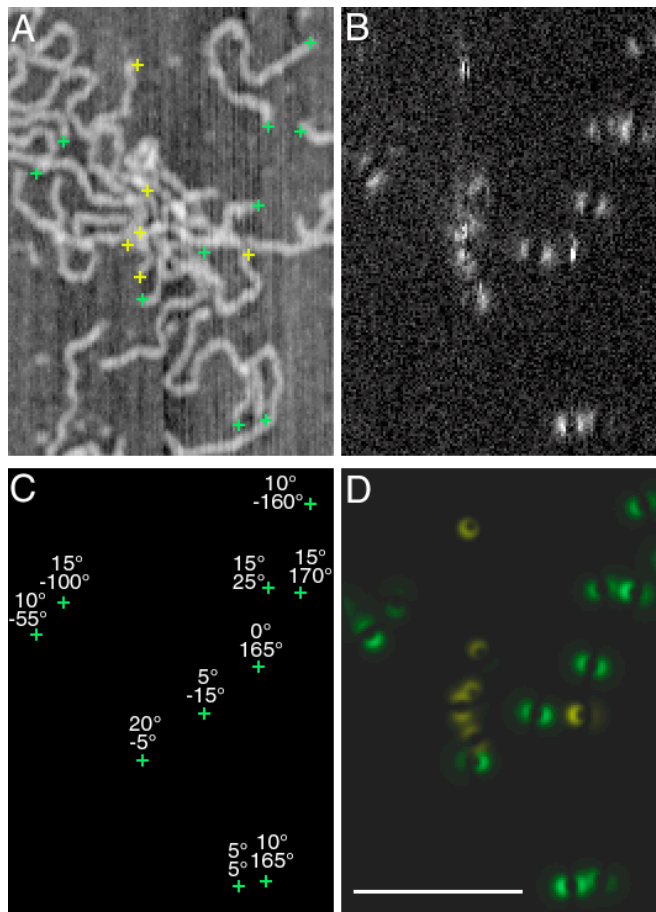


Abb. 8.11 DNA mit Cy-3 markierten Enden und zugehörigen Modellrechnungen, (a) Topographie mit den berechneten Positionen der detektierten Farbstoffmoleküle markiert mit "+", (b) gemessene Fluoreszenz, (c) Positionen wie in (a) zusammen mit Neigungs- und Azimutwinkel, wie sie aus der Anpassung der ersten Näherungsrechnungen, deren Ergebnisse in (d) gezeigt werden, an die Messung hervorgehen. Der durch Anpassen ermittelte Spitzenradius ist $r_{\text{Spitze}} = 1 \mu\text{m}$. Die Rechnung kann gut an die grün markierten Moleküle angepaßt werden, weniger gut an die gelb markierten Moleküle wegen des Blinkens, Bleichens und teilweise gleichzeitiger Überlagerung mehrerer Bilder verschiedener Moleküle.

Der Maßbalken ist $200 \mu\text{m}$ lang.

Schnelle Rasterrichtung: vertikal. Langsame Rasterrichtung: von links nach rechts.

Zur Überprüfung des Einflusses des Rauschens auf die Genauigkeit der durch Anpassen der Modellrechnung ermittelten Werte wurden in Modellrechnungen Fluoreszenzmuster zufällig positionierter und orientierter Moleküle berechnet und mit einem simulierten Rauschen versehen. Anschließend wurden durch den Anpassalgorithmus wieder die Position und die Orientierung des Moleküls ermittelt. Für das Rauschen wurden typische Werte aus Abb. 8.11 übernommen: Hintergrund $61 \mu\text{Pixel}$, Standardabweichung des Hintergrunds $13 \mu\text{Pixel}$

(möglicherweise zum Teil elektronisch erzeugt) und Zählrate pro Molekül 7900. Für die Streuung des Signals eines Pixel wurde die Wurzel des Signals genommen. Die gesamte Standardabweichung eines Pixels ergibt sich als Wurzel der Summe der Quadrate der Standardabweichung des Hintergrunds und des Signals. Die dabei resultierenden maximalen Abweichungen in der Position waren kleiner als 0,5 μ m und die Abweichungen in den Winkeln kleiner als 5°.

Man muß jedoch bei der Anpassung an Meßwerte beachten, daß es sich bei diesen Rechnungen nur um Näherungsrechnungen handelt, die nicht exakt mit den Messungen übereinstimmen. Dadurch kommt es beim Anpassen an Messungen zu einer stärkeren Streuung der Werte und es können auch systematische Abweichungen auftreten. Systematische Abweichungen sind auch zu erwarten, wenn in den Feldern starke Asymmetrien wie z.B. in der Modellrechnung aus Kapitel 8.2.1 (z.B. Abb.8.3) auftreten. Dies ist in den Messungen jedoch nicht der Fall, denn sonst würde sich dies in den Messungen als eine horizontale Anisotropie in der Richtungsverteilung zeigen, die in keinem der gemessenen Bilder beobachtet wurde. (Siehe Abb. 7.12 und 7.13. Abb. 8.11 zeigt nur einen kleinen Ausschnitt aus einem größeren Bild. Die dort sichtbare Vorzugsrichtung ist nur lokal in dem ausgewählten Ausschnitt.)

Als Ergebnis zeigt sich, daß die meisten Moleküldipolmomente parallel ($\pm 20^\circ$) zur Glimmroberfläche liegen (vergleiche Abb. 7.13 mit Abb. 8.10; siehe auch Abb. 8.11) und nur sehr wenige einen steilen Neigungswinkel besitzen.

Wenn aus einem Bild mit mehreren Einzelmolekülmustern noch erkannt werden kann, daß es sich um eine bestimmte Anzahl von Farbstoffmolekülen handelt, so können auch dann die Position und Orientierung bestimmt werden, wenn sich die Einzelmolekülmuster stark überlagern. Abbildung 8.12 zeigt ein Beispiel zweier Farbstoffmoleküle, die nur 12 nm von einander entfernt sind.

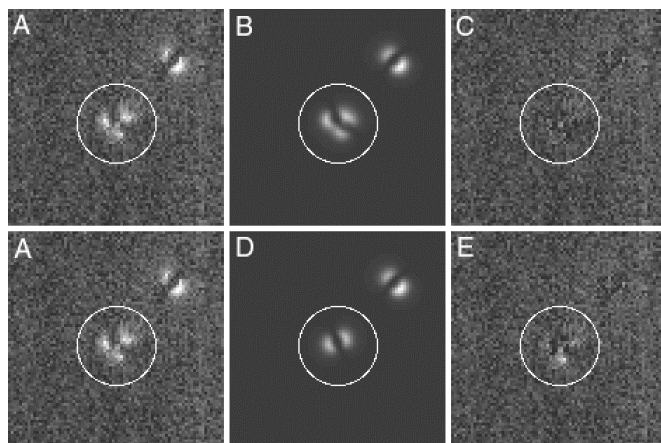


Abb. 8.12 Beispiel für Hochauflösung. Bild A zeigt das gemessene Bild insgesamt (wahrscheinlich) dreier Farbstoffmoleküle, von denen die beiden durch den Kreis hervorgehobenen Moleküle sehr dicht benachbart sind. B zeigt einen Fit unter der Annahme, daß sich im Kreis tatsächlich zwei Moleküle befinden. C ist das Differenzbild A-B. D zeigt einen Fit unter der Annahme, daß im Kreis nur ein Farbstoffmolekül ist, und E ist das Differenzbild A-D.

Im Bild E sind wesentlich mehr Strukturen zu erkennen als im Bild C, was stark die Interpretation unterstützt, daß sich im Kreis tatsächlich zwei Farbstoffmoleküle befinden. Durch den Fit erhält man die Position und Orientierung der Moleküle. Es ergibt sich ein Abstand von nur 12 nm der beiden Moleküle.

Bildgröße: jeweils 300 nm Seitenlänge.

Schnelle Rasterrichtung: vertikal. Langsame Rasterrichtung: von links nach rechts.

8.4 Übertragbarkeit des Modells auf andere Farbstoffmoleküle

Die Modelle von Kapitel 8.2 gehen lediglich davon aus, daß das Farbstoffmolekül als Punktdipol betrachtet werden kann - es müßte also nicht nur für die Cy-3-Farbstoffmoleküle sondern auch für andere einzelne Farbstoffmoleküle gelten. Hier sollen daher die Messungen an den DIL-C18 und TOTO1-Molekülen überprüft werden, wieweit sie im Einklang mit diesem Modell sind.

Bei den in PMMA eingebetteten DIL-C18 Molekülen muß die andere Umgebung beachtet werden. Dabei ist besonders wichtig, daß der Abstand der Farbstoffmoleküle zur Metallspitze größer ist, so daß die Fluoreszenzauslöschung eine kleinere Rolle spielt. Daher haben die einzelnen Flecken eine rundlichere Form. Es treten auch asymmetrische Flecken und Doppelflecken auf, die sich durch schräge oder liegende Dipole erklären lassen (siehe Abb. 8.13). Bei der PMMA-Probe gibt es aber deutlich weniger Doppelflecken als bei Cy-3

auf Glimmer, da die DIL-C18 Moleküle in der PMMA-Schicht zufällig orientiert sind, wo hingegen die Cy-3-Moleküle auf der Glimmeroberfläche parallel zur Glimmeroberfläche ausgerichtet liegen.

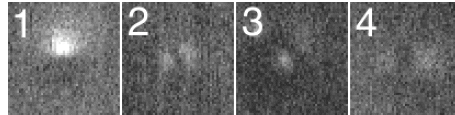


Abb. 8.13 Aus Abb. 7.10 herauskopierte Einzelmolekülmuster mit verstärktem Kontrast. Bild 1 zeigt einen asymmetrischen Fleck (unten: steiler Abfall der Intensität, oben: flacher Abfall); die Bilder 2-4 haben Doppelmaxima-Muster. Der Abstand der Maxima hängt von der Tiefe der Position des DIL-C 18 Moleküls in der PMMA-Schicht ab.

Seitenlänge der Ausschnitte: 200 μm .

Für die Abweichungen der Bilder der in PMMA eingebetteten DIL-C18 Moleküle zu den Bildern der Cy-3-Moleküle können also plausible Erklärungen gegeben werden.

Dagegen ist nicht klar, ob das Modell bei der mit TOTO1 markierten DNA auf Glimmer auch richtige Ergebnisse liefert (Abb. 7.11).

Es wurden Aufnahmen mit der gleichen Spitze zuerst an einer TOTO1-Probe, dann einer Cy-3 Probe und dann wieder an einer TOTO1-Probe aufgenommen, so daß ausgeschlossen werden kann, daß Unterschiede der Einzelmolekülmuster durch verschiedene Spitzen verursacht werden. Die großräumige Umgebung der Farbstoffmoleküle ist auch dieselbe - sie befinden sich dicht über einer Glimmeroberfläche. Daher sind eigentlich dieselben Fluoreszenzmuster wie bei den Cy-3 Molekülen zu erwarten.

Schaut man Abb. 7.11 an, so hat man jedoch zunächst den Eindruck, daß nur Einzelmaxima vorkommen. Dabei muß aber beachtet werden, daß die meisten Einzelmolekülbilder durch Bleichereignisse abgeschnitten sind - was das Beurteilen der Muster sehr erschwert. Konzentriert man sich auf die etwas weniger hellen Flecken, so gibt es durchaus Stellen, an denen Doppelflecken sein könnten, z.B. in der Ecke links unten von Abb. 7.11. Diese ist vergrößert und mit erhöhtem Kontrast in Abb. 8.14 abgebildet.

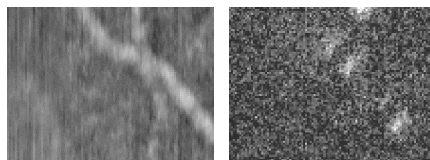


Abb. 8.14 Ausschnitte (links unten) aus der Aufnahme der mit TOTO1 markierten DNA (Abb. 7.11). Links: Topographie, rechts: Fluoreszenz (verstärkter Kontrast). Bildgröße: $200\text{nm} \times 50\text{nm}$. Handelt es sich um 2 Einzelmoleküle mit Doppelmaxima oder um 4 Einzelmoleküle mit jeweils einem einfachem Maximum?

Die wenigen ganz zu sehenden hellen Einzelmolekülbilder sind rundliche Flecke - die Fluoreszenzauslöschung spielt also wahrscheinlich eine geringere Rolle. Dies könnte durch einen schnellen Energietransfer zwischen den benachbarten Farbstoffmolekülen erklärt werden, der die Energie rasch von der Spitzennähe weg transportiert.

Für ein besseres Verständnis dieser TOTO1-Fluoreszenzbilder müssen noch weitere Messungen gemacht werden.

Bei Einzelmolekülmessungen können noch weitere Effekte auftreten, die hier nur erwähnt werden sollen. So zeigen Einzelmoleküle oft sogenanntes Blinken: Das Molekül geht zeitweise in einen metastabilen Zustand über und kann nicht mehr durch das Laserlicht in andere Zustände angeregt werden [30, 73]. Ist die Lebensdauer dieses metastabilen Zustandes 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.

Außerdem wurden bei Einzelmolekülen schon Rotationen und Driften [30, 86, 87] auf der Oberfläche beobachtet. Bei den Messungen dieser Arbeit ist die Position und Orientierung der Cy-3-Moleküle an DNA auf Glimmer zumindest im Zeitfenster einer Abbildung stabil, da die Einzelmoleküle klare Muster ergeben.

Zur Überprüfung der Modelle sind in Zukunft Messungen der Abstandsabhängigkeit der Fluoreszenz oberhalb von Einzelmolekülen notwendig. Dazu müssen jedoch photostabilere Fluoreszenzmoleküle (z.B. die Alexa-Farbstoffe) verwendet werden, damit vom gleichen Molekül auch ein Bild zur Bestimmung der Orientierung und eine Abstandskurve aufgenommen werden kann, bevor es photobleicht wird.

Ein Meßaufbau mit gepulstem Laser und entsprechend schneller Elektronik wäre eine große Hilfe: Er würde die Bestimmung der Lebensdauer des abgebildeten Moleküls erlauben. Dadurch wäre eine Trennung der verschiedenen Effekte - erhöhte Anregung, reduzierte Lebensdauer, und erhöhte Abstrahlung - stark vereinfacht. Leider ist der dazu benötigte Meßaufbau teuer.

8.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Modellrechnungen

- Es wurde ein Modell für das Einkoppeln des Aperturlichts in die Metallspitze aufgestellt und damit das elektrische Feld in Spitzenumgebung berechnet. Anhand dieses Modells kann die beobachtete Polarisationsabhängigkeit der Sonde bestätigt werden.
- Es wurde ein Modell zur Berechnung des Fluoreszenzsignals eines Einzelmoleküls in Abhängigkeit von der Sondenposition aufgestellt.
- Eine stark vereinfachte Version dieses Modells - das Spitzenkugelmodell - beschreibt die gemessenen Fluoreszenzmuster an Cy-3-Molekülen gut.
- Durch Anpassen der Modellrechnung an das gemessene Fluoreszenzmuster eines Einzelmoleküls kann die Position des Einzelmoleküls mit hoher Präzision (1 μ m) bestimmt werden. Außerdem erhält man die Orientierung des Dipolmoments des Farbstoffmoleküls.
- Die Positionen und Orientierungen zweier Einzelmoleküle können selbst dann noch bestimmt werden, wenn deren Fluoreszenzmuster sich teilweise überlagern.
- Unterschiede der Fluoreszenzmuster der Cy-3-Moleküle auf Glimmer und der in PMMA eingebetteten DIL-C18-Moleküle lassen sich qualitativ durch die unterschiedlichen Versuchsbedingungen erklären. Die Fluoreszenzmuster der TOTO1-Probe sind dagegen noch nicht verstanden und müssen noch näher untersucht werden.

9. Ausblick zur Weiterentwicklung und Anwendung der TOA-Sonde

In dieser Arbeit wurden durch das Einführen des TOA-Prinzips große Fortschritte für die Rasternahfeldfluoreszenzmikroskopie erreicht. Z.B. ist die demonstrierte optische Auflösung an Einzelmolekülen bisher unerreicht. Diese Technik läßt sogar noch weitere Fortschritte durch systematische Optimierung erwarten, zu der es aus Zeitgründen in dieser Arbeit nicht gereicht hat:

Durch theoretische Überlegungen und experimentelle Untersuchungen kann der Einfluß der Spitzenlänge und des Spitzenmaterials auf die Feldüberhöhung an der Spitze untersucht werden. Durch gezieltes Ausnützen der Resonanzen sollte sowohl die Beleuchtungsintensität als auch das Signal-Hintergrund-Verhältnis noch zusätzlich erhöht werden können. Auch die Apertur- und Spitzenform können noch optimiert werden. So wird eine wesentlich höhere Transmission erwartet, wenn als Apertur ein schmaler Schlitz, der aber länger als der Cut-Off-Durchmesser ist, verwendet würde, wobei die Spitze an der *langen Seite* des Schlitzes stehen sollte. Hierbei wäre es wohl günstig, wenn die Spitze die Form eines gleichschenkligen Dreiecks hätte, dessen Basis so lang wie der Aperturschlitz ist.

Durch schärfere Spitzen kann sowohl die topographische als auch die optische Auflösung weiter verbessert werden. Dabei wäre es günstig, das vorderste Spitzenende aus einem hochbrechenden, aber wenig absorbierenden Material zu machen. Dadurch könnte der Effekt der Fluoreszenzauslöschung deutlich reduziert werden, was sowohl die optische Auflösung als auch die Signalhöhe der Fluoreszenz verbessern würde.

Bisher wurde die TOA-Sonde nur an Testproben charakterisiert. Die dort demonstrierten Eigenschaften zeigen aber, daß die Sonde für einige biologische Anwendungen gut geeignet sein wird:

Die in Abb. 8.12 demonstrierte hohe Auflösung sollte ausreichen, um markierte Proteine einzeln abzubilden, auch wenn sie dicht beieinander liegen. Strukturen, die dicht bei oder in der Zellmembran liegen, so wie z.B. Transport- oder Rezeptorsysteme, könnten in natürlicher Umgebung untersucht werden.

Zwischen zwei Farbstoffen mit unterschiedlichem spektralem Verhalten sollten in Analogie zu Fernfeldmethoden [88] sogar Abstände, die kleiner als die Auflösung sind, detektiert werden können - und dies mit einer Genauigkeit von etwa $1\mu\text{m}$. Die Farbstoffe können durch zwei Messungen mit einer optischen Anregung in den beiden Absorptionsmaxima unterschieden werden. Dies gilt sogar für Fälle, in denen die Anregungsenergie von einem

Farbstoffmolekül zum anderen durch FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer, [1, 89])[90] übertragen wird. Damit wird die neue Technik erlauben, Abstände in der Größe von Untereinheiten makromolekularer Komplexe zu detektieren. Mit Fluoreszenztechniken waren diese Abstandsbereiche bis jetzt nur durch nicht abbildende Verfahren, die auf FRET basieren, erreichbar. Diese sind außerdem auf Abstände zwischen 1 und 8 nm beschränkt [90].

Zusätzlich zur Position der Einzelmoleküle erhält man mit der TOA-Sonde die Orientierung ihres Absorptionsdipolmoments. Wird ein Farbstoffmolekül starr und mit definierter Orientierung an biologische Moleküle oder Untereinheiten biologischer Komplexe gebunden, so kann die Ausrichtung dieser Moleküle optisch detektiert werden. Die Kenntnis der gegenseitigen Orientierung von Reaktionspartnern ist für die Untersuchung makromolekularer Prozesse auf der Einzelmolekülebene wichtig. Außerdem ist die gegenseitige Orientierung zweier Farbstoffmoleküle ein hilfreicher Parameter in FRET-Abstandsmessungen.

Da das gleichzeitig gemessene optische und topographische Signal vom gleichen Ort auf der Probe herrührt und nicht von zwei zueinander verschobenen Stellen, sollte die TOA-Sonde auch besonders gut zur Verfolgung dynamischer Prozesse geeignet sein. Es können gleichzeitig topographische Ereignisse, wie z.B. Höhenänderungen durch Konformationsänderungen des Objekts, und Fluoreszenzereignisse, wie z.B. durch FRET registrierte Abstandsänderungen, in ihrer zeitlichen Abfolge beobachtet und miteinander verglichen werden.

Eine geplante dynamische Anwendung ist z.B. die Beobachtung der Faltung einzelner Proteine in Chaperoninen (Sonderforschungsbereich 486, Projekt A7). Dabei soll die Konformation des Chaperonins (z.B. GroEl/GroES von *Escherichia coli*) anhand der Topographie und der Faltungszustand der Proteine anhand der Fluoreszenz detektiert werden. Dies könnte z.B. durch Verwendung von GFP (green fluorescent protein) als Präparat erreicht werden, das nur im gefalteten Zustand fluoresziert.

10. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde ein neuartiges optisches Rasternahfeldmikroskop (SNOM) für Fluoreszenzanwendungen entwickelt, das insbesondere auch für biologische Anwendungen geeignet ist. Besonderes Gewicht wurde dabei auf die Entwicklung einer neuen, hochauflösenden Sonde gelegt, die sowohl als Spitze für Rasterkraftmikroskopie verwendet werden kann als auch als SNOM-Sonde, die die Detektion des Fluoreszenzlichts einzelner Moleküle erlaubt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein SNOM aufgebaut, bei dem die Probe über eine Glasfasersonde beleuchtet wird. Um ein möglichst hohes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu ermöglichen hat der Aufbau einen konfokalen Strahlengang. Der Proben-Sonden-Abstand wird mit einer Quarzgabel-Scherkraftabstandsregelung konstant gehalten.

Für biologische Anwendungen muß das SNOM in Pufferlösung arbeiten können. Daher wurde zunächst die Quarzgabel-Scherkraftabstandsregelung in dünnen Wasserschichten erprobt. Es konnte gezeigt werden, daß in Wasserschichten von einigen 10 μ m Dicke die zusätzliche Dämpfung der Quarzgabel klein gehalten werden kann, so daß ähnliche Güten wie beim Abbilden an Luft erreicht werden. Das läßt auch eine ähnliche Kraftempfindlichkeit erwarten. Dabei hat sich als Problem herausgestellt, daß die Resonanzfrequenz und Güte der Quarzgabel stark von der Luftfeuchtigkeit abhängen.

Eine neue Nahfeldsonde wurde entwickelt, da die bisher gängigen Sonden die beiden oben gestellten Forderungen - eine hohe Topographieauflösung und optische Einzelmoleküldetektion - nicht gleichzeitig erfüllen:

Bei der Apertursonde im Beleuchtungsmodus wird das Objekt nur lokal beleuchtet, so daß das geringe Hintergrundsignal Einzelmoleküldetektion ermöglicht. Aber die Apertursonde besitzt statt einer Spitze ein sehr flaches Ende, so daß sie als Topographiesonde oft nur eine schlechte Auflösung erlaubt. Meistens stammen das optische und topographische Signal von zwei deutlich zueinander verschobenen Positionen auf der Probe. Außerdem können nur optische Auflösungen im Bereich 50 μ m-100 μ m erreicht werden.

Die Streusonde, eine mit einem Fernfeld-fokussierten Laserstrahl beleuchtete Spitze aus Metall oder Dielektrikum, erlaubt dagegen sowohl topographisch als auch optisch eine Auflösung von ungefähr dem Spitzenkrümmungsradius, typischerweise 10 μ m-20 μ m. Da jedoch auch die Umgebung der Spitze durch den Laserstrahl beleuchtet wird, werden Farbstoffmoleküle in diesem Bereich gebleicht und man hat ein sehr hohes Hintergrundsignal. Daher ist es mit dieser Sonde sehr schwierig, Einzelmoleküle zu detektieren.

Um diese Probleme zu überwinden, wurde bei der neuen Sonde, der "tip-on-aperture" Sonde (TOA-Sonde), das Prinzip der Apertursonde mit dem Prinzip der Streusonde vereint: Eine scharfe Metallspitze am Rand einer Apertur wird über das Nahfeld der Apertur beleuchtet.

In dieser Arbeit wird ein Weg zur Verwirklichung der TOA-Sonde beschrieben und die Sonde an verschiedenen Objekten charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, daß die TOA-Sonde die positiven Eigenschaften der Streusonde mit den positiven Eigenschaften der Apertursonde verbindet.

Das Hintergrundsignal ist ausreichend gering, um klar einzelne Farbstoffmoleküle abzubilden. Diese zeigen typische Fluoreszenzmuster, die von der Orientierung des Dipolmoments des Farbstoffmoleküls abhängen.

Es wurde eine Auflösung - sowohl topographisch als auch optisch - besser als 16 nm demonstriert. Gemessene Fluoreszenzmuster zeigen Details mit nur 10 nm Halbwertsbreite - ein in der Fluoreszenzmikroskopie bisher unerreichter Wert. Zwei 12 nm voneinander entfernt liegende Farbstoffmoleküle konnten sogar noch von einem einzelnen unterschieden und ihre Position ermittelt werden. Das optische und topographische Bild sind im Rahmen der Auflösung nicht gegeneinander verschoben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Modellrechnungen durchgeführt, mit denen die in Einzelmolekülbildern zu erkennenden Strukturen qualitativ erklärt werden können. Im "Antennenmodell" wurden an einer idealisierten, aber in den wesentlichen Eigenschaften der realen Sonde entsprechenden Geometrie die elektromagnetischen Felder mit Hilfe einer Variante der Multiple-Multipol-Methode berechnet. Da diese Rechnungen sehr viel Zeit beanspruchen, wurde auch ein sehr stark vereinfachtes Modell eingeführt, das den Intensitätsverlauf bei Einzelmolekülabbildungen zwar nur grob wiedergibt, aber sehr viel schnellere Rechnungen erlaubt. Durch Anpassen der Parameter dieser Modellrechnung an die gemessenen Einzelmolekülbilder kann die laterale Position der Einzelmoleküle im optischen Bild auf 1 nm genau bestimmt werden. Ebenso erhält man dabei die Orientierung der Einzelmoleküle.

In dieser Arbeit sind somit die Grundlagen für hochauflösende Rasternahfeldfluoreszenzmikroskopie mit gleichzeitiger hoher topographischer Auflösung gelegt. Die Kombination zweier unabhängiger Signale erhöht die Aussagekraft der Messung weit über die Aussagekraft der Einzelmessungen hinaus. Die hervorragenden Eigenschaften der neuen Sonde eröffnen dabei ganz neue Möglichkeiten für Einzelmolekülexperimente, insbesondere in der Strukturbiologie.

Literatur

- [1] S. Weiss, *Fluorescence Spectroscopy of Single Biomolecules*. Science **283**, 1676-1683 (1999).
- [2] A. D. Mehta, M. Rief, J. A. Spudich, D. A. Smith und R. M. Simmons, *Single Biomechanics with Optical Methods*. Science **283**, 1689-1695 (1999).
- [3] H. F. Hamann, *Prospects for molecular spectroscopy at high spatial resolution*. Zeitschrift für Physikalische Chemie International Journal of Research in Physical Chemistry & Chemical Physics **215**, 1025-1042 (2001).
- [4] B. Hecht, B. Sick, U. P. Wild, V. Deckert, R. Zenobi, O. J. F. Martin und D. W. Pohl, *Scanning near-field optical microscopy with aperture probes: Fundamentals and applications*. Journal of Chemical Physics **112**, 7761-7774 (2000).
- [5] S. W. Hell, M. Schrader und H. T. M. Vandervoort, *Far-field fluorescence microscopy with 3-dimensional resolution in the 100-nm range*. Journal of Microscopy-Oxford **187**, 1-7 (1997).
- [6] E. H. Synge, *A suggested method for extending microscopic resolution into the ultra-microscopic region*. Philos. mag. **6**, 356-653 (1928).
- [7] D. W. Pohl, S. M. Denk und M. Lanz, *Optical stethoscopy: image recording with resolution $l/20$* . Applied Physics Letters **44**, 651-653 (1984).
- [8] A. Lewis, M. Isaacson, A. Harootunian und A. Muray, *Development of a 500 Å spatial resolution light microscope*. Ultramicroscopy **13**, 227-232 (1984).
- [9] L. Novotny und C. Hafner, *Light propagation in a cylindrical waveguide with a complex, metallic, dielectric function*. Physical Review E **50**, 4094-4106 (1994).
- [10] T. I. Kuznetsova und V. S. Lebedev, *Structure of light waves in a waveguide tapered to subwavelength transverse size*. Quantum Electronics **32**, 727-737 (2002).
- [11] H. A. Bethe, *Theory of diffraction by small holes*. The Physical Review **66**, 163-182 (1944).
- [12] C. J. Bouwkamp, *On Bethe's theory of diffraction by small holes*. Philips Res. Rep. **5**, 321-332 (1950).
- [13] E. Betzig und R. J. Chichester, *Single molecules observed by near-field scanning optical microscopy* Science **262**, 1422-1425 (1993).
- [14] A. Roberts: *Theoretical considerations associated with near-field scanning by subwavelength apertures*. edn. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht/ Netherlands; 1993.
- [15] L. Novotny, D. W. Pohl und B. Hecht, *Light confinement in scanning near-field optical microscopy*. Ultramicroscopy **61**, 1-9 (1995).
- [16] A. Castiaux, C. Girard, M. Spajer und S. Davy, *Near-field optical effects inside a photosensitive sample coupled with a snom tip*. Ultramicroscopy **71**, 49-58 (1998).
- [17] A. Drezet, J. C. Woehl und S. Huant, *Extension of Bethe's diffraction model to conical geometry: Application to near-field optics*. Europhysics Letters **54**, 736-740 (2001).
- [18] A. Pack, M. Hietschold und R. Wannemacher, *Propagation of femtosecond light pulses through near-field optical aperture probes*. Ultramicroscopy **92**, 251-264 (2002).
- [19] C. Hoppener, D. Molenda, H. Fuchs und A. Naber, *Simultaneous topographical and optical characterization of near-field optical aperture probes by way of imaging fluorescent nanospheres*. Applied Physics Letters **80**, 1331-1333 (2002).
- [20] A. Naber, D. Molenda, U. C. Fischer, H. J. Maas, C. Hoppener, N. Lu und H. Fuchs, *Enhanced light confinement in a near-field optical probe with a triangular aperture - art. no. 210801*. Physical Review Letters **8921**, 801 (2002).

- [21] F. Zenhausern, M. P. Oboyle und H. K. Wickramasinghe, *Apertureless near-field optical microscope*. Applied Physics Letters **65**, 1623-1625 (1994).
- [22] L. Novotny, E. J. Sanchez und X. S. Xie, *Near-field optical imaging using metal tips illuminated by higher-order hermite-gaussian beams*. Ultramicroscopy **71**, 21-29 (1998).
- [23] S. Kawata und Y. Inouye, *Scanning probe optical microscope using a metallic probe tip*. Ultramicroscopy **57**, 313-317 (1995).
- [24] F. Zenhausern, Y. Martin und H. K. Wickramasinghe, *Scanning interferometric apertureless microscopy - optical imaging at 10 angstrom resolution*. Science **269**, 1083-1085 (1995).
- [25] R. Hillenbrand und F. Keilmann, *Material-specific mapping of metal/semiconductor/dielectric nanosystems at 10 nm resolution by backscattering near-field optical microscopy*. Applied Physics Letters **80**, 25-27 (2002).
- [26] R. Hillenbrand und F. Keilmann, *Optical oscillation modes of plasmon particles observed in direct space by phase-contrast near-field microscopy*. Applied Physics B-Lasers & Optics **73**, 239-243 (2001).
- [27] G. Wurtz, R. Bachelot und P. Royer, *Imaging a GaAlAs laser diode in operation using apertureless scanning near-field optical microscopy*. European Physical Journal-Applied Physics **5**, 269-275 (1999).
- [28] M. Labardi, S. Patane und M. Allegrini, *Artifact-free near-field optical imaging by apertureless microscopy*. Applied Physics Letters **77**, 621-623 (2000).
- [29] R. Hillenbrand, B. Knoll und F. Keilmann, *Pure optical contrast in scattering-type scanning near-field microscopy*. Journal of Microscopy **202**, 77-83 (2001).
- [30] M. F. Garcia-Parajo, J. A. Veerman, R. Bouwhuis, R. Vallee und N. F. van Hulst, *Optical probing of single fluorescent molecules and proteins*. Chemphyschem **2**, 347-360 (2001).
- [31] E. J. Sanchez, L. Novotny und X. S. Xie, *Near-field fluorescence microscopy based on two-photon excitation with metal tips*. Physical Review Letters **82**, 4014-4017 (1999).
- [32] R. C. Reddick, R. J. Warmack und T. L. Ferrell, *New form of scanning optical microscopy*. Physical Review B **39**, 767-770 (1989).
- [33] R. Eckert, J. M. Freyland, H. Gersen, H. Heinzelmann, G. Schurmann, W. Noell, U. Staufer und N. F. de Rooij, *Near-field fluorescence imaging with 32 nm resolution based on microfabricated cantilevered probes*. Applied Physics Letters **77**, 3695-3697 (2000).
- [34] O. Sqalli, M. P. Bernal, P. Hoffmann und F. Marquis-Weible, *Improved tip performance for scanning near-field optical microscopy by the attachment of a single gold nanoparticle*. Applied Physics Letters **76**, 2134-2136 (2000).
- [35] U. C. Fischer: *The tetrahedral tip as a probe for scanning near-field optical microscopy*, edn. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht/ Netherlands; 1993.
- [36] J. Michaelis, C. Hettich, J. Mlynek und V. Sandoghdar, *Optical microscopy using a single-molecule light source*. Nature **405**, 325-328 (2000).
- [37] K. Karrai und I. Tiemann, *Interfacial shear force microscopy*. Physical Review B **62**, 13174-13181 (2000).
- [38] P. K. Wei und W. S. Fann, *The effect of humidity on probe-sample interactions in near-field scanning optical microscopy*. Journal of Applied Physics **87**, 2561-2564 (2000).
- [39] P. J. James, M. Antognozzi, J. Tamayo, T. J. McMaster, J. M. Newton und M. J. Miles, *Interpretation of contrast in tapping mode AFM and shear force microscopy. A study of nafion*. Langmuir **17**, 349-360 (2001).

- [40] M. Antognozzi, M. D. Szczelkun, A. N. Round und M. J. Miles, *Comparison between shear force and tapping afm - high resolution imaging of DNA*. *Single Molecules* **3**, 105-110 (2002).
- [41] V. V. Polonski, Y. Yamamoto, J. D. White, M. Kourogi und M. Ohtsu, *Vacuum shear force microscopy application to high resolution work*. *Japanese Journal of Applied Physics Part 2-Letters* **38**, L826-L829 (1999).
- [42] M. Schuttler, M. Leuschner, M. Lippitz, W. W. Ruhle und H. Giessen, *Towards the origin of the shear force in near-field microscopy*. *Japanese Journal of Applied Physics Part 1-Regular Papers Short Notes & Review Papers* **40**, 813-818 (2001).
- [43] A. Kramer, J. M. Segura, A. Hunkeler, A. Renn und B. Hecht, *A cryogenic scanning near-field optical microscope with shear-force gapwidth control*. *Review of Scientific Instruments* **73**, 2937-2941 (2002).
- [44] I. I. Smolyaninov, W. A. Atia, S. Pilevar und C. C. Davis, *Experimental-study of probe-surface interaction in near-field optical microscopy*. *Ultramicroscopy* **71**, 177-182 (1998).
- [45] D. A. Lapshin, E. E. Kobylkin und V. S. Letokhov, *Shear force distance control in near-field optical microscopy: experimental evidence of the frictional probe-sample interaction*. *Ultramicroscopy* **83**, 17-23 (2000).
- [46] R. D. Grober, J. Acimovic, J. Schuck, D. Hessman, P. J. Kindlemann, J. Hespanha, A. S. Morse, K. Karrai, I. Tiemann und S. Manus, *Fundamental limits to force detection using quartz tuning forks*. *Review of Scientific Instruments* **71**, 2776-2780 (2000).
- [47] E. Betzig, P. L. Finn und J. S. Weiner, *Combined shear force and near-field scanning optical microscopy*. *Applied Physics Letters* **60**, 2484-2486 (1992).
- [48] R. Toledocrow, P. C. Yang, Y. Chen und M. Vaeziravani, *Near-field differential scanning optical microscope with atomic force regulation*. *Applied Physics Letters* **60**, 2957-2959 (1992).
- [49] K. Karrai und R. D. Grober, *Piezoelectric tip-sample distance control for near-field optical microscopes*. *Applied Physics Letters* **66**, 1842-1844 (1995).
- [50] X. Zhu, G. S. Huang, H. T. Zhou und Y. D. Dai, *A novel ultrasonic resonance sample tip distance regulation for near-field optical microscopy and shear force microscopy*. *Solid State Communications* **98**, 661-664 (1996).
- [51] Y. H. Chuang, C. J. Wang, J. Y. Huang und C. L. Pan, *Nonoptical tip sample distance control for scanning near- field optical microscopy*. *Applied Physics Letters* **69**, 3312-3314 (1996).
- [52] M. Lippitz, M. Schuttler, H. Giessen, M. Born und W. W. Ruhle, *Bandwidth enhancement of a shear-force-controlled distance regulation in near-field microscopy*. *Journal of Applied Physics* **86**, 100-106 (1999).
- [53] C. L. Jahncke und H. D. Hallen, *Stabilizing wide bandwidth, tuning fork detected force feedback with nonlinear interactions*. *Journal of Applied Physics* **93**, 1274-1282 (2003).
- [54] W. H. J. Rensen, N. F. van Hulst und S. B. Kammer, *Imaging soft samples in liquid with tuning fork based shear force microscopy*. *Applied Physics Letters* **77**, 1557-1559 (2000).
- [55] L. F. Lee, R. D. Schaller, L. H. Haber und R. J. Saykally, *High spatial resolution imaging with near-field scanning optical microscopy in liquids*. *Analytical Chemistry* **73**, 5015-5019 (2001).
- [56] P. Lambelet, M. Pfeffer, A. Sayah und F. Marquisweible, *Reduction of tip-sample interaction forces for scanning near- field optical microscopy in a liquid environment*. *Ultramicroscopy* **71**, 117-121 (1998).

- [57] L. A. Gheber, J. Hwang und M. Edidin, *Design and optimization of a near-field scanning optical microscope for imaging biological samples in liquid*. Applied Optics **37**, 3574-3581 (1998).
- [58] E. Betzig, J. K. Trautmann, T. D. Harris, J. S. Weiner und R. L. Kostelak, *Breaking the Diffraction Barrier: Optical Microscopy on a Nanometer Scale*. Science **251**, 1468-1470 (1991).
- [59] G. A. Valaskovic, M. Holton und G. H. Morrison, *Parameter control, characterization, and optimization in the fabrication of optical-fiber near-field probes*. Applied Optics **34**, 1215-1228 (1995).
- [60] T. Pangaribuan, K. Yamada, S. D. Jiang, H. Ohsawa und M. Ohtsu, *Reproducible fabrication technique of nanometric tip diameter fiber probe for photon scanning tunneling microscope*. Japanese Journal of Applied Physics Part 2-Letters **31**, L1302-1304 (1992).
- [61] R. Stockle, C. Fokas, V. Deckert, R. Zenobi, B. Sick, B. Hecht und U. P. Wild, *High-quality near-field optical probes by tube etching*. Applied Physics Letters **75**, 160-162 (1999).
- [62] M. N. Islam, X. K. Zhao, A. A. Said, S. S. Mickel und C. F. Vail, *High-efficiency and high-resolution fiberoptic probes for near-field imaging and spectroscopy*. Applied Physics Letters **71**, 2886-2888 (1997).
- [63] T. Saiki, S. Mononobe, M. Ohtsu, N. Saito und J. Kusano, *Tailoring a high-transmission fiber probe for photon scanning tunneling microscope*. Applied Physics Letters **68**, 2612-2614 (1996).
- [64] A. Sayah, C. Philipona, P. Lambelet, M. Pfeffer und F. Marquisweible, *Fiber tips for scanning near-field optical microscopy fabricated by normal and reverse etching*. Ultramicroscopy **71**, 59-63 (1998).
- [65] T. Held, S. Emonin, O. Marti und O. Hollricher, *Method to produce high-resolution scanning near-field optical microscope probes by beveling optical fibers*. Review of Scientific Instruments **71**, 3118-3122 (2000).
- [66] H.-J. Hagemann, W. Gudat und C. Kunz, *Optical Constants from the Far Infrared to the X-Ray region: Mg, Al, Cu, Ag, Au, Bi, C, and Al₂O₃*. Deutsches Elektron-Synchrotron DESY **SR-74/7**, (1974).
- [67] C. W. Hollars und R. C. Dunn, *Evaluation of thermal evaporation conditions used in coating aluminum on near-field fiberoptic probes*. Review of Scientific Instruments **69**, 1747-1752 (1998).
- [68] J. A. Veerman, A. M. Otter, L. Kuipers und N. F. Vanhulst, *High-definition aperture probes for near-field optical microscopy fabricated by focused ion-beam milling*. Applied Physics Letters **72**, 3115-3117 (1998).
- [69] K. I. Schiffmann, *Investigation of fabrication parameters for electron-beam-induced deposition of contaminaton tips used in atomic force microscopy*. Nanotechnology **4**, 163-169 (1993).
- [70] G. Janchen, P. Hoffmann, A. Kriele, H. Lorenz, A. J. Kulik und G. Dietler, *Mechanical properties of high-aspect-ratio atomic-force microscope tips*. Applied Physics Letters **80**, 4623-4625 (2002).
- [71] M. Wendel, H. Lorenz und J. P. Kotthaus, *Sharpened electron-beam deposited tips for high-resolution atomic-force microscope lithography and imaging*. Applied Physics Letters **67**, 3732-3734 (1995).
- [72] H. G. Frey, F. Keilmann, A. Kriele und R. Guckenberger, *Enhancing the resolution of scanning near-field optical microscopy by a metal tip grown on an aperture probe*. Applied Physics Letters **81**, 5030-5032 (2002).
- [73] F. Vargas, O. Hollricher, O. Marti, G. de Schaetzen und G. Tarrach, *Influence of protective layers on the blinking of fluorescent single molecules observed by confocal*

- microscopy and scanning near field optical microscopy*. Journal of Chemical Physics **117**, 866-871 (2002).
- [74] J. Enderlein, *Single-molecule fluorescence near a metal layer*. Chemical Physics **247**, 1-9 (1999).
- [75] A. Bouhelier, M. Beversluis, A. Hartschuh und L. Novotny, *Near-Field Second-Harmonic Generation Induced by Local Field Enhancement*. Physical Review Letters **90**, 013903 (2003).
- [76] R. Hillenbrand und F. Keilmann, *Complex optical constants on a subwavelength scale*. Physical Review Letters **85**, 3029-3032 (2000).
- [77] H. F. Hamann, A. Gallagher und J. Nesbitt, *Near-field fluorescence imaging by localized field enhancement near a sharp probe tip*. Applied Physics Letters **76**, 1953-1955 (2000).
- [78] P. K. Wei, H. L. Chou und W. S. Fann, *Optical near field in nanometallic slits*. Optics Express **10**, 1418-1424 (2002).
- [79] J. A. Veerman, M. F. GarciaParajo, L. Kuipers und N. F. VanHulst, *Single molecule mapping of the optical field distribution of probes for near-field microscopy*. Journal of Microscopy-Oxford **194**, 477-482 (1999).
- [80] N. F. van Hulst, J. A. Veerman, M. F. Garcia-Parajo und L. Kuipers, *Analysis of individual (macro)molecules and proteins using near-field optics*. Journal of Chemical Physics **112**, 7799-7810 (2000).
- [81] L. Novotny, *Single molecule fluorescence in inhomogeneous environments*. Applied Physics Letters **69**, 3806-3808 (1996).
- [82] V. V. Klimov, M. Ducloy und V. S. Letokhov, *A model of an apertureless scanning microscope with a prolate nanospheroid as a tip and an excited molecule as an object*. Chemical Physics Letters **358**, 192-198 (2002).
- [83] R. R. Chance, A. Prock und R. Silbey, *Lifetime of an emitting molecule near a partially reflecting surface*. Journal of Chemical Physics **60**, 2744-2748 (1974).
- [84] Katalog von Quantum Dot Vision, Seite 5
- [85] B. Knoll und F. Keilmann, *Enhanced dielectric contrast in scattering-type scanning near-field optical microscopy*. Optics Communications **182**, 321-328 (2000).
- [86] M. A. Bopp, A. J. Meixner, G. Tarrach, I. Zschokke-Granacher und L. Novotny, *Direct imaging single molecule diffusion in a solid polymer host*. Chemical Physics Letters **263**, 721-726 (1996).
- [87] A. G. T. Ruiter, J. A. Veerman, M. F. GarciaParajo und N. F. Vanhulst, *Single-molecule rotational and translational diffusion observed by near-field scanning optical microscopy*. Journal of Physical Chemistry A **101**, 7318-7323 (1997).
- [88] X. Michalet, T. D. Lacoste und S. Weiss, *Ultra-high-Resolution Colocalization of Spectrally Separable Point-like Fluorescent Probes*. Methods **25**, 87-102 (2001).
- [89] T. Ha, *Single-Molecule Fluorescence Resonance Energy Transfer*. Methods **25**, 78-86 (2001).
- [90] T. Ha, T. Enderle, D. F. Ogletree, D. S. Chemla, P. R. Selvin und 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. USA **93**, 6264-6268 (1996).
- [91] W. Nolting, *Grundkurs: Theoretische Physik. 3 Elektrodynamik*, Verlag Zimmermann-Neufang, 340
- [92] V. V. Klimov, M. Ducloy und V. S. Letokhov, *Spontaneous emission of an atom in the presence of nanobodies*. Quantum Electronics **31**, 569-586 (2001).

Eigene Publikationen zum Thema der Dissertation

Heinrich G. Frey, Fritz Keilmann, Armin Kriele und Reinhard Guckenberger

Enhancing the resolution of scanning near-field optical microscopy by a metal tip grown on an aperture probe.

Applied Physics Letters **81**, 5030-5032 (2002)

Heinrich G. Frey, Susanne Witt, Karin Felderer und Reinhard Guckenberger

High resolution imaging of single fluorescent molecules with the optical near-field of a metal tip.

eingereicht 2004

Anhang 1

Herleitung der Signalübertragung einer Quarzgabel aus dem Ersatzschaubild

Die Bezeichnung der Größen ist wie in Kapitel 4.2.

Im angenäherten Zustand wirken konservative Kräfte und dämpfende Kräfte auf die Quarzgabel. Die konservative Kraft F_k bewirkt eine Änderung Δk der Federkonstante k_0 und die dämpfende Kraft F_d eine Änderung ΔR der Dämpfungskonstante R_0 . Daher lautet die Differentialgleichung im angenäherten Zustand:

$m\ddot{x} + \Delta k + kx = F + F_d + F_k = F + \Delta R \dot{x} + \Delta k x$. Dabei ist F ist die Kraft, die die Quarzgabel zur Schwingung anregt.

Hier soll hergeleitet werden, wie sich bei einer Quarzgabel eine harmonische Änderung der Federkonstante bzw. der Dämpfung als Signal auf die Ausgänge des Lock-In-Verstärkers übertragen.

Obige Differentialgleichung übertragen ins Ersatzschaubild der Quarzgabel:

$$L\ddot{Q} + R\dot{Q} + \frac{1}{C}Q = U + \Delta R \dot{Q} + \Delta \frac{1}{C}Q \quad (1)$$

Dabei ist die dämpfende Kraft $F_d = \Delta R \dot{x} = \Delta \frac{R}{L} \dot{Q}$ und die konservative Kraft

$$F_k = \Delta k x = \Delta \frac{Q}{C}.$$

Für harmonische Änderungen der Dämpfung und der Federkonstante gilt:

$$\Delta R = r \cdot \cos(\omega t + \varphi) \quad \text{und} \quad \Delta \frac{1}{C} = \frac{1}{C} \cdot \cos(\omega t + \varphi). \quad (2)$$

Die durch die Änderung der Dämpfung und Federkonstante verursachten Signale gehen in (1) wie eine Änderung der Anregungsspannung ein. Deshalb wird formal eine Gesamtanregung $U_{ges}(t)$ eingeführt.

$$U_{ges}(t) = U(t) + \Delta R \dot{Q}(t) + \Delta \frac{1}{C} Q(t) = U(t) + (r \dot{Q}(t) + \frac{1}{C} Q(t)) \cdot \cos(\omega t + \varphi).$$

(3) Für kleine Kräfte sind r und $\frac{1}{C}$ klein und die Anregung $U(t) = U \cdot e^{i\omega t}$ ist betragsmäßig der größte Summand. Durch die Multiplikation mit $\cos(\omega t + \varphi)$ erzeugen die hinteren beiden Summanden Seitenbänder im Frequenzspektrum, so daß U_{ges} von folgender Form ist:

$$U_{ges}(t) = \sum_{k \in \mathbb{Z}} U_k \cdot e^{i(\omega + k\omega)t}. \quad (4)$$

Dabei ist $U_0 = U$. (5)

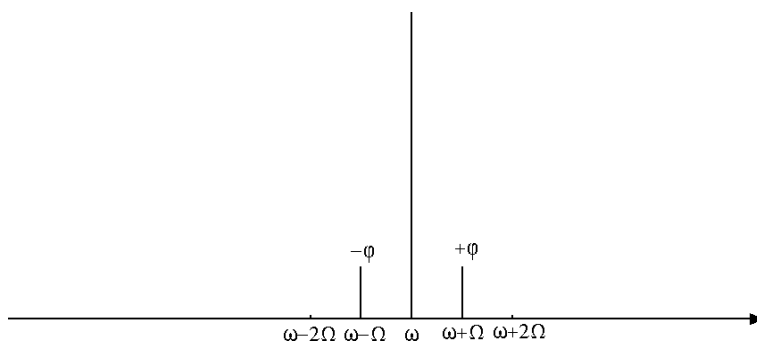


Abb. A1.1 Das schematische Frequenzspektrum von U_{ges} beispielhaft für $r \ll \omega$ und $\frac{1}{C} = 0$. An die Seitenbänder 1. Ordnung ist die jeweilige Phase geschrieben.

Da die linke Seite von (1) wie bei der Differentialgleichung einer Quarzgabel ohne Störung ist, können die einzelnen Frequenzkomponenten des Stroms einfach mit

$$I_k = \frac{U_k}{Z(\omega + k\Omega)} \quad \text{mit} \quad Z(\omega) = R + i\left(\omega L - \frac{1}{\omega C}\right) \quad (6)$$

für die einzelnen Frequenzkomponenten U_k der effektiven Gesamtanregung U_{ges} ausgerechnet werden.

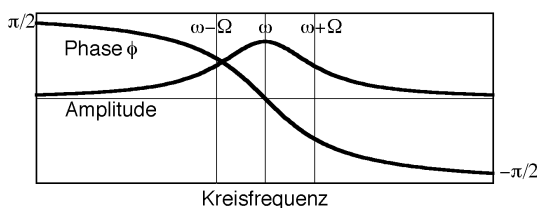


Abb. A1.2 Der Frequenzabhängigkeit von $\frac{1}{Z}$. Die vertikalen Striche entsprechen den wichtigsten Frequenzkomponenten von U_{ges} bei einer Anregung in der Resonanzfrequenz.

Der Strom hat also auch die Form

$$I(t) = \sum_{k \in \mathbb{Z}} I_k \cdot e^{i(\omega + k\Omega)t}. \quad (7)$$

$$\text{Dabei ist } I_0 \approx \frac{U}{Z(\omega)}. \quad (8)$$

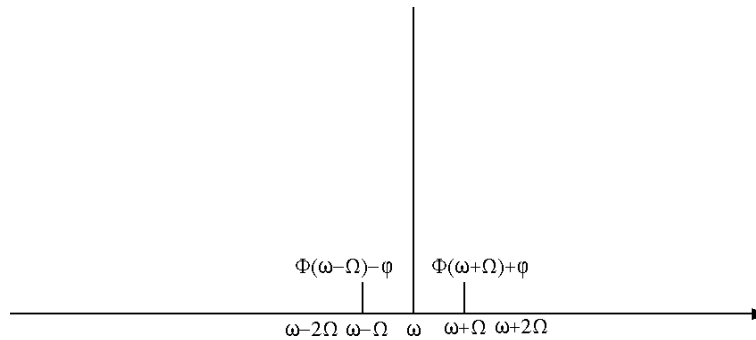


Abb. A1.3 Das schematische Frequenzspektrum von I beispielhaft für $r \ll \Omega$ und $\frac{1}{c} = 0$. An die Seitenbänder 1. Ordnung ist die jeweilige Phase geschrieben. Dieses Schaubild ergibt sich als punktweises Produkt des Frequenzgangs aus Abb. A1.2 mit dem Spektrum aus Abb. A1.1.

Aus (2), (3), (4) und (7) folgt

$$\sum_{k \in \mathbb{Z}} U_k \cdot e^{i(\Omega + k\Omega)t} = U \cdot e^{i\Omega t} \cos(\Omega t + \varphi) \cdot \sum_{k \in \mathbb{Z}} \left(r + \frac{1}{i(\Omega + k\Omega)c} \right) \cdot I_k \cdot e^{i(\Omega + k\Omega)t}.$$

$$\text{Also } U_k = \sum_{k,0} \cdot U \cdot \frac{1}{2} \left(\left(r + \frac{1}{i(\Omega + (k-1)\Omega)c} \right) I_{k-1} e^{+i\Omega} + \left(r + \frac{1}{i(\Omega + (k+1)\Omega)c} \right) I_{k+1} e^{+i\Omega} \right) \quad (9)$$

(6) und (9) ergeben zusammen:

$$I_k = \frac{\sum_{k,0} \cdot U \cdot \frac{1}{2} \left(\left(r + \frac{1}{i(\Omega + (k-1)\Omega)c} \right) I_{k-1} e^{+i\Omega} + \left(r + \frac{1}{i(\Omega + (k+1)\Omega)c} \right) I_{k+1} e^{+i\Omega} \right)}{Z(\Omega + k\Omega)} \quad (10)$$

Da die I_k mit wachsendem k stark abnehmen, kann man I_l näherungsweise berechnen, indem

man $I_0 \approx \frac{U}{Z(\Omega)}$ einsetzt und $I_{k+1} \approx 0$ setzt.

$$I_{\pm 1} \approx \frac{\frac{1}{2} \left(r + \frac{1}{i\Omega c} \right) \cdot I_0 e^{\pm i\Omega}}{Z(\Omega \pm \Omega)}$$

$$I(t) \approx \frac{U}{Z(\Omega)} \cdot \left(\frac{1}{2} \left(r + \frac{1}{i\Omega c} \right) \frac{1}{Z(\Omega + \Omega)} \cdot e^{i(\Omega + \Omega)t} + \frac{1}{2} \left(r + \frac{1}{i\Omega c} \right) \frac{1}{Z(\Omega - \Omega)} \cdot e^{i(\Omega - \Omega)t} \right) e^{i\Omega t}$$

Im Lock-In-Verstärker wird das X-Signal durch Multiplikation von $I(t)$ mit $\cos(\Omega t)$ und das Y-Signal durch Multiplikation von $I(t)$ mit $\sin(\Omega t)$ erzeugt. Dabei sind hier nur die entstehenden niederfrequenten Komponenten von Interesse.

$$X(t) \approx \frac{U}{2 \cdot Z(\Omega)} \cdot \left(\frac{1}{2} \left(r + \frac{1}{i\Omega c} \right) \frac{1}{Z(\Omega + \Omega)} \cdot e^{i(\Omega + \Omega)t} + \frac{1}{2} \left(r + \frac{1}{i\Omega c} \right) \frac{1}{Z(\Omega - \Omega)} \cdot e^{i(\Omega - \Omega)t} \right) + \dots$$

$$Y(t) \approx \frac{U}{2 \cdot i \cdot Z(\Omega)} \cdot \left(\frac{1}{2} \left(r + \frac{1}{i\Omega c} \right) \frac{1}{Z(\Omega + \Omega)} \cdot e^{i(\Omega + \Omega)t} - \frac{1}{2} \left(r + \frac{1}{i\Omega c} \right) \frac{1}{Z(\Omega - \Omega)} \cdot e^{i(\Omega - \Omega)t} \right) + \dots$$

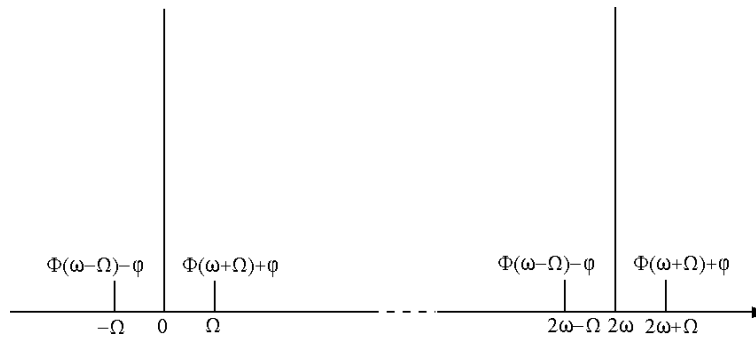


Abb. A1.4 Frequenzspektrum nach Multiplikation des Spektrums aus Abb. A1.3 mit $\cos(\Delta t)$. Der hochfrequente Anteil spielt bei der weiteren Datenverarbeitung keine Rolle. Das Signal des X-Ausgangs ist für dieses Beispiel also eine Konstante plus ein harmonischer Anteil der Phase $[\Delta t + \varphi]$.

$\omega_0 = \sqrt{\frac{1}{LC}}$ ist die Resonanzfrequenz der Leitfähigkeit $\frac{1}{Z(\omega)}$ der Quarzgabel. Für $\omega \ll \omega_0$ ist

$$Z(\omega_0 + \Delta) \approx R + i \frac{2\Delta}{\omega_0^2 C} \approx R(1 + i\sqrt{3} \frac{\Delta}{\omega_0 \frac{1}{2}}). \quad \text{Dabei ist } \omega_0 \frac{1}{2} = \frac{\sqrt{3}\omega_0^2 CR}{2} \quad \text{die halbe}$$

Halbwertsbreite der Resonanzkurve.

Daher erhält man für $\omega \ll \omega_0$:

$$\begin{aligned} X(t) &\approx \frac{U}{2 \cdot R} \cdot \left(1 \cdot \frac{R^{\text{Re}}}{1 + 3\left(\frac{\Delta}{\omega_0 \frac{1}{2}}\right)^2} \left(\frac{1}{2}\left(r + \frac{1}{i\omega_0 c}\right)\left(1 + i\sqrt{3} \frac{\Delta}{\omega_0 \frac{1}{2}}\right) \cdot e^{i(\Delta t + \varphi)} + \frac{1}{2}\left(r + \frac{1}{i\omega_0 c}\right)\left(1 + i\sqrt{3} \frac{\Delta}{\omega_0 \frac{1}{2}}\right) \cdot e^{i(\Delta t + \varphi)}\right)\right) \\ &= \frac{U}{2 \cdot R^2} \cdot \left(R \left(r + \frac{1}{i\omega_0 c}\right) \frac{1}{1 + 3\left(\frac{\Delta}{\omega_0 \frac{1}{2}}\right)^2} (\cos(\Delta t + \varphi) + \sqrt{3} \frac{\Delta}{\omega_0 \frac{1}{2}} \sin(\Delta t + \varphi))\right) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} Y(t) &\approx \frac{\omega U}{2 \cdot i \cdot R} \cdot \left(1 \cdot \frac{R^{\text{Re}}}{1 + 3\left(\frac{\Delta}{\omega_0 \frac{1}{2}}\right)^2} \left(\frac{1}{2}\left(r + \frac{1}{i\omega_0 c}\right)\left(1 + i\sqrt{3} \frac{\Delta}{\omega_0 \frac{1}{2}}\right) \cdot e^{i(\Delta t + \varphi)} + \frac{1}{2}\left(r + \frac{1}{i\omega_0 c}\right)\left(1 + i\sqrt{3} \frac{\Delta}{\omega_0 \frac{1}{2}}\right) \cdot e^{i(\Delta t + \varphi)}\right)\right) \\ &= \frac{U}{2 \cdot R^2} \cdot \left(iR \left(ir + \frac{1}{\omega_0 c}\right) \frac{1}{1 + 3\left(\frac{\Delta}{\omega_0 \frac{1}{2}}\right)^2} (\cos(\Delta t + \varphi) + \sqrt{3} \frac{\Delta}{\omega_0 \frac{1}{2}} \sin(\Delta t + \varphi))\right) \end{aligned}$$

Da nur der Realteil bei einer realen Messung auftritt, ist

$$X(t) = \frac{U}{2 \cdot R} \cdot \left(1 \cdot \frac{r}{R(1 + 3\left(\frac{\Delta}{\omega_0 \frac{1}{2}}\right)^2)} (\cos(\Delta t + \varphi) + \sqrt{3} \frac{\Delta}{\omega_0 \frac{1}{2}} \sin(\Delta t + \varphi))\right)$$

$$Y(t) = \frac{U}{2 \cdot R^2} \cdot \frac{1}{C} \frac{1}{\left(1 + 3\left(\frac{R}{\omega L}\right)^2\right)} (\cos(\omega t + \varphi)) \sqrt{3} \frac{R}{\omega L} \sin(\omega t + \varphi)$$

oder komplex ausgedrückt:

$$X(t) = \frac{U}{2 \cdot R} \cdot \left(1 - \frac{r}{R(1 + i\sqrt{3} \frac{R}{\omega L})} e^{i(\omega t + \varphi)}\right)$$

$$Y(t) = \frac{U}{2 \cdot R} \cdot \frac{1}{C} \frac{1}{R(1 + i\sqrt{3} \frac{R}{\omega L})} e^{i(\omega t + \varphi)}$$

Das Amplitudensignal des Lock-In-Verstärkers ist dann

$$A(t) = \sqrt{X^2(t) + Y^2(t)} = \frac{U}{2 \cdot R} \cdot \left(1 - \frac{r}{R(1 + i\sqrt{3} \frac{R}{\omega L})} e^{i(\omega t + \varphi)}\right) = X(t),$$

und das Phasensignal berechnet sich zu

$$\tan \varphi(t) = \frac{Y(t)}{X(t)} = \frac{1}{C} \cdot \frac{1}{R(1 + i\sqrt{3} \frac{R}{\omega L})} e^{i(\omega t + \varphi)} + \frac{1}{rC}$$

$$\varphi(t) = \tan \varphi(t) = \frac{1}{C} \cdot \frac{1}{R(1 + i\sqrt{3} \frac{R}{\omega L})} e^{i(\omega t + \varphi)}.$$

Alle Größen $X(t)$, $Y(t)$, $A(t)$ und $\varphi(t)$ haben also näherungsweise den Frequenzgang

$$\frac{1}{1 + i\sqrt{3} \frac{R}{\omega L}} \text{ eines einpoligen Tiefpaßfilters, } \frac{R}{\omega L} = \frac{\sqrt{3} \omega_0^2 CR}{2} = \frac{\sqrt{3} \omega_0^2 k}{2} = \frac{\omega_0}{2q} \text{ ist die}$$

Grenzfrequenz des Tiefpaßfilters. Dabei ist $q = \frac{1}{\sqrt{3} \omega_0 CR}$ der Q-Faktor der Resonanz.

Anhang 2

Spektrn der fluoreszierenden Kügelchen (Microspheres)

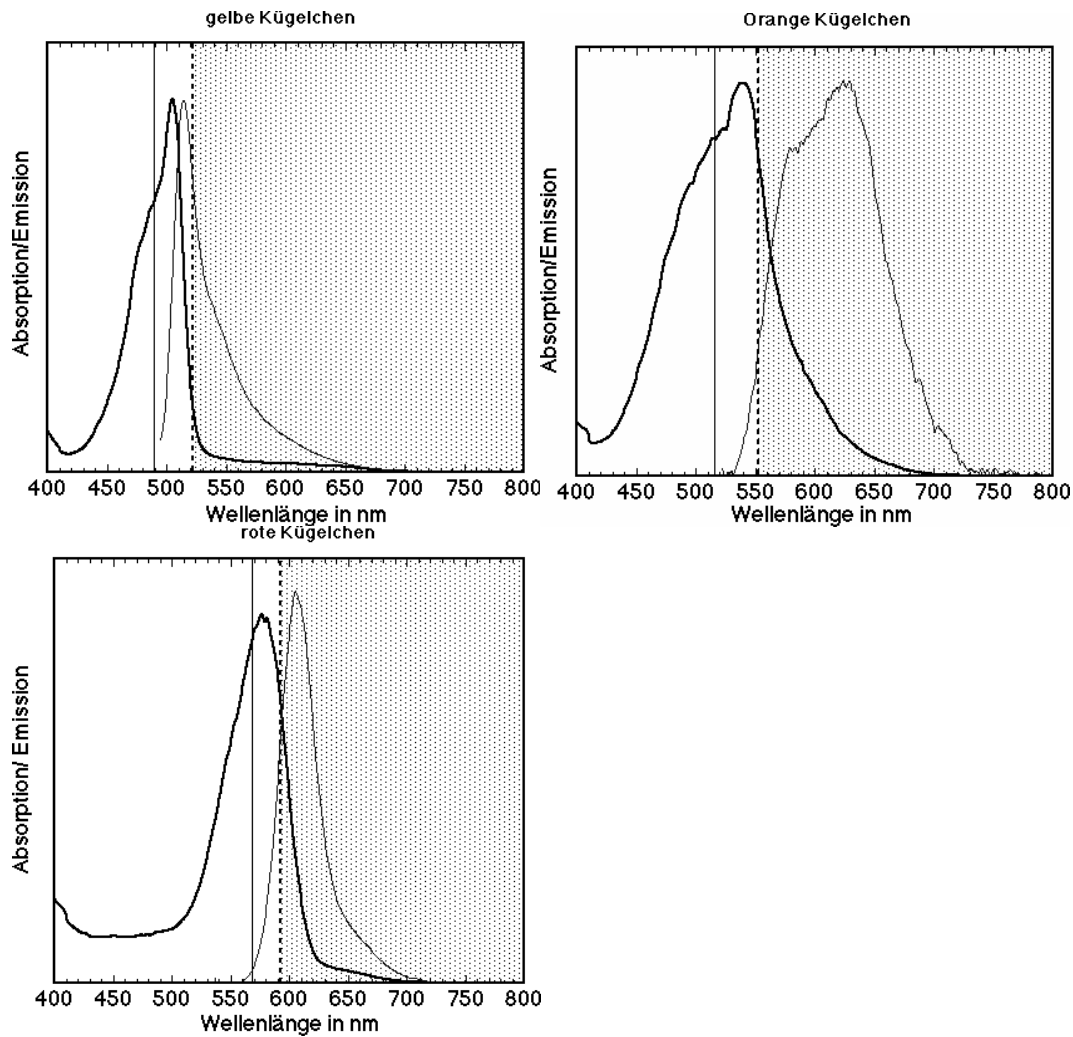


Abb. A2.1 Mit dem Fluoreszenzspektrometer gemessene Absorptions- und Emissionsspektren der Farbstoffe in den fluoreszierenden Kügelchen. Die zur Anregung verwendete Laserlinie ist als durchgezogener Strich eingetragen, der Durchlaßbereich der verwendeten Langpaßfilter als punktierte Fläche.

Anhang 3

Berechnung der Antennenfelder mit der Multiple-Dipol-Methode

In dieser Arbeit wurden die Felder einer Antenne berechnet, die homogen aus Aluminium besteht ($\epsilon_r = 34,5$ bei 96m , [66]) und die Form eines mit Halbkugeln abgeschlossenen Zylinders der Gesamtlänge 198m und mit 15m Radius hat. Verlangt man von der Lösung die entsprechende Spiegelsymmetrie so kann man dies auch als eine halb so lange Antenne verstehen, die auf einer ideal leitenden Metallfläche steht.

Die Felder außerhalb des Aluminiumstabes \vec{E}_2 bzw. \vec{H}_2 setzen sich aus zwei Anteilen zusammen: einem von dem Aluminiumstab unabhängigen von außen vorgegebenen Feld \vec{E}_v bzw. \vec{H}_v und dem vom Aluminiumstab als Reaktion auf das äußere Feld verursachten Feld \vec{E}_r bzw. \vec{H}_r : $\vec{E}_2 = \vec{E}_v + \vec{E}_r$ und $\vec{H}_2 = \vec{H}_v + \vec{H}_r$.

Die Felder \vec{E}_v bzw. \vec{H}_v werden durch elektrische Dipole entwickelt, die innerhalb des Stabes entlang der Oberfläche verteilt sind. Die Felder innerhalb des Stabes \vec{E}_1 bzw. \vec{H}_1 werden durch elektrische Dipole, die außerhalb des Stabes entlang der Oberfläche verteilt sind, entwickelt. Dabei wird zur Feldberechnung außerhalb des Stabes $\epsilon_r = 1$ gesetzt und zur Feldberechnung innerhalb des Stabes $\epsilon_r = 34,5$. In beiden Bereichen kann hier die Permeabilität mit $\mu = 1$ angenähert werden.

Das von einem harmonisch schwingenden Dipol \vec{p} erzeugte elektrische Feldstärke ist

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{1}{r^3} \left[\ddot{\vec{p}}(\vec{r} \times \vec{p}) \times \vec{r} + \left(\frac{3}{r^2} \vec{r}(\vec{r} \cdot \vec{p}) - \ddot{\vec{p}} \right) (1 - irk) \right] e^{i(kr - \omega t)}$$

und die magnetische Feldstärke

$$\vec{H}(\vec{r}, t) = \frac{u}{4\pi r^2} \left(1 - \frac{1}{ikr} \right) (\vec{r} \times \vec{p}) e^{i(kr - \omega t)},$$

wobei $k = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_r}$ und $u = \frac{c}{\sqrt{\epsilon_r}}$ [91].

Da die Maxwellgleichungen linear sind, ist die Summe von Lösungen der Maxwellgleichungen wieder eine Lösung und die Maxwellgleichungen sind automatisch innerhalb und außerhalb des Stabes erfüllt. Es müssen die Dipole nun so gewählt werden, daß die Randwertbedingungen

$$\vec{n} \cdot (\vec{E}_1 \times \vec{E}_2) = 0;$$

$$\vec{n} \cdot (\vec{H}_1 \times \vec{H}_2) = 0;$$

$$\vec{n} \cdot (\vec{E}_1 \times \vec{E}_2) = 0;$$

$$\vec{n} \cdot (\vec{H}_1 \times \vec{H}_2) = 0;$$

auf der ganzen Oberfläche möglichst gut erfüllt sind. Dabei ist \vec{n} der lokale Normalenvektor der Oberfläche.

Für die Rechnung ist es wichtig, mit möglichst wenigen Dipolen auszukommen, um den notwendigen Speicherplatz und die notwendige Rechenzeit klein zu halten.

Damit die Feldstärke an der Oberfläche nicht zu stark mit der Anordnung der Dipole variiert, sollte der Abstand zwischen benachbarten Dipolen höchstens ein Fünftel des Abstandes der Dipole zur Oberfläche betragen. Um den Speicher- und Rechenaufwand zu verkleinern, wird die Oberfläche in Parzellen eingeteilt, in denen alle Dipole die gleiche Größe und Ausrichtung haben. Jede Parzelle hat also 3 komplexe Parameter für die Dipole innerhalb des Stabes und 3 komplexe Parameter für die Dipole außerhalb des Stabes.

Über die Oberfläche werden Meßpunkte verteilt, an denen obige Randwertbedingungen erfüllt werden sollen. Jeder Meßpunkt bringt also 6 komplexe Bestimmungsgleichungen mit sich. Es ist günstig, ein überbestimmtes Gleichungssystem aufzustellen. Dadurch kann vermieden werden, daß die Randwertbedingungen an den Meßpunkten zwar exakt eingehalten werden, zwischen den Meßpunkten aber große Abweichungen von den Randwertbedingungen auftreten. Die Fehler an den Meßpunkten eines überbestimmten Systems lassen außerdem Rückschlüsse über die Fehler auf der ganzen Oberfläche zu. Hier wurden vier mal so viele Gleichungen wie zu bestimmende Parameter gewählt - das ergibt vier Meßpunkte pro Parzelle.

Für die Parzellengröße ist das Verhältnis des Abstandes zweier benachbarter Meßpunkte zum Abstand der Dipole von der Oberfläche wichtig. Ist das Verhältnis groß, so wirkt eine Parzelle hauptsächlich auf die zugehörigen Meßpunkte aber kaum auf Meßpunkte anderer Parzellen. Der Verlauf der Feldstärke an der Oberfläche ist dann stufenförmig von Parzelle zu Parzelle und nicht mehr gleichmäßig. Ist dagegen das Verhältnis klein, so wirkt eine Parzelle fast so stark auf die Meßpunkte benachbarter Parzellen wie auf die eigenen Meßpunkte. Es kann dann nur ein Feldverlauf mit kleinen Feldänderungen von Parzelle zu Parzelle entwickelt werden und das Gleichungssystem neigt dazu, singular zu werden. Ein Verhältnis im Bereich von 1 hat sich als günstig erwiesen - muß aber von Fall zu Fall optimiert werden.

Um mit wenigen Parzellen auszukommen, ist es günstig, die Parzellengröße dem erwarteten Feldverlauf anzupassen. In Bereichen, wo auf kurze Strecken große Feldänderungen erwartet

werden, muß die Größe der Parzellen klein gewählt werden - und entsprechend auch der Abstand der Dipole von der Oberfläche.

Ist sowohl die Geometrie des Objekts als auch das Feld E_{al} symmetrisch (bzw. E_{al} auch antisymmetrisch), so kann das Gleichungssystem entsprechend vereinfacht werden (bei einfacher Spiegelsymmetrie: halbe Zahl an Meßpunkten und halbe Zahl an Parametern).

Das elektrische Feld \vec{E} wird hier als symmetrisch zu einer Ebene mit dem Normalenvektor \hat{n} bezeichnet, wenn für alle Punkte \vec{r} gilt: $\vec{E}(\vec{r}') = \vec{E}(\vec{r}) + 2(\hat{n} \cdot \vec{E}(\vec{r}))\hat{n}$, wobei \vec{r}' der Spiegelpunkt von \vec{r} ist.

Das elektrische Feld \vec{E} wird als antisymmetrisch zu dieser Spiegelebene bezeichnet, wenn $\vec{E}(\vec{r}') = 2(\hat{n} \cdot \vec{E}(\vec{r}))\hat{n} - \vec{E}(\vec{r})$.

Zur Berechnung der Antennenfelder wurden folgende Symmetrien ausgenutzt:

- 1) Die Antenne soll eine Halbantenne auf einem Spiegel (xy-Ebene) aus einem idealen Leiter sein. Dann ist das elektrische Feld antisymmetrisch zur xy-Ebene.
- 2) Es werden hier nur Fälle betrachtet, bei denen das äußere Feld E_{al} spiegelsymmetrisch zur xz-Ebene ist. Dann ist auch die ganze Anordnung dazu symmetrisch.

Die Antenne wurde längs in 80 und entlang des Umfangs in 30 (der Oberfläche nach) gleich lange Parzellen eingeteilt. Wegen der Symmetrien braucht nur ein Ausschnitt von 40×15 Parzellen, also 600 Parzellen betrachtet werden. Eine Parzelle besteht hier aus 4×3 Dipolen (Um den Rechenaufwand zu verkleinern, kann die Zahl der Dipole in einer Parzelle auch variabel gemacht werden - abhängig vom Abstand des Punktes, an dem gerade das durch die Parzelle verursachte Feld berechnet wird. Für einen kleinen Abstand ist eine große Anzahl Dipole notwendig, für einen großen Abstand können weniger entsprechend stärker gewichtete Dipole verwendet werden.)

Folgendes Schaubild A3.1 zeigt die gewählte Verteilung der Meßpunkte und der Dipole längs einer halben Seite der Antenne.

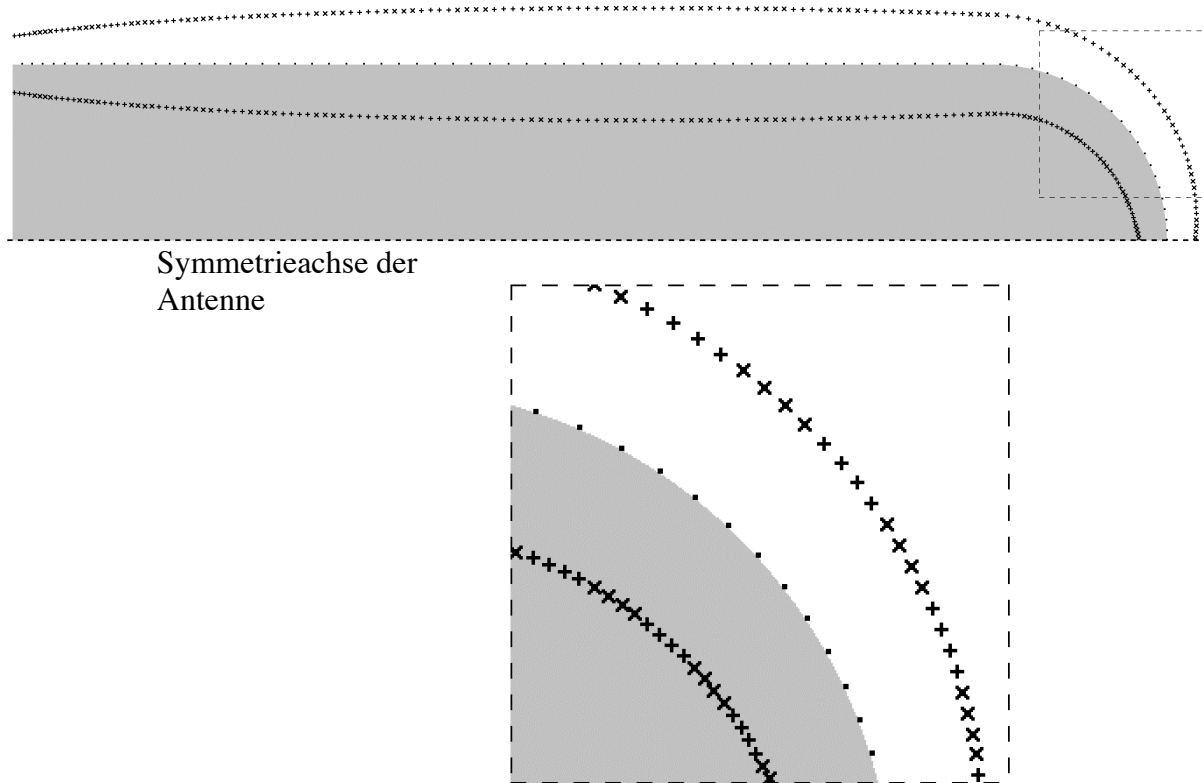


Abb. A3.1 Verteilung der Meßpunkte (Punkte) und der Dipole (stehende und gekippte Kreuze) längs der Antenne zur Berechnung der Felder bei der Beleuchtung durch das Nahfeld einer Apertur. Es ist nur ein Viertel des Querschnitts gezeigt. Der Innenraum der Antenne aus Aluminium ist grau gefärbt.

Immer 4 aufeinander folgende Dipole sind zu einer Parzelle zusammengefaßt - hier als eine Gruppe stehender bzw. gekippter Kreuze dargestellt. Um dies klar zu zeigen, ist der eingerahmte Ausschnitt auch 3-fach vergrößert gezeigt.

Da in Aperturnähe und im Spitzengebiet höhere Feldgradienten zu erwarten sind, sind dort die Meßpunkte dichter gewählt.

Es sind also $3 \cdot 100$ komplexe Parameter mit $14 \cdot 100$ Gleichungen zu bestimmen. Da jede komplexe Zahl 16 Byte Speicherplatz benötigt, ergibt dies eine Matrix von 829.44 Mega-Byte. Dieses Gleichungssystem wurde mit dem Programm Matlab 6.5 (Mathworks, Inc.) gelöst.

Anhang 4

Die Lebensdauer des angeregten Zustands eines Fluoreszenzmoleküls in der Nähe reflektierender Oberflächen

Zur Beschreibung der Änderung der Lebensdauer in der Nähe einer reflektierenden Oberfläche wird die klassische Herleitung von Chance [83] verwendet. Hier entspricht die Abklingdauer der Lebensdauer. Die quantenmechanische Rechnung kommt zum selben Ergebnis [92].

Eine schwingungsfähige, harmonisch gebundene Ladung wird durch folgende Differentialgleichung beschrieben:

$m\ddot{x} + d\dot{x} + kx = Ee$. Dabei ist E das auf die Ladung wirkende elektrische Feld. Dieses resultiert vom Licht, das vom Dipol selbst erzeugt und von den spiegelnden Flächen reflektiert wird.

Die Gleichung mit e/m multipliziert und $\varrho = ex$, $b = \frac{d}{m}$, $\varrho^2 = \frac{k}{m}$ eingesetzt:

$$\varrho + b\dot{\varrho} + \varrho^2 \varrho = \frac{e^2}{m} E(\varrho).$$

$$\varrho + b\dot{\varrho} + (\varrho^2 \varrho - \frac{e^2 E(\varrho)}{m\varrho}) \varrho = 0$$

Die Lösungen dieser Differentialgleichung haben die Form:

$\varrho = p \cdot e^{\varrho t}$. Diesen Ansatz eingesetzt ergibt:

$$\varrho^2 \varrho + b + (\varrho^2 \varrho - \frac{e^2 E(p)}{mp}) = 0$$

$$\varrho = \frac{1}{2}b \pm \frac{1}{2}\sqrt{b^2 - 4(\varrho^2 \varrho - \frac{e^2 E(p)}{mp})} = \frac{1}{2}b \pm i\varrho \sqrt{1 \pm \frac{b^2}{4\varrho^2} \pm \frac{e^2 E(p)}{\varrho^2 mp}}$$

Die beiden hinteren Summanden in der Wurzel sind betragsmäßig klein gegen 1, so daß die Wurzel entwickelt werden kann. Je nachdem, ob die Lösung ohne Dämpfung in $\varrho = p \cdot e^{i\varrho t}$ oder $\varrho = p \cdot e^{i\varrho t}$ übergehen soll, wird die entsprechende Lösung gewählt:

$$\varrho = \frac{1}{2}b \pm i\varrho \left(1 \pm \frac{b^2}{8\varrho^2} \pm \frac{e^2 E(p)}{2\varrho^2 mp} \right) = \frac{1}{2}b \pm \frac{e^2 \text{Im}(E(p))}{2\varrho mp} \pm i\varrho \left(\frac{b^2}{8\varrho} \pm \frac{e^2 \text{Re}(E(p))}{2\varrho mp} \right)$$

Mit $I_{\mu} |p|^2$ folgt für die Abklingzeit ϱ der emittierten Intensität:

$$\varrho^{\text{Ab}} = 2 \cdot \text{Re}(\varrho) = b \pm \frac{e^2}{\varrho mp} \text{Im}(E(p))$$

Die klassische Formel für die Strahlungsdämpfung ist:

$$b_s = 2 \frac{e^2 \omega^2 n}{3c^3 m}. \text{ Bei einer Quanteneffizienz } q \text{ ist die Gesamtdämpfung dann } b = \frac{2e^2 \omega^2 n}{3qc^3 m}.$$

Für einen Dipol mit fester Schwingungsrichtung ist E die Feldkomponente in Schwingungsrichtung.

$$\text{Für den Kehrwert der Lebensdauer ergibt sich: } \Gamma^{\square 1} = \frac{2e^2 \omega^2 n}{3qc^3 m} \pm \frac{e^2}{\square mp^2} \text{Im}(\vec{E}(p) \cdot \vec{p})$$

Die auf die freie Abstrahlungsdauer $b_s^{\square 1}$ normierte Lebensdauer:

$$T = \frac{b_s}{\Gamma^{\square 1}} = \frac{\frac{2e^2 \omega^2 n}{3c^3 m}}{\frac{2e^2 \omega^2 n}{3qc^3 m} \pm \frac{e^2 \text{Im}(\vec{E}(p) \cdot \vec{p})}{\square mp^2}} = \frac{q}{1 \pm \frac{3qc^3}{2\square^3 np^2} \text{Im}(\vec{E}(p) \cdot \vec{p})}$$

Anhang 5

Feldverlauf an der Metallspitze nach der Rechnung mit der Multiple-Dipol-Methode

Wie man in Abbildung 7.2 sehen kann, ist das Nahfeld in der Nähe einer kugelförmig endenden Spitze (siehe Abb. 6.10) näherungsweise radial. Nach Abbildung A5.1 fällt es mit ungefähr r^{-2} mit dem Abstand r zum Kugelmittelpunkt ab. Es kann daher gut durch das Feld einer Punktladung, die im Kugelmittelpunkt sitzt, simuliert werden. Die üblicherweise [75-77] beim aperturlosen SNOM verwendete Annäherung des Spitzenfeldes durch das Feld eines Punktdipols fällt dagegen mit der Abstandsabhängigkeit r^{-3} zu schnell ab (siehe Abb. A5.1).

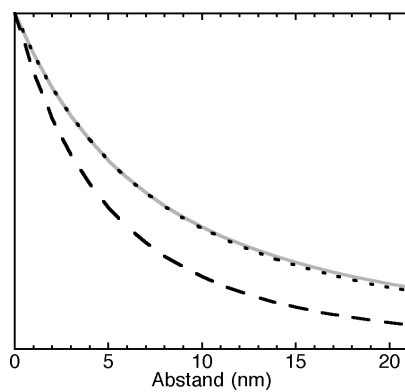


Abb. A5.1 Vergleich der elektrischen Feldkomponente $\text{Im}(E_z)$ auf der Symmetrieachse der Spitze im Antennenmodell (graue, durchgezogene Linie) und in der Punktladungsnäherung r^{-2} (punktiert) und der Dipolnäherung r^{-3} (gestrichelt).

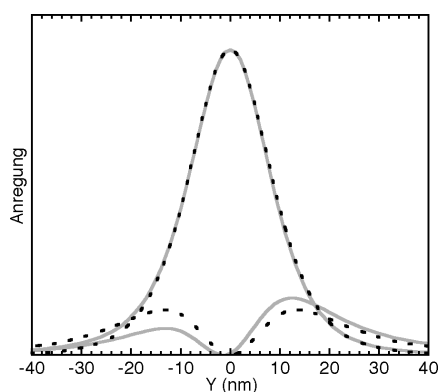


Abb. A5.2 Vergleich der berechneten Anregung für einen Farbstoff mit stehendem bzw. liegendem Dipolmoment nach dem Antennenmodell (graue, durchgezogene Linien) und dem Punktladungsmodell (punktierte Linien). Die im Antennenmodell berechneten Werte sind wegen der asymmetrischen Beleuchtung auch asymmetrisch.

Anhang 6

Spiegeldipole an Ebenen und Kugeln

Für Ebenen gilt in der Elektrostatik:

Die Oberfläche eines Körpers eines Materials der dielektrischen Funktion ϵ in einer Umgebung mit $\epsilon_0 = 1$ habe eine ebene Oberfläche, die durch eine Gleichung der Form $\hat{n} \cdot (\vec{r} - \vec{r}_0) = 0$ beschrieben wird. (Dabei ist $\hat{n} = \frac{\vec{n}}{n}$ der normierte Normalenvektor der Ebene).

Dann kann das Feld außerhalb des Körpers, das von einem Dipol \vec{p} außerhalb des Körpers an der Stelle \vec{r}_p herrührt, durch die Summe der Felder des Dipols \vec{p} und des Spiegeldipol

$\vec{p}' = (2(\hat{n} \cdot \vec{p})\hat{n} - \vec{p}) \frac{\epsilon - 1}{\epsilon + 1}$ an der Stelle $\vec{r}_{p'} = \vec{r}_p + 2((\vec{r}_0 - \vec{r}_p) \cdot \hat{n})\hat{n}$ berechnet werden. Das Feld im

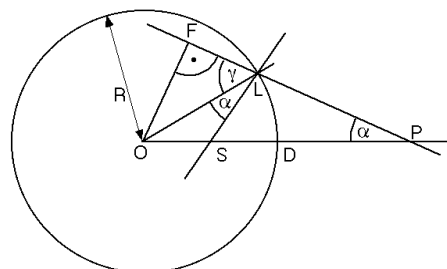
Körper läßt sich durch den Dipol $\vec{p}'' = \vec{p} \frac{2}{\epsilon + 1}$ an der Stelle \vec{r}_p beschreiben.

Da im Spitzenkugelmodell der Spiegeldipol an einer Kugel eine Rolle spielt, wird dieser kurz hergeleitet. Die Formel gilt exakt für Elektrostatik an einem Leiter, für Dielektrika ist sie nur eine Näherung. Zunächst wird die Formel für eine Spiegelladung hergeleitet, daraus folgt dann direkt die Formel für einen Spiegeldipol.

Das Feld außerhalb der Kugel wird durch die Summe des Feldes der eigentlichen Ladung und des Feldes einer Spiegelladung beschrieben. Das Feld innerhalb der Kugel ist näherungsweise das Feld einer verkleinerten Ladung am Ort der eigentlichen Ladung. An der Kugeloberfläche sollen die Randwertbedingungen erfüllt werden.

O sei der Mittelpunkt der Kugel mit Radius R . An der Stelle P mit $[OP] = r$ sei eine Punktladung. Es wird gezeigt, daß für eine Spiegelladung an der Stelle S mit $[OS] = \frac{R^2}{r}$ die

Randwertbedingungen (näherungsweise) erfüllt werden. L sei ein beliebiger Punkt auf der Kugeloberfläche, F die senkrechte Projektion von O auf die Gerade (PL) und D der Schnittpunkt der Strecke OP mit der Kugeloberfläche. Außerdem sei $\beta = \angle SLO$ und $\alpha = \angle OLF$.



Es ist $\frac{[OL]}{[OS]} = \frac{[OP]}{[OL]} = \frac{r}{R}$. Deshalb sind die Dreiecke OSL und OLP gespiegelt-ähnlich. (1)

Daher ist $\sphericalangle OPL = \sphericalangle SLO = \sphericalangle$. Also gilt für die Seite OF der rechtwinkligen Dreiecke OPF und OLF : $[OF] = [OP] \sin(\sphericalangle) = R \sin(\sphericalangle)$ und $[LF] = [OL] \sin(\sphericalangle) = r \sin(\sphericalangle)$. (2)

Wegen (1) ist $[SL] = \frac{[OS]}{[OL]} [PL] = \frac{R}{r} [PL] = \frac{R}{r} [PL]$. (3)

Für die zur Kugeloberfläche parallelen Feldkomponenten folgt außerhalb der Kugeloberfläche:

$$\text{Feld der ursprünglichen Ladung: } E_{\parallel 1} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{Q_1 \sin(\sphericalangle + \sphericalangle)}{[PL]^2}.$$

$$\text{Mit (2): } E_{\parallel 1} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{Q_1 r \sin(\sphericalangle)}{R [PL]^2}.$$

$$\text{Feld der Spiegelladung: } E_{\parallel 2} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{Q_2 \sin(\sphericalangle)}{[SL]^2}.$$

$$\text{Mit (3): } E_{\parallel 2} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{Q_2 r^2 \sin(\sphericalangle)}{[PL]^2 R^2}.$$

Für die zur Kugeloberfläche parallelen Feldkomponenten folgt innerhalb der Kugeloberfläche:

$$\text{Feld durch die Ladung am ursprünglichen Ort: } E_{\parallel 3} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{Q_3 r \sin(\sphericalangle)}{R [PL]^2}.$$

Aus der Randbedingung $E_{\parallel 1} + E_{\parallel 2} = E_{\parallel 3}$ folgt:

$$Q_1 \sphericalangle + Q_2 \sphericalangle \frac{r}{R} = Q_3 \quad (4)$$

Für ein ideales Metall mit $\epsilon = \infty$ ist das Problem bereits gelöst. Für ein Dielektrikum muß auch die Randbedingung $E_{\perp 1} + E_{\perp 2} = \epsilon E_{\perp 3}$ erfüllt sein. Mit einer einzelnen Spiegelladung läßt sich diese Bedingung jedoch nicht überall gleichzeitig erfüllen. Da Punkte mit kleinem Abstand am wichtigsten sind, wird verlangt, daß die Randbedingung zumindest auf der Geraden (OP) erfüllt ist. Hier ist

$$E_{\perp 1} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{Q_1}{[PD]^2} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{Q_1}{(r - R)^2},$$

$$E_{\perp 2} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{Q_2}{[SD]^2}.$$

Mit $[SD] = R - [OS] = R - r$ folgt:

$$E_{\square 2} = \square \frac{1}{4 \square \square \square_0} \frac{Q_2}{(r \square R)^2} \frac{r^2}{R^2}$$

$$E_{\square 3} = \frac{1}{4 \square \square \square_0} \frac{Q_3}{(r \square R)^2}$$

$$\text{Daraus folgt } Q_1 \square Q_2 \frac{r^2}{R^2} = Q_3 \quad (5)$$

$$\text{Aus (4) und (5) folgt: } Q_2 = \square Q_1 \frac{\square \square 1}{\square + \frac{r}{R}} \frac{R}{r}.$$

Ein Dipol kann behandelt werden, indem zwei Ladungen mit kleinem Abstand und mit gleich großer Ladung aber mit umgekehrtem Vorzeichen betrachtet werden. Dabei muß berücksichtigt werden, daß der Abstand der Spiegelladungen um den Faktor $\frac{R^2}{r^2}$ kleiner als der Abstand der ursprünglichen Ladungen ist.

Also ist der Spiegeldipol $\vec{p}_2 = (2(\vec{p}_1 \cdot \hat{r})\hat{r} \square \vec{p}_1) \frac{\square \square 1}{\square + \frac{r}{R}} \frac{R^3}{r^3}$ (wenn O der Ursprung des

Koordinatensystems ist).

Anhang 7

Abstrahlung in den vom Mikroskopobjektiv erfaßten Raumwinkel beim Spitzenkugelmodell

Für Positionen des Farbstoffmoleküls, für die der Abstand des Farbstoff-Dipols zu seinem Spiegelbild in der Spitzenkugel viel kleiner als die Wellenlänge des emittierten Lichts ist, können zur näherungsweisen Berechnung der Abstrahlung die beiden Dipolmomente einfach addiert werden.

$$\vec{p}_{ges} = \vec{p} + \vec{p}_{Spiegel} = \vec{p} + (2(\vec{p} \cdot \hat{r})\hat{r} - \vec{p}) \frac{1}{R} \frac{R^3}{r^3}$$

Der Realteil und der Imaginärteil dieses Vektors sind im Allgemeinen nicht parallel. Diese Teile können jedoch getrennt betrachtet werden. Dazu wird im Folgenden angenommen, daß das Licht für jeden Winkel einen gleich langen optischen Weg zum Detektor hat. Es ist dann

$$I_{ges} \propto |E_{ges}|^2 = (E_{reel}^2 + E_{imag}^2).$$

Es kann also die Intensität, die in den vom Objektiv erfaßten Raumwinkel emittiert wird, für den Real- und Imaginärteil des Gesamtdipols getrennt berechnet und dann addiert werden.

Es ist also ab jetzt mit "Dipol" immer der Real- oder Imaginärteil des Gesamtdipols gemeint.

x, y, z seien die Koordinaten eines Punktes im eigenen Koordinatensystem des Dipols.

Der strahlende Dipol sei parallel zur z -Achse ausgerichtet. In Kugelkoordinaten:

$$x = R \sin\theta \cos\phi \quad (1)$$

$$y = R \sin\theta \sin\phi \quad (2)$$

$$z = R \cos\theta$$

Dann ist die Strahlung in Richtung des Punktes (x, y, z) proportional zu $\sin^2\theta$.

Der Dipol ist im Mikroskopsystem um den Winkel θ zur z -Achse gedreht (zunächst um die y -Achse des Mikroskopsystems; dies ist keine Einschränkung der Allgemeinheit, da die Linse rotationssymmetrisch ist. Der Dipol wird wieder in den Ursprung gelegt.). Der oben betrachtete Punkt habe die Koordinaten (a', b', c') im Mikroskopsystem. Die Koordinatentransformation vom Dipolkoordinatensystem in das Mikroskopkoordinatensystem lautet:

$$x' = a' \cos \varphi + c' \sin \varphi \quad (3)$$

$$y' = b' \quad (4)$$

$$z' = a' \sin \varphi + c' \cos \varphi$$

Kugelkoordinaten im Mikroskopsystem:

$$a' = R \sin \vartheta \cos \varphi \quad (6)$$

$$b' = R \sin \vartheta \sin \varphi \quad (7)$$

$$c' = R \cos \vartheta \quad (8)$$

ϑ_{gr} sei der halbe Öffnungswinkel des Mikroskopobjektivs.

Das in Richtung des Objektivs emittierte Licht ist proportional zu

$$A := \int_0^{\vartheta_{gr}} \int_0^{2\pi} \sin^2 \vartheta \, d\vartheta \cdot \sin \vartheta \, d\varphi.$$

$$\text{Aus (1),(3) und (7),(8),(9) folgt: } \sin \vartheta \cos \vartheta + \cos \vartheta \sin \vartheta \cos \vartheta = \sin \vartheta \cos \vartheta \quad (9)$$

$$\text{Aus (2),(4) und (7),(8),(9) folgt: } \sin \vartheta \sin \vartheta = \sin \vartheta \sin \vartheta \quad (10)$$

$$\begin{aligned} (9)^2 + (10)^2 \text{ ergibt: } & \int_0^{\vartheta_{gr}} \int_0^{2\pi} (\sin^2 \vartheta \cos^2 \vartheta + \cos^2 \vartheta \sin^2 \vartheta \cos^2 \vartheta + \sin^2 \vartheta \sin^2 \vartheta) \\ & = \int_0^{\vartheta_{gr}} \int_0^{2\pi} (\sin^2 \vartheta \cos^2 \vartheta + 2 \sin \vartheta \cos \vartheta \cos \vartheta \sin \vartheta \cos \vartheta + \cos^2 \vartheta \sin^2 \vartheta \cos^2 \vartheta + \sin^2 \vartheta \sin^2 \vartheta) \end{aligned}$$

$$\text{Mit } \int_0^{2\pi} \cos^2 \vartheta \, d\vartheta = \pi, \quad \int_0^{2\pi} \sin^2 \vartheta \, d\vartheta = \pi, \quad \int_0^{2\pi} \cos \vartheta \, d\vartheta = 0 \text{ folgt:}$$

$$\int_0^{2\pi} \sin^2 \vartheta \, d\vartheta \sin \vartheta = \pi (2 \sin^2 \vartheta \cos^2 \vartheta + \cos^2 \vartheta \sin^2 \vartheta + \sin^2 \vartheta) \sin \vartheta$$

$$= \pi (2 \sin^2 \vartheta \cos^2 \vartheta + (\cos^2 \vartheta + 1) \sin^2 \vartheta) \sin \vartheta$$

$$= \pi \frac{1}{4} (2 \sin^2 \vartheta (\sin \vartheta + \sin 3\vartheta) + (\cos^2 \vartheta + 1) (3 \sin \vartheta - \sin 3\vartheta))$$

$$A = \int_0^{\vartheta_{gr}} \int_0^{2\pi} \sin^2 \vartheta \, d\vartheta \sin \vartheta \, d\varphi$$

$$= \pi \left(\frac{4}{3} \frac{1}{4} (2 \sin^2 \vartheta (\cos \vartheta_{gr} + \frac{1}{3} \cos 3\vartheta_{gr}) + (\cos^2 \vartheta + 1) (3 \cos \vartheta_{gr} - \frac{1}{3} \cos 3\vartheta_{gr})) \right)$$

Anteil des in Richtung Objektiv abgestrahlten Lichts an der Gesamtemission des Dipols:

$$A_{Ob}(\vartheta) = \left(\frac{1}{2} \pi \frac{3}{32} (2 \sin^2 \vartheta (\cos \vartheta_{gr} + \frac{1}{3} \cos 3\vartheta_{gr}) + (\cos^2 \vartheta + 1) (3 \cos \vartheta_{gr} - \frac{1}{3} \cos 3\vartheta_{gr})) \right)$$

Normierte Gesamtabstrahlung:

$$A_{norm} = \frac{A_{Ob}(\vartheta_{Re}) \cdot \text{Re}^2(\vec{p}_{ges}) + A_{Ob}(\vartheta_{Im}) \cdot \text{Im}^2(\vec{p}_{ges})}{|\vec{p}|^2}$$

Anhang 8

Das Spitzenkugelmodell mit Glimmerunterlage

Durch Einführen der Glimmerunterlage müssen in allen Rechenschritten Spiegeldipole im Glimmer mit berücksichtigt werden. Dabei gilt jeweils: Um gleichzeitig sowohl die Randwertbedingungen der Glimmeroberfläche als auch der Spitzenkugel zu erfüllen, müssen zu allen Spiegeldipole im Glimmer bzw. in der Spitzenkugel auch deren Spiegeldipole in der Spitzenkugel bzw. dem Glimmer eingeführt werden. Es ergibt sich für jeden Dipol also immer eine unendliche Folge an Dipolen.

1. Anregung: Das anregende Lichtfeld ergibt sich als Summe der Felder des ursprünglichen Spitzendipols und dessen Spiegelbilder:

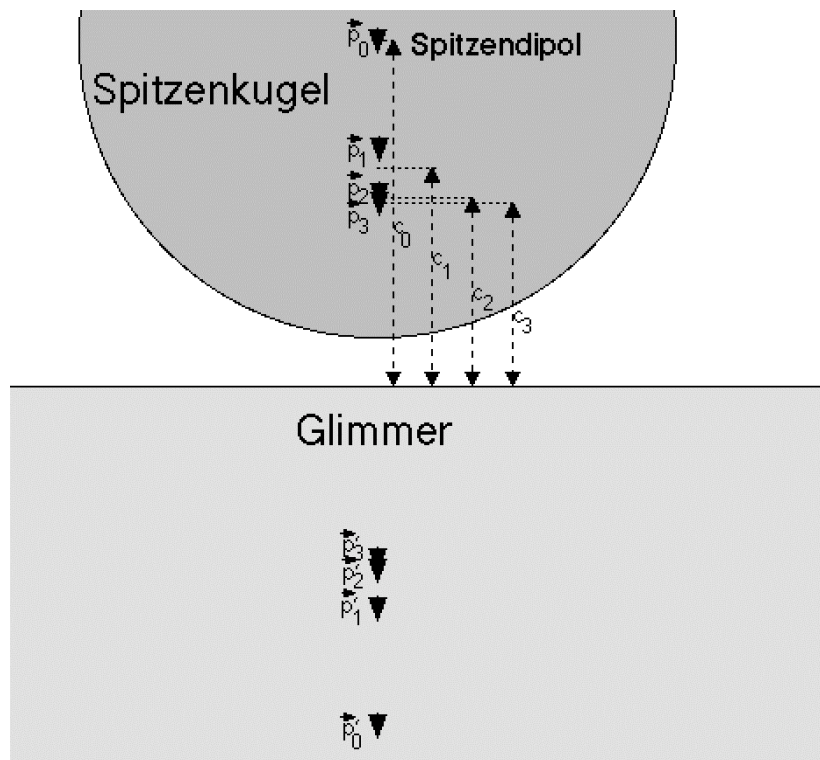


Abb. A8.1 Positionen der Spiegelbilder des Spitzendipols.

Der ursprüngliche Spitzendipol sei mit \vec{p}_0 bezeichnet und die folgenden Spiegeldipole in der Spitzenkugel mit \vec{p}_n .

Für einen senkrechten (Spiegel-)Dipol \vec{p}_n in der Kugel hat dessen Spiegeldipol im Glimmer die Größe $\vec{p}'_n = (2(\hat{z} \cdot \vec{p}_n)\hat{z} - \vec{p}_n) \frac{\epsilon_{Gl} - 1}{\epsilon_{Gl} + 1} = \vec{p}_n \frac{\epsilon_{Gl} - 1}{\epsilon_{Gl} + 1}$ und hat den gleichen Abstand von der

Glimmeroberfläche wie der ursprüngliche Dipol \vec{p}_n .

Die Höhe über dem Glimmer des $(n+1)$ -ten Spiegeldipols in der Spitzenkugel ist

$$c_{n+1} = c_0 \square \frac{R^2}{c_0 + c_n}.$$

Die Größe dieses $(n+1)$ -ten Spiegeldipols in der Kugel ist

$$\vec{p}_{n+1} = \frac{\square_{Gl} \square 1}{\square_{Gl} + 1} \frac{\square_{Al} \square 1}{\square_{Al} + \frac{c_n + c_0}{R}} \frac{R^3}{(c_n + c_0)^3} \vec{p}_n.$$

2. Fluoreszenzlebensdauer:

In die Formel für die Fluoreszenzlebensdauer aus Anhang 4 ist das reflektierte elektrische Feld die Summe der Felder aller Spiegeldipole. Das Feld des direkten Spiegelbildes im Glimmer kann dabei vernachlässigt werden, da es keinen Imaginärteil hat.

Da das Farbstoffmolekül sehr dicht über der Glimmerunterlage ist, kann sein Dipolmoment direkt mit seinem Spiegelbild im Glimmer zum Dipol $\vec{p}_{0,neu}$ zusammengefaßt werden.

$$\vec{p}_{0,neu} = (2(\hat{z} \cdot \vec{p})\hat{z} \square \vec{p}) \frac{\square_{Gl} \square 1}{\square_{Gl} + 1} + \vec{p} = ((\square_{Gl} \square 1)(\hat{z} \cdot \vec{p})\hat{z} + \vec{p}) \frac{2}{\square_{Gl} + 1} \text{ an der Stelle } \vec{r}_{0,neu} = \vec{r}_p \text{ des}$$

ursprünglichen Farbstoffdipols \vec{p} .

Das $(n+1)$ -te Spiegelbild dieses Gesamtdipols $\vec{p}_{0,neu}$ in der Spitzenkugel ergibt sich dann zu:

$$\vec{p}_{n+1,neu} = (2(\vec{p}_{0,neu} \cdot \hat{r}_{n,neu})\hat{r}_{n,neu} \square \vec{p}_{0,neu}) \frac{\square_{Al} \square 1}{\square_{Al} + \frac{r_{n,neu}}{R}} \frac{R^3}{r_{n,neu}}$$

an der Position $\vec{r}_{n+1,neu} = \left(\frac{R}{r_{n,neu}}\right)^2 \vec{r}_{n,neu}$.

Das n -te Spiegelbild des Dipols $\vec{p}_{0,neu}$ im Glimmer ergibt sich dann zu:

$$\vec{p}_{n,neu} = (2(\hat{z} \cdot \vec{p}_{n,neu})\hat{z} \square \vec{p}_{n,neu}) \frac{\square_{Gl} \square 1}{\square_{Gl} + 1} \text{ an der Position } \vec{r}_{n,neu} = 2(h \square \vec{r}_{n,neu} \cdot \hat{z})\hat{z} + \vec{r}_{n,neu}, \text{ wobei } h \text{ die}$$

Höhe des Mittelpunktes der Spitzenkugel über der Glimmeroberfläche ist.

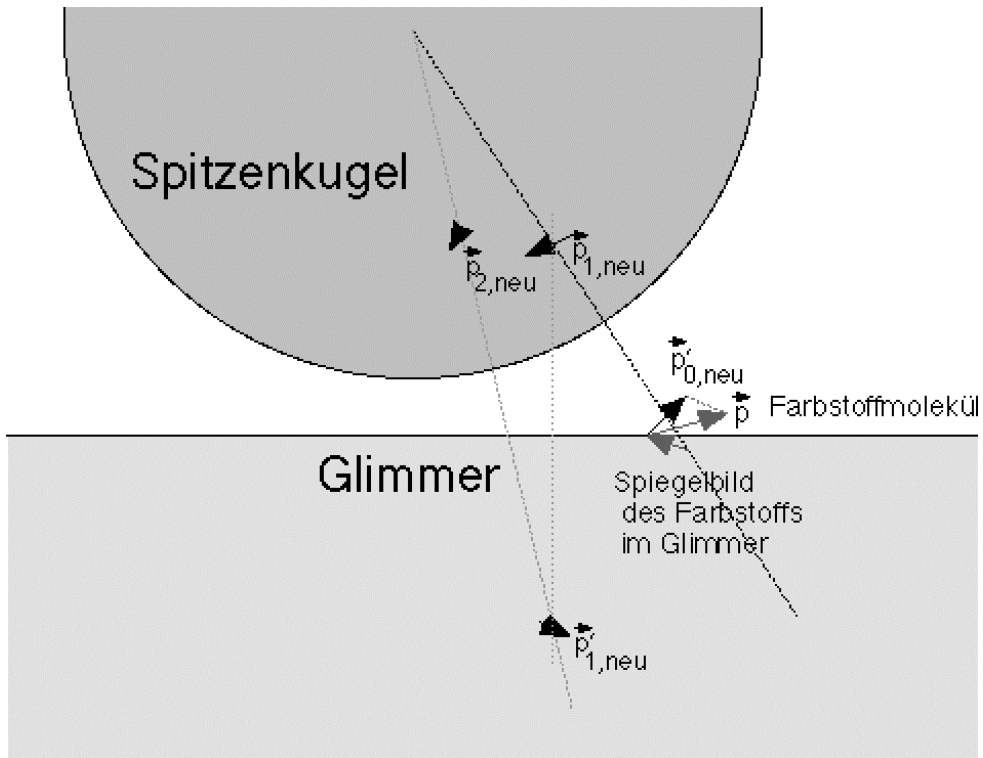


Abb. A8.2 Folge der Spiegeldipole des Farbstoffmoleküls.

3. Abstrahlung:

Zur Abstrahlung in den Glimmer tragen nur der ursprüngliche Dipol des Farbstoffmoleküls und die Spiegeldipole in der Spitzenkugel bei. Da diese dicht beieinander liegen, lassen sie sich zu einem Gesamtdipol zusammenfassen, der wie \bar{p}_{ges} in Anhang 7 behandelt werden kann:

$$\bar{p}_{ges} = (\bar{p} + \sum_{n=1}^{\infty} \bar{p}_{n,neu}) \frac{2}{\epsilon_{Gl} + 1}.$$

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Baumeister für die Möglichkeit, meine Promotion in seiner Abteilung am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchzuführen.

Herrn Prof. Sackmann gilt mein Dank für die Möglichkeit, am Physik-Department der Technischen Universität zu promovieren.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Reinhard Guckenberger (Guckus) bedanken. Er hat die Arbeit sehr intensiv betreut und war jederzeit für Diskussionen und Hilfestellungen bereit und hat mit seinen Anregungen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herzlicher Dank gilt Susanne Witt und Karin Felderer für das Präparieren biologischer Präparate, für geduldige Zusammenarbeit beim Schreiben einer Veröffentlichung und auch für gemütliches Zusammensitzen bei Kuchen.

Den aktiven und ehemaligen Mitgliedern der Nahfeldgruppe von Herrn Dr. Fritz Keilmann - Herrn Keilmann selbst, Rainer Hillenbrand, Thomas Taubner, Bernhard Knoll, Markus Brehm und Nenad Ocelic - gilt mein herzlicher Dank für Diskussionen über optische Probleme, für das kritische Durchlesen meiner Veröffentlichungen und für gute Zusammenarbeit.

Allen Mitgliedern des Tunnelvereins, auch den Ehemaligen, danke ich für die konstruktive Zeit und die angenehme hilfsbereite Atmosphäre innerhalb der Gruppe.

Jens Schiener gilt herzlichen Dank für das angenehme Zusammenarbeiten. Er war oft bei Computerfragen, beim Probenpräparieren und beim Arbeiten am Rasterkraftmikroskop sehr hilfreich!

Anton Hillebrand (Toni) war oft die letzte Rettung bei Computerproblemen. Vielen Dank für die schnelle Hilfe.

Meinem Vorgänger Axel Kramer danke ich dafür, daß er am Anfang meiner Arbeit durch Ratschläge per Telefon in mehreren Problemsituationen weitergeholfen hat.

Allen Mitarbeitern der Werkstatt, besonders aber Herrn Rudolf Gatz, danke ich für das schnelle Herstellen auch komplizierter Teile für den neuen SNOM-Aufbau und für die Geduld, wenn Entwürfe mehrfach abgeändert werden mußten.

Herrn Dr. Armin Kriele (LMU) gilt mein Dank für die Hilfe beim Wachsen von EBD-Spitzen.

Martinsried, Dezember 2003

Heinrich Frey