

Spitzenverstärkte optische Nahfeldmikroskopie

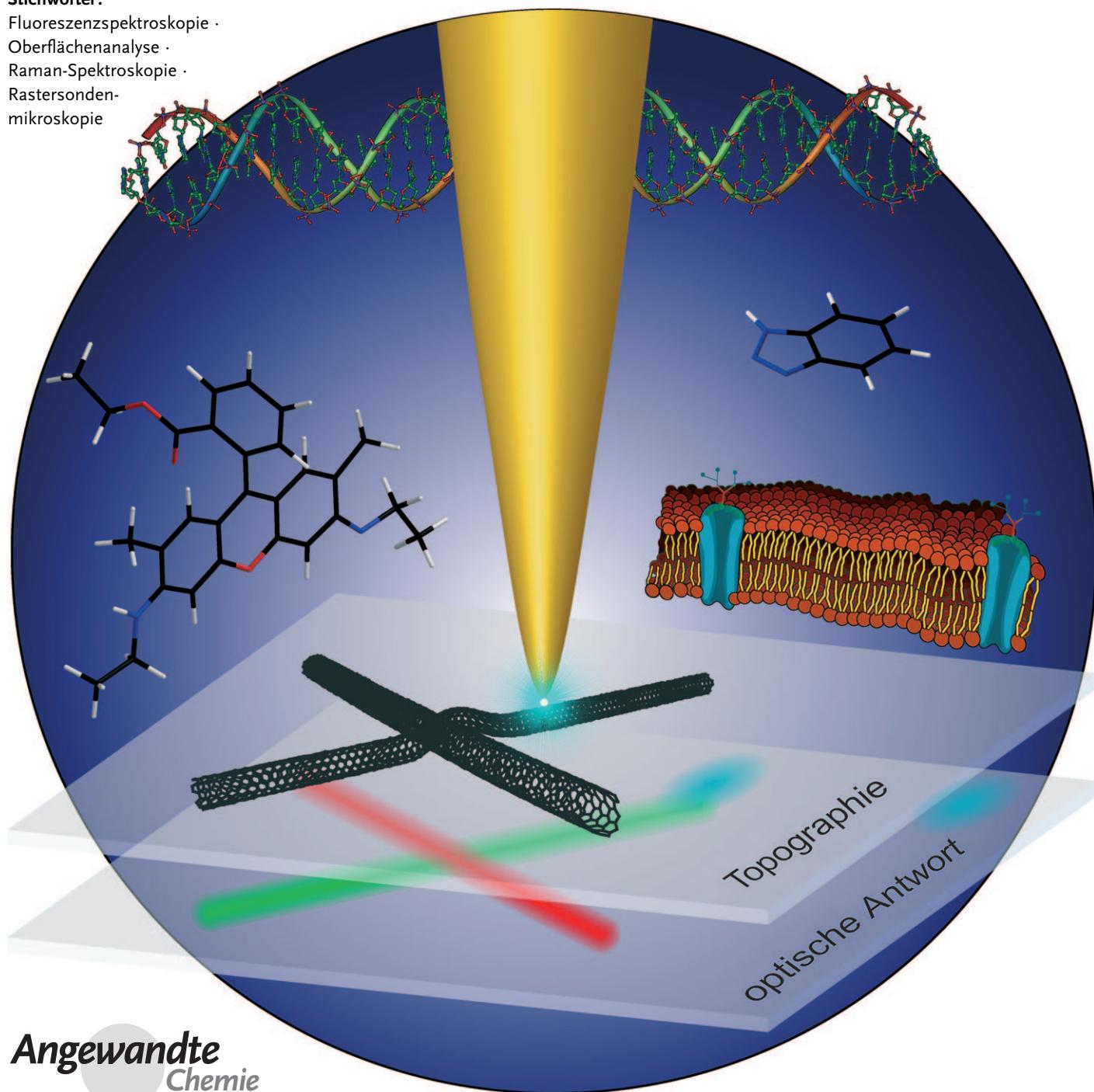
Achim Hartschuh*

Stichwörter:

Fluoreszenzspektroskopie ·

Oberflächenanalyse ·

Raman-Spektroskopie ·

Rastersonden-
mikroskopie**Angewandte
Chemie**

Spektroskopiemethoden mit höchster Ortsauflösung sind von grundlegender Bedeutung für die Untersuchung der physikalischen und chemischen Eigenschaften von nanostrukturierten Materialien einschließlich Quantenstrukturen und biologischen Oberflächen. Wir stellen ein optisches Verfahren vor, das auf den stark überhöhten elektrischen Feldern in der Nähe einer laserbeleuchteten Metallspitze basiert. Diese Felder ermöglichen die Messung verschiedener optischer Signale in räumlich stark begrenzten Bereichen und ermöglichen so eine detaillierte Probencharakterisierung weit jenseits der Beugungsgrenze. Darüber hinaus liefern die verstärkten Felder auch die notwendige Nachweisempfindlichkeit für die Messung kleinsten Probenvolumina. Zunächst werden die Grundlagen der Nahfeldoptik erläutert, im Anschluss behandeln wir die verschiedenen Mechanismen, die zur lokalen Feldverstärkung beitragen, und zeigen, wie sich damit optische Signale verstärken lassen. Verschiedene experimentelle Umsetzungen und einige aktuelle Ergebnisse zu Raman- und Fluoreszenzmikroskopie mit bis zu 10 nm Ortsauflösung an einzelnen Molekülen werden vorgestellt.

1. Einleitung

Optische Mikroskopie bildet die Grundlage vieler Naturwissenschaften. Insbesondere die Biologie profitiert von den faszinierenden Möglichkeiten, kleinste Strukturen und Vorgänge in lebendem Gewebe untersuchen zu können. Neben der reinen Bildgebung liefert beispielsweise die Raman-Spektroskopie auch detaillierte strukturspezifische Informationen für die chemische Analyse. Optische Methoden bieten zudem eine extrem hohe Nachweisempfindlichkeit und ermöglichen sogar die Beobachtung der Fluoreszenz-, Raman- und Absorptionsspektren einzelner Moleküle.^[1–4] Unsere stetig wachsenden Fähigkeiten, immer komplexere Nanostrukturen herstellen zu können, erfordern dringend neue Mikroskopietechniken zur Charakterisierung dieser Nanoobjekte – vorzugsweise optische Mikroskopie mit Ortsauflösung im Nanometerbereich. Darüber hinaus eröffnen neuartige Messtechniken ungeahnte Einblicke in neue physikalische Phänomene und regen so verschiedene Forschungsfelder an.

Die optische Beugung ist eine Folge der Wellennatur des Lichts und begrenzt die räumliche Auflösung konventioneller Mikroskope auf die halbe Wellenlänge des verwendeten Lichts. Innerhalb der letzten Jahrzehnte wurden verschiedene Ansätze zur Umgehung der Beugungsgrenze entwickelt, die in Fernfeld- und Nahfeldmethoden unterschieden werden. Bei der Fernfeldmikroskopie werden die sich von der Probe ausbreitenden elektromagnetischen Wellen gemessen, während die Nahfeldmikroskopie auf der Detektion evaneszenter Wellen in unmittelbarer Nähe der Probe beruht. In den 1980er Jahren wurde die optische Nahfeldmikroskopie durch die bahnbrechenden Experimente von Pohl, Lewis und anderen auf den Weg gebracht und eröffnete so erstmals einen Zugang zu optischen Messungen auf der Nanometerskala.^[5,6]

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	8299
2. Grundlagen	8300
3. Feldverstärkung an einer Metallspitze	8301
4. Verstärkung optischer Signale mit einer Metallspitze	8303
5. Experimentelle Umsetzungen	8304
6. Spitzenverstärkte Fluoreszenz	8305
7. Spitzenverstärkte Raman-Streuung	8307
8. Ausblick	8310

Die weitere Entwicklung der Nahfeldoptik wird in zwei neueren Artikeln von Pohl und Novotny ausführlich dargestellt.^[7,8] Darüber hinaus beschäftigen sich zahlreiche Übersichtsartikel und Bücher mit den Grundlagen und Anwendungen der Nahfeldoptik.^[9–12] In diesem Aufsatz konzentrieren wir uns auf die neueren Entwicklungen einer speziellen Methode, der spitzenverstärkten optischen Nahfeldmikroskopie (tip-enhanced near-field optical microscopy; TENOM). Sie beruht auf der Feldverstärkung in der unmittelbaren Nähe von laserbeleuchteten Metallspitzen. Es wird gezeigt, dass TENOM das leistungsfähigste Instrument zur optischen Charakterisierung von Oberflächen ist, da diese Methode neben der hervorragenden Ortsauflösung von etwa 10 nm auch eine enorme Signalverstärkung und damit Nachweisempfindlichkeit bietet.

Zunächst werden wir die physikalischen Grundlagen von evaneszenten und sich ausbreitenden Wellen sowie den mit der Ausbreitung verbundenen Informationsverlust erläutern. Der dann folgende Abschnitt behandelt die elektromagnetische Feldverstärkung an Metallspitzen und deren Anwendung zur Signalverstärkung. Verschiedene experimentelle Umsetzungen und einige neuere Ergebnisse der spitzenverstärkten Raman- und Fluoreszenzmikroskopie werden vorgestellt. Ein Ausblick zeigt schließlich Zukunftsperspektiven für TENOM und verbleibende Fragestellungen auf.

[*] Prof. Dr. A. Hartschuh

Department Chemie und Biochemie and CeNS
Ludwig-Maximilians-Universität München
Butenandtstraße 5–13 E, 81377 München (Deutschland)
Fax: (+89) 2180-77188
E-Mail: achim.hartschuh@cup.uni-muenchen.de
Homepage: <http://www.cup.uni-muenchen.de/pc/hartschuh>

2. Grundlagen

Das Ziel der optischen Nahfeldmikroskopie ist die Überwindung der Beugungsgrenze.^[13,14] Im Folgenden skizzieren wir die der Beugungsgrenze zugrunde liegenden physikalischen Prinzipien: die Ausbildung des Fernfelds im Zuge der Wellenausbreitung sowie die Eigenschaften des Nahfelds, das von evaneszenten Wellen dominiert wird. Für die Beschreibung der Wellenausbreitung ist die Darstellung der Felder durch ihr Winkelspektrum äußerst hilfreich. Das elektrische Feld \mathbf{E} in der Detektorebene im Abstand z wird hierbei als Überlagerung harmonischer Wellen der Form $\exp(i\mathbf{k}\mathbf{r}-i\omega t)$ mit den Amplituden $\bar{\mathbf{E}}(k_x, k_y, z=0)$ dargestellt, die von der Quelle bei $z=0$ ausgehen [Gl. (1)].^[15,9]

$$\mathbf{E}(x, y, z) = \int_{-\infty}^{+\infty} \int \bar{\mathbf{E}}(k_x, k_y, z=0) e^{i(k_x x + k_y y)} e^{\pm i k_z z} dk_x dk_y \quad (1)$$

Der Wellenvektor \mathbf{k} , der die Ausbreitungsrichtung der Welle beschreibt, wird durch seine Komponenten $\mathbf{k} = (k_x, k_y, k_z)$ bestimmt und hat eine feste Länge $|\mathbf{k}| = \sqrt{k_x^2 + k_y^2 + k_z^2} = 2\pi n/\lambda$, die von der Wellenlänge des Lichts λ und dem Brechungsindex des umgebenden Mediums n gegeben ist. In Gleichung (1) wurde die Zeitabhängigkeit zum besseren Verständnis nicht berücksichtigt. Im Folgenden beschränken wir uns der Einfachheit halber auf die x - z -Ebene und $n = 1$, sodass $|k_z| = \sqrt{2r^2/\lambda^2 - k_x^2}$ gilt. Der Ausdruck $\exp(\pm i k_z z)$ in Gleichung (1) bestimmt die Ausbreitung der zugehörigen Welle: Für $k_z \leq 2\pi/\lambda$ ist die Komponente k_z reell, und die entsprechende Welle mit der Amplitude $\bar{\mathbf{E}}(k_x, z=0)$ breite sich mit einer Oszillation gemäß $\exp(-i k_z z)$ in z -Richtung aus. Für $k_z > 2\pi/\lambda$ wird die Komponente k_z imaginär und $\exp(-|k_z|z)$ beschreibt den exponentiellen Abfall der zugehörigen evaneszenten Welle. Folglich können sich nur Wellen mit $k_z \leq 2\pi/\lambda$ ausbreiten und zum Fernfeld beitragen. Dies ist in Abbildung 1 veranschaulicht: links das elektrische Feld \mathbf{E} einer Quelle, deren räumliche Ausdehnung kleiner ist als die Wellenlänge, zusammen mit dem zugehörigen Winkelspektrum auf der rechten Seite, gegeben durch die Umkehrung von Gleichung (1). Im Allgemeinen ergeben sich die Wellenamplituden $\bar{\mathbf{E}}$ aus der zweidimensionalen Fourier-Transformation des Feldes \mathbf{E} . Genau wie beim Zusammenhang zwischen Zeit- und Frequenzbereich, wo ein kurzer optischer Puls ein entsprechend breites Frequenzspektrum besitzt, ist eine scharf begrenzte Feldverteilung stets mit

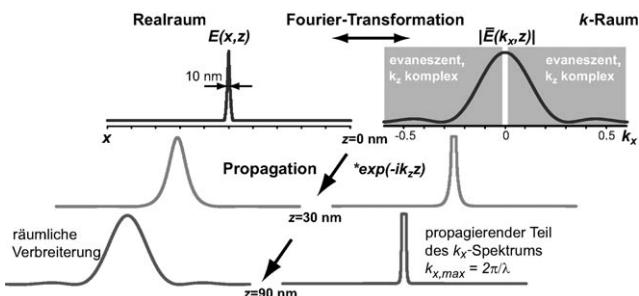


Abbildung 1. Prinzip der Wellenausbreitung und des damit verbundenen Verlustes an Ortsinformation. Obere Reihe: anfängliche Feldverteilung $E(x, z=0)$ nahe einer 10 nm großen Quelle in der x - z -Ebene (links) und das entsprechende Winkelspektrum $|\bar{E}(k_x, z=0)|$ (rechts). In unmittelbarer Nähe der Quelle enthält das Spektrum sowohl evanescente als auch sich ausbreitende Wellen. Die beiden unteren Reihen zeigen die Entwicklung des Feldes im Abstand $z=30$ nm und $z=90$ nm. Bei einer Wellenlänge $\lambda=500$ nm breiten sich im Vakuum nur die Wellen mit $k_x \leq 2\pi/\lambda \approx 0.0126$ nm $^{-1}$ aus. Evanescente Wellen werden gemäß $\exp(-k_z z)$ exponentiell schwächer. Diese Abschwächung der höheren Ortsfrequenzen führt zu einer breiteren Feldverteilung und dem Verlust an Ortsinformation.

einem breiten Spektrum an Ortsfrequenzen k_x verbunden. Da sich nur diejenigen Wellen mit einer Ortsfrequenz $k_x \leq 2\pi/\lambda$ ausbreiten können, nimmt die spektrale Breite mit zunehmendem Abstand z von der Quelle rasch ab und führt so zu einer schnellen Verbreiterung der Feldverteilung im Realraum. Die Wellenausbreitung entspricht also einer Tiefpassfilterung mit einer Grenzfrequenz $k_{x,\max} = 2\pi/\lambda$. Das Fernfeld enthält deshalb nur einen eingeschränkten Bereich an Ortsfrequenzen, was gleichbedeutend mit begrenzter Ortsinformation ist. Um diese Grenze zu überwinden, wurden sowohl Fernfeld- als auch Nahfeldmethoden entwickelt, die im Folgenden vorgestellt werden.

2.1. Fernfeldmethoden

Signale, die von zwei identischen inkohärenten Quellen ausgehen, welche nur wenige 10 nm voneinander entfernt sind (z.B. zwei fluoreszierende Moleküle), können im Fernfeld nicht voneinander unterschieden werden, weil die dazu notwendige Information bei der Wellenausbreitung verloren geht. Um die Signale der zwei Quellen trotzdem im Fernfeld unterscheiden zu können, dürfen sie nicht dauerhaft gleichzeitig Strahlung mit den gleichen Eigenschaften aussenden. Dieser Zustand kann entweder durch aktive Kontrolle, z. B. durch stimulierte Emission und Verarmung (stimulated emission depletion; STED)^[16,17] erreicht werden oder durch stochastisches Auslesen, basierend auf photophysikalischen oder photochemischen Effekten wie photoinduziertem Blitzen, Bleichen oder An-/Ausschalten der Quelle. Letzteres wird bei der hochauflösenden Mikroskopie durch photoaktivierte Lokalisierung (photo-activated localization microscopy; PALM) und durch stochastische optische Rekonstruktion (stochastic optical reconstruction microscopy; STORM) angewendet.^[18,19] Um Signale einzelner Emittoren unterscheiden zu können, sind die beiden Methoden PALM und STORM auf ein ausreichend hohes Signal-Rausch-Verhältnis ange-



Achim Hartschuh studierte Physik an den Universitäten Tübingen und Stuttgart und promovierte 2001 bei Prof. H. C. Wolf. Er verbrachte zwei Jahre als Postdoc am Institute of Optics an der Universität Rochester, New York, in der Gruppe von Prof. L. Novotny. Im Jahr 2002 erhielt er eine Juniorprofessur an der Universität Siegen und zog nach zwei Jahren zur Universität Tübingen um. Seit 2006 ist er Professor an der LMU München.

wiesen, das maßgeblich durch die Nachweisempfindlichkeit des Mikroskops und die Fluoreszenz-Quantenausbeute des Emitters bestimmt wird. In diesem Fall ergibt sich die erreichbare Ortsauflösung aus der Präzision, mit der sich die Ortsbestimmung einzelner Emitter durchführen lässt. Fortgeschrittene Techniken ermöglichen dies momentan mit einer Positionsgenauigkeit von etwa 1.5 nm für einzelne Moleküle.^[20] Wenn Fluoreszenzmarker zur Abbildung von Probenstrukturen verwendet werden, müssen diese mindestens in Abständen gleich der angestrebten Auflösung im Probenvolumen vorhanden sein, d.h. in entsprechend hohen Konzentrationen von etwa einem Marker auf 10 nm³.

Ein kürzlich erschienener Überblick über die Grundlagen, Fortschritte und Perspektiven von hochauflösender Fernfeldmikroskopie findet sich in Lit. [21]. Im Allgemeinen sind die bestehenden Fernfeldmethoden auf bestimmte photophysikalische oder photochemische Eigenschaften der Probe, wie z.B. Emissionsenergie oder die Lebensdauer angeregter Zustände, angewiesen und benötigen daher Vorkenntnisse der Proben. Ein großer Vorteil der Messung von propagierenden Wellen ist die Möglichkeit der dreidimensionalen Abbildung – eine Grundvoraussetzung für intrazelluläre Untersuchungen.^[22] Andererseits bieten die bestehenden Fernfeldmethoden keine Signalverstärkung, die bei immer kleiner werdenden Detektionsbereichen von großer Bedeutung ist. Für Raman-Spektroskopie sind die derzeitigen Fernfeldmethoden nicht geeignet.

2.2. Nahfeldmethoden

Die optische Nahfeldmikroskopie beruht auf einem anderen Ansatz, bei dem die hochaufgelöste Ortsinformation durch Wechselwirkungen einer spitzen Sonde mit dem elektromagnetischen Nahfeld der Probe gewonnen wird. Indem die Probenoberfläche mit der Sonde abgerastert und gleichzeitig das Signal detektiert wird, lässt sich ein Bild der Probe erzeugen. Da höhere Ortsfrequenzen mit einer stärkeren exponentiellen Abschwächung verbunden sind (siehe Definition von k_z in Abschnitt 2), lässt sich eine hochaufgelöste Abbildung nur durch einen Sonde-Probe-Abstand von wenigen Nanometern erzielen. Als Folge daraus ist die Nahfeldmikroskopie nur für die Untersuchung von Oberflächen oder knapp darunter liegender Bereiche geeignet.^[23]

Vier Konzepte zur Fokussierung elektromagnetischer Felder sind in Abbildung 2 veranschaulicht, darunter die Fernfeldfokussierung auf der Grundlage von Linsen (Abbildung 2a), der weitverbreitete Ansatz mit einer Apertur (Apertur-SNOM, Abbildung 2b) und die Feldverstärkung an Spitzen (Abbildung 2c und d), dem Hauptthema dieses Aufsatzes.

Die Einführung von Apertur-Sonden für die Nahfeldmikroskopie in den 1980er Jahren ermöglichte erstmals die optische Abbildung mit einer Auflösung jenseits der Beugungsgrenze und weckte damit das Interesse verschiedenster Disziplinen, vor allem der Material- und Biowissenschaften.^[8,24,25] Apertur-Sonden sind typischerweise aluminiumbedampfte Glasfaserspitzen, bei denen das Ende unbeschichtet bleibt und so eine kleine Blende (Apertur) bildet.

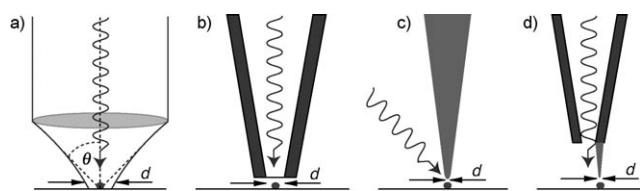


Abbildung 2. Konzepte zur Fokussierung: a) Fernfeldfokussierung mit einer Linse. Der Winkelspektralbereich von propagierenden Wellen $k_{x,\max}$ und damit auch der Fokusdurchmesser sind durch den Öffnungswinkel der Linse begrenzt: $k_{x,\max} = n \sin(\theta) 2\pi/\lambda$ mit dem Brechungsindex n und der Lichtwellenlänge λ . b) Optische Raster-Nahfeldmikroskopie mit einer Apertur (Apertur-SNOM). c) Spitzenverstärkte optische Nahfeldmikroskopie (TENOM). d) Tip-on-Aperture(TOA)-Ansatz, der die Vorteile von (b) und (c) verbindet.

Leider tritt von dem in die Glasfaser eingekoppelten Licht nur ein sehr kleiner Bruchteil ($\leq 10^{-4}$ für eine Apertur von 100 nm) am Ende der Sonde aus, weil die propagierenden Wellenleiter-Moden für klein werdende Spitzendurchmesser effektiv abgeschnitten werden.^[26] Bei der spitzenverstärkten optischen Nahfeldmikroskopie (TENOM) werden verstärkte optische Felder in der unmittelbaren Umgebung einer spitzen metallischen Sonde verwendet, um sowohl das Anregungslicht als auch das emittierte Licht lokal zu verstärken (Abbildung 2c). Abbildung 2d zeigt eine sogenannte Tip-on-Aperture(TOA)-Sonde, die die Vorteile des Apertur-Ansatzes mit denen von TENOM verbindet. Die Verwendung von laserbeleuchteten Metallspitzen für die Nahfeldmikroskopie wurde 1985 von Wessel vorgeschlagen.^[27] Generell können hierbei drei Ansätze unterschieden werden: 1) Streulicht-Mikroskopie, bei der das elastisch gestreute Probensignal mit gleicher Frequenz wie das eingestrahlte Licht im Fernfeld gemessen wird.^[28–30] 2) Spitzenverstärkte nichtlineare optische Frequenzerzeugung und -mischung wie z.B. Erzeugung der zweiten Harmonischen (second-harmonic generation; SHG) und Vierwellenmischung (four-wave mixing; 4WM).^[31–34,10] 3) Spitzenverstärkte Nahfeldmikroskopie durch Verwendung lokal verstärkter Felder, die das inelastisch gestreute Probensignal verstärken.^[1,10,11,35–37] Diese lokale Signalverstärkung steigert nicht nur die Ortsauflösung, sondern führt auch zu einer enorm erhöhten Nachweisempfindlichkeit. Die Methode lässt sich deshalb auch bei schwach emittierenden Proben mit niedriger Quantenausbeute oder inhärent schwachen Signalen wie der Raman-Streuung einsetzen. Diese Vielseitigkeit erlaubt die lokale Messung zahlreicher spektroskopischer Signale, darunter auch zeitaufgelöste Fluoreszenz. In diesem Aufsatz konzentrieren wir uns auf diesen dritten Ansatz und verweisen den interessierten Leser auf die angegebenen Literaturquellen für die beiden anderen Ansätze. Der nächste Abschnitt dieses Aufsatzes enthält eine kurze theoretische Beschreibung der Feldverstärkung an Metallspitzen und ihrem Einfluss auf optische Signale.

3. Feldverstärkung an einer Metallspitze

Die Feldverstärkung an Metallstrukturen ist ein Phänomen, dem wir fast täglich begegnen. Sie ist Grundlage sowohl

für die Funktion von Blitzableitern und Radioantennen als auch für die Farbgebung mittels metallischer Nanopartikel. Tatsächlich veranschaulichen diese drei Beispiele bereits die verschiedenen Beiträge zur Feldverstärkung: Der elektrostatische Blitzableiter-Effekt wird durch geometrische Singularitäten mit entsprechend hohen Oberflächenladungsdichten hervorgerufen, die auch Grundlage für die Feldemission sind (Abbildung 3a). Resonante Anregung von Oberflächenplasmonen in Metallpartikeln, die deren Form und dielektrischen Eigenschaften widerspiegeln, führen zu charakteristischen Extinktionsspektren (Abbildung 3b). Antennenresonanzen spielen dann eine Rolle, wenn die Länge einer Metallstruktur im Bereich eines Vielfachen der halben Wellenlänge der Strahlung liegt (Abbildungen 3c und d).^[38,39] Antennen- und Plasmonenresonanzen zeigen eine deutliche

Abhängigkeit von der Wellenlänge mit ausgeprägten Maxima der Feldintensität, die im gesamten sichtbaren Spektralbereich einstellbar sind. Der elektrostatische Blitzableiter-Effekt hängt hingegen von der Leitfähigkeit des Materials bei der jeweiligen Lichtfrequenz ab und nimmt typischerweise zum Infrarotbereich hin zu.^[38,40]

Zahlreiche theoretische Arbeiten wurden veröffentlicht, in denen die Beiträge der einzelnen Feldverstärkungsmechanismen mithilfe unterschiedlicher Techniken quantitativ bestimmt wurden, um die optimale Spitzengeometrie zu finden. Da sich Metalle für Frequenzen im sichtbaren Spektralbereich nicht wie ideale Leiter verhalten, ist die Beschreibung metallischer Strukturen in diesem Bereich sehr schwierig. Die elektromagnetischen Felder sind nicht länger auf die Oberfläche beschränkt, und ihre endliche Eindringtiefe führt letztlich zu Abweichungen von der einfachen Antennentheorie. Eine weitere Folge ist die Bildung von Oberflächenplasmonen an der Grenzfläche zwischen Metall und Dielektrikum. Der Einfluss der Spitzengeometrie und des Materials auf die Feldverstärkung wurde in mehreren Veröffentlichungen behandelt, mit dem Ziel, die optimale Spitze zu finden.^[41–43] Für einfache Spitzengeometrien wurde theoretisch vorausgesagt und experimentell bestätigt, dass die höchste Verstärkung genau dann auftritt, wenn die Antennenlänge dem Vielfachen einer effektiven Wellenlänge entspricht.^[44,39] Ergebnisse verschiedener numerischer Berechnungsmethoden müssen jedoch quantitativ verglichen werden, um technische Schwierigkeiten aufzuzeigen und die Aussagekraft der theoretischen Vorhersagen zu maximieren.^[45]

Theorie und Experimente zur oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie zeigen, dass die höchste Feldverstärkung für bestimmte Anordnungen von zwei oder mehr Nanopartikeln erzielt wird, wie sie sich durch Kombination von Kugeln, Antennen oder in komplexeren Kolloidaggregaten realisieren lassen.^[34,44,46–52] Auf ähnliche Weise wird die Feldverstärkung für Spitzen nahe einer Metalloberfläche enorm erhöht, bei gleichzeitig stärkerer Lokalisierung der Felder (Abbildungen 3e und f).^[53–56] Hingegen sinkt die Feldverstärkung für Proben mit einer dünnen dielektrischen Beschichtung rapide ab.^[23] Die Wechselwirkung zwischen Spalte und Probe führt, abhängig von der Oberfläche und dem Abstand, zu spektralen Verschiebungen der Plasmonenresonanzen, was die quantitative Bewertung der erzielten Feldverstärkung für eine bestimmte Anordnung erschwert.^[57–60]

Neuere Experimente mit Spitzen auf Metallsubstraten haben gezeigt, dass die Felder zusätzlich durch subnanometer- oder wenige Nanometer große Oberflächenstrukturen verstärkt werden, die in AFM-Bildern kaum zu erkennen sind (siehe auch Abbildung 9 in Abschnitt 7).^[60,61] Um Artefakte zu vermeiden, die durch solche Rauigkeiten hervorgerufen werden, sind für quantitative TENOM-Bilder atomar flache Substrate notwendig. Außerdem reichen maximale Feldintensitäten allein für TENOM-Anwendungen nicht aus. Die Feldmaxima müssen auch zugänglich sein und daher an jenen Endpunkten der Partikel oder Spitzen auftreten, die in der Rastersonden-Konfiguration mit der Oberfläche wechselwirken.^[39] Darüber hinaus sollte die Größe der Sonde möglichst

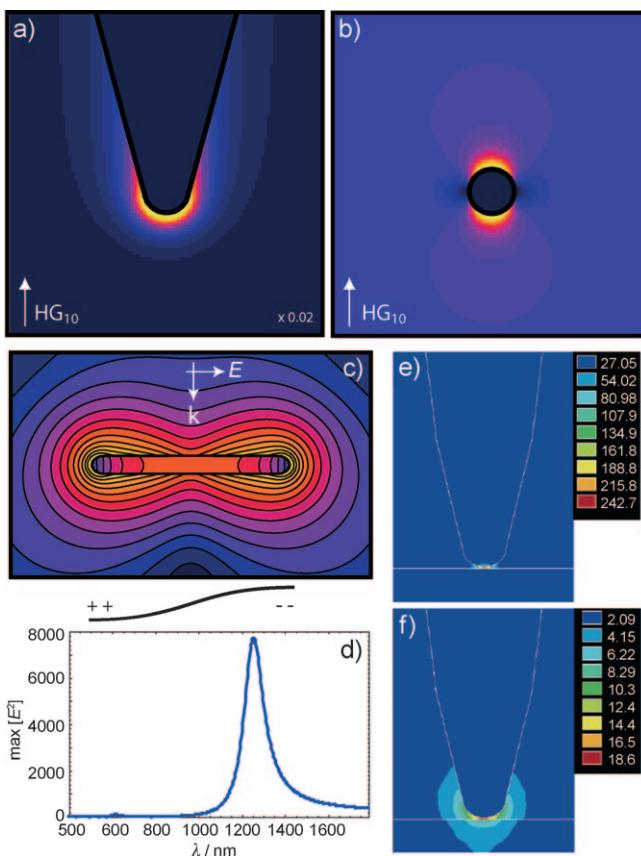


Abbildung 3. Die Feldverstärkung an Nanostrukturen ergibt sich aus drei Beiträgen: 1) Der quasistatische Blitzableiter-Effekt erfordert eine geometrische Singularität und lässt sich bei einseitig spitz zulaufenden Sonden beobachten. 2) Resonanten Oberflächenplasmonen durch kollektive Anregung von Elektronen spiegeln sowohl die Form als auch die dielektrischen Eigenschaften von Metallpartikeln wider. (a) und (b) zeigen die berechnete Feldverteilung $|E_{\text{local}}(\mathbf{r},\omega)|^2$ in der Nähe einer Goldspitze (a) und einer Kugel (b), die über einem Glassubstrat angeordnet sind und entlang ihrer Achse mit der fokussierten Lasermode HG_{10} beleuchtet werden. Abdruck aus Lit. [86], Copyright 2006, mit Genehmigung von Annual Reviews. 3) Antennenresonanzen treten auf, wenn die Länge der Spalte einer effektiven Wellenlänge entspricht ((c) und (d)). Wiedergabe nach Lit. [8], Copyright 2007, mit Genehmigung von Elsevier. Die Verstärkung und Lokalisierung des elektrischen Feldes an einer Metallspalte ist bei metallischen Substraten (e) deutlich höher als bei Glassubstraten (f). Abdruck aus Lit. [53], Copyright 2005, mit Genehmigung der American Chemical Society.

klein sein, da die erreichbare Ortsauflösung und mögliche topographische Artefakte durch Schwankungen des Spitz-Probe-Abstandes direkt damit in Zusammenhang stehen.^[62,63]

Die Feldverteilung und die lokale Verstärkung hängen nicht nur von der Partikelanordnung und der Wellenlänge, sondern vor allem auch vom Polarisationszustand des anregenden Lichtes ab. Für hohe Feldverstärkungen an Spitzen, hergestellt durch Verjüngung eines Metalldrahts, muss das elektrische Feld des anregenden Lasers entlang der Spitzenchse polarisiert sein.^[38] Ursprünglich wurden die Feldverteilungen für kontinuierliche Anregung mit ebenen Wellen berechnet. Für ausgedehntere Antennenstrukturen, bei denen die Lichtausbreitung an Bedeutung gewinnt, führt eine Anregung mit stark fokussiertem Licht oder evaneszenten Wellen zu abweichenden Feldverteilungen. Weiterentwickelte Ansätze verwenden für die Felderzeugung und -gestaltung die Ausbreitung und Manipulation von Oberflächenplasmonen. Laserpulse mit Chirp- und Polarisationskontrolle können so gestaltet werden, dass die gezielte adaptive Steuerung optischer Felder an Metallnanostrukturen im Subwellenlängenbereich möglich ist. Diese erst kürzlich entwickelten Methoden eröffnen vielfältige Möglichkeiten und haben das neue Forschungsfeld der ultraschnellen Nanooptik auf den Weg gebracht.^[64–67] Ein wichtiger Schritt ist auch die Weiterentwicklung nichtoptischer Verfahren zur Visualisierung elektromagnetischer Felder und Eigenmoden von Nanostrukturen. Die Kombination von Elektronen-Energieverlust-Spektroskopie (electron energy loss spectroscopy; EELS) und Rastertransmissionselektronenmikroskopie (scanning transmission electron microscopy; STEM) kann zur Abbildung von Plasmonen verwendet werden. Die Plasmonen treten als Resonanzen in den EELS-Spektrien der fokussierten Elektronenstrahlen hervor und können so mit einer Ortsauflösung im Nanometerbereich abgebildet werden.^[69] Mit der energieaufgelösten Zweiphotonenphotoemissionselektronenmikroskopie (photoemission electron microscopy; PEEM) lässt sich das Potential des elektrischen Feldes mit einer Ortsauflösung von bis zu 0.5 nm messen, abhängig von der Güte der Elektronenoptik.^[66,67]

4. Verstärkung optischer Signale mit einer Metallspitze

Obwohl die verstärkten elektromagnetischen Felder an der Spitze lokalisiert sind (siehe vorheriger Abschnitt und Abbildung 3), ergibt sich der Bildkontrast bei Abbildung der Probe durch Abrastern nicht einfach nur aus der Spitzengeometrie. Mit anderen Worten: Die optische Abbildung mittels Feldverstärkung an Spitzen ist nicht gleichbedeutend mit Rasterkraftmikroskopie (atomic force microscopy; AFM) zuzüglich optischer Information. Da insbesondere Raman-Streuung und Fluoreszenz komplexe optische Prozesse sind, die verschiedene elektronische Zustände im Probenmaterial mit unterschiedlicher Kohärenz einbeziehen, variieren die Verstärkungseffekte und damit der entsprechende Bildkontrast je nach Probentyp.

Die überhöhten Felder an der Spitze führen zunächst zu höheren Anregungsraten, entsprechend einer höheren An-

regungsleistung der Lichtquelle. Im Allgemeinen wird die Erhöhung der Anregungsrate k_{ex} für Raman-Streuung und Fluoreszenz gleich sein, wenn die elektronische Dephasierung nicht verändert wird. Definiert man die Feldverstärkung f als das Verhältnis zwischen elektrischem Feld an der Spitze $E_{\text{tip}}(x)$ und dem Feld ohne Spitze $E_0(x)$, so gilt für die Erhöhung der Anregungsrate $k_{\text{ex,tip}}/k_{\text{ex},0} = f^2$. Analog zu einem Radio, das sowohl als Empfänger und Sender verwendet werden kann, erhöhen die verstärkten Felder aber auch die Rate des strahlenden Zerfalls („strahlende Rate“) k_{rad} . Diese Zunahme der strahlenden Rate kann im Sinne des Purcell-Effekts verstanden und durch Fermis Goldene Regel im Bereich schwacher Kopplung beschrieben werden.^[70,71]

4.1. Verstärkung der Raman-Streuung

Im Falle der Raman-Streuung hängt die Signalintensität vom Produkt der Raten $k_{\text{ex}}(\lambda_{\text{ex}}) k_{\text{rad}}(\lambda_{\text{rad}})$ ab. Daraus folgt, dass die Signalverstärkung mit der vierten Potenz der Feldverstärkung zunimmt, wenn die Differenz zwischen Anregungs- und Emissionswellenlänge nicht allzu groß ist und man annimmt, dass die Feldverstärkung an der Spitze weitgehend unabhängig von der Wellenlänge ist [Gl. (2)].

$$M_{\text{Raman}} = (k_{\text{ex,tip}}/k_{\text{ex},0})(k_{\text{rad,tip}}/k_{\text{rad},0}) \approx f^4 \quad (2)$$

Für die oberflächenverstärkte Ramanstreuung (surface enhanced Raman scattering; SERS) wurden Verstärkfaktoren im Bereich von zwölf Größenordnungen erreicht. Hierfür sind aber bestimmte Anordnungen mehrerer Partikel mit entsprechenden Zwischenräumen oder die Nähe spitzer Oberflächenstrukturen notwendig.^[72,46] Da das Signal mit der vierten Potenz zunimmt, sind bereits mäßige Feldverstärkungen von $f=10\text{--}100$, wie sie für einzelne kugelförmige Partikel vorhergesagt werden, ausreichend für eine enorme Signalverstärkung.

4.2. Verstärkung der Fluoreszenz

Die Fluoreszenzintensität hängt hingegen von der Anregungsrate k_{ex} und der Quantenausbeute η ab, die den Anteil der Übergänge vom angeregten zum Grundzustand beschreibt, bei denen ein Photon ausgesendet wird. Die Quantenausbeute berechnet sich aus den Raten des strahlenden Zerfalls k_{rad} und des strahlunglosen Zerfalls k_{nonrad} gemäß $\eta = k_{\text{rad}}/(k_{\text{rad}} + k_{\text{nonrad}})$. Entsprechend lässt sich die Fluoreszenzverstärkung durch eine Metallspitze dann als Gleichung (3) schreiben:

$$M_{\text{flu}} = (E_{\text{tip}}/E_0)^2 (\eta_{\text{tip}}/\eta_0) = f^2 (\eta_{\text{tip}}/\eta_0) \quad (3)$$

Hierbei nehmen wir an, dass das System weit unterhalb der Sättigungsintensität angeregt wird. Aus Gleichung (3) wird deutlich, dass TENOM für Proben mit geringer Quantenausbeute und schnell wiederholbarer Anregung, wie z.B. halbleitende Kohlenstoffnanoröhren, am besten funktioniert.^[73,74] Bei stark fluoreszierenden Proben wie Farbstoff-

molekülen ist die Quantenausbeute η_0 bereits nahe eins und kann nicht weiter erhöht werden. Aufgrund des geringen Abstandes zwischen Emitter und Spalte, der für die hohe Ortsauflösung (unter 10 nm in typischen Experimenten) notwendig ist, muss ein strahlungsloser Energieübergang vom angeregten Molekül zur Metallspitze und die anschließende Ableitung der Energie ins Metall berücksichtigt werden. Dieser Prozess stellt einen zusätzlichen strahlunglosen Relaxationspfad dar und verringert die Zahl der messbaren Fluoreszenzphotonen. Obwohl der Energieübergang zwischen Molekülen und metallischen Grenzflächen im Rahmen der phänomenologischen klassischen Theorie sehr gut verstanden ist,^[75,76] sind diese Effekte für Objekte im Nanometerbereich schwerer zu quantifizieren. Die Erhöhung der strahlenden Rate und Fluoreszenzlösung durch Spitzen wurde theoretisch untersucht.^[71,77–80,51] Experimente an Modellsystemen aus Metallpartikeln und einzelnen Dipol-emittenten wie fluoreszierenden Molekülen zeigen eine abstandsabhängige Wechselwirkung zwischen verstärkenden und dämpfenden Prozessen.^[81–85] Neben einer verstärkten Emission kann die Erhöhung der strahlenden Rate durch Partikel auch zu beträchtlichen Änderungen der räumlichen und spektralen Abstrahlungscharakteristik führen.^[83,86,87] Die Orientierung des Dipolemitters bezüglich der Antennenstruktur ist für die Modifikation der strahlenden Rate von großer Bedeutung.^[83] Obwohl die Fluoreszenzlösung mit halbleitenden Spitzen weniger effizient ist,^[88,89] bieten diese aufgrund der geringeren Leitfähigkeit bei optischen Frequenzen eine kleinere Feldverstärkung.

Da die Signalverstärkung und die hohe Ortsauflösung das Resultat von Nahfeldwechselwirkungen zwischen Sonde und Probe sind, können TENOM-Spektren deutlich von den entsprechenden Fernfeldspektren abweichen. Beispielsweise kann man erwarten, dass sich mit großen Wellenvektoren \mathbf{k} optische Übergänge jenseits der normalen Dipolnäherungen für konstante Anregungsfelder erreichen lassen.^[90–92] Hohe Feldstärkegradienten könnten die Auswahlregeln ändern und auf diese Weise die Raman-Spektren beeinflussen.^[93] Ein besseres Verständnis der optischen Nahfeldwechselwirkungen würde eine gezielte Untersuchung dieser Phänomene ermöglichen und zusätzliche spektrale Information liefern.

5. Experimentelle Umsetzungen

5.1. Nahfeldmikroskope

Da die Feldverstärkung auf das Ende der Spalte beschränkt ist, muss der Spalte-Probe-Abstand im Bereich weniger Nanometer kontrolliert werden können. Experimentelle Umsetzungen beruhen auf der Messung der Normal- oder Scherkräfte bei Verwendung eines AFM oder des Tunnelstroms für ein Rastertunnelmikroskop (scanning-tunneling microscope; STM).^[94,95] Eine Vielzahl unterschiedlicher TENOM-Sonden wird verwendet, darunter scharfe Gold- oder Silberspitzen, die aus dünnen Drähten geätzt werden, und metallbeschichtete AFM-Spitzen, die kommerziell erhältlich sind.^[35,37,10] Alternativ dazu können auch feldverstärkende Metallpartikel an scharfen Glasspitzen angebracht

werden.^[96–98] Aufwändiger Ansätze kombinieren elektrochemisches Ätzen und die Bearbeitung mit einem fokussierten Ionenstrahl (focused ion beam; FIB), um so maßgeschneiderte plasmonische Strukturen, z.B. sogenannte Bow-Tie-Antennen, herzustellen.^[81,99,100]

Bezüglich der Anwendung mit nicht-transparenten Proben kann die Art der Beleuchtung in zwei Kategorien unterteilt werden (Abbildung 4). Eine Beleuchtung von der

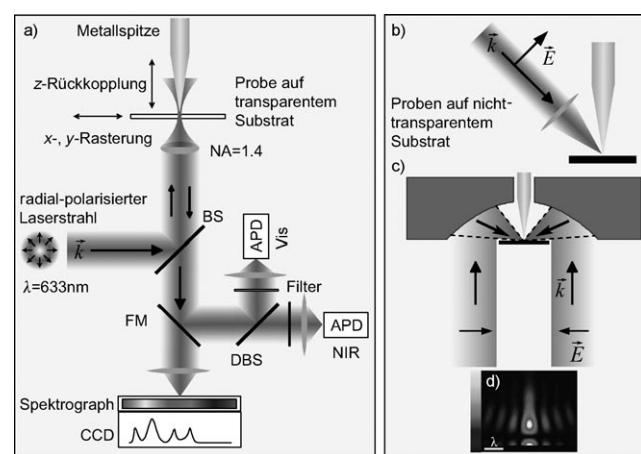


Abbildung 4. a) Prinzip eines Nahfeldmikroskops mit Beleuchtung der Spalte entlang ihrer Achse durch eine transparente Probe hindurch.^[73] Das optische Signal wird entweder von zwei Photodioden (avalanche photodiodes; APDs) für den sichtbaren (Vis) und nahinfraroten (NIR) Spektralbereich detektiert, oder einer Kombination aus Spektrometer und CCD-Kamera. b) Seitenbeleuchtung der Spalte auf einem nicht-transparenten Substrat. c) Fokussierung von Licht mit einem Parabolspiegel. Um eine starke Feldkomponente entlang der Spaltenachse zu erzeugen, die für eine effiziente Feldverstärkung nötig ist, wird in (a) und (c) eine radial polarisierte Lasermode zur Anregung verwendet.^[101,102,60] d) Berechnete Feldverteilung eines fokussierten Laserstrahls mit radialem Polarisationsmodus. Abdruck aus Lit. [60], Copyright 2008, mit Genehmigung von Wiley-VCH.

Seite ermöglicht die Untersuchung nicht-transparenter Proben, wobei sich die erforderliche Polarisierung entlang der Spaltenachse sehr einfach erreichen lässt (Abbildung 4b). Für den Fall transparenter Proben kann eine Beleuchtung entlang der Achse von großem Vorteil sein, wenn Objektive mit großer numerischer Apertur ($NA > 1$) eingesetzt werden. Dadurch verringert sich das konfokale Detektionsvolumen, das zum Fernfeldhintergrund beiträgt, und die Sammelleffizienz für das emittierte Licht wird erhöht. Letzteres ist von größter Bedeutung für schwach fluoreszierende Spezies, bei denen photoinduziertes Bleichen durch höhere Anregungsintensitäten zum Problem wird. Für eine Beleuchtung entlang der Achse ist die Ausbreitungsrichtung des Lichts parallel zur Polarisationsrichtung, die für eine effiziente Feldverstärkung an der Spalte notwendig ist. Diese Forderung kann nur durch die Fokussierung höherer Lasermode erfüllt werden.^[101,102] Nicht-transparente Proben können mit großer numerischer Apertur untersucht werden, wenn statt eines Glasobjektivs ein Parabolspiegel verwendet wird (Abbildung 4c).^[103,104,60] Darüber hinaus zeigen Parabolspiegel keine chromatischen

Aberrationen und können bei jeglichen Temperaturen sowie im UHV eingesetzt werden, womit sie sich ideal für Oberflächenuntersuchungen eignen. Die Ausrichtung und Einstellung ist jedoch sehr anspruchsvoll und bereits kleinste Abweichungen führen zu einem deutlich verformten Fokus und reduzierter Nachweisempfindlichkeit.^[103]

Um ein Bild aufzunehmen, wird die Spitzes in den Fokus des Objektivs gebracht und mit dem Laser beleuchtet. Das optische Signal wird meist mit demselben Objektiv aufgesammelt und dann entweder mit Photodioden oder einem Spektrometer mit CCD-Kamera detektiert. Durch Abrastern der Probe können die optischen Nahfeldsignale und die Topographie gleichzeitig aufgenommen werden. Für spektroskopische Bilder wird an jedem Bildpunkt ein Spektrum aufgenommen. Sie enthalten die ausführlichsten Informationen und bieten echten spektralen Kontrast.

5.2. Fernfeldhintergrund

Die bisher vorgestellten Konfigurationen verwenden eine Fernfeldbeleuchtung der Metallspitze. Dadurch wird neben dem aus der Nahfeldwechselwirkung zwischen Spalte und Probe resultierenden Signal auch ein Fernfeldsignal detektiert, der sogenannte Fernfeldhintergrund. Eine erhebliche Verstärkung des Nahfeldsignals ist notwendig, um aus dem Fernfeldhintergrund hervorzutreten, der aus einem wesentlich größeren beugungsbegrenzten Probenvolumen hervorgeht. Für eine hochauflösende Abbildung kommt das Signal aus einem kreisförmigen Gebiet von etwa $\pi(5 \text{ nm})^2$ auf der Probe, während die konfokale Fläche ca. $\pi(200 \text{ nm})^2$ groß ist. Das Verhältnis der Oberflächen beträgt also 40 000/25. Bei Bulk-Proben muss zusätzlich die geringe Eindringtiefe des Nahfelds von etwa 10 nm mit der Nachweistiefe der Fernfeldmikroskopie ($\approx 500 \text{ nm}$) in Beziehung gesetzt werden, wodurch das Verhältnis um den Faktor 50 erhöht wird. Diese Betrachtung macht deutlich, dass TENOM für niedrig-dimensionale Strukturen am besten geeignet ist, beispielsweise für eindimensionale Nanodrähte oder einzelne Emittoren wie Halbleiter-Quantenpunkte.

Zur Minimierung oder Abgrenzung des Fernfeldhintergrunds wurden verschiedene Ansätze entwickelt. Der erste beruht auf dem rapide abfallenden Nahfeldsignal bei zunehmendem Spalte-Probe-Abstand. Hierbei wird ein Tapping-Mode-AFM zum Abtasten der Probe verwendet und das optische Signal mit der Grundfrequenz oder höherer Harmonischer der Tapping-Mode-Frequenz demoduliert. Dieser Ansatz ist auch die Grundlage der in Abschnitt 2 erwähnten spitzenverstärkten Streulichtmikroskopie. Im Falle schwacher Emittoren, beispielsweise fluoreszierender Moleküle, wird der Detektionszeitpunkt der Photonen bezüglich der Tapping-Mode-Oszillation ausgewertet. Auf diese Weise lassen sich Photonen aus Nahfeldwechselwirkungen bei kleinem Spalte-Probe-Abstand von Photonen des Fernfeldhintergrunds bei größerem Abstand unterscheiden.^[105,55] Die entsprechende Demodulation für spektroskopische CCD-Signale ist momentan eine große Herausforderung, und die Messung ganzer Spektren bei höheren Harmonischen der Tapping-Mode-Frequenz ist nicht möglich.

Weitere Ansätze verwenden spezielle Sonden, die eine Fernfeldanregung der Probe verhindern. Die TOA-Sonde (Abbildung 2d) kombiniert die Vorteile zweier Techniken: hohe Ortsauflösung und Signalverstärkung durch Metallspitzen und deren Beleuchtung mit evaneszenten Wellen im Nahfeld einer Apertur kleiner als die Wellenlänge.^[106,107] Zusätzlich kann die Länge dieser Spalte mit Antennenresonanzen abgestimmt werden, um die Feldverstärkung weiter zu erhöhen.^[108] Andere Ansätze verwenden die Ausbreitung von Oberflächenplasmonen. Die Anregung dieser Plasmonen mit Fernfeldbeleuchtung kann durch eine Einkopplung des Lichts an einem Gitter erreicht werden. Das mit einem FIB in die Metallspitze geschriebene Gitter wird mit dem Laser beleuchtet, und die so angeregten Plasmonen breiten sich dann zum Spaltenende hin aus, wo sie fokussiert werden und starke Felder erzeugen.^[109] Eine effiziente Anregung von propagierenden Plasmonen ist auch durch die Einkopplung höherer Lasermoden in vollständig metallbeschichtete, spitz zulaufende Glasfasern möglich.^[110,111,79]

Im Prinzip kombiniert ein Aufbau für spitzenverstärkte optische Nahfeldmikroskopie einfach ein konfokales Mikroskop mit einem System zur Regelung des Spalte-Probe-Abstandes, z.B. einem Rasterkraft- oder Rastertunnelmikroskop. Obwohl diese Mikroskopietechniken an sich sehr weit entwickelt sind, führt die Kombination der beiden zu einer deutlich höheren Komplexität, und sorgfältige Anpassung der Instrumentierung ist notwendig, um Benutzerfreundlichkeit zu gewährleisten. Zwar gibt es eine große Auswahl der verschiedenen AFM-Spitzen, darunter chemisch funktionalisierte und magnetische Spitzen, aber die meisten der kommerziell erhältlichen Spitzen sind nicht für TENOM geeignet, da sie aus Halbleitermaterialien aufgebaut sind und nur schwache Signalverstärkung bieten (siehe Abschnitt 4). Die großtechnische Herstellung metallischer oder metallisierter Spitzen mit optimierter Feldverstärkung und hoher Reproduzierbarkeit ist derzeit ein wichtiges Thema.

6. Spitzenverstärkte Fluoreszenz

Konfokale Mikroskope weisen eine Nachweisempfindlichkeit auf, die für die Abbildung der Fluoreszenz einzelner Moleküle mit hoher Quantenausbeute ausreicht. Die Signalverstärkung der Metallspitze dient hier vor allem zur Erhöhung der Ortsauflösung. In der Literatur sind zahlreiche Beispiele mit Ein- oder Zweiphotonenanregung beschrieben.^[1,73,82,83,105,107,108,112,113] Im Folgenden werden ausgewählte Beispiele vorgestellt, um die herausragenden Fähigkeiten von TENOM aufzuzeigen und die Aussagen der vorangegangenen Abschnitte zu illustrieren.

6.1. Einzelmolekül-Fluoreszenzverstärkung

Mehrere Veröffentlichungen demonstrieren das Wechselspiel zwischen Feldverstärkung und Fluoreszenzlösung durch die Spalte in klar definierten Einzelmolekülexperimenten (siehe auch Abschnitt 4). In mehreren grundlegenden

Arbeiten wurden Metallkugeln verwendet, bei denen die Feldverteilung analytisch berechnet werden kann.^[82–84,107,114]

Abbildung 5a zeigt die Abstandsabhängigkeit des Fluoreszenzsignals für ein einzelnes Molekül, dessen Dipolmoment senkrecht zur Substratoberfläche ausgerichtet ist. Bei

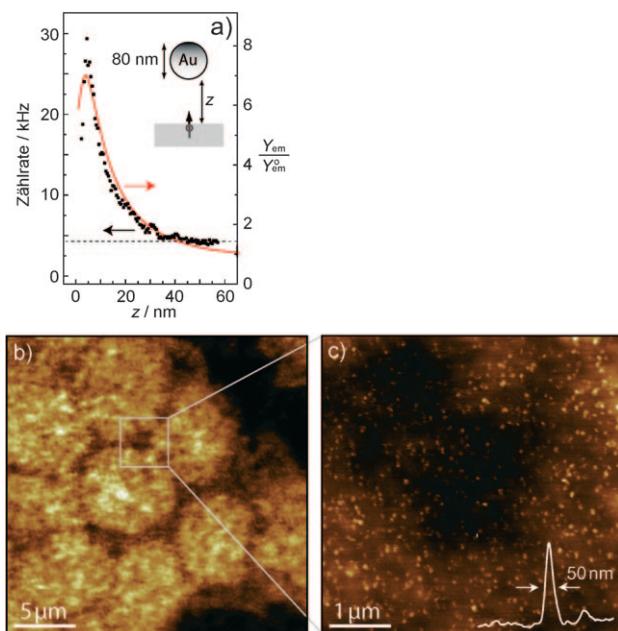


Abbildung 5. a) Abstandsabhängigkeit der Fluoreszenzverstärkung eines einzelnen Farbstoffmoleküls durch ein 80 nm großes Gold-Nanopartikel. Die rote Kurve zeigt die theoretisch zu erwartende Verstärkung. Abdruck aus Lit. [82], Copyright 2006, mit Genehmigung der American Physical Society. b) Konfokale Abbildung der Fluoreszenz von Erythrozyt-Plasmamembranen in wässriger Pufferlösung. c) Nahfeld-Fluoreszenzbild des in (b) markierten Ausschnitts, das einzelne PMCA4-Proteine auflöst. Das Bild wurde mit einem 60 nm großen Gold-Nanopartikel aufgenommen. Der Einschub zeigt den Querschnitt durch einen Fluoreszenzpunkt und eine Auflösung von 50 nm. Abdruck aus Lit. [117], Copyright 2008, mit Genehmigung der American Chemical Society.

abnehmendem Spitz-Probe-Abstand wird das Signal deutlich verstärkt, unter 5 nm dominiert dann jedoch die Fluoreszenzlösung. Die gute Übereinstimmung zwischen theoretischen und experimentellen Daten, einschließlich verschiedener Dipolorientierungen in Bezug auf die Spitze, belegt, dass dieser Effekt gut verstanden ist und in Experimenten berücksichtigt werden kann.^[82,83,115] Aufgrund der unterschiedlichen Abstandsabhängigkeit für Fluoreszenzverstärkung und Auslösung gibt es einen optimalen Spitz-Probe-Abstand für die spitzenverstärkte Fluoreszenzmikroskopie (siehe Abbildung 5a und Abschnitt 4.2). In einigen Experimenten wurden zusätzlich inerte Polymerschichten als Abstandhalter aufgebracht, um diesen Abstand zu gewährleisten.^[116,108] Wie in Lit. [23] gezeigt wurde, führt dies jedoch zu einem deutlichen Verlust an Feldverstärkung und Auflösung, da die Feldstärke im Dielektrikum abnimmt.

6.2. Abbildung fluoreszierender biologischer Oberflächen

Die mögliche Verwendung von TENOM für die Fluoreszenzmikroskopie von biologischen Oberflächen in wässrigen Pufferlösungen wurde vor kurzem demonstriert.^[117] In Abbildung 5c sind Nahfeld-Fluoreszenzbilder von einzelnen PMCA4-Proteinen auf einer Erythrozyt-Plasmamembran in Wasser mit einer Ortsauflösung von 50 nm zu sehen. Abbildung 6 zeigt Fluoreszenzbilder von Cy3-Farbstoffmolekülen,

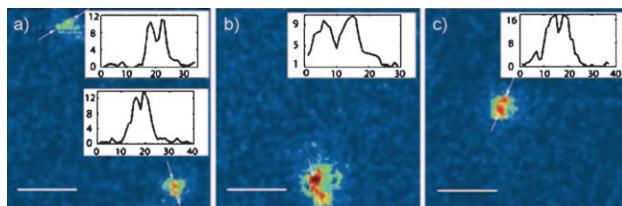


Abbildung 6. a–c) Nahfeldbilder von Cy3-Paaren auf einer Oberfläche. Die Einschübe zeigen Querschnitte entlang der mit Pfeilen gekennzeichneten Linien. Die horizontale Achse ist die Ortskoordinate in Bildpunkten (1 Bildpunkt = 1.95 nm), die vertikale Achse ist das Fluoreszenzsignal. Maßstab: 50 nm. Abdruck aus Lit. [105], Copyright 2006, mit Genehmigung der American Chemical Society.

die kovalent an den Enden kurzer DNA-Stränge gebunden sind.^[105] In diesem Beispiel wurde der Fernfeldhintergrund durch zeitliche Zuordnung jedes einzelnen detektierten Photons und optimierte Filterung unterdrückt (siehe Abschnitt 5.2). Farbstoffmoleküle mit Abständen unter 10 nm konnten so mit hohem Signal-Rausch-Verhältnis aufgelöst werden. Da die Spektren von hochempfindlichen CCD-Kameras nicht bei den üblichen Tapping-Mode-Frequenzen im Bereich von 100 kHz demoduliert werden können, ist die zeitliche Zuordnung einzelner Photonen mit dem Verlust an spektraler Information verbunden. Die Abbildung von farbstoffmarkierter DNA unter Verwendung von TOA-Sonden wurde in Lit. [107] demonstriert. Neben der hohen Ortsauflösung kann mit der radialsymmetrischen Feldverteilung an der Spitze auch die dreidimensionale Orientierung des Übergangsdipolmoments sichtbar gemacht werden. Da die Probe nicht im Fernfeld angeregt wird, minimiert dieser Ansatz den Fernfeldhintergrund und das irreversible Ausbleichen der Fluoreszenz.^[107,108]

Neben der Abbildung fluoreszierender Moleküle, die typischerweise zur Markierung biologischer Strukturen verwendet werden, ist TENOM insbesondere zur Untersuchung der Photolumineszenz (PL) von halbleitenden einwandigen Kohlenstoffnanoröhren (SWNTs) geeignet. SWNTs sind photolumineszente, quasi-eindimensionale Systeme und für Anwendungen in der Photonik, Opto- und Nanoelektronik sehr vielversprechend.^[118] Eine rapide steigende Zahl an Veröffentlichungen unterstreicht ihr enormes Potenzial als Lumineszenzmarker in biologischen Studien. Die Emission im nahinfraroten Spektralbereich, in dem keine Autofluoreszenz auftritt, ist hier von großem Vorteil.^[119] Die Quantenausbeute der Lumineszenz von Nanoröhren liegt aktuellen Untersuchungen zufolge im Bereich von 10^{-4} bis hin zu wenigen Prozent. Grund hierfür ist ein effizienter strah-

lungsloser Zerfall, der durch Defekte und die Kopplung an inhärente, nicht-emittierende dunkle Zustände verursacht wird.^[120–124] Obwohl in letzter Zeit viele grundlegende Eigenschaften entdeckt und erklärt wurden, gibt es weiterhin offene Fragestellungen wie die Rolle von lokalen Störungen in der Umgebung und Wechselwirkungen zwischen Nanoröhren. Für die Untersuchung solcher Phänomene entlang einzelner Nanoröhren hat sich die spitzenverstärkte Fluoreszenzmikroskopie als sehr geeignet erwiesen.^[73, 125]

Abbildung 7a zeigt die Photolumineszenz von Nanoröhren im Spektralbereich von 860 nm bis 1050 nm. Das PL-Signal ist entlang der gesamten Nanoröhre ausgedehnt, variiert aber in seiner Intensität. Die energieaufgelöste Abbildung durch Aufnahme von Spektren an jedem Bildpunkt

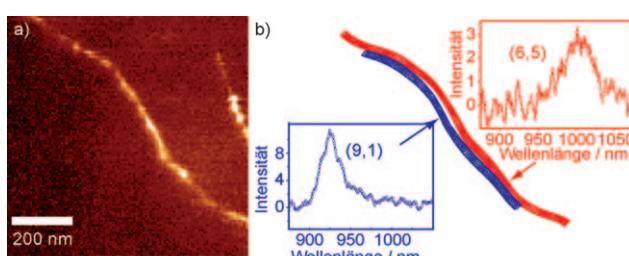


Abbildung 7. a) Nahfeld-PL-Bild von SWNTs auf einer Glimmeroberfläche. Dargestellt ist die gesamte PL zwischen 860 und 1050 nm nach Laser-Anregung mit 632.8 nm und 5 μW . b) Nahfeld-PL-Spektren, die entlang der Struktur aufgenommen wurden, belegen, dass dies ein Bündel aus zwei Nanoröhren mit unterschiedlicher Emissionsenergie ist. Die Strukturparameter der beiden SWNTs werden anhand der charakteristischen Emissionsenergien zu (9,1) und (6,5) bestimmt. In Lit. [125] wurde der abstandsabhängige Energieübergang von der (9,1)-zur (6,5)-Nanoröhre mit Subnanometergenauigkeit gemessen.

zeigt, dass es sich bei der ausgedehnten Struktur um ein dünnes Nanoröhrenbündel handelt, bestehend aus einer (9,1)- und einer (6,5)-Nanoröhre.^[125] Durch die gleichzeitige Lokalisierung der zwei Nanoröhren in den entsprechenden spektroskopischen Bildern mit Subnanometergenauigkeit war es möglich, die Abstandsabhängigkeit des Nahfeld-Energieübergangs zwischen zwei benachbarten Nanoröhren zum ersten Mal quantitativ zu bestimmen.^[125] Für Nanoröhren können gleichzeitig Nahfeld-Raman-Streuung und PL gemessen und zum Vergleich der verschiedenen Verstärkungsmechanismen herangezogen werden.^[73, 126] Typischerweise ist die Signalverstärkung für PL stärker. Dies ist etwas überraschend, da das Raman-Signal mit der vierten Potenz der Feldverstärkung zunimmt, während das PL-Signal nur quadratisch zunehmen sollte. Aus den Gleichungen (2) und (3) (Abschnitt 4.1 und 4.2) ergibt sich, dass $M_{\text{Flu}} > M_{\text{Raman}}$ nur für $(\eta_{\text{tip}}/\eta_0) \geq 1$ möglich ist. Da die Quantenausbeute nicht größer als eins werden kann, muss für $M_{\text{Flu}} > M_{\text{Raman}}$ die intrinsische Quantenausbeute sehr klein sein ($\eta_0 \ll 1$), wie dies für SWNTs der Fall ist. Da nicht zu erwarten ist, dass die Spitze die strahlungslosen Rate k_{nonrad} verringert, kann die größere Quantenausbeute nur durch eine deutliche Erhöhung der strahlenden Rate k_{rad} in Anwesenheit der Spitz hervorgerufen werden, wie sie in Abschnitt 4 diskutiert wurde. Diese Überlegungen zeigen, dass die spitzenverstärkte Flu-

reszenzmikroskopie besonders für die Untersuchung schwach emittierender (Bio-)Proben geeignet ist.

7. Spitzenverstärkte Raman-Streuung

Die Raman-Streuung misst das Schwingungsspektrum einer Probe und gibt damit direkt deren chemische Zusammensetzung und Struktur wieder. Ein großer Nachteil ist der extrem kleine Streuquerschnitt, typischerweise 14 Größenordnungen kleiner als der Streuquerschnitt der Fluoreszenz. Für die Messung von Probenvolumina im Bereich weniger Nanometer sind hier offensichtlich sowohl die hohe Ortsauflösung als auch die Signalverstärkung von TERS notwendig. Nachfolgend erläutern wir einige ausgewählte Beispiele, um die Möglichkeiten und Perspektiven der spitzenverstärkten Ramanstreuung (tip-enhanced Raman scattering; TERS) aufzuzeigen.

7.1. Signalverstärkung und Nachweisempfindlichkeit

Eine umfangreiche Liste der in TERS-Experimenten erreichten Verstärkungsfaktoren von bis zu 5×10^9 findet sich in Lit. [10]. Wie in Abschnitt 5 diskutiert, spiegelt die gemessene relative Signalverstärkung – also das Verhältnis zwischen verstärktem Nahfeldsignal und dem Fernfeldhintergrund – auch die verschiedenen Probenvolumina für Fern- und Nahfeld wider, weshalb die Feldverstärkung nicht direkt bestimmt werden kann. Für die Herleitung dieser Volumenverhältnisse werden einheitliche Probeneigenschaften vorausgesetzt, z. B. einheitliche Bedeckung für dünne Schichten oder einheitliche Signalcharakteristika entlang eindimensionaler Strukturen. Abbildung 8 zeigt die experimentell bestimmte Signalverstärkung der Raman-Streuung von einwandigen Kohlenstoffnanoröhren in An- und Abwesenheit der Spitz. In diesem Beispiel wurde eine geschätzte Verstärkung von

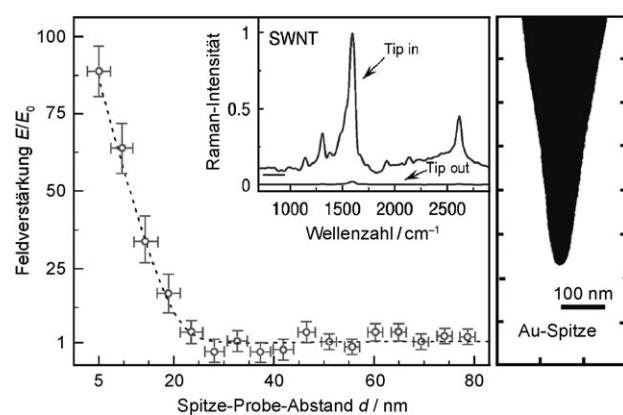


Abbildung 8. Links: Optische Feldverstärkung in Abhängigkeit des Spitze-Probe-Abstands d aus Raman-Experimenten. Einschub: Entsprechende Raman-Spektren für SWNTs auf einer Goldoberfläche mit der Spitz bei $d \approx 5 \text{ nm}$ („Tip in“) und für größeren Abstand außerhalb des Nahfelds („Tip out“). Rechts: SEM-Bild einer typischen Goldspitze, die in diesen Experimenten verwendet wurde. Abdruck aus Lit. [127], Copyright 2008, mit Genehmigung der Optical Society of America.

$M_{\text{Raman}} \approx (1-50) \times 10^7$ erzielt, was einer Feldverstärkung von 60 bis 150 entspricht. Um die starke Lokalisierung der verstärkten Felder in Richtung der Spitzennachse zu demonstrieren, wurde die Raman-Intensität in Abhängigkeit des Spitz-Probe-Abstands d aufgenommen.

Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass in TERS-Experimenten der Nachweis einzelner Moleküle möglich ist, wenn sich diese zwecks höherer Feldverstärkung auf Metalloberflächen befinden.^[128-132, 54] Der tatsächliche Nachweis für Einzelmolekülempfindlichkeit ist schwierig und stützt sich auf die Beobachtung von charakteristischen spektralen Fluktuationen und Intensitätsschwankungen bei schrittweise reduzierter Konzentration. Diese Signalschwankungen können aber auch Ausdruck einer zeitlichen Instabilität der Signalverstärkung sein, hervorgerufen durch physikalische/chemische Änderungen der adsorbierten Moleküle und der TERS-Spitze im Laufe des Experiments. Eine lokale Erwärmung der Probe durch die Spitzene wurde ebenso als Ursache von Signalverlusten diskutiert. Sie führt zu geringerer Oberflächenrauigkeit und Oberflächendiffusion der Moleküle und damit letztendlich zu einer schwächeren Signalverstärkung.^[133] Für extrem hohe Feldstärken müssen auch photochemische Änderungen der Moleküle berücksichtigt und im Spektrum unterschieden werden.^[95, 134] Auf SERS-Substraten wurde Einzelmolekülempfindlichkeit zweifelsfrei nachgewiesen, indem zwei Rhodamine-6G-Isotopologe mit eindeutig unterscheidbaren Schwingungsspektren verwendet wurden.^[135] Sehr überzeugende Beweise für den Einzelmolekülnachweis in TERS-Messungen wurden kürzlich durch die gleichzeitige Abbildung der Probenbedeckung mittels STM und einer linearen Abhängigkeit der Signalintensität von der Zahl der Moleküle im Detektionsbereich geliefert.^[136]

7.2. Chemische Analyse von Oberflächen

Die chemische Analyse von Molekülen auf Oberflächen ist eine der treibenden Kräfte für die Weiterentwicklung von TERS, da diese Anwendung für Forschungsbereiche wie etwa die Katalyse sehr vielversprechend ist. Ein Beispiel für chemische spezifische Nahfeldbilder ist in Abbildung 9 gezeigt.

Hier wurde eine dünne Schicht von Benzotriazol-Molekülen (BTA) auf einem gleichmäßigen Goldfilm mit einer Goldspitze im Fokus eines Parabolspiegels abgebildet. Die Moleküle werden bei der verwendeten Laserwellenlänge nicht resonant angeregt, sodass es keine zusätzliche Resonanzverstärkung gibt. Das optische Signal ergibt sich aus der Überlagerung des BTA-Ramansignals und der Photolumineszenz des Goldfilms. Wie in Abschnitt 3 erläutert, tritt an nanometergroßen Oberflächenstrukturen des Metallfilms eine zusätzliche Signalverstärkung auf, die die Ursache für die sehr hellen und stark lokalisierten Bereiche in der optischen Abbildung 9a ist. Analog zur spaltenverstärkten Fluoreszenzmikroskopie (Abschnitt 6) gibt auch das TERS-Signal die Orientierung des Raman-Tensors bezüglich der verstärkten Felder wieder. Genauer gesagt können die relativen Amplituden bestimmter Raman-Banden dazu verwendet werden, die Orientierung und deren zeitliche Änderung zu beobachten. Im Falle einer chemischen Bindung der unter-

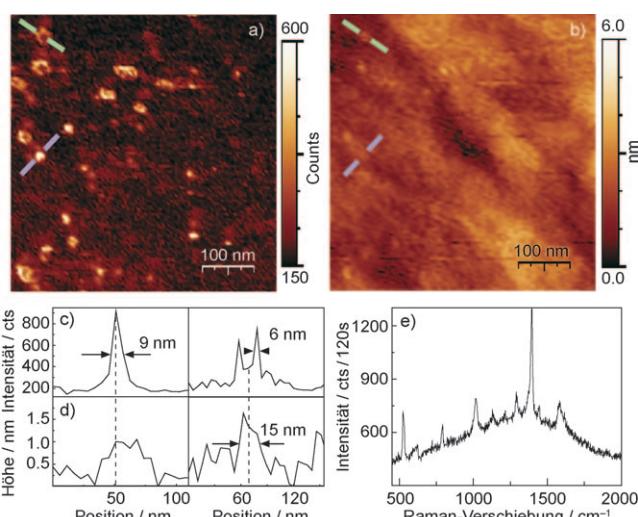


Abbildung 9. a) Optisches Nahfeldbild eines gleichmäßigen Goldfilms, der mit einer Schicht von Benzotriazol-Molekülen (BTA) bedeckt ist. Deren Raman-Signal zeichnet sich deutlich auf dem Photolumineszenzhintergrund des Goldfilms ab. b) Die gleichzeitig aufgenommene Topographie zeigt nur subnanometergroße Höhenunterschiede. Die größte Nahfeldverstärkung lässt sich an Oberflächenstrukturen im Nanobereich beobachten. c,d) Intensitäts- und Höhenprofile über zwei kleine Goldinseln, aufgenommen entlang der in den Bildern markierten Linien. e) Raman-Spektrum von einer der hellen Stellen in (a). Abdruck aus Lit. [60], Copyright 2008, mit Genehmigung von Wiley-VCH.

suchten Moleküle zur Oberfläche können zusätzlich Raman-Banden, -Aufspaltungen oder -Verschiebungen auftreten, die dabei helfen, die Details der Oberflächenchemie zu erkunden.

7.3. Biopolymere und Biooberflächen

DNA-Basen zeigen charakteristische Raman-Spektren, und die direkte optische Sequenzierung von DNA auf Substraten mittels TERS ist ein langjähriger Traum, der die Weiterentwicklung dieser Technik gefördert hat. Neuere Experimente an einzelnen RNA-Strängen und pikomolaren Mengen von DNA-Basen deuten darauf hin, dass dieses Ziel in absehbarer Zeit erreichbar ist.^[137, 129] Die in Abbildung 10 dargestellten TERS-Spektren verschiedener DNA-Basen auf einer Gold(111)-Oberfläche belegen die enorme Nachweisempfindlichkeit, die sich mit TERS erreichen lässt. Innerhalb der letzten Jahre demonstrierten zahlreiche TERS-Untersuchungen an biologischen Proben, darunter Linsenoberflächen von Ommatidien,^[138] Adenin-Nanokristalle,^[139] Cytochrome c^[140] und Bakterien,^[141] die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten dieser Technik.

7.4. Abbildung mechanischer Spannungen in Halbleitern

Aufgrund der ständig kleiner werdenden Abmessungen von Halbleiter-Bauelementen, wie z. B. Transistoren, stellt die ortsaufgelöste Messung der gezielt in den Transistorkanal eingebrachten mechanischen Spannungen eine enorme tech-

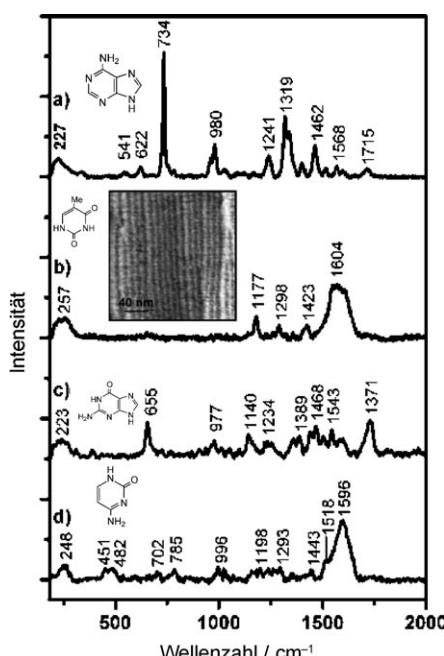


Abbildung 10. TERS-Spektren (hintergrundkorrigiert) von DNA-Basen adsorbiert auf einer Gold(111)-Oberfläche: a) Adenin, b) Thymin, c) Guanin, d) Cytosin, jeweils normiert auf 1 s Aufnahmezeit bei 2 mW Anregungsleistung. Der Einschub zeigt das STM-Bild einer selbstorganisierten Thymin-Monolage auf Gold(111). Abdruck aus Lit. [129], Copyright 2007, mit Genehmigung der American Chemical Society.

nische Herausforderung dar. Für die weitere Optimierung der Spannungen sind diese Messungen jedoch von großer Bedeutung.^[10, 142, 143] Die mechanischen Spannungen lassen sich über die Verschiebung der Raman-Banden messen, welche in Silicium etwa 4 cm^{-1} pro 1 GPa biaxialer Spannung beträgt. Für realistische (dreidimensionale) Spannungszustände in Transistorstrukturen können Verschiebungen von etwa 1 cm^{-1} erwartet werden. Das Hauptproblem von Raman-Messungen im Nanometerbereich resultiert aus dem großen Verhältnis der Detektionsvolumina von Fern- und Nahfeld, das die Unterscheidung des schwachen Nahfeldsignals vom Fernfeldhintergrund extrem schwierig macht. Darüber hinaus führt auch eine Probenerwärmung durch die Laseranregung zu ausgeprägten Verschiebungen im Bereich von 1 cm^{-1} pro 50 K, die nur schwer von den rein spannungsinduzierten Verschiebungen unterschieden werden können.^[144, 145] Durch die hohe Reflektivität von Silicium können auch Artefakte auftreten, insbesondere bei periodischen und Schichtstrukturen.^[142] Verschiedene Ansätze auf der Basis von Polarisationsfilterung wurden zur Erhöhung des Nahfeldkontrasts und Unterdrückung des Hintergrunds entwickelt,^[10, 146, 147] und TERS wird sich sehr wahrscheinlich als wichtiges Instrument zur Untersuchung von Halbleitermaterialien etablieren.

7.5. Raman-Streuung von Kohlenstoffnanoröhren

Die Kombination von hoher Ortsauflösung und spektroskopischem Kontrast bei TERS-Messungen wurde auch an einwändigen Kohlenstoffnanoröhren demonstriert.^[37, 148–150]

Raman-Streuung von SWNTs ist ausgiebig studiert worden^[118] und für Nanoröhren in Kontakt mit fraktalen Silberkolloiden wurden Raman-Verstärkungen von bis zu 10^{12} beschrieben.^[151] In Abbildung 11 ist das Nahfeld-Raman-Bild einer SWNT auf Glas zusammen mit der gleichzeitig aufge-

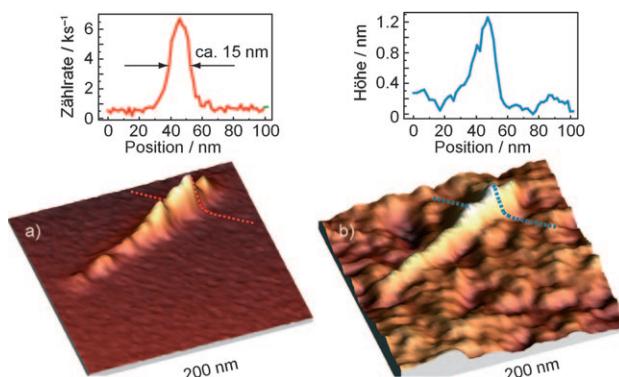


Abbildung 11. Gleichzeitig aufgenommenes Nahfeld-Raman- (a) und Topographie-Bild (b) einer SWNT auf Glas. Bildgröße $0.2 \times 0.2 \mu\text{m}^2$. Das Raman-Bild repräsentiert die Intensität der G-Bande bei Laseranregung mit 632.8 nm .^[118] Die Aufnahmezeit des Bildes betrug etwa 20 Minuten. In der Topographie ist die Rauigkeit der Glasoberfläche zu erkennen. Oben sind Querschnitte entlang der gestrichelten Linien in den entsprechenden Bildern gezeigt.

nommenen Topographie zu sehen. Die Ortsauflösung kann aus der Strukturbreite im Querschnitt bestimmt werden und beträgt etwa 15 nm. Für Glassubstrate zeigen die schärfsten bisher aufgenommenen Bilder eine Auflösung von 10 nm, begrenzt durch den Durchmesser der Spitze.^[150] Allgemein ist die optische Strukturbreite etwa um den Faktor 1.3 kleiner als die topographische Breite.^[150, 37] Während das Topographiesignal von nanometergroßen Objekten die Spitzengeometrie abbildet, führt die Abhängigkeit des Raman-Signals von der vierten Potenz der Feldverstärkung zu einer schärferen optischen Abbildung [Gl. (2)] (Abschnitt 4.1). Die Visualisierung intramolekularer Strukturübergänge und Defekte in Kohlenstoffnanoröhren mit TERS wurde in Lit. [150, 152] gezeigt.

Die in der Fluoreszenzmikroskopie verwendete zeitliche Zuordnung der detektierten Photonen (siehe Abschnitt 5) kann auch bei TERS zur Unterdrückung des konfokalen Fernfeldhintergrunds verwendet werden.^[55] Wie in Lit. [153] für DNA-Netzwerke gezeigt wurde, lässt sich bei der spaltenverstärkten kohärenten Anti-Stokes-Ramanstreuung (tip-enhanced coherent anti-Stokes Raman scattering; TE-CARS) eine zusätzliche Verstärkung erzielen. Andere lokale Effekte durch die Spitze, die nicht auf Feldverstärkung beruhen, können ebenfalls für hochauflöste Abbildungen verwendet werden. Lokale druckinduzierte Verschiebungen der Raman-Banden wurden in Lit. [154] gemessen, und in Lit. [155] wird die chemische Bestimmung von DNA-Basen durch die lokale Entstehung von Bindungen zu Silberatomen der Spitze diskutiert.

8. Ausblick

Die in diesem Aufsatz vorgestellten Ergebnisse belegen deutlich, dass sich TENOM zu einem leistungsfähigen und vielseitigen Instrument entwickelt hat. Mit dieser Technik wurden optische Oberflächenmessungen mit der bislang höchsten Ortsauflösung erreicht, in Kombination mit einer enormen Signalverstärkung. Zusätzlich bietet TENOM detaillierte Strukturinformationen auf der Basis von Raman-Streuung mit ultrahoher Nachweisempfindlichkeit. Eine kurze Checkliste für die Anwendbarkeit von TENOM zur Charakterisierung einer bestimmten Probe enthält die folgenden Punkte: 1) Die Oberfläche kann mit AFM oder STM untersucht werden, was die Grundlage für die Regelung des Spitz-Probe-Abstands im Nanometerbereich liefert. 2) Die optisch aktiven Elemente (z.B. Raman-aktive oder fluoreszierende Moleküle) befinden sich nahe der Oberfläche. 3) Die Probe zeigt ein stabiles konfokales optisches Signal. Aufgrund des Fernfeldhintergrunds und des günstigen Nahfeld-zu-Fernfeld-Verhältnisses ist TENOM besonders für die Messung von null- oder eindimensionalen Strukturen, wie etwa Punktdipolen oder dünnen Drähten, geeignet. Messungen an Bulk-Proben mit entsprechend geringem Nahfeldkontrast bleiben hingegen problematisch. Laufende Forschungen beschäftigen sich mit diesem Problem, und deutliche Verbesserungen, vor allem der Signalverstärkung und Ortsauflösung, können in den nächsten Jahren erwartet werden.

Verglichen mit Fernfeldmethoden wird TENOM wahrscheinlich weiterhin eine etwas höhere Ortsauflösung bieten, die hauptsächlich vom Durchmesser des Spitzenendes begrenzt wird. Für die Fluoreszenzmikroskopie von Emittoren mit hoher Quantenausbeute bieten Fernfeldmethoden hingegen eine deutlich kürzere Aufnahmezeit im Vergleich zu TENOM auf Basis der Rastersondenmikroskopie. In der Tat ermöglicht STED bereits die Fluoreszenzmikroskopie mit Video-Wiederholraten.^[21] Da das Signal bei TENOM auf elektromagnetischen Nahfeldwechselwirkungen zwischen Spalte und Probe beruht, kann die gemessene optische Antwort der Probe grundlegend von der Fernfeldmessung abweichen. Um dies im Hinblick auf die Probencharakterisierung zu bewerten und den Nahfeldkontrast quantitativ zu bestimmen, muss der Einfluss der Spalte modelliert und im Detail verstanden werden. Des Weiteren ist die kontrollierte, reproduzierbare und idealerweise parallele Herstellung von Spitzen mit hoher Feldverstärkung eine Voraussetzung für die breite Anwendbarkeit von TENOM. Dies wird insbesondere für Ansätze mit Hintergrundreduzierung, wie beispielsweise TOA-Sonden, sehr schwierig sein. Es existieren zwar bereits kompakte Mikroskopiesysteme, die AFM/STM und optische Mikroskopie integrieren, sie können hinsichtlich der Benutzerfreundlichkeit aber noch weiter optimiert werden. Neben den bislang beispiellosen Möglichkeiten der Probenanalyse, die TENOM bietet, ist dies auch ein faszinierendes Forschungsfeld, das unser Verständnis der optischen Nahfeldphänomene noch wesentlich erweitern wird.

Mein Dank gilt den Mitarbeitern in diesem aufregenden Forschungsfeld. Die Projekte wurden durch die Deutsche For-

schungsgemeinschaft (DFG-HA4405/3-1) und die Nanosystems Initiative Munich (NIM) gefördert.

Eingegangen am 6. April 2008

Online veröffentlicht am 22. September 2008

- [1] E. J. Sánchez, L. Novotny, X. S. Xie, *Phys. Rev. Lett.* **1999**, *82*, 4014–4017.
- [2] S. Nie, S. R. Emory, *Science* **1997**, *275*, 1102–1106.
- [3] J. Y. P. Butter, B. Hecht, B. R. Crenshaw, C. Weder, *J. Chem. Phys.* **2006**, *125*, 154710.
- [4] P. Kukura, M. Celebrano, A. Renn, V. Sandoghdar, *Condens. Matter* **2008**, arXiv: 0802.1206v1.
- [5] D. W. Pohl, W. Denk, M. Lanz, *Appl. Phys. Lett.* **1984**, *44*, 651–653.
- [6] A. Lewis, M. Isaacson, A. Harootunian, A. Muray, *Ultramicroscopy* **1984**, *13*, 227–231.
- [7] D. W. Pohl, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A* **2004**, *362*, 701–717.
- [8] L. Novotny, *Progress in Optics*, Vol. 50 (Hrsg.: E. Wolf), Elsevier, Amsterdam, **2007**, S. 137–184.
- [9] L. Novotny, B. Hecht, *Principles of Nano-Optics*, Cambridge University Press, Cambridge, **2006**.
- [10] „Tip enhancement“: *Advances in Nano-Optics and Nano-Photonics* (Hrsg.: S. Kawata, V. M. Shalaev), Elsevier, Amsterdam, **2007**.
- [11] A. Hartschuh, M. R. Beversluis, A. Bouhelier, L. Novotny, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A* **2004**, *362*, 807–819.
- [12] A. Bouhelier, *Micr. Res. Techn.* **2006**, *69*, 563–579.
- [13] E. Abbe, *Arch. Mikrosk. Anat.* **1873**, *9*, 413.
- [14] L. Rayleigh, *Philos. Mag.* **1879**, *8*, 261–274.
- [15] M. Born, E. Wolf, *Principles of Optics*, 6. Aufl., Pergamon, Oxford, **1970**.
- [16] M. Dyba, S. Hell, *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *88*, 163901.
- [17] R. J. Kittel, C. Wichmann, T. M. Rasse, W. Fouquet, M. Schmidt, A. Schmid, D. A. Wagh, C. Pawlu, R. R. Kellner, K. I. Willig, S. Hell, E. Buchner, M. Heckmann, S. J. Sigrist, *Science* **2006**, *312*, 1051–1054.
- [18] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H. F. Hess, *Science* **2006**, *313*, 1642–1645.
- [19] M. J. Rust, M. Bates, X. Zhuang, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 793–796.
- [20] A. Yildiz, M. Tomishige, R. D. Vale, P. R. Selvin, *Science* **2004**, *303*, 676–678.
- [21] S. Hell, *Science* **2007**, *316*, 1153–1158.
- [22] B. Huang, W. Wang, M. Bates, X. Zhuang, *Science* **2008**, *319*, 810–813.
- [23] N. Anderson, P. Anger, A. Hartschuh, L. Novotny, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 744–749.
- [24] E. Betzig, J. K. Trautman, *Science* **1992**, *257*, 189–195.
- [25] B. Dunn, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2891–2928.
- [26] L. Novotny, D. W. Pohl, *NATO Adv. Study Inst. Ser. Ser. E* **1995**, *184*, 21–33.
- [27] J. Wessel, *J. Opt. Soc. Am. B* **1985**, *2*, 1538–1541.
- [28] B. Knoll, F. Keilmann, *Nature* **1999**, *399*, 134–137.
- [29] R. Hillenbrand, T. Taubner, F. Keilmann, *Nature* **2002**, *418*, 159–162.
- [30] F. Keilmann, R. Hillenbrand, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A* **2004**, *362*, 787–805.
- [31] A. Zayats, V. Sandoghdar, *Opt. Commun.* **2000**, *178*, 245–249.
- [32] A. V. Zayats, I. I. Smolyaninov, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A* **2004**, *362*, 843–860.
- [33] A. Bouhelier, M. Beversluis, A. Hartschuh, L. Novotny, *Phys. Rev. Lett.* **2003**, *90*, 013903.
- [34] M. Danckwerts, L. Novotny, *Phys. Rev. Lett.* **2007**, *98*, 026104.

- [35] S. M. Stöckle, Y. D. Suh, V. Deckert, R. Zenobi, *Chem. Phys. Lett.* **2000**, *318*, 131–136.
- [36] N. Hayazawa, Y. Inouye, Z. Sekkat, S. Kawata, *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *335*, 369–374.
- [37] A. Hartschuh, E. J. Sánchez, X. S. Xie, L. Novotny, *Phys. Rev. Lett.* **2003**, *90*, 095503.
- [38] L. Novotny, R. X. Bian, X. S. Xie, *Phys. Rev. Lett.* **1997**, *79*, 645–648.
- [39] R. Kappeler, D. Erni, C. Xudong, L. Novotny, *J. Comput. Theor. Nanosci.* **2007**, *4*, 686–691.
- [40] C. C. Neacsu, G. A. Steudle, M. B. Raschke, *Appl. Phys. B* **2005**, *80*, 295–300.
- [41] Y. C. Martin, H. F. Hamann, H. K. Wickramasinghe, *J. Appl. Phys.* **2001**, *89*, 5774–5778.
- [42] J. T. I. Krug, E. J. Sánchez, X. S. Xie, *J. Chem. Phys.* **2002**, *116*, 10895–10901.
- [43] L. Novotny, *Phys. Rev. Lett.* **2007**, *98*, 266802.
- [44] P. Mühlischlegel, H.-J. Eisler, B. Hecht, D. W. Pohl, *Science* **2005**, *308*, 1607–1609.
- [45] T. Grosges, A. Vial, D. Barchiesi, *Opt. Express* **2005**, *13*, 8483–8497.
- [46] G. A. Baker, D. S. Moore, *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *382*, 1751–1770.
- [47] R. M. Bakker, H.-K. Yuan, Z. Liu, V. P. Drachev, A. V. Kildishev, V. M. Shalaev, R. H. Pedersen, S. Gresillon, A. Boltasseva, *Appl. Phys. Lett.* **2008**, *92*, 043101.
- [48] P. Olk, J. Renger, T. Härtling, M. T. Wenzel, L. M. Eng, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 1736–1740.
- [49] H. Xu, E. J. Bjerneld, M. Käll, L. Börjesson, *Phys. Rev. Lett.* **1999**, *83*, 4357–4360.
- [50] O. L. Muskens, V. Giannini, J. A. Sánchez-Gil, J. G. Rivas, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 2871–2875.
- [51] L. Rogobete, F. Kaminski, M. Agio, V. Sandoghdar, *Opt. Express* **2007**, *32*, 1623–1625.
- [52] A. Alù, N. Engheta, *Nat. Photonics* **2008**, *2*, 307–310.
- [53] I. Notingher, A. Elfick, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 15699–15706.
- [54] C. C. Neacsu, J. Dreyer, N. Behr, M. B. Raschke, *Phys. Rev. B* **2006**, *73*, 193406.
- [55] T. Yano, T. Ichimura, A. Taguchi, N. Hayazawa, P. Verma, Y. Inouye, S. Kawata, *Appl. Phys. Lett.* **2007**, *91*, 121101.
- [56] N. Hayazawa, H. Ishitobi, A. Taguchi, A. Tarun, K. Ikeda, S. Kawata, *Jpn. J. Appl. Phys.* **2007**, *46*, 7995–7999.
- [57] T. Kalkbrenner, U. Hakanson, A. Schädle, S. Burger, C. Henkel, V. Sandoghdar, *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *95*, 200801.
- [58] B. Pettinger, K. F. Domke, D. Zhang, R. Schuster, G. Ertl, *Phys. Rev. B* **2007**, *76*, 113409.
- [59] B. S. Yeo, T. Schmid, W. Zhang, R. Zenobi, *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *387*, 2655–2662.
- [60] M. Sackrow, C. Stanciu, M. A. Lieb, A. J. Meixner, *ChemPhysChem* **2008**, *9*, 316–320.
- [61] W. Zhang, X. Cui, B. S. Yeo, T. Schmid, C. Hafner, R. Zenobi, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 1401–1405.
- [62] B. Hecht, H. Bielefeldt, Y. Inouye, D. W. Pohl, L. Novotny, *J. Appl. Phys.* **1997**, *81*, 2492–2498.
- [63] S. I. Bozhevolyyi, *J. Opt. Soc. Am. B* **1997**, *14*, 2254–2259.
- [64] M. I. Stockman, S. V. Faleev, D. J. Bergman, *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *88*, 067402.
- [65] T. Brixner, F. J. García de Abajo, J. Schneider, W. Pfeiffer, *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *95*, 093901.
- [66] M. I. Stockman, M. F. Kling, U. Kleineberg, F. Krausz, *Nat. Photonics* **2007**, *1*, 539–544.
- [67] M. Aeschlimann, M. Bauer, D. Bayer, T. Brixner, F. J. García de Abajo, W. Pfeiffer, M. Rohmer, C. Spindler, F. Steeb, *Nature* **2007**, *446*, 301–304.
- [68] L. Novotny, S. Stranick, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2006**, *57*, 303–331.
- [69] J. Nelayah, M. Kociak, O. Stéphan, F. J. García de Abajo, M. Tené, L. Henrard, D. Taverna, I. Pastoriza-Santos, L. M. Liz-Marzán, C. Colliex, *Nat. Phys.* **2007**, *3*, 348–353.
- [70] E. M. Purcell, *Phys. Rev.* **1946**, *69*, 681.
- [71] M. Thomas, R. Carminati, J. R. Arias-Gonzalez, J.-J. Greffet, *Appl. Phys. Lett.* **2004**, *85*, 3863–3865.
- [72] H. Xu, J. Aizpurua, M. Käll, P. Apell, *Phys. Rev. E* **2000**, *62*, 4318–4323.
- [73] A. Hartschuh, H. Qian, A. J. Meixner, N. Anderson, L. Novotny, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 2310–2313.
- [74] K. Aslan, I. Gryczynski, J. Malicka, E. Matveea, J. R. Lakowicz, C. D. Geddes, *Anal. Biotechnol.* **2005**, *16*, 55–62.
- [75] R. R. Chance, A. Prock, R. Silbey, *J. Chem. Phys.* **1974**, *60*, 2744–2748.
- [76] W. L. Barnes, *J. Mod. Opt.* **1998**, *45*, 661–699.
- [77] A. Bek, R. Jansen, M. Ringler, S. Mayilo, T. A. Klar, J. Feldmann, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 585–589.
- [78] R. Carminati, J. J. Greffet, C. Henkel, J. M. Vigoureux, *Opt. Express* **2006**, *261*, 368–375.
- [79] N. A. Issa, R. Guckenberger, *Opt. Express* **2007**, *15*, 12131–12144.
- [80] G. Baffou, C. Girard, E. Dujardin, G. Colas des Francs, O. J. F. Martin, *Phys. Rev. B* **2008**, *77*, 121101.
- [81] J. N. Farahani, D. W. Pohl, H.-J. Eisler, B. Hecht, *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *95*, 017402.
- [82] P. Anger, P. Bharadwaj, L. Novotny, *Phys. Rev. Lett.* **2006**, *96*, 113002.
- [83] S. Kühn, U. Hakanson, L. Rogobete, V. Sandoghdar, *Phys. Rev. Lett.* **2006**, *97*, 017402.
- [84] P. Bharadwaj, P. Anger, L. Novotny, *Nanotechnology* **2007**, *18*, 044017.
- [85] R. Eckel, V. Walhorn, C. Pelargus, J. Martini, J. Enderlein, T. Nann, D. Anselmetti, R. Ros, *Small* **2007**, *3*, 44–49.
- [86] M. Ringler, A. Schwemer, M. Wunderlich, A. Nichtl, K. Kürzinger, T. A. Klar, J. Feldmann, *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *100*, 203002.
- [87] T. H. Tamminiau, F. D. Stefani, F. B. Segerink, N. F. van Hulst, *Nat. Photonics* **2008**, *2*, 234–237.
- [88] M. Stavola, D. L. Dexter, R. S. Knox, *Phys. Rev. B* **1985**, *31*, 2277–2289.
- [89] J. Azoulay, A. Débarre, A. Richard, P. Tchénio, *Europhys. Lett.* **2000**, *51*, 374–380.
- [90] J. R. Zurita-Sánchez, L. Novotny, *J. Opt. Soc. Am. B* **2002**, *19*, 1355–1362.
- [91] U. Hohenester, G. Goldoni, E. Molinari, *Appl. Phys. Lett.* **2004**, *84*, 3963–3965.
- [92] U. Hohenester, G. Goldoni, E. Molinari, *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *95*, 216802.
- [93] E. J. Ayars, H. D. Hallen, C. L. Jahncke, *Phys. Rev. Lett.* **2000**, *85*, 4180–4183.
- [94] K. Karrai, R. D. Grober, *Appl. Phys. Lett.* **1995**, *66*, 1842–1844.
- [95] B. Pettinger, B. Ren, G. Picardi, R. Schuster, G. Ertl, *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *92*, 096101.
- [96] T. Kalkbrenner, M. Ramstein, J. Mlynek, V. Sandoghdar, *J. Microsc.* **2001**, *202*, 72–76.
- [97] I. Barsegov, A. Lewis, A. Khatchatourians, A. Manevitch, A. Ignatov, N. Axelrod, C. Sukenik, *Appl. Phys. Lett.* **2002**, *81*, 3461–3463.
- [98] I. U. Vakarelski, K. Higashitani, *Langmuir* **2006**, *22*, 2931–2934.
- [99] P. J. Schuck, D. P. Fromm, A. Sundaramurthy, G. S. Kino, W. E. Moerner, *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *94*, 017402.
- [100] J. N. Farahani, H.-J. Eisler, D. W. Pohl, M. Pavius, P. Flückiger, B. Gasser, P. Hecht, *Nanotechnology* **2007**, *18*, 125506.
- [101] L. Novotny, E. J. Sánchez, X. S. Xie, *Ultramicroscopy* **1998**, *71*, 21–29.

- [102] S. Quabis, R. Dorn, O. Glöckl, M. Eberler, G. Leuchs, *Opt. Commun.* **2000**, *179*, 1–7.
- [103] A. Lieb, A. J. Meixner, *Opt. Express* **2001**, *8*, 458–474.
- [104] J. Steidtner, B. Pettinger, *Rev. Sci. Instrum.* **2007**, *78*, 103104.
- [105] Z. Ma, J. M. Gerton, L. A. Wade, S. R. Quake, *Phys. Rev. Lett.* **2006**, *97*, 260801.
- [106] H. G. Frey, F. Keilmann, A. Kriele, R. Guckenberger, *Appl. Phys. Lett.* **2002**, *81*, 5300–5320.
- [107] H. G. Frey, S. Witt, K. Felderer, R. Guckenberger, *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *93*, 200801.
- [108] T. H. Taminiau, R. J. Moerland, F. B. Segerink, L. Kuipers, N. F. van Hulst, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 28–33.
- [109] C. Ropers, C. C. Neacsu, T. Elsaesser, M. Albrecht, M. B. Raschke, C. Lienau, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 2784–2788.
- [110] J. M. Eckert, R. Freyland, H. Gersen, H. Heinzelmann, G. Schürmann, W. Noell, U. Staufer, N. F. de Rooij, *Appl. Phys. Lett.* **2000**, *77*, 3695–3697.
- [111] A. Bouhelier, J. Renger, M. R. Beversluis, L. Novotny, *J. Microsc.* **2003**, *210*, 220–224.
- [112] F. M. Huang, F. Festy, D. Richards, *Appl. Phys. Lett.* **2005**, *87*, 183101.
- [113] H. Frey, C. Bolwien, A. Brandenburg, R. Ros, D. Anselmetti, *Nanotechnology* **2006**, *17*, 3105–3110.
- [114] J. Seelig, K. Leslie, S. Renn, A. Kühn, V. Jacobsen, M. van de Corput, C. Wyman, V. Sandoghdar, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 685–689.
- [115] S. Kühn, V. Sandoghdar, *Appl. Phys. B* **2006**, *84*, 211–217.
- [116] A. Kramer, W. Trabesinger, B. Hecht, U. P. Wild, *Appl. Phys. Lett.* **2002**, *80*, 1652–1654.
- [117] C. Höppener, L. Novotny, *Nano Lett.* **2008**, *8*, 642–646.
- [118] „Carbon Nanotubes“: *Topics in Applied Physics, Vol. 111* (Hrsg.: A. Jorio, M. S. Dresselhaus, G. Dresselhaus), Springer, Berlin, **2008**.
- [119] K. Welsher, Z. Liu, D. Daranciang, H. Dai, *Nano Lett.* **2008**, *8*, 586–590.
- [120] F. Wang, G. Dukovic, L. E. Brus, T. F. Heinz, *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *92*, 177401.
- [121] M. J. O’Connell, S. M. Bachilo, C. B. Huffman, V. C. Moore, M. S. Strano, E. H. Haroz, K. L. Rialon, P. J. Boul, W. H. Noon, C. Kittrell, J. Ma, R. H. Hauge, R. B. Weisman, R. Smalley, *Science* **2002**, *297*, 593–596.
- [122] Z. Zhu, J. Crochet, M. S. Arnold, M. C. Hersam, H. Ulbricht, D. Resasco, T. Hertel, *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 3831–3835.
- [123] A. Hartschuh, H. N. Pedrosa, L. Novotny, T. D. Krauss, *Science* **2003**, *301*, 1354–1356.
- [124] A. Hagen, M. Steiner, M. B. Raschke, C. Lienau, T. Hertel, H. Qian, A. J. Meixner, A. Hartschuh, *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *95*, 197401.
- [125] H. Qian, C. Georgi, N. Anderson, A. A. Green, M. C. Hersam, L. Novotny, A. Hartschuh, *Nano Lett.* **2008**, *8*, 1363–1367.
- [126] H. Qian, T. Gokus, N. Anderson, A. J. Novotny, L. Meixner, A. Hartschuh, *Phys. Status Solidi B* **2006**, *243*, 3146–3150.
- [127] R. M. Roth, N. C. Panoiu, M. M. Adams, R. M. Osgood, Jr., C. C. Neacsu, M. B. Raschke, *Opt. Express* **2006**, *14*, 2921–2931.
- [128] W. Zhang, B. S. Yeo, T. Schmid, R. Zenobi, *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 1733–1738.
- [129] K. F. Domke, D. Zhang, B. Pettinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6708–6709.
- [130] K. F. Domke, D. Zhang, B. Pettinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14721–14727.
- [131] C. C. Neacsu, J. Dreyer, N. Behr, M. B. Raschke, *Phys. Rev. B* **2007**, *75*, 236402.
- [132] D. R. Ward, N. J. Halas, J. W. Ciszek, J. M. Tour, Y. Wu, P. Nordlander, D. Natelson, *Nano Lett.* **2008**, *8*, 919–924.
- [133] W. Zhang, T. Schmid, B. S. Yeo, R. Zenobi, *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 2104–2108.
- [134] K. F. Domke, D. Zhang, B. Pettinger, *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 8611–8616.
- [135] J. A. Dieringer, R. B. Lettan II, K. A. Scheidt, R. P. Van Duyne, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 16249–16256.
- [136] J. Steidtner, B. Pettinger, *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *100*, 236101.
- [137] E. Bailo, V. Deckert, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 1682–1685; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1658–1661.
- [138] M. S. Anderson, S. D. Gaimari, *J. Struct. Biol.* **2003**, *142*, 364–368.
- [139] H. Watanabe, Y. Ishida, N. Hayazawa, Y. Inouye, S. Kawata, *Phys. Rev. B* **2004**, *69*, 155418.
- [140] B. S. Yeo, S. Mäder, T. Schmid, W. Zhang, R. Zenobi, *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 4867–4873.
- [141] U. Neugebauer, M. Rösch, M. Schmitt, J. Popp, C. Julien, A. Rasmussen, C. Budich, V. Deckert, *ChemPhysChem* **2006**, *7*, 1428–1430.
- [142] C. Georgi, M. Hecker, E. Zschech, *Appl. Phys. Lett.* **2007**, *90*, 171102.
- [143] A. Tarun, N. Hayazawa, M. Motohashi, S. Kawata, *Rev. Sci. Instrum.* **2007**, *79*, 913706.
- [144] T. R. Hart, R. L. Aggarwal, B. Lax, *Phys. Rev. B* **1970**, *1*, 638–642.
- [145] C. Georgi, M. Hecker, E. Zschech, *J. Appl. Phys.* **2007**, *101*, 123104.
- [146] R. Ossikovski, Q. Nguyen, G. Picardi, *Phys. Rev. B* **2007**, *75*, 045412.
- [147] M. Motohashi, N. Hayazawa, A. Tarun, S. Kawata, *J. Appl. Phys.* **2008**, *103*, 034309.
- [148] N. Hayazawa, T. Yano, H. Watanabe, Y. Inouye, S. Kawata, *Chem. Phys. Lett.* **2003**, *376*, 174–180.
- [149] A. Hartschuh, A. J. Meixner, L. Novotny, *AIP Conf. Proc.* **2004**, *723*, 63–66.
- [150] N. Anderson, A. Hartschuh, L. Novotny, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2533–2537.
- [151] K. Kneipp, H. Kneipp, P. Corio, S. D. Brown, K. Shafer, J. Motz, L. T. Perelman, E. B. Hanlon, A. Marucci, G. Dresselhaus, M. S. Dresselhaus, *Phys. Rev. Lett.* **2000**, *84*, 3470.
- [152] N. Anderson, A. Hartschuh, L. Novotny, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 577–582.
- [153] T. Ichimura, N. Hayazawa, M. Hashimoto, Y. Inouye, S. Kawata, *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *92*, 220801.
- [154] T. Yano, Y. Inouye, S. Kawata, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 1269–1273.
- [155] N. Hayazawa, H. Watanabe, Y. Saito, S. Kawata, *J. Chem. Phys.* **2006**, *125*, 244706.