

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen
Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

**vorgelegt von
Dipl.-Phys. Anna Luise Grab
aus Sinsheim**

Tag der mündlichen Prüfung: 16.07.2014

Nanostrukturierte plasmonische
Oberflächen zum *in situ* Nachweis
von Proteinadsorptionsprozessen

Gutachter: Prof. (apl.) Dr. Reiner Dahint
Prof. Dr. Joachim Spatz

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Des Weiteren erkläre ich, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Heidelberg, den

.....

Nanostrukturierte plasmonische Oberflächen zum *in situ* Nachweis von Proteinadsorptionsprozessen

Zum markierungsfreien *in situ* Nachweis biospezifischer Bindungsereignisse in hoch-dichten Peptidarrays wurde die Ausbildung optischer Extinktionen in Kern-Schale-Nanopartikelfilmen mit metallisierten hexagonal dicht angeordneten dielektrischen Partikeln eingehend untersucht und die Nanostrukturen für den Einsatz in der Biosensorik optimiert. Die Extinktionsspektren im sichtbaren Spektralbereich wiesen scharfe Peaks auf, deren spektrale Lage sensitiv auf Änderungen des Brechungsindex in der Sensorumgebung reagiert. Die Signalentstehung wurde experimentell charakterisiert, mit elektronenstrahlolithographisch hergestellten Nanostrukturen moduliert und die Spektren mit rigoroser Beugungsanalyse im Fourier-Raum berechnet. Es konnte gezeigt werden, dass die Signale durch eine Kombination aus Interferenzen und plasmonischen Anregungen hervorgerufen werden.

Zur *in situ* Detektion von Bindungsereignissen ist es von zentraler Bedeutung, den Einfluss von Moleküladsorbaten und Brechungsindexänderungen der Volumenphase auf das Sensorsignal zu trennen. Es wurden Lichteinfallswinkel gefunden, unter denen der Einfluss des Brechungsindex der Flüssigkeit auf die Peakposition im Extinktionsspektrum vernachlässigbar war. Unter diesen Winkeln wurde die Adsorption von Biomolekülen *in situ* und zeitaufgelöst detektiert. Durch gezielte Beschichtungen mit Metall-organischen Gerüstverbindungen konnte die Nachweisempfindlichkeit gegenüber Diffusionsprozessen aus der Gasphase gesteigert werden. Im Hinblick auf diagnostische Anwendungen wurde unter Verwendung hochauflösender Lokalisationsmikroskopie die laterale Position einzelner Peptidmoleküle auf hexagonal angeordneten Goldnanopartikeln nach einer kovalenten Anbindung von Farbstoffmolekülen nachgewiesen.

Nanostructured plasmonic surfaces for *in situ* detection of protein adsorption processes

For label-free *in situ* detection of biospecific binding events in high-density peptide-arrays, the origin of optical extinctions in core-shell-nanoparticle-films with metallized hexagonally close packed dielectric particles has been investigated and the nanostructures have been optimized for biosensor applications. The extinction spectra in the visible regime exhibit sharp peaks, whose position is sensitive to changes in refractive index of the sensor environment. The cause of the signal was experimentally characterized, modelled with nanostructures fabricated by electron beam lithography and calculated with rigorous diffraction analysis in the Fourier-space. It has been proven that the signal is a combination of interference and plasmonic excitations.

For *in situ* detection of binding events it is important to separate the impact of molecule adsorption and refractive index changes in the bulk-phase. Angles have been found, under which the influence of the refractive index of the liquid on the peak position was negligible. Under these angles, the adsorption was detected *in situ*. Using selective coatings with metal-organic-frameworks, sensitivity was increased for diffusion processes from the gas-phase. With regard to diagnostic applications, the lateral position of individual peptide molecules was detected on hexagonally arranged gold nanoparticles by covalent attachment of dye molecules using high-resolution localization microscopy.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Einleitung und Motivation	1
1.2	Zielsetzung	2
2	THEORIE	3
2.1	Absorption	3
2.2	Dielektrische Funktion	4
2.3	Plasmonen-Resonanz	6
2.3.1	Propagierende Oberflächenplasmonen (SPR)	6
2.3.2	Anregung von Oberflächenplasmonen und Messmethoden	7
2.3.3	Lokalisierte Plasmonenresonanz (LSPR)	8
2.3.4	Plasmon-Hybridisierung in Kern-Schale-Nanopartikel	10
2.3.5	Plasmonische Kopplungen	12
2.4	Abhängigkeit der optischen Antwort vom Brechungsindex	14
2.4.1	Sensitivität gegenüber der Volumenphase	14
2.4.1.1	Untersuchung auf Oberflächen	14
2.4.1.2	Untersuchung in Lösung	15
2.4.2	Sensitivität gegenüber einer zusätzlichen Adsorbatschicht	15
2.4.3	Sensitivität gegenüber Multilag	17
2.5	Oberflächenstrukturierung mit selbstorganisierenden Monolagen (SAMs)	18
2.5.1	Mikrokontakt-Drucken	19
2.5.2	Metall-organische Gerüststrukturen (MOFs)	20
2.6	Mikroskopie unterhalb des Abbe-Limits und Charakterisierung der Proben	22
2.6.1	Rasterelektronenmikroskop	22
2.6.1.1	Aufbau des Rasterelektronenmikroskops (REM)	22
2.6.1.2	Detektoren	24
2.6.1.3	Kontrastarten	25
2.6.2	Auflösungsgrenze	25
2.6.3	Lokalisationsmikroskopie	27
2.6.3.1	Fluoreszenz	27
2.6.3.2	SPDM-Arbeitsprinzip	28
2.6.3.3	Alternative Messmethoden	29
2.6.4	Datenauswertung	30
2.6.4.1	Segmentierung	30
2.6.4.2	Lokalisation	31

2.7 Proteine und Proteinadsorption	33
2.7.1 Peptide	33
2.7.2 Fibrinogen	33
2.7.3 Adsorption	34
2.7.3.1 Wichtige Wechselwirkungen bei der Adsorption	34
2.7.3.2 Proteinadsorptionsprozesse auf nanostrukturierten Oberflächen	35
2.7.3.3 Theorie der Adsorption	35
2.7.4 Proteinresistente Oberflächen	38
2.8 Simulationstechnik	39
3 EXPERIMENTELLER TEIL	41
3.1 Geräte	41
3.1.1 Strahlungsquelle	41
3.1.2 Spektrometer	42
3.1.3 Glasfasern	43
3.1.4 REM	43
3.1.5 UV-NIR-Aufbau	44
3.1.6 SPR-Imaging-Aufbau	45
3.1.7 SPDM-Mikroskop	46
3.2 Chemikalien und Trägermaterialien	47
3.3 Präparation homogener Nanopartikeloberflächen	49
3.3.1 Übertragung dielektrischer Nanopartikel mit Kontaktpunkten mittels Floating	49
3.3.2 Metallisierung der Sensoroberflächen	50
3.3.2.1 Nasschemische Methoden	50
3.3.2.2 Ionen-Sputtern	51
3.3.2.3 Silberbeschichtung	51
3.3.3 Herstellung vollständig umhüllter Partikel	52
3.3.3.1 Plating in Suspension	52
3.4. Experimente zur Signalentstehung	53
3.4.1 Filme	53
3.4.2 Reaktives Ionen Plasmaätzen	53
3.4.3 Goldnanopartikel	53
3.4.3.1 Herstellung der Goldnanopartikel-Lösung	53
3.4.3.2 Messung in Transmission	54
3.4.3.3 Messung in Reflexion	54
3.4.4 Elektronenstrahlolithographisch hergestellte Oberflächen	54
3.5 Herstellung heterogener Oberflächen	56
3.5.1 Selbstorganisationsprozesse in hochgeordneten Templat-Strukturen	56
3.5.2 Nanopartikel auf DVD	57
3.5.3 Mikrokontaktdrucken	58

3.6 Anwendung	59
3.6.1 Metallorganische Gerüststrukturen	59
3.6.2 Sensitivitätstest gegenüber Proteinadsorption	60
3.6.3 Anwendungen im Arrayformat	60
3.6.3.1 Peptidtransfer	60
3.6.3.2 Passivierung	61
3.7 Herstellung der fluoreszenzmarkierten Proben	62
3.7.1 Substrate	62
3.7.2 Reaktive Farbstofflösung	64
3.7.3 Funktionalisierung und Bindung der Alexa Moleküle	64
3.8 Datenerhebung	66
3.8.1 Extinktionsspektren	66
3.8.2 Lineare Anpassung	66
3.8.3 SPR-Imaging	66
3.8.4 Fluoreszenzmessungen	67
4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	68
4.1 Signalentstehung	69
4.1.1 Dielektrische Kontaktpunkte in Kern-Schale-Nanopartikelfilmen	69
4.1.2 Interferenzen	73
4.1.2.1 Extinktionseigenschaften von planaren Filmen versus Nanopartikelfilme	73
4.1.2.2 Untersuchung der Extinktionseigenschaften isolierter Partikel	75
4.1.3 Einfluss der Metallisierung	79
4.1.3.1 Extinktionseigenschaften von Goldnanopartikeln gemessen in Transmission	79
4.1.3.2 Extinktionseigenschaften von Goldnanopartikeln gemessen in Reflexion	80
4.1.3.3 Variation der Metallhüllendicke von Kern-Schalen-Nanopartikelfilmen	82
4.1.3.4 Hüllenmaterial	83
4.1.3.5 Aluminiumfolie als Substrat	85
4.2 Sensitivität	86
4.2.1 Sensitivität von Gold-Nanopartikeln in Lösung	86
4.2.2 Sensitivität von Kern-Schale-Nanopartikelfilmen auf Gold	87
4.2.3 Sensitivität von Nanopartikelfilmen auf Aluminium-Folie	89
4.2.4 Sensitivität von planaren dielektrischen Filmen	89
4.3 Abhängigkeit vom Brechungsindex der Volumenphase und Reflexionswinkel	92
4.3.1 Kern-Schale-Nanopartikelfilme	92
4.3.1.1 Metallisierung mit Gold	92
4.3.1.2 Metallisierung mit Silber	94
4.3.2 Beitrag der lokalisierten Plasmonen zur Volumensensitivität	95
4.3.3 Separierte Partikel	96
4.3.4 Planare dielektrische Filme	96
4.3.4.1 Ohne Metallisierung	96
4.3.4.2 Mit Metallisierung	97

4.3.5	<i>In situ</i> Detektion in Echtzeit	99
4.4	Sensitivitätssteigerung	101
4.4.1	Sensitivitätssteigerung durch SURMOF-Beschichtung	101
4.4.1.1	Extinktionseigenschaften der Nanopartikelfilme mit SURMOF-Beschichtung	102
4.4.1.2	Beobachtung von Diffusionsprozessen in der Gasphase	102
4.4.1.3	Einsatz mit Gerüststrukturen beschichteter Sensoren unter Flüssigkeit	105
4.4.2	Sensitivitätssteigerung mit heterogenen Oberflächen	107
4.4.2.1	Selbstorganisation auf Gitterstrukturen	107
4.4.2.2	Sensitivität von Nanopartikelfilmen auf Gitterstrukturen	110
4.4.2.3	Selbstorganisation auf hochgeordneten Templat-Oberflächen	111
4.4.2.3	Untersuchung von Clustern	114
4.5	Optische Eigenschaften elektronenstrahlolithographisch hergestellter Proben	117
4.5.1	Elektronenstrahlolithographie als Alternative zu Selbstaggregationsprozessen	117
4.5.2	Stabilität unter Flüssigkeit	117
4.5.3	Extinktionseigenschaften	118
4.5.3.1	Abhängigkeit von der Probenorientierung	118
4.5.3.2	Einfluss der Strukturhöhe	119
4.5.3.3	Skalierung der Geometrie	121
4.5.3.4	Variation der Verbindungssteglänge	124
4.5.3.5	Abhängigkeit vom Reflexionswinkel	125
4.5.3.6	Abhängigkeit vom Brechungsindex und Eignung zur <i>in situ</i> Detektion	126
4.5.3.7	Messung und Modellierung der Sensitivität gegenüber Fibrinogen Adsorption	127
4.5.3.8	Einfluss der Polarisierung des Lichtes	130
4.6	Anwendungen	133
4.6.1	SPR-Imaging im Arrayformat	133
4.6.2	Fluoreszenzmessungen mit Lokalisationsmikroskopie	135
4.6.2.1	Kalibrationstest des Mikroskops	136
4.6.2.2	Kern-Schale-Nanopartikel-Monolage	142
4.6.2.3	Untersuchung des Fluoreszenzverhaltens der Goldnanopartikel	144
4.6.2.4	Einsatz im Hinblick zur medizinischen Diagnostik	145
5	ZUSAMMENFASSUNG	149
6	VERZEICHNISSE	151
6.1	Literaturverzeichnis	151
6.2	Liste der betreuten Forschungsarbeiten	159
6.3	Abbildungsverzeichnis	160
6.4	Tabellenverzeichnis	174
6.5	Liste der Veröffentlichungen	175
7	DANKSAGUNG	176

1 Einleitung

1.1 Einleitung und Motivation

Die optischen Eigenschaften kolloidaler Nanopartikelsysteme sind faszinierend und erfreuten schon vor über 1000 Jahren die Menschen aufgrund ihrer leuchtenden Farben in Trinkbechern und Kirchenfenstern.^[1] Den großen Nutzen der auftretenden Effekte konnte man allerdings noch nicht erahnen, als Mie^[2] und Faraday experimentell und theoretisch einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Beobachtungen leisteten, Wood resonante Anomalien in metallischen Gittern untersuchte^[3] und Fano die Effekte durch Oberflächenwellen, den sogenannten Plasmonen, an Metall-Dielektrikum-Grenzflächen erklärte. Ein großer Fortschritt wurde infolge der Weiterentwicklung neuer Detektionstechnologien (z.B. STM, AFM, SNOM, REM),^[1] der Vakuumsysteme und insbesondere der Fortschritte der lithographischen Verfahren zur Nanostrukturierung von Oberflächen erzielt. Die Wechselwirkung von Licht mit Metallnanopartikeln oder periodischen metallischen Strukturen führt zu scharfen Resonanzen, die gegenüber dem Brechungsindex ihrer Umgebung sensitiv sind.^[4] Daher finden Plasmonen in vielen Bereichen zum Teil in Form patentgeschützter richtungsweisender Verfahren Anwendung. Wichtige Anwendungen sind die Wellenleitung, optische Filter und Nachweisverfahren im Bereich der medizinischen Diagnostik, wie der Genom- und Transkriptionsanalyse in DNA-Chips.^[5]

Als Alternative zu etablierten markerbasierten Analysetechniken mit hohen Nachweisempfindlichkeiten, basierend auf Fluoreszenzfarbstoffen, Enzymen, radioaktiven Isotopen oder mit Goldnanopartikeln markierten Reaktionspartnern, gewinnen markierungsfreie *ex situ* und *in situ* Methoden zunehmend an Interesse. Besonders wichtig sind Verfahren, die mehrere ähnliche Spezies bei gleichzeitig hoher Sensitivität nachweisen können,^[5] ^[6] spezifische Wechselwirkungen identifizieren und quantifizieren können, die Kinetik von Bindungsprozessen messen und Reaktionskonstanten bestimmen. Dies ist wichtig im Bereich der Entwicklung von Biosensoren sowie der Implantat-Technologie, wo die Körperverträglichkeit von Implantaten durch die Menge, Zusammensetzung und Konformation der adsorbierten Proteinschicht beeinflusst wird. Deshalb ist eine Untersuchung von Adsorptionsprozessen unter möglichst realitätsnahen Bedingungen, d.h. in direktem Kontakt mit der jeweiligen flüssigen Phase, von großer Bedeutung. Insbesondere für die Immundiagnostik ist dabei zusätzlich die parallelisierte Bindungsanalytik im Arrayformat erwünscht,^[6] ^[7] bei der eine große Anzahl verschiedener Fangmoleküle in dichter Anordnung auf Substraten immobilisiert sind und als Basis zur Wirkstoffsuche in einem Hochdurchsatz-Screening dienen.^[8] Im Gegensatz zu anderen gängigen Methoden, beispielsweise der Quarzkristallmikrowägung oder Ellipsometrie, ermöglicht die Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)-Mikroskopie die Auslesung von Bindungsereignissen im Arrayformat.^[6] Dabei können gleichzeitig mehr als 1300 Spots mit einer Detektionsgrenze von 0,3 nm/cm² und mit einer Zeitauflösung von 1 s ausgelesen werden. Eine höhere Sensitivität verspricht ein Biosensorbauelement, das die Aspekte von propagierenden sowie lokalisierten Oberflächenplasmonen und Interferenz verbindet.^[9] ^[10]

Die Grundlage der vorliegenden Arbeit bilden nanostrukturierte Biosensoren, bestehend aus Monolagen trägergebundener Kern-Schale-Nanopartikel-Oberflächen mit dielektrischem Kern und nasschemisch metallisierter Hülle aus Goldnanopartikeln. Dieses Nachweiselement kombiniert die drei wichtigen Aspekte der propagierenden, lokalisierten Plasmonen-Anregung sowie Interferenz und bietet dadurch besonders hohe Empfindlichkeit.^[11] Durch die Beschichtung mit Gold besteht zusätzlich die Möglichkeit Moleküle chemisch zu binden und den Sensor gezielt zu funktionalisieren.

1.2 Zielsetzung

Das Ziel der Arbeit besteht darin, ein integriertes bioanalytisches System auf Basis plasmonischer Nanostrukturen zu entwickeln, das die markierungsfreie und parallele *in situ* Detektion biospezifischer Bindungsereignisse ermöglicht.

Als Sensorelement werden hexagonal dicht gepackte Kern-Schale-Nanopartikelfilme (Abb. 1, III.) eingesetzt, die aus oberflächenadsorbierten Nanopartikeln mit dielektrischem Kern und metallischer Hülle bestehen. Anhand vereinfachter Modellsysteme soll die Signalentstehung in den plasmonischen Nanopartikelsensoren verstanden werden. Hierbei sind die plasmonischen Anregungen, Interferenzen und die Kopplung wechselwirkender Anregungen im Material zu untersuchen. Zusätzlich sollen die Partikelfilme mit elektronenstrahlolithographisch hergestellten Nanostrukturen verglichen und die Sensorantwort berechnet werden.

Darüber hinaus sollen die Schichtstrukturen den markierungsfreien *in situ* Nachweis von Molekülanlagerungen in Echtzeit ermöglichen. Zur Beobachtung von Adsorptionsprozessen, wird meistens von einer Pufferlösung zum Analyten gewechselt. Für markierungsfreie Detektionsmethoden, die bezüglich Brechungsindexänderung in der Sensorumgebung sensitiv sind, kann dabei ein Problem auftreten: Die Signaländerung setzt sich aus zwei Anteilen zusammen, da sich der Brechungsindex über dem Sensor sowohl in der Lösung ändert als auch direkt auf der Sensoroberfläche infolge des Bindungsprozesses (Abb. 1, I. und II.).

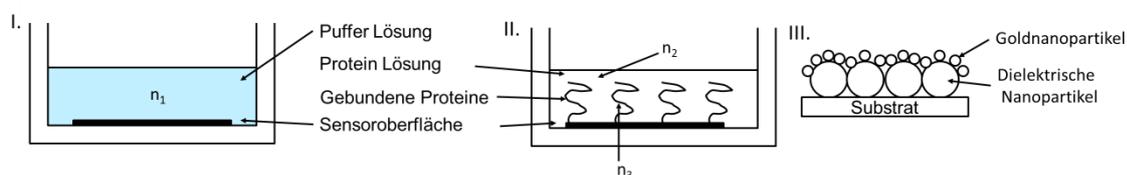


Abb. 1: Zwischen dem Volumeneffekt und dem Bindungsprozess muss separiert werden. **I.:** Eine Pufferlösung mit Brechungsindex n_1 befindet sich in Kontakt mit der Sensoroberfläche. **II.:** Eine Protein-Lösung mit Brechungsindex n_2 befindet sich in Kontakt mit der Sensoroberfläche. Infolge des Adsorptionsprozesses bildet sich ein Proteinfilm mit Brechungsindex n_3 auf dem Sensor. **III.:** Schematischer Aufbau des Sensors.

Um den Volumeneffekt zu charakterisieren werden die Extinktionseigenschaften in Abhängigkeit vom Reflexionswinkel und Brechungsindex in der Sensorumgebung mit Glycerin-Wasser-Gemischen untersucht.

Anschließend soll die Leistungsfähigkeit des Sensors zur markierungsfreien hoch-parallelen und quantitativen Analyse von Peptidarrays demonstriert werden. Hierzu werden mit einem Laserbasierten Verfahren Peptidarrays hergestellt^[12] und auf die plasmonischen Nanostrukturen übertragen.

Im letzten Schritt soll ein Sensorsystem entwickelt werden, das die parallele Detektion von Bindungsereignissen auf Einzelmolekülniveau ermöglicht. Zu diesem Zweck werden hexagonal angeordnete Goldnanopartikel mit der mizellaren Blockcopolymer Nanolithographie hergestellt. Auf den Goldnanopartikeln werden einzelne Peptidmoleküle adsorbiert. Die Detektion erfolgt mit Lokalisationsmikroskopie. Zuvor soll die Kalibration des Fluoreszenzmikroskops überprüft werden. Dies geschieht mit Hilfe der elektronenstrahlolithographisch hergestellten Nanostrukturen.

2 Theorie

2.1 Absorption

Im Rahmen dieser Arbeit werden die optischen Eigenschaften strukturierter Oberflächen untersucht. Eine wichtige Eigenschaft ist die Absorption von elektromagnetischer Strahlung, die mithilfe der Optischen Dichte als Intensitätsverhältnis quantifiziert werden kann.^[13]

$$O.D. = -\log_{10} \frac{I(l)}{I_0} \quad \text{Formel 1}$$

Zum Beispiel wird zur Messung der Absorptionsbanden einer Flüssigkeit monochromatisches Licht der Intensität I_0 durch eine Küvette gestrahlt und die Abschwächung der Strahlintensität beim Durchgang durch die Flüssigkeit detektiert. Die Abschwächung hängt nach dem Lambert-Beerschen Gesetz exponentiell von der räumlichen Ausdehnung l des Mediums und dem Extinktionskoeffizient ab.

$$I(l) = I_0 e^{-\alpha l} \quad \text{Formel 2}$$

Der Extinktionsquerschnitt α ergibt sich additiv aus dem Absorptions- und Streuquerschnitt und beschreibt die Wechselwirkung von elektromagnetischen Feldern mit Festkörpern. Die mathematische Beschreibung der Wechselwirkung geht von den Maxwellgleichungen in Materie aus. Diese führen auf die Telegraphengleichung. Die Probe wird mittels der frequenzabhängigen dielektrischen Funktion $\epsilon(\omega)$ charakterisiert.^[14] Mit dem Ansatz einer ebenen Welle erhält man den komplexen Brechungsindex $n(\omega)$ und hieraus die komplexe dielektrische Funktion $\epsilon(\omega)$.

$$n(\omega) = \tilde{n}(\omega) + i\kappa(\omega) = \sqrt{\epsilon_\infty + i \frac{\sigma(\omega)}{\epsilon_0 \omega}} = \sqrt{\epsilon(\omega)} \quad \text{Formel 3}$$

mit dem Realteil des Brechungsindex \tilde{n} , dem Absorptionskoeffizienten κ , der Frequenz ω , der Hintergrundpolarisierbarkeit ϵ_∞ , der dielektrischen Konstanten ϵ_0 und der Leitfähigkeit σ . Der Absorptionskoeffizient

$$\kappa(\omega) = \sqrt{-\frac{\epsilon_1(\omega)}{2} + \frac{1}{2} \sqrt{\epsilon_1(\omega)^2 + \epsilon_2(\omega)^2}} \quad \text{Formel 4}$$

hängt ab von dem Realteil ϵ_1 und vom Imaginärteil ϵ_2 der dielektrischen Funktion. Die Eindringtiefe δ_{Skin} ergibt sich zu

$$\delta_{\text{Skin}}(\omega) = \frac{c}{\omega \kappa(\omega)} \quad \text{Formel 5}$$

2.2 Dielektrische Funktion

Die dielektrische Funktion gibt den Zusammenhang von elektrischem Feld E und der Dichte der elektrischen Dipolmomente, der Polarisation P , an.^{[15] [16]} Sie wird über die dielektrische Verschiebung D definiert. Die dielektrische Verschiebung ist mit der äußeren Ladungsdichte so verbunden, wie E mit der gesamten Ladungsdichte, die sich aus externer ρ_{ext} und induzierter ρ_{ind} Ladungsdichte zusammensetzt.

$$\vec{D} = \vec{E} + 4\pi\vec{P} = \epsilon\epsilon_0\vec{E} \quad \text{Formel 6}$$

$$\text{div } D = \text{div} \sum \epsilon(\vec{k})\epsilon_0\vec{E}(\vec{k})e^{-i\vec{k}\vec{r}} = 4\pi \sum \rho_{ext}(\vec{k})e^{-i\vec{k}\vec{r}} \quad \text{Formel 7}$$

$$\text{div } E = \text{div} \sum \vec{E}(\vec{k})e^{-i\vec{k}\vec{r}} = 4\pi \sum (\rho_{ext}(\vec{k}) + \rho_{ind}(\vec{k}))e^{-i\vec{k}\vec{r}} \quad \text{Formel 8}$$

\vec{k} ist der Wellenvektor und \vec{r} der Ortsvektor. Aus den Beziehungen für die Fourierkomponenten folgt

$$\epsilon(\vec{k}) = \frac{\rho_{ext}(\vec{k})}{\rho(\vec{k})} \quad \text{Formel 9}$$

Im Fall eines Elektronengases beschreibt die dielektrische Funktion wichtige Grenzfälle: Die Plasmaschwingungen, das sind kollektive Anregungen des Elektronengases relativ zum Gitter, sowie die elektronische Abschirmung der Elektronen-Elektronen-Wechselwirkung, der Elektronen-Gitter-Wechselwirkung und der Elektronen-Fremdatom-Wechselwirkung.^[15]

Drude-Sommerfeld-Modell

Einen Ansatz zur Beschreibung der dielektrischen Funktion bei großen Wellenlängen erhält man aus der Bewegung eines freien Elektrons nach dem Drude-Sommerfeld-Modell.^{[14] [15]} Dabei werden die Prinzipien der kinetischen Gastheorie auf Leitungsbandelektronen in Metallen angewendet. Die Grundannahme des Modells ist die Beschreibung der Leitungselektronen als freies Elektronengas unter Vernachlässigung der Wechselwirkungen der Elektronen untereinander und mit den Atomrümpfen. Der Widerstand wird durch Stöße mit atomaren Defekten und Phononen hervorgerufen.^[17] Das Modell liefert wichtige Erkenntnisse zur Beschreibung der spezifischen Wärme von Festkörpern.^[14] Die Bewegungsgleichung eines freien Elektrons im elektrischen Feld führt bei optischen Frequenzen zur dielektrischen Funktion, die von der Frequenz, der Elektronenladung e , Elektronendichte n und Elektronenmasse m abhängt.^[15]

$$\epsilon(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2} \quad \text{Formel 10}$$

mit der Plasmafrequenz

$$\omega_p = \frac{ne^2}{\epsilon_0 m} \quad \text{Formel 11}$$

Allerdings stellt das Drude-Modell im sichtbaren Spektralbereich nur eine Näherung der dielektrischen Funktion dar (Abb. 2). Im IR-Bereich ist die Übereinstimmung besser.

2.2 Dielektrische Funktion

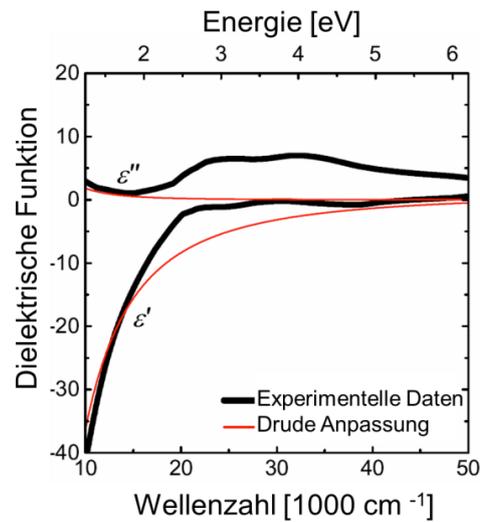


Abb. 2: Dielektrische Funktion von Gold im sichtbaren Spektralbereich. **Schwarz** sind die experimentellen Daten^[18], **rot** ist die Anpassung mit dem Drude-Modell (nach^[19]).

Die dielektrischen Eigenschaften im sichtbaren und UV-Bereich werden durch zwei Effekte bestimmt: die Interband- und Intrabandübergänge von Elektronen aus dem Valenzband ins Leitungsband. Die Interbandübergänge bewirken eine Zunahme des Imaginärteils der dielektrischen Funktion. Bei Interbandübergängen wird im Bereich der Eindringtiefe der elektromagnetischen Felder eine Polarisierung bewirkt, die zu einer kohärenten Schwingung führt.

2.3 Plasmonen-Resonanz

Plasmonen sind die Quanten, die Plasmaschwingungen zugeordnet werden. Um Oberflächenplasmonen zu beschreiben, braucht man zwei Konzepte: Das eine ist die Ausbreitung von Licht in Materie, das andere sind die Erhaltungssätze bei der Anregung von Plasmonen.^[20] Plasmonen finden Anwendungen in vielen Bereichen, wie z.B. in der Biosensorik, der Bestimmung von Affinitätsparametern verschiedener biologischer Wechselwirkungssysteme, photothermischer Krebstherapie^[21], Wellenleitung,^[22] Messung der Leitfähigkeit von Molekülen^[23] und in den feldverstärkenden Spektroskopie-Techniken wie der oberflächenverstärkten Infrarot-Absorption^[24] ^[25] (SEIRA) und der oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie^[26] ^[27] ^[28] (SERS), die Sensitivitäten bis zur Einzelmolekül-Detektion erreichen.

2.3.1 Propagierende Oberflächenplasmonen (SPR)

Man unterscheidet drei Typen von Plasmonen, die propagierenden, die lokalisierten und die akustischen.^[29] ^[30] ^[31] ^[32] Letztere werden hier nicht behandelt.

Ausgedehnte oder propagierende Plasmonen können als zweidimensionales Elektronengas, das an der Grenzfläche zwischen Metall und Dielektrikum existiert, beschrieben werden (Abb. 3, links).

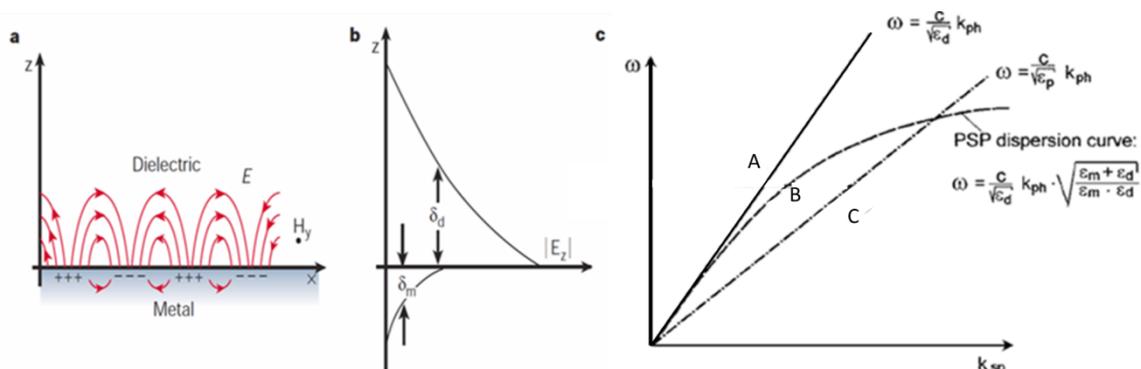


Abb. 3: Darstellung von der propagierenden Plasmonenresonanz,^[33] der gewählten Geometrie und des Koordinatensystems (**a, links**), der Abklinglängen im Metall und Dielektrikum (**b, Mitte**) und der Dispersionsrelation von Licht und Oberflächenplasmonen (**c, rechts**)^[34] Die Anregung kann mit einem Otto-Aufbau erfolgen, bei dem Laserlicht unter der Bedingung der Totalreflexion an der Basis eines Prismas reflektiert wird. Die Basis ist die Grenzfläche zu einem Goldfilm. Die Kurve **A** kennzeichnet den Fall ohne Prisma und stellt die Dispersionsrelation eines Photons, das sich als ebene Welle in Luft ausbreitet, dar. Es tritt kein Schnittpunkt mit der Dispersionskurve **B** auf. **B** ist die Dispersion des Oberflächenplasmons, das sich an der Metall/Dielektrikum-Grenzfläche ausbreitet. **C** ist die Dispersionsrelation eines Photons, das sich im Prisma fortbewegt. Im Schnittpunkt der Kurven **B** und **C** erfolgt die Anregung der Plasmonen.

Entscheidend ist die Polarisation von freien als auch von induzierten Ladungen, die durch ein elektromagnetisches Feld erzeugt wird.^[35] Es gibt mehrere Ansätze die plasmonischen Anregungen zu motivieren.^[36] ^[37] Eine Darstellungsweise betrachtet die Leitungselektronen als geladene inkompressible Flüssigkeit vor einer festen uniformen positiven Hintergrundladung, die durch die Ionenkerne generiert wird.^[38] Erfolgt eine Deformation η der Flüssigkeit, so entstehen durch elektrostatische Wechselwirkungen Oszillationen der Elektronen-Flüssigkeit, die Plasmonen.^[38] Die Energiezustände als Funktion ihres Wellenvektors sind durch die Dispersionsrelation gegeben.

2.3 Plasmonen-Resonanz

Die Herleitung geht von den Maxwellgleichungen in Materie aus,^[39] stellt die elektrischen und magnetischen Felder im Metall und Dielektrikum auf und verwendet die Stetigkeit der Normalkomponente der dielektrischen Verschiebung D und des Magnetfeldes B sowie die Stetigkeit der Tangentialkomponente von elektrischem Feld E und magnetischer Erregung H als Randbedingungen.^[20] Durch Lösen der Wellengleichung erhält man die Dispersionsrelation (Abb. 3, rechts).^{[40] [41]}

$$k_{sp} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_d \epsilon_m}{\epsilon_d + \epsilon_m}} \quad \text{Formel 12}$$

ϵ_d beschreibt die dielektrische Konstante des Dielektrikums, im Fall von Luft ist $\epsilon_d = 1$, ϵ_m ist die dielektrische Konstante des Metalls mit $\epsilon_m < 0$ und $|\epsilon_m| > 1$, c ist die Lichtgeschwindigkeit. Unter diesen Bedingungen ergibt sich kein Schnittpunkt mit der Dispersionskurve vom Licht und Plasmon. Eine Anregung ist nur unter der Bedingung möglich, dass Energie und Impuls erhalten sind. Bei gleicher Frequenz bzw. Energie muss der Wellenvektor und damit der Impuls des Lichts erhöht werden, so dass die oberflächenparallelen Komponenten der Wellenvektoren von Licht und Plasmon gleich sind.^[42] Zwei gängigen Verfahren sind die Gitterkopplung und die Prismenkopplung. Die Methoden werden im nächsten Abschnitt behandelt.

Die Anregung der Plasmonen kann nur mit dem parallel (p) zur Einfallenebene polarisierten Lichtanteil bewirkt werden, da zur Anregung der E -Vektor des Lichtes an das Dipolmoment parallel zur Ausbreitungsrichtung der Plasmonen ankoppeln muss. Der s -polarisierte Anteil kann keine Plasmonen erzeugen.^[43] Die plasmonische Anregung propagiert über Distanzen von der Größenordnung $10 - 100 \mu\text{m}$ bis zu 1 mm im Nah-Infraroten.^[33] Die Dämpfung erfolgt durch die Absorption des Metalls und hängt vom Realteil ϵ_m' und Imaginärteil ϵ_m'' der dielektrischen Funktion des Metalls bei der Resonanzfrequenz des Plasmons ab. Die Ausbreitungslänge δ_{SP} ist gegeben durch den reziproken Imaginärteil des Plasmonen-Wellenvektors.

$$\delta_{SP} = \frac{1}{2k_{SP}''} = \frac{c}{\omega} \left(\frac{\epsilon_m' + \epsilon_d}{\epsilon_m' \epsilon_d} \right)^{\frac{3}{2}} \frac{(\epsilon_m'')^2}{\epsilon_m''} \quad \text{Formel 13}$$

Das damit verbundene evaneszente Feld fällt zu beiden Seiten mit zunehmender Entfernung von der Grenzfläche (Abb. 3, b) exponentiell ab. Die Abklinglänge im Dielektrikum entspricht etwa der halben Wellenlänge (200 nm), im Metall ist die Abklinglänge durch die Eindringtiefe (Formel 5) gegeben.

2.3.2 Anregung von Oberflächenplasmonen und Messmethoden

Die Anregung von Oberflächenplasmonen mit Licht erfordert einen zusätzlichen Impuls parallel zur Grenzfläche.^{[44] [45] [46]}

Gitterkopplung

Zuerst wird die Methode der Gitterkopplung betrachtet (Abb. 4, links), bei der Licht auf ein Beugungsgitter fällt. Das Koordinatensystem sei so gewählt, dass die x -Richtung parallel zur Grenzfläche Gitter/Analyt verlaufe. Die x -Komponente des Wellenvektors des einfallenden Lichtes ist durch $k_x = 2\pi\lambda \sin\theta$ gegeben mit dem Einfallswinkel θ zur Probennormalen und der Wellenlänge λ des Lichtes. Durch die Beugung am Gitter wird die x -Komponente des Wellenvektors um ganzzahlige Vielfachen des Gittervektors erhöht und beträgt nach der Reflexion am Gitter:

2 Theorie

$k_{x, \text{reflektiert}} = k_x + m2\pi\Lambda$. m ist eine ganze Zahl und gibt die Beugungsordnung an und Λ ist die Gitterperiode. Ist m verschieden von Null, so ermöglicht der zusätzliche Impuls die Anregung der Plasmonen.

Otto- bzw. Kretschmann-Aufbau

Alternativ kann der Impuls durch Passieren eines Mediums mit Brechungsindex größer eins ($n > 1$) erhöht werden, sodass die Steigung der Dispersionsgeraden von Licht abnimmt (Abb. 3, rechts). Die Realisierungen mithilfe eines Prismas sind in Form des Otto- bzw. Kretschmann-Aufbaus bekannt. Im Kretschmann-Aufbau wird direkt auf die Grundfläche des Prismas ein dünner Gold-Film aufgebracht. Im Fall des Otto-Aufbaus ist ein kleiner Spalt zwischen der Basis des Prismas und dem Metallfilm (Abb. 4, rechts). In beiden Verfahren wird Licht an der Unterseite eines Prismas totalreflektiert, das heißt unter einem Winkel größer als dem Brewster-Winkel reflektiert. Das elektrische Feld dringt aus Stetigkeitsgründen ins Metall ein und koppelt im Resonanzfall an die Leitungsband-Elektronen des Metalls. Resonanz tritt auf, wenn die oberflächenparallele Komponente des Wellenvektors des Lichtes mit dem der Elektronen übereinstimmt.

Die Detektion erfolgt mit verschiedenen Methoden, beispielsweise kann die Reflexion von Licht winkelaufgelöst oder als Funktion der Wellenlänge detektiert werden.^[20] Erfolgt die Messung bei konstanter Wellenlänge, wird der Winkel durchgestimmt. Die Anregung der Plasmonen ist unter einem bestimmten Einfallswinkel erfüllt, der an einem scharfen Minimum in der Reflexionskurve zu erkennen ist. Bei Änderungen der dielektrischen Eigenschaften in der Goldfilmumgebung ändert sich der Winkel, unter dem das Reflexionsminimum auftritt. Deshalb kann der Aufbau zur Detektion von Adsorptionsprozessen verwendet werden. Erfolgt die Messung bei konstantem Reflexionswinkel, wird die Wellenlänge durchgestimmt. Die Resonanzwellenlänge, unter der die Anregung der Plasmonen erfolgt, ist am Minimum der Reflektivität zu erkennen. Infolge eines Adsorptionsprozesses auf der Goldschicht, verläuft die Dispersionskurve der Plasmonen (Kurve B in Abb. 3, c) flacher, der Schnittpunkt verschiebt sich zu kleineren Frequenzen und damit längeren Wellenlängen. Verfolgt man die Wellenlängenänderung zeitaufgelöst, ergibt sich die Bindungskinetik. Eine alternative Detektionsmethode ist das sogenannte SPR-Imaging. Bei konstantem Winkel und konstanter Wellenlänge wird die Reflektivität als Funktion der Position gemessen.

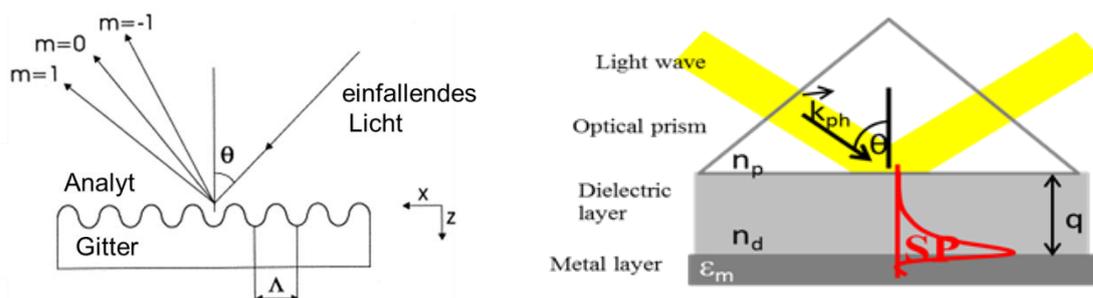


Abb. 4: Links: Anregung der Oberflächenplasmonen mit Gitterkopplung (nach ^[47]) und Rechts: Anregung der Oberflächenplasmonen mit dem Otto-Aufbau.^[48] θ ist der Einfallswinkel des Lichtes, m die Beugungsordnung, Λ die Gitterperiode, ϵ_m der Brechungsindex des Metalls, q der Abstand zwischen Prisma und Metallfilm. k_{ph} ist der Wellenvektor des Lichtes. n_p und n_d sind der Brechungsindex des Prismas bzw. der dielektrischen Schicht.

2.3.3 Lokalisierte Plasmonenresonanz (LSPR)

Eine direkte Anregung von Plasmonen mit Licht ist für Metallnanopartikel möglich. Durch ein elektromagnetisches Feld werden die Leitungsbandelektronen im Metall relativ zu den Atom-

2.3 Plasmonen-Resonanz

rümpfen ausgelenkt. Dadurch entsteht aufgrund der Coulombanziehung zwischen den Elektronen und dem Kern eine rücktreibende Kraft, die die Elektronen zu kohärenten Schwingungen anregt (Abb. 5). Man spricht von lokalisierten Plasmonen oder Partikel-Plasmonen, weil die kollektive Anregung durch die Abmessungen der Nanopartikel beschränkt ist. Aufgrund dieser Randbedingung treten diskrete Wellenvektoren auf.^[49] Mie berechnete durch Lösen der Maxwellgleichungen das Extinktionsspektrum^[50] eines beliebig geformten metallischen Nanopartikels

$$E(\lambda) = \frac{24\pi^2 N a^3 \epsilon_d^{\frac{3}{2}}}{\lambda * \ln(10)} \left[\frac{\epsilon_i(\lambda)}{(\epsilon_r(\lambda) + \chi \epsilon_d) + \epsilon_i(\lambda)^2} \right] \quad \text{Formel 14}$$

Die Extinktion ist stark abhängig von ϵ_r der Real- und ϵ_i der Imaginär-Komponente der dielektrischen Funktion ϵ des Metalls, von dem Formfaktor χ , dem Partikelradius a , ϵ_d ist die dielektrische Konstante der Partikelumgebung. Die Wellenlänge des Extinktionsmaximums wird bei Änderung dieser Parameter verschoben. Im Folgenden wird eine Metallkugel betrachtet. Ist die Wellenlänge des anregenden Lichtes größer als der Partikeldurchmesser, kann die mathematische Beschreibung im Rahmen der quasistatischen Näherung erfolgen.^[50] Die Maxwellgleichungen können unter dieser Voraussetzung durch die Laplace-Gleichung der Elektrostatik ersetzt werden.

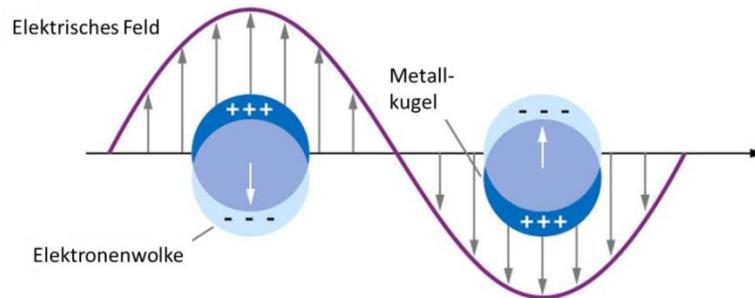


Abb. 5: Darstellung der Anregung der lokalisierten Plasmonenresonanz. (nach ^[29])

Die Polarisierbarkeit ist abhängig von der frequenzabhängigen dielektrischen Funktion ϵ des Metallpartikels und der dielektrische Konstante ϵ_d des Mediums in der Partikelumgebung.

$$\alpha(\omega) = 3\epsilon_0 V \frac{\epsilon(\omega) - \epsilon_d}{\epsilon(\omega) + 2\epsilon_d} \quad \text{Formel 15}$$

Die Extinktion wird für die Resonanzfrequenz ω_{res} maximal, bei der die Polarisation sehr groß wird. Hierzu muss der Nenner in Formel 15 klein werden, es folgt

$$\epsilon(\omega_{res}) = -2\epsilon_d \quad \text{Formel 16}$$

Mit der dielektrischen Funktion im Drude-Modell (Formel 10)^[51] ergibt sich die Resonanzfrequenz unter Vernachlässigung der Dämpfung im Metall zu

$$\omega_{res} = \frac{\omega_p}{\sqrt{1 + 2\epsilon_d}} \quad \text{Formel 17}$$

Zusätzlich können der Absorptions-, Streu- und Extinktionsquerschnitt mit der Polarisation berechnet werden. Der Absorptionsquerschnitt wächst proportional zum Wellenvektor und Imaginärteil der Polarisierbarkeit, während der Streuquerschnitt mit der vierten Potenz des Wellenvektors wächst und proportional zum Betrag der Polarisierbarkeit ist. Der Extinktionsquerschnitt ergibt sich additiv aus Absorptions- und Streuquerschnitt.^[51]

2.3.4 Plasmon-Hybridisierung in Kern-Schale-Nanopartikel

Besondere Bedeutung bei der Feinabstimmung der Resonanzlage gewinnen Kern-Schale-Nanopartikel.^[52] Die Energie der plasmonischen Anregung kann für sensorische Anwendungen über das Verhältnis der Radien von Kern und Hülle so eingestellt werden, dass sie nicht im Absorptionsbereich der zu untersuchenden Substanz liegt. Eine andere Anwendungsmöglichkeit ist der Einsatz plasmonischer Anregungen im Kern-Schale-Partikel als wellenlängenabhängigen Schalter für die Kurz- und Freischaltzustände, je nachdem ob sie eine Eingangsimpedanz bewirken oder nicht.^[53]

Das Verhalten in elektromagnetischen Feldern wird mathematisch durch die Erweiterung der Mie-Theorie auf Kern-Schale-Nanopartikel behandelt. Die Vorhersage der plasmonischen Eigenschaften können mithilfe des Hybridisierungsmodells (Abb. 6)^[52] analog zur Hybridisierung atomarer Orbitale veranschaulicht werden. Die Plasmonen von Kern-Schale-Nanopartikeln werden durch die Linearkombination der einzelnen Komponenten, dem Partikelplasmon und dem Hohlraum-Plasmon, beschrieben. Durch die Wechselwirkung der einzelnen Komponenten miteinander kommt es zur Aufspaltung in einen symmetrischen und einen antisymmetrischen Zustand. Die Plasmonen sind inkompressible Verformungen des Elektronengases. Das Elektronengas des Bulk-Materials sei als homogen angenommen mit der Elektronendichte n_0 und Bulk-Plasmafrequenz

$$\omega_B = \sqrt{\frac{4\pi e^2 n_0}{m_e}} \quad \text{Formel 18}$$

e ist die Elementarladung, m_e ist die Elektronenmasse.

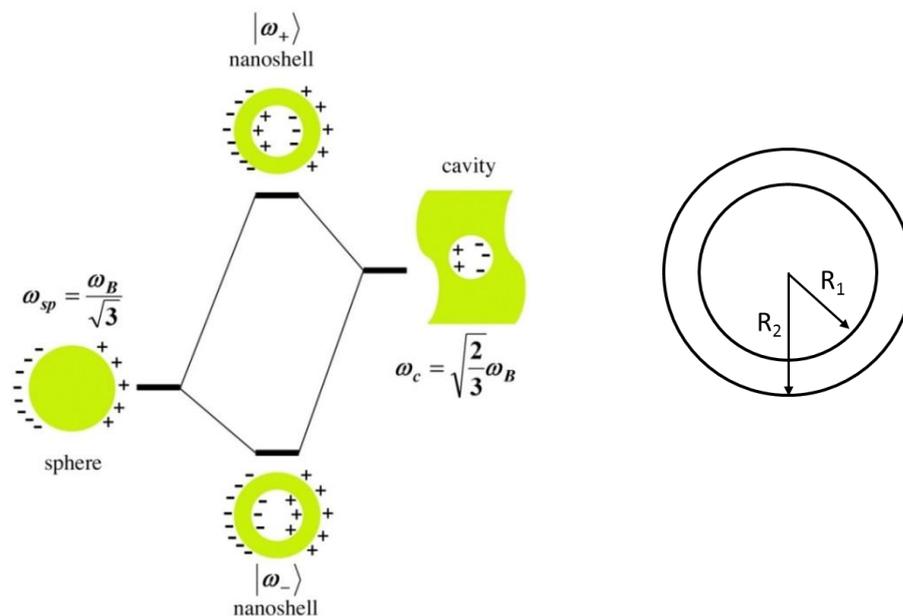


Abb. 6: Links: Darstellung des Energie-Diagramms für die Plasmon-Hybridisierung in Metall-Nanoschalen resultierend aus der Wechselwirkung zwischen Partikel-Plasmonen und Hohlraum-Plasmonen.^[52] **Rechts:** Schematische Darstellung der Nanopartikel Geometrie. R_1 ist der Radius der Kugel, die Differenz von R_2 und R_1 ist die Schalendicke.

2.3 Plasmonen-Resonanz

Die konzentrischen Kern-Schale-Nanopartikel sind rotationssymmetrisch aufgebaut. Analog zur Multipolentwicklung können die Anregungen nach Kugelflächenfunktionen entwickelt werden, z.B. in Form eines Dipol-Terms ($l=1$) oder Quadrupol-Terms ($l=2$). Die Resonanzfrequenzen der einzelnen Komponenten, des Partikels $\omega_{sp,l}$ und des Hohlraums $\omega_{c,l}$, sind eine Funktion der Mode l und der Bulk-Plasmafrequenz ω_B .^[54]

$$\omega_{sp,l} = \omega_B \sqrt{\frac{l}{2l+1}} \quad \text{Formel 19}$$

$$\omega_{c,l} = \omega_B \sqrt{\frac{l+1}{2l+1}} \quad \text{Formel 20}$$

Hybridisieren beide entstehen für jedes l zwei neue Resonanzen $\omega_{\pm,l}$ in Form einer symmetrischen und antisymmetrischen Lösung, die vom Verhältnis aus innerem Radius R_1 und äußerem Radius R_2 abhängen.

$$\omega_{\pm,l}^2 = \frac{\omega_B^2}{2} \left[1 \pm \frac{1}{2l+1} \sqrt{1 + 4l(l+1) \left(\frac{R_1}{R_2}\right)^{2l+1}} \right] \quad \text{Formel 21}$$

Durch die Wahl des Hüllenmaterials kann die Resonanz beeinflusst werden. Die dielektrischen Eigenschaften Silber und Gold (Abb. 7) unterscheiden sich zum Beispiel bezüglich der energetischen Lage der Interbandübergänge (grün schraffiert).^[55] Das Edelmetall Gold zeichnet sich durch leichte Funktionalisierbarkeit aus, sein Plasmonen-Peak bei 530 nm liegt in der Nähe des Interbandübergangs (2,5 eV), der zur Dämpfung der Plasmonen führt.^[14, 38, 56] Die Plasmonen Resonanz des Goldnanopartikels hat eine geringere Signalintensität im Vergleich zur einer gleich dimensionierten Silber-Nanokugel. Im Fall von Silber liegen die Interbandübergänge bei höherer Energie (3,8 eV), deshalb ist ihre Plasmonenresonanz stärker. Die spektrale Lage der Resonanz wird durch die dielektrischen Eigenschaften des Materials bestimmt, weitere Faktoren sind die Partikelgröße, -form und der Brechungsindex der nächsten Partikelumgebung.

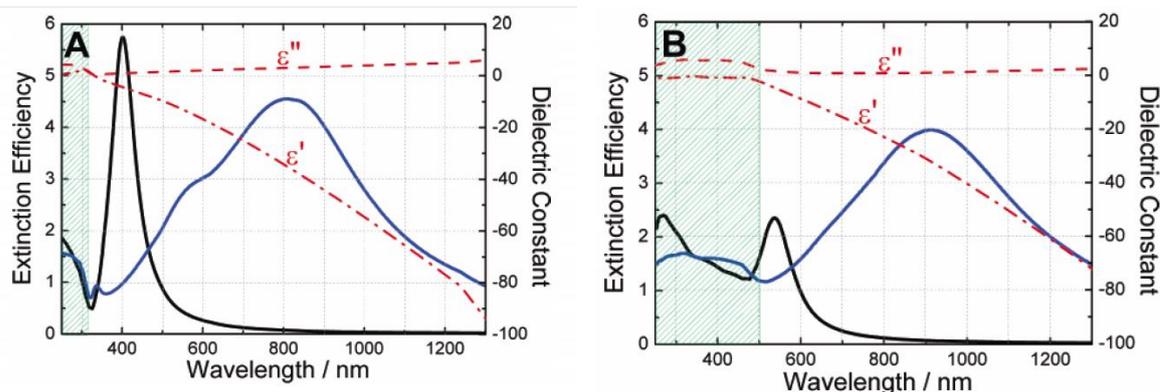


Abb. 7: Vergleich der theoretisch berechneten Extinktionswerte im Fernfeld einer Nanokugel von 20 nm Radius (**schwarze Kurve**) und eines Core-Shell-Nanopartikels (**blaue Kurve**) bestehend aus 63 nm Silika und 10 nm (**A**) Silber bzw. (**B**) Gold. Als Umgebung der Partikel wurde Ethanol gewählt (Brechungsindex: 1,36). Der Real- (ϵ') und Imaginärteil (ϵ'') der dielektrischen Funktionen (**rote Kurven**) wird für (**A**) Silber bzw. (**B**) Gold dargestellt.^[55]

Mehrere Schalen

Unter Verwendung des Hybridisierungs-Modells können auch die Eigenschaften von konzentrischen Nanopartikeln mit mehreren Schalen ermittelt werden. Durch die Wechselwirkung der unterschiedlichen Plasmonenresonanzen von inneren und äußeren Schalen treten im Extinktionsspektrum weitere Peaks auf (Abb. 8).^[57] Der Peak bei großen Wellenlängen (1600 nm) entspricht der Dipolresonanz. Die Resonanz bei 1000 nm enthält den Beitrag der Quadrupol-Resonanz. Im sichtbaren Spektralbereich werden höhere Multipolordnungen beobachtet. Die einzelnen Moden entsprechen einer unterschiedlichen Polarisierung der Schalen (Abb. 8, II.).

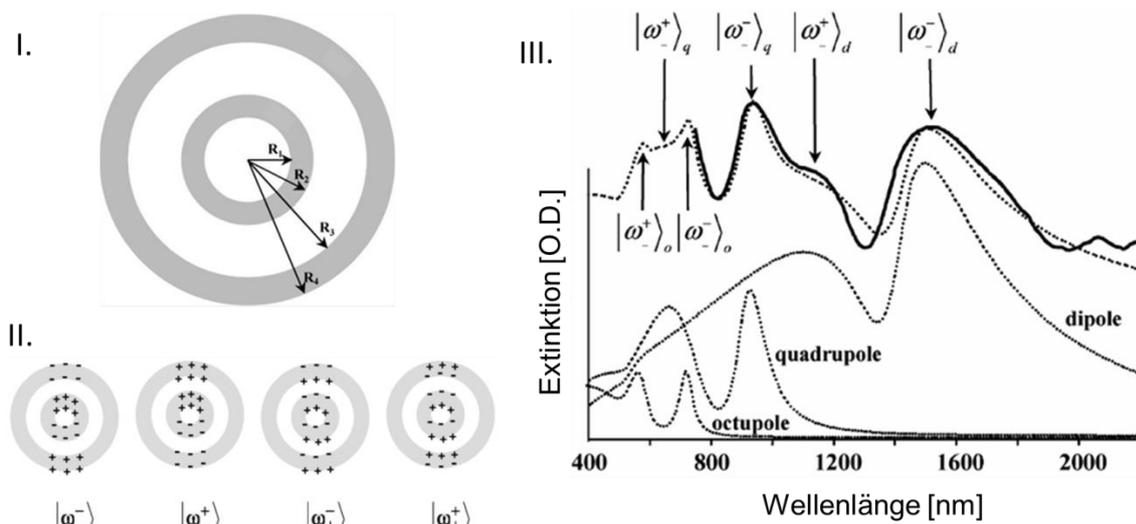


Abb. 8: I.: Schematische Darstellung konzentrischer Nanoschalen. Die Struktur besteht aus einem SiO₂-Nanopartikel mit Radius R₁, darauf aufgebracht ist eine Schale aus Gold mit dem Radius R₂, eine Schale aus SiO₂ mit Radius R₃ und einer Goldschale mit Radius R₄. II.: Veranschaulichung der induzierten Polarisierung in den konzentrischen Schalen für die beobachteten Moden. III.: Gemessenes Extinktionsspektrum (durchgezogene Kurve) und beobachtete Eigenmoden nach dem Hybridisierungsmodell für SiO₂/Au/SiO₂/Au-Nanoschalen mit Durchmessern R₁/R₂/R₃/R₄ = 80 nm/107 nm/135 nm/157 nm^[57].

2.3.5 Plasmonische Kopplungen

Meist werden metallische Nanopartikel aufgrund ihrer plasmonischen Eigenschaften in biosensorischen Experimenten eingesetzt um die Sensitivität konventioneller SPR-Sensoren zu erhöhen.^[58] Eine Herausforderung stellt dabei die stabile Bindung der Nanopartikel an die Oberfläche dar. Ein wichtiger Aspekt ist die Kontrolle ihrer Dichte auf der Oberfläche ohne Bildung von Aggregaten.^[59] In Abhängigkeit vom Abstand der Nanopartikel können plasmonische Kopplungen auftreten. Die Herleitung der Wechselwirkungen im Ensemble mit Multipolen kann anhand eines stark vereinfachten Modells zweier Dipole p₁ und p₂, die sich im Abstand r befinden, betrachtet werden.^[60] Die Wechselwirkungsenergie V ergibt sich unter Beschränkung auf Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zu

$$V = \frac{\vec{p}_1 \vec{p}_2 - 3 * (\vec{p}_1 * \hat{r})(\vec{p}_2 * \hat{r})}{4\pi \epsilon_0 r^3} \quad \text{Formel 22}$$

Der Abstand der Nanoobjekte bestimmt die Überlagerung der Felder der einzelnen Objekte, die Polarisation und damit die Resonanzbedingung.

2.3 Plasmonen-Resonanz

Im Modell eines Dimers wird zwischen symmetrischen und antisymmetrischen Zuständen unterschieden.^[17] Für kleine Distanzen zwischen den Partikeln werden die Ladungsträger bevorzugt an den Enden konzentriert, wobei im Fall der (zum Mittelpunkt der Lücke zwischen den Partikeln) asymmetrischen Mode (Abb. 9, rechts) eine verstärkte attraktive Kraft und damit reduzierte Rückstellkraft auftritt. Die Resonanz ist zu kleineren Energien verschoben. Im Fall der symmetrischen Ladungsverteilung findet aufgrund der Repulsion eine Verschiebung zu höheren Energien statt.

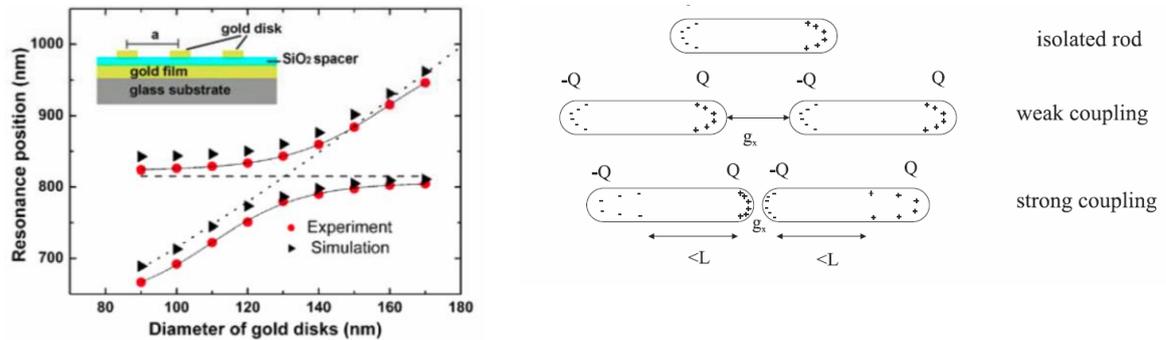


Abb. 9: Resonanzposition als Funktion des Durchmessers von Goldnanostrukturen mit einer Periode von 780 nm auf 31 nm SiO₂ (**links**).^[61] Schematische Darstellung der Verteilung der Oberflächenladungen für die asymmetrische, dipolaktive Mode im Fall isolierter, schwach und stark koppelnder Zylinder (**rechts**).^[17]

Typisch für starke plasmonische Kopplungen ist das Anticrossing Verhalten der Resonanzen (Abb. 9, links), das mithilfe des Modells zweier gekoppelter harmonischer Oszillatoren^[62] erklärt wird.^[61]

2.4 Abhängigkeit der optischen Antwort vom Brechungsindex

SPR-aktive Sensoren basieren auf der Abhängigkeit der Resonanzwellenlänge R vom Brechungsindex. Mit wachsendem Brechungsindex erfolgt eine Rotverschiebung der Resonanz, man spricht von Sensitivität. Im Folgenden werden drei Fälle unterschieden: der Sensitivität des Sensors gegenüber der Volumenphase, bei Adsorption einer Monolage eines dünnen Films und von Multilag.

2.4.1 Sensitivität gegenüber der Volumenphase

2.4.1.1 Untersuchung auf Oberflächen

Experimentelle Untersuchungen an SPR-Sensoren^[63] als auch von goldbeschichteten Nanopartikelfilmen (110 nm Polystyrol-Kugeln bedampft mit 20 nm Gold)^[64] zeigen eine Verschiebung der Resonanzlage infolge von Brechungsindexänderungen der Flüssigkeit über dem Sensor. Die Verschiebung der Resonanzwellenlänge R wächst mit zunehmendem Brechungsindexunterschied Δn_1 der verwendeten Lösungen über dem Sensor so an, dass die Messwerte in einem kleinen Brechungsindexbereich linear interpoliert werden können.

$$R = m * \Delta n_1$$

Formel 23

Die Steigung m der Geraden ist die Volumen-Sensitivität. Im Fall der Nanopartikelfilme beträgt sie $63,3 \pm 0,9$ nm/RIU, das heißt bei einer Änderung des Brechungsindex um 1 (entsprechend 1 RIU, engl. refractive index unit) verschiebt sich die Resonanzwellenlänge um $63,3 \pm 0,9$ nm. Die Sensitivität eines SPR-Sensors, der aus einem planaren Prisma mit einem Gold-Film von 50 nm besteht, ist um den Faktor 50 größer.^[63]

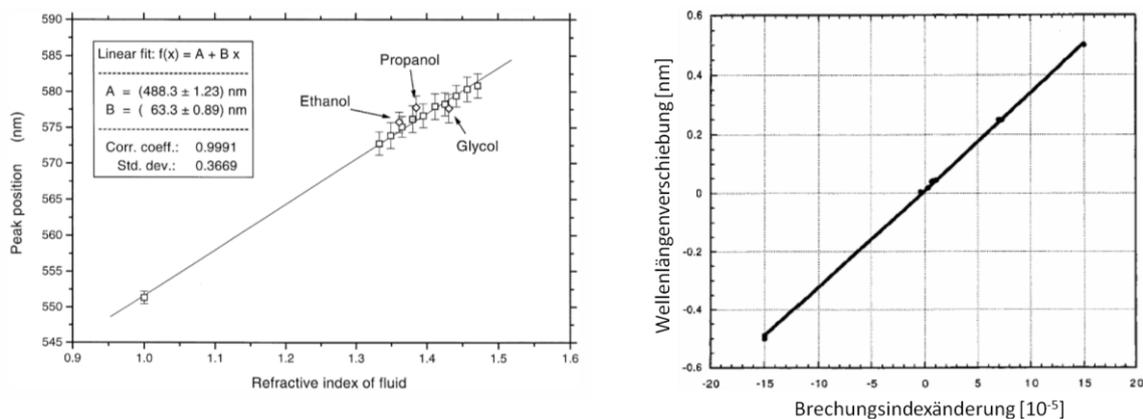


Abb. 10: Links: Abhängigkeit der Resonanzwellenlängenverschiebung vom Brechungsindex der Umgebung von goldbeschichteten Nanopartikelfilmen (20 nm Gold auf 100 nm Polystyrolkugeln)^[64] auf festem Träger. Experimentell erfolgt die Brechungsindexvariation durch Verwendung von Flüssigkeiten mit unterschiedlichem Brechungsindex z. B. Ethanol, Propanol und Glycerin-Wasser-Gemischen. Der Brechungsindex kann mit einem Abbe-Refraktometer gemessen werden oder nach der Clausius-Mossotti-Gleichung berechnet werden.^[14] Der untersuchte Brechungsindexbereich von 1,0 RIU bis 1,5 RIU umfasst 0,5 RIU (RIU=refractive index units). **Rechts:** Änderung der Resonanzwellenlänge infolge von Brechungsindexänderungen in der Umgebung eines SPR-Sensors, der aus einem planaren Prisma mit einem Gold-Film von 50 nm besteht.^[63] Der Verlauf ist in einem kleinen Brechungsindexbereich linear. Der dargestellte Bereich umfasst 0,0003 RIU.

2.4 Abhängigkeit der optischen Antwort vom Brechungsindex

2.4.1.2 Untersuchung in Lösung

Berechnungen der Sensitivität von Kern-Schale-Nanopartikeln in Lösung zeigen eine deutliche Abhängigkeit vom Verhältnis der Radien von Hülle und Kern (Abb. 11).^{[65] [66]} Im dargestellten Beispiel wurde ein SiO₂-Nanopartikel als Kern verwendet, das von einer Goldhülle mit unterschiedlicher Dicke umgeben ist. Als theoretische Grundlage wurde die Erweiterung der Mie-Theorie auf Kern-Schale-Nanopartikel eingesetzt und die Extinktionsspektren unter Variation des Brechungsindex berechnet. Die Änderung der Peakposition wurde als Funktion des Brechungsindex aufgetragen und die Sensitivität, d.h. Steigung der Ausgleichsgeraden bestimmt. Die Sensitivität nimmt mit wachsendem Schale-Kern-Verhältnis exponentiell ab (Abb. 11, rechts). Jain et al. führt die reduzierte Sensitivität auf die Abnahme des Feldes zurück.

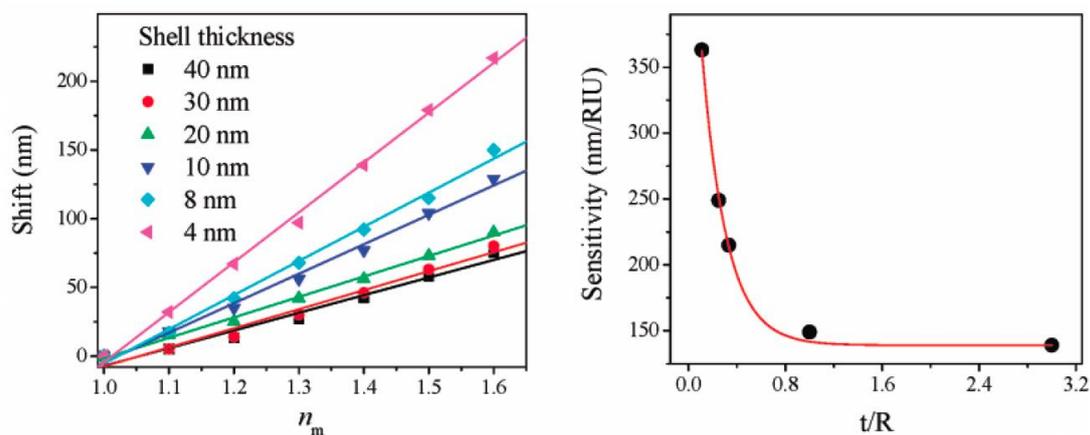


Abb. 11: Links: Dargestellt ist die Verschiebung der Resonanzwellenlänge als Funktion des Brechungsindex von Kern-Schale-Nanopartikeln mit unterschiedlicher Schalendicke aus Gold (schwarz 40 nm, rot 30 nm, grün 20 nm, blau 10 nm, hell blau 8 nm, magenta 4 nm) und einer SiO₂-Partikelgröße von 80 nm.^[65] Rechts: Abhängigkeit der Sensitivität vom Verhältnis aus Schalendicke t zum Partikelradius R .^[65] Die Werte basieren auf theoretischen Berechnungen auf Grundlage der Mie-Theorie für Kern-Schale-Nanopartikel. Für die Berechnungen wurden die Literaturwerte für die dielektrischen Daten der Goldschale nach Johnson und Christy^[18] verwendet. Für SiO₂ wurde ein konstanter Brechungsindex von 1,45 eingesetzt.

2.4.2 Sensitivität gegenüber einer zusätzlichen Adsorbatschicht

Jung et al.^[63] untersuchte SPR-Sensoren, die aus einem planaren Prisma mit einem Gold-Film von 50 nm bestehen. Für die Anwendung als Biosensor ist die Empfindlichkeit des SPR-Signals gegenüber Molekülanlagerungen auf der Sensoroberfläche entscheidend. Unter der Annahme, dass die Adsorption in Form einer Monolage einheitlicher Dicke erfolgt (Abb. 12, rechts), kann man die optischen Eigenschaften des Adsorbates und der Flüssigkeit mit einem effektiven Brechungsindex beschreiben.^[63] Der Schlüsselparameter bei der Berechnung des effektiven Brechungsindex ist die Abschwächung des evaneszenten Feldes mit der Entfernung von der Sensoroberfläche. Die Abschwächung ist wellenlängenabhängig und wächst mehr als linear mit der Wellenlänge.^[3] Typische Werte der Abschwächungslänge im sichtbaren Spektralbereich liegen bei 200 – 300 nm.^{[30] [33]} Kleine Nanopartikel haben wesentlich kürzere Abschwächungslängen ($\sim 5 - 15$ nm).^[67] Die Abhängigkeit der SPR-Antwort vom effektiven Brechungsindex lässt sich in einem einfachen mathematischen Zusammenhang darstellen. Die Änderung der Resonanzlage R ergibt sich aus dem Produkt aus Sensitivität m und Brechungsindexänderung von der Flüssigkeit n_f zum Adsorbat n_a mit der Filmdicke d sowie Abschwächungslänge l .

$$R = m(n_a - n_s) \left(1 - e^{-\frac{2d}{l}}\right) \quad \text{Formel 24}$$

Die Sensitivität von SPR-Sensoren liegt in der Größenordnung von $2 \cdot 10^6$ nm/RIU und ermöglicht die Detektion im $0,1 \text{ pg/mm}^2$ -Bereich^[63] bei einer linearen Sensorantwort bis zu einer Schichtdicke von 200 nm. Ferner sind eine Echtzeitdetektion von kinetischen Prozessen mit einer lateralen Auflösung von $10 \text{ }\mu\text{m}$ und Anwendungen im Arrayformat möglich.^[68]

Ist die Filmdicke kleiner als die Abschwächungslänge können höhere Terme nach der linearen Näherung in der Taylor-Reihe vernachlässigt werden.

$$R = m(n_a - n_s) \frac{2d}{l} \quad \text{Formel 25}$$

Für nasschemisch metallisierte dielektrische Nanopartikel (500 nm Silika-Kugeln) wurde die Sensitivität für Alkanthiole unterschiedlicher Kettenlänge durch Korrelation zwischen der Peak-Verschiebung im Extinktionsspektrum infolge der Moleküladsorption und der Massendichte des Adsorbates bestimmt. Die Massendichte wurde aus der Abschwächung des Au_{4f} -Peaks des XPS-Signals berechnet. Die Untersuchung ergab einen linearen Zusammenhang zwischen Massendichte (bzw. Filmdicke) und Wellenlängenänderung der Resonanz. Eine Verschiebung von 1 nm entspricht einer Massendichte von 34 ng/cm^2 bzw. 4 \AA Adsorbat-Filmdicke.^[69] Die Sensorantwort ist linear über Filmdicken von 75 nm und eine Massenbelegung von 600 ng/cm^2 hinaus.^[69] Alkanthiole bilden auf Goldoberflächen selbstorganisiert geordnete Monolagen (SAM), während Proteine inselartig adsorbieren. Die lineare Näherung kann auch für Proteine angenommen werden, wenn die Dicke der Proteininseln kleiner als die Abschwächungslänge ist und die Brechungsindizes der verwendeten Proteine und Alkanthiole in der gleichen Größenordnung liegen.

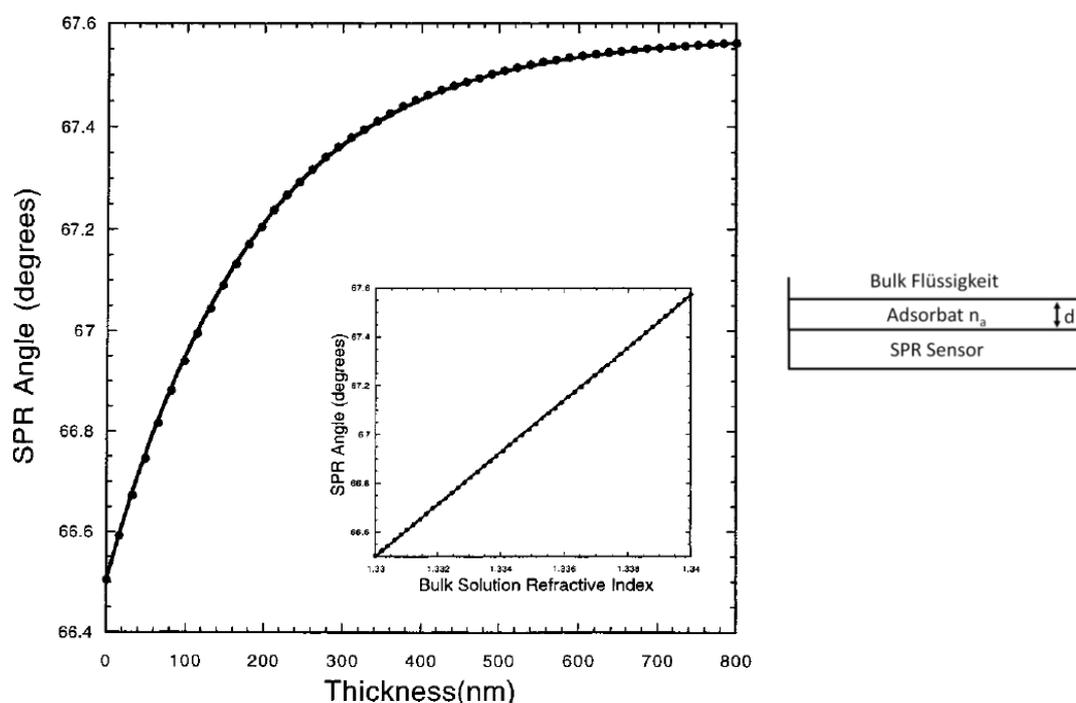


Abb. 12: Abhängigkeit der SPR-Resonanz von der Dicke des Adsorbates (**links**) und schematisches Diagramm der Zweilagengstruktur aus dem Adsorbat a mit der Dicke d , dem Brechungsindex n_a und der Flüssigkeit über dem Sensor mit Brechungsindex n_s (**rechts**).^[63]

2.4 Abhängigkeit der optischen Antwort vom Brechungsindex

2.4.3 Sensitivität gegenüber Multilag

Die Detektion spezifischer Bindungsereignisse erfordert die Betrachtung mehrerer Schichten. Als Beispiel wird eine Dreilagstruktur betrachtet. Die erste Schicht über dem Sensor ist durch die Akzeptorschicht b gegeben, welche die Sensoroberfläche funktionalisiert. Die zweite Schicht wird durch spezifisch gebundene Biomoleküle gebildet, die dritte Schicht entspricht der Probenflüssigkeit. Durch die zusätzliche Schicht b wird die Resonanzänderung R abgeschwächt.

$$R = m(n_a - n_s) \left(1 - e^{-\frac{2d}{l}}\right) e^{-\frac{2b}{l}} \quad \text{Formel 26}$$

2.5 Oberflächenstrukturierung mit selbstorganisierenden Monolagen (SAMs)

Anwendungsbereiche wie Mikroelektronik und Biosensorik,^[70] die eine Strukturierung von Oberflächen im Mikrometerbereich oder eine Verbindung anorganischer und organischer Materialien erfordern, nutzen zunehmend selbstorganisierende Monolagen zur Miniaturisierung der entwickelten Systeme.^[71] Dabei handelt es sich um organische dünne Schichten, die bei Adsorption auf Oberflächen aus Lösungen unter Minimierung der freien Energie selbsttätig zweidimensionale Schichtsysteme mit hoher Belegungsdichte und hohem Ordnungsgrad bilden.^{[72] [73]} Moleküle, die als selbstorganisierte Monolagen adsorbieren, bestehen aus drei Komponenten (Abb. 13). Die Kopfgruppe verankert das Molekül auf der Oberfläche, das Gerüst oder Rückgrat besteht aus einer organischen Kette, welche die Anordnung der Moleküle durch van-der-Waals-Wechselwirkung benachbarter Moleküle und den dadurch hervorgerufenen Energiegewinn von einigen kJ pro Mol bestimmt.^[73] Für die Funktionalisierung entscheidend ist die Endgruppe, die zur Modifikation der Grenzfläche hinsichtlich physikalischer und chemischer Eigenschaften, z.B. zur Oberflächenstrukturierung mittels gezielter chemischer Bindung von Nanopartikeln, eingesetzt wird.

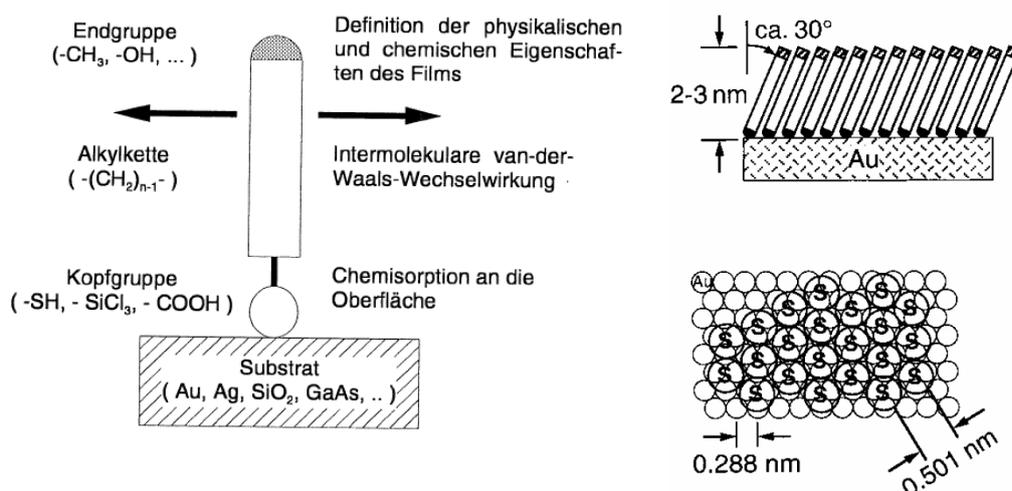
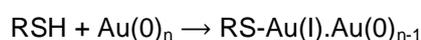


Abb. 13: Links: Schematischer Aufbau selbstorganisierender Monolagen aus drei Komponenten: die Kopfgruppe bindet über Chemisorption an die Oberfläche, die intermolekularen Wechselwirkungen der Gerüstkomponenten bestimmen die räumliche Orientierung der Moleküle, die funktionellen Endgruppen steuern die physikalischen und chemischen Grenzflächeneigenschaften.^[71] **Rechts oben:** Darstellung der hochgeordneten Struktur von Alkanthiol-Molekülen auf einem Goldsubstrat. Die Verkippung der Alkylkette bezüglich der Probennormalen beträgt etwa 30°. **Rechts unten:** Hochgeordnete Adsorptionsplätze der Alkanthiole auf einer Au(111)-Oberfläche.^[74]

Beispiele sind Silane und Thiole. Letztere haben aufgrund der Schwefelkopfgruppe eine hohe Affinität zu Münzmetallen, wie Gold, Silber oder Kupfer, die zusätzlich plasmonische Anregungen ermöglichen.^[55] Die Bindung des Schwefelmoleküls an Gold lässt sich nach dem HSAB-Konzept von R. G. Pearson auf die leichte Polarisierbarkeit der „weichen Säuren“ zurückführen und erhält einen damit verbundenen kovalenten Charakter mit der Bindungsenergie von 188 kJ/mol.^{[75] [43]} Die Bildung der selbstorganisierten Monolage (SAM) und Bindung als Thiolat folgt der Gleichung:



2.5 Oberflächenstrukturierung mit selbstorganisierenden Monolagen (SAMs)

Thiole bilden auf Gold eine hoch geordnete $(\sqrt{3} \times \sqrt{3})R30^\circ$ Struktur (Abb. 13, rechts) mit einem Tiltwinkel von 30° .^[74]

Auf doppelte Weise gewannen SAMs Bedeutung im Bereich der Biosensorik. Ein wichtiger Aspekt ist die Unterdrückung der unspezifischen Proteinadsorption^[76] bei gleichzeitiger toxikologischer Unbedenklichkeit und guten Körperverträglichkeit aufgrund der geringen Immunogenizität. Zum anderen dienen sie als Grundbaustein zur Funktionalisierung von Oberflächen. In dieser Arbeit werden SAMs als Beschichtungstechnik zur Herstellung mikrostrukturierter Sensoren mittels Mikrokontakt-druckens und zum Aufbau dreidimensionaler metallorganischer Gerüststrukturen, sogenannte MOFs (metal organic frameworks), verwendet.

2.5.1 Mikrokontakt-Drucken

Besonders interessant ist die Erzeugung von Mikrostrukturen ausgehend von chemisch strukturierten Bereichen auf festen Oberflächen, z.B. strukturierte selbstassemblierte Monolagen von Alkanthiolen auf Goldsubstraten. Diese ermöglichen die gezielte Funktionalisierung von Oberflächenbereichen mithilfe von chemischen Gruppen zur Anbindung von Partikeln^[77] oder Biomolekülen.^[78] Eine wichtige Alternative zur Photolithographie stellt das Mikrokontakt-Druckverfahren nach Whitesites dar.^{[79] [74]} Unter Verwendung einer Vorlage, z.B. eines mittels Photolithographie oder Ionenätzverfahren hergestelltem Silizium-Masters, kann ein Elastomerstempel definierter Struktur gegossen werden. Impft man diesen mit der gewünschten Substanz, lässt sich die Stempelstruktur als Negativabdruck auf das Substrat übertragen. Die Zwischenräume können passiviert oder chemisch funktionalisiert werden und als Adsorptionsplätze dienen (Abb. 14).^[77] Der Vorteil der Methode besteht in der schnellen und großflächigen Strukturierung von Oberflächen. Hierzu können auf ebenen Oberflächen rollbare strukturierte Stempel eingesetzt werden. Auch nicht ebene Oberflächen können strukturiert werden. Das Verfahren ist durch eine Strukturauflösung von 100 nm begrenzt.^[74]

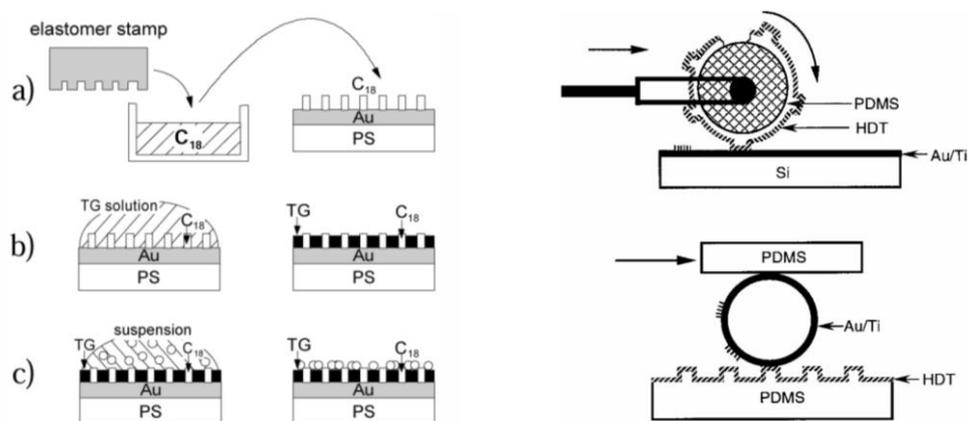


Abb. 14: Links: Schematische Darstellung des μ C-Druck-Verfahrens auf Gold zur gezielten Adsorption von Nanopartikeln.^[77] **a)** Stempeln vom Oktadecanthiol **b)** Füllen der Lücken mit Natriumthioglykolat (TG) **c)** Partikeladsorption. **Rechts:** Verfahren zur großflächigen Funktionalisierung von ebenen und nicht planaren Oberflächen. Hierzu können rollbare Stempel (**rechts, oben**) eingesetzt werden oder nicht ebene Gold-Oberflächen über den Stempel gerollt werden (**rechts, unten**).^[74]

Das Mikrokontaktverfahren mit Thiolen, die eine Carboxylgruppe aufweisen, erfordert eine Aktivierung mit EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid) und NHS (N-Hydroxysuccinimid) um z. B. Nanopartikel, die über eine Aminogruppe verfügen, kovalent zu binden. Bei der Aktivierung erfolgt eine chemische Reaktion^[80] (Abb. 15), in der die Säuregruppe des Thiols aktiviert und

2 Theorie

somit die Ausbildung einer Peptidbindung mit den Aminogruppen auf den Partikeln erleichtert wird. Dieses Verfahren ist analog zur Carbodiimid-Methode,^[81] die bei der Peptidsynthese Verwendung findet, und basiert auf der Bildung eines reaktionsfähigen O-Acylisoharnstoffderivats aus der Säure und EDC.^[80] Es entsteht ein aktiviertes Carbonsäurederivat unter Abspaltung eines Harnstoffderivats und Reaktion mit NHS.^[80]

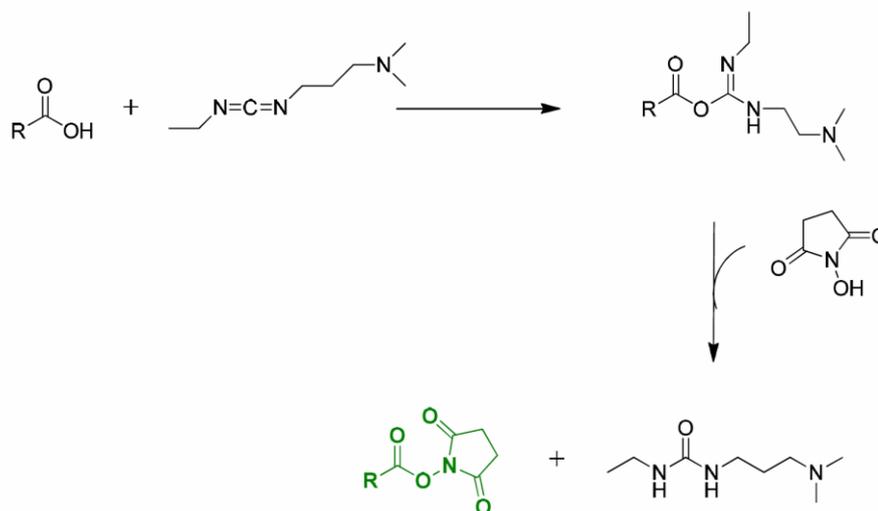


Abb. 15: Carbodiimid-Methode zur Aktivierung der Carbonsäure.^[80]

2.5.2 Metall-organische Gerüststrukturen (MOFs)

Hochporöse metallorganische Käfigverbindungen gewinnen zunehmend Interesse zur Anwendung als Speichermaterialien, wie Gasspeicher für Brennstoffzellen, zur Bereitstellung weiterer Adsorptionsplätze durch Beladung von Poren in der Sensorik und als medizinische Implantate zur gezielten und langsamen Freigabe von Medikamenten durch Diffusion. Dünne MOF-Schichten bestehen zunächst aus Gerüsteinheiten, die aus mindestens zwei Komponenten aufgebaut sind. Metallkomplexe werden durch organische Linker verknüpft. Abhängig von der Produktionsmethode können zweierlei Typen hergestellt werden, die sich hinsichtlich Struktur und Eigenschaften unterscheiden. Partikuläre MOFs werden in einem solvothermalen Prozess in einer Stammlösung hergestellt, indem Metallionen über Linkermoleküle verbunden werden. Die Dimensionen der Linkermoleküle bestimmen die Porengröße. Beim Aufbringen der selbstassemblierten Käfigverbindungen entstehen polykristalline Schichten. Die Erzeugung wohlgeordneter homogener Schichten mit definierter Kristallorientierung, sogenannte SURMOFs (surface grown crystalline metal-organic framework multilayers) basiert auf epitaktischen Methoden, der sogenannten Flüssigkeitsepitaxie. Dieses Verfahren wurde in der Gruppe von Herrn Prof. Dr. Christof Wöll (KIT) etabliert. Die Herstellung erfordert mehrere Arbeitsschritte beginnend mit einer maßgeschneiderten Funktionalisierung durch Thiol-SAMs, deren Endgruppe dem Liganden-Terminus entspricht und Metallionen einfängt. Der Wachstumsprozess erfolgt in einem Schritt-für-Schrittverfahren, das aus Zugabe der Ligandenlösung, Spülen und Zugabe der Metallionenlösung besteht (Abb. 16). Die Kristallstruktur der entstandenen Mehrschichten wird mittels Röntgendiffraktometrie charakterisiert, die Orientierung kann mit Reaktionssequenzierung gesteuert werden.^{[82] [83]} Die Netzwerke besitzen ein großes Porenvolumen und eine Oberfläche bis zu 6000 m²/g bei gleichzeitig geringer Dichte (0,21 g/cm³). Eine weitere wichtige Eigenschaft ist die Temperatur Stabilität bis zu 300 – 400°C.^[84]

2.5 Oberflächenstrukturierung mit selbstorganisierenden Monolagen (SAMs)

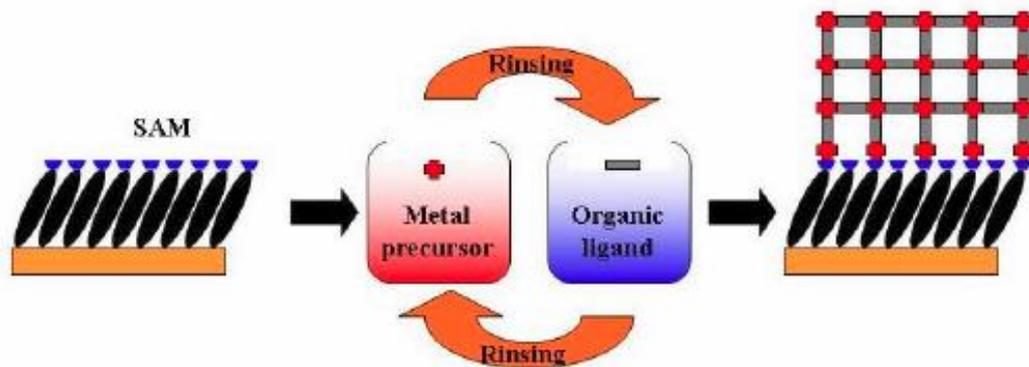


Abb. 16: Schematische Darstellung der Herstellung von SURMOFs auf Substraten, die mit einem SAM funktionalisiert wurden.^[85]

Die Materialeigenschaften sind durch die Wahl der Bausteine und deren Verknüpfungen kontrollierbar. Dadurch kann die Härte des Materials, die Flexibilität, Dichte, Gitterabstände und Bedeckung der Probe mit funktionellen Gruppen in drei Dimensionen „maßgeschneidert“ werden.^[86] Durch Modifikation des Herstellungsprozesses gelang es SURGELe zu erzeugen. In diesen Gerüststrukturen werden die Metallionen herausgelöst und die Linkermoleküle kovalent verknüpft.^[87] Dadurch wird eine hohe Stabilität unter Flüssigkeit erreicht. Dies erweitert das Anwendungsspektrum der Gerüststrukturen. Beispielsweise konnten SURGELe mit dem Einfachzucker Arbinose beladen werden und so das Wachstum von E.coli Bakterien und P.putida fördern. Das Anwendungspotential zur Manipulation der Zelladhäsion konnte über das grün fluoreszierende Protein GFP nachgewiesen werden.

Bemerkung

Für die Entdeckung und Weiterentwicklung des grün fluoreszierenden Proteins aus der Qualle *Aequorea victoria* erhielt Osamu Shimomura,^[88] Martin Chalfie und Roger Y. Tsien 2008 den Nobelpreis für Chemie.^[90] Dieses Protein ist als schaltbarer Fluoreszenzmarker von großem Interesse im Bereich der Molekularbiologie in Verbindung mit hochauflösenden Lichtmikroskopieverfahren. Für die GFP Super Resolution Lokalisations-Mikroskopie wurde ein US-Patent erteilt, das Herr Prof. Dr. Dr. C. Cremer 2008 einreichte.^[91] ^[92] ^[93]

2.6 Mikroskopie unterhalb des Abbe-Limits und Charakterisierung der Proben

In vielen Bereichen erfordert die Weiterentwicklung innovativer Technologien eine Verfeinerung und Miniaturisierung bestehender Systeme.^[94] Dadurch entsteht zunehmender Bedarf an prozessfreundlichen Qualitäts- und Abmessungskontrollen von beispielsweise elektrischen Bauelementen, wie integrierten Schaltkreisen und Transistoren^[95] neben strukturierten Oberflächen für biosensorische Anwendungen,^[96] Metamaterialforschung und Medizintechnik.^[97] Zusätzlich führten bessere Strukturierungsmethoden zu neuen Kontrollmöglichkeiten von Materialeigenschaften, z. B. im Bereich der Optronik,^[30] der Kombination aus Optik und Plasmonik. Inspiriert von diesem Ansatz charakterisierten Stranahan und Willets^[98] plasmonische Nanostrukturen unter Verwendung von die Einzelmoleküloberflächenverstärkte Ramanspektroskopie (SERS).^[96] Die Grenze technologischer Bemühungen zur Verkleinerung optischer Instrumente, Detektoren, Lichtquellen oder Abbildungen von Strukturen, ist das Abbe-Kriterium.^[30] Daher sind nur Einzelkontrollen von Nanostrukturen mittels Elektronenstrahlmikroskopie unter Hochvakuumbedingungen möglich, weil lichtoptische Analyseverfahren durch die Wellennatur des Lichtes beugungsbegrenzt sind.

Für die Grundlagenforschung im Bereich der Elektronenoptik und für die Entwicklung des ersten Elektronenmikroskops erhielt Ernst Ruska 1986 den halben Nobelpreis für Physik.^[99] Die andere Hälfte erhielten Gerd Binnig und Heinrich Rohrer für die Entwicklung des STM (Scanning tunneling microscope). Eine Auflösung unterhalb des Abbe-Beugungslimits wird durch weitere hochauflösende Verfahren erreicht. Hierzu zählen beispielsweise die Neutronenstreuung (Nobelpreis 1994 für Bertram N. Brockhouse)^[100], Röntgenstreuung, Rasterkraftmikroskopie, Raster-Nahfeld-Mikroskopie (SNOM, Scanning Nearfield Optical Microscopy) sowie Weiterentwicklungen der Fernfeld-Mikroskopie-Methoden, die unter dem Begriff RESOLFT-Mikroskopie (engl. reversible saturable optical fluorescence transitions) zusammengefasst werden.

In dieser Arbeit werden zwei hochauflösende abbildende Verfahren verwendet, die Rasterelektronenmikroskopie und die Lokalisationsmikroskopie (SPDM, Spektrale Präzisions-Distanz-Mikroskopie).

2.6.1 Rasterelektronenmikroskop

2.6.1.1 Aufbau des Rasterelektronenmikroskops (REM)

Das Rasterelektronenmikroskop ist ein sehr wichtiges Gerät zur Abbildung von Oberflächen mit Hilfe von Elektronen. Die Auflösung beträgt ca. 10 nm. Das Rasterelektronenmikroskop besteht aus mehreren Hauptbestandteilen, der Elektronenquelle, dem Linsensystem, dem Probenraum, den Detektoren und dem Hochvakuumsystem mit Pumpen (Abb. 17, links).^{[101] [102]}

Die Erzeugung der Elektronen in dem in dieser Arbeit verwendeten Gerät erfolgt unter Einsatz einer Schottky-Feldemitter-Kathode. Diese kombiniert die thermische Emission von Elektronen und den Feldeffekt. Die Kathode besteht aus einer Wolframspitze mit einem Zirkoniumoxid-Reservoir, das die Austrittsarbeit der Elektronen herabsetzt.^[102] Es wird eine Spannung von einigen kV angelegt, wobei Felder von 10^{11} V/m erzeugt werden. Die Feldstärke lässt sich aus dem Quotienten der angelegten Spannung und dem Krümmungsradius der Spitze abschätzen, der einige 10 nm beträgt. Die Spitze wird mittels Ätztechniken hergestellt.^[103] Die so erzeugten primären Elektronen werden nach Durchlaufen eines Wehnelt-Zylinders, einer Beschleunigungsspannung von 1 – 100 kV zwischen Kathode und Anode beschleunigt und mit einem elektromagnetischen Linsensystem bestehend aus Spulen auf die Probe fokussiert.

2.6 Mikroskopie unterhalb des Abbe-Limits und Charakterisierung der Proben

Die Wechselwirkung mit der Probe erfolgt auf elastische und nicht elastische Weise (Tabelle 1) bis zu einer Informationstiefe von ca. 10 μm .^[104] Diesen Bereich der Probe bezeichnet man als Elektronendifusionswolke oder Streubirne (Abb. 17).

Eine wichtige Rolle spielt dabei der differentielle Wechselwirkungsquerschnitt σ . Er gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der ein Teilchen in eine gewisse Richtung gestreut wird.^[105] Betrachtet man die elastische Streuung von Elektronen am Kern ergibt sich unter Vernachlässigung des Spins eine Abhängigkeit von der Geschwindigkeit v , der Elektronenmasse m_e , der Kernladungszahl Z und dem Winkel θ , der die Richtungsänderung der Bewegung infolge des Streuprozesses angibt. Nach Rutherford ergibt sich der differentielle Streuquerschnitt:

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = \left(\frac{Ze^2}{8\pi\epsilon_0 m_e v} \right)^2 \frac{1}{\sin^4 \frac{\theta}{2}} \quad \text{Formel 27}$$

Ω ist der Raumwinkel, den der Detektor umfasst.

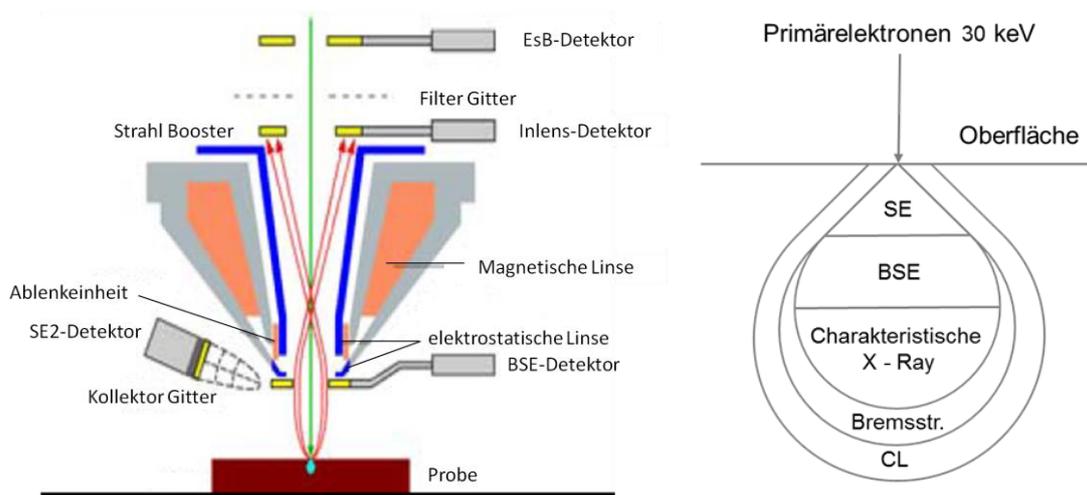


Abb. 17: Links: Aufbau des Rasterelektronenmikroskops und Position des Inlens- und SE2-Detektors. Rechts: Vergrößerter Ausschnitt der Streubirne mit den Wechselwirkungsprodukten des Primärelektronenstrahls (nach^[102]).

Tabelle 1: Wechselwirkungsprodukte des Primärelektronenstrahls mit Materie

Wechselwirkungsprodukt	Probentiefe [nm]
Auger Elektronen	1 - 2
Sekundär Elektronen (SE)	10 – 100
Rückgestreute Elektronen (BSE)	bis 2500
Charakteristische Röntgenstrahlung	bis 5000
Bremsstrahlung	bis 5000
Kathodolumineszenz (CL)	bis 10000

Der Primärelektronenstrahl wechselwirkt mit der Probe sowohl auf elastische (Rutherford-Streuung, Coulomb-Wechselwirkung mit Atomkernen) als auch nicht elastische Weise. Nicht elastische Wechselwirkungen mit der Atomhülle des Probenmaterials führen zur Emission von Sekundärelektronen, die eine Energie von bis zu 50 eV haben und aus den oberen Schichten (< 2 nm) des Probenmaterials austreten.

Zusätzlich treten Plasmonenanregungen, Bremsstrahlung, charakteristische Röntgenstrahlung (deren Ausdringtiefe im μm -Bereich liegt) bzw. Auger-Elektronen auf. Letztere entstehen durch die Ionisation innerer Schalen. Ebenso werden bis zu einer Eindringtiefe von 1 – 10 μm tausende Elektronen-Loch-Paare erzeugt.^[101] Der Prozess ist sowohl abhängig von der Energie der Primärelektronen als auch vom Probenmaterial.

Durch die Exzitonen tritt in Halbleitermaterialien, bei denen die Bandlücke 1 – 3 eV beträgt, infolge des Relaxationsprozesses Kathodolumineszenz auf.^[106] Der Energieverlust pro zurückgelegter Strecke x ist hauptsächlich gegeben durch die Bremsstrahlung und Ionisation.

$$\left(-\frac{dE}{dx}\right)_{total} = \left(-\frac{dE}{dx}\right)_{ion} + \left(-\frac{dE}{dx}\right)_{brems} \quad \text{Formel 28}$$

Da Elektronen im Vergleich zu Protonen eine geringe Masse aufweisen, erfolgt ein entscheidender Energieverlust durch Bremsstrahlung. Ionisation tritt auf, wenn die beim Stoß übertragene Energie größer als die Bindungsenergie und Austrittsarbeit ist.^{[105] [107]} Die Trajektorien der Elektronen können mit Monte Carlo Simulationen berechnet werden (Abb. 18).^[108]

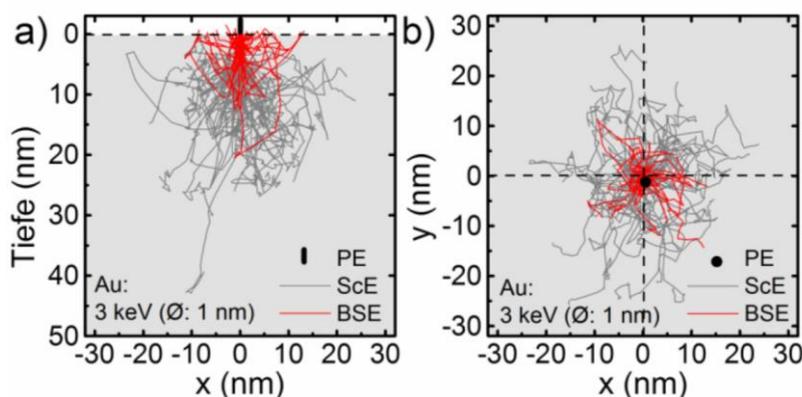


Abb. 18: Monte-Carlo Simulation der Trajektorien von Primärelektronen (3 keV, Strahldurchmesser 1 nm) beim Eintritt in einen Festkörper (aus Gold) als Tiefenprofil (a) und Flächenprofil (b). Nur Primärelektronen auf den rot gezeichneten Trajektorien verlassen die Probe.^[108]

2.6.1.2 Detektoren

In dieser Arbeit werden zwei Detektoren verwendet, zum einen der SE2-Detektor und zum anderen der Inlens-Detektor.

Der SE2- oder Everhart-Thornley-Detektor (Abb. 19) ist aus mehreren Hauptbestandteilen aufgebaut, dem Kollektor, der durch Anlegen einer positiven Spannung Elektronen ansaugt, dem Szintillator, der Photokathode und dem Photomultiplier. Der Szintillator ist mit einer Metallschicht umhüllt, die von hochenergetischen Elektronen durchdrungen wird. Diese Elektronen erzeugen in der Szintillatorschicht (z. B. NaI oder ZnS) tausende Elektron-Loch-Paare (3 eV pro Paar), bei deren Rekombination in etwa 1% der Fälle die Energie in Form von Licht frei wird. Dieses wird auf eine Photodiode geleitet und erzeugt Photoelektronen, die mit einem Photomultiplier verstärkt werden. Zur Signaldetektion fließen die Elektronen über einen Widerstand am Ende des Photomultipliers zur Masse ab. Der Spannungsabfall wird zur Bildgebung genutzt. Durch die seitliche Positionierung des Detektors im Elektronenmikroskop eignet er sich besonders gut zur Darstellung von Topographiekontrasten.

2.6 Mikroskopie unterhalb des Abbe-Limits und Charakterisierung der Proben

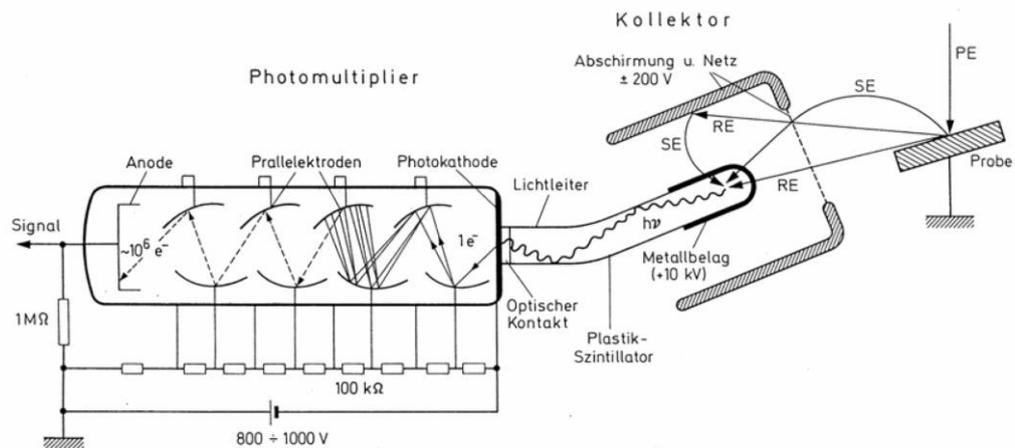


Abb. 19: Darstellung des SE2- oder Everhart-Thornley-Detektor.^[101] PE sind die primären Elektronen, SE sind die Sekundärelektronen und RE sind Rückstreuerelektronen.

Der Inlens-Detektor befindet sich in der Elektronensäule oberhalb der Objektivlinse und detektiert Elektronen, die in die Säule zurückgestreut werden. Die Sekundärelektronen treten nur aus den obersten Schichten des Objektes mit geringer Energie aus. Sie werden mit einem Beam-Booster beschleunigt, bevor sie auf einen Szintillator treffen. Der Szintillator umschließt den Primärelektronenstrahl ringförmig. Auftreffende Elektronen erzeugen Kathodolumineszenz. Die Kathodolumineszenz wird mit einer Photodiode nebst Photomultiplier verstärkt und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Der Detektor eignet sich besonders gut zur Bestimmung von lateralen Distanzen, weil man bedingt durch das geringe Wechselwirkungsvolumen der Sekundärelektronen eine hohe Auflösung der Probenoberfläche erreicht.

2.6.1.3 Kontrastarten

Der Kontrast einer Aufnahme hat zwei Hauptursachen. Er ist zum einen durch Topographie und zum anderen materialbedingt.^{[104] [101]} Demnach erscheinen Flächen hell, die zur vermehrten Detektion von Sekundärelektronen beitragen. Dies ist der Fall, wenn die Flächen einen kleinen Winkel zum Primärelektronenstrahl aufweisen (Flächenneigungskontrast), dem Detektor zugewandt sind (Abschattungskontrast), über herauspringende Kanten verfügen (Kanteneffekte) oder rau sind (Rauigkeitskontrast). Zusätzlich führen Materialkontraste zu einem besseren Eindruck von der Oberfläche. Hell erscheinen Bereiche mit großer Ordnungszahl aufgrund des höheren Rückstreuungskoeffizienten (Materialkontrast) und negativ geladene Bereiche, die vermehrt Elektronen emittieren (Potentialkontrast). Hinzu kommen Einflüsse durch die Neigung von Kristallebenen (Kristallorientierungskontrast) oder Magnetfelder (Magnetfeldkontrast).

2.6.2 Auflösungsgrenze

Die Auflösung des Bildes einer Oberfläche hängt von mehreren Faktoren ab, dem Detektor, dem Präparat, Linsenfehlern, Eindringtiefe bzw. Wechselwirkungsvolumen und ist durch die Beugung von Licht begrenzt.

Die Auflösungsgrenze wurde bei Untersuchungen mit Licht von Ernst Abbe auf Grundlage der Beugung an Strichgittern und von Baron Rayleigh ausgehend von selbstleuchtenden Objekten formuliert. Demnach erscheinen Objekte aufgrund der Wellennatur des Lichtes als Streuscheibchen, dem sogenannten Airy-Scheibchen (Abb. 20).^[109]

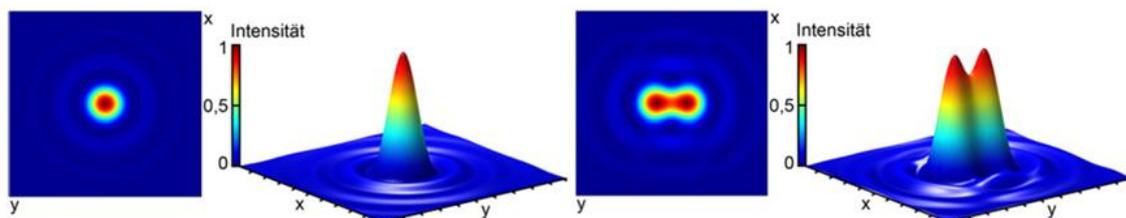


Abb. 20: Links: Darstellung des Streuscheibchens eines punktförmigen Emitters und des dreidimensionalen Intensitätspeaks (Airy-Funktion). **Rechts:** Grenze der Auflösung im Falle benachbarter Punkte. Die Intensität ist normiert und farbkodiert dargestellt (nach ^[109] ^[110]).

Die Objektposition ist am Ort des Maximums des Intensitätspeaks, deshalb müssen die Streuscheibchen benachbarter Punkte trennbar sein. Dies ist der Fall, wenn das Maximum des zweiten Objektes im Minimum des ersten Punktes oder weiter entfernt liegt. Rayleigh formulierte den minimalen auflösbaren Abstand in Abhängigkeit von der Wellenlänge des Lichts, das vom selbstleuchtenden Objekt ausgeht, dem Brechungsindex n des Mediums zwischen Objektiv (Frontlinse) sowie Objekt und dem maximalen halben Öffnungswinkel α zwischen einem Objektpunkt und dem Objektiv.

$$d_{\min} = 0,61 \frac{\lambda}{n * \sin \alpha} \quad \text{Formel 29}$$

Nach Abbe ergibt sich ein Vorfaktor von 0,5. Unter Verwendung von Laserlicht mit einer Wellenlänge von 647 nm, einem maximalen halben Aperturwinkels von 90° und dem maximalen Brechungsindex $n = 1,5$ ergibt sich eine laterale Auflösung 263 nm (nach Rayleigh).

Gedankenexperiment von Heisenberg

Heisenberg führte 1930 in seinem Gedankenexperiment zum Gammastrahlenmikroskop die Auflösungsgrenze auf das Unschärfeprinzip der Quantenmechanik zurück.^[111] ^[112] Um eine optimale Positionsbestimmung eines Objektes im Blickfeld des Mikroskops zu erreichen, müssen ein Objektiv möglichst großer numerischer Apertur und Wellen kürzester Wellenlänge verwendet werden. Die Ortsbestimmung erfordert mindestens die Detektion eines Photons, das am Objekt gestreut wird. Der Einfallswinkel des Photons in die Optik ist auf den halben Öffnungswinkel α des Objektivs genau bestimmbar (Abb. 21).

Entscheidend für die Auflösung in x -Richtung ist die x -Komponente des Wellenvektors k_x nach der Streuung. Dieser liegt im Intervall $[-k_0 \sin(\alpha), k_0 \sin(\alpha)]$ mit der Wellenzahl k_0 des Photons. Die Unschärfe beträgt $\Delta k_x = 2k_0 \sin(\alpha)$ und führt mit einem auflösbaren Abstand von $d \geq \frac{\lambda}{2 * n * \sin(\alpha)}$ zur

Unschärfe der Bildposition $\Delta x \geq \frac{\lambda}{2 * n * \sin(\alpha)}$. Es folgt die Heisenbergsche Unschärferelation $\Delta x * \Delta k_x \geq 2\pi$.

2.6 Mikroskopie unterhalb des Abbe-Limits und Charakterisierung der Proben

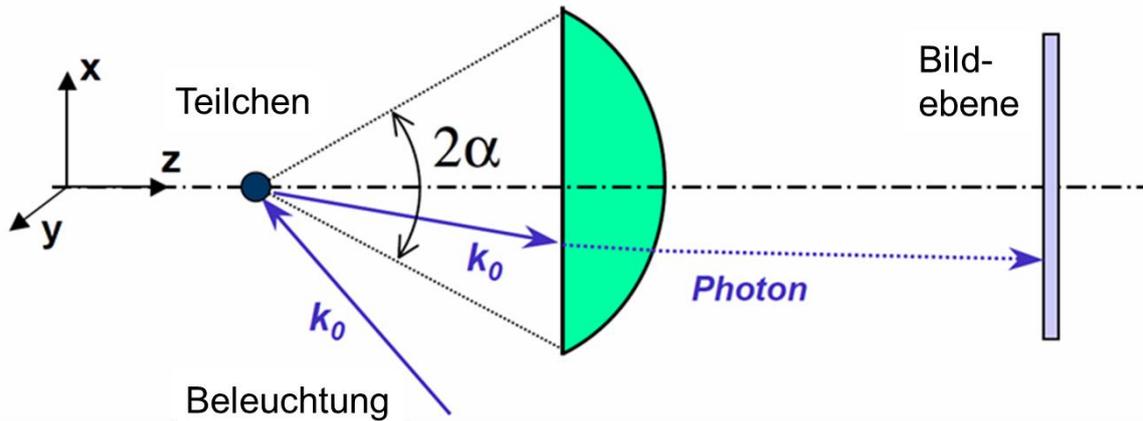


Abb. 21: Prinzipskizze zum Heisenbergschen Gedankenexperiment^[111]

2.6.3 Lokalisationsmikroskopie

Die Fähigkeit biologische Systeme auf Einzelmolekülniveau zu analysieren gewinnt zunehmend an Bedeutung.^[113] Die grundlegende Verbesserung der optischen Auflösung der Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie zu hochauflösenden Methoden wie 4 Pi,^[114] Structured Illumination Microscopy (SIM) und die zahlreichen Anwendungen der Lokalisationsmikroskopie, wie SPDM, PALM, STORM, ermöglichen eine Detektion unterhalb des Beugungslimits. Das Kernstück der Methoden sind schaltbare Fluoreszenzfarbstoffe, entweder organische Farbstoffe oder Quanten Dots.^{[115] [116] [117] [118]}

2.6.3.1 Fluoreszenz

Betrachtet man die Wechselwirkung von Licht und Materie, unterscheidet man drei elementare Absorptions- und Emissionsprozesse: die induzierte Absorption, induzierte Emission und spontane Emission.^[119] Unter induzierter Absorption versteht man den Übergang eines Moleküls unter Beachtung der Auswahlregeln in einen energetisch angeregten Zustand durch Aufnahme eines Photons passender Energie (Abb. 22). Die Wahrscheinlichkeit für diesen Prozess ist gegeben durch das Produkt des Einsteinkoeffizienten für induzierte Absorption, der proportional zum Betragsquadrat des elektrischen Übergangsmomentes ist, mit der spektralen Energiedichte am Ort des Moleküls.^[120] Geht das Molekül von selbst spontan in einen energetisch niedrigeren Zustand gleicher Multiplizität über, spricht man von Fluoreszenz. Sei A_{ij} die Wahrscheinlichkeit für diesen Übergang pro Zeit, so ist der Kehrwert von A_{ij} die mittlere Lebensdauer des angeregten Zustands. Tragen weitere Deaktivierungsprozesse bei, wie inelastische Stöße, so ändert sich die Übergangswahrscheinlichkeit und man definiert eine effektive Lebensdauer. Typische Werte liegen im Nanosekundenbereich. Die Intensität eines Vibrationsübergangs ist proportional zum Betragsquadrat des Übergangsmomentes. Im Rahmen der Born-Oppenheimer Näherung, d.h. unter der Annahme, dass sich die Atomrümpfe viel langsamer als die Elektronen bewegen, kann man das Übergangsmoment als Produkt der Wellenfunktionen (ψ) des Ausgangs- (v') und Endzustandes (v'') beschrieben werden. Das Übergangsmoment ist gegeben durch das elektronische Übergangsmoment R_e und das Überlappungsintegral, dessen Quadrat der Frank-Condon-Faktor ist.^[119]

$$R_{ev} = R_e \int \psi_{v'}^* \psi_{v''} dr$$

Formel 30

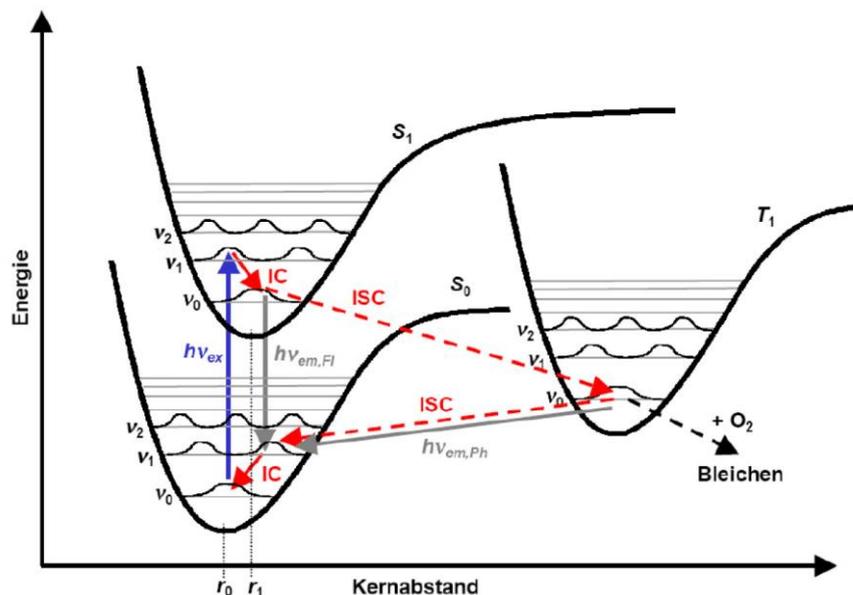


Abb. 22: Energieniveaus von Singulett-Grundzustand S_0 und Anregungszustand S_1 sowie Triplett-Zustand T_1 und deren Vibrationsniveaus v_i . IC=Internal Conversion, ISC= Inter System Crossing, Fl= Fluoreszenz und Ph= Phosphoreszenz.^[121]

2.6.3.2 SPDM-Arbeitsprinzip

Ziel der hochauflösenden Methoden ist es auch nahe beieinander liegende Objekte getrennt zu detektieren. Nach dem Abbe Kriterium sind benachbarte Fluorophore gleicher spektraler Signatur nur auflösbar, wenn die Beugungsscheibchen des emittierten Lichtes unterscheidbar sind. Die Unterscheidbarkeit zweier Moleküle hängt von deren Abstand und den Eigenschaften des emittierten Lichtes (spektrale Signatur) wie z.B. Spektralfarbe (Abb. 23), Lebensdauern angeregter Zustände oder Zeitabhängigkeit der Lumineszenz ab.

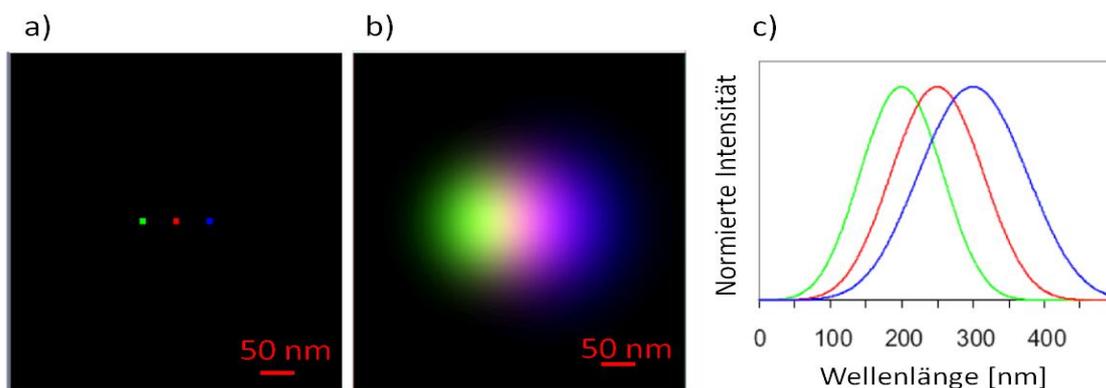


Abb. 23: Prinzip der SPDM **a)** Drei im Abstand von jeweils 50 nm liegende mit unterschiedlicher spektraler Signatur leuchtende Punkte **b)** das von ihnen erzeugte Beugungsbild und **c)** deren Intensitätsverteilung. Die einzelnen Punkte sind getrennt erkennbar (nach ^[122]).

Eine Auflösung innerhalb dieses Abstandes wird erreicht, wenn die Trennung der Signale mithilfe eines Filters aufgrund unterschiedlicher Emissionswellenlängen, dem sogenannten Stokes-Shift, möglich ist oder die Blinkfrequenz unterschiedlich ist, d.h. die Fluorophore abwechselnd aufleuchten. Der Aufenthaltsort entspricht dem Maximum des Beugungsscheibchens.^[122-123]

Photoschalten von konventionellen Fluorophoren

Die Idee der spektralen Präzisions-Distanz Mikroskopie besteht darin die Fluorophore nicht gleichzeitig zu detektieren, sondern durch An- und Ausschalten Signale einzelner Moleküle mit separierbaren Abständen zu erhalten. Hierzu werden zuerst alle Fluorophore durch eine hohe Laserintensität ausgeschaltet. Aus diesem Aus-Zustand kehren wenige Moleküle stochastisch zurück. Nimmt man in einer schnellen zeitlichen Abfolge Bilder der Fokusebene auf, sind die Fluoreszenzereignisse auf einer Einzelaufnahme separiert. Das heißt die Entfernung benachbarter Fluoreszenzereignisse ist größer als die Beugungsgrenze. Von der Intensitätsverteilung der detektierten Photonen wird das Maximum bestimmt. Das Maximum entspricht dem Aufenthaltsort des Farbstoff-Moleküls. Die Fluoreszenz erlischt und Moleküle an einer anderen lateralen Position leuchten auf. Dies wird im nächsten Bild festgehalten. Die Position der einzelnen Moleküle in jeder Einzelaufnahme kann sehr genau bestimmt werden und in eine gemeinsame Karte eingetragen werden.^[109] Durch solche Einzelmoleküluntersuchungen erhält man Informationen, die im Mittelwert des Ensembles verloren gehen, z.B. Konformations-Änderungen, die Kinetik elementarer Reaktionsschritte^[124] oder Bilder mit fast molekularer Auflösung von ganzen Zellen.^{[125] [126]}

2.6.3.3 Alternative Messmethoden

Zur Signalgenerierung in der Einzelmolekülspektroskopie stehen verschiedene Ansätze zur Verfügung. Voraussetzung ist jeweils die Trennbarkeit der Airy-Scheiben. Das fundamentale Konzept, das zur Signalunterscheidung führt, beruht auf der Trennung der Fluoreszenzsignale eng benachbarter einzelner Farbstoffmoleküle. Zum Schalten der Fluorophore sind mehrere Methoden einsetzbar: photochemische Prozesse, wie Photoaktivierung, Photochromatismus, reversibles Bleichen,^[127] photophysikalische Schaltung der Fluoreszenz durch Bestrahlung mit Licht, sowie lichtunabhängig durch reversible Bindung von Kupfer(II) an einen Liganden, welche die Fluoreszenz gezielt ausschaltet.^[128] Weitere Beispiele sind enzymatische Redoxreaktionen eines intrinsischen Chromophors zur Messung enzymatischer Reaktionen und abstandsabhängige photophysikalische Prozesse, wie Energie- (FRET)^[124] oder Elektronentransfer (DEXTER). Bei der Methode FRET (Förster-Resonanzenergietransfer) kann Fluoreszenzlöschung durch strahlungslosen Energietransfer vom Fluorophor (Donator) zum Photoschalter (Akzeptor) erfolgen.^[129] Das Verfahren basiert auf zwei unterschiedlichen Konfigurationen des Photoschalters, zum Beispiel in Form eines offenen oder geschlossenen Rings (Abb. 24). Grundvoraussetzung ist der Überlapp der Absorptionsbanden des Akzeptors mit den Emissionsbanden des Farbstoffmoleküls.^[124]

Bleichen kann infolge von Reaktionen mit Sauerstoff^[130] oder Radikalen auftreten, die die Resonanz des delokalisierten Elektronensystems verschieben. Dies kann durch Änderung der Hybridisierung (von sp^2 zu sp^3) und der damit verbundenen anderen räumlichen Orientierung auftreten.

Eine andere Möglichkeit besteht darin Fluorophore mit Hilfe eines zweiten Lasers gezielt auszuschalten. Hierfür wird bei der stimulated emission depletion (STED) eine "donutförmige" Intensitätsverteilung verwendet, die im Zentrum ein Minimum aufweist.^[131] Die erreichbare Auflösung hängt von der Intensität des löschenden Laserstrahls ab. Dies wird in der erweiterten Abbe-Formel ausgedrückt.^[132] Die Methode ist durch nicht lineare Effekte, Mehr-Photonen-Übergänge, und Stabilität der Probe gegenüber hohen Laserstrahlintensitäten beschränkt. Für Farbzentren in Diamant konnte eine Auflösung von 1 nm erreicht werden.^[133]

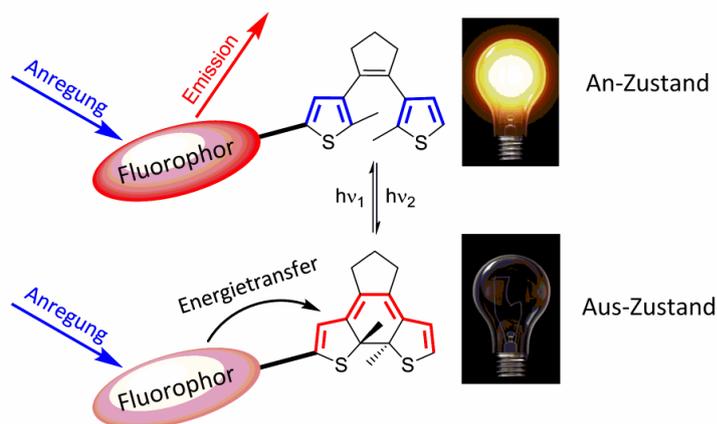


Abb. 24: Dargestellt ist das Prinzip photochromer Fluoreszenzfarbstoffsysteme. Der An-Zustand (**oben**) des Farbstoffs bei offenem Photoschalter und die Unten: Fluoreszenzlöschung durch Ring-Schließung infolge der Wechselwirkung des Farbstoffs mit dem Photoschalter (Aus-Zustand, **unten**).^[134]

2.6.4 Datenauswertung

Zur Auswertung der Daten werden zwei in MatLab implementierte Algorithmen verwendet, die auf Grundlage des Levenberg-Marquardt-Algorithmus^[135] bzw. des Maximum-Likelyhood-Kriteriums rechnen.^[136] Die Rechenzeit wird verringert, indem auf einer Benutzeroberfläche aufbauspezifische Größen, wie effektive Pixelgröße, Konversionsfaktor zwischen Photoelektronen und Counts, sowie datenrelevante Größen, wie mittlere Anzahl der Events pro Einzelaufnahme und maximale Lokalisationsgenauigkeit, vorgegeben werden können.^[137] Letztere ermöglicht schlecht lokalisierte Fluoreszenzereignisse zu entfernen, die zum Beispiel infolge der Übersättigung des Detektors auftreten und deshalb nicht korrekt ausgewertet werden können. Die Information über die Positionen der Fluoreszenzmoleküle erhält man nach Segmentierung der Daten durch die Lokalisation.

2.6.4.1 Segmentierung

Im ersten Schritt erfolgt die Segmentierung der Daten, d.h. nur Grauwerte, die heller als ein Schwellwert sind, werden als Bildkoordinaten berücksichtigt. Zur Beschränkung der Rechenzeit werden zuerst Bildbereiche, sogenannte Regions of Interest (ROI) betrachtet, die ein optisch isoliertes Signal enthalten. Dabei sollen die Signale der einzelnen Moleküle erkannt und grob lokalisiert werden.

Auf Grundlage des Clean-Algorithmus^[138] ^[137] für astronomische Daten erfolgt eine Bandpassfilterung, in der durch Schwellwerte Signale von nicht punktförmigen Objekten stammen, unterdrückt werden. Es handelt sich um Rauschsignale oder Farbstoffcluster. Von den verbleibenden Signalen wird das Intensitätsmaximum gesucht und die Position notiert. Die maximale Amplitude wird mit der Punktbildfunktion (PSF) des Systems gefaltet und vom Datenstapel subtrahiert. Diese Methode verhindert, dass das gleiche Ereignis mehrfach ausgewertet wird. Das Verfahren wird wiederholt. Als Abbruchbedingung dient ein Schwellwert für die minimale Intensität des gefundenen Maximums. Schließlich wird eine zweidimensionale Karte erstellt, in welche die lateralen Positionen der gefundenen fluoreszierenden Ereignisse eingetragen werden und als ROI-Zentren dienen.

Die Punktbildfunktion (PSF) gibt die Intensitätsverteilung der elektromagnetischen Strahlung in der Fokusebene, das heißt die Airy-Verteilung, an. Sie beschreibt, wie eine punktförmige Lichtquelle durch ein optisches System abgebildet wird.^[139]

2.6.4.2 Lokalisation

Es folgt die genaue Lokalisation der fluoreszierenden Ereignisse. Lokalisationsmikroskopie erzeugt kein Bild wie bei Weitfeldaufnahmen sondern diskrete Koordinaten von Fluorophoren.^[127] Hierzu kann entweder der Schwerpunkt der Signaldaten unter Verwendung des Maximum-Likelihood-Kriteriums^{[140] [141]} verwendet werden oder eine Modellfunktion^{[142] [143]} an die Intensitätsverteilung angepasst werden. Die Schwerpunktmethode ist ein schnelles Rechenverfahren zur Bestimmung der lateralen Position und der Photonenzahl pro Fluoreszenz-Ereignis. Der Schwerpunkt \vec{r}_s für eine ROI i ergibt sich für die Pixel (k,l) nach

$$\vec{r}_s = \frac{1}{\sum_{kl} I_{kl}(i)} \sum_{kl} \vec{r}_{kl} I_{kl}(i) + \vec{r}_{ROI}(i) \quad \text{Formel 31}$$

Im Gegensatz dazu ermöglicht eine Anpassung mit dem Levenberg-Marquardt-Algorithmus^[137]^{[142] [143]} eine Abschätzung der Parameterunsicherheit. Der Algorithmus verbindet das Gradientenverfahren mit einer Regularisierungstechnik und konvergiert schneller als das Gauß-Newtonverfahren (Methode der kleinsten Quadrate). An die Fluoreszenzereignisse wird eine zweidimensionale Gaußfunktion $f(x,y,p)$ angepasst (Abb. 25) mit

$$f(x, y, p) = p(1) * e^{-\frac{1}{2} \left(\left(\frac{x-p(2)}{p(4)} \right)^2 + \left(\frac{y-p(3)}{p(5)} \right)^2 \right)} + p(6) + p(7) * (x - p(2)) + p(8) * (y - p(3)) \quad \text{Formel 32}$$

und den Parametern p : $p(1)$ als maximale Signalamplitude, die siebenmal größer als der Hintergrund sein muss, $p(2)$ und $p(3)$ sind die lateralen Positionen des Intensitätsmaximums in x - und y -Richtung, $p(4)$ und $p(5)$ sind die Standardabweichung der lateralen Positionen. Ein zusätzlicher Term zur Berücksichtigung des Hintergrunds der Fluoreszenzaufnahmen ist $p(6)$ und für die Beschreibung eines Hintergrundgradienten wird $p(7)$ und $p(8)$ verwendet. Die Lokalisationsgenauigkeit ist definiert als der Mittelwert der Standardabweichungen der lateralen Positionen.^{[139a] [137]}

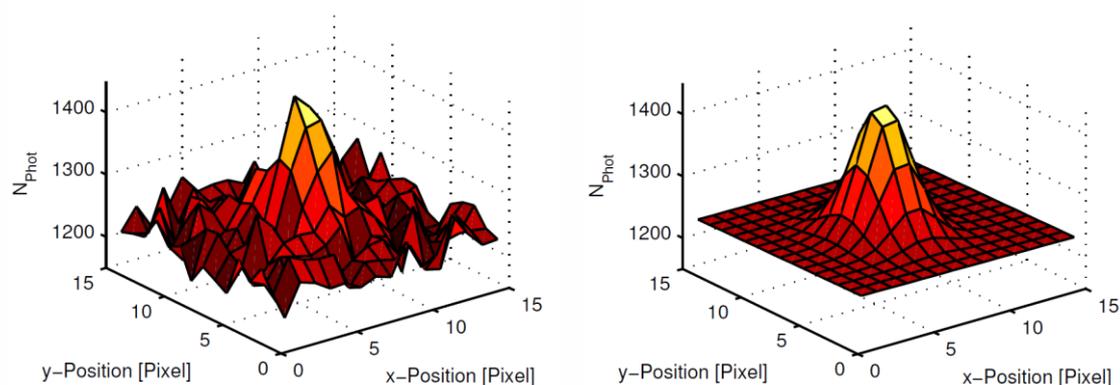


Abb. 25: Intensitätsverteilung eines Einzelmolekülsignals (**links**) und Anpassung einer 2D-Gaußfunktion mit zusätzlichem Hintergrundterm (**rechts**). Ein Pixel ist in x - und y -Richtung 65 nm groß.^[139a]

2 Theorie

Eine weitere wichtige Größe ist die Photonenzahl N pro Fluoreszenz-Ereignis, die sich unter Beachtung der Nachweiseffizienz η der Kamera ergibt nach

$$N = p(1) * \frac{1}{\eta} \iint e^{-\frac{1}{2}\left(\left(\frac{x}{p(4)}\right)^2 + \left(\frac{y}{p(5)}\right)^2\right)} dx dy \quad \text{Formel 33}$$

Die Anpassung erfolgt automatisch durch den Befehl „spdm“ und gibt die angepassten Parameter in Form einer Tabelle aus. Der Ort des fluoreszierenden Ereignisses kann mit einer Genauigkeit bestimmt werden, die von mehreren Faktoren abhängt: der Anzahl der Photonen, der Halbwertsbreite (FWHM) der Punktbildfunktion des optischen Aufbaus, der Größe der sensitiven Fläche der Kamerapixel sowie Stärke und Verlauf des Hintergrundsignals. Nach der Poisson-Statistik für das Photonenrauschen ergibt sich die Lokalisationsgenauigkeit

$$\sigma = \frac{1}{\sqrt{8 \ln(2)}} * \frac{FWHM}{\sqrt{N}} \quad \text{Formel 34}$$

Die Anzahl der detektierten Photonen N leistet den Hauptbeitrag zur Lokalisationsgenauigkeit.^[144]
^[145] Weitere Beiträge zur Lokalisationsgenauigkeit sind z.B. die Drift der Probe, die Größe der PSF, die Pixelgröße des Detektors sowie des Hintergrundrauschens auf jedem Pixel. Die Poisson-Verteilung ergibt sich als Grenzwert der Binomialverteilung.^[146]

2.7 Proteine und Proteinadsorption

2.7.1 Peptide

Peptide sind ihrer chemischen Natur nach Säureamide. Sie bestehen aus verknüpften Aminosäuren. Für Aminosäuren sind zwei funktionelle Gruppen charakteristisch, zum einen die Carbonsäuregruppe (-COOH) zum anderen die Aminogruppe (-NH₂). Die Gruppe R₁-(CO)-(NH)-R₂ bezeichnet die Peptidbindung. R₁ und R₂ sind die Reste. Liegt ein Makropeptid vor aus mehr als 100 verknüpften Aminosäuren, spricht man von einem Protein. Von den zahlreichen bekannten Aminosäuren werden nur 20 in Proteinen gefunden.^{[147] [148]}

2.7.2 Fibrinogen

Das Blutplasma enthält mehr als 200 Plasmaproteine. Das häufigste ist Albumin (35 – 50 g/l), das zur Regelung des osmotischen Drucks sowie dem Transport von Fettsäuren, Vitaminen, Gallenfarbstoffen und Calcium-Ionen beiträgt. Adsorbiert es auf Oberflächen, wirkt es passivierend gegenüber der Zelladhäsion und der Blutgerinnung. Eine bedeutende Rolle bei der Blutgerinnung spielt Fibrinogen.^[149] Es liegt im Plasma mit einer Konzentration von 7,5 µl/mol vor und hat einen Diffusionskoeffizienten von $2,0 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$.^[150] Fibrinogen wird durch das Enzym Thrombin und Calcium in unlösliches Fibrin umgewandelt.

Die Struktur von Fibrinogen (Abb. 26) besteht aus mehreren Segmenten mit unterschiedlicher Nettoladung.^[151]

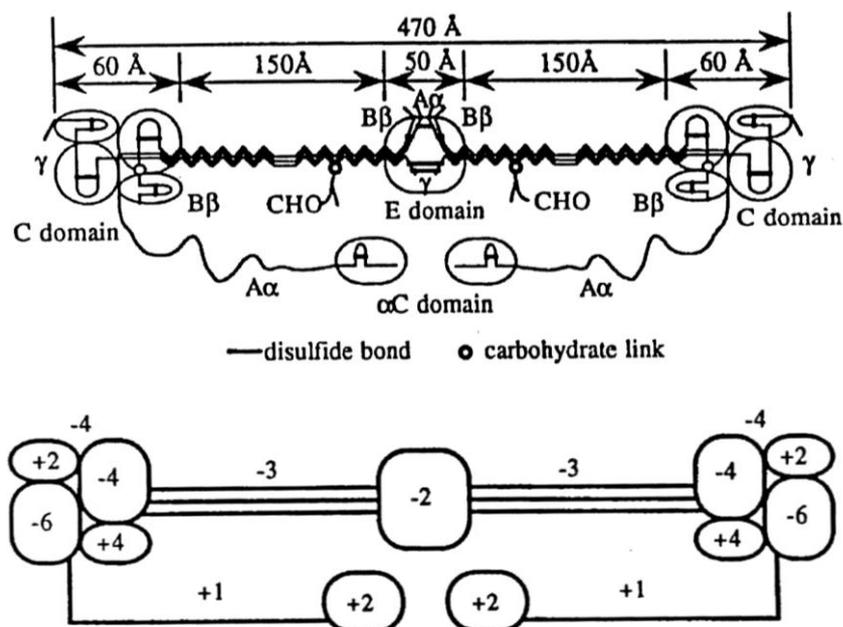


Abb. 26: Strukturmodell des Fibrinogen-Moleküls (**oben**) und die Nettoladungen der einzelnen Segmente (**unten**).^[152]

Fibrinogen bildet viskose und elastische Filme auf festen Oberflächen. Weber et al. führten Untersuchungen des Adsorptionsverhaltens von Fibrinogen mit einer Quarzmikrowaage durch. Die

2 Theorie

Proteinlösung der Konzentration 3 mg/ml wurde in Kontakt mit Schwingquarzen mit unterschiedlicher Polymerbedeckung gebracht. Gemessen wird die Verschiebung der Resonanzfrequenz durch die Erhöhung der oszillierenden Masse infolge des Adsorptionsprozesses. Dabei ist die Massendichte und Filmdicke auch vom gebundenen Hydratwasser abhängig und unterscheidet sich im Vergleich zu Messmethoden, die den trockenen Film betrachten. Bei der Messung wurden mehrere Eigenschaften des sich bildeten Filmes ermittelt (Tabelle 2).^{[153] [154]} Die Gestalt und Struktur des Moleküls konnte bereits 1952 mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen des gefriergeätzten Proteins abgebildet werden. Weitere Untersuchungen basierten auf der Röntgenkleinwinkelstreuung an verdünnten Lösungen von Rinderfibrinogen.^{[155] [154b]}

Tabelle 2: Eigenschaften von Fibrinogen

Eigenschaft	Einheit	Wert
Molekülgröße	[nm x nm x nm]	45 x 9 x 6
Masse	[kDa]	340
Trockenvolumen	[Å ³]	4*10 ⁵
Volumen im hydratisierten Zustand	[Å ³]	2,9*10 ⁶
Adsorbatdicke	[nm]	2 - 37
Viskosität	[kg/mms]	0,001 – 0,005
Massendichte (feucht)	[µg/cm ³]	0,2 – 4,3
Massendichte (trocken)	[µg/cm ³]	0,39 (Ellipsometrie)
Massendichte (trocken)	[µg/cm ³]	0,45 (Optische Wellenleiter-spektroskopie OWLS)

2.7.3 Adsorption

2.7.3.1 Wichtige Wechselwirkungen bei der Adsorption

Adsorption bezeichnet das Bestreben von Teilchen aus fluider Phase (Gas oder Flüssigkeit) zur Anreicherung an der Grenzfläche zu festen Oberflächen. Die Triebkraft der Adsorption und Ursache für das Entstehen von Isothermen sind einerseits die Wechselwirkungen zwischen Teilchen in der Gasphase bzw. Flüssigphase und der Festkörperoberfläche andererseits der Platzbedarf adsorbierter Teilchen.^[156] Abhängig von der Art der Bindungskräfte unterscheidet man zwischen physikalischer (im Fall von van-der-Waals-Wechselwirkung) und chemischer Adsorption. Der Unterschied liegt in der Stärke der Bindung, der Überwindung einer Energiebarriere zur Chemisorption und der Größe der Adsorptionenthalpie, die bei Physisorption vergleichbar mit Kondensationenthalpien ist, für Chemisorption Reaktionsenthalpien gleicht.^[157]

Wichtige Wechselwirkungen sind die Coulomb-Wechselwirkung, die van-der-Waals-Wechselwirkungen und die hydrophoben Wechselwirkungen.^{[158] [159] [160]}

Die langreichweitigen Coulomb-Wechselwirkungen wirken zwischen geladenen Teilchen und fallen mit dem reziproken Abstand ab. Das Coulomb Gesetz folgt aus den Maxwellgleichungen. Im einfachsten Fall wird eine Punktladung am Ursprung angenommen. Die Ladung verfügt über ein radialsymmetrisches Feld.

2.7 Proteine und Proteinadsorption

Zur Herleitung wird der Gaußsche Satz auf die erste Maxwell Gleichung angewendet und die Definition der Feldstärke als Kraft pro Probeladung verwendet.^[161] Ein exponentieller Abfall mit dem Abstand ergibt sich in Lösungen mit freien Ladungsträgern. Ursache hierfür ist eine elektrostatische Doppelschicht an der Grenzfläche zwischen Oberfläche und Lösung. Diese entsteht, da Oberflächen, die in Kontakt mit Wasser sind, Ladung tragen durch Protonierung, Deprotonierung oder Adsorption von Ionen. Ionen entgegengesetzter Ladung ordnen sich aus der Lösung in der Nachbarschaft der Oberfläche an.^[162]

Van-der-Waals-Wechselwirkungen wirken zwischen neutralen Molekülen. Sie werden verursacht durch fluktuierende Felder, die eine kurzzeitige Asymmetrie in der Elektronenverteilung hervorrufen. Ein temporärer Dipol entsteht, dessen Feld auf Nachbaratome wirkt und dort durch Polarisation einen Dipol induziert. Das van-der-Waals-Potential zwischen einer Kugel und einer planaren Oberfläche fällt proportional zum Radius und reziproken Abstand zwischen Kugel und Oberfläche ab. Die Kugel dient als Modell für das Protein. Das Potential zwischen zwei Partikeln ist proportional zur sechsten Potenz des reziproken Abstandes zwischen den Partikeln.

Zur Herleitung wird das Dipolmoment des ersten Dipols im elektrischen Feld des zweiten Dipols betrachtet.^[14, 162] Die Wechselwirkung hydrophober Moleküle in wässrigen Lösungen führt zur Verdrängung hydrophiler Lösungsmittelmoleküle zwischen ihnen. Dadurch wird Entropie gewonnen ($\Delta S > 0$). Dies beeinflusst die Faltung von Proteinen.^[163]

Das Adsorptionsverhalten wird von mehreren Einflussfaktoren bestimmt,^[164] die von den Eigenschaften der beteiligten Systeme, bestehend aus der Oberfläche, dem Adsorbat und dem flüssigen Medium bzw. Gasphasenreservoir, abhängen. Für biosensorische Anwendungen ist die selektive Adsorption aus Gemischen von Interesse, beispielsweise Antikörper-Antigenwechselwirkungen. Je nach Stärke der Bindung können die leichteren bereits adsorbierten Proteine durch die schwereren von der Oberfläche verdrängt werden (Vroman Effekt).^[164b]

Wichtige Reaktionsbedingungen sind Druck und Temperatur sowie Flächenspezifität, d. h. die kristallographische Ebene bestimmt die Anzahl an Nachbar-Adsorbat-Molekülen. Letzteres findet z.B. bei der nasschemischen Herstellung von Nanopartikeln Anwendung.^{[165] [166]} Silber bevorzugt die (100) Ebene, unter Ausnutzung dessen, können nicht-sphärische Legierungspartikel erzeugt werden. Ein weiterer wichtiger Punkt bei Adsorptionsprozessen ist die Bindungsstärke. Sie steuert die Ordnung der Adsorbat-Moleküle. Ist die Bindung schwach, so ist ein random walk der Moleküle auf der Oberfläche möglich, wie bei der Bildung von SAMs auf Gold, während die SAM-Bildung auf Silizium beispielsweise über eine chemische Klick-Reaktion^[167] verläuft. Beide SAMs unterscheiden sich in der Packungsdichte.^[168]

2.7.3.2 Proteinadsorptionsprozesse auf nanostrukturierten Oberflächen

Die experimentelle Untersuchung von Proteinadsorptionsprozessen auf nanostrukturierten Oberflächen werden durch theoretische Modellrechnungen gestützt, die z.B. Teile der Finite Element Methode (FEM) mit der Brownschen Dynamik verbinden.^[169] Diese Simulationen finden unter anderem Anwendung bei der Studie von Kanteneffekten und der Suche nach bevorzugten Adsorptionsplätzen. Im Modell werden Proteine als geladene Kugeln behandelt, deren Wechselwirkung untereinander nach der DLVO (Derjaguin, Landau, Verweg, Overbeek)^[170]-Theorie beschrieben werden.^{[171] [172]} Die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Protein und Nanostruktur werden numerisch durch Lösen der Poisson-Boltzmann-Gleichung bestimmt,^[173] während für den anziehenden Teil die Hamaker-Gleichung betrachtet wird.

2.7.3.3 Theorie der Adsorption

Zuerst wird die Adsorption aus der Gasphase an Festkörperoberflächen betrachtet. Ist der Adsorptionsprozess reversibel, d.h. liegt ein thermodynamisches Phasengleichgewicht vor, so ist die

2 Theorie

Vorgehensweise analog zur Beschreibung des Dampfdrucks einer Flüssigkeit nach Clausius Clapeyron.^[174] Die Adsorptionsphase entspricht einer Mischphase aus Adsorbat A und Sorbens S bestehend aus Teilchen gleicher Größe und die Teilchenzahl n_s sei proportional zur Oberfläche S, die Stoffmenge sei konstant. Aus dem totalen Differential der freien Enthalpie der Adsorptionsphase,

$$dG = \left(\frac{\partial G}{\partial T}\right)_{p, n_A, n_S} \cdot dT + \left(\frac{\partial G}{\partial p}\right)_{T, n_A, n_S} \cdot dp + \left(\frac{\partial G}{\partial n_A}\right)_{T, p, n_S} \cdot dn_A + \left(\frac{\partial G}{\partial n_S}\right)_{T, p, n_A} \cdot dn_S \quad \text{Formel 35}$$

ergibt sich folgende Bedingung für die Änderung des chemischen Potentials:

$$d\mu_A^\alpha = \left(\frac{\partial \mu_A^\alpha}{\partial T}\right)_{p, \Gamma, n_S} \cdot dT + \left(\frac{\partial \mu_A^\alpha}{\partial p}\right)_{T, \Gamma, n_S} \cdot dp + \left(\frac{\partial \mu_A^\alpha}{\partial \Gamma}\right)_{T, p, n_S} \cdot d\Gamma \quad \text{Formel 36}$$

Im Gleichgewicht sind die chemischen Potentiale beider Phasen gleich. Im isotheren Fall, d.h. bei konstanter Belegung

$$\Gamma = \frac{n_A}{n_S} \quad \text{Formel 37}$$

folgt

$$\left(\frac{\partial p}{\partial T}\right)_\Gamma = \frac{s_A^{*\beta} - s_A^\alpha}{v_A^{*\beta} - v_A^\alpha} \approx \frac{h_A^{*\beta} - h_A^\alpha}{T \cdot v_A^{*\beta}} \quad \text{Formel 38}$$

v ist das partielle molare Volumen des Adsorbats, das im letzten Schritt gegenüber dem molaren Volumen des gasförmigen Adsorptivs vernachlässigt wurde. Betrachten wir die Gasphase als ideal, können wir unter Verwendung des idealen Gasgesetzes den Differentialquotient analog zur Clausius Clapeyronschen Gleichung formulieren^[174]

$$\left(\frac{\partial \ln p}{\partial T}\right)_\Gamma = \frac{h_A^{*\beta} - h_A^\alpha}{RT^2} = \frac{-\Delta_{ads}H}{RT^2} \quad \text{Formel 39}$$

Im Fall einer Proteinadsorption ergibt sich die Änderung der freien Enthalpie als Summe aus mehreren Beiträgen

$$\Delta_{ads}G = \Delta_{ads}G_{vdW} + \Delta_{ads}G_{EDL} + \Delta_{ads}G_{hydr} + \Delta_{ads}G_{Hbond} + \Delta_{ads}G_{struct} \quad \text{Formel 40}$$

(in der Gleichung von links nach rechts) den attraktiven van-der-Waals-Kräften zwischen Oberfläche und Protein ($\Delta H \sim 0.4$ kJ/mol), hinzu kommt der Beitrag der elektrostatischen Doppelschicht ($\Delta H \sim 12.5$ kJ/mol), der hydrophoben Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken ($\Delta H \sim 4$ kJ/mol). Besonders wichtig sind strukturelle Umwandlungen innerhalb des Proteinmoleküls.^[69]

Langmuir-Isotherme

Die einfachste thermodynamische Beschreibung der Wechselwirkung zwischen Teilchen in der Gasphase und einer Festkörperoberfläche unter Gleichgewichtsbedingungen erfolgt mit der

2.7 Proteine und Proteinadsorption

Langmuir-Isothermen.^[156] Das Gleichgewicht besteht zwischen der Adsorbatphase und der Gasphase. Das Modell basiert auf drei Grundannahmen: Die Adsorption führt höchstens zu einer Monolage der adsorbierten Moleküle auf der Oberfläche. Die Oberfläche ist einheitlich und alle Bindungsstellen sind gleichwertig. Die Bindung eines Moleküls an eine bestimmte Oberflächenposition erfolgt unabhängig von der Besetzung benachbarter Bindungsstellen.^{[157] [174]} Die Herleitung setzt voraus, dass die Wechselwirkung zwischen adsorbierten Molekülen gegenüber der Bindungsenergie vernachlässigbar ist. Im Folgenden werden zwei Ansätze zur Herleitung vorgestellt. Der erste Ansatz betrachtet die Adsorptionsgeschwindigkeit und Desorptionsgeschwindigkeit. Im thermodynamischen Gleichgewicht sind beide Geschwindigkeiten gleich groß. Die Adsorptionsgeschwindigkeit wird proportional zum Druck und der Anzahl freier Oberflächenplätze angesetzt. Die Desorptionsgeschwindigkeit ist proportional zum Bedeckungsgrad, der maximal eins ist. Das Gleichsetzen beider Geschwindigkeiten führt auf den Bedeckungsgrad.^[156] Für Alkanthiole kann beispielsweise das Langmuir-Modell erster Ordnung angenommen werden.^[175] Die zeitliche Änderung des Bedeckungsgrades θ ist charakterisiert durch $\frac{d\theta}{dt} \sim 1 - \theta$ mit der zeitabhängigen Bedeckung $\theta(t) = 1 - e^{-ckt^\alpha}$ mit $\alpha=1$, c ist die Konzentration in mol/l, k ist die Konstante in l/(mol*s). Ist der Adsorptionsprozess diffusionsbestimmt, gilt $\alpha=1/2$.^[176] Dieses Gesetz beschreibt die Adsorption von Antikörpern auf Oberflächen, die mit Antigenen besetzt sind.^[177] Die theoretische Herleitung über die kanonische Zustandssumme geht davon aus, dass eine feste Zahl N an Molekülen und eine definierte Zahl M identischer Adsorptionsplätze vorliegt. Jeder Adsorptionsplatz kann maximal durch ein Molekül besetzt werden. Die Zustandssumme des Systems ist gegeben durch die N -te Potenz der Zustandssumme eines Moleküls multipliziert mit einem Faktor, der die Entartung des Systems beschreibt.^{[178] [179]}

$$Z = (Z^s)^N \frac{M!}{N! (M - N)!} \quad \text{Formel 41}$$

mit

$$Z^s = Z_{\text{Adsorptionsplatz}} * Z_{\text{innere Freiheitsgrade}} * e^{\frac{E}{kT}} \quad \text{Formel 42}$$

Z^s ist die Zustandssumme für ein Molekül. E ist die Bindungsenergie bezogen auf den Energie-Nullpunkt, der für einen unendlich großen Abstand zwischen Oberfläche und Molekül erreicht wird. Im nächsten Schritt wird das chemische Potential μ_s berechnet. Im Gleichgewicht ist das Potential der Gasphase und der adsorbierten Phase gleich. Aus

$$\mu_s = -k_B T \frac{\partial Z}{\partial N} \quad \text{Formel 43}$$

und der Stirlingformel folgt

$$\frac{\mu_s}{k_B T} = \ln\left(\frac{N}{M - N}\right) - \ln(Z_s) = \ln\left(\frac{\theta}{(1 - \theta)Z_s}\right) = \frac{\mu_G}{k_B T} \quad \text{Formel 44}$$

mit $\theta = \frac{N}{M}$ Die Gasphase wird durch ein ideales Gas beschrieben, dessen chemisches Potential gegeben ist durch

$$\mu_G = -k_B T \frac{k_B T}{\Lambda^3 p_0} \quad \text{Formel 45}$$

mit der thermischen De-Broglie-Wellenlänge Λ . p_0 ist der Referenzdruck und 3 ist die Anzahl an Freiheitsgraden. Es folgt

$$\theta = \frac{a(T)p}{1 + a(T)p} \quad \text{Formel 46}$$

a ist die Gleichgewichtskonstante.

In der Herleitung wurde der Hydrophobizität nicht Rechnung getragen. Es ist interessant, dass das Protein auf hydrophilen^[180] und hydrophoben Oberflächen ein anderes Adsorptionsverhalten zeigt.^[181] Ist das Substrat hydrophil, kann die Kinetik der Fibrinogen-Adsorption aus gering konzentrierten Lösungen, in Übereinstimmung mit AFM- und Ellipsometrie-Messungen, mithilfe des Random Sequential Adsorption (RSA) Modells berechnet werden.^[180] Ausgangspunkt sind mehrere Annahmen, zum einen über die Gestalt von Fibrinogen, das Molekül besteht aus einer Kette sich berührender Kugeln, zum anderen über die Adsorption, sie erfolgt als stochastischer Prozess. Moleküle adsorbieren irreversibel auf freien Oberflächenplätzen, ohne dass ein Überlapp zu bereits adsorbierten Molekülen entsteht. Zur Berechnung der Abhängigkeit der Proteinbedeckung von der verfügbaren Oberflächenfunktion werden numerische Monte Carlo Simulationen verwendet. Durch Extrapolation konnte eine maximale Oberflächenkonzentration von $2,26 \cdot 10^3 \mu\text{m}^{-2}$ für side-on Adsorption, d.h. das Molekül liegt auf der Oberfläche ermittelt werden. Dies entspricht einer Bedeckung von 0,29. Die Kinetik folgt durch Lösen der Massentransportgleichung in der Volumenphase mit nicht linearen Randbedingungen, die durch die Blockier-Funktion gegeben sind.^[180]

2.7.4 Proteinresistente Oberflächen

Zur Vermeidung der unkontrollierten Proteinadsorption kann man Oberflächen z.B. mit Polyethylenglykol (PEG)-Filmen beschichten.^[182] Dabei handelt es sich um lineare oder verzweigte Polyether ($\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$), die über ein Molekulargewicht von 200 g/mol bis mehrere Millionen g/mol verfügen. PEG-Moleküle haben eine konformative Freiheit und sind hydratisiert.^[183] Nähert sich ein Protein an den PEG-Film an, werden die PEG-Moleküle in ihrer Konformation eingeschränkt. Unter der Annahme, dass PEG neutrale, lineare und flexible Ketten sind, die sich auf hydrophoben Oberflächen in wässrigem Medium befinden, kann die sterische Abstoßung nach der Alexander-de-Gennes Theorie berechnet werden.^[184]

Ein weiterer Schlüsselfaktor ist die Wechselwirkung von PEG mit Wassermolekülen.^[185] Die Wechselwirkungen wurden mit mehreren Methoden experimentell untersucht, mit Lichtstreuung,^[186] kalorimetrischen Messungen,^[187] Kernspinresonanz, Neutronenstreuung, Gravimetrie und Rasterkraftmikroskopie.^{[188] [189] [190] [191] [108] [187] [192]} Durch Wasserstoffbrückenbindungen bildet sich eine Hydrathülle. Diese führt zu einem Ausschluss-Volumen, das die Annäherung von Proteinen an die Oberfläche verhindert. Bei Polyethylenglykolen liegen pro EG-Einheit zwischen drei und fünf gebundenen Wassermoleküle vor.^{[187] [190]} Mit zunehmender Dicke des Filmes wächst die Proteinresistenz. Die Mechanismen der Proteinresistenz kurzkettiger EG-terminierter selbstassemblierter Monolagen sind bislang noch nicht eindeutig geklärt. Eine detaillierte Darstellung findet man beispielsweise in^[193].

2.8 Simulationstechnik

Die Lösung der Maxwell Gleichungen ist Grundlage aller Ansätze zur Simulation der Streuung von Licht an Nanostrukturen. Angepasst auf das jeweilige Problem stehen mehrere Techniken zur Verfügung, wie effektive Mediums-Theorien nach Maxwell Garnet^[194] oder Bruggeman, discrete dipol approximation, boundary element method (BEM),^[195] Finite Difference Time Domain Simulationen (FDTD)^[196] und rigorose Beugungstheorien. Letztere werden zur Berechnung der Sensorantwort in dieser Arbeit verwendet. Die Simulationen werden mit dem Programm DiffractMOD von RSOFT durchgeführt. Das Verfahren ist anwendbar für komplizierte periodische Strukturen, die sowohl aus dielektrischen als auch metallischen Bauteilen mit dispersiven Materialien bestehen.^[197] Der Kernalgorithmus löst die Maxwell Gleichungen im Fourier Raum unter Beachtung der Randbedingungen auf Basis der Coupled Wave Analysis (RCWA) und der Modal Transmission Line (MTL) Theorie zur Förderung der Stabilität.^[198] Im Folgenden wird auf den RCWA Algorithmus, auch Fourier Modal Methode genannt, genauer eingegangen. Die grundlegende Eigenschaft der RCWA ist die Einschränkung der möglichen Lösungen durch die Regelmäßigkeit der Struktur und unter Verwendung der Floquet Bedingung für zweidimensionale Probleme bzw. des Bloch Theorems im Dreidimensionalen.^[199] Dieses fordert die Quasiperiodizität der Felder bei periodischen Randbedingungen. Die Vorgehensweise des Algorithmus lässt sich in 4 Schritte aufteilen. Der Startpunkt sind die Maxwell Gleichungen in Materie, dies sind Differentialgleichungen. Die Zeitabhängigkeit wird als harmonischer Faktor $\exp(-i\omega t)$ separiert mit der Frequenz ω . Ableitungen werden durch Fourier-Transformationen zu algebraischen Operationen, weil die Funktionen Eigenfunktionen des Laplace-Operators sind.^{[161] [39]} Ein weiterer wichtiger Punkt ist der Faltungssatz und die Parsevalsche Gleichung, aus denen folgt, dass Faltungen im Realraum zu Produkten im Fourier Raum werden. Der Gradient bewirkt eine Multiplikation mit ik und die Zeitableitung eine Multiplikation mit $-i\omega$.

$$\nabla \times E = i\omega\mu H \quad \text{Formel 47}$$

$$\nabla \times H = -i\omega\varepsilon_0\varepsilon(x, y, z)E \quad \text{Formel 48}$$

mit der Kreisfrequenz ω , und der ortsabhängigen dielektrischen Funktion $\varepsilon(x,y,z)$, die das Gitter beschreibt. Ausgehend von der einfallenden Lichtwelle soll nun die Beugungseffizienz bzw. die reflektierten und transmittierten Wellen berechnet werden. Die Felder werden in x- und y-Richtung in Fourier-Reihen entwickelt. Die z-Abhängigkeit verbleibt.

$$\mathbf{E}_g = \sum_{\mu=-M_x}^{M_x} \sum_{\nu=-M_y}^{M_y} [S_{x,\mu\nu}(z)\mathbf{e}_x + S_{y,\mu\nu}(z)\mathbf{e}_y + S_{z,\mu\nu}(z)\mathbf{e}_z] \exp[i(k_{x,\mu}x + k_{y,\nu}y)] \quad \text{Formel 49}$$

$$\mathbf{H}_g = -i\sqrt{\frac{\varepsilon_0}{\mu_0}} \sum_{\mu=-M_x}^{M_x} \sum_{\nu=-M_y}^{M_y} [U_{x,\mu\nu}(z)\mathbf{e}_x + U_{y,\mu\nu}(z)\mathbf{e}_y + U_{z,\mu\nu}(z)\mathbf{e}_z] \exp[i(k_{x,\mu}x + k_{y,\nu}y)] \quad \text{Formel 50}$$

Es wird über die Modenzahlen M_x und M_y in x- und y-Richtung mit den Laufindices der Fourier – Entwicklung μ und ν summiert. S und U sind die normierten Fourier-Koeffizienten. \mathbf{e}_x , \mathbf{e}_y und \mathbf{e}_z sind die Einheitsvektoren. k_x und k_y sind die Komponenten der Wellenvektoren, die vom Polarwinkel, Azimutwinkel und Gittervektor abhängen. Zur Reduktion des Rechenaufwandes wird die Struktur in Zellen aufgeteilt, die vertikal homogen sind, d.h. dort ist die dielektrische Funktion homogen und unabhängig von der z-Richtung. Eine Möglichkeit zur Modellierung beliebiger Profilverformen erfolgt mittels Treppenstufen-Näherung (Abb. 27) nach Li et al.^{[200] [201] [202]}

2 Theorie

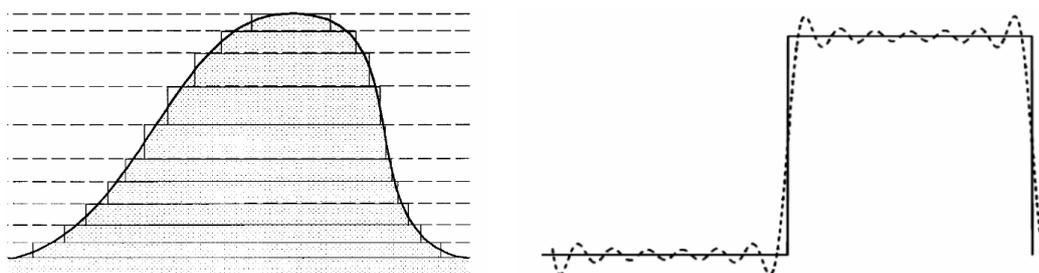


Abb. 27: Links: Veranschaulichung der Wahl einer Treppenstufe zur Berechnung beliebiger Profilformen^[200] Rechts: Beschreibung einer Gitterstufe durch vierzehn Koeffizienten eines Rechtecks.^[203]

Im zweiten Schritt wird die Periodizität der Struktur zur Vereinfachung genutzt, die sich entsprechend dem Bloch'schen Theorem auf die Feldkomponenten in x- und y-Richtung überträgt. Diese werden in die Maxwell-Gleichungen eingesetzt. Die Darstellung erfolgt mithilfe von Matrizen und im 3. Schritt wird das Eigenwertproblem formuliert. Die Eigenfunktionen sind aus harmonischen Funktionen zusammengesetzt, die Eigenwerte können als effektive Brechungsindices identifiziert werden.^[204] Anschließend wird die Lösung des Streuproblems unter Verwendung des Transmission-Line-Ansatzes für die Randbedingungen berechnet. Ein ganz entscheidender Punkt ist dabei die Konvergenz der Lösung. Konvergenz bedeutet hier die Annäherung der berechneten Beugungseffizienz an einen konstanten, von der Anzahl der verwendeten Fourier-Koeffizienten unabhängigen Wert.

In dieser Arbeit wird die Geometrie der Nanostruktur mit einer CAD-Oberfläche aus einzelnen Segmenten gestaltet, die dielektrischen Eigenschaften unter Verwendung einer Datenbank definiert und die Einfallsebene des Lichtes festgelegt (Abb. 28). Es wird eine Konvergenzstudie durchgeführt, indem die Reflexion bei festgehaltener Wellenlänge als Funktion der berücksichtigten Oberschwingungen berechnet wird. Entsprechend der verwendeten dielektrischen Eigenschaften beträgt die Brechindexauflösung 0,0045 RIU. Die Wellenlängenauflösung wird auf 1 nm bzw. 10 nm gesetzt. Die Rechenzeit hängt von der gewählten Auflösung ab.

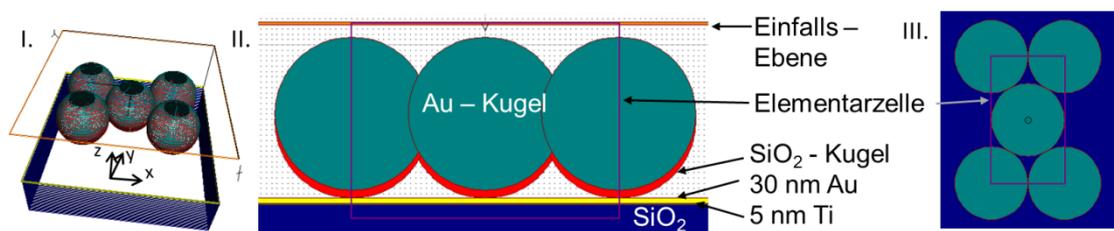


Abb. 28: Darstellung der verwendeten Geometrie zur Modellierung der Nanopartikelfilme, Elementarzelle und Einfallsebene. Die Ansicht ist in I. 3 dimensional, in II. von der Seite und III. Sicht von oben.

3 Experimenteller Teil

3.1 Geräte

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
UV-Quecksilberlampe	Typs NIQ 40/18	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Ultraschallbad	Sonomatic 1800	Langford Ultrasonics (Coventry, Großbritannien)
Spin-Coater	TT 200-8	LP-Thermtech AG (Ramsen, Schweiz)
PID Controller des Spin-Coaters	2416	Eurotherm (Worthing, Großbritannien)
Rüttelbrett	Promax 1020	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
UV-VIS-Spektrometer	HR 2000	Ocean Optics
CCD-Camera	Sensicam em pco.imaging	PCO AG (Kelheim, Deutschland)
Deuterium-Wofram-Halogen-Lampe	DH 2000	Ocean Optics
REM	LEO1530	Zeiss
Mikrowellenplasmagerät	TePla100-E	PVA TePla AG, (Wettenberg, Deutschland)
Sputter-Coater	MED 020 Coating System	Bal-Tec

3.1.1 Strahlungsquelle

Die Untersuchung der Extinktionseigenschaften, insbesondere plasmonischer Anregungen im Medium Luft und unter Flüssigkeiten, und der Proteinadsorption erfordert eine Lichtquelle mit kontinuierlichem Spektrum (Abb. 29) im gesamten Spektralbereich vom UV bis zum nahen Infrarot (NIR), d.h. von ca. 200 – 1000 nm. Im Fall noch kürzerer Wellenlängen würde der organische Film, der sich auf der Sensoroberfläche beim Adsorptionsprozess bildet, zerstört werden. Gold wird im UV Bereich transparent und Glas absorbiert verstärkt durch Elektronenübergänge und Verunreinigungen.^[14] Im IR-Bereich wäre die Messung unter Flüssigkeit durch Wasserbanden erschwert. Eine einzelne feste Wellenlänge genügt bei Untersuchung unterschiedlicher Brechungsindices und Reflexionswinkel nicht, weil die Richtung der Verschiebung der Spektren nicht eindeutig wäre. Verschiebung infolge der Proteinadsorption findet in der Regel ins Rote statt, allerdings kann auch stabilitätsbedingt, zum Beispiel durch Reduktion der plasmonischen Kopplung im Fall von Partikelverlusten, das Signal ins Blaue verschoben werden. Ein weiteres wichtiges Kriterium bei der Wahl der Lichtquelle ist deren Leistung, die im gesamten Messbereich vergleichbar sein sollte. Aus diesen Gründen wurde die Deuterium-Wolfram-(165 - 350 nm)-Halogen-(350 -2500 nm)-Lampe verwendet, deren Spektren in einem optischen Pfad vereinigt werden. Die Lichtemission erfolgt durch Anregung der Gasatome mithilfe von Elektronen in Form einer

3 Experimenteller Teil

Gasentladung. Die Messung der Extinktionseigenschaften erfolgt relativ zur Referenz. Die Intensitätsverteilung der Lichtquelle weist am Rande des detektierten Bereichs wenig Intensität auf. In diesen Bereichen können sich kleine Änderungen in der Referenz auf die Intensitäten der Peaks im Extinktionsspektrum auswirken.

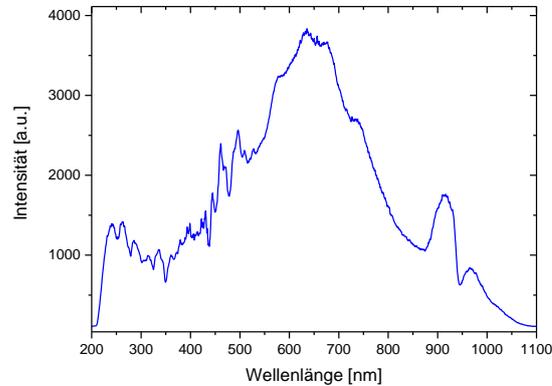


Abb. 29: Die Intensitätsverteilung der Lichtquelle als Funktion der Wellenlänge.

3.1.2 Spektrometer

Klassisch werden zur spektralen Auflösung von Spektren Gitter- oder Prismenspektrometer bzw. Fabry-Perot-Interferometer eingesetzt.^{[120] [205]} Letztere ermöglichen durch Interferenz nach Mehrfachreflexion der Lichtes zwischen zwei Spiegeln die Wellenlängenbestimmung mit einem spektralen Auflösungsvermögen von 10^6 . Ein Prismen-Monochromator nutzt zur spektralen Zerlegung die Brechung und Dispersion des Lichtes in einem Prisma. In dieser Arbeit wird ein Gittermonochromator eingesetzt (Abb. 30). Das Licht wird mit einer Linse gebündelt und trifft durch einen Einzelspalt auf einen Hohlspiegel, der den Strahl als breites Bündel paralleler Lichtstrahlen auf ein Gitter lenkt. Dies hat den Vorteil, dass alle Strahlen unter dem gleichen Winkel auf das Gitter treffen. Durch Drehen des Gitters werden die einzelnen Wellenlängen, intensitätsbedingt meist der ersten Beugungsordnung, selektiert und auf einen zweiten Hohlspiegel gelenkt. Danach trifft das Licht durch einen Austrittsspalt auf den Photodetektor. Die Auflösung A hängt ab von der Beugungsordnung m und der Anzahl der Gitterschlitze N und ergibt sich mithilfe des Rayleigh-Kriteriums und der Bedingung für Minima bei Beugung am Einzelspalt zu

$$A = \frac{\lambda}{\Delta\lambda} = mN \quad \text{Formel 51}$$

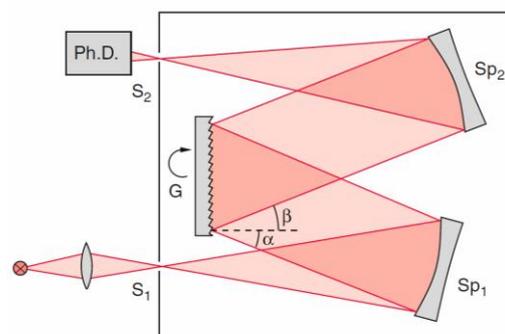


Abb. 30: Gittermonochromator mit Eintrittsspalt S_1 , Hohlspiegeln Sp_1 und Sp_2 , Gitter G , Austrittsspalt S_2 und Photodetektor $Ph.D.$ ^[206]

3.1 Geräte

Als Photodetektor wurde in dieser Arbeit ein Charge Coupled Device (CCD) – Detektor eingesetzt.

Tabelle 4: Detektor des UV-VIS-Spektrometers (HR 4000, Ocean Optics)^[207]

Detektor:	Toshiba TCD1304AP linear CCD array
Detektor Bereich:	200 - 1100 nm
Pixel:	3636 Pixel
Pixel Größe:	8 µm x 200 µm
Sensitivität:	130 Photonen/Ereignis bei 400 nm; 60 Photonen/Ereignis bei 600 nm

3.1.3 Glasfasern

Das Grundprinzip der Ausbreitung von Licht in Wellenleitern basiert auf dem Snelliusschen Brechungsgesetz unter der Bedingung der Totalreflexion an der Grenzschicht Kern-Mantel. Im Kernbereich der Glasfaser befindet sich ein Material, das einen höheren Brechungsindex n_1 als das Mantelmaterial n_2 hat. Die numerische Apertur der Faser ist

$$\sin \alpha = \sqrt{n_1^2 - n_2^2} \quad \text{Formel 52}$$

Man unterscheidet zwischen Stufenindexfasern, bei denen das radiale Brechungsindexprofil als Stufen ausgebildet ist, und Gradientenfasern, die eine vom Abstand abhängige numerische Apertur haben (Abb. 31). Eine wichtige Größe ist die Faserdämpfung. Die Verluste setzen sich aus Absorption und Streuung durch Verunreinigungen, OH⁻-Radikale (IR-Bereich, bei 1,4 µm), Elektronen-Anregungen im UV-Bereich von nicht abgesättigten Bindungen und Leckagen aus dem Kern in den Mantel zusammen.^{[206] [14]} Mit zunehmender Länge nimmt die transmittierte Leistung exponentiell ab. Beträgt die Dämpfung 0,2 dB/km, nimmt die Leistung auf 100 km auf 1% ab. Die Wellenlänge des Lichtes geht in den Lichtstreuquerschnitt für Rayleigh-Streuung ein, der proportional zu λ^{-4} ist.^[206]

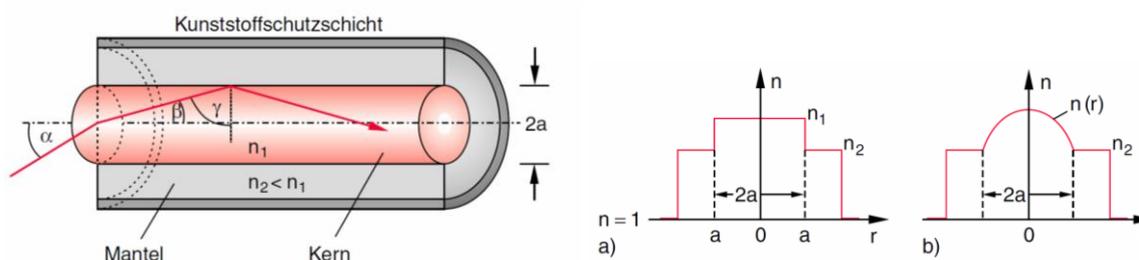


Abb. 31: Aufbau einer Lichtleitfaser sowie Ausbreitung von Lichtwellen durch Totalreflexion an der Grenzschicht Kern-Mantel und radiales Brechzahlprofil für (a) eine Stufenindexfaser, (b) eine Gradientenfaser.^[206]

3.1.4 REM

Alle Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Leo 1530 Gemini Elektronenmikroskop bei Raumtemperatur und einem Druck kleiner als 10^{-5} mbar durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit einem Inlens- bzw. SE-Detektor. Als Beschleunigungsspannung für die Elektronen, EHT (engl. Electron High Tension), wurden 3 bzw. 5 kV verwendet. Zur Vermeidung von Aufladungseffekten wurden nicht leitfähige Proben mit Kohlenstoff besputtert.

3.1.5 UV-NIR-Aufbau

Die Extinktionseigenschaften der Sensoren werden in Reflexion winkelabhängig untersucht. Die Messung erfolgt relativ zur Referenz, das ist das Substrat ohne Nanopartikelbeschichtung. Es werden drei optische Aufbauten eingesetzt: Die Lichteinstrahlung ist entlang der Probenormalen (Abb. 32, links), unter Winkeln im Bereich von 30° - 50° (Abb. 32, rechts) zur Probenormalen oder mit polarisiertem Licht unter einem festen Reflexionswinkel (Abb. 33).

In allen Aufbauten wird das Licht einer UV-NIR-Lampe (DH-2000-BAL Deuterium Tungsten Halogen Lamp, Ocean Optics) verwendet, die das kontinuierliche Spektrum ihrer Deuterium- und Wolfram-Halogen-Lichtquelle (200 nm – 1100 nm) in einem optischen Pfad vereint.^[208] Die Lichtleitung erfolgt mit Glasfasern. Im Aufbau zur Detektion entlang der Probenormalen wird eine Glasfaser (R200-7, Ocean Optics) mit einem Durchmesser von 3 mm eingesetzt. Diese besteht aus einem Glasfaserbündel. Im Aufbau zur Detektion unter Winkeln werden Glasfasern mit unterschiedlichem Durchmesser verwendet. Zur Leitung des Lichtes von der Quelle zur Probe wird eine Glasfaser mit einem Durchmesser von 400 μm (XSR, Ocean Optics) eingesetzt und zur Analyse der reflektierten Intensität das Licht mit einer Glasfaser vom Durchmesser 600 μm (XSR, Ocean Optics) zum UV-VIS-Spektrometer (HR 4000, Ocean Optics) geleitet. Die Justage der Glasfasern wird auf einer Seite mit einem xyz-Translationstisch (DT12 x,y,z, Thorlabs) und auf der anderen Seite mit einem z-Translationstisch (DT12 z, Thorlabs) vorgenommen. Der Reflexionswinkel kann mithilfe von Rotationstischen (Pro01/M, Thorlabs), an denen die Fasern befestigt sind, auf $0,5^\circ$ genau eingestellt werden. Die Probe befindet sich in einer Glasschale. Bei Untersuchungen unter Flüssigkeiten tauchen die Glasfaserenden in die Flüssigkeit ein, um Brechung zu vermeiden.

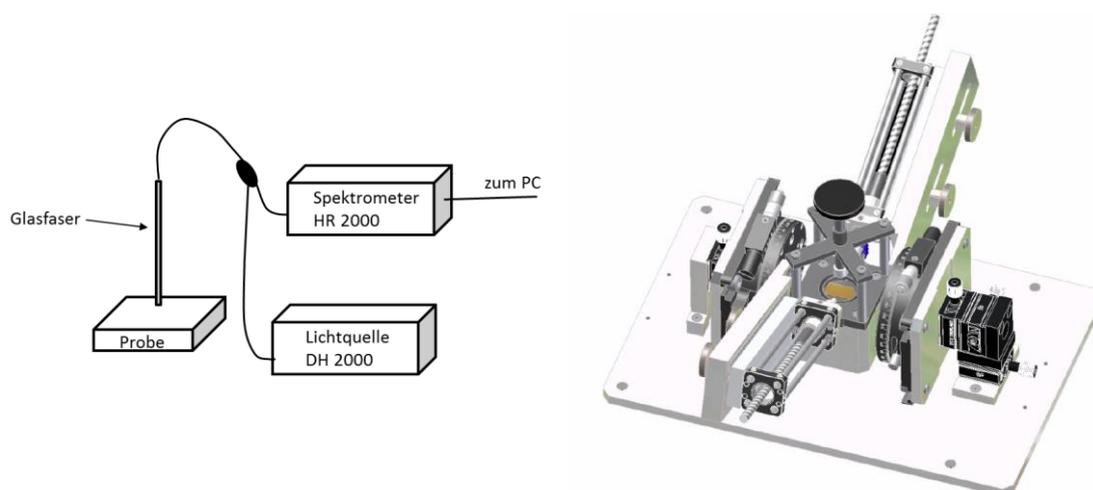


Abb. 32: UV-NIR-Aufbauten zur Untersuchung der Extinktionseigenschaften der Biosensoren unter Lichteinfall entlang der Probenormalen (links) und unter Winkeln im Bereich von 30° - 50° (rechts^[209]).

Im dritten Aufbau, der zur polarisationsabhängigen Charakterisierung der optischen Eigenschaften dient, wird Licht auf einen Polarisator (Thorlabs GmbH, München Deutschland) gelenkt und mit einer Linse (OceanOptics) auf die Probe fokussiert. Die Einstellungen für s- bzw. p-polarisiertes Licht werden zuvor geeicht. Das gängige Verfahren ist die Betrachtung des Spiegelbildes eines Gegenstandes an einer Glasplatte bei Reflexion unter dem Brewster Winkel. Die Beobachtung erfolgt mit Blick durch den Polarisator. Die Polarisatoreinstellung wird gedreht bis das Spiegelbild, entsprechend dem p-polarisierten Lichtanteil, verschwindet.^{[210] [211]} Die Probe wird mit einem doppelseitigen Klebeband im Zentrum eines Rotationstisches und daneben auf gleicher Höhe die Referenz befestigt. Dieser Rotationstisch ist mithilfe einer Schiene parallel zum

3.1 Geräte

Labortisch verschiebbar und so montiert, dass der einfallende Lichtstrahl auf der Höhe des Zentrums des Rotationstisches liegt. Diese Anordnung ermöglicht eine einfache Messung von Referenz und Probe. Die Orientierung der Probe senkrecht zur Einfallsebene kann bis auf ein Grad genau eingestellt werden. Die Winkel-Unsicherheit entsteht beim Aufkleben der Probe, danach ist die Orientierung bis auf $0,5^\circ$ genau regelbar.

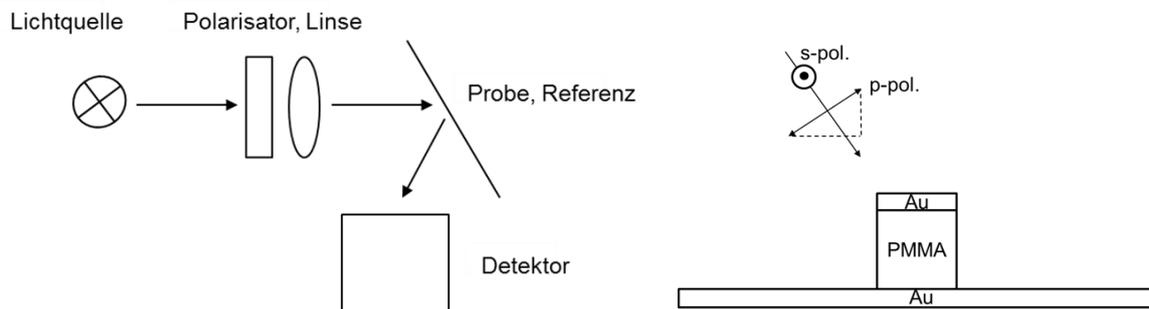


Abb. 33: Links: UV-NIR-Aufbauten zur polarisationsabhängigen Untersuchung der Extinktionseigenschaften der Biosensoren unter Lichteinfall unter einem festen Reflexionswinkel zur Probennormalen. **Rechts:** Darstellung der Orientierung von s- und p-polarisiertem Licht. Als Beispiel für die verwendeten nanostrukturierten Proben ist hier ein Würfel aus PMMA, der mit Gold beschichtet ist, abgebildet.

3.1.6 SPR-Imaging-Aufbau

Die Detektion im Array-Format erfolgt mit einem SPR-Imaging Aufbau von Dr. H. Güvenc. Der Aufbau besteht aus mehreren Teilen (Abb. 34), einer DH-2000-BAL Lichtquelle (OceanOptics / USA) ausgestattet mit Deuterium- und Halogenlampen, die in einem Lichtpfad kombiniert werden, einer Edelstahl ummantelten Glasfaser mit einem Kerndurchmesser von $600\ \mu\text{m}$ (OceanOptics / USA), einem 74-UV-Kollimator (OceanOptics / USA), einem mit motorisierten Schlitzen ausgestatteten Cornerstone 260 1/4m Monochromator (Newport Spectra-Physics GmbH / Deutschland), einem Teleskopsystem einschließlich einer konkaven PLCC-Linse, mit einer Brennweite von $100\ \text{mm}$ (Laser Components GmbH / Deutschland) und einer konvexen PLCx-Linse, mit einer Brennweite von $250\ \text{mm}$ (Laser Components GmbH / Deutschland), um den Strahldurchmesser anzupassen. Der Probenhalter wurde auf einen drehbaren Sockel (Thorlabs GmbH / Deutschland) montiert. Die Detektion erfolgte mit einer hochauflösende Sensicam em UV-CCD-Kamera (PCO AG / Deutschland) mit der Abbildungslinse Makro Planar 2/100mm ZF (Carl Zeiss / Deutschland), die zwischen $400 - 1000\ \text{nm}$ arbeitet. Die Auflösung des Monochromators wurde durch die Einstellung der Spaltbreite bis $3\ \text{nm}$ in allen Experimenten gesteuert. In dem Teleskopsystem wurde der Strahldurchmesser auf das 2,5-fache des Durchmessers der Glasfaser ($600\ \mu\text{m}$) eingestellt. Die beleuchtete Fläche beträgt etwa $1,6\ \text{cm}^2$. Die Pixelgröße der CCD-Detektors beträgt $8\ \mu\text{m} \times 8\ \mu\text{m}$.^[212]

3 Experimenteller Teil

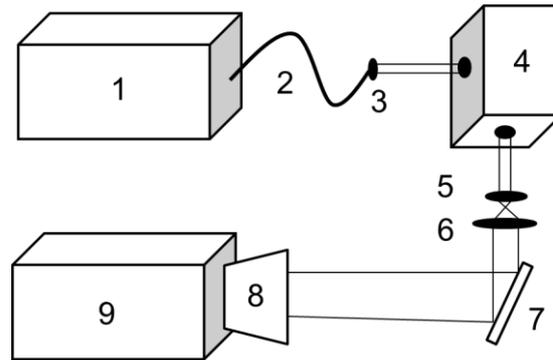


Abb. 34: SPR-Imaging-Aufbau bestehend aus der Lichtquelle (1), der Glasfaser (2) mit 600 μm Durchmesser, einem Kollimator (3), dem Monochromator (4), konkave (5) und konvexe (6) Linse, der Probe (7), der Abbildungslinse (8) und der CCD-Kamera (9) (nach ^[59]). Um eine größere Fläche auszuleuchten wurde die Linse (3 und 6) entfernt.

3.1.7 SPDM-Mikroskop

Es wurde ein hochauflösendes Fluoreszenzmikroskop verwendet, das die Vorteile der Einzelmolekül-Lokalisations-Mikroskopie (single molecule localisation microscopy, SMLM) mit strukturierter Beleuchtung (structured illumination microscopy, SIM) verbindet. Der Aufbau ist im Detail in Rossberger et al.^[213] beschrieben. Die Messungen wurden unter Verwendung von schaltbaren Fluorophoren durchgeführt.

3.2 Chemikalien und Trägermaterialien

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Chemikalien nebst Reinheitsgrad und Hersteller

Chemikalie	Reinheitsgrad	Hersteller
Ethanol	p.a.	Zentrallager, Heidelberg
Destilliertes Wasser	Voll entsalzt bei einem spezifischen Widerstand von 18,2 M Ω cm	Millipore GmbH, Eschborn, Deutschland
Phosphatpuffer	pH = 7,4 Tablette	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Polyethylenimin (PEI)	MW=25000 Da, wasserfrei	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	> 99,5%	Sigma-Aldrich
Tetrachlorgoldsäure-Trihydrat (HAuCl ₄ × 3 H ₂ O)	99.9%	Sigma-Aldrich
Natriumborhydrid	99%	Sigma-Aldrich
TritonX-100		Sigma-Aldrich
Natriumcitrat	99+%	Sigma-Aldrich
N-Hydroxysuccinimid (NHS)	97%	Sigma-Aldrich
N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimid Hydrochlorid (EDC)	98%	Sigma-Aldrich
Hydroxylamin (NH ₂ OH)	99%	Sigma-Aldrich
16-Mercaptohexadecansäure	99%	Sigma-Aldrich
1-Oktadekanthiol	98%	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid	p.a.	Merck
Fibrinogen from human plasma	Proteingehalt 35 - 65% 98% gerinnbar	Sigma-Aldrich
Glycerin	99%	Chem solute, Geyer (Reinigen, Deutschland)
Trinatriumcitratdihydrat	99%	Merck
Polyallylaminhydrochlorid-Lösung (PAH)	Keine Angabe	Sigma Aldrich
Wasserstoffperoxid	30%	AppliChem, Darmstadt
Ammoniak	25%	Sigma Aldrich
Isopropanol	p.a.	AppliChem, Darmstadt
Alexa 647 Succinimidyl Ester (A-21676 Component B Carboxysäure)	Keine Angabe	Invitrogen, Darmstadt
ProLong®Gold	Keine Angabe	Invitrogen, Carlsbad, USA
Poly-L-Lysin grafted Polyethylenglykol (PLL-g-PEG)	1°mg/ml, aliquot	Keine Angabe
Toluol	99,8%	VWR international
PS(500)-block-2PVP-(270)	Keine Angabe	Polymer Source Inc., Montreal, Kanada
Wasserstoffperoxid	p.a.	Baker, Deventer
Schwefelsäure	25%	VWR international

3 Experimenteller Teil

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten dielektrischen Nanopartikel

Nanopartikel	Durchmesser [nm]	Konzentration	Firma
Silika-NH ₂	510 - 540	Pulver	Polysciences, (Warrington, USA)
Polystyrol Latex-Plain White Partikel	6000	10,0% in Wasser	Varian
	570	10,0% in Wasser	
	384		
	190	10,1% in Wasser	
	96	10,0% in Wasser	
46	10,0% in Wasser		

Silika-NH₂ bezeichnet dielektrische aminoterminierte SiO₂-Kugeln.

3.3 Präparation homogener Nanopartikeloberflächen

Feste Glasträger, die mit Gold der Dicke 100 nm und 5 nm Titan als Haftvermittler bedampft sind, wurden von Georg Albert (KIT) bezogen. Die Substrate werden in 3 Arbeitsschritten (Abb. 28) mit optisch aktiven Nanopartikelfilmen beschichtet. Zuerst erfolgt eine Reinigung der Substrate mittels Ozon, durch einstündige Bestrahlung mit einer UV-Quecksilberlampe. Anschließend werden dielektrische Kugeln mit der sogenannten Floating-Methode (siehe unten) an die Substrate gebunden und die Proben abschließend metallisiert. Als dielektrische Partikel werden Polystyrol-Nanopartikel oder Silika-Nanopartikel eingesetzt.

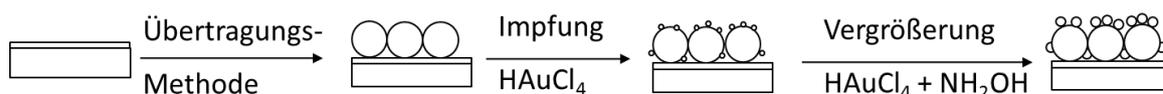


Abb. 35: Präparation der metallisierten Nanopartikeloberflächen. Das Substrat wird gereinigt, dielektrische Partikel werden in einem Langmuir-Blodgett ähnlichen Verfahren auf den Träger übertragen, darauf Metall-Nanopartikel aus einer Suspension abgeschieden (Seeding) und diese Nukleationskeime unter Verwendung von Hydroxylamin vergrößert (Plating).

3.3.1 Übertragung dielektrischer Nanopartikel mit Kontaktpunkten mittels Floating

Mit einer Langmuir-Blodgett ähnlichen Übertragungsmethode („Floating“) werden dielektrische Nanopartikel hexagonal dicht gepackt auf das Substrat übertragen.^{[214] [215] [59] [216]} Die Übertragung der dielektrischen Nanopartikel auf ein Substrat erfolgt in mehreren Schritten (Abb. 36).

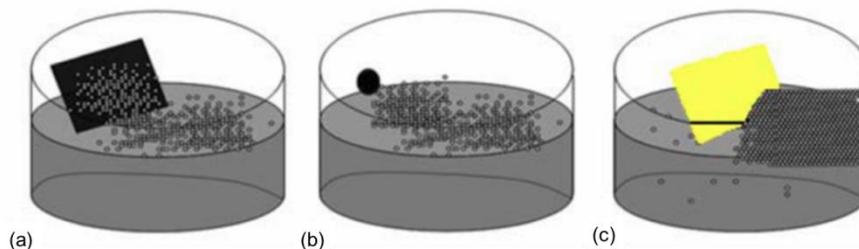


Abb.36: Darstellung der Schrittfolge zur Übertragung dielektrischer Nanopartikel als dicht gepackte Monolage: **(a)** Übertrag der Partikel mit Hilfe eines Deckglases auf die Wasseroberfläche, **(b)** Hinzugabe von Detergenzien zur Verringerung der Oberflächenspannung und **(c)** Aufnahme der dicht gepackten Partikelschicht durch ein Substrat (nach ^[214]).

Zuerst wird die Oberfläche vorbereitet. Hierzu werden die Substrate nach der Reinigung mithilfe eines Polymers positiv geladen, indem die Probe in eine Lösung von zwei Teilen Polyethylenimin-Lösung (2 mg PEI pro 1 ml 0,5 M NaCl) sowie ein Teil phosphatgepufferter Salzlösung mit pH 7.4 (1 PBS-Tablette pro 200 ml Milli-Q-Wasser) eingelegt wird. Das Polymer erzeugt Spiegelladungen im Goldfilm und bindet elektrostatisch. Ungebundene Polymerlagen werden mit Milli-Q-Wasser abgespült und die Probe im Stickstoffstrom getrocknet. Zum Aufbringen der dielektrischen Nanopartikel werden die Polystyrol-Nanopartikel, die als Suspensionen vorliegen, als fester Bestandteil ab zentrifugiert und der Überstand verworfen.

3 Experimenteller Teil

Die Partikel werden mit doppelter Menge Ethanol verdünnt, während im Fall der Silika-Partikel, die als Pulver vorliegen, eine Suspension der Konzentration 0,05 mg/ml in Ethanol hergestellt wird. Die Mischung erfolgt im Ultraschallbad für 30 min.

Anschließend werden sie mithilfe eines Deckglases auf der Wasseroberfläche eines Gefäßes durch Eintauchen verteilt (Abb. 36, (a)). Durch Zugabe von Chemikalien, 5 µl Natriumlaurylsulfat-Lösung und 5 µl TitronX, bildet sich eine dicht gepackte Monolage (b). Im letzten Schritt werden die Nanopartikel mit dem Substrat aufgenommen (c). Die Anordnung der Partikel beruht auf Kapillarkräften.^{[217] [218] [219]}

3.3.2 Metallisierung der Sensoroberflächen

Zur Metallisierung der Sensoroberflächen werden nasschemische Methoden, Ionen-Sputtern und physikalische Gasabscheidung (PVD) eingesetzt. Beschichtungen mittels PVD-Verfahren wurden durch Herrn Georg Albert (KIT), Herrn Peter-Jürgen Jakobs bzw. Frau Nees (KNMF, KIT) und Herrn Volker Schultheiß (Reinraumtechnik, KIP) hergestellt.

3.3.2.1 Nasschemische Methoden

Die nasschemische Metallisierung der Probe wird in zwei Schritten vorgenommen. Zuerst wird die Oberfläche mit Gold-Nanopartikeln (Seeding) geimpft und dieselben durch eine Metallabscheidung aus einer Goldsalzlösung (Plating) vergrößert.^[11] Beide Schritte werden im Folgenden im Detail erklärt.

Seeding

Zur elektrostatischen Bindung von Goldnanopartikeln im sogenannten Seeding-Schritt wird die Oberfläche mit Polyethylenimin-Lösung positiv geladen und zum Abscheiden der Impfkeime zwei Mal über Nacht mit einer citratstabilisierten Gold-Kolloidlösung versetzt. Diese wird in einer Redoxreaktion von Tetrachlorgoldsäure mit Natriumborhydrid und Natriumcitrat dargestellt.^{[215] [220]} Ausgehend von 600 ml Milli-Q-Wasser, zu dem 6 ml 1%ige Tetrachlorgoldsäure gegeben wird, erfolgt unter Rühren zuerst die Zugabe von 6 ml 1%iger Natriumcitrat-Lösung und nach 10 Minuten von 0,0045 g Natriumborhydrid, das in 6 ml 1%iger Natriumcitrat-Lösung gelöst wird. Bei Zugabe der letzten Chemikalie findet ein Farbumschlag zu Rot statt. Ein entscheidender Punkt zur Herstellung einer monodispersen Größenverteilung ist das kräftige Rühren der Lösung bei hoher Umdrehungszahl für 60 min. Ist dies nicht der Fall, bilden sich Partikel einer anderen Größe. Die Lösung wird dann nicht rot sondern dunkelviolett, weil die farbgebende Plasmonenresonanz stark von der Partikelgröße und -form abhängt. Es bilden sich positiv polarisierte Goldkolloide deren Oberflächenladung durch Citrat-Liganden stabilisiert wird (Abb. 37). Die negativ geladenen Liganden erfordern bei der elektrostatischen Deposition von Partikeln auf der Oberfläche eine entsprechende positiv geladene Funktionalisierung.

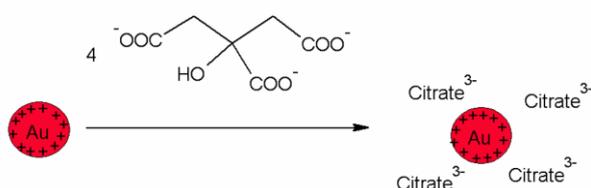
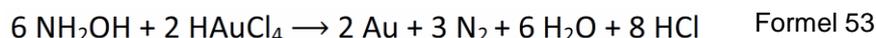


Abb. 37: Schematische Darstellung der mittels Citrat-Liganden stabilisierten Oberflächenladung der Goldkolloide.^[220]

3.3 Präparation homogener Nanopartikeloberflächen

Plating

Durch stromlose Goldabscheidung erfolgt die Vergrößerung der Goldkeime. Dabei scheidet sich Gold aus einer 0,1%igen Tetrachlorgoldsäure-Lösung durch Reduktion mit 0,04 M Hydroxylamin - Lösung an den bestehenden Goldkolloiden ab (Abb. 38). Dabei werden die Goldionen durch Elektronenaufnahme reduziert, das Reduktionsmittel wird oxidiert.



Bei dieser Redoxreaktion bilden sich keine neuen Partikel^[221] auf der Oberfläche, was vermutlich auf die Oberflächenenergie der Grenzfläche zurückzuführen ist,^[222] obwohl nach der Nernstschen Gleichung das Redoxpotential von Hydroxylamin (-1,8 V bei pH 2,5)^[223] zur Bildung neuer Partikel ausreichen würde. Die Reduktions-Lösung ist instabil. Die Reaktion wird durch Abspülen mit Milli-Q-Wasser gestoppt. Die Reaktionszeit bestimmt, ob sich ein geschlossener Film bildet.

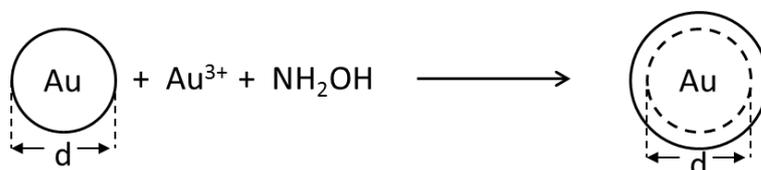


Abb. 38: Schematische Darstellung der Goldabscheidung. Nukleation in Form neuer Partikel findet nicht statt (nach ^[221]).

3.3.2.2 Ionen-Sputtern

Zum Besputtern der Sensoroberflächen mit Gold, Titan als Haftvermittler oder Graphit wird das MED 020 Coating System von der Firma Bal-Tec verwendet. Der Sputter-Coater besteht aus einem Vakuumsystem, einem Metalltarget bzw. Graphitfaden, einem Probenhalter und der Probe in Argon-Umgebung.^[224] Beim Beschichten der Proben mit Metallen werden mittels elektrischer Entladung Argon-Ionen erzeugt, die auf das Target beschleunigt werden. Durch Ionenbeschuss werden Metallatome aus dem Target gelöst und auf der Probe abgeschieden.

Im Fall von Graphit wird durch Kathodenzerstäubung des Graphitfadens eine dünne Graphitschicht auf die Proben aufgebracht. Dieses Verfahren reduziert Aufladungseffekte bei rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen.

3.3.2.3 Silberbeschichtung

Zur Sensoroptimierung wird Silber unterschiedlicher Dicke auf zwei unterschiedliche Oberflächentypen aufgebracht. Als Beispiel für einen plasmonischen Gitterkoppler werden hexagonal dicht gepackte Nanopartikel und mittels Elektronenstrahl strukturierte Proben verwendet. Den zweiten Sensortyp bilden dielektrische Filme. In einem Vorexperiment werden PMMA-Filme der Dicke 300 nm und 600 nm beschichtet und die optischen Eigenschaften überprüft.

Die Metallisierung mit Silber in den Dicken 20 nm und 30 nm mit dem Haftvermittler Titan wird mit der Sputter-Anlage Alcatel SCM 691 mit unterschiedlichen Raten (Tabelle 7) am Kirchhoff-Institut für Physik von Herrn Volker Schultheiß vorgenommen.

3 Experimenteller Teil

Tabelle 7: Parameter der Sputter-Anlage zur Metallisierung mit Silber und Titan zur Haftvermittlung

Material	Argon-Druck	Leistung	Rate
Ti (5 nm und 10 nm)	6 mTorr	200 W	1 nm/min
Ag (20 nm und 30 nm)	8 mTorr	100 W	10,8 nm/min

3.3.3 Herstellung vollständig umhüllter Partikel

Zur Herstellung vollständig umhüllter Nanopartikel (Abb. 39) werden PS-Partikel (60 $\mu\text{l/ml}$) bzw. Silica-Partikel (0,05 mg/ml) mit einer Lösung von zwei Teilen PEI-Lösung sowie einem Teil PBS-Lösung 30 Minuten im Ultraschallbad gelöst, anschließend wenige Minuten bei 8000 rpm zentrifugiert und der Überstand ab pipettiert. Die Nanopartikel werden 3-mal gewaschen, hierzu wird im ersten Schritt 0.5 M NaCl-Lösung, sonst Milli-Q-Wasser verwendet, um das Agglomerieren der Partikel durch Ladungsstabilisierung zu verhindern. Abschließend werden die dielektrischen Partikel mit der Seeding-Lösung versetzt und bei Raumtemperatur auf einem Rüttelbrett bei 100 rpm bis zum Entfärben der Lösung inkubiert, dann wird die Seeding-Lösung erneuert.

3.3.3.1 Plating in Suspension

Zum Anwachsen der Nukleationskeime zu einer geschlossenen Metallhülle werden die Nanopartikel mit 1 ml der frisch angesetzten Plating-Lösung versetzt und die Suspension sofort für 3 min mit dem Kreisschüttler (Vortexer von IKA, Staufen, Deutschland) geschüttelt, 1 Minute zentrifugiert und 3-mal mit Milli-Q-Wasser gewaschen.

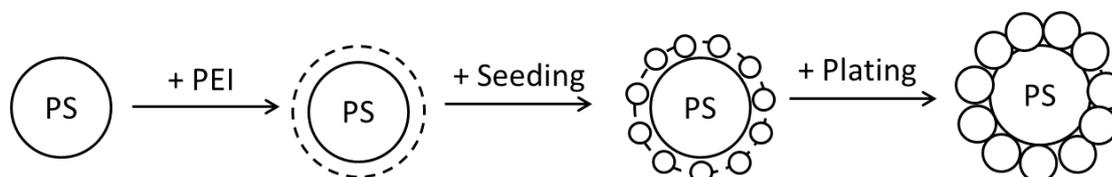


Abb. 39: Darstellung des Herstellungsprozesses vollständig mit Gold umhüllter Nanopartikel. Nach elektrostatischer Aufladung der Partikeloberfläche mithilfe eines Polymers erfolgen die Abscheidung von Nukleationskeimen aus einer Lösung und die anschließende Vergrößerung der Goldnanopartikel zu einem geschlossenen Mantel.

3.4. Experimente zur Signalentstehung

3.4.1 Filme

Es werden die optischen Eigenschaften sowohl von nicht metallisierten als auch mit 30 nm Gold bedampften PMMA-Filmen der Dicke 150 nm, 300 nm und 600 nm mit dem UV-VIS-Aufbau winkelabhängig und in Abhängigkeit vom Brechungsindex untersucht, sowie deren Sensitivität gegenüber Proteinadsorption getestet. Die Filme werden durch Spincoating am KIT hergestellt.

3.4.2 Reaktives Ionen Plasmaätzen

Durch Plasmaätzen mit einem radiofrequenzgenerierten reaktiven Ionenplasma (Plasma Lab 80 Plus ICP-PIE-System) werden die Partikeldurchmesser von Polystyrolpartikeln, die als hexagonal dicht gepackte Monolage vorliegen, reduziert und die Partikel vereinzelt (Abb. 40). Als Reaktionsgas wird (nach ^[225]) Sauerstoff bei einer Flussrate von 30 Standard Kubik Zentimeter (sccm) bei einem Druck von 700 mTorr verwendet, die Proben werden während der Reaktion auf 20°C gekühlt, um ein unkontrolliertes Verformen oder Schmelzen der Partikel zu verhindern. Die Radiofrequenzleistung beträgt 100 Watt. Als Probengröße wird je eine Fläche von 1 cm² gewählt und die Proben einzeln nacheinander auf der gleichen Position im Plasmagerät platziert und geätzt. Diese Vorgehensweise ist erforderlich, weil der Sputterprozeß sowohl von chemischem Ätzen als auch Sputterätzen bewirkt wird und deshalb die Probengröße und Probenposition gegenüber des ein- und ausströmendem Reaktionsgases die Anzahl an Reaktionspartnern und damit die Ätzgeschwindigkeit ändern könnte.

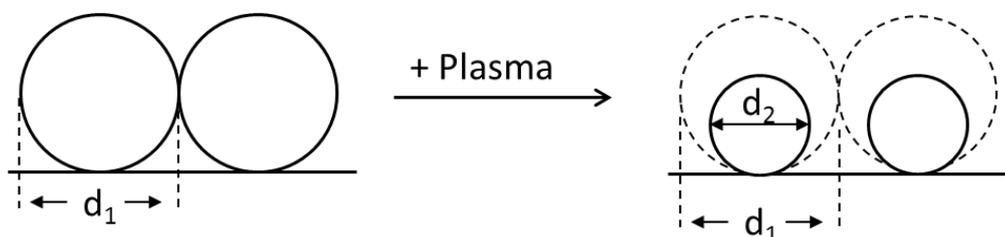


Abb. 40: Herstellung isolierter Partikel mittels reaktiven Ionenplasmas. Infolge des Ätzprozesses nimmt der Partikeldurchmesser d_1 der hexagonal dicht gepackten Polystyrol-Nanopartikel auf den Durchmesser $d_2 < d_1$ ab. Die Partikel werden kleiner und der Partikelabstand erhöht sich.

3.4.3 Goldnanopartikel

3.4.3.1 Herstellung der Goldnanopartikel-Lösung

Die Herstellung der Goldnanopartikel folgt einer Methode nach Frens durch Reduktion von Tetrachloraurat (HAuCl_4) mit Natriumcitrat.^[226] In einem Becherglas wird 1 ml 1% HAuCl_4 -Lösung mit Milli-Q-Wasser auf 100 ml verdünnt, mit Aluminiumfolie bedeckt und zum Sieden gebracht.

3 Experimenteller Teil

Dann gibt man 1% Trinatriumcitratdihydrat-Lösung ($C_6H_3Na_3O_7 \cdot 2 H_2O$, 294,1 g/mol) zu und erhitzt weitere 10 min. Das Goldsalz wird reduziert. Durch Variation der Menge an Citrat-Lösung (0,5 ml, 1 ml, 2,5 ml, 3 ml, 5 ml, 6 ml, 10 ml und 25 ml) werden unterschiedliche Partikelgrößen hergestellt. Monodisperse Partikel werden erhalten, wenn alle verwendeten Geräte sauber sind.

3.4.3.2 Messung in Transmission

Die Absorptionseigenschaften der Goldnanopartikellösung werden in Transmission in Abhängigkeit von der Partikkonzentration in wässriger Lösung und vom Brechungsindex des Lösungsmittels gemessen (Abb. 41). Der Brechungsindex des Lösungsmittels wurde durch Hinzufügen unterschiedlicher Glycerin Konzentrationen variiert. Die Untersuchung erfolgt mit polychromatischem Licht. Die Abschwächung der Strahlintensität beim Durchgang durch die mit Flüssigkeit gefüllte Küvette wird mit einem UV-VIS-Spektrometer relativ zu Wasser als Referenz detektiert.

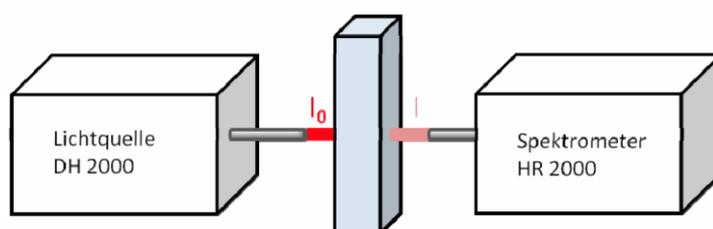


Abb. 41: Aufbau zur Messung der Absorptionseigenschaften in Transmission. Eine Küvette aus Quarzglas wird mit polychromatischem Licht bestrahlt und das transmittierte Licht mit einem UV-VIS-Spektrometer (HR 2000) analysiert.

Zusätzlich wird die Sensitivität gegenüber Proteinadsorption getestet, indem zur Goldnanopartikellösung unter Rühren in PBS-Puffer gelöstes Fibrinogen zugefügt wird, sodass eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml vorliegt. Die optische Antwort wird zeitabhängig gespeichert.

3.4.3.3 Messung in Reflexion

Hierzu werden die Partikel auf einer Oberfläche adsorbiert und in Reflexion untersucht. Nach einstündiger UV-Reinigung werden die Wafer für 2 Stunden in eine Polyallylaminhydrochlorid-Lösung (PAH, 1 mg/ml 1 mol NaCl) gelegt und anschließend mit Wasser gewaschen, getrocknet und über Nacht mit der Goldnanopartikel-Lösung inkubiert. Das Polymer ist positiv geladen.^[227] Die citratstabilisierten Goldnanopartikel adsorbieren elektrostatisch auf dem Substrat.

3.4.4 Elektronenstrahlithographisch hergestellte Oberflächen

Vom KNMF (KIT) werden im Rahmen des Projektes 2010-004-00301 und dessen Fortsetzung mehrere quaderförmige Nanostrukturen hergestellt (Abb. 42). Als Herstellungsverfahren wird Elektronenstrahlithographie genutzt. Hierzu werden drei Silizium-Wafer mit 5 nm Chrom als haftvermittelnde Schicht und 15 nm Gold bedampft. Es werden auch Proben ohne Haftvermittler angefertigt. Die Oberflächen werden mit einem PMMA-Film der Dicken 150 nm, 300 nm und 600 nm durch Spincoating beschichtet. Anschließend wird der Wafer für 5 min bei 180°C getempert. Die Strukturierung erfolgt durch direktes Schreiben mit dem Elektronenstrahl in Form von Quadrern, die zum Teil über Stege in Verbindung stehen. Das Substrat wurde bei 110°C für 5 min getempert und anschließend 30 s entwickelt. Die Nachentwicklungszeit beträgt 15 Sekunden. Die Hälfte der

3.4. Experimente zur Signalentstehung

Proben wird mit 30 nm Gold bedampft, die anderen Proben verbleiben nicht metallisiert. Letztere können anschließend nasschemisch metallisiert werden. Die Strukturgröße beträgt $2.5 \times 2.5 \text{ mm}^2$ bzw. $2,4 \times 2,4 \text{ mm}^2$.

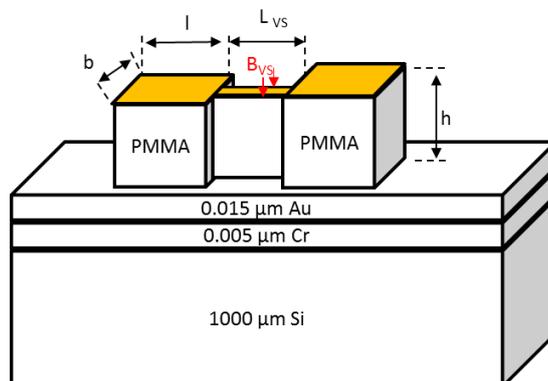


Abb. 42: Darstellung der Struktur, die durch Elektronenstrahlolithographie erzeugt wird. Es wird im Folgenden die Bezeichnung $(l/b/h-L_{VS})$ verwendet für (Länge/Breite/Höhe-Abstand benachbarter Quader), B_{VS} und L_{VS} sind Breite und Länge der Verbindungsstege. Die Höhe der Verbindungsstege und Quader stimmen überein.

Die Strukturabmessungen werden variiert (Tabelle 8). Ausgehend von der 300/300/300-300 wird die Höhe der Struktur halbiert oder verdoppelt. Die Strukturabmessungen werden skaliert und die Verbindungssteglänge verändert. Die Extinktionsspektren der hergestellten Strukturen werden in Reflexion relativ zum Substrat (Siliziumwafer, 5 nm Cr, 15 nm Au) untersucht. Dabei wird die Abhängigkeit der Spektren von der Probenorientierung, vom Reflexionswinkel und vom Brechungsindex der Volumenphase untersucht. Anschließend erfolgt die Adsorption von Fibrinogen (1 mg/ml) auf den Sensoroberflächen.

Tabelle 8: Übersicht der nanostrukturierten Oberflächen, die sowohl nicht metallisiert als auch mit 30 nm Gold bedampft sowie mit und ohne Verbindungsstegen (VS) untersucht werden. Die Höhe von Quadern und Verbindungsstegen ist herstellungsbedingt durch die PMMA-Filmdicke bestimmt und auf einer Probe gleich.

Name	Länge [nm]	Breite [nm]	Höhe [nm]	VS-Länge		
1	150	150	150	keine Stege		
2			150	150		
3			300			
4			600			
5	600	600	150	600		
6			300			
7			600			
8	300	300	150	150		
9				300		
10				600		
11				900		
12			300	300	keine Stege	keine Stege
13					300	
14					600	
15			600	300	900	keine Stege
16					300	
17					keine Stege	

3.5 Herstellung heterogener Oberflächen

3.5.1 Selbstorganisationsprozesse in hochgeordneten Templat-Strukturen

Als fester Träger werden strukturierte Glas-Substrate von Mikrogas Chemtech GmbH (Mainz, Deutschland) verwendet.^[228] Auf einer Fläche von 1 cm^2 befinden sich sechs Arrayfelder mit zylinderförmigen Vertiefungen unterschiedlichen Durchmessers, die mittels Chrommaske im Trockenätzverfahren hergestellt werden. Die Mittelpunkte benachbarter Vertiefungen in Feld 1 bis 5 haben einen konstanten Abstand von $10\text{ }\mu\text{m}$ (Abb. 43 und Tabelle 9). Dadurch wird eine Strukturierungsdichte von 1 Million Vertiefungen pro cm^2 erreicht. In Feld 6 wird der Abstand der Strukturen erhöht und die Dichte um die Hälfte reduziert, die Kantenlänge der quadratischen Felder (3 und 6) ist $4,466\text{ mm}$. Die Felder 5 und 2 haben die Abmessungen $2,15\text{ mm} \times 3,97\text{ mm}$. Die Felder 1 und 4 schließen direkt an die Felder 2 und 5 an. Die Gesamtkantenlänge der Probe ist 1 cm . Das Layout wurde am KIT in der Forschungsgruppe Peptidarrays von Fieder Märkle, PD Dr. Alexander Nesterov-Müller und Prof. Dr. Frank Breitling entwickelt.

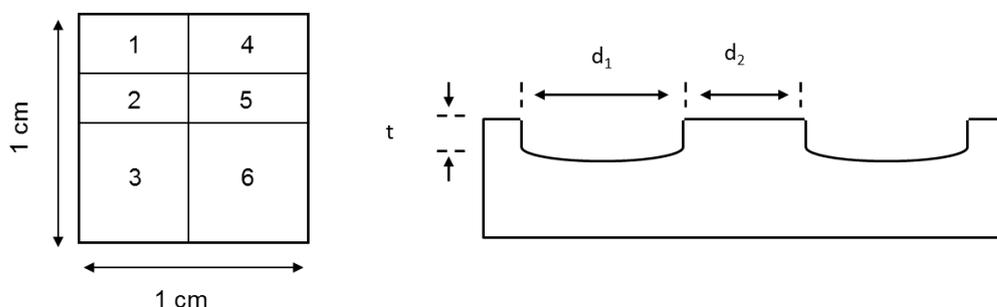


Abb. 43: Layout der Templat-Strukturen, d_1 ist der Durchmesser der zylinderförmigen Vertiefungen, d_2 ist die Distanz benachbarter Lochränder, t ist die Tiefe der Struktur.

Tabelle 9: Tabellarische Übersicht der verwendeten Templat-Strukturen

Array-Feld	Durchmesser d_1 [μm]	Distanz d_2 [μm]	Strukturtiefe t [μm]
1	3	7	10
2	4	6	10
3	6	4	10
4	5	5	10
5	7	3	10
6	10	4	14

Die Substrate werden mit 5 nm Titan und 100 nm Gold besputtert und mit einer Polymerbeschichtung versehen. Anschließend werden dielektrische Partikel auf der Oberfläche absorbiert (Tabelle 10). Es werden dielektrische Partikel mit unterschiedlichem Durchmesser abgeschieden und die Anordnung der Partikel in Abhängigkeit vom Verhältnis von Partikel- zu Vertiefungsdurchmesser d_1 mit dem REM untersucht.

3.5 Herstellung heterogener Oberflächen

Tabelle 10: Variation der Beschichtung der Templat-Strukturen

Metallisierung des Substrates	Polymerbeschichtung	Partikelbedeckung
5 nm Titan, 100 nm Gold	PEI	SiO ₂ 540 nm (floating)
5 nm Titan, 100 nm Gold	PEI	PS 6 µm (random)
5 nm Titan, 100 nm Gold	PEI	PS 6 µm (random), SiO ₂ 540 nm (floating)

Die Polystyrol (PS) Nanopartikel werden aus wässriger Lösung (0,05 ml PS auf 2 ml 0,1 mol NaCl) für zwei Stunden statistisch adsorbiert (Bezeichnung „random“), indem die polymerbedeckte Probe mit der Partikellösung bedeckt wird.

Silika-Nanopartikel (SiO₂) werden ausschließlich mittels der Floating-Transfer-Methode auf die Oberflächen übertragen und die Probe liegend an Luft getrocknet (Abb. 44). Partikel, die sich nicht in den Vertiefungen befinden, werden mit einem fusselfreien Tuch vor dem Trocknen des Filmes abgewischt. Mit zunehmender Verweildauer der Nanopartikel auf der Oberfläche nimmt die Bindung zwischen Partikeln und Substrat zu. Lässt man die Partikel zuerst trocknen, erfordert das Abwischen mehr Kraft und zerstört zum Teil die Goldbedeckung.

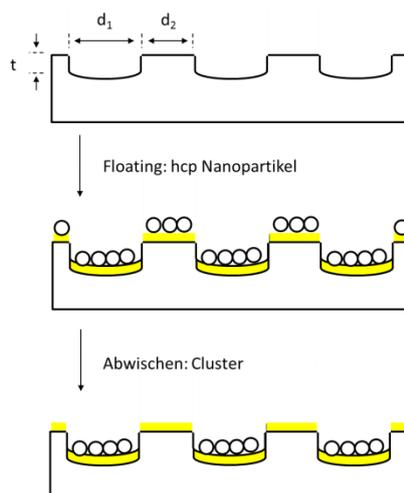


Abb. 44: Herstellung von Nanopartikel Clustern mithilfe von Templatstrukturen. Im ersten Schritt wird die Probe mit zylinderförmigen Vertiefungen metallisiert. Auf den Templatstrukturen werden mit einer Langmuir-Blodgett ähnlichen Übertragungsmethode („Floating“) aminoterminierte Silikakugeln adsorbiert. Partikel, die sich nicht in den Vertiefungen befinden, werden durch Abwischen entfernt.

Die Proben werden mit 30 nm Gold besputtert und bezüglich ihrer optischen Eigenschaften mit dem UV-VIS-Aufbau in Reflexion und Transmission unter Lichteinfall entlang der Probennormalen untersucht. Als Referenz wird ein Glasobjektträger mit Titan und Gold beschichtet bzw. die metallisierte Templat-Struktur ohne Nanopartikel verwendet.

3.5.2 Nanopartikel auf DVD

Als Substrat mit Beugungsgitter wird eine 8x DVD+R DL (Verbatim, Eschborn, Deutschland) bzw. eine CD (Verbatim, 700 MB) verwendet. Nach Entfernen der abdeckenden Plastiksicht mit einer Schere wird das Gitter mit einem Spurbstand im µm-Bereich zugänglich und mit 100 nm Gold und 5 nm Titan als Haftvermittler besputtert. Silika-Nanopartikel werden auf die

3 Experimenteller Teil

Gitterstruktur mit der Floating-Transfer-Methode übertragen und mit 30 nm Gold besputtert. Die Änderung der optische Antwort infolge der Absorption von Partikeln wird mit dem UV-VIS-Aufbau untersucht. Als Referenz dient das nicht strukturierte Plastik in der DVD-Mitte. Die Proben (Tabelle 11) werden auf Sensitivität gegenüber Fibrinogen-Adsorption aus Lösung getestet.

Tabelle 11: Übersicht der Proben mit Beugungsgitter

Substrat	Substrat-Metallisierung	Bedeckung
DVD	keine	keine Nanopartikel
DVD	100 nm Gold 5 nm Titan	keine Nanopartikel
DVD	100 nm Gold 5 nm Titan	SiO ₂ -NP mit 30 nm Gold
CD	100 nm Gold 5 nm Titan	SiO ₂ -NP mit 30 nm Gold

3.5.3 Mikrokontaktdrucken

Zur Strukturierung der Probe im μm -Bereich wird die Bindungsaffinität von Schwefel zu Gold ausgenutzt und der goldbedampfte Träger durch Aufdrucken eines Thiols mithilfe eines PDMS-Stempels funktionalisiert.^{[77] [73]} Die Stempelungen werden mit Linien-, Kreis- und Dreieckstempeln unterschiedlicher Struktur-Abstände ausgeführt. Hierzu wird der Stempel mit 1 mM Octadecanthiol-Lösung für 5 min benetzt, anschließend 1 min im Stickstoffstrom getrocknet, auf das zuvor frisch gereinigte Goldsubstrat gelegt und vorsichtig angepresst. Nach weiteren 10 min wird die Probe mit reichlich Ethanol gewaschen um Multilagungen abzuspuhlen. Die Probe wird für eine Stunde mit einer 1 mM 16-Mercaptohexadecansäure-Lösung bedeckt und mit einer großen Menge Ethanol gewaschen. Zur Aktivierung der Carboxygruppe wird eine Mischung mit Volumenverhältnis 1:1 aus einer wässrigen 0,2 M N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimid Hydrochlorid (EDC) Lösung und 0,05 M N-Hydroxysuccinimid (NHS) Lösung hergestellt und direkt für 7 min auf die Probe gegeben. Danach wird die Oberfläche mit Milli-Q-Wasser abgespült und mit einer Suspension aus aminoterminierten Silika-Nanopartikeln in Ethanol mit der Konzentration 0,5 mg/ml bedeckt. Die Partikel werden kovalent gebunden. Anschließend werden nicht gebundene Partikel mit Wasser abgespült. Die Bedeckung der Probe wird mit dem Rasterelektronenmikroskop überprüft und die optischen Eigenschaften mit dem UV-VIS-Aufbau untersucht. Die Sensitivität gegenüber Brechungsindexänderung in der Probenumgebung und gegenüber Bindungsereignissen wird gemessen.

„Umgedrehtes“ Mikrokontaktdruckverfahren

Eine Alternative zum Mikrokontaktdrucken ist das gezielte Abziehen von Partikeln mit einem PDMS-Stempel. Hierzu werden ein funktionalisierter mikrostrukturierter Stempel und ein hexagonal dicht gepackter Nanopartikelfilm benötigt. Der Nanopartikelfilm wird mit der Floating-Methode hergestellt und anschließend nasschemisch metallisiert. Zur Beseitigung von organischen Verunreinigungen und zur Aktivierung der Oberfläche wird die Probe direkt vor dem Stempelprozess für eine Stunde mit UV-Licht bestrahlt. Indessen wird in Zusammenarbeit mit M. Halbig (MPI) ein PDMS-Stempel für 40 min mit Fibronectin inkubiert. Der Stempel wird anschließend mit PBS-Puffer gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Dann wird der Stempel auf den aktivierten Nanopartikelfilm gelegt und vorsichtig angedrückt. Nach 5 min wird der Stempel abgezogen. Dabei werden die Bereiche des Nanopartikelfilms, die mit den Erhebungen des Stempels in Kontakt waren, entfernt. Der Rest des Nanopartikelfilms verbleibt hexagonal dicht gepackt auf der Oberfläche. Die Qualität der Strukturierung wird mit dem Rasterelektronenmikroskop überprüft.

3.6 Anwendung

3.6.1 Metallorganische Gerüststrukturen

In Zusammenarbeit mit Dr. H. Gliemann (KIT, IFG, Leitung Prof. Dr. Christof Wöll) wird die Pyridin Diffusion in 4 nm große Poren untersucht. Hierzu werden Sensoren, die aus einem nasschemisch metallisierten Silika-Nanopartikelfilm bestehen, mit einer epitaktischen Sprühmethode mit oberflächenverankerten metallorganischen Gerüstverbindungen beschichtet. Die Oberflächen werden mittels Thiol-SAMs funktionalisiert. Zwei unterschiedliche zugrundeliegende SAMs werden eingesetzt (Tabelle 12). Es wird sowohl Mercaptohexadecan-Säure (MHDA) als auch 9-Carboxy-10-(mercaptomethyl)tritypycen (CMMT) verwendet. In mehreren Zyklen wird am KIT auf die Oberflächen die HKUST-1-SURMOF-Struktur aufgebracht. Die HKUST-1-SURMOF-Struktur ist eine poröse metallorganische Gerüststruktur mit Kupfer(II)-Dimere als anorganische Knotenpunkte und 1,3,5-Benzentricarboxylatmolekülen als Linker.^[229] Zur Herstellung des SURMOFs wird mit einer Handsprüh-Vorrichtung abwechselnd eine Lösung mit Kupferacetat und Linker-Lösung aufgesprüht. Zwischen jedem Schritt wird mit Ethanol gespült. Nach 15 Zyklen wird eine Schichtdicke von 50 nm erreicht. Analog werden Proben mit einer SURMOF-Dicke von 200 nm, 300 nm und wenigen Nanometern hergestellt. Die Proben werden am KIT mit Röntgendiffraktometrie (XRD) (Abb. 45, rechts) untersucht. Die Spektren zeigen, dass das Wachstum der Gerüststrukturen nicht komplett geordnet erfolgt.

Zur Beobachtung des Diffusionsprozesses befindet sich die Probe in einem geschlossenen Container, in den 4 ml Pyridin eingespritzt wird (Abb. 45, links). Die optischen Eigenschaften werden unter Lichteinfall entlang der Probennormalen zeitabhängig gespeichert. Nach zwei Stunden wird das Pyridin-Reservoir entfernt und die Diffusion aus den Poren beobachtet. Die Messtemperatur wird mithilfe eines Wasserbades bzw. Eis-Bades variiert (0°C und 35°C). Zum Vergleich wird eine Probe ohne SURMOF-Beschichtung analog untersucht.

Tabelle 12: Am KIT hergestellte SURMOF HKUST-1-Proben. Mit einer Handsprühvorrichtung erfolgen die Waschschrte, das Aufbringen Linker-Lösung und der Kupferacetat-Lösung. Das Substrat sind jeweils nasschemisch metallisierte SiO₂-Nanopartikel auf einer 100 nm dicken Goldschicht.

Probe	Zyklen Zahl	Dicke [nm]
1	15 (CMMT – SAM)	50
2	15 (MHDA-SAM)	50
3	30	200
4	60	300
5	2	Wenige nm, nicht geschlossener Film ¹

¹ d.h., dass die Oberfläche nur partiell mit der SURMOF beschichtet ist (Erfahrungswert, KIT).

3 Experimenteller Teil

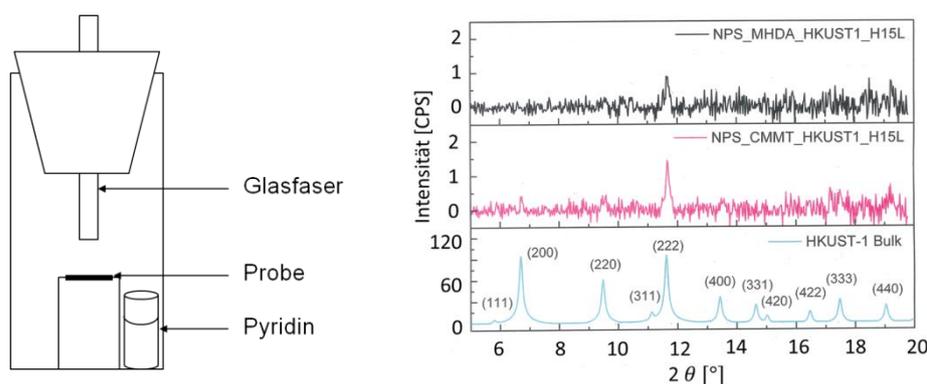


Abb. 45: Versuchsaufbau zur Messung der Pyridin Diffusion (links) und XRD-Diagramme (rechts). Rechts oben ist das Röntgendiffraktions-Diagramm von Probe 1, darunter von Probe 2 und unten rechts das theoretisch zu erwartende Spektrum. Das Röntgendiffraktions-Diagramm wurde am KIT in Zusammenarbeit mit Dr. H. Gliemann (KIT, IFG, Leitung Prof. Dr. Christof Wöll) gefertigt.

3.6.2 Sensitivitätstest gegenüber Proteinadsorption

Die Proben werden unter Laborbedingungen mit Fibrinogenlösung der Konzentration 1 mg/ml inkubiert und die Änderung der Extinktionsspektren vor und nach der Proteinadsorption untersucht. Hierzu stehen zwei Möglichkeiten zur Verfügung, zum einen die *ex situ* Messung durch Vergleich der Extinktionsspektren vor und nach Proteinadsorption im gleichen Medium (z.B. Luft oder PBS-Puffer). Alternativ dazu ist die *in situ* Datenerhebung, welche die Detektion unter dem magischen Winkel unter Flüssigkeit in Echtzeit erfordert (Abb. 46). Im letzten Fall wird der Sensor in eine mit PBS gefüllte Schale gelegt, die Zeitmessung gestartet und Fibrinogenlösung zugefügt, sodass eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml PBS vorliegt. Vor dem Herausnehmen der Probe wird zum PBS-Puffer gewechselt und die Zeitmessung gestoppt.

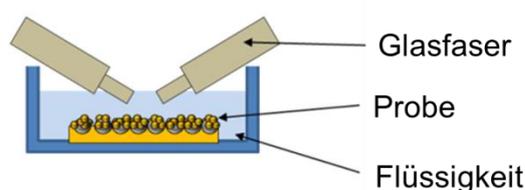


Abb. 46: Schematischer Aufbau zur winkelabhängigen Messung der optischen Eigenschaften unter Flüssigkeit und der Sensitivitätstests.

3.6.3 Anwendungen im Arrayformat

3.6.3.1 Peptidtransfer

Der Peptidtransfer von einem Glaträger von der Firma PEPperPRINT GmbH (Heidelberg/Deutschland), auf dem die Peptide im Arrayformat vorliegen, auf einen Nanopartikelfilm erfolgt in mehreren Schritten (Abb. 47). Zuerst wird die Probe auf ein Filterpapier in eine große Glaspetrischale (10 cm Durchmesser) gelegt. Das Filterpapier wird mit einer Transferflüssigkeit (1:1 Mischung aus Toluol und TFA) vollständig angefeuchtet und gleich darauf einige Tropfen der Lösung auf die Probe gegeben und durch Schräghalten der Petrischale auf der Probe verteilt. Die gesamte Probenoberfläche muss mit der Flüssigkeit bedeckt sein. Dann legt man den Glaträger von der Firma PEPperPRINT mit dem zu übertragenden Peptidgehalt so auf, dass keine

3.6 Anwendung

Luftblasen eingeschlossen werden. Ist der Glasträger in Kontakt mit der Probenoberfläche, darf dessen Position nicht mehr verändert werden. Da der Transfer diffusionsbestimmt ist, würden sonst benachbarte Peptidspots vermischt werden. Die Rückseite des Glasträgers wird mit einer Glaspetrischale mit 5 cm Durchmesser beschwert, dieser Druck begünstigt den Kontakt beider Oberflächen. Bei höherem Druck wird die Nanostrukturierung der Probe beschädigt. Die große Petrischale wird nun sofort mit dem entsprechenden Glasdeckel zugedeckt um ein zu schnelles Verdampfen der Übertragsflüssigkeit zu verhindern. Die Probe verbleibt so für 2 Stunden im Abzug. Nun wird der Deckel der Petrischale abgenommen und die TFA-Toluol-Atmosphäre abdampfen gelassen. Erst wenn offensichtlich die gesamte Flüssigkeit zwischen Probe und Glasträger verdampft ist, dürfen beide mit einer Pinzette getrennt werden. Nicht der gesamte Peptidkontent wird übertragen, daher kann der Glasträger für weitere Proben analog verwendet werden.

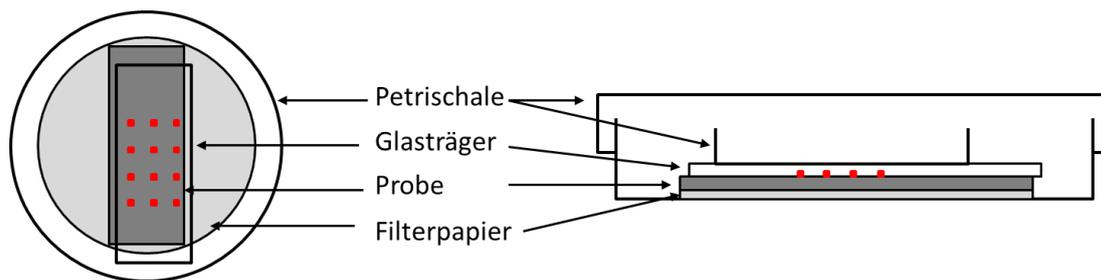


Abb. 47: Draufsicht zur Anordnung beim Übertrag des Peptidarrays (links) und Seitenansicht (rechts).

Anschließend erfolgen mehrere Waschstschritte: Das trockene Filterpapier wird entfernt und die Petrischale mit einer 1:1 Mischung aus TFA und Toluol gefüllt. Die Probe muss bedeckt sein. Die Schale wird mit dem Glasdeckel zugedeckt. Nach 30 min wird die Flüssigkeit in den vorgesehenen Abfallkanister abgeschüttet, die Probe verbleibt dabei und während der weiteren Waschstschritte auf dem Boden der Petrischale. Die Probe wird mit Toluol bedeckt und auf dem Schüttelbrett sehr langsam (etwa 30-mal pro Minute) für 1 min geschüttelt. Toluol wird abgeschüttet und der Vorgang noch 4-mal mit Toluol und 2-mal mit Ethanol (p.a.) wiederholt. Anschließend wird die Probe liegend an Luft getrocknet. Unter Umständen ist der Bereich der Probe, auf dem sich der Array befindet, aufgrund der Verschiebung der Plasmonenresonanz erkennbar. Die Probe kann zur genauen Analyse mit SPR-Imaging betrachtet werden.

3.6.3.2 Passivierung

Die Zwischenräume werden für 30 min mit einer 2 mM EG7-Lösung (7,2 μ l pro 10 ml Ethanol) inkubiert, mit Ethanol gewaschen und an Luft getrocknet.

3.7 Herstellung der fluoreszenzmarkierten Proben

3.7.1 Substrate

Die kovalente Bindung der Alexa 647 Succinimid Ester erfolgt durch nukleophile Substitution an feste, mittels Aminogruppe terminierter Träger. Es werden drei Typen nanostrukturierter Oberflächen (Abb. 48) verwendet, die durch kolloidale Nanolithographie, Elektronenstrahl-Lithographie oder mizellarer Block-Copolymer-Nanolithographie aufgebracht und anschließend funktionalisiert werden.

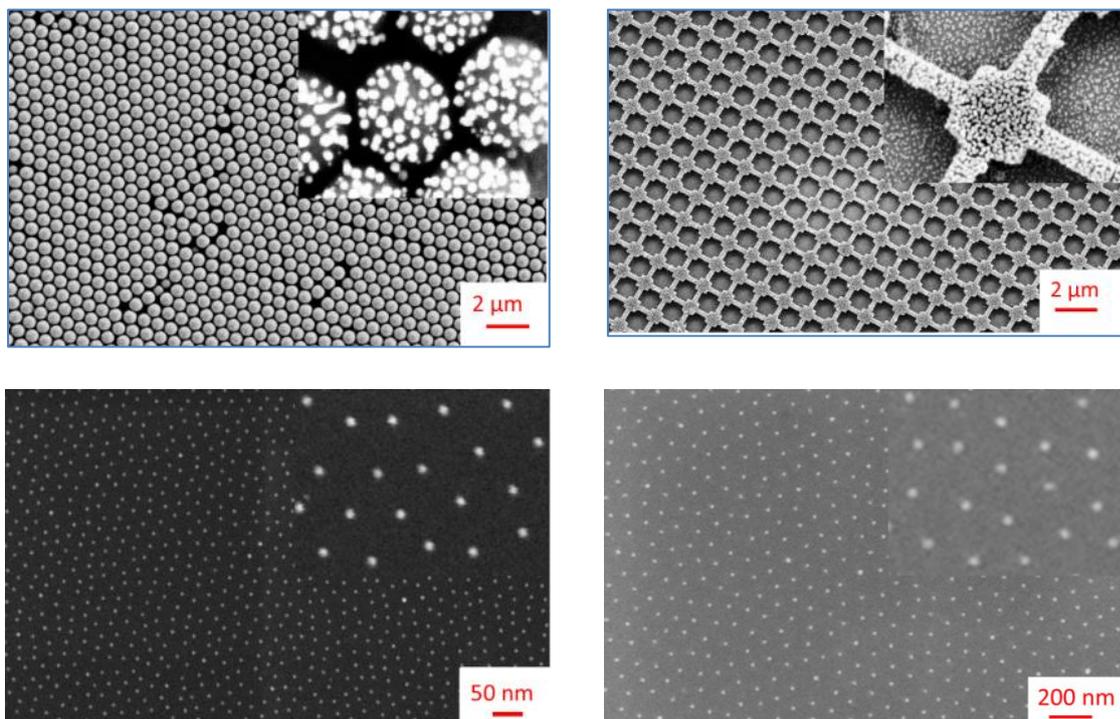


Abb. 48: Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme der verwendeten Oberflächentypen. **Oben links:** nasschemisch mit Gold metallisierter Nanopartikelfilm (SE2-Aufnahme) **Oben rechts:** Nasschemisch metallisierte elektronenstrahlolithographisch hergestellte Würfelstruktur (600/600/600-600). Die Würfel mit der Kantenlängen 600 nm sind über genauso lange aber nur etwa ein Drittel so breite Stege verbunden. **Unten links:** hexagonal geordnete Gold-Nanopartikel mit unterschiedlichen Partikelabständen. Die Proben wurden mit mizellarer Block-Copolymer-Nanolithographie hergestellt. **Unten links:** Der mittlere Abstand zwischen benachbarten Gold Nanopartikeln beträgt 38 nm und der Partikeldurchmesser $8 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$. **Unten rechts:** Der Partikelabstand ist 70 nm und Partikeldurchmesser 20 nm. Die Aufnahmen wurden mit dem Inlens-Detektor aufgenommen.

Die erste Probe besteht aus nasschemisch mit Seeding und 3 min Plating^[230] metallisierten Silika-Nanopartikeln mit einem Durchmesser von 540 nm, die auf einem mit 100 nm Gold und 5 nm Titan metallisierten Glassubstrat hexagonal dicht gepackt angeordnet sind.

3.7 Herstellung der fluoreszenzmarkierten Proben

Als Alternative zu Nanopartikel-Monolagen wird die am KNMF gefertigte 600 nm Würfel-Struktur (Probe 7, Tabelle 8) mit genauso langen aber nur 200 nm breiten Stegen nach nasschemischer Metallisierung mit Protein funktionalisiert und fluoreszenzmarkiert.

Den dritten Probentyp bilden auf einem Deckglas hexagonal angeordnete Goldnanopartikel mit einem Durchmesser von acht Nanometern. Die Herstellung erfolgt durch einen Tauchbeschichtungsprozess, der sogenannten mizellaren Block-Copolymer-Nanolithographie in mehreren Schritten (Abb. 49).^{[231] [232] [233]}

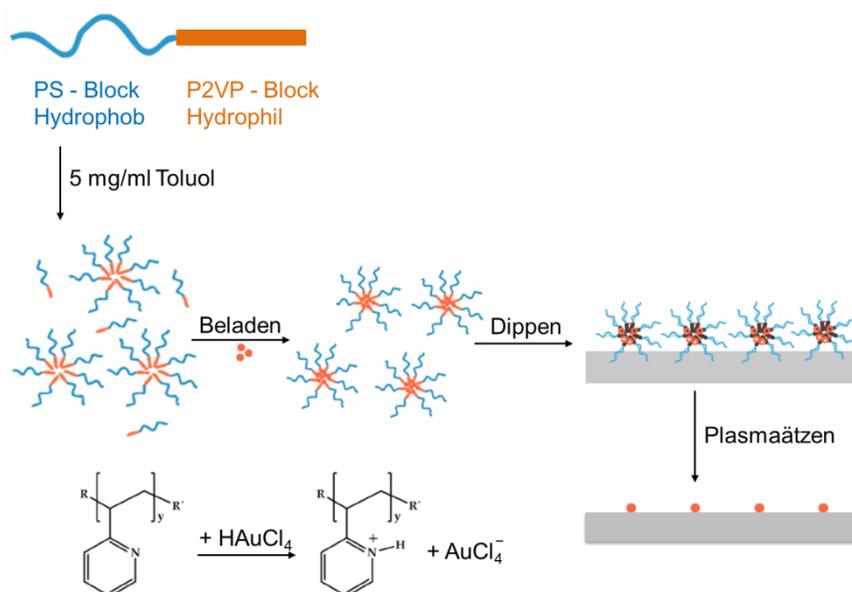


Abb.49: Schematische Darstellung nanostrukturierter Oberflächen mittels mizellarer Block-Copolymer-Nanolithographie (nach^[232]).

Zuerst wird die Beschichtungslösung nach Lohmüller et al.^[232] hergestellt. Diese besteht aus einem Di-Blockcopolymer, das in hydrophoben Lösungsmitteln Mizellen mit hydrophilem (Poly-2-vinyl-pyridin, P2VP) Kern und hydrophober (Polystyrol, PS) Hülle unter Minimierung der Enthalpie ausbildet, indem ungünstige Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel vermieden werden.^[231]
^[234] Hierzu werden 5 mg PS(500)-block-2PVP-(270) (Polymer Source Inc., Montreal, Kanada) pro 1 ml Toluol eingewogen und mindestens 24 Stunden gerührt. Im nächsten Schritt erfolgt die Impfung der Mizellen mit einem Goldsalz, indem 3,66 mg Tetrachlorgoldsäure ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) pro 1 ml Polymerlösung in Schutzgasatmosphäre zugegeben werden. Die Suspension wird bis zum Lösen des Goldsalzes gerührt, dabei agglomerierten die Goldsäuremoleküle im Poly-2-vinylpyridinkern der Mizellen. Im nächsten Schritt erfolgt die Abscheidung der Mizellen auf einem mit Piranha-Lösung gereinigten und damit aktivierten Deckglas mittels Tauchbeschichtung. Das heißt, die Substrate werden senkrecht in die mizellare Goldlösung getaucht und mit einer konstanten Geschwindigkeit (wenige mm/min) herausgezogen. Beim Herausziehen verdunstet das Lösungsmittel auf der Probe. Durch die Verdunstung wirken Kapillarkräfte zwischen den Mizellen.^{[235] [218]} Es bilden sich hexagonal strukturierte Oberflächen mit hoher lateraler Ordnung. Der Herstellungsprozess wird durch die Reduktion der Tetrachloroaurationen zu Gold mittels Wasserstoffplasmaabehandlung abgeschlossen. Die Reaktion erfolgt für 45 min bei einem Wasserstoffdruck von 0,4 mbar und einer Leistung von 150 W. Das Plasma wird durch ein Mikrowellenplasmagerät TePla100-E (PVA TePla AG, Wetztenberg) generiert.

3 Experimenteller Teil

Zur Kontrolle der erzeugten Strukturen wird eine Probe mit Graphit besputtert und mit dem Rasterelektronenmikroskop untersucht.

3.7.2 Reaktive Farbstofflösung

Zur Markierung der Proben werden Alexa 647 Moleküle (A-21676 Component B carboxy acid, succinimidyl ester) von der Firma Invitrogen (Darmstadt) verwendet (Abb. 50). Der Farbstoff verfügt über einen hohen Extinktionswert bei $239000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, ein Molekulargewicht von 1300 g/mol und emittiert im sichtbaren Spektralbereich.^[236] Das Absorptionsmaximum liegt bei 649 nm , die maximale Emission liegt um die Energie $0,06 \text{ eV}$ niedrigerer (Stokes-Verschiebung) und wird bei 665 nm beobachtet. Diese Fluorophore werden häufig als Marker eingesetzt. Die Farbstoffe zeichnen sich durch die hohe Quantenausbeute, Langzeit-Stabilität und Photostabilität aus. Die Moleküle werden meist über ihre reaktive Gruppe selektiv an Amine von DNA- oder Proteinmolekülen gebunden. Die Farbigeit entsteht durch das ausgedehnte Pi-System (Abb. 50) worin das freie Elektronenpaar am direkt zum aromatischen System benachbarten Stickstoffatom delokalisiert wird, weil durch die sp^2 -Hybridisierung des zum aromatischen System gehörenden Kohlenstoffatoms, an dem das Stickstoffatom hängt, ein Elektronen ziehender Effekt entsteht.^[148]

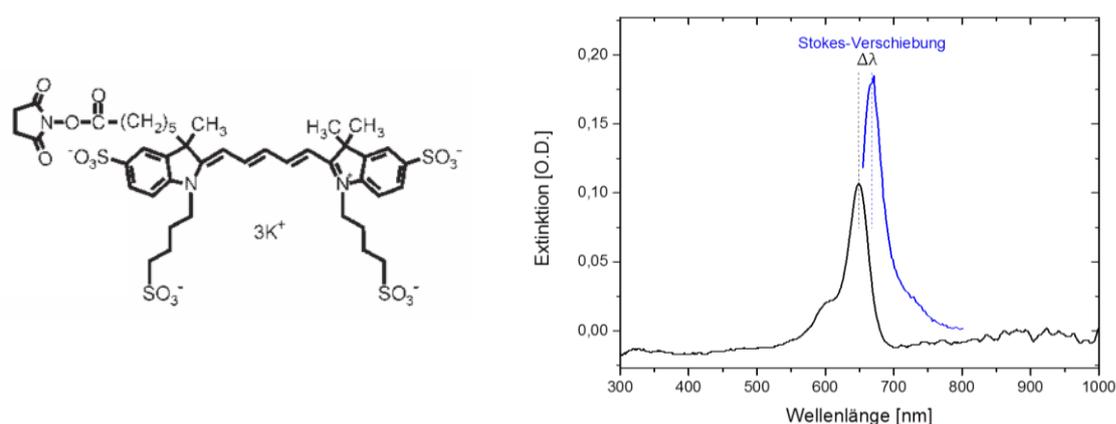


Abb. 50: Dargestellt ist die chemische Struktur von Alexa 647 ([links](#))^[237] und **rechts** das gemessene Absorptions- (schwarz) und Fluoreszenzspektrum (blau). Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte bei 630 nm um den Emissionspeak beobachten zu können. Die Stokes-Verschiebung beträgt $19,4 \text{ nm}$, was $0,06 \text{ eV}$ entspricht. Die Fluoreszenzmessung erfolgte in der Gruppe von Prof. (apl.) Dr. Dirk-Peter Herten mit dem Cary Eclipse Fluoreszenz Spektrophotometer (Varian, Darmstadt).

Der Farbstoff wird nach Gebrauchsanweisung^{[238] [239]} frisch in $50 \mu\text{l}$ DMSO 15 min im Ultraschallbad gelöst, direkt anschließend mit 30 ml Natriumhydrogencarbonat Puffer ($\text{pH } 8,3$) im Ultraschallbad verdünnt und sofort verwendet. Die reaktive Farbstofflösung ist in wässriger Lösung instabil, weil die Anker der Alexa-Moleküle hydrolysieren.^{[238] [239]}

3.7.3 Funktionalisierung und Bindung der Alexa Moleküle

Die Kern-Schale-Nanopartikeloberfläche erforderten keine weitere Funktionalisierung, da herstellungsbedingt Aminogruppen auf den Silika-Nanopartikeln vorhanden sind. Die Probe wird direkt nach der Herstellung für wenige Sekunden in die reaktive Farbstofflösung getaucht.

3.7 Herstellung der fluoreszenzmarkierten Proben

Im Fall der KNMF-Probe erfolgte die Bindung der Farbstoffmoleküle elektrostatisch über Fibrinogen, das aus einer 1 mg/ml Lösung in PBS-Puffer unter Laborbedingungen 3 h auf der Oberfläche adsorbiert wird. Die Probe wird mit Milli-Q-Wasser gewaschen, getrocknet und für wenige Sekunden in die reaktive Farbstofflösung getaucht. Danach wird die Probe sofort gewaschen und eingebettet.

Die mit mizellarer Block-Copolymer-Nanolithographie hergestellten Proben werden gegenüber unspezifischer Adsorption passiviert. Hierzu wird der Unterschied zwischen den Probenmaterialien Glas und Gold ausgenutzt. Direkt nach der Aktivierung der Oberfläche mit 15 min Wasserstoffplasma (0,4 mbar, 150-160 W) wird Poly-L-Lysin-Polyethylen-Glykol (PLL-g-PEG) aus einer aliquoten Lösung (0,15 mg/ml Puffer) ionisch an die negative Glasoberfläche gebunden. Nach 40 min wird die Probe gewaschen und in 0,5 M 11-Amino-1-undecanthiol Lösung für 1 h gelegt, anschließend mit hoher Scherung gewaschen und in die Farbstofflösung getaucht, gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Die Bindung erfolgt über die Schwefelgruppe auf den Goldnanopartikeln. Die Aminogruppe des Thiols liegt im alkalischen Milieu im reaktiven Zustand vor^[239] und kann den Farbstoff kovalent binden (Abb. 51).

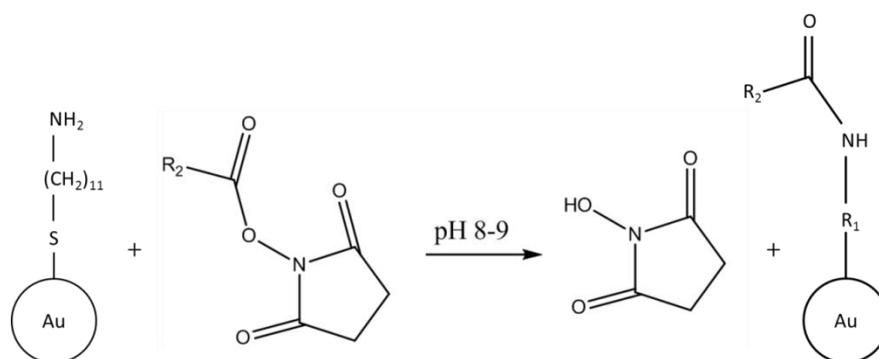


Abb.51: Reaktionsgleichung des Alexa 647-Farbstoffmoleküls mit 11-Amino-1-undecanthiol, das an das mit Goldnanopartikeln beschichtete Deckglas gebunden vorliegt. R₂ ist das Farbstoffmolekül und R₁ das gebundene 11-Amino-1-undecanthiol ohne die NH-Gruppe.

Als Einbettmedium für die fluoreszierenden Proben wird ProLong®Gold verwendet, das den optimalen pH-Wert für Alexa-Farbstoffe bietet und den Brechungsindexunterschied zum Deckglas minimiert, welches die Kristallisation des Einbettmediums (Abb. 45) verhindert. Im kristallinen Zustand tritt Autofluoreszenz auf. Das Deckglas wird mit Glasreiniger (50% Wasser, 25% Isopropanol, 25% Ammoniak) gereinigt.^[240] Die Probenränder werden mit Nagellack versiegelt und die Probe bis zur Messung lichtgeschützt und kühl gelagert.

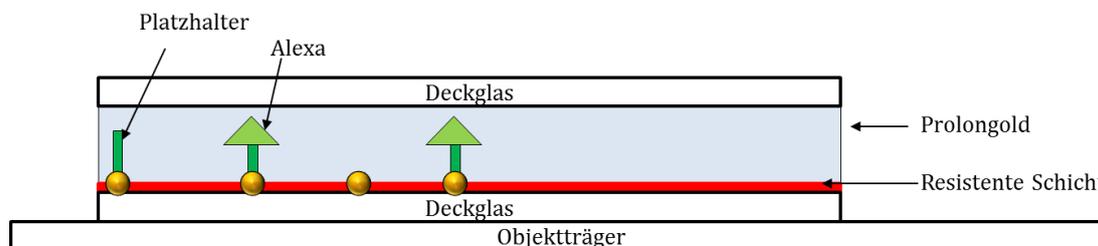


Abb.52: Schematische Darstellung des Aufbaus der mittels hexagonal angeordneten Goldnanopartikeln strukturierten Probe. 11-Amino-1-undecanthiol Moleküle dienen als Platzhalter zwischen den Goldnanopartikeln und den Alexa 647-Molekülen. Die Bindung findet in alkalischem Milieu statt.

3.8 Datenerhebung

3.8.1 Extinktionsspektren

Die Spektren werden mit dem Programm SpectraSuite von Ocean Optics aufgenommen.^[241] Zu Beginn der Messung wird die Intensität der Referenzprobe als Funktion der Wellenlänge und ein Dunkelspektrum gespeichert. Anschließend tauscht man die Referenz gegen die Probe und wechselt in den Absorptionsmodus. Die logarithmisch aufgetragene Änderung der Absorption der Probe relativ zur Referenz wird dargestellt. Die Software wertet jedes Pixel auf dem Detektor aus und berechnet das Spektrum.

$$A(\lambda) = -\log\left(\frac{S(\lambda) - D(\lambda)}{R(\lambda) - D(\lambda)}\right) \quad \text{Formel 54}$$

S ist die Probenintensität, D ist die Dunkelintensität und R ist die Referenzintensität. Die Absorption eines Stoffs bei Untersuchungen in Flüssigkeiten hängt von der Konzentration der Lösung ab und folgt dem Lambert-Beer-Gesetz. Die Absorption ist dann gleich dem Produkt aus dem stoffabhängigen und wellenlängenabhängigen Extinktionskoeffizient, der Konzentration der Lösung und der Dicke der Küvette. Das Spektrum wird im Textformat gespeichert, wobei die Wellenlänge und der zugehörige Extinktionswert durch ein Tab getrennt sein müssen. Die Auswertung erfolgt mit dem Programm Origin. Die Absorptionsmaxima werden unter Verwendung des Voigt-Profiles mit dem Levenberg-Marquardt-Algorithmus angepasst. Das Voigt-Profil ist eine Faltung aus Gauß- und Lorentz-Profil. Als Parameter werden ein Offset y_0 , die Fläche A, die Halbwertsbreite der Gauß- w_G und Lorentz-Verteilung w_L , die Zentrum-Wellenlänge x_c verwendet.

$$y = y_0 + A \frac{2 \ln 2}{\pi^{3/2}} \frac{w_L}{w_G^2} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{e^{-t^2}}{\left(\sqrt{\ln 2} \frac{w_L}{w_G}\right)^2 + \left(\sqrt{4 \ln 2} \frac{x - x_c}{w_G} - t\right)^2} dt \quad \text{Formel 55}$$

Die Anpassung im oberen Drittel des Extinktionsmaximums führt zu einer guten Übereinstimmung mit den Messwerten (nach ^[64]). Die Peak Form ist zum Teil asymmetrisch und fanoartig.

3.8.2 Lineare Anpassung

Alle linearen Anpassungen werden mit dem Programm Origin durchgeführt, indem die Parameter Steigung und y-Achsenabschnitt unter Minimierung der Residuen angepasst werden.

3.8.3 SPR-Imaging

Im Wellenlängenbereich von 450 – 900 nm werden in 5 nm Schritten Bilder von der Probe gespeichert. Als Dateiname wird die verwendete Wellenlänge verwendet. Die Auswertung basiert auf der Intensitätsbestimmung von Pixeln am Ort des mit Liganden besetzten Spots und des Hintergrunds und erfolgt mit dem Matlab Programm HAUTE_CUISINE, das von Dr. J. Wagner implementiert wurde. Hierzu werden die Mittelpunkte von Spot und Hintergrund definiert und die Intensitätswerte in einem Kreis von 4 Pixeln gemittelt. Anschließend werden die Intensitäten als Funktion der Wellenlänge mit Origin aufgetragen.

3.8 Datenerhebung

3.8.4 Fluoreszenzmessungen

Die Fluoreszenz wurde mit einer Laserlinie bei 671 nm bei einer Laserleistung von 70 mW angeregt. Pro Messung wurde ein Bilderstapel von 1000 – 10000 Einzelaufnahmen gespeichert. Zu Beginn jeder Messung wurde anhand des Blinkverhaltens der Ereignisse die Integrationszeit pro Einzelaufnahme optimal eingestellt. Die Messung erfolgte zusammen mit einem Mitarbeiter des Arbeitskreises von Prof. Dr. Dr. Christoph Cremer. Die Auswertung der Daten erfolgt nach dem Levenberg-Marquardt-Algorithmus^[135] bzw. nach dem Maximum Likelihood Kriterium rechnen.^[136] Letztere Methode basiert auf der Bestimmung des Schwerpunkts der Intensitätsverteilung von jedem blinkenden Ereignis nach Gruell et al.^[141] Als Parameter für die Auswertungen wird für die fastSPDM-Methode die geschätzte Anzahl der fluoreszierenden Signale pro Einzelaufnahme (hier 3) benötigt. Für Auswertungen nach dem Levenberg-Marquardt-Algorithmus wird zusätzlich eine geschätzte mittlere Lokalisationsgenauigkeit (hier 55 nm) definiert. Diese Parameter müssen in der richtigen Größenordnung sein, um die Rechenzeit zu verkürzen. Eine Abschätzung dieser Parameter erfolgt durch Zählen von Signalen in mehreren Einzelaufnahmen der aufgenommenen Sequenz. Zur Visualisierung wurde der Algorithmus Orte2Bild mit einer gewünschten Rasterweite von 20 nm verwendet. Alle gefundenen Fluoreszenzsignale werden automatisch in eine zweidimensionale Karte, dem Lokalisationsbild, eingetragen.^[137] Die strukturellen Einzelheiten werden anhand des Weitfeldbildes und des Lokalisierungsbildes bestimmt. Zur Analyse der Abstände werden die Intensitäten des Bildes entlang einer Gitterrichtung integriert. Hierzu wird entlang der x-Bildkoordinate für jeden Pixel die Intensitätswerte I_y in y-Richtung summiert:

$$I_x = \sum_y I_y$$

Formel 56

Die Darstellung der Intensitätsplots erfolgt mit dem Programm Origin.

4 Ergebnisse und Diskussion

Besonders wichtig zum Verständnis biologischer Prozesse sind die Wechselwirkungen und Affinitäten interagierender Moleküle im thermodynamischen Gleichgewicht.^[5] Der unmittelbare Nachweis komplexer Biomoleküle basiert auf der Wechselwirkung der Moleküle mit der Oberfläche oder spezifischen Interaktion mit immobilisierten Fangmolekülen. Biomoleküle sind meist aus wenigen chemischen Bausteinen mit geringen Unterschieden aufgebaut. Zur Beobachtung von Bindungsprozessen ähnlicher Biomoleküle wird eine hohe Selektivität benötigt. Diese wird aber nicht vom Sensor selbst, sondern durch entsprechende Funktionalisierung bereitgestellt. Die Forderung nach einer hohen Sensitivität ist mit kleinen Molekülmengen bzw. niedrigen Konzentrationen verbunden. Ein besonders wichtiger Faktor, der die Sensitivität bestimmt, ist die Nachweismethode. Neuere markierungsfreie Detektionskonzepte beruhen auf der sogenannten lokalen Oberflächenplasmonenresonanz (LSPR), bei der kollektive Elektronenschwingungen in metallischen oder metallisierten Nanopartikeln angeregt werden.^[242]

Vor einiger Zeit wurde am Lehrstuhl für Angewandte Physikalische Chemie der Universität Heidelberg ein Konzept entwickelt, das beide Aspekte – SPR und LSPR – in einem Bauelement kombiniert und eine deutlich höhere Nachweisempfindlichkeit als konventionelle Verfahren besitzt.^{[230] [9] [59] [215] [48]} Als Grundlage für das Design der Sensoroberfläche werden hoch sensitive Kern-Schale-Nanopartikel eingesetzt. Hierzu werden monodisperse dielektrische Nanopartikel aus Polystyrol (PS) oder SiO₂ mit einem Durchmesser von etwa 190 – 570 nm auf metallbeschichteten Substraten abgeschieden und anschließend durch Goldabscheidung aus Lösung mit Metall umhüllt (Core-Shell-Partikel). Diese optisch aktiven Oberflächen zeigen eine überraschend starke Rotverschiebung ihres Extinktionsspektrums in Reaktion auf Molekülanlagerungen und somit ein hohes Potential für einen Einsatz als markierungsfreie Biosensoren. Aufgrund der Komplexität der eingesetzten plasmonischen Strukturen war es bisher jedoch nicht möglich, die Ursache ihrer hohen Empfindlichkeit im Detail zu klären.

In dieser Arbeit wird anhand vereinfachter Modellsysteme die Signalentstehung sowohl experimentell als auch mit theoretischen Berechnungen quantitativ beschrieben. Mithilfe der gewonnenen Erkenntnisse wird ein integriertes bioanalytisches System auf Basis plasmonischer Nanostrukturen entwickelt, das die markierungsfreie und parallele *in situ* Detektion biospezifischer Bindungsereignisse in komplexen Peptidarrays ermöglicht.

Die Ergebnisse werden in sechs Hauptteilen dargestellt. Zuerst wird die Signalentstehung anhand homogener Oberflächen untersucht. Hierzu werden die optischen Eigenschaften von Kern-Schale-Nanopartikeln, die aus dielektrischen Nanopartikeln mit einer metallischen Hülle bestehen, vorgestellt. Die Ursachen der Sensorantwort werden durch die Untersuchung der einzelnen Sensorkomponenten charakterisiert. Das heißt, die Extinktion von Goldnanopartikeln wird getrennt von der optischen Antwort nicht metallisierter dielektrischer Schichten diskutiert. Im zweiten Kapitel werden die Oberflächen bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber Fibrinogen-Adsorption untersucht. Der dritte Teil zeigt die Leistungsfähigkeit der Sensoren bezüglich der *in situ* Detektion von Proteinadsorptionsprozessen. Im vierten Hauptteil werden Methoden zur Sensitivitätssteigerung vorgestellt. Anschließend wird ein Modellsystem für die Nanopartikelfilme mit Elektronenstrahl-Lithographie entwickelt. Das letzte Kapitel befasst sich mit Anwendungen im Hinblick auf die medizinische Diagnostik.

4.1 Signalentstehung

Im ersten Schritt wird die Signalentstehung der Schichtsysteme aus metallisierten monodispersen dielektrischen Nanopartikeln aus Polystyrol (PS) oder Siliziumdioxid (SiO_2) untersucht. Die Partikel werden unter Variation des Nanopartikeldurchmesser von 190 – 570 nm auf einem Substrat in Form einer Monolage abgeschieden und metallisiert. Als Metallisierungsmethode werden die nasschemische Methode und Besputtern im Fall von Gold gewählt.

4.1.1 Dielektrische Kontaktpunkte in Kern-Schale-Nanopartikelfilmen

In diesem Kapitel wird die Komplexität des eingesetzten plasmonischen Sensors vorgestellt. Die Nanopartikelfilme werden bezüglich ihres Aufbaus charakterisiert und im Hinblick auf ihre optischen Eigenschaften im sichtbaren Spektralbereich verglichen. Die Messungen erfolgen in Reflexion relativ zu einer Referenz. Die Referenz ist das nicht mit Nanopartikeln beschichtete Substrat (Glas mit 5 nm Titan und 100 nm Goldfilm).

Aufbau

Die hergestellten Oberflächen unterscheiden sich hinsichtlich der Größe der verwendeten Nanopartikel und ihrer Metallhülle (Abb. 53). Abhängig von der gewählten Metallisierungsmethode sind die dielektrischen Nanopartikel unterschiedlich umhüllt. Während das Bedampfen zu einer Schale von oben bis zum Äquator der dielektrischen Nanopartikel führt (Abb. 53, II.), ist im Fall von besputterten Proben auch die untere Hemisphäre bedeckt (Abb. 53, III.), allerdings mit einer dünneren Metallschicht als die obere Hemisphäre. Eine gleichmäßige Metallisierung der gesamten freien Oberfläche erhält man durch die nasschemische Metallisierung von dielektrischen Nanopartikeln auf der Oberfläche (Abb. 53, IV.) oder in Lösung (Abb. 53, V.).

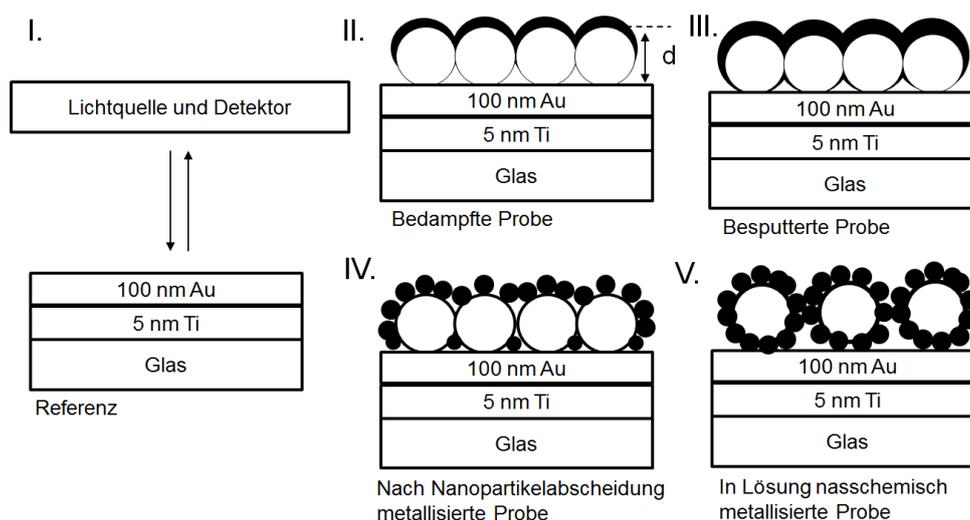


Abb. 53: Dargestellt ist die Referenz I. und die Proben mit unterschiedlicher Metallisierung: bedampftem dielektrischem Nanopartikelfilm II., besputterten III., nasschemisch auf der Oberfläche metallisierten IV. sowie nasschemisch in Lösung metallisierten und anschließend auf der Oberfläche abgeschiedenen Partikeln V.. Dielektrische Kontaktpunkte zwischen benachbarten Partikeln sind für die Proben vorhanden, bei denen die Metallisierung auf der Oberfläche erfolgt (II., III. und IV.). d ist der Durchmesser der dielektrischen Nanopartikel.

4 Ergebnisse und Diskussion

Die Abbildung der Probenoberfläche erfolgt mit dem Rasterelektronenmikroskop. Die Übertragungsmethode Floating führt zu einer hexagonal dicht gepackten Monolage dielektrischer Nanopartikel auf dem Substrat (Abb. 54, I. – VIII.). Unter Nutzung des Materialkontrastes können die Kontaktpunkte der dielektrischen Partikel mit dem Substrat sowohl auf dem Substrat (Abb. 54, IV. und V.) als auch auf der Partikelunterseite (Abb. 54, VII. und Abb. 54, VIII.) und Kontaktpunkte benachbarter dielektrischer Nanopartikel (Abb. 54, VI.) beobachtet werden. Hierzu wird ein Teil des Partikelfilms mit einem Klebeband abgezogen, so dass die Kontaktpunkte sichtbar werden. Der Nanopartikelfilm ist nicht komplett geordnet, da die Partikel herstellungsbedingt über eine gewisse Größenverteilung verfügen und der Adsorptionsprozess der Partikel auf dem Substrat auf Selbstaggregationsprozessen beruht. Die Partikelmonolage weist daher Domänen auf. Eine Bildung von Multilagen wird für die Partikel beobachtet, die vor der Adsorption in Lösung metallisiert wurden und eine vollständige Metallhülle aufweisen (Abb. 54, IX.). Benachbarte Nanopartikel verfügen daher nicht über dielektrische Kontaktpunkte.

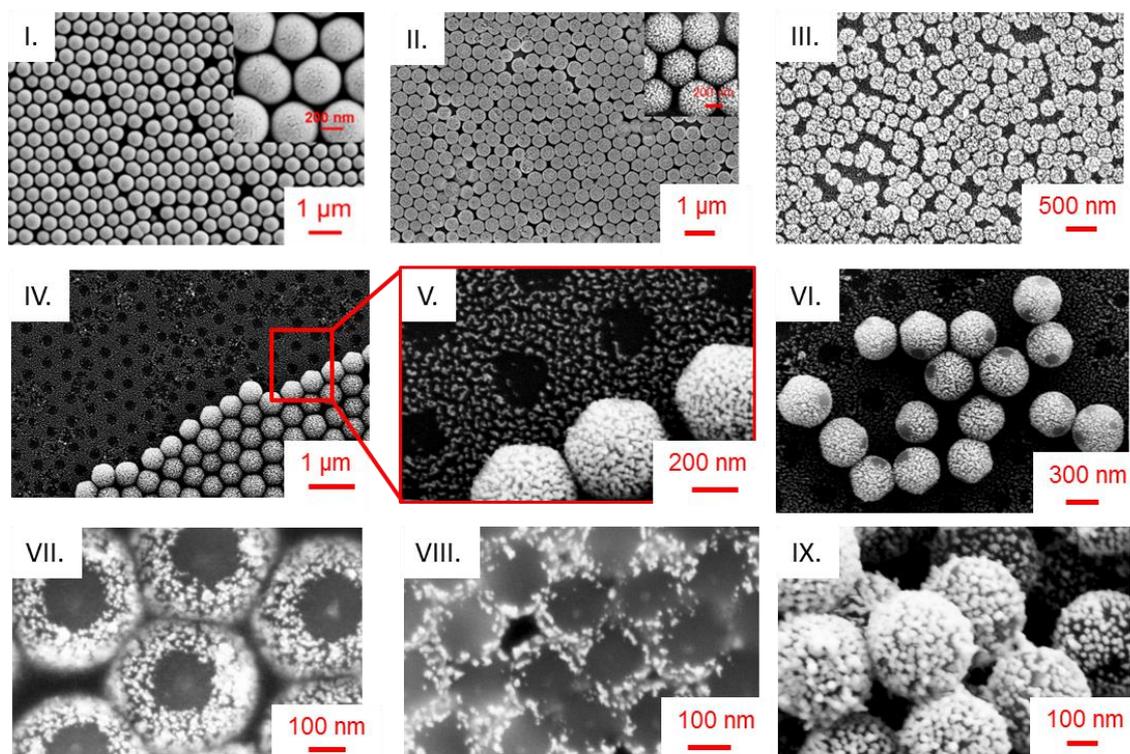


Abb. 54: REM-Aufnahmen der gefloateten Silika-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 540 nm nach Besputtern mit 30 nm Gold I. und nach nasschemischer Metallisierung II.. III. zeigt die Anordnung von gefloateten Polystyrol-Nanopartikeln mit einem Durchmesser von 190 nm, die Adsorption erfolgt in einer Monolage IV. und V. zeigen die Kontaktflächen zum Substrat. In VI. sind die Kontaktpunkte zu den nächsten Nachbarpartikeln dargestellt. Die Aufnahmen wurden durch Abziehen der Partikel mit einem Klebeband aufgenommen. Untersuchungen der Nanopartikel auf dem Klebeband zeigen die Kontaktpunkte zur Oberfläche für die mit Floating übertragenen und nasschemisch metallisierten Polystyrol-Nanopartikel vom Durchmesser 380 nm VII. und 190 nm VIII.. IX. zeigt Polystyrol-Nanopartikel, die in Lösung vollständig umhüllt wurden. Die Adsorption der vollständig umhüllten Partikel erfolgt in Multilagen. Aufgrund des Materialkontrastes erscheinen die Goldnanopartikel als helle Punkte. Die Plating-Zeit betrug 3 min.

Ein wichtiger Aspekt für die Struktur des Nanopartikelfilmes auf dem Substrat sind die Stabilität und Ordnung des Nanopartikelfilmes auf der Wasseroberfläche beim Floating vor dem Übertrag auf das Substrat. Hierzu tragen mehrere Faktoren bei.^{[243] [244]} Besonders von Bedeutung sind die van-der-Waals-Wechselwirkungen, die Oberflächenspannung, und die Kapillarkräfte.^{[217] [245]} Die Krümmung der Wasseroberfläche kostet Energie aufgrund der Oberflächenspannung.

4.1 Signalentstehung

Die Minimierung der Energie des Gesamtsystems erfolgt dadurch, dass benachbarte Partikel eine attraktive Kraft erfahren.^[246] Die Haftkraft zwischen zwei Kugeln, die durch eine Flüssigkeitsbrücke verbunden sind, hängt ab vom Benetzungsverhalten und den Hauptkrümmungsradien R_1 und R_2 . Die Herleitung der Krümmungsradien erfolgt über die Winkelbeziehungen am Dreiphasenkontakt (Abb. 55). Als Haftkraft F ergibt sich^[247]

$$F = \sigma \left(\frac{1}{R_1} - \frac{1}{R_2} \right) \frac{\pi d^2}{4} \sin \alpha \quad \text{Formel 57}$$

α ist der Benetzungswinkel, θ der Kontaktwinkel, σ die Oberflächenspannung der Flüssigkeit und d der Kugeldurchmesser. Die Kraft nimmt quadratisch mit dem Durchmesser zu. Große Partikel lassen sich daher dichter anordnen.

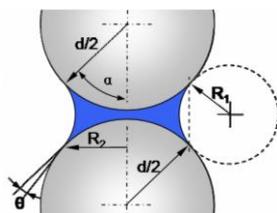


Abb. 55: Schematische Darstellung zweier Partikel, die durch eine Flüssigkeitsbrücke verbunden sind.^[247]

Die wirkenden Kräfte sind materialabhängig. Die Ursache für die Bildung von Multilagen von vollständig umhüllten Partikeln lässt sich auf die van-der-Waals-Wechselwirkung zurückführen. Die Wechselwirkungsenergie W zwischen kugelförmigen Partikeln mit dem Radius R ergibt sich im Sinne der Derjaguin-Näherung zu

$$W = - \frac{A_H R}{12h} \quad \text{Formel 58}$$

h ist der Abstand von Oberfläche zu Oberfläche und A_H ist die Hamaker-Konstante.^[243] Typische Werte für die Hamaker Konstante sind im Bereich von 10^{-20} J in Luft, in Wasser sind die Kräfte zehnmal kleiner. Die Partikel werden auf der Wasseroberfläche gefloatet. Dadurch wechselwirken die Partikel auch in der Luftphase. Metallisierte Partikel lagern sich stärker zusammen als beispielweise die unbehandelten PS-Partikel, weil die attraktive Kraft im Fall von metallisierten Partikeln größer ist. Die Stärke der Kraft zwischen zwei Teilchen wird mit der Hamaker-Konstante ausgedrückt. Diese beträgt für Polystyrol $1,3 \cdot 10^{-20}$ J, für Gold ist die Konstante mit $30 \cdot 10^{-20}$ J um den Faktor 20 größer.^[248]

Nichtmetallisierte dielektrische Partikel mit einem Radius von 250 nm und größer ordnen sich dicht an. Nanopartikel mit kleinerem Radius formen weniger dichte Monolagen (Abb. 54, III.), weil die Wechselwirkungskräfte kleiner sind. Die van-der-Waals-Wechselwirkung nimmt proportional zum Partikelradius ab. Für kleine Partikel, z.B. mit einem Durchmesser von 50 nm, ist daher die Methode Spincoating zu bevorzugen. Für geladene Nanopartikel kann eine Adsorption in Gegenwart von NaCl,^[249] das die Ladungen abschirmt, zu geordneten Filmen mit Kontaktpunkten^[250] führen.

Optische Eigenschaften

Die optischen Eigenschaften hängen stark von der Nanostrukturierung der Oberfläche ab und werden mit weißem Licht in Reflexion gemessen. In den Extinktionsspektren werden mehrere Peaks beobachtet, die umso schärfer sind, je größer der Durchmesser der Nanopartikel ist (Abb. 56, links). Dabei werden optische Dichten von mehr als 2 O.D. erreicht. Die Peaks im Spektrum vollständig umhüllter Nanopartikel sind flach und breit (grüne Kurve). Die schlecht aus-

4 Ergebnisse und Diskussion

gebildeten Peaks werden unabhängig davon beobachtet, ob Multilagene oder weniger dicht gepackte Monolagen vorliegen. Daher lässt sich schlussfolgern, dass dielektrische Kontaktpunkte zwischen benachbarten Nanopartikeln und zum Substrat wichtig für scharfe Extinktionsspektren sind. Allen Spektren gemeinsam ist ein Peak bei 238 nm, der durch die Absorption der Polystyrol-Nanopartikel hervorgerufen wird. Die anderen Resonanzmaxima sind Extinktionspeaks. Untersuchungen statistisch adsorbierter Nanopartikelfilme führten zu ähnlichen Beobachtungen.^[250]

Vergleich nicht metallisierter und metallisierter Nanopartikelfilme

Einen Hinweis auf die Signalursache liefert der Vergleich der Extinktionseigenschaften von nicht metallisierten Nanopartikel-Filmen und metallisierten Partikeln. Bereits ohne Metallisierung der Nanopartikelfilme werden periodische Resonanzen im Extinktionsspektrum beobachtet (Abb. 56, rechts), die infolge der Metallisierung verstärkt werden.

Die Resonanzen im nicht metallisierten Nanopartikelfilm können durch mehrere Faktoren verursacht werden. Wichtige Punkte sind Interferenzen infolge von Mehrfachreflexion, Plasmonenanregung im Goldfilm auf dem Glasträger, Metalleinschlüsse in den dielektrischen Nanopartikeln oder elektronische Anregungen im Partikel. Die Ursachen werden im Folgenden diskutiert. Die Plasmonenanregungen im Goldnanopartikelfilm als alleiniger Effekt sind auszuschließen. Dies wird überprüft, indem ein Silizium-Wafer anstelle des Substrates mit Goldfilm eingesetzt wird. Die Absorptionspeaks werden bereits für einen mit nicht metallisierten dielektrischen Partikeln beschichteten Siliziumwafer beobachtet. In Silizium treten keine Plasmaschwingungen im sichtbaren Spektralbereich auf, da diese durch die Interbandübergänge gedämpft werden. Nicht dotiertes Silizium leitet schlecht.

Als nächster Punkt wird mittels XPS untersucht, ob Metalleinschlüsse durch den Herstellungsprozess im Nanopartikel vorhanden sind. Plasmonenanregungen im UV-VIS-Bereich treten bei Gold, Silber und Aluminium auf. Die nicht metallisierten Nanopartikelfilme enthalten keine nachweisbaren Metalleinschlüsse. Auch elektronische Anregungen in den Partikeln können ausgeschlossen werden, da der Effekt auch bei Siliziumdioxidnanopartikeln sowie PMMA-Filmen auftritt. Es handelt sich vielmehr um Dünnschichtinterferenzen, welche durch Metallisierung der Partikel und zusätzliche Metallisierung des Trägermaterials verstärkt werden. Diese Interferenzen können sich nicht ausbilden, wenn die Nanopartikel vollständig umhüllt sind. Die Resonanzverstärkung wird nur für eine Metallisierung nach der Partikeladsorption beobachtet.

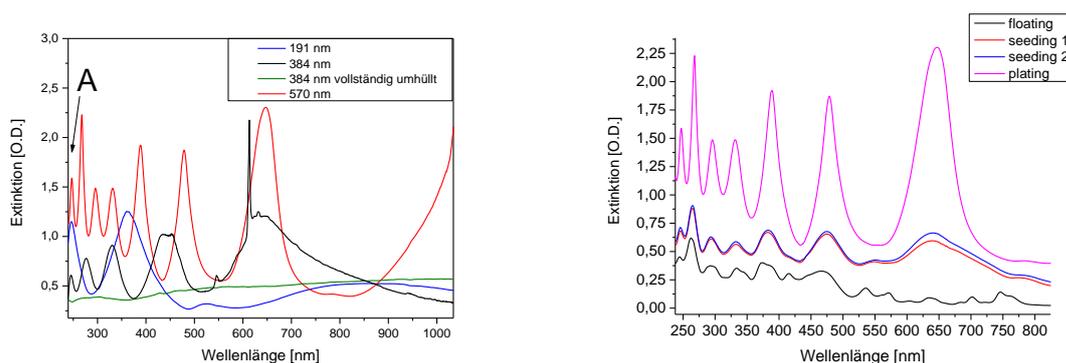


Abb. 56: Links: Extinktionsspektren von gefloateten Polystyrol-Nanopartikeln mit einem Durchmesser von 191 nm (**blau**), 380 nm (**schwarz**) und 570 nm (**rot**), die nach der Adsorption auf dem Substrat nasschemisch metallisiert wurden, sowie das Spektrum vollständig mit Gold umhüllter, auf dem Träger abgeschiedener Nanopartikel mit einem Durchmesser von 384 nm (**grün**). Die Messungen erfolgten alle in Reflexion unter Lichteinfall parallel zur Probenormalen im Medium Luft. Der mit A gekennzeichnete Peak kommt von der Absorption der Polystyrol-Nanopartikel bei 238 nm. Rechts: Änderung der optischen Sensorantwort infolge des nasschemischen Metallisierungsprozesses der Polystyrol-Nanopartikel mit einem Durchmesser

4.1 Signalentstehung

von 570 nm. Die beiden Seeding-Schritte erfolgen jeweils über Nacht. Die Plating-Zeit betrug 3 min.

Abschließende Bemerkung

Die optische Antwort von Nanopartikelfilmen ist in besonderem Maße von der Existenz dielektrischer Kontaktpunkte abhängig. Für dicht gepackte Nanopartikelfilme bestehen diese sowohl zwischen benachbarten Partikeln als auch zum Substrat. Es bleibt zu klären, ob die Kontaktpunkte zum Substrat den Hauptunterschied darstellen. Zusätzlich tragen Interferenzeffekte zum Signal bei. Dies ist bedingt durch den Aufbau. Das Schichtsystem besteht aus einem metallisierten Substrat und einer dielektrischen Schicht, die von oben metallisiert ist. Dies entspricht dem Aufbau aus zwei planparallelen halbdurchlässigen Spiegeln zwischen denen sich ein dielektrisches Medium befindet, dem sogenannten Fabry-Perot-Interferometer.^[72] Die Interferenz ist daher ein wichtiger Beitrag zur optischen Antwort. Das Ergebnis stimmt mit Untersuchungen von Autoren überein, die Systeme mit gekoppelten Anregungen, LSPR und Interferenz, beschrieben.^{[251] [252]}

4.1.2 Interferenzen

Im Folgenden werden dielektrische planare Filme zum Verständnis des Beitrags der Interferenz untersucht. Anschließend werden isolierte Nanopartikel, die nur über dielektrische Kontaktpunkte zum Substrat verfügen, betrachtet.

4.1.2.1 Extinktionseigenschaften von planaren Filmen versus Nanopartikelfilme

Die Untersuchung von dielektrischen Filmen kann Hinweise auf die Signalentstehung in den Nanopartikelfilmen geben. Um die Bedeutung der Interferenz zu untersuchen werden sowohl PMMA-Filme (Abb. 57) als auch SiO_2 -Filme mit Gold oder Silber metallisiert und deren optische Eigenschaften mit Nanopartikelfilmen verglichen. Die Einsetzbarkeit des Sensors bestehend aus metallisierten SiO_2 -Filmen wurde bereits in einer früheren Arbeit gezeigt.^[48]

Hier liegt das Augenmerk auf den Extinktionseigenschaften von planaren Filmen im Vergleich Nanopartikelfilmen. Darüber hinaus soll in dieser Arbeit ein elektronenstrahlolithographisch hergestelltes Modellsystem für die Nanopartikelfilme entwickelt werden. PMMA könnte als Ausgangsmaterial zur Nanostrukturierung von Oberflächen dienen. Die Voraussetzung ist, dass PMMA-Filme ein vergleichbares Signal mit Kern-Schale-Nanopartikelfilmen zeigen. Zu diesem Zweck und zur Klärung der Signalursache in Nanopartikelfilmen wurden hier die optischen Eigenschaften untersucht.

Winkelabhängige Untersuchungen eines metallisierten Siliziumdioxidfilmes der Dicke 250 nm zeigen, dass durch geschickte Wahl des Detektionswinkels die Peakpositionen von Nanopartikeln und dielektrischem Film an vergleichbaren Positionen liegen (Abb. 57). Die Filmdicke ist etwa halb so groß wie der Partikelradius. Das Extinktionsspektrum des Nanopartikelfilms kann experimentell durch eine effektive Filmdicke moduliert werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

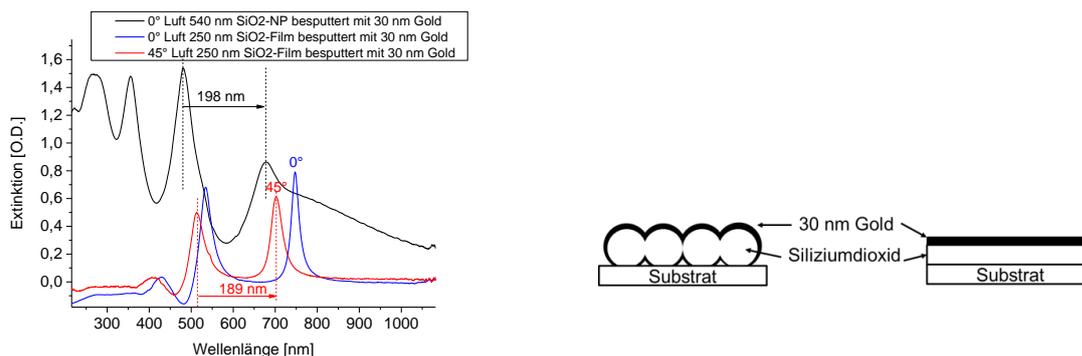


Abb. 57: Links: Extinktionsspektren des SiO₂-Nanopartikelfilms mit einem Partikeldurchmesser von 540 nm unter dem Reflexionswinkel von 0° und Extinktionsspektren eines SiO₂-Films der Dicke 250 nm unter 0° und 45° zur Probenormalen im Medium Luft. Beide Proben wurden mit 30 nm Gold besputtert. Rechts: Schematische Darstellung der Geometrie.

Zur genaueren Signalanalyse werden die Extinktionsspektren von PMMA-Filmen der Dicke 600 nm mit und ohne Metall mit dem Extinktionsspektrum eines Polystyrol-Nanopartikelfilms der Dicke 570 nm unter Lichteinfall entlang der Probenormalen verglichen (Abb. 58, links). Die Peaks werden beginnend von kleinen Wellenlängen gezählt. Die inverse Peakposition wird als Funktion der Peaknummer abgetragen (Abb. 58, rechts). Für den metallisierten und nicht metallisierten PMMA-Film ergibt sich eine Gerade. Das heißt, der Frequenzabstand benachbarter Maxima im Extinktionsspektrum ist konstant.

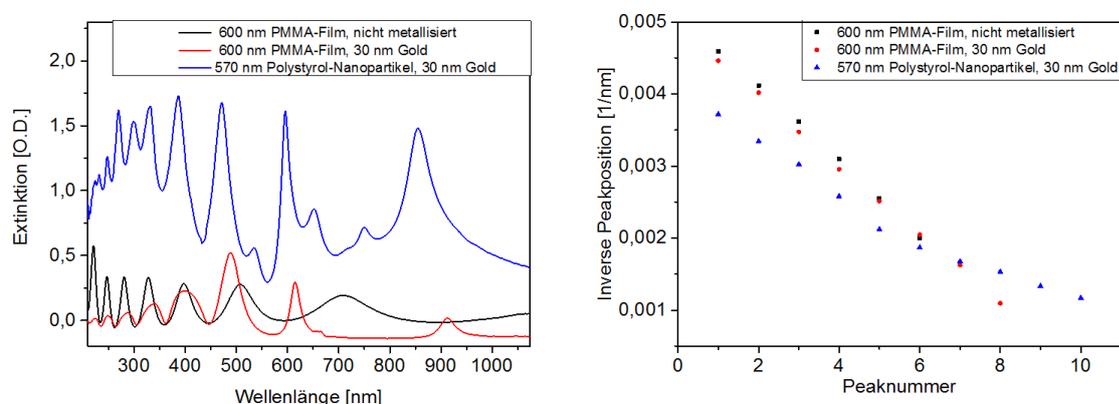


Abb. 58: Links: Optische Sensorantwort eines PMMA-Films mit einer Dicke von 600 nm ohne Metall (schwarze Kurve) und mit 30 nm Gold (rote Kurve) sowie eines Polystyrol-Nanopartikelfilms mit 30 nm Gold. Der Partikeldurchmesser beträgt 570 nm. Die Messung erfolgt im Medium Luft unter Lichteinfall entlang der Probenormalen. Rechts: Darstellung der inversen Peakposition als Funktion der Peaknummer. Der Zusammenhang für die PMMA-Filme ist linear. Für die Nanopartikel flacht die Kurve ab.

Die Peaks werden durch destruktive und konstruktive Interferenz der Teilstrahlen hervorgerufen. Für ein Fabry-Perot-Interferometer ist der Frequenzabstand benachbarter Transmissionsmaxima bestimmt durch den Brechungsindex n , den Spiegelabstand L und die Wellenlängen λ_1 und λ_2 benachbarter Transmissionsmaxima.^[206]

$$\frac{1}{\lambda_1} - \frac{1}{\lambda_2} = \frac{1}{2nL}$$

Formel 59

4.1 Signalentstehung

Der Spiegelabstand L entspricht der Dicke des PMMA-Filmes bzw. dem Durchmesser der eingesetzten dielektrischen Nanopartikel. Setzt man für PMMA einen wellenlängenunabhängigen Brechungsindex von 1,49 ein, so ergibt sich für den nicht metallisierten PMMA-Film eine Dicke von 647 ± 9 nm. Für Kern-Schale-Nanopartikelfilme verläuft die Kurve flacher, der Zusammenhang ist nicht linear. Daraus lässt sich schließen, dass die optische Antwort von Nanopartikelfilmen neben Interferenzen von weiteren Effekten bestimmt wird.

Abschließende Bemerkung

Durch einen Vergleich der Extinktion von Nanopartikelfilmen und planaren Filmen konnte gezeigt werden, dass die Peakposition im Spektrum der Nanopartikel durch eine effektive Filmdicke modelliert werden kann. Interferenz spielt daher eine wichtige Rolle. Der nicht lineare Zusammenhang zwischen der inversen Peakposition und der Peaknummer sowie die hohe optische Dichte beruhen auf zusätzlichen plasmonischen Effekten.

4.1.2.2 Untersuchung der Extinktionseigenschaften isolierter Partikel

Bisherige Messungen zeigten die Bedeutung von Kontaktpunkten und der Interferenz im Vergleich zu planaren Filmen. Offen blieb allerdings die Frage inwiefern dielektrische Kontaktpunkte zwischen benachbarten Nanopartikeln die optische Antwort beeinflussen.

Bei dichter Packung von dielektrischen Partikeln auf metallischen Oberflächen kann es zu Interferenzen kommen von Lichtstrahlen, die auf dem Substrat reflektiert werden, und Teilstrahlen, die auf dem Nanopartikelfilm reflektiert werden. Gleichzeitig wäre auch eine Anregung von Oberflächenplasmonen im Substrat denkbar. Zur Untersuchung der Effekte werden isolierte Nanopartikel (Abb. 59) auf einem mit Gold metallisierten Glasträger und zum Vergleich auf einem Silizium-Wafer hergestellt. Die optischen Eigenschaften werden in Abhängigkeit vom Substratmaterial und Partikelabstand untersucht. Anschließend werden die Nanopartikel metallisiert und die Änderung der Extinktion, die infolge der Metallisierung auftritt, gemessen.

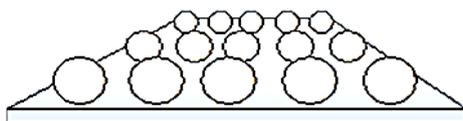


Abb. 59: Abscheidung von isolierten Nanopartikeln auf einem festen Träger.

Die Herstellung von isolierten Nanopartikeln mit konstanten Abständen erfolgt durch Floating mit anschließendem reaktiven Ionenplasmaätzen. Der Abstand der Partikel auf der Sensoroberfläche ist abhängig von der Reaktionsdauer. Je länger das reaktive Ionenplasma auf die Nanopartikel einwirkt, desto kleiner werden die Partikel und desto größer sind die Abstände zwischen den Partikeln. Der Abstand benachbarter Partikelzentren ist konstant. Die hexagonale Struktur wird nicht zerstört. Die Partikelgröße wird anhand der Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen ermittelt (Abb. 60). Der Partikeldurchmesser nimmt mit wachsender Ätzzeit ab. Die Ätzrate wird durch lineares Anpassen der Messwerte mit Origin 8.6G bis zur Reaktionszeit von zwei Minuten erhalten (Abb. 61, links). In diesem Bereich beträgt die Ätzrate 128 ± 22 nm/min. Nach dem Ätzprozess liegen nahezu monodisperse Partikel vor, weil der Ätzprozess lateral isotrop ist. Die Proben werden nasschemisch metallisiert. Nach jedem Schritt der Metallisierung werden die optischen Eigenschaften untersucht.

4 Ergebnisse und Diskussion

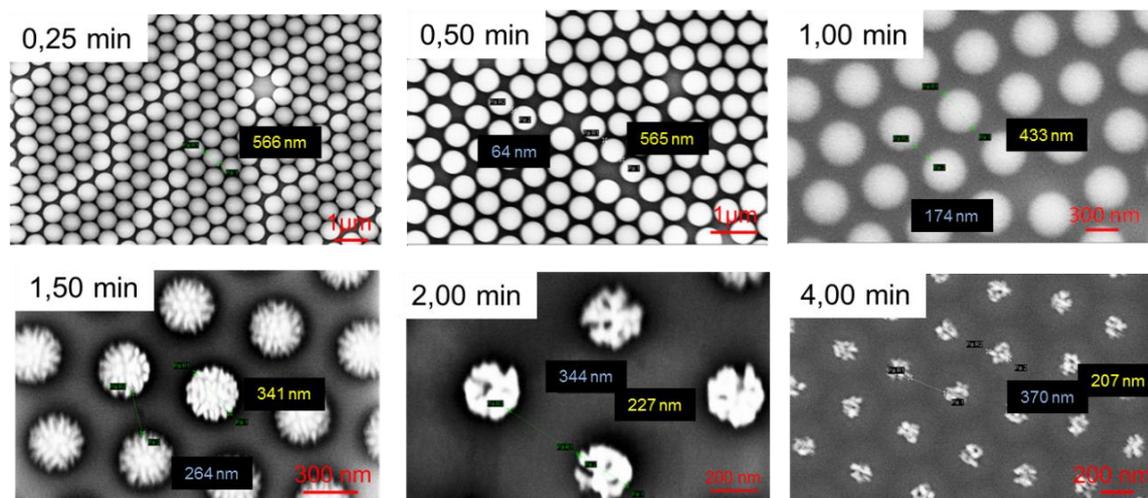


Abb. 60: REM-Aufnahme der nicht metallisierten Polystyrol-Nanopartikelfilme nach unterschiedlichen Reaktionszeiten mit dem reaktiven Ionenplasma. Der Durchmesser der Nanopartikel vor dem Ätzen betrug 570 nm. Mit wachsender Reaktionszeit nahmen die Partikeldurchmesser ab und der Abstand benachbarter Partikel zu. Die Probe wurde während des Ätzzvorgangs auf 20°C gekühlt, um ein Schmelzen der Partikel zu verhindern. Dargestellt sind die Proben nach Reaktionszeiten von (links nach rechts) 0,25 min, 0,50 min, 1,00 min, 1,50 min, 2,00 min und 4,00 min. Der gemessene Durchmesser ist in der Farbe Gelb notiert, der entsprechende Partikelabstand ist blau.

Nicht metallisierte Partikel auf Gold und Silizium

Bereits vor dem Metallisieren treten Multipeaks in den Extinktionsspektren auf (Abb. 61, rechts). Die Extinktionswerte nach 1,5 min Ätzzzeit sind um den Faktor zwei höher als bei nicht geätzten Partikeln. Bei 1,5 min liegen sternförmige Partikel mit einem Durchmesser von 340 nm vor. Eine mögliche Ursache für die hohen Extinktionswerte könnte die Streuung der Partikel sein. Die Rauheit nimmt mit wachsender Reaktionszeit zu. Im Spektrum verschiebt sich der langwellige Peak zu kleineren Wellenlängen. Dies deutet auf einen Interferenzeffekt hin, da die Nanopartikel nicht metallisiert sind und mit wachsender Ätzzzeit kleiner werden.

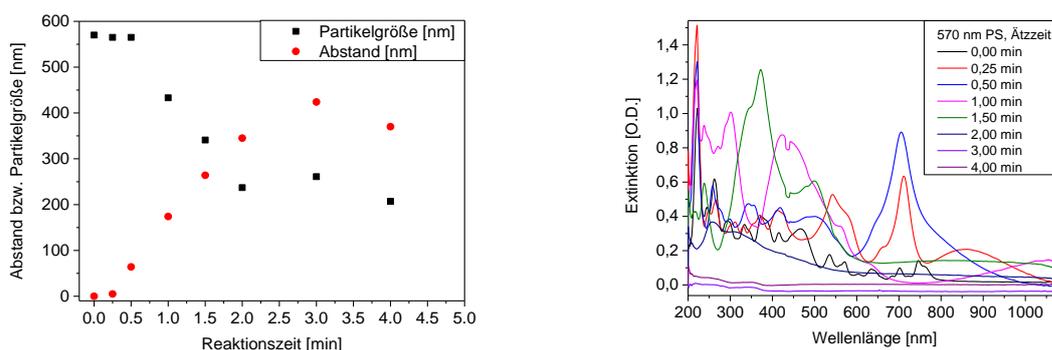


Abb. 61: Links: Partikeldurchmesser und Abstand benachbarter Partikeloberflächen als Funktion der Reaktionszeit. Rechts: Optische Sensorantwort nicht metallisierter Polystyrol-Nanopartikel nach unterschiedlichen Ätzzzeiten. Vor dem Ätzen lagen die Partikel mit einem Durchmesser von 570 nm dicht gepackt auf dem Silizium-Substrat vor.

Einen wichtigen Hinweis könnte ein Vergleich der optischen Eigenschaften von isolierten Partikeln auf Gold und Silizium liefern. Die Peaks im Extinktionsspektrum werden für beide verwendeten Substrate, Silizium und Gold, beobachtet (Abb. 62). Im Fall des Goldträgers wird ein zusätzli-

4.1 Signalentstehung

cher Peak bei 640 nm beobachtet, der vermutlich aufgrund von propagierenden Plasmonen im Goldfilm auftritt. Bei den übrigen Resonanzen der nicht metallisierten Polystyrol-Nanopartikel handelt es sich um Interferenzen. Ein weiteres Argument hierfür ist, dass bis zu einer Ätzzeit von 1,5 min eine Signalverstärkung beobachtet wird. Es handelt sich nicht um Polarisierungseffekte, wie Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, da diese schnell mit wachsendem Abstand abfallen.

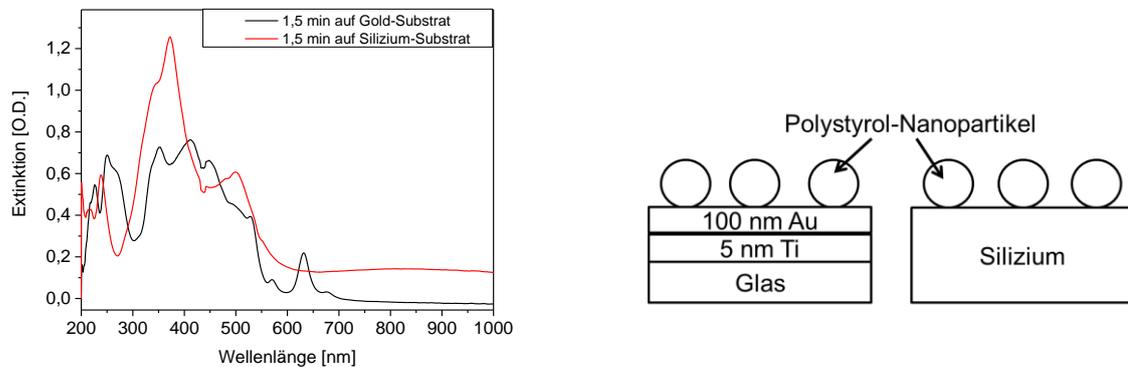


Abb. 62: Links: Optische Sensorantwort nicht metallisierter Polystyrol-Nanopartikel nach einer Ätzzeit von 1,5 min auf einem Silizium-Substrat (**rote Kurve**) und einem mit Gold metallisierten Glaträger (**schwarze Kurve**). Rechts: Schematische Darstellung der Proben.

Metallisierte Proben

Zur Untersuchung der Wichtigkeit der Kontaktpunkte zu benachbarten Partikeln werden die separierten Partikel nasschemisch metallisiert. Durch den Metallisierungsprozess wird eine Verstärkung der Absorptionswerte erreicht (Abb. 63). Für Oberflächen, bei denen kein Peak im nicht metallisierten Zustand vorlag, tritt infolge der Metallisierung ein Peak bei 600 nm auf. Hierbei handelt es sich vermutlich um einen plasmonischen Effekt. Genauso verhalten sich 190 nm Partikel nach 0,5 min Reaktionszeit (Abb. 65).

Schlussfolgernd ergibt sich als Richtlinie für das Sensordesign die Notwendigkeit dielektrischer Kontaktpunkte zum Substrat, um scharfe Peaks im Extinktionsspektrum zu sehen.

Eine Grenze für mittels Ionenplasmaätzens hergestellte Sensoroberflächen bildet die Detektierbarkeit des Signals. Für 570 nm große Partikel liegt nach einer Reaktionszeit von 7 min keine optische Aktivität mehr vor, genauso wie für 190 nm nach 1 min und 96 nm Partikel nach 0,5 min. Bis zu Partikeldurchmesser von 200 nm sind Peaks im Extinktionsspektrum beobachtbar, die sich mit abnehmendem Partikeldurchmesser und zunehmendem Abstand verbreitern und zu kleineren Wellenlängen verschieben. Die Verbreiterung kann mehrere Ursachen haben, zum einen die raue Oberfläche, die zur Dämpfung der Plasmonen oder diffusen Streuung von Licht führt. Bei der diffusen Streuung ist der Impuls nach der Streuung zufällig verteilt. Hinzu kommen die Polydispersivität der Nanopartikel und die Geometrie der geätzten Partikel. Es handelt sich um abgeplattete Halbkugeln (Abb. 64). Die Verschiebung zu kleineren Wellenlängen beruht auf Interferenzen.

4 Ergebnisse und Diskussion

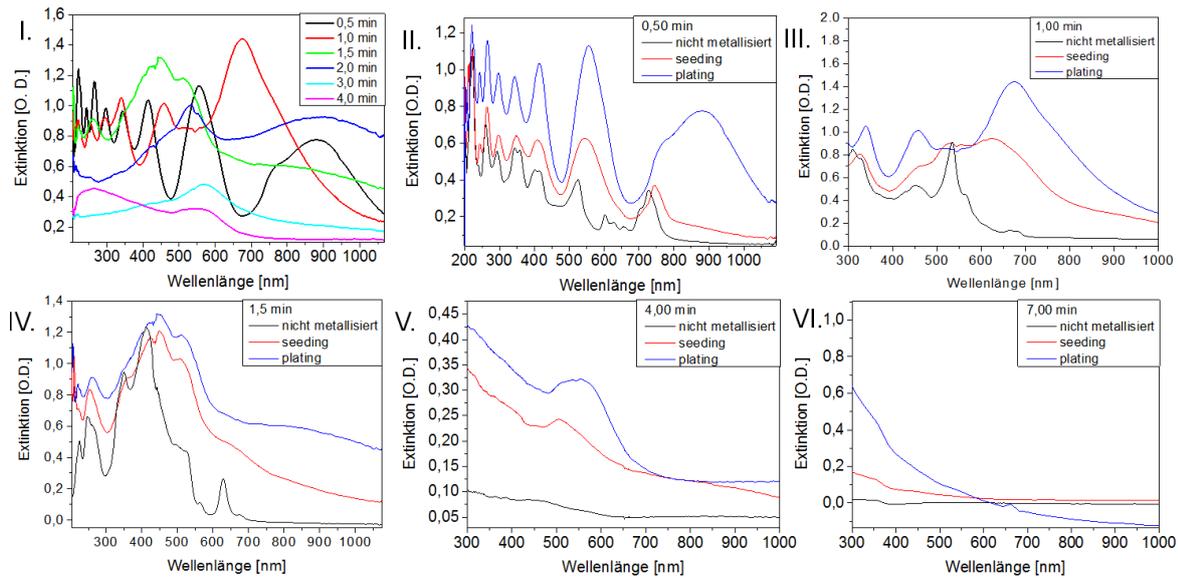


Abb. 63: I.: Optische Antwort der Sensoroberflächen mit 570 nm Polystyrol-Nanopartikeln nach verschiedenen Ätzzeiten und nasschemischer Metallisierung mittels Seeding und Plating. II.-VI.: Änderung der optischen Sensorantwort infolge des nasschemischen Metallisierungsprozesses der Polystyrol-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 570 nm nach dem reaktivem Ionenplasmaätzen. Die Ätzdauer betrug 0,50 min (II.), 1,00 min (III.), 1,50 min (IV.), 4,00 min (V.) und 7,00 min (VI.). Dargestellt sind je die Extinktionsspektren der nicht metallisierten Nanopartikel (schwarze Kurve), der Oberfläche nach dem Seeding-Schritt (rote Kurve) und nach dem Plating (blaue Kurve).

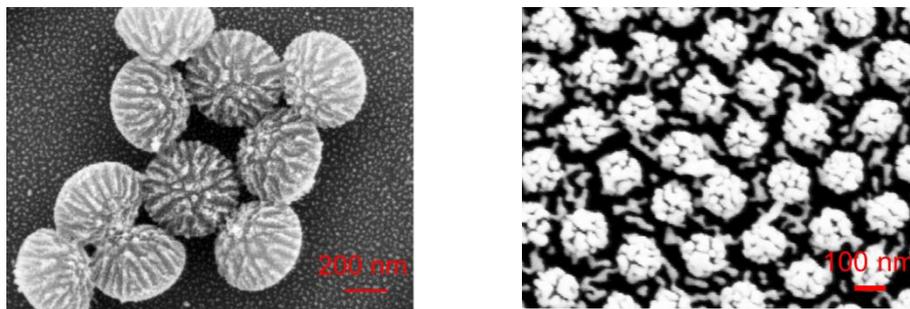


Abb. 64: Links: REM-Aufnahme der geätzten Polystyrol-Nanopartikel. Die Partikel sind diskusförmig. Rechts: REM-Aufnahme der metallisierten Nanopartikel.

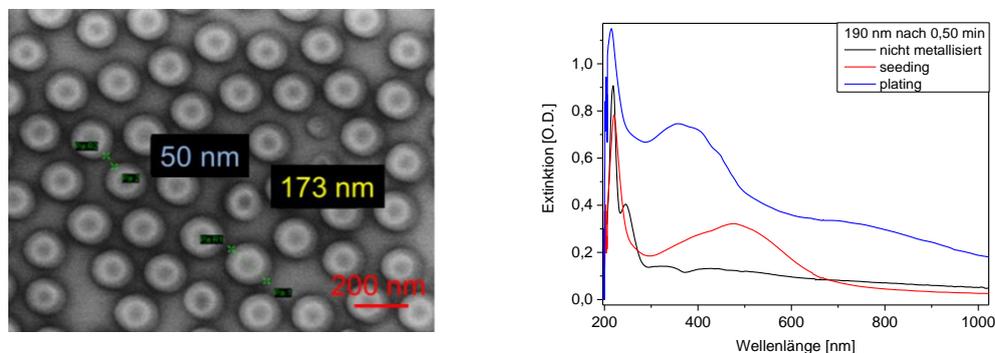


Abb. 65: Links: REM-Aufnahme der nicht metallisierten Polystyrol-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 190 nm nach 0,5 min reaktivem Ionenplasmaätzen. Rechts: Änderung der optischen Sensorantwort infolge des nasschemischen Metallisierungsprozesses der Polystyrol-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 190 nm nach 0,5 min reaktivem Ionenplasmaätzen. Dargestellt sind je die Extinktionsspektren der nicht metallisierten Nanopartikel (schwarze Kurve), nach dem Seeding (rot) und nach dem Plating (blau).

4.1 Signalentstehung

Kontaktpunkte

Die Existenz von Peaks im Spektrum zeigt im Vergleich zu Partikeln mit vollständiger Metallhülle die Wichtigkeit dielektrischer Kontaktpunkte zum Substrat. Die Ursache konnte nicht geklärt werden. Vermutlich liegen bei Partikeln mit einer vollständigen Metallhülle andere Randbedingungen vor. Es wird kein Licht absorbiert. Der Kurzschluss in der Metallhülle könnte die Polarisierung des Partikels erschweren. Wird das dielektrische Partikel ohne Metallhülle direkt auf dem Substrat adsorbiert, so befindet es sich in Kontakt mit einer natürlichen Oxidationsschicht (wenige Nanometer) bzw. mit dem haftvermittelnden Polymer auf dem Substrat.

Abschließende Bemerkung

Durch die Untersuchung von isolierten Partikeln auf Silizium-Wafern und mit Gold beschichteten Glaträgern konnte gezeigt werden, dass drei Aspekte die Extinktion in Nanopartikelfilmen charakterisieren. Die Resonanzen von nicht metallisierten Partikeln auf Silizium zeigen die Bedeutung der Interferenz. Im Fall von Gold als Substrat werden propagierende Plasmonen im Metallfilm auf dem Substrat angeregt. Durch nasschemische Metallisierung kommen lokalisierte Plasmonen hinzu. Der wichtigste Faktor, um Peaks im Spektrum zu sehen, sind dielektrische Kontaktpunkte zum Substrat, auch wenn das Substrat selbst mit Gold beschichtet ist. Warum das so ist, konnte bisher nicht geklärt werden.

Ausblick

Ein Modell für die Beschreibung der metallisierten dielektrischen Nanopartikel wäre ein Film aus einem effektiven Medium (Luft, Polystyrol und Gold). Die Verschiebung ins Blaue mit wachsender Ätzzeit könnte durch eine Reduktion der Filmdicke erklärt werden. Das Verständnis der plasmonischen Effekte erfordert allerdings eine getrennte Betrachtung der Metallhülle. Es wäre interessant die Partikelgröße unabhängig vom Abstand der Partikel einstellen zu können. Zur unabhängigen Wahl von geometrischen Abmessungen und Abständen braucht man eine andere Methode. In dieser Arbeit wurde Elektronenstrahlolithographie (Kap. 4.5) gewählt. Die Tatsache, dass die geätzten Strukturen mit einem Partikeldurchmesser von ca. 300 nm eine maximale Extinktion im nicht metallisierten Zustand zeigten, wurde bei der Wahl der Geometrie für das elektronenstrahlolithographisch hergestellte Modellsystem berücksichtigt.

4.1.3 Einfluss der Metallisierung

In diesen Abschnitt werden zuerst die optischen Eigenschaften von Goldnanopartikeln in Lösung und auf Oberflächen untersucht, um den Einfluss der lokalisierten Plasmonen auf das Gesamtsignal des Sensors zu ermitteln. Anschließend werden Kern-Schale-Nanopartikelfilme mit unterschiedlich dicker Metallhülle betrachtet und die Materialabhängigkeit durch Verwendung von Silber als Hüllenmetall und Aluminiumfolie als Substrat getestet.

4.1.3.1 Extinktionseigenschaften von Goldnanopartikeln gemessen in Transmission

Zur Untersuchung des Einflusses der Goldnanopartikel auf die Extinktion werden kugelförmige Citrat-stabilisierte Partikel mit unterschiedlichen Radien in Lösung hergestellt. Durch die Liganden-Hülle ist die Oberfläche der Partikel negativ geladen. Die Teilchengröße wird anhand von Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen ermittelt, nachdem die Teilchen elektrostatisch auf einem

4 Ergebnisse und Diskussion

positiv geladenen Substrat gebunden wurden. Dies wurde zuvor mit dem Polyelektrolyten PAH beschichtet. Die optischen Eigenschaften der Nanopartikel werden in Transmission durch eine Küvette untersucht. Die Extinktionsspektren zeigen in Transmission einen Peak, dessen Position sich mit zunehmender Teilchengröße ins Rote verschiebt. Es handelt sich um eine lokalisierte Plasmonenresonanz. Der Zusammenhang von Peakposition und Teilchengröße ist im betrachteten Bereich linear (Abb. 66, I.), die Verschiebung beträgt $0,23 \pm 0,03$ nm für eine Durchmesserzunahme um 1 nm. Eine Verdünnung der Lösung führt zu einer Abnahme des Extinktionspeaks.

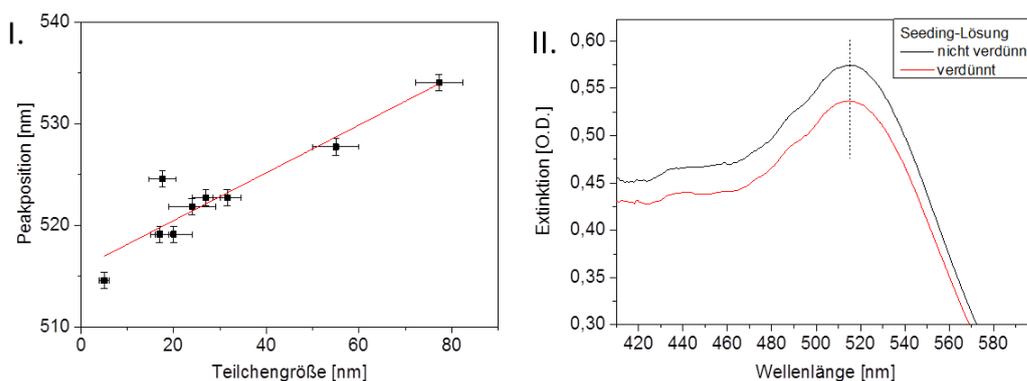


Abb. 66: I.: Dargestellt ist die Peakposition in Abhängigkeit vom Teilchendurchmesser. Der Zusammenhang ist linear. II.: Resonanzwellenlänge einer festen Teilchengröße, hier der Seeding-Lösung (**schwarze Kurve**). Infolge der Verdünnung der Lösung (**rote Kurve**) tritt keine Änderung der Peakposition auf. Die Abnahme der Extinktion beruht auf dem Lambert-Beer-Gesetz.

Abschließende Bemerkung

Die Ergebnisse zeigen, dass der Peak um 500 nm im Extinktionsspektrum der Kern-Schale-Nanopartikelfilme auf die lokalisierte Plasmonenresonanz der Goldnanopartikel in der Metallhülle zurückzuführen ist.

4.1.3.2 Extinktionseigenschaften von Goldnanopartikeln gemessen in Reflexion

Befinden sich die Goldnanopartikel auf einer Festkörperoberfläche, hängt die Extinktion von weiteren Faktoren ab, wie z.B. der Dichte der Partikel auf der Oberfläche und vom Material des Substrates, insbesondere von dessen Brechungsindex und der Polarisierbarkeit. Zusätzlich kann eine Kopplung zu Anregungen im Trägermaterial auftreten. Letzteres wird hier untersucht.

Zur Untersuchung des Einflusses von Goldnanopartikeln auf die Extinktionseigenschaften von Kern-Schale-Nanopartikeln werden Goldnanopartikel unterschiedlicher Größe auf einem goldbeschichteten Träger bzw. Silizium-Wafer abgeschieden (Abb. 67). Als Nanopartikel werden die monodispersen Seeding-Partikel und eine Partikelmischung aus 17 nm und wenigen Nanometern großen Partikeln eingesetzt. Die optischen Eigenschaften werden in Reflexion unter Lichteinfall entlang der Probenormalen im Medium Luft untersucht.

Abhängig vom Trägermaterial werden unterschiedliche optische Eigenschaften beobachtet. Auf dem Goldfilm zeigt die Extinktion der Nanopartikel, die aus der Seeding-Lösung abgeschieden wurden, einen Peak mit einer optischen Dichte von 0,1 O.D., die Partikelmischung wird durch einen Doppelpik charakterisiert. Anhand der Probe mit zwei stark unterschiedlichen Partikelgrößen wird deutlich, dass die optische Antwort durch die lokalisierten Oberflächenplasmonen in den Nanopartikeln verursacht wird.

4.1 Signalentstehung

Aufgrund der Größenabhängigkeit der LSPR gibt die Peakform über die Größenverteilung der Partikel auf dem Substrat Aufschluss.

Rolle des Substrates

Einen wichtigen Hinweis auf die Signalursache liefert die Tatsache, dass im Fall des Silizium-Substrates kein Peak im Extinktionsspektrum beobachtet wird. Dies kann mehrere Gründe haben. Es ist kein Effekt der Nanopartikeldichte. Die Dichte der Goldnanopartikel auf dem Substrat wird jeweils mit dem REM überprüft. Ein weiterer Punkt ist die Reflektivität des Substrates. Dies kann jedoch ausgeschlossen werden, weil die Intensität der Referenz über die Integrationszeit angeglichen wird. Aus den Beobachtungen lässt sich schließen, dass die lokalisierten plasmonischen Anregungen in den Goldnanopartikeln durch den Goldfilm verstärkt werden. Die Ursache kann die zusätzliche Anregung von propagierenden Plasmonen im Goldfilm sein. Die Resonanzbedingung wird durch die Rauheit der Probe erfüllt. Dennoch liegt die optische Dichte von Gold-Nanopartikeln, die ohne dielektrische Partikel auf der Oberfläche adsorbiert sind, in der Größenordnung von 0,1 O.D.. Deshalb wurden für weitere Untersuchungen Kern-Schale-Nanopartikelfilme auf Gold eingesetzt.

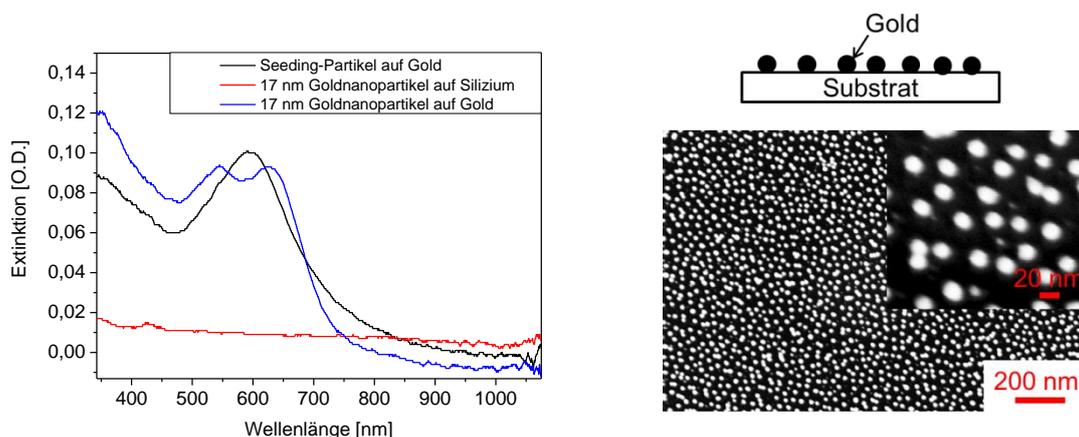


Abb. 67: Links: Extinktionsspektren von Goldnanopartikeln, die auf PAH beschichteten Trägern adsorbiert sind. Als Substrate werden mit 100 nm Gold bedampfte Glasträger oder Silizium-Wafer eingesetzt. Die Nanopartikel haben eine unterschiedliche Größe. Dargestellt ist das Extinktionsspektrum der Seedingpartikel auf einem Goldfilm (**schwarze Kurve**), einer Partikelmischung aus 17 nm und wenigen Nanometern großen Partikeln auf Silizium (**rote Kurve**) und auf einem Goldfilm (**blaue Kurve**). **Rechts:** Schematische Darstellung des Probenaufbaus und REM-Aufnahme der Silizium-Oberfläche, die mit Goldnanopartikeln mit zwei unterschiedlichen Durchmessern besetzt ist. Die Größe der kleinsten Partikel ist anhand der Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme nicht ablesbar.

Abschließende Bemerkung

Untersuchungen der plasmonischen Anregungen auf Oberflächen in Reflexion erfordern einen Verstärkungseffekt. Die Signalverstärkung wird durch propagierende Plasmonen in einem Goldfilm bewirkt. Dennoch ist die Optische Dichte klein im Vergleich zu den Extinktionswerten von Kern-Schale-Nanopartikelfilmen.

4.1.3.3 Variation der Metallhüllendicke von Kern-Schalen-Nanopartikelfilmen

Bisherige Untersuchungen zeigten die Bedeutung der lokalisierten Plasmonen. Auf einer nasschemisch metallisierten Sensoroberfläche liegen aber keine kugelförmigen Partikel, sondern eine Metallumhüllung vor. Im Folgenden wird der Einfluss der Metallhülle auf das Signal untersucht. Die optimale Linienform wird für Nanopartikelfilme mit Kontaktpunkten und einer Plating-Zeit von 3 min erreicht.^[48] Die Metallhüllendicke von Kern-Schalen-Nanopartikelfilmen wird durch Variation der Plating-Zeiten verändert. Die Abscheidung einer dickeren Metallhülle führt zur Bildung von Schultern und zum Aufspalten von Peaks, wie das Beispiel von 10 min Plating verdeutlicht (Abb. 68).

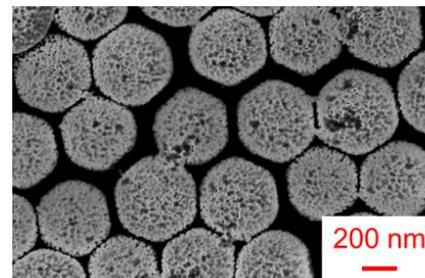
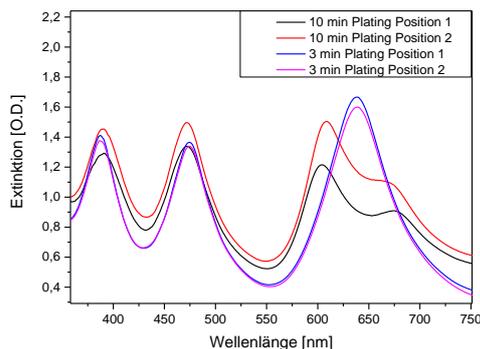


Abb. 68: Links: Reproduzierbarkeit der Peak Position: Dargestellt ist das Extinktionsspektrum für Silika-Nanopartikel mit Plating-Zeiten von 3 min und 10 min an zwei verschiedenen Probenpositionen. **Rechts:** REM-Aufnahmen der geflooteten Silika-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 540 nm nach nasschemischer Metallisierung mit 10 min Plating.

Die Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme zeigt, dass die Nanopartikel zum Teil zusammengewachsen sind. Durch das Wachstum der Metallhülle werden mehrere Faktoren gleichzeitig geändert: Die Partikelgröße, die Partikelform, die Leitfähigkeit sowie die Oberflächen-Rauigkeit.

Berechnung der optischen Antwort

Die optische Antwort des Nanopartikelfilmes kann mit dem Programm DiffractMod berechnet werden. Die Hülle aus Nanopartikeln wird hierzu als geschlossener Film modelliert und die Dicke der Goldummantelung variiert. Für den Goldfilm werden die dielektrischen Daten von Bulk-Gold verwendet und die Rauheit vernachlässigt. Eine 15 nm dicke Goldschicht auf den dielektrischen Nanopartikeln führt zu keinen Schultern der Peaks. Für eine Dicke von 20 nm tritt eine Schulter im Peak bei mittleren und langen Wellenlängen auf und die Peaks spalten für dickere Metallhüllen auf. Die Konvergenz der Berechnungen wurde überprüft (Abb. 69). Als Fazit ergibt sich, dass die Metallisierung, die nach dreiminütiger Plating-Zeit erreicht wird, als 15 nm dicke Goldschicht modelliert werden kann. Durch die wachsende Metallhülle treten mehr Resonanzen auf.

4.1 Signalentstehung

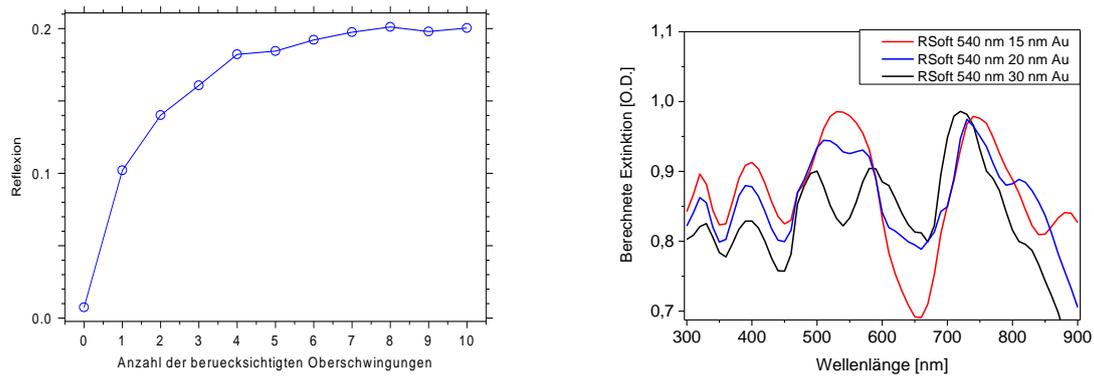


Abb. 69: Links: Dargestellt ist die mit dem Programm DiffracMOD von RSOFT berechnete Reflexion bei der Wellenlänge von $1\ \mu\text{m}$ als Funktion der Anzahl an berücksichtigten Oberschwingungen. Konvergenz tritt für 8 Oberschwingungen auf. **Rechts:** Die berechneten Extinktionsspektren von Silika-Nanopartikeln mit einem Durchmesser von 540 nm und einer Bedeckung mit 15 nm Gold (**rot**), 20 nm Gold (**blau**) und 30 nm Gold (**schwarz**). Die Wellenlängenauflösung beträgt 1 nm. Die zugrunde gelegte Geometrie ist in Abb. 28 dargestellt.

Abschließende Bemerkung

Es wurde ein Aufspalten von Peaks mit wachsender Filmdicke beobachtet. Im Modell stark gekoppelter plasmonischer Anregungen wäre das ein Hinweis auf ein anti-crossing Verhalten. Die Kopplung bestünde dann zwischen propagierenden Plasmonen und lokalisierten Plasmonen in der Hülle. Die Leitfähigkeit nimmt mit wachsender Metallhüllendicke zu, daher sind propagierende Plasmonen sowohl in der Metallhülle als auch im Substrat möglich. Die Resonanzbedingung wird durch die raue Oberfläche erfüllt.^[20] Die Stärke der Kopplung und Leitfähigkeit konnte allerdings nicht berechnet werden.

4.1.3.4 Hüllenmaterial

In diesem Kapitel wird eine dickere Metallhülle als die Eindringtiefe aufgebracht. Darüber hinaus wird Silber verwendet. Metallhüllen aus Silber versprechen eine hohe Sensitivität. Um die Abhängigkeit der optischen Eigenschaften vom Metall zu untersuchen, werden sowohl SiO_2 -Nanopartikelfilme (Durchmesser 540 nm) als auch ein planarer PMMA-Film der Dicke 600 nm mit Silber beschichtet. Zur Metallisierung werden 20 nm und 30 nm Silber durch Besputtern und 50 nm Silber durch Bedampfen aufgebracht (Abb. 70).

Nanopartikelfilme

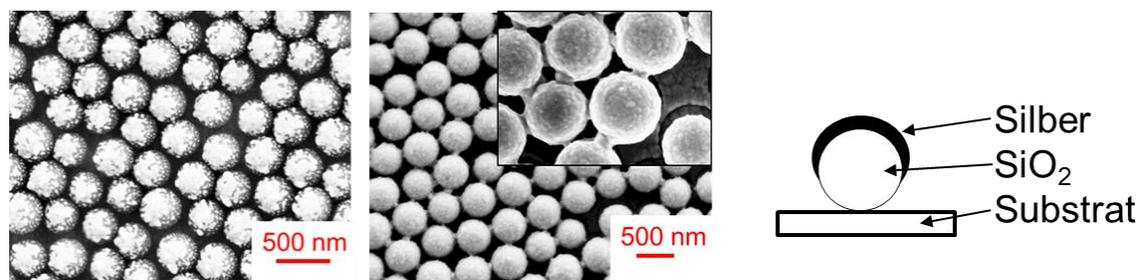


Abb. 70: Links: REM-Aufnahme der mit 30 nm Silber besputterten Silika-Nanopartikel. **Mitte:** REM-Aufnahme der mit 50 nm Silber bedampften Silika-Nanopartikel. **Rechts:** Schematische Darstellung des Probenaufbaus.

4 Ergebnisse und Diskussion

Die optimale Silberfilmdicke zur Metallisierung der Sensoroberflächen wird durch den Vergleich der Extinktionsspektren ermittelt (Abb. 71). Zum Vergleich werden planare Filme beschichtet.

Die Extinktion wird durch Reflexion von weißem Licht auf der Sensoroberfläche unter Lichteinfall entlang der Probennormalen relativ zur Referenz (100 nm Gold auf Glas) untersucht. Im Fall des Nanopartikelfilms werden für alle Silberdicken mehrere Peaks im Extinktionsspektrum beobachtet. Mit wachsender Silberdicke wird die Resonanz bei langen Wellenlängen stärker. Die Silberfilmdicke von 50 nm ist typisch für die prismengekoppelte Oberflächenplasmonen-Resonanz. Nanopartikelfilme mit 50 nm Silber zeigen die höhere optische Dichte. In diesem Fall ist die obere Partikelhalbkugel mit Silber bedeckt und es bestehen leitende Kontakte zwischen benachbarten Partikeln. Dies ist von Vorteil für eine scharfe Resonanz.

Planare Filme

Anders verhält sich die Extinktion der planaren Filme. Das Extinktionsspektrum des metallisierten PMMA-Filmes zeigt einen Absorptionspeak bei 300 nm mit 0,75 optischer Dichte (Abb. 71, rechts). Anschließend sinkt die Absorption auf kleinere Werte. Die optische Antwort wird negativ und geht ab 600 nm auf den Wert Null zurück. Ursache hierfür sind die dielektrischen Eigenschaften von Silber im Vergleich zur Goldreferenz. Gold ist das Substrat unter dem PMMA-Film. Insbesondere im Fall von Silber sind die Interbandübergänge bei einer höheren Energie (3,8 eV) als bei Gold (2,5 eV). Das einfallende Licht kann die Silberschicht nicht durchdringen, weil die Eindringtiefe im Bereich von 20 nm liegt. Beim Besputtern der Oberfläche mit 20 nm Silber wird allerdings kein geschlossener Film erreicht. Der Lichtstrahl kann die obere Metallschicht durchdringt, an der unteren Goldschicht reflektiert werden und nach Durchqueren des Mediums mit hohem Brechungsindex unter Energie- und Impulserhaltung Plasmonen im Silber anregen kann. Die optischen Dichten sind im Vergleich zu Beschichtungen mit Gold um den Faktor 2 höher.

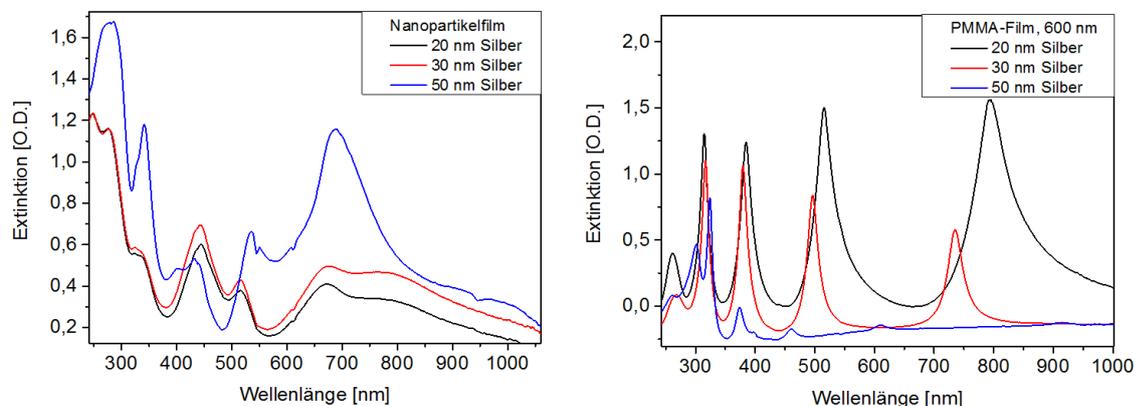


Abb. 71: Links: Optische Sensorantwort eines mit Silber beschichteten Silika-Nanopartikelfilms. Der Nanopartikeldurchmesser ist 540 nm. Die Silberdicke beträgt 20 nm, 30 nm und 50 nm. **Rechts:** Extinktionsspektrum eines PMMA-Films mit der Dicke 600 nm mit Silberdicken von 20 nm, 30 nm und 50 nm. Die Messung erfolgt im Medium Luft unter Lichteinfall entlang der Probennormalen.

Stabilität

Die Beobachtung eines Adsorptionsprozesses auf den Oberflächen war allerdings nicht möglich, weil die Silberschicht durch den energiereichen UV-Anteil des Lichtes oxidiert wird. Eine Beobachtung der Extinktion an einer festen lateralen Stelle führt zu einer Änderung der dielektrischen Eigenschaften und Verschiebung der Peaks ins Rote. Es wurde ein SAM adsorbiert um die Stabilität zu verbessern. Dennoch erfolgte eine Rotverschiebung.

4.1 Signalentstehung

Abschließende Bemerkung

Eine Signalverstärkung im Extinktionsspektrum von Nanopartikelfilmen tritt auf, wenn zusätzlich zu dielektrischen Kontakten leitende Kontakte zwischen benachbarten Partikeln bestehen. Im Fall von planaren Filmen ist eine nicht geschlossene Schicht wichtig für scharfe Peaks. Metallschichten, die dicker als die Eindringtiefe sind, führen zu Peaks im Extinktionsspektrum, weil die Nanopartikel möglicherweise wie ein Gitterkoppler wirken. Für planare Filme treten für dicke Metallfilme keine Peaks auf.

Silber ermöglicht höhere Extinktionswerte als vergleichbare Beschichtungen mit Gold, weil in Silber die Elektronen weniger gedämpft werden. Bezüglich der Stabilität unter Flüssigkeit, UV-Licht und der Funktionalisierbarkeit ist das Material Gold zu bevorzugen.

4.1.3.5 Aluminiumfolie als Substrat

Ein deutlich billigeres Substrat als die verwendeten goldbeschichteten Glaträger stellt eine Aluminiumfolie dar, die auf einen Glaträger gespannt wird. Zum Test des Einflusses der Reflektivität wurde sowohl die matte als auch die reflektierende Seite mit Nanopartikelfilmen beschichtet. Ein Vergleich der Extinktionsspektren verdeutlicht, dass die Peakpositionen bei gleicher Bedeckung durch das Substrat bestimmt werden und für Aluminium ins Rote verschoben sind. Der Unterschied der Reflektivität der matten und reflektierenden Aluminiumfolienseite hat einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Peakposition (Abb. 72). Durch geschickte Wahl des Substrates kann somit die Peakform und -position „maßgeschneidert“ werden, um z. B. Absorptionsbanden der zu untersuchenden Flüssigkeit auszuweichen.

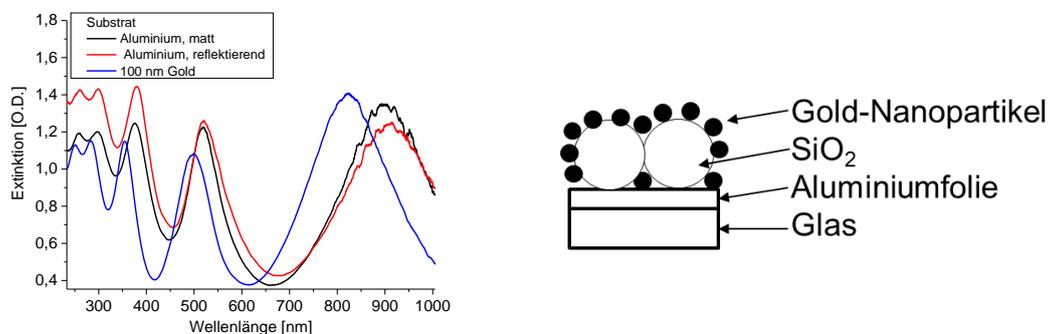


Abb. 72: Links: Extinktionsspektren der nasschemisch metallisierten Silika-Nanopartikel auf der matten Seite einer Aluminiumfolie (schwarze Kurve), auf der reflektierenden Seite einer Aluminiumfolie (rote Kurve) und auf einem mit 100 nm Gold bedampften Glassubstrat. **Rechts:** Schematische Darstellung des Probenquerschnitts.

Abschließende Bemerkung

Es konnte gezeigt werden, dass die die Peakposition durch das Substrat bestimmt wird. Der relative Peakabstand wird durch die Nanostrukturierung festgelegt. Die Peakform ist von der Metallhülle abhängig. Eine Aluminiumfolie ist als billiges Substrat einsetzbar, weil bezüglich der Stabilität beim Metallisieren und Auslesen der optischen Antwort keine Probleme auftraten. Natürlich ist für sensorische Anwendungen die Sensitivität von großer Bedeutung. Diese wird im nächsten Kapitel studiert.

4.2 Sensitivität

In diesem Kapitel wird untersucht, welcher Aspekt des Sensors (lokalisierte, propagierende Plasmonen oder Interferenzen) den größten Einfluss auf die Sensitivität hat. Zuerst wird die Sensitivität von Goldnanopartikeln in Lösung untersucht. Anschließend werden Kern-Schale-Nanopartikelfilme mit dielektrischen Kontaktpunkten zwischen benachbarten Partikeln betrachtet und zuletzt separierte Nanopartikel und dielektrische Filme behandelt.

Als Sensitivität ist im Folgenden die Verschiebung der Resonanzlage durch Adsorption von Fibrinogen aus einer 1 mg/ml Lösung definiert. Diese beträgt typischerweise einige Nanometer. Die Peakposition im Extinktionsspektrum kann durch eine Inhomogenität in der Nanostrukturierung beim Wechsel der lateralen Probenposition um einige Nanometer schwanken. Dieses Problem wird dadurch minimiert, dass Spektren vor und nach der Proteinadsorption an der gleichen lateralen Position verglichen werden. Anschließend wird über mehrere Probenpositionen gemittelt. Bei Untersuchungen in Lösung erfolgt die Mittelung über drei unabhängige Proben.

4.2.1 Sensitivität von Gold-Nanopartikeln in Lösung

Zur Abschätzung des Beitrags der lokalisierten Plasmonen zur Sensitivität, werden Goldnanopartikel in Lösung untersucht. Die Messungen erfolgen nicht auf der Oberfläche, weil bisherige Ergebnisse zeigten, dass die Extinktionseigenschaften von Goldnanopartikeln auf Oberflächen durch das Substrat beeinflusst werden und die Peakform in Transmission schärfer ist. Die Proteinadsorption führt zu einer Verschiebung ins Rote (Formel 24), die von der Nanopartikelgröße abhängt. Für Partikel mit einer Größe von 32 nm beträgt sie $5,7 \pm 0,3$ nm (Abb. 73). Kleinere Partikel sind sensitiver.

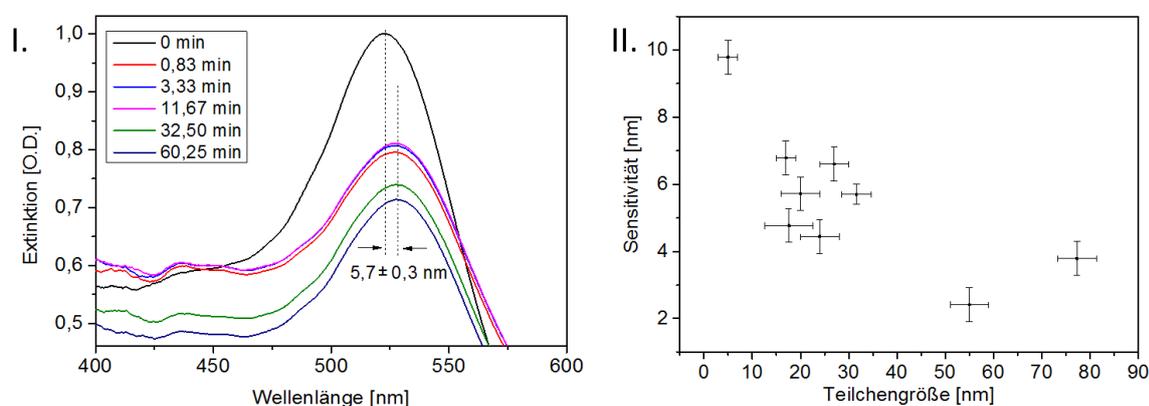


Abb. 73: Links: Änderung der Extinktionsspektren für Goldnanopartikel mit einer Größe von 32 nm durch die Adsorption von Fibrinogen. Rechts: Sensitivität gegenüber der Adsorption von Fibrinogen als Funktion der Teilchengröße. Die Messung erfolgte in Transmission.

Es besteht eine Problematik darin, die Verschiebung durch Brechungsindexänderungen in der Volumen-Phase vom Bindungsprozess auf der Oberfläche zu trennen, weil das Waschen der Nanopartikel erschwert ist. Kleine Nanopartikel lassen sich nicht oder nur unter hoher Umdrehungszahl abzentrifugieren. Dabei können sich Cluster bilden, wodurch die optische Antwort verändert wird. Die tatsächlich adsorbierte Proteinmenge ist daher nicht quantifizierbar. Praktischer in der Anwendung sind feste Träger.

4.2 Sensitivität

4.2.2 Sensitivität von Kern-Schale-Nanopartikelfilmen auf Gold

Weitere Einflussfaktoren auf die Sensitivität sind die Metallhülle und das Substrat. Zuerst werden vollständig mit Gold umhüllte dielektrische Nanopartikel untersucht. Anschließend wird die Dicke der Goldschicht der Metallhüllen und des Substrates variiert. Hierzu gab es bereits in früheren Arbeiten Messungen auf bedampften Glaträgern. Hier wird der Einfluss der Rauheit des Substrates durch mit Gold besputterte Glaträger studiert.

Vollständig umhüllte Partikel

Die Nanopartikelfilme weisen eine hohe Sensitivität gegenüber Adsorptionsprozessen auf der Sensoroberfläche auf. Dies ermöglicht die markierungsfreie Detektion von Bindungsereignissen. Die Resonanzposition von Peaks mit geringer Breite bei gleichzeitig hoher optischer Dichte lässt sich leicht bestimmen. Besonders von Bedeutung sind dabei die dielektrischen Berührungspunkte zwischen den Nanopartikeln und dem Substrat. Vollständig umhüllte Nanopartikel (Abb. 74) sind dafür nicht geeignet, weil die Peaks schlecht ausgebildet sind und keine Peak-Verschiebung infolge des Adsorptionsprozesses erkennbar ist.

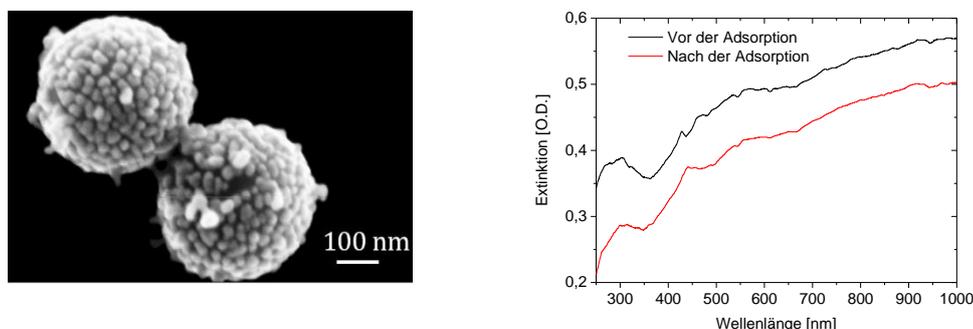


Abb. 74: **Links:** Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme der in Suspension metallisierten Polystyrol-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 380 nm. **Rechts:** Extinktionsspektrum vor (schwarz) und nach (rot) der Fibrinogen-Adsorption gemessen in Reflexion für vollständig umhüllte Polystyrol-Nanopartikelfilme mit einem Durchmesser von 380 nm. Das Substrat ist mit 30 nm Gold und 5 nm Titan beschichtet. Die Messung erfolgte unter einem Reflexionswinkel von 0° gemessen zur Probennormalen im Medium Luft.

Variation der Metalldicke

Im Folgenden werden Silika-Nanopartikel hexagonal dicht gepackt auf einem mit Gold metallisierten Träger adsorbiert und bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber der Protein-Adsorption untersucht. Die Dicke des Metallfilms auf dem Substrat und der Hülle wird variiert. Die Messung erfolgt im Medium Luft unter Lichteinfall entlang der Probennormalen.

Für Silika-Nanopartikel mit einer Plating-Zeit von 3 min wird eine höhere Sensitivität beobachtet als für eine Platingzeit von 10 min (Abb. 75). Die Sensitivität hängt zusätzlich von dem Substrat ab. Es werden mit Gold besputterte Glas-Träger mit 30 nm Gold und 100 nm Gold verwendet. Beide Goldfilme, 30 nm und 100 nm wurden unter den gleichen Bedingungen aufgesputtert. Hierzu wurde das MED 020 Coating System von der Firma Bal-Tec verwendet. Für Substrate mit 30 nm Gold wird für 3 min Plating für den Peak zwischen 400 – 500 nm eine Verschiebung von $5,92 \pm 0,86$ nm (14,59%) erreicht, der Peak zwischen 800 – 900 nm verschiebt sich $48,41 \pm 5,74$ nm (11,87%) (Abb. 75, links). Ist die Dicke des Goldfilms etwa dreimal so dick, beträgt die Peak Verschiebung $8,61 \pm 0,73$ nm (8,48%) (400 – 500 nm) bzw. $35,73 \pm 6,48$ nm (18,15%) (800 – 900 nm). Die Verschiebung der Extinktionsspektren von Nanopartikelfilmen mit 10 min Plating ist nur halb so groß (Abb. 75, rechts).

4 Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse auf den besputterten Oberflächen sind in Übereinstimmung mit Untersuchungen auf aufgedampften Goldfilmen.^{[48] [215] [59] [69]} Der Einfluss der Rauheit des Substrates spielt keine Rolle.

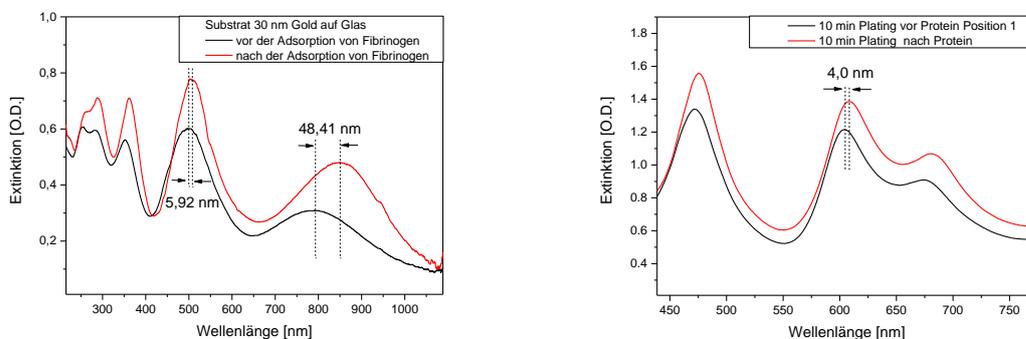


Abb. 75: Links: Extinktionsspektren für 3 min Plating vor und nach der Adsorption von Fibrinogen. **Rechts:** Extinktionsspektren für 10 min Plating vor und nach der Adsorption von Fibrinogen. Die Messung erfolgte unter einem Reflexionswinkel von 0° an Luft.

Die Beobachtungen folgen zwei Gesetzmäßigkeiten:

Der erste Punkt ist die Abhängigkeit der Verschiebung von der Wellenlänge des betrachteten Peaks. Je größer die Resonanzwellenlänge des Peaks für einen festen Partikeldurchmesser, desto größer die Verschiebung (Abb. 75).

Homola et al.^[45] definiert als Sensitivität die Verschiebung der Resonanzlage als Funktion des Brechungsindex des Adsorbates und beobachtete die Sensitivität einer SPR-Konfiguration. Er setzte ein Glasprisma ein, das mit 50 nm Gold oder 50 nm Silber metallisiert war. In beiden Fällen stieg die Sensitivität mit wachsender Wellenlänge monoton an. Als weiterer Punkt kommt die Abklinglänge im angrenzenden Medium hinzu, die mit wachsender Wellenlänge mehr als linear wächst.^[3] Dadurch sind im Signal die Brechungsindexinformationen aus einer größeren Entfernung von der Grenzfläche im Signal enthalten. Für die Kern-Schale-Nanopartikelfilme hängt die Verschiebung zusätzlich vom Reflexionswinkel und Brechungsindex in der Sensorumgebung ab (Kap. 4.3).

Der zweite Punkt betrifft die Dicke des Goldfilms auf dem Substrat bzw. auf den Partikeln. Befindet sich der Goldnanopartikelfilm auf dem Substrat mit 100 nm Gold, ist die Sensitivität des mittleren Peaks höher als für Nanopartikelfilme auf 30 nm Gold.

Ein wichtiger Einflussfaktor ist die Eindringtiefe des elektromagnetischen Feldes. Die Eindringtiefe von Licht in einen Goldfilm ist abhängig von der Wellenlänge des Lichtes und der Leitfähigkeit des Materials.^[253] Die Eindringtiefe bei 830 nm beträgt 26 nm.^[254] Die Plasmfrequenz berechnet nach dem Drude-Modell beträgt 72800 cm^{-1} ,^[255] die entsprechende Wellenlänge ist 137 nm. Im UV-Bereich ist Gold transparent. Dies liegt außerhalb des Messbereichs. Durch einen Film der Dicke 100 nm wird im sichtbaren Bereich kein Licht transmittiert. Der nicht absorbierte Teil wird reflektiert und dadurch die Spiegelwirkung des Substrates erhöht. Die Ursache für die Variation der Sensitivität mit der Dicke des Metallfilms könnte der Unterschied in der Spiegelwirkung des Substrates sein.

4.2 Sensitivität

4.2.3 Sensitivität von Nanopartikelfilmen auf Aluminium-Folie

Als Alternative zu Gold wird eine Aluminiumfolie als Substrat verwendet. Die Nanopartikelfilme auf Gold und Aluminium werden unter den gleichen Bedingungen bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber Proteinadsorption verglichen. Die Sensitivität der Nanopartikelfilme auf Gold und Aluminiumfolie ist gleich (Abb. 76).

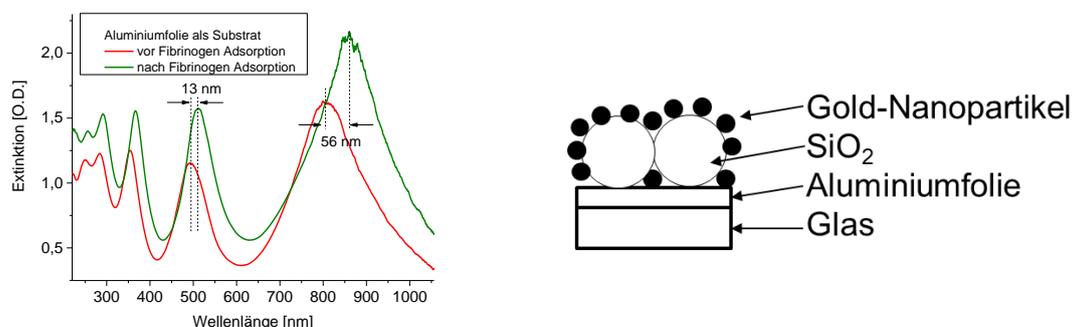


Abb. 76: Links: Verschiebung der Peakposition infolge der Proteinadsorption auf Nanopartikelfilmen. Die Kern-Schale-Nanopartikel bestehen aus SiO₂-Nanopartikeln (Durchmesser = 540 nm), die nasschemisch mit 3 min Plating metallisiert wurden. Als Substrat wurde eine Aluminiumfolie verwendet. Die Detektion erfolgt im Medium Luft unter Lichteinfall entlang der Probennormalen. **Rechts:** Schematische Darstellung des Probenquerschnitts.

Abschließende Bemerkung

Extinktionsspektren Kern-Schale-Nanopartikelfilme auf einer matten sowie reflektierenden Aluminiumfolie zeigen dieselben Peak-Verschiebungen wie Nanopartikelfilme auf 100 nm Gold. Das Substratmaterial und die Reflektivität des Substrates beeinflussen nicht die Sensitivität, wenn die Metalldicke größer als die Eindringtiefe des Lichtes ist. Dies ist ein wichtiges Ergebnis, da so der Sensor preisgünstig großflächig produziert werden kann sowie aufgerollt platzsparend transportiert werden könnte.

4.2.4 Sensitivität von planaren dielektrischen Filmen

Zur Charakterisierung des Einflusses der Interferenz auf die Sensitivität und als Voruntersuchung für weitere Experimente werden hier planare Filme als Sensorelemente eingesetzt (Abb. 77). In Kap. 4.5 soll ein einfaches elektronenstrahlolithographisch hergestelltes Modellsystem für die Kern-Schale-Nanopartikelfilme entworfen werden. PMMA ist ein beliebtes Ausgangsmaterial für die Elektronenstrahlolithographie.



Abb. 77: Schematische Darstellung der Referenz für die Extinktionsmessungen (I.) sowie der Schichtsysteme bestehend aus nicht metallisierten (II.) und metallisierten (III.) PMMA-Filmen. Das Substrat entspricht für alle Messungen dem Aufbau der Referenz.

Sensitivität nicht metallisierter Filme

Im Fall von nicht metallisierten PMMA-Filmen werden aufgrund von Interferenzeffekten mehrere Peaks im Extinktionsspektrum beobachtet. Die Sensitivität der Probe wird gegenüber der Proteinadsorption getestet. Die Verschiebung des Peaks bei 500 nm von nicht metallisierten Filmen beträgt $10,58 \pm 7,08$ nm für eine Filmdicke von 300 nm und $6,29 \pm 1,06$ nm für die doppelte Filmdicke. Im Fall nicht metallisierter Filme sind 300 nm zu bevorzugen. Die Verschiebung wurde aus drei Messungen gemittelt.

Sensitivität metallisierter Filme

Gegenstand der Untersuchungen ist die Sensitivität metallisierter PMMA-Filme mit unterschiedlichen Filmdicken. Es werden PMMA-Filme der Dicken 150 nm, 300 nm und 600 nm eingesetzt. Mit wachsender dielektrischer Schicht werden mehr Interferenzpeaks beobachtet (Abb. 78). Auf den Oberflächen wurde Fibrinogen adsorbiert. Die Sensitivität der Extinktionsmaxima gegenüber der Proteinadsorption nimmt mit wachsender Filmdicke zu.

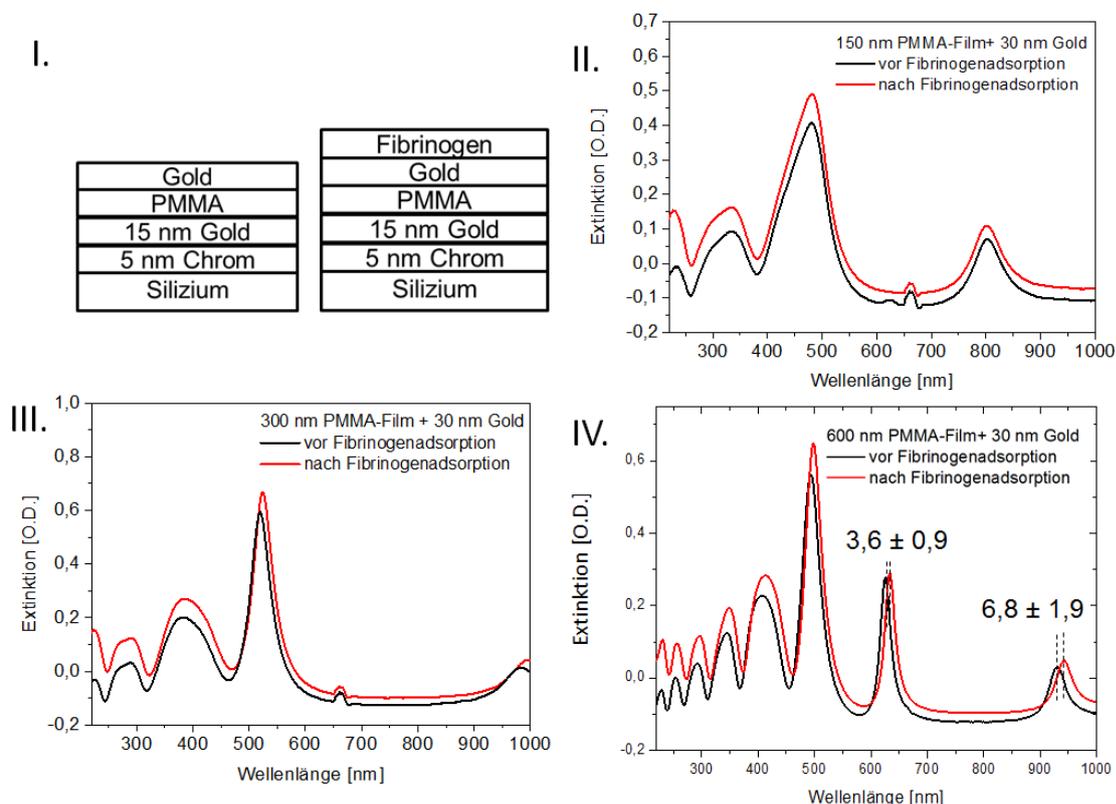


Abb. 78: I.: Schematischer Aufbau der Proben. II.-IV.: Extinktionsspektrum für einen Sensor bestehend aus einem PMMA-Film der Dicke 150 nm (II.) bzw. 300 nm (III.) und 600 nm (IV.). Der Film ist je mit 30 nm Gold metallisiert. Die Spektren werden vor (schwarze Kurve) und nach (rote Kurve) der Fibrinogen-Adsorption aufgenommen. Die Messung erfolgte in Luft unter Lichteinfall entlang der Probennormalen.

Die Metallisierung scheint die Sensitivität gegenüber Proteinadsorption zu verschlechtern. Das könnte daran liegen, dass der obere Metallfilm das elektrische Feld abschwächt und gleichzeitig keine Plasmonen erzeugt werden. Für einen metallisierten PMMA-Film der Dicke 600 nm ist die Sensitivität des Peaks bei großen Wellenlängen im Extinktionsspektrum um einen Faktor 8 kleiner

4.2 Sensitivität

als für Nanopartikelfilme vergleichbarer Dicke. Einen Beitrag hierzu kann die Oberflächengröße leisten. Die Oberfläche ist für Nanopartikelfilme um den Faktor vier größer als für planare Oberflächen. Ein weiterer Punkt ist die Hydrophobizität der Oberflächen. Diese wird über den Wasser-Kontaktwinkel charakterisiert. Sowohl für PMMA-Filme als auch Silika-Nanopartikelfilme wird ein Wert von 80° erreicht. Das heißt, es besteht kein Unterschied bezüglich der Hydrophobizität.

Abschließende Bemerkung

Sensorelemente, die nur auf lokalisierten Plasmonen oder nur Interferenzen basieren, können die Adsorption von Proteinen nachweisen. Dabei werden bei mittleren Wellenlängen vergleichbare Verschiebungen wie für Kern-Schale-Nanopartikelfilme erreicht. Der Peak bei langen Wellenlängen ist für Kern-Schale-Nanopartikel am sensitivsten. Ein Unsicherheitsfaktor in diesen Experimenten ist die tatsächlich adsorbierte Proteinmenge, da unterschiedliche Oberflächen vorliegen. Dies erschwert auch den Vergleich der Sensitivität mit Nanopartikelfilmen.

4.3 Abhängigkeit vom Brechungsindex der Volumenphase und Reflexionswinkel

Für sensorische Anwendungen ist die Brechungsindex-Abhängigkeit des Signals wichtig. Der Sensor reagiert sowohl auf den Brechungsindex der Volumenphase als auch auf den Brechungsindex der adsorbierten Schicht. Dies kann zu Problemen bei *in situ* Messungen führen, bei denen in der Regel ein Wechsel zwischen einer Pufferlösung und Probeflüssigkeiten mit unterschiedlichem Brechungsindex erforderlich ist. Zur Ermittlung der adsorbierten Massendichte *in situ* ist eine Separation zwischen den Beiträgen der Volumenphase und Oberflächenadsorptionsprozessen erforderlich.

4.3.1 Kern-Schale-Nanopartikelfilme

Die optischen Eigenschaften von Kern-Schale-Nanopartikelfilmen, die mit Gold bzw. Silber beschichtet sind, werden unter Variation des Reflexionswinkels und Brechungsindex der Volumen-Phase untersucht. Das Ziel ist einen Reflexionswinkel zu finden, unter dem die Peakposition des Sensors unabhängig vom Brechungsindex der Flüssigkeit über dem Sensor ist.

4.3.1.1 Metallisierung mit Gold

Zuerst wird die Abhängigkeit der Peakposition vom Brechungsindex der Flüssigkeit über dem Sensor ermittelt. Hierzu erfolgt ein Vergleich der Peakposition im Medium Luft und Wasser unter unterschiedlichen Reflexionswinkeln. Die Richtung der Verschiebung der Resonanzwellenlänge, die infolge der Brechungsindexänderung beim Übergang von Luft zur Flüssigkeit über dem Sensor auftritt, ist abhängig vom Reflexionswinkel (Abb. 79, I.). Für große Reflexionswinkel sind die Resonanzen ins Blaue verschoben. Im Fall kleiner Reflexionswinkel erfolgt die Verschiebung ins Rote. Beträgt der Reflexionswinkel 35° für besputterte Polystyrol-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 570 nm, ist die Peakposition unabhängig vom Brechungsindex der Volumenphase über dem Sensor.

Zur unabhängigen Bestätigung werden für einen festen Reflexionswinkel die Peakpositionen als Funktion des Brechungsindex aufgetragen. Der Brechungsindex wird durch Glycerin-Wasser-Gemische variiert. Bei festem Reflexionswinkel ist der Zusammenhang zwischen der Peakposition und dem Brechungsindex linear (Abb. 79, III.). Die Messwerte werden mit einer Geraden angepasst. Die Steigung der so gewonnenen Eichkurve wird mit dem Programm Origin ermittelt und ist ein Maß für die Sensitivität gegenüber Brechungsindexänderungen in der angrenzenden Volumenphase. Die so ermittelte Sensitivität hängt vom Reflexionswinkel des Lichtes ab (Abb. 79, IV.).

Für Polystyrol-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 570 nm beträgt die Sensitivität unter Lichteinfall parallel zur Probennormalen $89,34 \pm 10,89 \text{ nm/RIU}$ (Abb. 79, III.). Der Wert für konventionelles SPR liegt bei Bulksensitivitäten, die um den Faktor 40 höher sind.^[63] Die relativ geringe Abhängigkeit vom Brechungsindex der Bulk-Flüssigkeit ist ein Vorteil der LSPR-Methode. Eine noch geringere Abhängigkeit von der Volumenphase wird unter dem Reflexionswinkel von 35° beobachtet, unter dem die Extinktionseigenschaften des Sensors weitgehend unabhängig von Brechungsindexänderungen der Flüssigkeit sind (Abb. 79, I. und IV.). Dieser Effekt ist in der Literatur bekannt für mit 30 nm Gold bedampfte Polystyrol-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 110 nm, die mit einer zufälligen Ordnung auf dem Substrat adsorbiert sind.^[64] Hier wurde die Studie auf nasschemisch metallisierte Nanopartikel mit unterschiedlichem Durchmesser und hexagonal dicht gepackter Partikelanordnung erweitert, um die Detektionsbedingungen für den Einsatz der Nanopartikelfilme als Biosensor zu optimieren.

4.3 Abhängigkeit vom Brechungsindex der Volumenphase und Reflexionswinkel

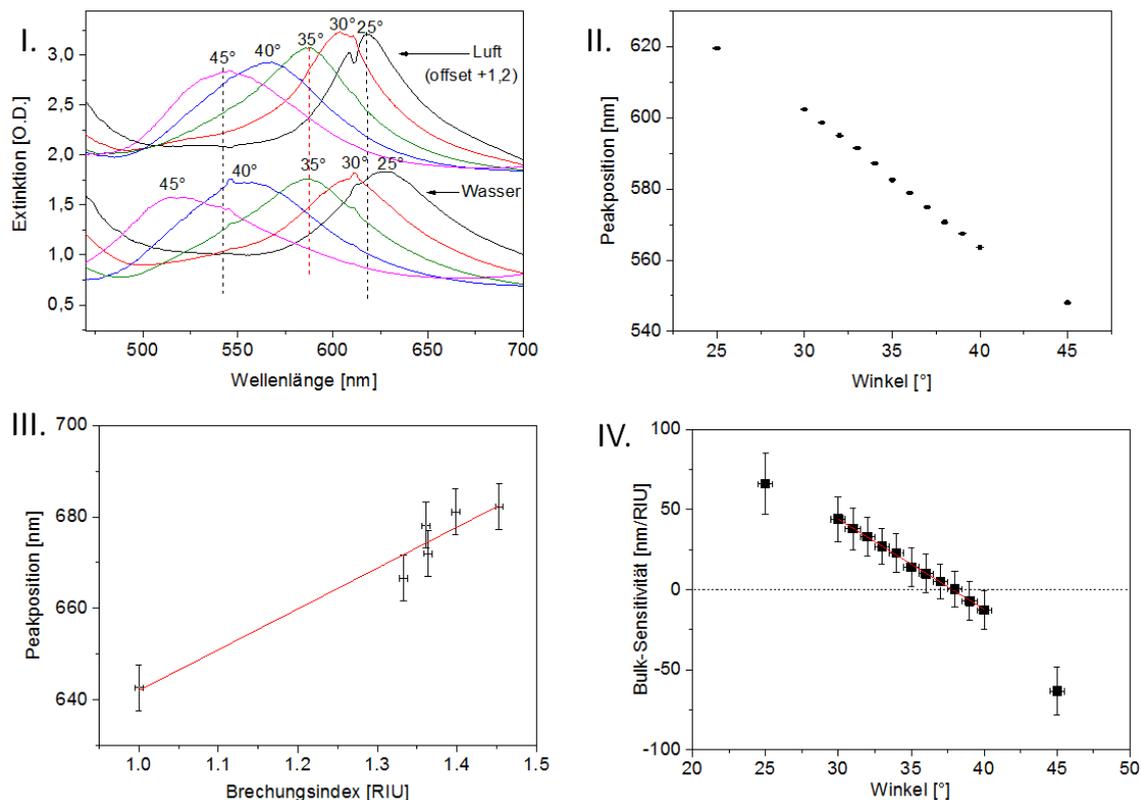


Abb. 79: I. Dargestellt ist die Winkelabhängigkeit des Extinktionsspektrums von nasschemisch metallisierten Polystyrol-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 570 nm im Medium Luft und Wasser. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Extinktionswerte in Luft ein konstanter Offset von 1,2 addiert. Bei 25° liegt das Extinktionsmaximum unter Wasser bei höheren Wellenlängen, bei 45° bei kleineren Wellenlängen als der entsprechende Peak im Medium Luft. Bei 35° liegen die Resonanzmaxima in den Medien Luft und Wasser (rote gepunktete Linie) bei der gleichen Wellenlänge. II. zeigt die lineare Änderung der Resonanzlage mit dem Winkel im Medium Luft. Eine lineare Anpassung der Messwerte ergibt eine Steigung von $-3,91 \pm 0,03 \text{ nm}^\circ$. In III. ist die Abhängigkeit der Peakposition vom Brechungsindex für einen Reflexionswinkel von 0° dargestellt. Die Steigung der Ausgleichsgeraden beträgt $89,34 \pm 10,89 \text{ nm/RIU}$. IV. zeigt die Abhängigkeit der Bulk-Sensitivität vom Winkel. Ist diese Null, so ist der Einfluss des Brechungsindex der Sensorumgebung auf die Resonanzlage vernachlässigbar.

Alle untersuchten Nanopartikelfilme zeigen einen magischen Winkel. (Tabelle 13). Der Winkel ist innerhalb des Fehlers unabhängig von der Metallisierungsmethode liegt für alle Partikeldurchmesser im Bereich von 30° bis 40°.

Tabelle 13: Magische Winkel für metallisierte Silika- und Polystyrol-Nanopartikel mit unterschiedlichem Durchmesser. Die Abkürzung PS steht für Polystyrol.

Material	Durchmesser $\pm 10\%$ -15% [nm]	Resonanzlage [nm]	Magischer Winkel [°]
Silika-NH ₂	540 nasschemisch	400 - 500 und 500 - 800	$36,8 \pm 0,1$
PS	570 nasschemisch	500 - 650	$37,8 \pm 1,4$
PS	570 besputtert	500 - 650	35 ± 3
PS	384 nasschemisch	500 - 700	$36,4 \pm 5,8$
PS	384 nasschemisch	300 - 400	$28,2 \pm 6,6$
PS	190 nasschemisch	300 - 400	$36,2 \pm 3,5$
PS	96 nasschemisch	400 - 800	$33,5 \pm 0,4$

4 Ergebnisse und Diskussion

Kontrollmessungen zeigen, dass unter den ermittelten Reflexionswinkeln kaum eine Verschiebung der Bandenposition in Abhängigkeit vom Brechungsindex der Volumenphase detektiert wird.

Gedankenexperiment zum magischen Winkel

Betrachtet man den Nanopartikelfilm vereinfachend als effektiven dielektrischen Film und vernachlässigt Mehrfachreflexionen, so ergibt sich der Extinktionspeak aus der Interferenz von zwei Teilstrahlen: Der erste Strahl wird auf der Filmoberfläche reflektiert, der zweite Strahl auf dem Substrat. Durch den Wegunterschied liegt eine Phasendifferenz vor. Die Phase ist abhängig vom Brechungsindex des Materials, der Filmdicke und dem Reflexionswinkel. Ist die Ableitung beider Phasen nach dem Brechungsindex gleich, so verschiebt sich die Resonanzlage nicht beim Wechsel des Brechungsindex der Volumen-Phase. Dieser Reflexionswinkel ist der sogenannte magische Winkel.^[256] Für eine bestimmte experimentell vorgegebene Kombination aus Partikeldurchmesser und Metallisierung konnte der magische Winkel für Kern-Schale-Nanopartikelfilme gefunden werden, der unabhängig von der Rauheit der Metallisierung ist. Es bleibt zu untersuchen, zu welchem Anteil Interferenz und plasmonische Anregungen zu diesem Effekt beitragen.

4.3.1.2 Metallisierung mit Silber

Mit Silber beschichtete Sensoren versprechen eine höhere Sensitivität. Hier wird die Volumen-Sensitivität unter Lichteinfall entlang der Probenormalen ermittelt. Eine Untersuchung der Peaks unter wässrigen Lösungen ergibt 2 Peaks. Die Position des breiten Peaks zwischen 350 – 600 nm ist unabhängig vom Brechungsindex der Flüssigkeit über der Sensoroberfläche. Der Peak zwischen 800 nm und 1000 nm weist eine Bulk-Sensitivität von 577 ± 16 nm/RIU auf. Dies entspricht etwa dem 5 fachen Wert, der für mit Gold nasschemisch metallisierten Oberflächen beobachtet wurde (Abb. 80).

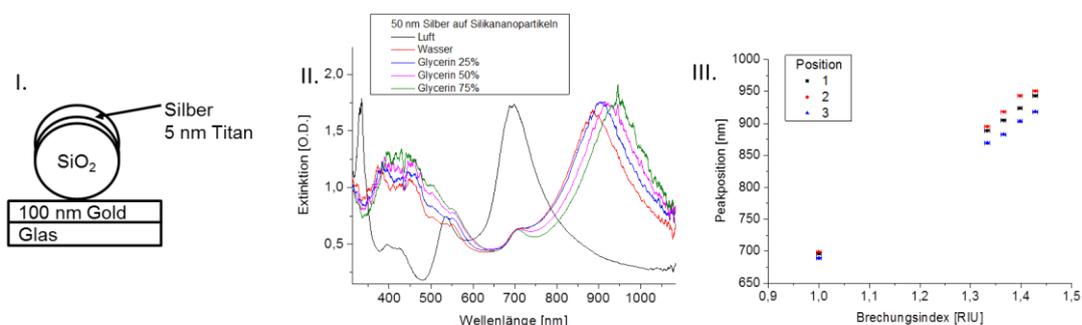


Abb. 80: I.: Querschnitt der Sensorgeometrie der Core-Shell-Nanopartikel II.: Extinktionsspektren der mit 50 nm Silber metallisierten Silika-Nanopartikel unter Flüssigkeiten mit unterschiedlichem Brechungsindex. Der Lichteinfall ist entlang der Probenormalen. III.: Peak Position als Funktion des Brechungsindex für den Peak bei langen Wellenlängen.

Stabilität

Verbleibt der Lichtstrahl für längere Zeit an der gleichen lateralen Position findet, wie bereits erwähnt, eine Oxidation statt. Diese ist erkennbar an der Farbveränderung der Oberfläche und der Verschiebung der Resonanzlage im Spektrum.

4.3 Abhängigkeit vom Brechungsindex der Volumenphase und Reflexionswinkel

Abschließende Bemerkung

Es wurde gezeigt, dass für Kern-Schale-Nanopartikelfilme unabhängig vom Verhältnis aus dielektrischem Kern und metallischer Hülle ein magischer Winkel gefunden wird. Erfolgt die Detektion unter diesem Reflexionswinkel, sind die Extinktionseigenschaften des Sensors weitgehend unabhängig von Brechungsindexänderungen der Volumenphase. Unter dem magischen Winkel können Adsorptionsprozesse *in situ* beobachtet werden. Eine Metallisierung der Oberflächen mit Silber verspricht eine höhere Sensitivität. Aufgrund von Stabilitätsproblemen ist die Oberfläche nicht zum Echtzeitnachweis von Adsorptionsprozessen geeignet.

4.3.2 Beitrag der lokalisierten Plasmonen zur Volumensensitivität

Über keinen magischen Winkel verfügen Goldnanopartikel in Lösung. Ihre hohe Sensitivität gegenüber Proteinadsorptionsprozessen ist deshalb zum Teil auf Änderungen des Brechungsindex der Volumen-Phase zurückzuführen. Zur Bestimmung des Beitrags der lokalisierten Plasmonen zur Volumen-Sensitivität werden Gold-Nanopartikel-Lösungen in Transmission untersucht.

Die Sensitivität der Lösungen gegenüber Brechungsindexänderungen in der Teilchenumgebung wird mit Glycerin-Wassergemischen in Abhängigkeit vom Teilchendurchmesser untersucht (Abb. 81, II.). Für eine feste monodisperse Teilchengröße ist der Zusammenhang zwischen Peakposition und Brechungsindex linear (Abb. 81, I.). Goldnanopartikel mit einer Größe von 32 ± 3 nm zeigten eine Sensitivität von $75,85 \pm 4,75$ nm/RIU gegenüber Brechungsindex-Änderungen. Dies liegt im Bereich der Sensitivität, die für die Kern-Schale-Nanopartikelfilme mit dielektrischem Polystyrol-Kern und nasschemisch metallisierter Goldhülle beobachtet wurde.

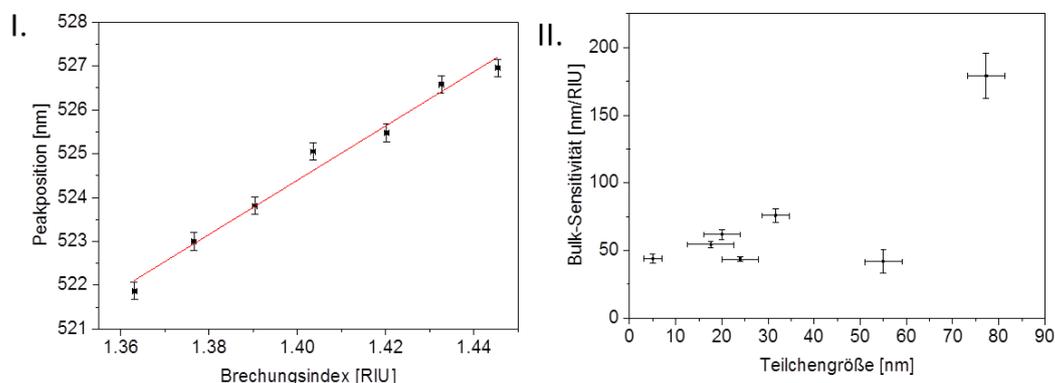


Abb. 81: I.: Änderung der Resonanzwellenlänge einer festen Teilchengröße, hier 20 ± 4 nm, vom Brechungsindex II.: „Bulk“-Sensitivität von Goldnanopartikeln mit unterschiedlichem Durchmesser gemessen in Transmission.

Abschließende Bemerkung

Es wurde gezeigt, dass die Volumensensitivitäten von Goldnanopartikeln gemessen in Transmission und von Kern-Schale-Nanopartikeln gemessen in Reflexion unter Lichteinfall entlang der Probenormalen in der gleichen Größenordnung liegen. Die Verschiebung des Extinktionspeaks durch Brechungsindexänderungen in der Goldnanopartikelumgebung basiert auf Partikelplasmonen (Formel 14).

4.3.3 Separierte Partikel

Offen blieb bisher die Frage, inwiefern die Existenz dielektrischer Kontaktpunkte und Interferenzen die Volumen-Sensitivität und den magischen Winkel beeinflussen. Zur Klärung der Fragestellung werden Oberflächen mit separiert angeordneten Nanopartikeln bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber Brechungsindexänderungen der Volumenphase untersucht (Abb. 82). Dabei wurde über je drei Probenpositionen pro Medium gemittelt und die mittlere Peakposition als Funktion der Brechungsindex aufgetragen. Für einen festen Reflexionswinkel ist der Zusammenhang zwischen Peakposition und Brechungsindex für alle betrachteten Partikelabstände linear. Die hieraus bestimmte Sensitivität wurde als Funktion des Reflexionswinkels dargestellt (Abb. 82, rechts). Zwischen der Bulk-Sensitivität und dem Reflexionswinkel wird keine lineare Abhängigkeit festgestellt. Dennoch wird experimentell für die Strukturen mit 0,25 min ($40^\circ \pm 4^\circ$) und 0,50 min ($36^\circ \pm 4^\circ$) Ätzzzeit ein magischer Winkel gefunden. Durch die geringe Sensitivität von etwa 20 nm/RIU, die für kleinere Winkel als 35° auftritt, ist die Probe über einen großen Winkelbereich zum Einsatz für *in situ* Messungen geeignet.

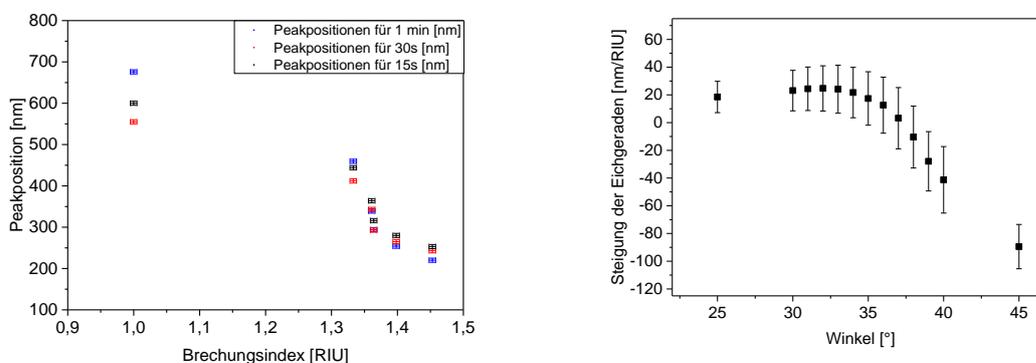


Abb. 82: Links: Abhängigkeit der Peakposition von Brechungsindexänderungen in der Umgebung der Polystyrol-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 570 nm nach 0,25 min, 0,5 min und 1 min reaktivem Ionenplasmaätzen nach nasschemischen Metallisierung. Der Lichteinfall erfolgt entlang der Probennormalen. **Rechts:** Winkelabhängigkeit der Sensitivität gegenüber Brechungsindexänderungen in der Umgebung der Polystyrol-Nanopartikel (570 nm Durchmesser) nach 0,5 min reaktivem Ionenplasmaätzen und nasschemischer Metallisierung mit Luft.

Abschließende Bemerkung

Die Existenz eines magischen Winkels für separierte kugelförmige Nanopartikel wurde gezeigt. Der Winkel liegt, wie für dicht gepackte Filme, zwischen 30° und 40° . Die dielektrischen Kontaktpunkte sind daher kein notwendiges Kriterium für einen Sensor, der zum *in situ* Nachweis von Bindungsprozessen eingesetzt werden soll. Eine wichtige Größe für die Winkelabhängigkeit der Bulk-Sensitivität könnte daher die Interferenz sein.

4.3.4 Planare dielektrische Filme

4.3.4.1 Ohne Metallisierung

Die Extinktionsspektren eines PMMA-Films der Dicke 600 nm ohne Metallisierung werden an Luft und unter Flüssigkeiten mit unterschiedlichem Brechungsindex gemessen (Abb. 83). Nichtmetallisierte PMMA-Filme zeigen keine Sensitivität bezüglich Brechungsindexänderungen der Flüssig-

4.3 Abhängigkeit vom Brechungsindex der Volumenphase und Reflexionswinkel

keit über der Sensoroberfläche unter Lichteinfall parallel zur Probennormalen. Der magische Winkel liegt somit unter dem Reflexionswinkel von 0° gemessen zur Probennormalen vor. Dies stimmt mit theoretischen Berechnungen zum Reflexionsverhalten der dünnen Filme überein. Die Berechnungen mit dem kommerziellen Softwarepaket SCOUT^[257] (Abb. 83, rechts) erfolgten zusammen mit T. Glaser (KIP). Zusätzlich bestätigt die Berechnung die experimentell beobachtete Abnahme der Intensität mit steigendem Brechungsindex der Volumenphase.

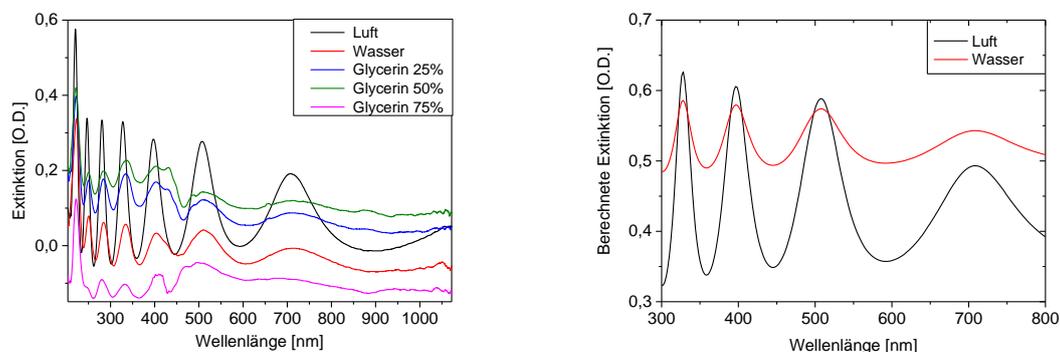


Abb. 83: Brechungsindexabhängigkeit der gemessenen (**links**) und Berechnung Extinktionsspektren eines nicht metallisierten PMMA-Films der Dicke 600 nm auf mit Gold bedampftem Silizium-Wafer unter Lichteinfall entlang der Probennormalen (**rechts**). Es wurde das Programm Scout zusammen mit Dr. T. Glaser (KIP, Universität Heidelberg) verwendet.

4.3.4.2 Mit Metallisierung

Es ist interessant, ob sich der magische Winkel infolge der Metallisierung ändert. Analog zu Untersuchungen von Kern-Schale-Nanopartikeln wird die Abhängigkeit der Peakposition vom Brechungsindex der Flüssigkeit über dem Sensor ermittelt. Es wird ein linearer Zusammenhang zwischen Peakposition und Brechungsindex (Abb. 84) beobachtet. Die Steigung Null wird nicht erreicht. Ein magischer Winkel wird somit nicht beobachtet.

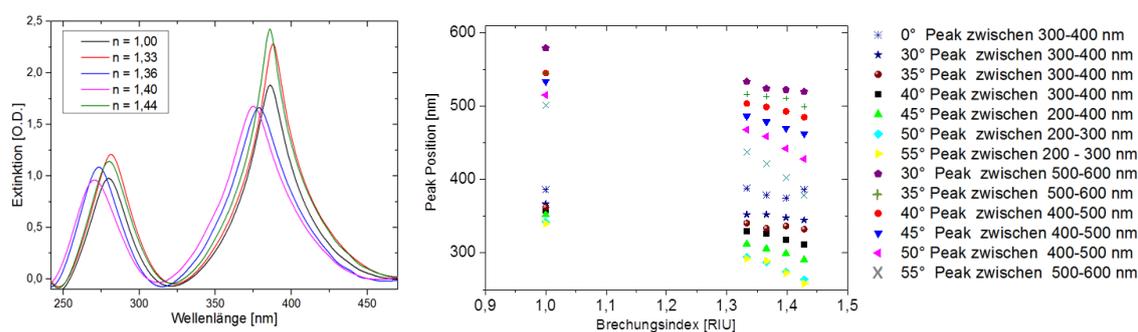


Abb. 84: **Links:** Extinktionsspektren eines nasschemisch metallisierten PMMA-Films der Dicke 300 nm auf mit Gold bedampftem Silizium-Wafer unter Lichteinfall parallel zur der Probennormalen **Rechts:** Abhängigkeit der Peakposition vom Brechungsindex für Reflexionswinkel von 0° - 55° . Die Abhängigkeit wurde für den Peak zwischen 300 nm und 400 nm sowie den Peak zwischen 500 nm und 600 nm dargestellt. Die Messwerte liegen auf einer Geraden. Die Steigung der Ausgleichsgeraden gibt die Sensitivität bezüglich der Volumenphase an.

4 Ergebnisse und Diskussion

Es ist interessant, dass die Bulksensitivität linear vom Reflexionswinkel abhängt (Abb. 85). Dies wurde bereits für Kern-Schale-Nanopartikelfilme beobachtet. Die Winkelabhängigkeit der Bulk-Sensitivität könnte daher ein Interferenzeffekt sein. Für Untersuchungen unter einem Lichteinfall entlang der Probennormalen ist die Bulk-Sensitivität klein, aber nicht null (ohne Abb.).

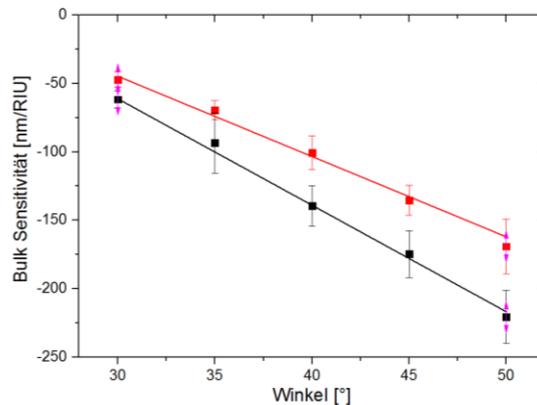


Abb. 85: Volumen-Sensitivität des mittleren Peaks von nasschemisch metallisierten PMMA-Filmen der Dicke 300 nm (rot) und 600 nm (schwarz) auf mit Gold bedampftem Silizium-Wafer in Abhängigkeit vom Reflexionswinkel. Die Steigung beträgt $-5,87 \pm 0,35$ nm für den 300 nm dicken Film und $-7,78 \pm 0,19$ nm im Fall des 600 nm dicken Filmes.

Abschließende Bemerkung

Für nicht metallisierte Filme liegt ein magischer Winkel unter Lichteinfall entlang der Probennormalen vor. Dies stimmt mit theoretischen Berechnungen überein. Nicht metallisierte Filme sind daher zur *in situ* Detektion geeignet. Aufgrund der schärferen Peaks, insbesondere unter Flüssigkeit, werden allerdings Kern-Schale-Nanopartikelfilme bevorzugt. Die Untersuchung metallisierter Filme zeigte, dass die Metallisierung für die Existenz des magischen Winkels entscheidend sein kann.

4.3 Abhängigkeit vom Brechungsindex der Volumenphase und Reflexionswinkel

4.3.5 *In situ* Detektion in Echtzeit

Die *in situ* Detektion der Proteinadsorption in Echtzeit setzt eine hohe Sensitivität unter Flüssigkeit voraus. Hierzu wurden Messungen der Extinktionsspektren vor und nach der Proteinadsorption im Medium PBS durchgeführt. Die Sensitivität unter Flüssigkeit ist für Kernschale-Nanopartikelfilme geringer als im Medium Luft (Abb. 86, rechts).

Polystyrol-Nanopartikel

Für Polystyrol-Partikel mit einem Durchmesser von 190 nm ist die Verschiebung im Medium Luft unter Lichteinfall parallel zur Probenormalen mit 10 nm am größten und erreicht für größere Winkel nur die halbe Verschiebung. Eine Vergrößerung des Partikeldurchmessers um den Faktor 3 erhöht die Sensitivität unter Winkeln größer 0° um den Faktor 6. Der Vergleich erfolgte je für den vorletzten Peak im Spektrum. Partikel mit einem Durchmesser von 570 nm sind somit zu bevorzugen.

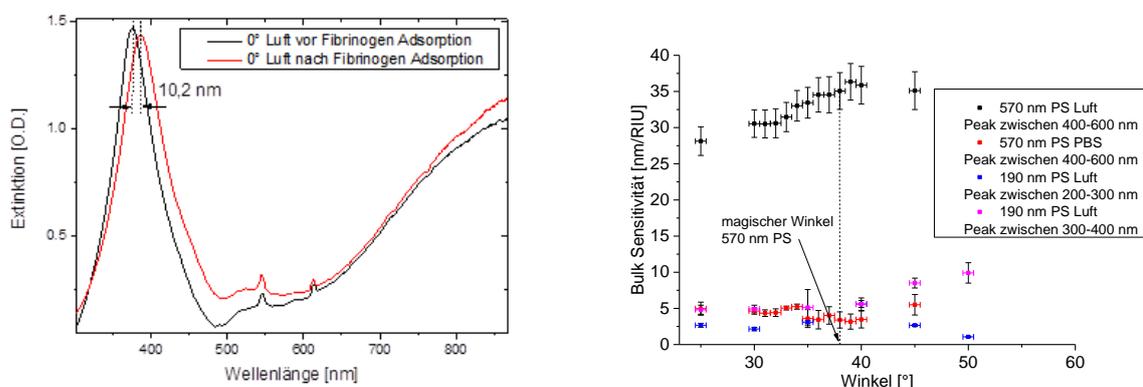


Abb. 86: Links: Extinktionsspektren für Polystyrol-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 190 nm vor und nach der Adsorption von Fibrinogen. Die Messung erfolgte unter einem Reflexionswinkel von 0° an Luft. **Rechts:** Winkelabhängigkeit der Verschiebung in Luft und PBS-Puffer gemittelt aus 2 Proben und je 3 Probenpositionen. Für Polystyrol-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 570 nm wird die Verschiebung des Peaks im Wellenlängenbereich von 400 - 600 nm in Luft und PBS dargestellt. Für Polystyrol-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 190 nm wird die Verschiebung des Peaks zwischen 200-300 nm und 300 - 400 nm im Medium Luft dargestellt. Die Nanopartikel sind nasschemisch metallisiert. Das Glas-Substrat ist mit 5 nm Titan und 100 nm Gold bedampft.

Silika-Nanopartikel

Für Silika-Nanopartikel ist die Sensitivität unter Flüssigkeit bis zu einem Faktor 2 besser als für Polystyrol-Nanopartikel vergleichbarer Größe (Abb. 87). Dies gilt nicht für alle Reflexionswinkel. Unter dem magischen Winkel ist die Sensitivität gleich.

Die Änderung der Resonanzposition infolge des Adsorptionsprozesses ist unter Flüssigkeit auf ein Drittel des Wertes an Luft reduziert. Die maximale Verschiebung wird für einen Reflexionswinkel von 38° erreicht. Es handelt sich dabei nicht um den magischen Winkel.

Der *in situ* Nachweis von Bindungskinetiken erfolgt unter dem magischen Winkel. Nur die Änderungen des Brechungsindex auf der Probenoberfläche, die durch die Adsorption von z.B. Fibrinogen bewirkt werden, tragen zum Signal bei. Dies ermöglicht eine Messung unabhängig vom Brechungsindex der Volumen-Phase. Die Verschiebung beträgt 5 nm (Abb. 87, rechts).

4 Ergebnisse und Diskussion

Der zweite wichtige Punkt dabei ist, dass sich der magische Winkel nicht durch den Adsorptionsprozess verschiebt. Dies wurde anhand einer Messung der Extinktionsspektren unter Flüssigkeiten mit unterschiedlichem Brechungsindex nach der Proteinadsorption bestätigt.

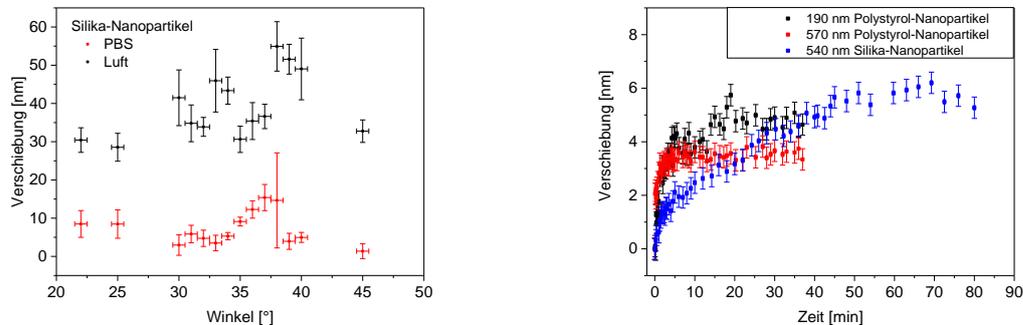


Abb. 87: Links: Winkelabhängigkeit der Verschiebung in Luft (schwarz) und PBS (rot) infolge der Fibrinogenadsorption auf nasschemisch metallisierten SiO₂-Nanopartikelfilmen (Durchmesser = 540 nm) auf 100 nm Gold gemittelt aus je 5 verschiedenen lateralen Probenpositionen für jeden Winkel. Die maximale Verschiebung wurde bei 38° detektiert. **Rechts:** Kinetik der Fibrinogen-Adsorption auf nasschemisch metallisierten Nanopartikelfilmen aus Polystyrol (schwarze Kurve entspricht dem Durchmesser 190 nm, rote Kurve 570 nm) und aus Silika (blaue Kurve 540 nm,). Als Substrat wurde Glas, das mit 100 nm Gold bedampft war, eingesetzt. Die Detektion erfolgte unter dem magischen Winkel.

Abschließende Bemerkung

Ein bedeutender Vorteil, den Kern-Schale-Nanopartikelfilme gegenüber herkömmlichen SPR-Methoden bieten, ist die Existenz des magischen Winkels. Daher können Bindungsereignisse nicht nur markierungsfrei und in Echtzeit verfolgt werden sondern vor allem *in situ*. Dies ist von Interesse für viele wissenschaftliche Bereiche, insbesondere trägt es zum Verständnis biologischer Bindungsprozesse bei. Die Kombination der Kern-Schale-Nanopartikel mit einer geeigneten Funktionalisierung, z.B. durch hochdichte Peptidarrays, ermöglicht eine hochgradig parallelisierte Analytik auf kleinem Raum (Kap. 4.6).

4.4 Sensitivitätssteigerung

Da die Sensitivität unter dem magischen Winkel sehr gering ist, erfolgt in diesem Kapitel eine Optimierung der Sensorempfindlichkeit. Hierzu werden zwei Ansätze betrachtet: die zusätzliche Beschichtung der Nanopartikelfilme mit metall-organischen Gerüststrukturen und die Sensitivitätssteigerung durch Feldeffekte. Hierzu werden Nanopartikelfilme auf Gitterstrukturen abgetrennt.

4.4.1 Sensitivitätssteigerung durch SURMOF-Beschichtung

Niedrigere Nachweisgrenzen in der Bioanalytik können durch gezielte Oberflächenvergrößerung erreicht werden. Hierzu wird das Konzept verwendet, dreidimensionale poröse Gitterstrukturen auf Sensoroberflächen aufzubringen, die größere Analytmengen binden. In Anbetracht der typischen Größe von Biomolekülen sollte hier das Augenmerk auf SURMOFs mit großer Maschenweite liegen. Zuerst werden die optischen Eigenschaften von Nanopartikelfilmen untersucht, die mit dem SURMOF HKUST-1 beschichtet sind (Abb. 88). Dabei handelt es sich um eine poröse metallorganische Gerüststruktur mit anorganischen Knotenpunkten aus Kupfer-Ionen, die über organische Linker-Moleküle verknüpft sind.^[229] Die Poren in der Gerüststruktur entstehen durch einen Selbstassemblierungs-Prozess. Dabei kann die Bindung zwischen dem Metallion und dem Linker reversibel geöffnet und geschlossen werden. Die Kupfer-Ionen stellen ihren Abstand quasi aus eigenem Antrieb ein.^[258] Die kristalline Struktur ist die thermodynamisch stabilste.

Als Beispiel für einen Diffusionsprozess wird die Diffusion von Pyridinmolekülen in die Poren des SURMOFs beobachtet. Die Diffusion von Biomolekülen in die Poren erfordert eine höhere Stabilität unter Flüssigkeiten. Durch die starken Wechselwirkungskräfte (eine Kombination aus Wasserstoffbrücken-Bindungen, van-der-Waals-Wechselwirkungen und elektrostatischen Wechselwirkungen mit den Linker-Molekülen, sowie Coulomb-Kräften mit den Kupfer-Ionen) kann die Gerüststruktur zerstört werden. Derzeit wird am KIT an einer Verbesserung der Stabilität des Gerüstsystems gearbeitet. Die Proben werden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. H. Gliemann (KIT, IFG, Leitung Prof. Dr. Christof Wöll) gefertigt und ermöglichen eine gezielte Oberflächenvergrößerung mithilfe von porösen Gerüststrukturen.

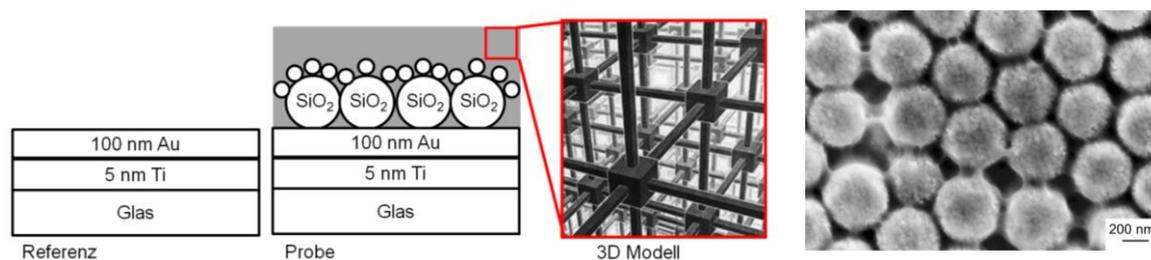


Abb. 88: Links: Schematische Darstellung der Referenz, Probe und dem dreidimensionalen Modell aus kubisch angeordneten Würfeln (3D Darstellung nach ^[259]) **Rechts:** REM-Aufnahme der mit SURMOFs beschichteten Kern-Schale Nanopartikeloberfläche.

Es werden SURMOF-Beschichtungen mit unterschiedlichen Schichtdicken und mit einer Porengröße von ca. 4 nm verwendet. Die SURMOF-Dicke wird zwischen nicht geschlossenen Filmen von wenigen Nanometern bis zu defektfreien Filmen von 300 nm variiert. Unter Defekt versteht man hier Risse, die sich von der Film-Oberfläche zum Goldsubstrat erstrecken und mit Voltametrie-Messungen festgestellt werden können.

4.4.1.1 Extinktionseigenschaften der Nanopartikelfilme mit SURMOF-Beschichtung

Die Sensoroberflächen zeigen mehrere Peaks im Extinktionsspektrum, deren Resonanzlage variiert. Es ist keine systematische Abhängigkeit der Peakposition von der Schichtdicke der SURMOF-Bedeckung festzustellen (Abb. 89). Für einen Nanopartikelfilm mit der Dicken-Angabe 300 nm, entsprechend 60 Zyklen, wird das schärfste Signal beobachtet. Die Extinktion weist einen scharfen Peak bei 550 nm mit einer Halbwertsbreite von 52 ± 1 nm und einer Intensität von $1,14 \pm 0,44$ O.D. auf. Dies entspricht den typischen Werten für nicht beschichtete Nanopartikelfilme. Es fällt auf, dass Proben mit einer Bedeckung von 200 nm die geringste optische Dichte haben. Zusätzlich würde man mit steigender Schichtdicke eine zunehmende Rotverschiebung erwarten. Dies wird jedoch nicht beobachtet. Der Grund hierfür ist unklar.

Die Dicke der Schicht ist ein Erfahrungswert (KIT), da der Zuwachs an Schichtdicke pro Anzahl an Schichten bekannt ist. Es wäre möglich, dass die Schichtdicke auf den Nanopartikelfilmen mit einem größeren Fehler verbunden ist, da keine planare Oberfläche vorliegt. Einen Hinweis darauf kann die Reproduzierbarkeit der Peakposition im Extinktionsspektrum liefern. Die Reproduzierbarkeit nimmt mit wachsender Filmdicke ab (Abb. 89, rechts).

Dies ist vermutlich auf die uneinheitliche Filmdicke zurückzuführen. Röntgenbeugungs-Experimente am KIT zeigen, dass die Schichten polykristalline Bereiche aufweisen. Möglicherweise kann sich der SAM, der zur Funktionalisierung der Oberfläche benötigt wird, nicht optimal ausbilden, weil der dielektrische Nanopartikelfilm nicht vollständig mit Goldnanopartikeln bedeckt ist, sondern Lücken aufweist. Der anschließende Wachstumsprozess der Gerüststruktur erfolgt nicht kristallin. Ein kristalliner Wachstumsprozess erfolgt bevorzugt auf (111)-Goldoberflächen. Die Charakterisierung der nasschemisch hergestellten Metallisierung würde z.B. ein Transmissions-elektronenmikroskop erfordern.

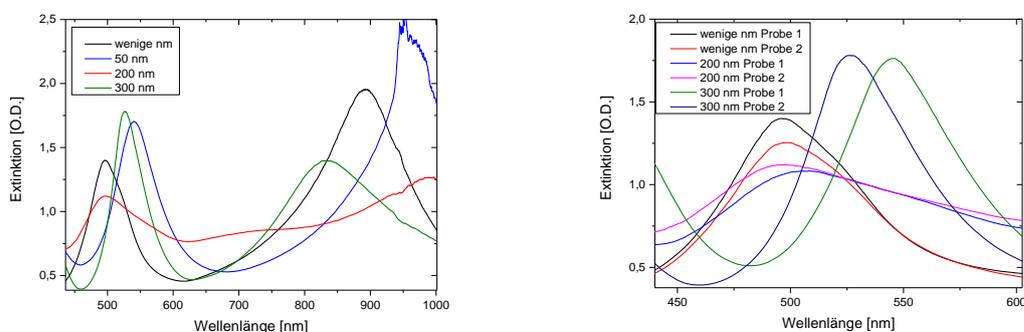


Abb. 89: Links: Extinktionsspektren der mit unterschiedlich dicken HKUST-1 beschichteten Nanopartikelfilme. Rechts: Vergleich der Reproduzierbarkeit der Extinktionsspektren der Nanopartikelfilme, nach einer Beschichtung mit unterschiedlich dicken HKUST-1 Gerüststrukturen.

4.4.1.2 Beobachtung von Diffusionsprozessen in der Gasphase

Im Folgenden wird die Sensitivität der Oberflächen gegenüber Diffusionsprozessen getestet.

Probe ohne SURMOF

Zuerst erfolgt eine Untersuchung von nicht beschichteten Nanopartikelfilmen (Abb. 90, II.) bei unterschiedlich langem Kontakt mit dem Pyridin-Dampf bei einer Temperatur von 35°C (Abb. 91, links). Die Resonanzlage bleibt unverändert.

4.4 Sensitivitätssteigerung

Probe mit SURMOF

Für Proben, die über eine Beschichtung mit Gerüststrukturen verfügen (Abb. 90, III.), beobachtet man nur für 0°C keine Verschiebung, da die Pyridinkonzentration in der Gasphase zu gering ist (Abb. 91, rechts).

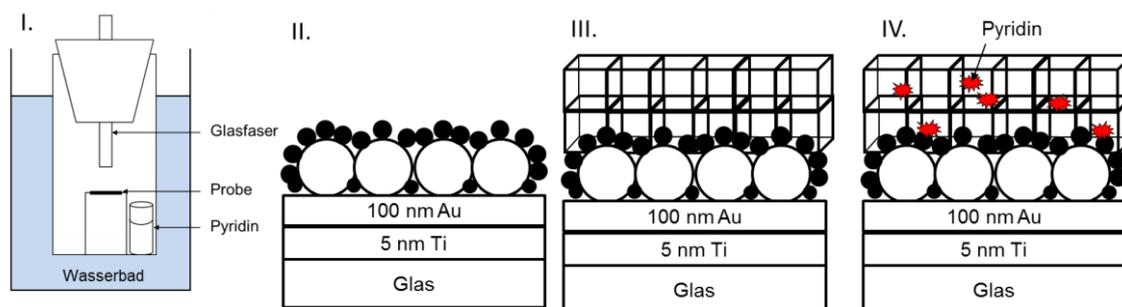


Abb. 90: Schematische Darstellung I. des Versuchsaufbaus, II. der Probe ohne SURMOF-Beschichtung, III. der Probe mit SURMOF-Beschichtung, IV. der Pyridin-Moleküle in den Poren.

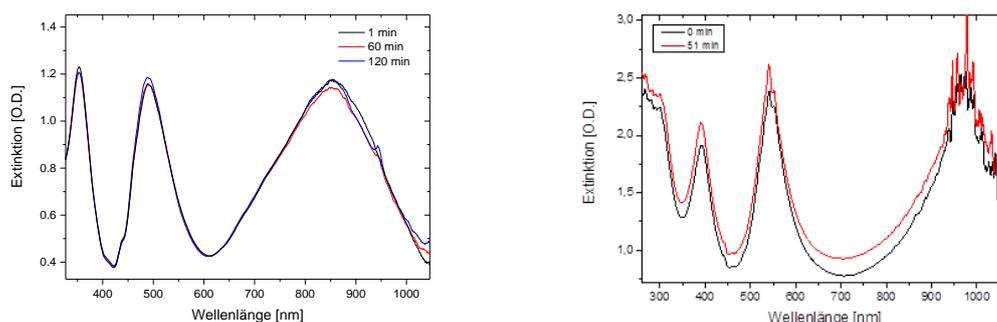


Abb. 91: Links: Extinktionsspektren des Sensors ohne SURMOF-Beschichtung bei Reaktionszeiten von 1 min, 60 min und 120 min mit Pyridindampf bei 35°C. **Rechts:** Extinktionsspektren des Sensors mit 50 nm HKUST-1-Beschichtung bei Messung im Eisbad. Die dargestellten Messzeiten sind 0 min und 51 min. Die Resonanzlagen sind unverändert.

Nun wird die Temperatur erhöht und die Extinktionsspektren der Sensoroberflächen mit einer Beschichtungsdicke von 50 nm untersucht. Befindet sich das Pyridin-Reservoir bei 35°C, wird in den Extinktionsspektren eine deutliche Resonanzverschiebung beobachtet. Die Extinktionsspektren werden alle 5 s gespeichert und die Peakpositionänderung als Funktion der Zeit aufgetragen (Abb. 92). Die Kinetik des Eindiffundierens kann so verfolgt werden, ebenso wie die Diffusion aus den Poren nach Entfernen des Pyridin-Reservoirs. Die Verschiebung der Resonanzlage nach einer Reaktionszeit von zwei Stunden beträgt 35 nm. Die Peak-Intensität nimmt deutlich ab und der Peak verbreitert sich gleichzeitig. Dies ist beim Entfernen des Pyridin-Reservoirs reversibel (Abb. 92, rechts). Unter Annahme eines Reaktionsverlaufs nach dem Langmuir-Modell kann bei einer Messung über Nacht bei 35°C eine Verschiebung von 63 nm erwartet werden (Abb. 92). Die Änderung der Resonanzlage bei 35°C beträgt nach 60 Stunden 63 nm (Abb. 93, II.) für den Peak bei 500 nm.

4 Ergebnisse und Diskussion

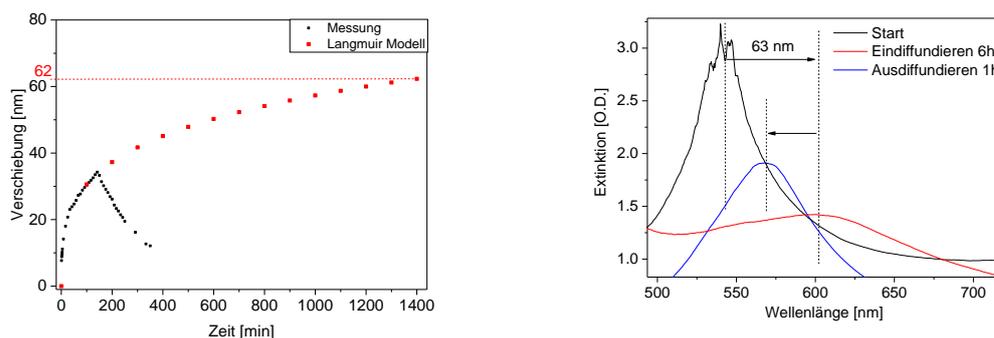


Abb. 92: Links: Messung der Diffusion (**schwarze Kurve**) und Anpassung mit Langmuir-Modell (**rote Kurve**). Bei einer Messung über Nacht bei 35 °C erwartet man infolge der Berechnung eine Verschiebung von 62 nm. Bei der Messung wurde nach 150 min das Pyridin-Reservoir entfernt und die Diffusion des Pyridins aus den Poren beobachtet. Rechts: Extinktionsspektren vor dem Kontakt mit Pyridin (**schwarze Kurve**), nach sechs Stunden Eindiffundieren bei einer Konzentration von 1,82 mol/m³ (**rote Kurve**) und nach einer Stunde Ausdiffundieren (**blaue Kurve**).

Abschätzung der erwarteten Verschiebung

Alternativ lässt sich die zu erwartende Verschiebung aus der Massendichte und Sensitivität abschätzen. Jede Pore der Gerüststruktur des HKUST-1-SURMOFs kann mit ca. 10 Pyridin-Molekülen besetzt werden. Mit Schwingquarzmikrowägung wird eine Massendichte von 0,2 µg/cm² in einer 20 nm dicken SURMOF-Schicht bestimmt.^[260] Die Sensitivität^[9] des Kern-Schale-Nanopartikelsensors beträgt 0,25 nm/ng*cm². Die abgeschätzte Verschiebung beträgt 50 nm. Es ist zu erwarten, dass die gebundene Massendichte mit der Dicke der Gerüststruktur zunimmt, da eine größere Oberfläche zur Verfügung steht.

Variation der SURMOF-Dicke

Alle hergestellten Sensoren mit SURMOF-Beschichtung können Diffusionsprozesse in der Gasphase nachweisen. Die Verschiebung ist abhängig von der SURMOF-Schichtdicke (Abb. 93). Die Proben werden zwecks eines direkten Vergleichs gleichzeitig im gleichen Gefäß inkubiert. Für einen HKUST-1-Film mit einer Dicke von wenigen Nanometern (Abb. 93, I.) ist die Verschiebung des Peaks bei 500 nm nur ein Drittel so groß wie für den 50 nm dicken SURMOF-Film. Vervierfacht sich die Filmdicke auf 200 nm, nimmt die Sensitivität um 10 nm zu. Für einen 300 nm dicken Film reduziert sich die Verschiebung auf die Hälfte. Die Sensitivität des Peaks bei 500 nm ist für die 200 nm dicke HKUST-1-Struktur am größten.

Abschließende Bemerkung

Drei Aspekte sind für die Sensitivität entscheidend, die mögliche Adsorption auf der Oberfläche, die Diffusion von Pyridin-Molekülen aus der Gasphase in die Poren und die Abklinglänge des plasmonischen Signals. Damit lassen sich die beobachteten Sensitivitäten erklären. Ein großer Unsicherheitsfaktor bleibt jedoch die tatsächliche Filmdicke und die adsorbierte Menge. Als optimal erweisen sich Sensoren mit wenigen Nanometern Beschichtung, da sie preisgünstig in der Herstellung sind, gleichzeitig scharfe Peaks aufweisen und die am besten reproduzierbaren Peakpositionen haben. Strukturen mit 50 nm zeigen zwar die dreifache Verschiebung, sind aber durch die Verbreiterung des Peaks und die Reduktion der Peakintensität unpraktisch. Die Sensitivität des Kern-Schale-Nanopartikelfilms konnte durch die Beschichtung mit Gerüststrukturen verbessert werden.

4.4 Sensitivitätssteigerung

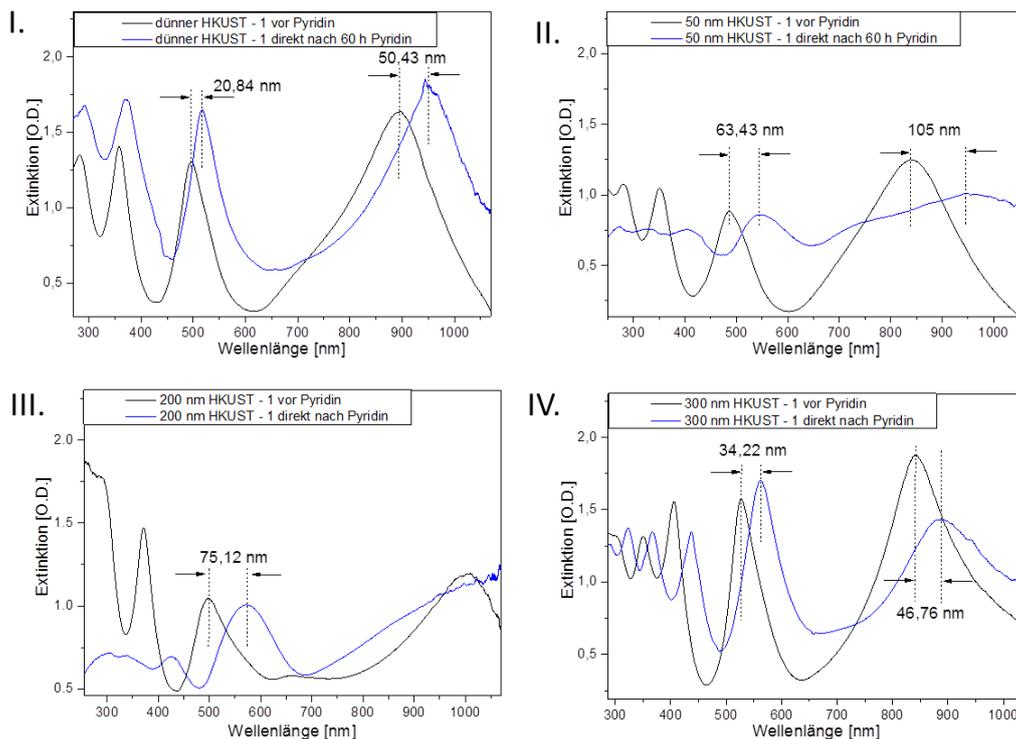


Abb. 93: Verschiebung der Peaks im Extinktionsspektrum von Nanopartikelfilmen, die mit unterschiedlich dicken HKUST-1-SURMOFs beschichtet sind. Die Dicke der Gerüststruktur beträgt im Fall von I. wenige Nanometer, II. 50 nm (zweite Messung), III. 200 nm und IV. 300 nm. Die Inkubationszeit beträgt jeweils 60 Stunden.

4.4.1.3 Einsatz mit Gerüststrukturen beschichteter Sensoren unter Flüssigkeit

Von besonderem Interesse für biosensorische Anwendungen, z.B. in Hinblick auf die Untersuchung gezielter Wirkstofffreisetzung, sind Gerüststrukturen, die im Einsatz unter Flüssigkeiten stabil sind. Dahingehend werden zwei Proben untersucht, zum einen der HKUST-SURMOF mit einer Filmdicke von 50 nm zum anderen SURGELe.^[87] Bei letzteren handelt es sich um Gerüststrukturen, bei denen die metallischen Ionen durch vernetzte organische Linker ersetzt werden.

Mit HKUST-1 beschichtete Nanopartikelfilme

Beim Einsatz der mit HKUST-1 beschichteten Nanopartikelfilmen unter Wasser wird eine Verschiebung der Resonanzlagen ins Blaue beobachtet (Abb. 94, I. und II.), die sich nach 30 min stabilisiert. Die Gesamtverschiebung unter Wasser beträgt -17 nm. Dies deutet auf einen Verlust an Material hin. Die Verschiebung infolge des Materialverlustes ist dabei dreimal so groß, wie die Resonanzlagenänderung ins Rote, die infolge der Fibrinogenadsorption auf dem nicht beschichteten Nanopartikelfilm auftritt. Die Instabilität kann auf die ionischen Bindungskräfte im SURMOF zurückgeführt werden. Der Prozess könnte analog zur Lösung von Kochsalz in Wasser unter Bildung einer Hydrathülle um die Kupfer-Ionen erfolgen.

Mit einem SURGEL-Film beschichtete Nanopartikelfilme

Eine neuere Entwicklung am KIT sind deshalb SURGELe. Allerdings wird auch für Oberflächen, die mit einem SURGEL-Film beschichtet sind, beim Kontakt mit Wasser eine Verschiebung zu kleineren Wellenlängen beobachtet (Abb. 94, III. und IV.). Im Fall der SURGEL Schicht verläuft

4 Ergebnisse und Diskussion

die Verschiebung der Peakposition langsamer als bei der HKUST-1 Struktur. Bei einer Kontaktzeit von drei Stunden wird eine Verschiebung unter Wasser von 17 nm, aber keine Sättigung, erreicht. Dieser Effekt kann mehrere Gründe haben: zum einen füllen sich die Poren mit Wasser, wodurch sich der effektive Brechungsindex in der Umgebung der Sensoroberfläche ändert. Der effektive Brechungsindex setzt sich aus dem Brechungsindex organischer Materialien, i.d.R. 1,38 RIU, und Wasser zusammen. Dabei könnte der Film quellen. Dies hätte eine Verschiebung ins Blaue zur Folge. Gleichzeitig könnte der bereits oben erwähnte Verlust an Massendichte eine Blauverschiebung bewirken. Ein Vergleich der Extinktionsspektren vor dem Eintauchen in Wasser und nach dem Trocknen der Probe (Abb. 95) zeigt eine Verschiebung von -9 nm. Dies entspricht einem Verlust an Filmdicke von 34 ± 2 nm. Bei einer Layer-Länge und damit Porengröße von 4 nm handelt es sich um 8 Schichten. Die Instabilität ist vermutlich auf die fehlende kristalline Ordnung und chemische Heterogenität der nasschemisch hergestellten Goldhülle zurückzuführen.

Bei Messungen auf planaren Oberflächen treten keine Stabilitätsprobleme auf.^[87]

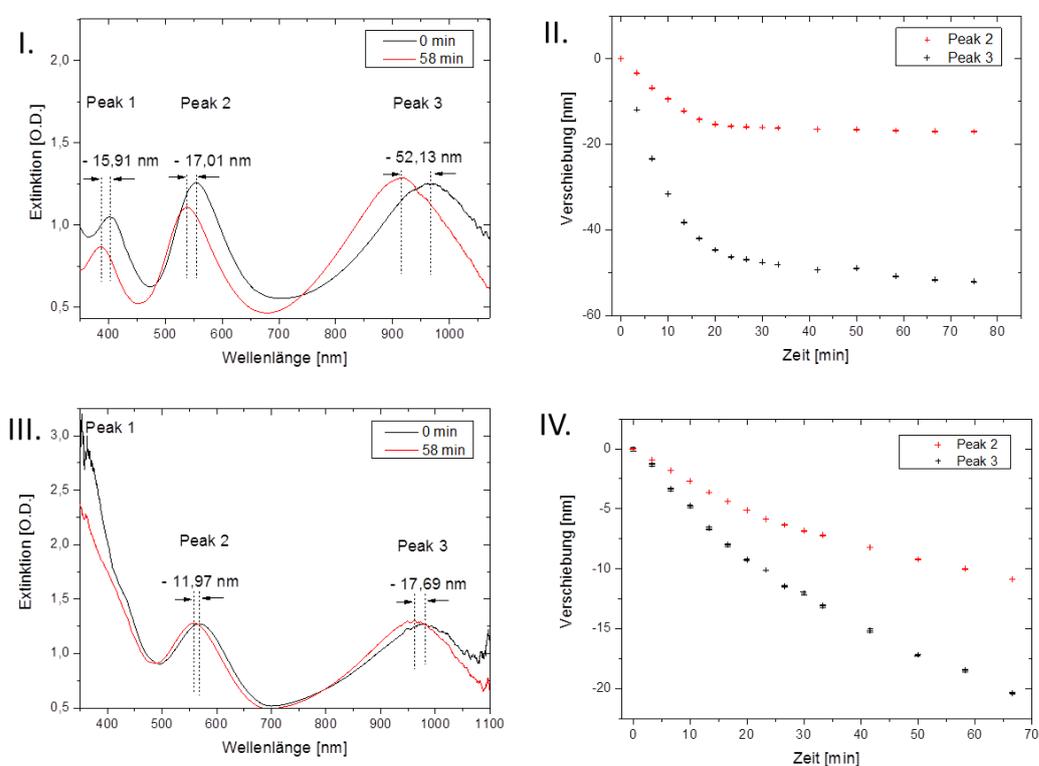


Abb. 94: Verschiebung der Peaks im Extinktionsspektren von Nanopartikelfilmen, die mit 50 nm dicken HKUST-1-Gerüststruktur (**I. und II.**) und einem SURGEL-Film (**III. und IV.**) beschichtet sind, bei Messung unter Flüssigkeit. **I. und III.** ist der Vergleich zu Beginn der Messung und nach einer Eintauchzeit von 58 min, in **II. und IV.** ist die Verschiebung der Peakmaxima als Funktion der Zeit dargestellt. Die Messung erfolgt unter einem Reflexionswinkel von 0° . Nach 30 min wird für die Probe mit SURMOF-Beschichtung ein konstanter Wert erreicht.

4.4 Sensitivitätssteigerung

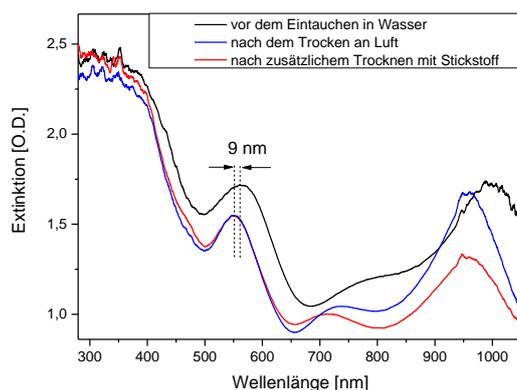


Abb. 95: Extinktionsspektren von Nanopartikelfilmen, die mit einer SURGEL-Gerüststruktur beschichtet sind im Medium Luft unter Lichteinfall parallel zur Probennormalen. **Schwarze Kurve:** Extinktionsspektrum vor dem Eintauchen in Wasser. **Blaue Kurve:** Extinktionsspektrum nach dreistündigem Kontakt der Probe mit Wasser und Trocknen an Luft. **Rote Kurve:** Extinktionsspektrum nach dem Trocknen an Luft und zusätzlichem Trocknen im Stickstoffstrom. Die Verschiebung der Resonanz beträgt 9 nm ins Blaue. Ein Teil des SURMOF-Films löst sich unter Wasser ab.

Abschließende Bemerkung

Zum Einsatz der Gerüststrukturen unter Flüssigkeiten muss die Haftung der SURMOFs und SURGELs auf den Nanopartikelfilmen erhöht werden. Eine Sensitivitätssteigerung konnte unter Flüssigkeit bisher nicht mit beschichteten Nanopartikelfilmen erreicht werden. Von Vorteil wäre eine einheitliche Oberfläche, die nur aus SiO_2 bzw. Gold mit der kristallinen Ordnung (111) besteht. Eine chemisch einheitliche Oberfläche ermöglicht eine Verbesserung der Funktionalisierung mit Silanen bzw. Thiolen. Dadurch könnte eine Verstärkung der Haftung erreicht werden.

4.4.2 Sensitivitätssteigerung mit heterogenen Oberflächen

Die Untersuchung hoch-dichter Molekülarrays setzt voraus, dass keine Überlagerung der unterschiedlichen Informationen von benachbarten Spots erfolgt. Heterogene Oberflächen bieten zwei wichtige Vorteile. Sie können die Ausbreitungslänge der Plasmonen begrenzen sowie dazu beitragen die Empfindlichkeit der Nanopartikelsysteme weiter zu steigern. In dieser Arbeit werden zwei Methoden zur Herstellung von heterogenen Oberflächen verwendet: das Mikrokontaktdrucken zur Erzeugung von Partikelclustern und metallische Gitter. Bei der Reflexion von Licht an metallischen Gitterstrukturen tritt bei spezifischen Wellenlängen eine drastische Erhöhung der lokalen elektromagnetischen Felder auf.^[261] Diese Feldverstärkungseffekte könnten wiederum genutzt werden, um besonders ausgeprägte plasmonische Anregungen in Nanopartikelfilmen zu erzeugen. Hierzu müssen die Nanopartikel auf metallischen Gittern adsorbiert werden, die zu einer Felderhöhung bei einer Plasmonenresonanz der Nanopartikelfilme führen.

4.4.2.1 Selbstorganisation auf Gitterstrukturen

Der Einsatz von metallischen Gittern als Gitterkoppler ermöglicht die Kopplung von Licht an Plasmonen.^{[262] [263] [264]} Im Alltag häufig verwendete Oberflächen mit Gitterstrukturen stellen CDs und DVDs dar. Die optischen Eigenschaften von metallisierten DVDs ohne Nanopartikelbedeckung und von Nanopartikelfilmen auf DVDs sind Gegenstand der Untersuchungen.

4 Ergebnisse und Diskussion

Das Ziel ist es herauszufinden, ob die plasmonischen Signale der Nanopartikelfilme durch die Kombination mit solch einfach verfügbaren Gitterstrukturen verstärkt werden können.

DVD mit Plastikschiicht und mit Nanopartikeln

Das Gitter der DVD wird vom Hersteller durch eine Plastikabdeckung nach außen geschützt. Zur Herstellung der Proben werden DVDs mit Plastikabdeckung und DVDs nach Entfernen der Plastikabdeckung als Substrate eingesetzt. Die Substrate bieten ein regelmäßiges Gitter mit einer Gitterperiode von ca. 700 nm (Abb. 96, I.). Die Oberflächen werden mit Gold besputtert und die Nanopartikelfilme mit der Floating-Transfermethode darauf übertragen. Die Anordnung der Partikel erfolgt in weniger dichten Bereichen in den Vertiefungen, in Bereichen hoher Partikeldichte auch auf den Stegen (Abb. 96, II. und III.). Mit dieser Methode können Nanopartikel so angeordnet werden, dass die Struktur dem Negativabdruck des Substrates entspricht. Die DVD hat die Wirkung einer Schablone.

Optische Eigenschaften

Die Extinktionsspektren werden vor und nach der Adsorption von Nanopartikeln aufgenommen und mit dem Extinktionsspektrum von Nanopartikelfilmen verglichen, die auf einem flachen Gold-Substrat abgeschieden wurden (Abb. 96). Im Spektrum der DVD wird ein breiter Peak zwischen 300 nm und 550 nm sowie ein scharfes Minimum bei 600 nm beobachtet. Die Lage des Minimums stimmt mit dem Minimum von nasschemisch metallisierten Kern-Schale-Nanopartikeln überein, die sich auf einem flachen Gold-Substrat befinden. Da die Gitterperiode gut zu dem Nanopartikelfilm passt, könnte eine Kopplung zwischen plasmonischen Anregungen im Gitter und im Nanopartikelfilm auftreten. Die optische Antwort des kombinierten Sensors aus Nanopartikelfilm und DVD-Substrat entspricht der Summe der Einzelspektren (Abb. 97). Das heißt, es tritt keine Kopplung auf.

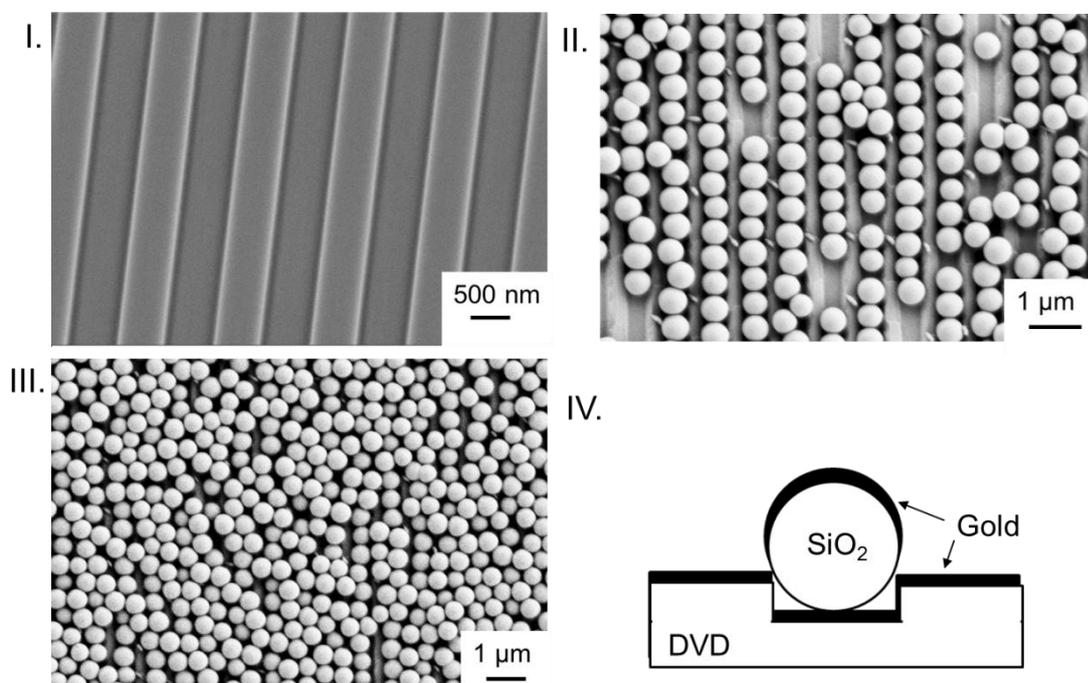


Abb. 96: Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme einer DVD vor der Adsorption von Nanopartikeln I. und nach der Adsorption von Nanopartikeln in niedriger II. und hoher Dichte III. sowie die schematische Darstellung des Probenaufbaus IV.

4.4 Sensitivitätssteigerung

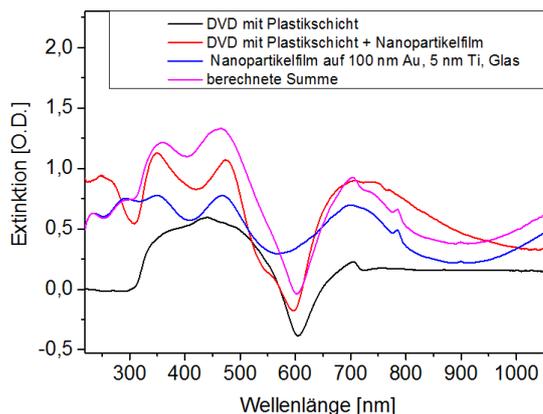


Abb. 97: Extinktionsspektren einer mit Gold metallisierten DVD mit Plastikabdeckung vor der Adsorption von Nanopartikeln (schwarze Kurve), nach der Adsorption von Nanopartikeln auf der DVD (rote Kurve), Extinktionsspektrum des Nanopartikelfilms auf einem flachen Goldsubstrat (blaue Kurve) und berechnete Summe (magenta). Die Aufnahmen erfolgten im Medium Luft unter Lichteinfall parallel zur Probennormalen.

DVD ohne Plastikschiicht und ohne Nanopartikel

Zum Vergleich werden DVDs ohne Plastikabdeckung eingesetzt. Diese sind allerdings weniger praktisch in der Anwendung, als DVDs mit Plastikabdeckung. Zum Abtrennen der Plastikabdeckung muss die DVD erst in kleinere Stücke geschnitten werden und nur mit großer Vorsicht bleibt das Gitter unbeschädigt. Das Extinktionsspektrum der DVD ohne Plastikabdeckung zeigt breite überlagerte Peaks, deren Lage im Spektrum nicht mit den Peaks im Extinktionsspektrum der Nanopartikelfilme übereinstimmt (Abb. 98). Daher ist keine plasmonische Kopplung im kombinierten System aus Gitter und Nanopartikelfilm zu erwarten.

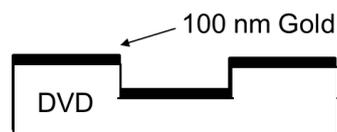
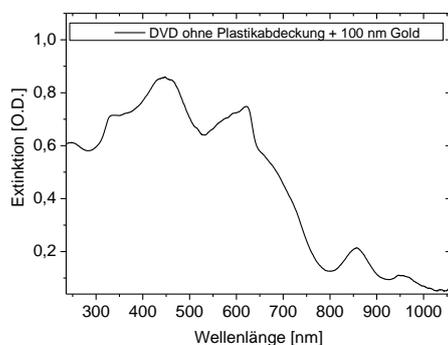


Abb. 98: Extinktionsspektrum der DVD ohne Plastikabdeckung. Die Oberfläche wurde mit 100 nm Gold besputtert. Die Detektion erfolgt unter einem Lichteinfall parallel zur Probennormalen im Medium Luft.

CD mit Plastikschiicht und mit Nanopartikeln

Im Fall einer CD ist die Plastikabdeckung so gut mit dem Gitter verbunden, dass sich die Plastikschicht nicht entfernen lässt. Die CD mit Plastikabdeckung wird mit einem Nanopartikelfilm beschichtet und die optische Antwort vor und nach der Partikelablagerung untersucht. Ein Vergleich mit dem Extinktionsspektrum des Nanopartikelfilms auf einem planaren Goldfilm bestätigt die additive Überlagerung aus Substrat und Bedeckung (Abb. 99). Die Tatsache, dass das Gesamtsignal gleich der Summe der Teilsignale ist bedeutet, dass keine Kopplungen auftreten.

4 Ergebnisse und Diskussion

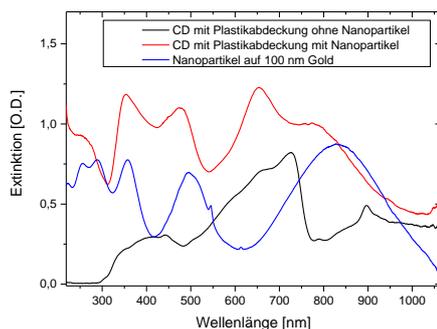


Abb. 99: Extinktionsspektrum der CD mit Plastikabdeckung. Die Oberfläche wurde mit 100 nm Gold besputtert. Die Detektion erfolgt unter einem Lichteinfall parallel zur Probennormalen im Medium Luft.

Nanopartikelfilm-Doppellagen

Eine weitere Möglichkeit Gitter zu erzeugen ist die gezielte Abscheidung zweier Monolagen mit der Floating-Methode. Die Qualität der Partikelformation wird mit dem Rasterelektronenmikroskop überprüft. Hinsichtlich der Linienform ist eine Adsorption in Form einer Monolage zu bevorzugen (Abb. 100). Das Problem hierbei ist vermutlich, dass Adsorption der zweiten Lage in den Lücken der Monolage erfolgt. Zusätzlich wird beim Metallisieren erneut Gold auf der unteren Lage abgeschieden, dies führt zu einer dickeren Metallschicht und könnte eine Ursache für die Peakform sein.

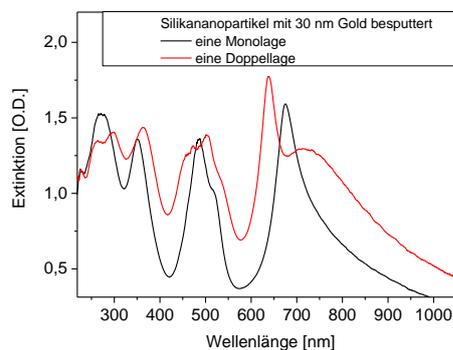
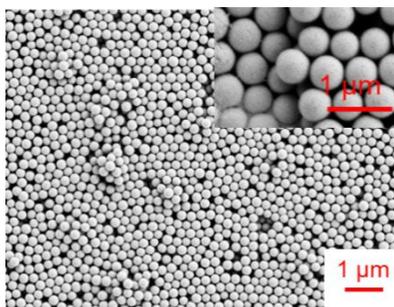


Abb. 100: Links: Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme der Nanopartikeldoppellage. Rechts: Extinktionsspektrum einer Nanopartikelmonolage (schwarz) und Doppellage (rot). Die Detektion erfolgt unter einem Lichteinfall parallel zur Probennormalen im Medium Luft.

Abschließende Bemerkung

Durch die Kombination von Nanopartikelfilmen und Gitterstrukturen konnte geschlossen werden, dass keine Kopplung zwischen der optischen Antwort auftritt.

4.4.2.2 Sensitivität von Nanopartikelfilmen auf Gitterstrukturen

Besonders interessant ist der Einsatz des kombinierten Sensors, DVD und Nanopartikelfilm, zum Nachweis von Proteinadsorptionsprozessen. Beim Einsatz des Sensors unter Flüssigkeit sind die Peaks weniger scharf ausgeprägt (Abb. 101). Infolge der Fibrinogen-Adsorption aus der Lösung wird eine Peakverschiebung von $14 \text{ nm} \pm 1 \text{ nm}$ beobachtet. Dies ist eine Steigerung um den Faktor 3 im Vergleich zu Nanopartikelfilmen auf flachem Substrat. Es besteht die Möglichkeit durch Felderhöhungseffekte eine Steigerung in der Sensitivität zu erreichen.

4.4 Sensitivitätssteigerung

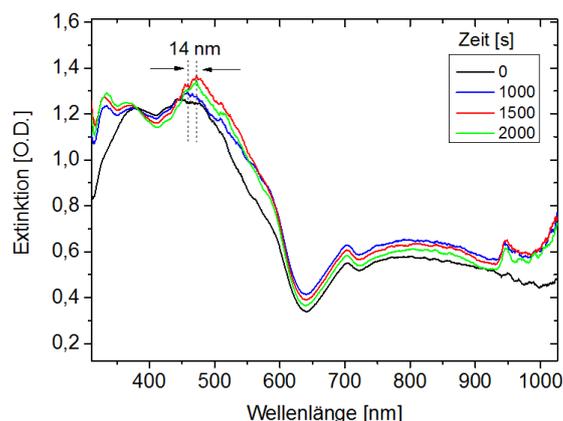


Abb. 101: Extinktionsspektrum des kombinierten Sensors aus Nanopartikelfilm und DVD-Substrat unter Flüssigkeit. Der Sensor befindet sich in Kontakt mit der Proteinlösung. Dargestellt sind die Spektren mit unterschiedlichen Reaktionszeiten (schwarze Kurve 0 s, blaue Kurve 1000 s, rote Kurve 1500 s und grüne Kurve 2000 s). Die Detektion erfolgte unter dem magischen Winkel des Nanopartikelfilmes.

4.4.2.3 Selbstorganisation auf hochgeordneten Templat-Oberflächen

Als Substrate wurden Glassubstrate mit geordneten Löchern eingesetzt. Die Selbstorganisation von Nanopartikeln auf mikrostrukturierten Oberflächen wurde in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. A. Nesterov-Müller und F. Märkle (KIT) untersucht. Diese Oberflächen bieten mehrere Vorteile für die Partikelanordnung. Die Löcher bieten Adsorptionsplätze definierter Größe und Position. Dies ermöglicht die Anzahl abgeschiedener Partikel zu steuern. Beispielsweise hängt die Anordnung von Polystyrol-Nanopartikel vom Verhältnis des Partikeldurchmessers zum Lochdurchmesser ab.

Selbstassemblierung von Partikel in der Größenordnung des Lochdurchmessers

Es werden Nanopartikel mit einem Durchmesser von $6\ \mu\text{m}$ eingesetzt. Die Partikel- und Lochdurchmesser liegen im gleichen Größenbereich. Dies ermöglicht die Untersuchung des Einflusses des Größenverhältnisses auf die Verteilung der Nanopartikel auf der Templat-Oberfläche: Die Partikel ordnen sich bei einer Partikelabscheidung aus einer wässrigen Suspension selbstorganisiert auf dem Substrat an (Abb. 102). Ist der Durchmesser von Partikeln kleiner oder gleich dem Durchmesser der Löcher, so adsorbieren die Nanopartikel bevorzugt in den Löchern (I., II. und III.). Dort sind sie fester gebunden, weil ihre Wechselwirkungsfläche mit dem Substrat groß ist und die Angriffsfläche nach außen klein ist. Ist der Durchmesser der Partikel größer als der Lochdurchmesser erfolgt die Partikeladsorption auf den Löchern. Dies wurde für Lochdurchmesser mit $5\ \mu\text{m}$ beobachtet (IV.). Im Fall von Löchern mit Durchmessern von $3\ \mu\text{m}$ erfolgt die Adsorption auf dem Substrat zufällig (V.). Die Löcher werden nicht gezielt besetzt, weil die Nanopartikel nicht tief in die Löcher eindringen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Nanopartikel zuerst auf der Oberfläche diffundieren und die anschließende Adsorption unter Maximierung der Kontaktfläche mit dem Substrat erfolgt.

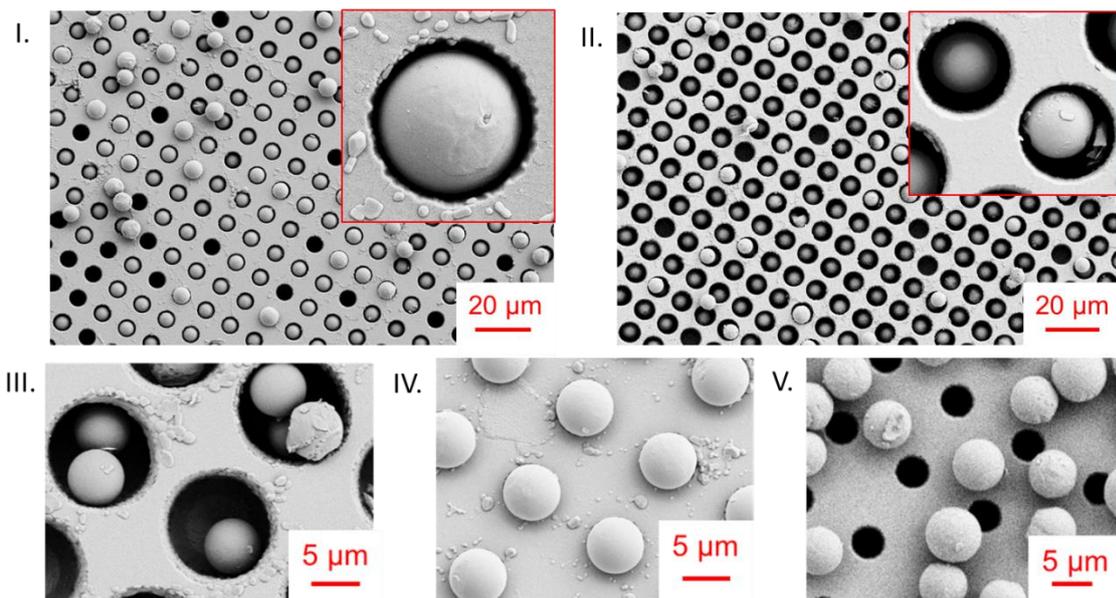


Abb. 102: Selbstorganisation von Polystyrol-Nanopartikeln mit einem Durchmesser von 6 µm auf mit 100 nm Gold metallisierten Lochstrukturen mit unterschiedlichem Loch-Radius und Mittelpunktabständen.

Selbstassemblierung von kleinen Partikeln

Zum Vergleich mit Sensoren, die aus homogenen Nanopartikelfilmen bestehen, wurden Silika-Nanopartikel (Durchmesser 0.5 µm) mit Floating auf das Substrat übertragen und nasschemisch metallisiert. Die Anordnung der Partikel auf der Lochstruktur erfolgt als dicht gepackte Monolage (Abb. 103, **A.**) Beim Abwischen der Oberfläche mit einem Tuch verbleiben die Nanopartikel in den Löchern (**B.**). Die Abscheidung in den Löchern erfolgt bevorzugt am Rand, seltener werden Löcher komplett gefüllt. Eine gezielte Anordnung der Partikel in den Löchern als geordnete Monolage erhält man durch Floating der Silika-Partikel auf Lochstrukturen, deren Löcher mit Polystyrol-Nanopartikeln gefüllt sind (**C.**). Mit dieser Methode können gezielt Cluster von Partikeln erzeugt werden.

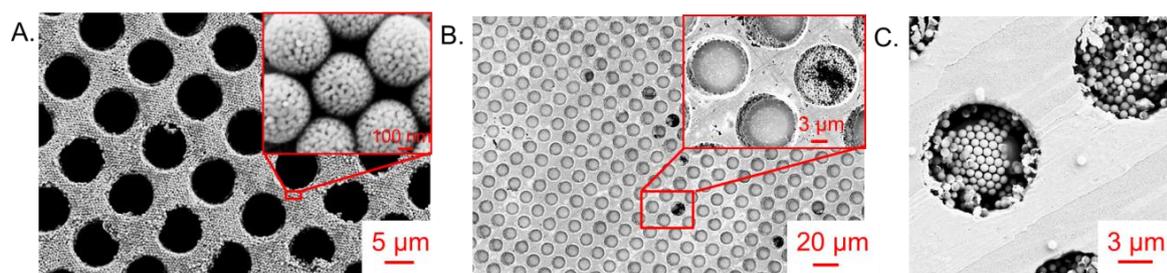


Abb. 103: **A.:** Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme von Lochstrukturen, die mit einem Silika-Nanopartikelfilm bedeckt wurden. Der Partikelübertrag erfolgte mit Floating. **B.:** Oberfläche aus A. nach Abwischen der Partikel mit einem Tuch. **C.:** Der Partikelübertrag erfolgte mit Floating auf Lochstrukturen, deren Löcher mit Polystyrol-Nanopartikeln besetzt sind. Die Polystyrol-Nanopartikel liegen unter den Silika-Nanopartikeln. Die Probe wurde anschließend mit einem Tuch abgewischt. Der Durchmesser der Polystyrol-Nanopartikel beträgt 6 µm. Die Silika-Nanopartikel haben einen Durchmesser von 540 nm.

4.4 Sensitivitätssteigerung

Extinktionseigenschaften

Im Folgenden wird der Einfluss der Templat-Strukturen auf die Extinktionseigenschaften von Nanopartikelfilmen untersucht. Es werden Nanopartikeln mit einem Durchmesser von 540 nm verwendet (Abb. 103, A.).

Beobachtung in Reflexion

Das Extinktionsspektrum wird vor und nach der Abscheidung der Nanopartikel untersucht. Für Strukturen ohne Nanopartikel wird ein Peak zwischen 600 nm und 800 nm beobachtet. Zusätzlich treten kleine Interferenzpeaks auf, die vermutlich auf Rückseitenreflexionen zurückzuführen sind. Dies wurde durch Transmissionsmessungen bestätigt (Abb. 104).

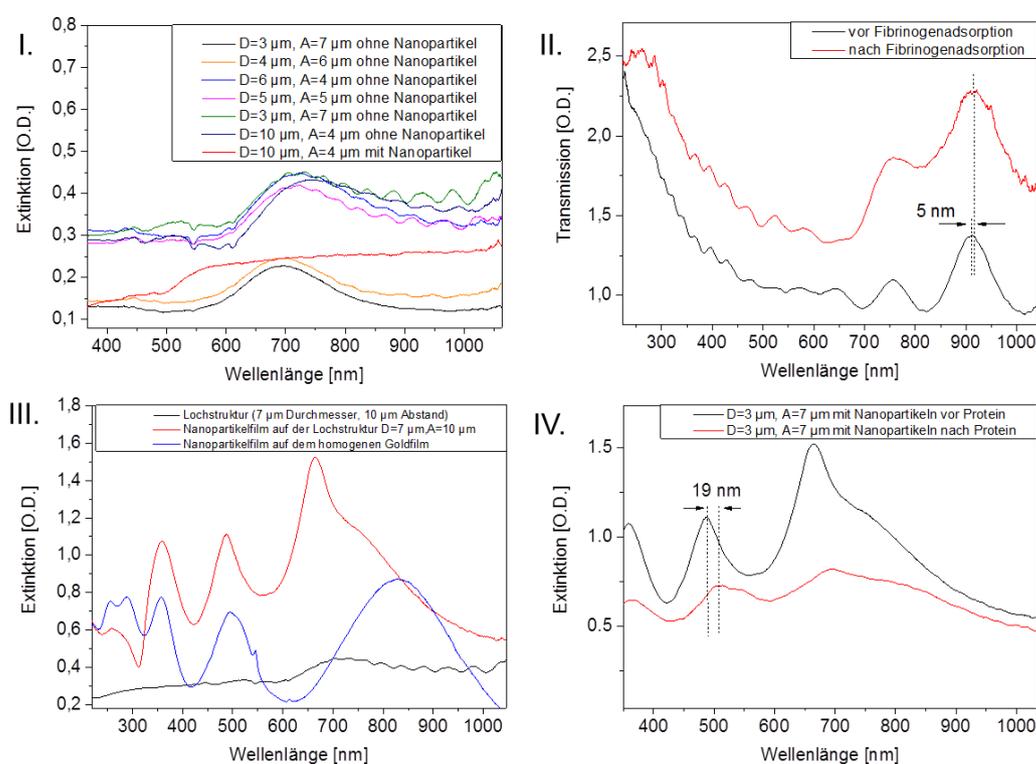


Abb. 104: I.: Extinktionsspektrum von Lochstrukturen mit unterschiedlichem Durchmesser D und Lochabstand A ohne Nanopartikel. Stellvertretend für Strukturen mit homogenem Nanopartikelfilm nach Abwischen der Nanopartikel wurde die Struktur D = 10 μm und A = 4 μm (rote Kurve) dargestellt. II.: Transmissionspektrum vor (schwarz) und nach (rot) der Adsorption von Fibrinogen auf der Struktur D = 10 μm und A = 4 μm. III.: Extinktionsspektren der Lochstrukturen D = 7 μm und A = 10 μm vor der Partikeladsorption (schwarze Kurve), nach der Nanopartikeladsorption ohne Abwischen (rote Kurve) (Abb. 103, A.) und des nasschemisch metallisierten Nanopartikelfilms auf einem homogenen Goldfilm (blaue Kurve). IV.: Extinktionsspektren der Lochstrukturen D = 3 μm und A = 7 μm mit Nanopartikel ohne Abwischen vor (schwarz) und nach (rot) der Proteinadsorption. Die Messung erfolgte in Luft. Der Lichteinfall ist entlang der Probenormalen. Als Referenz wurde für alle Spektren ein planarer Goldfilm der Dicke 100 nm verwendet.

Beobachtung in Transmission und Sensitivität

Die Transmissionspektren der reinen Mikrostrukturierten Glasträger werden bezüglich der Sensitivität gegenüber der Proteinadsorption untersucht. Die Verschiebung des Peaks bei 900 nm ist um den Faktor 10 kleiner als die Änderung der Peakposition im Extinktionsspektrum der Kern-

Schale-Nanopartikel. Eine Kombination der Templat-Struktur mit dem Nanopartikelfilm verspricht eine höhere Sensitivität.

Kombinierter Sensor aus dem Kern-Schale-Nanopartikelfilm und der Templat-Struktur

Die optische Antwort des kombinierten Sensors aus der metallisierten Nanopartikelmonolage und dem Templat-Substrat (Abb. 103, A. und Abb. 104, III.) zeigt mehrere Peaks. Der Peak bei großen Wellenlängen ist asymmetrisch verbreitert. Die Extinktion ergibt sich additiv aus den Extinktionsspektren der Lochstruktur und des Nanopartikelfilmes. Die Sensitivität des kombinierten Sensors, aus Templat und Nanopartikelfilm) ist im Vergleich zu Nanopartikelfilmen auf einem flachen Substrat um den Faktor 2 besser (Abb. 104, IV.). Dies könnte durch die erhöhte Oberfläche zustande kommen. Um den Beitrag der Nanopartikel, die in den Löchern adsorbiert wurden, zum Signal zu untersuchen, wird die Oberfläche mit einem Tuch abgewischt. Dadurch werden alle Partikel entfernt, die nicht in den Vertiefungen sitzen (Abb. 103, B). Die Nanopartikel sind bevorzugt an den Rändern der Vertiefungen abgelagert. Als Referenz für die Messung wird die Lochstruktur ohne Nanopartikel eingesetzt. Das Extinktionsspektrum (Abb. 104, I.) zeigt keinen Peak. Dies ist vermutlich auf die geringere Partikeldichte der am Rand sitzenden Partikel zurückzuführen. Eine Besetzung der Lochmitte wird erreicht, indem die Löcher zuvor mit größeren Nanopartikeln gefüllt werden (Abb. 103, C.). Diese Strukturierungsmethode führt zu einer kontrollierten Ablagerung der Nanopartikel. Die Dichte der definierten lateralen Positionen der adsorbierten Teilchen wird durch die Dichte der Löcher auf dem Substrat bestimmt.

Abschließende Bemerkung und Ausblick

Unter Verwendung von strukturierten Oberflächen als Träger für die Nanopartikelfilme konnte gezeigt werden, dass sich die optische Antwort additiv aus den Extinktionen beider Komponenten ergibt. Es besteht daher keine Koppelung. Der kombinierte Sensor führt zu höheren Sensitivitäten. Dies könnte auf Feldverstärkungseffekte hindeuten. Ein großer Unsicherheitsfaktor bleibt die tatsächlich adsorbierte Proteinmenge, da unterschiedliche Oberflächen vorliegen.

Das Verfahren ist besonders interessant zur Erzeugung hochdichter Arrays von Molekülen. Als Ausgangsmaterial müssten die Moleküle in Partikeln synthetisiert werden. Denkbar ist auch die Verwendung poröser Partikel, die mit der Substanz getränkt oder ummantelt werden. Nach der Deponierung der Moleküle können die Nanopartikel gelöst oder geschmolzen werden und die Moleküle ortsselektiv freisetzen. Dieses Verfahren wird bereits eingesetzt. Hierzu werden Aminosäure-Tonerpartikeln für die kombinatorische Synthese von Peptidarrays auf einen Chip abgelagert.^[265] Als Alternative Abscheidemöglichkeit kann die Partikelsuspension über das Templat gepumpt werden.^[266]

4.4.2.3 Untersuchung von Clustern

Bei dichter Packung der Partikel kann es zur Wechselwirkung von Oberflächenplasmonen in benachbarten Partikeln kommen.^[70] Dies stört beim Auslesen dichter Peptidarrays. Zur Untersuchung plasmonischer Kopplungen und des Einflusses der Bedeckung auf die optischen Eigenschaften werden Nanopartikel mittels Mikrokontaktdruckens ortsselektiv in definierten Clustern auf dem Substrat (Abb. 105) angeordnet. Eine alternative Methode stellt das selektive Abziehen von Nanopartikeln mit einem Stempel dar.

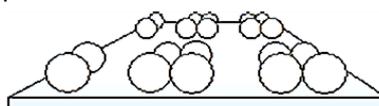


Abb. 105: Abscheidung von Nanopartikel-Clustern

4.4 Sensitivitätssteigerung

Mikrokontaktdrucken

Die Methode Mikrokontaktdrucken nutzt zur Funktionalisierung die schnelle Bildung von SAMs beim Kontakt eines Polymerstempels mit der Trägeroberfläche. Es werden Linien und Kreisstempel zum Übertrag des Oktadekanthiols verwendet, anschließend werden die Zwischenräume passiviert und kommerziell bezogene aminoterminierte Nanopartikel selektiv gebunden.

Qualität der Strukturierung

Die Qualität der hergestellten Oberflächen wird mit dem Rasterelektronenmikroskop und durch Beugungsexperimente mit einem Laserpointer untersucht. Das Beugungsverhalten der Mikrokontaktdruckten Linien entspricht einem Liniengitter, die entsprechende Probe mit Kreisen erzeugt das Beugungsbild eines Kreuzgitters (Abb. 106). Die Besetzung der Stege mit Nanopartikeln erfolgt zum Teil in Form von Multilagenn. Die Größe des strukturierten Bereichs beträgt 1 mm^2 . Die Problematik lag daran, dass die Dichte der Aminogruppen auf den Silika-Nanopartikeln unbekannt war. Zur Detektion wurde der Winkelaufbau mit einem Glasfaserdurchmesser von $100\text{ }\mu\text{m}$ eingesetzt. Eine Aufnahme unter Lichteinfall entlang der Probenormalen war aufgrund des Strahldurchmessers von 3 mm nicht möglich (siehe Kap. 3).

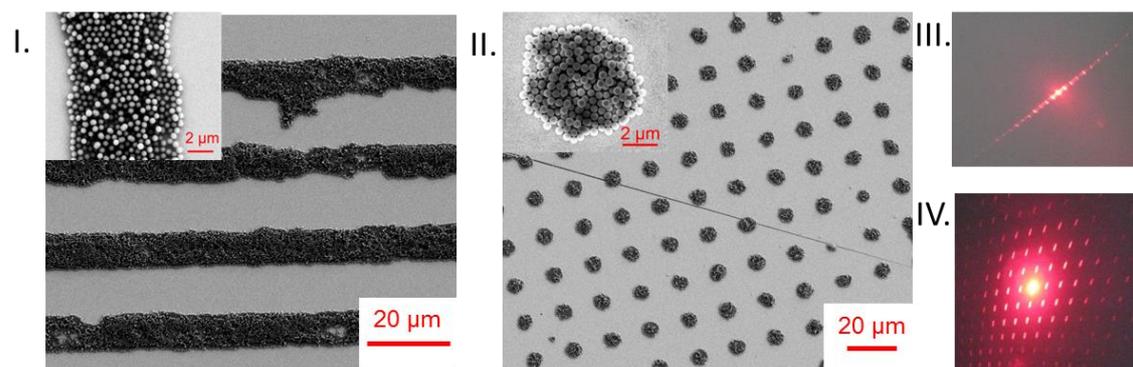


Abb. 106: Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen (SE2-Detektor) der mittels Mikrokontaktdruckens strukturierten Proben unter Verwendung eines (I.) Liniensampels und eines (II.) Kreisstempels. III. und IV. sind die entsprechenden Beugungsbilder, die man durch Projektion des von der Probe reflektierten Strahls eines Laserpointers erhält.

Umgedrehtes Mikrokontaktdrucken

Beim „umgedrehten“ Mikrokontaktdruckverfahren werden auf der Oberfläche adsorbierte Partikel mit einem Stempel abgezogen. Ausgangspunkt ist die Ablagerung der Partikel im sogenannten Floating-Schritt. Die Bindung erfolgt dabei elektrostatisch auf polymerbeschichtete Träger. Durch Abziehen der Partikel mit einem Liniensampel, sind die Nanopartikel, die auf den Flächen verbleiben, die nicht mit dem Stempel in Berührung kamen, in einer hexagonal dicht gepackten Monolage angeordnet (Abb. 107, rechts). Der strukturierte Bereich entspricht der Stempelgröße. Letzteres Verfahren ist zu bevorzugen, weil bei diesem keine Aktivierung von funktionellen Gruppenerforderlich ist. Die Adhäsionskräfte zwischen den Nanopartikeln und dem Stempel sind größer als die Kräfte zwischen den Nanopartikeln und dem Substrat.

Bei der Aktivierung mit UV-Licht wird vermutlich die Bindung der Partikel zum Substrat geschwächt, weil die Polymerschicht durch die Energie des Lichtes zerstört wird. Daher lassen sich die Partikel leicht durch Kontakt mit dem Stempel abziehen. Die auf der Oberfläche verbleibenden Partikel sind gegenüber dem Einsatz unter Flüssigkeiten stabil.

4 Ergebnisse und Diskussion

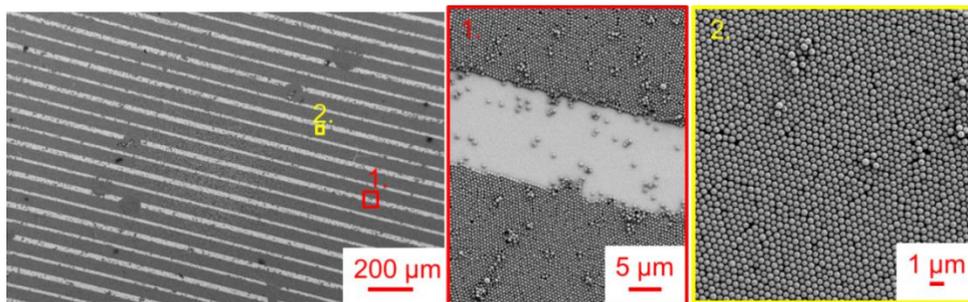


Abb. 107: Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen (SE2-Detektor) der mittels „umgedrehten“ Mikrokontakt-druckens strukturierten Proben unter Verwendung eines Linienstempels.

Optische Eigenschaften

Im Extinktionsspektrum der Probe mit Linien wird ein breiter Peak beobachtet, dessen optische Dichte gegenüber homogen beschichteten Proben deutlich erniedrigt ist (Abb. 108). Die Ursache für die niedrige Intensität ist auf die geringere Oberflächenbedeckung der Probe zurückzuführen. Der Bedeckungsgrades der Oberfläche wird anhand der Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen mit dem Programm Adobe Photoshop CS2 ausgewertet. Im Fall des homogenen Filmes ist 81% der Oberfläche bedeckt, die Mikrokontakt-gedruckte Oberfläche weist eine Bedeckung von 35% auf. Die geometrisch hergeleitete Maximalbedeckung beträgt 91%. Die Bestimmung der Peakposition erfolgt durch Anpassung mit dem Programm Origin unter Verwendung des Voigt-Profiles nach dem Levenberg Marquardt Algorithmus. Die Peakposition ist unter einem Reflexionswinkel von 30° gemessen zur Probennormalen im Bereich von 1,366 – 1,428 RIU wenig abhängig vom Brechungsindex der Volumenphase. Die Sensitivität gegenüber der Adsorption von Fibrinogen beträgt 30 ± 1 nm.

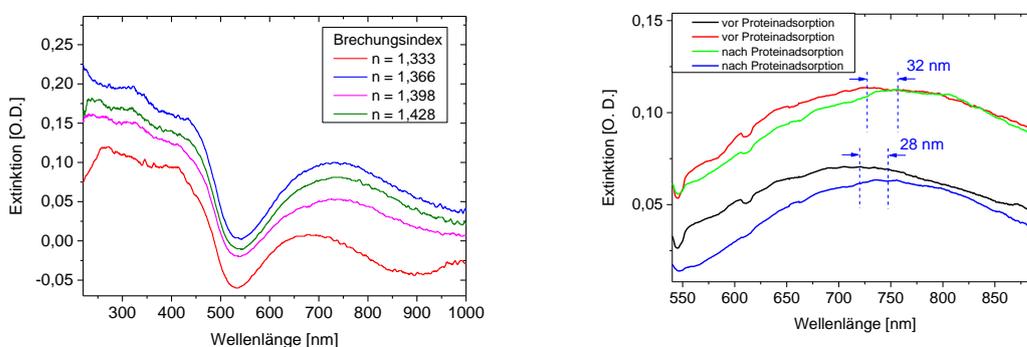


Abb. 108: Links: Extinktionsspektrum unter einem Reflexionswinkel von 30° zur Probennormalen der mittels Mikrokontakt-druckens strukturierten Probe und deren Sensitivität gegenüber Brechungsindexänderungen in der Umgebung nach nasschemischen Metallisierung. **Rechts:** Peakverschiebung infolge der Proteinadsorption auf einer mittels Mikrokontakt-druckens strukturierten Probe mit Silika-Nanopartikeln auf 30 nm Gold auf Glas. Die Messung wurde im Medium Luft durchgeführt.

Abschließende Bemerkung

Nanopartikel-Cluster sind als optischer Sensor einsetzbar unter der Voraussetzung, dass das Spektrum an der gleichen lateralen Position und mit einer identischen Probenorientierung vor und nach dem Adsorptionsprozess gemessen wird. Allerdings muss die Extinktion vor dem Einsatz als Peptidchip in weiteren Experimenten optimiert werden. Es ist zu prüfen, ob durch Variation der Clusterabmessungen ein schärferes Signal erreicht werden kann. Durch die Strukturierung wird eine Kopplungen benachbarter Bindungsprozesse im Array-Format vermieden. Die Detektion erfolgt dann mit der Methode SPR-Imaging.

4.5 Optische Eigenschaften elektronenstrahlolithographisch hergestellter Proben

In den folgenden Untersuchungen soll ein Modellsystem für die Kern-Schale-Nanopartikel mit elektronenstrahlolithographisch hergestellten Strukturen entwickelt werden. Die Angabe (w/x/y-z) bezeichnet eine Struktur mit Quadern der Breite w, Länge x und Höhe y. Der Kantenabstand benachbarter Quader beträgt z. Diese Abmessungen sind jeweils in Nanometern angegeben.

Zuerst wird eine Teststruktur 300/300/300-300 angefertigt und die optischen Eigenschaften mit den Nanopartikelfilmen verglichen. Die Strukturgrößen der elektronenstrahlolithographisch erzeugten Oberflächen werden anschließend systematisch variiert, um die Sensitivität der Substrate gegenüber Moleküladsorption zu optimieren. Eine wichtige Fragestellung ist dabei die Signalentstehung in den elektronenstrahlolithographisch hergestellten Strukturen. Zur Untersuchung der Bedeutung der Kontaktpunkte werden Strukturen mit und ohne Verbindungsstege hergestellt. Von besonderem Interesse ist auch der Einfluss der Strukturhöhe und des Abstands der Nanostrukturen. Dies ermöglicht die Beiträge von Interferenzeffekten, plasmonischen Kopplungen zwischen benachbarten Partikelplasmonen und propagierende Plasmonen in der oberen Metallschicht bzw. dem Goldfilm auf dem Silizium-Substrat zu diskutieren. Durch die Kanten der erzeugten Strukturen ist eine weitere Felderhöhung und Signalverstärkung zu erwarten.

4.5.1 Elektronenstrahlithographie als Alternative zu Selbstaggregationsprozessen

Mittels Selbstaggregation von kolloidalen Nanopartikeln sind große Flächen leicht und preisgünstig beschichtbar. Völlig geordnete Filme können auf diese Weise jedoch nicht erreicht werden. Eine Alternative stellen mittels Elektronenstrahlithographie hergestellte Sensoroberflächen dar, die eine hohe Strukturreproduzierbarkeit besitzen. Zusätzliche können die Objektmessungen und -abstände unabhängig variiert werden. In Zusammenarbeit mit dem KNMF (Karlsruhe Nano Micro Facility) am KIT wurden Nanoarrays rechteckiger Geometrie angefertigt. Es wurden Quader mit unterschiedlichen Abmessungen (siehe Tabelle 8, Seite 55) mit und ohne Verbindungsstege als modellhafte Annäherung an dichtgepackte und separierte Nanopartikel-Filme hergestellt. Die strukturierten Bereiche sind 2,4 mm x 2,4 mm groß.

4.5.2 Stabilität unter Flüssigkeit

In einem ersten Experiment wird eine Teststruktur (300/300/300-300) bestehend aus PMMA-Würfeln hergestellt. Die Kantenlänge der Würfel beträgt somit 300 nm. Benachbarte Würfel stehen über genauso lange und hohe aber nur 100 nm breite Stege in Verbindung. Als Substrat wird Silizium verwendet. Silizium ist besonders gut für Elektronenstrahlithographie geeignet, weil es sich nicht auflädt. Die Struktur soll zum Einsatz unter Flüssigkeiten geeignet sein. Bei optischen Untersuchungen unter wässrigen Lösungen traten jedoch partielle Zerstörungen der Struktur auf (Abb. 109). Deshalb erfolgte die Herstellung einer zweiten Struktur unter Verwendung eines Haftvermittlers (5 nm Chrom). In verschiedenen Experimenten zeigte sich, dass hierdurch eine gute Stabilität bei Kontakt mit wässrigen Lösungen erreicht wurde.

4 Ergebnisse und Diskussion

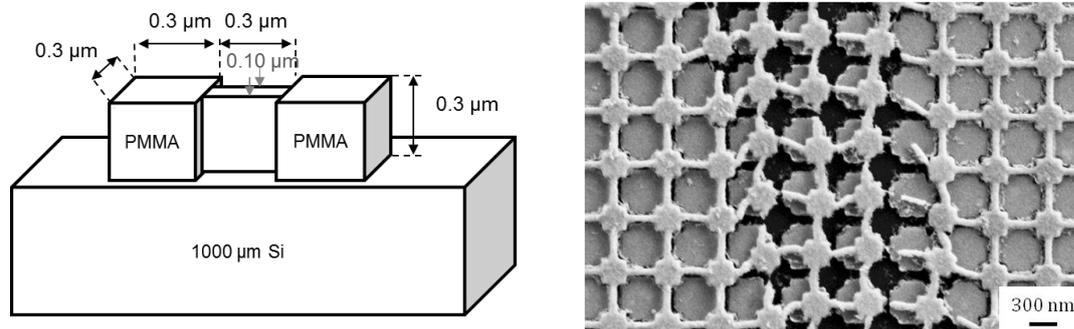


Abb. 109: Links: Schematische Darstellung der vom KNMF gefertigten Nanostruktur 300/300/300-300 ohne Chrom als Haftvermittler. Es handelt sich um Würfel mit einer Kantenlänge von 300 nm. Benachbarte Würfel stehen über 300 nm lange, 300 nm hohe und 100 nm breite Stege in Verbindung. **Rechts:** Raster-elektronenmikroskop-Aufnahme der Nanostruktur (ohne Chrom als Haftvermittler). Aufgrund des Einsatzes unter wässrigen Lösungsmitteln wurde die Nanostrukturierung partiell zerstört.

4.5.3 Extinktionseigenschaften

Die Extinktionseigenschaften der Proben werden mit polychromatischem Licht im Wellenlängenbereich von 300 – 900 nm in Abhängigkeit vom Reflexionswinkel und vom Brechungsindex der Umgebung des Sensors untersucht. Die Extinktionsspektren aller Strukturen zeigen Peaks im sichtbaren Bereich, deren Lage von der Orientierung der Struktur, vom Einfallswinkel des Lichts und vom Brechungsindex in der Probenumgebung abhängig ist.

4.5.3.1 Abhängigkeit von der Probenorientierung

Das Extinktionsspektrum ist von der Orientierung der Probe abhängig, wenn das Licht unter einem Winkel größer als 0° zur Probennormalen einfällt. Die Orientierung der Probe relativ zum einfallenden Licht bestimmt die Peakposition und Peakform. Es werden zwei Orientierungsrichtungen untersucht (Abb. 110). Ist die Probe so orientiert, dass das Licht entlang der Verbindungsstege einfällt, beträgt die Gitterperiode 600 nm. Diese Orientierung wird mit „Orientierung 1“ bezeichnet. Im Fall von „Orientierung 2“ ist die Probe um 45° gedreht. Das Licht trifft dann auf die Würfecken. Im Extinktionsspektrum von beiden Orientierungen werden drei Peaks beobachtet. Die Position von Peak 1 ist wenig abhängig von der Probenorientierung, es handelt sich dabei vermutlich um den Absorptionspeak von PMMA. Die Resonanzwellenlängen von Peak 2 und 3 sind für Orientierung 2 ins Blaue verschoben und die Peakform ist schärfer.

Beim Einsatz der Oberflächen als Sensor sind Peaks mit hohen optischen Dichten und geringer Breite von Vorteil, weil sich die Änderung der Resonanzlage leicht auslesen lässt. Orientierung 2 ist daher zu bevorzugen. Die Änderung der Peakposition erfolgt aber nicht allein dadurch, dass sich die Gitterperioden von Orientierung 1 und Orientierung 2 unterscheiden. Die Tatsache, dass die Verschiebung im Fall von Orientierung 2 ins Blaue erfolgt, deutet bereits darauf hin, dass durch die dielektrische PMMA-Schicht weitere Effekte als nur Beugung einen Beitrag zur optischen Antwort leisten. Die Form des Gitters, insbesondere die Kanten, spielt eine große Rolle.

Karabchevsky et al.^[3] berechnete mit rigorosen Simulationen die Transmissionsspektren von Nanoschlitz in einem Silberfilm auf einem Glassubstrat. Er variierte sowohl die Höhe der Strukturen zwischen 50 nm und 100 nm als auch die Gitterperiode zwischen 500 nm und 1000 nm. Für alle Strukturhöhen erfolgt allerdings mit zunehmender Gitterperiode eine Verschiebung der Reso-

4.5 Optische Eigenschaften elektronenstrahlolithographisch hergestellter Proben

nanzwellenlänge ins Rote. Den Sachverhalt begründete er ausgehend vom Gittervektor G , der proportional zur Beugungsordnung m und zum Kehrwert der Gitterperiode Λ ist.

$$G = \frac{2\pi m}{\Lambda} \quad \text{Formel 60}$$

Der zusätzliche Wellenvektor erlaubt die Anregung von Plasmonen unter der Bedingung

$$\frac{2\pi}{\lambda} n_a \sin \theta \pm \frac{2\pi}{\Lambda} m = \frac{2\pi}{\lambda} \left(\frac{n_m^2 n_{a,s}^2}{n_m^2 + n_{a,s}^2} \right)^{\frac{1}{2}} \quad \text{Formel 61}$$

θ ist der Einfallswinkel, m ist die Beugungsordnung, n_m ist der Realteil des Brechungsindex des Metalls. Auf der rechten Seite der Formel wird n_a bzw. n_s verwendet, wenn die Oberflächenplasmonen an der Grenzfläche zur Umgebung (ambient) bzw. zum Substrat betrachtet werden. Die Resonanzwellenlänge für den Lichteinfall entlang der Probenormalen ergibt sich zu^[3]

$$\lambda_m = \frac{\Lambda}{m} \left(\frac{n_m^2 n_{a,s}^2}{n_m^2 + n_{a,s}^2} \right)^{\frac{1}{2}} \quad \text{Formel 62}$$

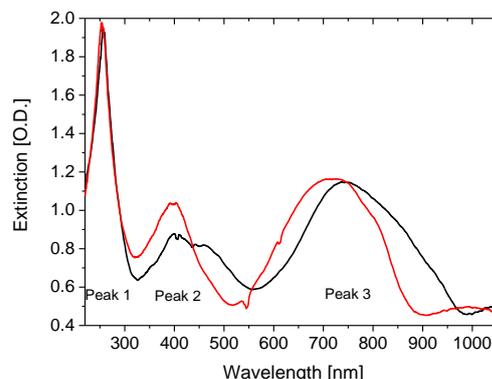
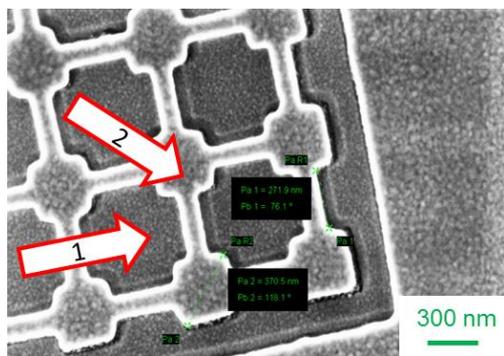


Abb. 110: Links: Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme der Nanostruktur 300/300/300-300 mit Verbindungsstegen. Die Aufnahme erfolgte unter Verwendung des Inlens-Detektors. Die Probenorientierungen 1 und 2 sind mit Pfeilen gekennzeichnet. **Rechts:** Extinktionsspektrum der Struktur. Die Detektion erfolgte unter einem Reflexionswinkel von 30° zur Probenormalen. Das Spektrum für die Probenorientierung 1 ist **schwarz** und für Probenorientierung 2 ist **rot**.

Abschließende Bemerkung

Die elektronenstrahlolithographisch hergestellten Strukturen verfügen über eine exzellente Reproduzierbarkeit und laterale Homogenität. Die Probe ist zum markierungsfreien Nachweis von bio-spezifischen Wechselwirkungen geeignet. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Peakform als auch die Peakposition durch eine gezielte Ausrichtung der Probe einstellbar sind. Die optischen Eigenschaften werden von der Nanostrukturierung in Beobachtungsrichtung bestimmt. Neben der Beugung am Gitter spielen die Kanten eine große Rolle. Dies lässt verstärkte Felder und eine erhöhte Sensitivität erwarten. Zur Klärung der Signalursache werden die Abmessungen im Folgenden variiert.

4.5.3.2 Einfluss der Strukturhöhe

Der Einfluss der Strukturhöhe auf die Extinktionseigenschaften wird untersucht, indem die Höhe der Quader um den Faktor 0,5 bzw. 2 skaliert wird (Abb. 111). Es werden Strukturen mit und oh-

4 Ergebnisse und Diskussion

ne Verbindungsstege untersucht. Durch den Vergleich von Strukturen mit Stegen und Strukturen ohne Stege (300/300/300 Struktur ohne Stege) sollten neue Erkenntnisse bezüglich der Auswirkung dielektrischer Kontaktpunkte auf die optische Antwort gewonnen werden.

Strukturen mit Verbindungsstegen

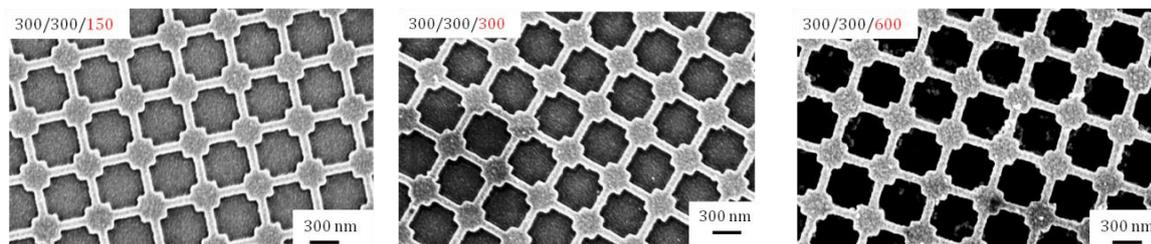


Abb. 111: Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme der Nanostrukturen bestehend aus Quadern mit unterschiedlicher Höhe (150 nm, 300 nm, 600 nm), die über 300 nm lange Stege in Verbindung stehen. Der horizontale Quaderquerschnitt ist ein Quadrat mit 300 nm Seitenlänge.

Zuerst werden die Extinktionsspektren von Strukturen mit Stegen im Medium Luft mit Lichteinfall parallel zur Probennormalen verglichen. Die Nanostrukturen bestehen aus Quadern mit unterschiedlicher Höhe (150 nm, 300 nm, 600 nm). Alle angefertigten Strukturen (Abb. 112, links) zeigen in Übereinstimmung mit den numerischen Berechnungen (Abb. 112, rechts) mehrere Resonanzen. Die Berechnung erfolgt mit dem Programm RSOFT, indem die Maxwell-Gleichungen mit periodischen Randbedingungen durch rigorose Beugungsanalyse (RCWA) gelöst werden.

Die Höhe der Struktur hat einen großen Einfluss. Für eine Strukturhöhe von 150 nm wird ein breiter Peak beobachtet. Mit zunehmender Quaderhöhe treten mehr Resonanzen auf, deren Extinktionspeaks schärfer werden. Die Extinktionsmaxima von Strukturen mit 600 nm Höhe weisen Schultern auf. Keine Schultern im Extinktionsspektrum treten für eine Höhe von 300 nm auf.

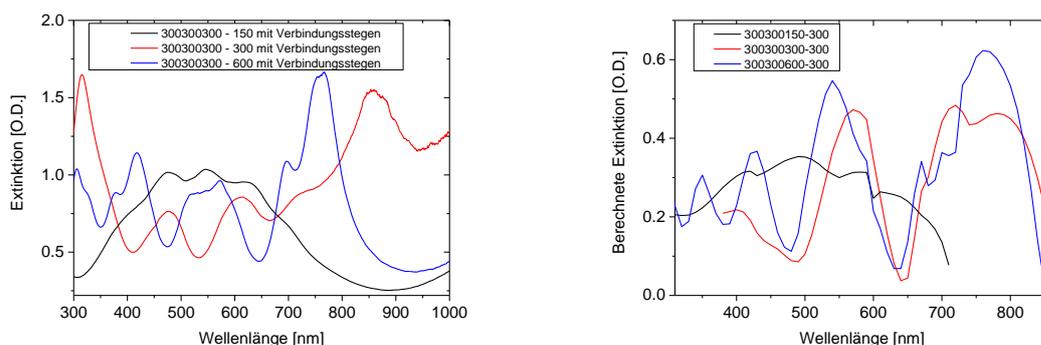


Abb. 112: Gemessene (links) und berechnete (rechts) optische Sensorantwort der Nanostrukturen bestehend aus Quadern mit würfelförmigem horizontalen Querschnitt der Kantenlänge 300 nm mit einer Höhe von 150 nm (schwarz), 300 nm (rot) und 600 nm (blau), die über 300 nm lange Stege in Verbindung stehen.

Strukturen ohne Stege

Zum Vergleich werden die Spektren von Strukturen ohne Stege (Abb. 113) untersucht. Sich entsprechende Strukturabmessungen sind in Abb. 112 und 113 mit gleichen Farben gekennzeichnet. Die Extinktionseigenschaften von Strukturen mit und ohne Stege unterscheiden sich wenig bezüglich der spektralen Lage und der Linienform der Resonanzen. Die optischen Dichten sind unabhängig davon, ob Verbindungsstege vorhanden sind. Die Beobachtungen zeigen, dass eventu-

4.5 Optische Eigenschaften elektronenstrahlolithographisch hergestellter Proben

elle propagierende Plasmonen, die sich über die Verbindungsstege ausbreiten, keinen Effekt auf die Resonanzlagen im Spektrum haben. Der Hauptaspekt des Signals wird durch Interferenzen getragen.

Im Vergleich zu PMMA-Filmen gleicher Dicke (Kap. 4.1.2) wird die optische Dichte der Spektren durch die Nanostruktur deutlich erhöht. Dies ist ein Hinweis darauf, dass verstärkte Absorption für nanostrukturierte Oberflächen auftritt.

Kopplungseffekte zwischen benachbarten Nanopartikeln in Form von Partikelplasmonen und propagierende Plasmonen im Goldfilm des Substrates können dabei eine wichtige Rolle spielen. Zur genaueren Untersuchung dieses Effektes wurde die Geometrie skaliert. Die Strukturabmessungen wurden so gewählt, dass sie in der Größenordnung des Durchmessers der bereits untersuchten Kern-Schale-Nanopartikel liegen.

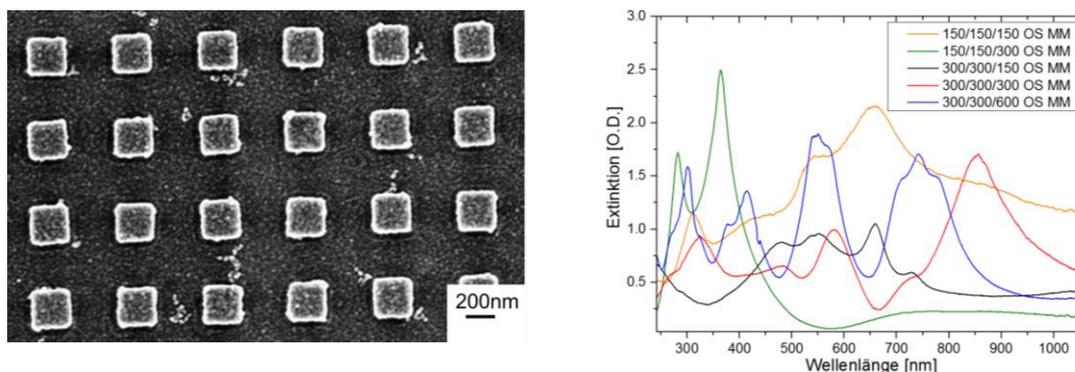


Abb. 113: Links: Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme der 300/300/300-300 Struktur ohne Stege
Rechts: Extinktionsspektren dieser Struktur unter Variation der Quaderhöhe (150 nm (schwarz), 300 nm (rot) und 600 nm (blau)) sowie die Spektren der um den Faktor 0,5 skalierten Struktur 150/150/150-150 (orange) und 150/150/300-150 (grün). Die Extinktionsspektren höherer Strukturen weisen eine größere Anzahl an Peaks auf. Zusätzlich sind die Peaks schärfer. OS steht für „ohne Stege“, MM bedeutet „mit Metall“.

Abschließende Bemerkung

Die Herstellungsmethode ermöglicht eine hohe Strukturflexibilität zur Verbesserung der optischen Eigenschaften. Theoretische Berechnungen des Extinktionsspektrums stimmen mit den experimentellen Ergebnissen überein. Es besteht eine große Abhängigkeit des Signals von der Nanostrukturhöhe. Die Tatsache, dass mit wachsender Quaderhöhe mehr Resonanzen beobachtet werden, beweist den Beitrag von Interferenzeffekten. Die verstärkte Extinktion im Vergleich zu planaren Filmen bei gleicher Metallisierungsdicke deutet auf zusätzliche plasmonische Effekte hin.

4.5.3.3 Skalierung der Geometrie

Zur Untersuchung des Einflusses plasmonischer Kopplungen werden Würfel mit 150 nm Kantenlänge ohne Verbindungsstege untersucht (150/150/150-150), d.h. die Struktur (300/300/300-300) wird um den Faktor 2 herabskaliert. Für kleinere Partikel erwartet man im Modell der Partikelplasmonen eine Verschiebung ins Blaue.

Im Extinktionsspektrum werden breite Peaks beobachtet (Abb. 114). Die Positionen der Peaks sind bei ca. 550 nm und 670 nm. Vergleicht man die skalierten Strukturen 150/150/150-150 und 300/300/300-300 je ohne Stege kann die Größenabhängigkeit der optischen Effekte ermittelt werden. Für beide Skalierungen werden mehrere Peaks im sichtbaren Spektralbereich beobachtet.

4 Ergebnisse und Diskussion

tet, deren spektrale Lage im Wellenlängenbereich unterhalb von 600 nm unabhängig von den Würfelkantenlängen ist (Abb. 114). Nur die Position des Peaks auf der langwellenlängigen Seite des Spektrums ist abhängig von der Nanostrukturabmessung. Der für die Struktur 300/300/300 beobachtete Peak bei 900 nm verschiebt sich für die herunterskalierte 150/150/150 Struktur ins Blaue zu 700 nm.

Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen für separierte kugelförmige Nanopartikel überein, dort handelte es sich um einen Interferenzeffekt, da bereits im Extinktionsspektrum der nicht metallisierten Partikel Peaks vorhanden waren.

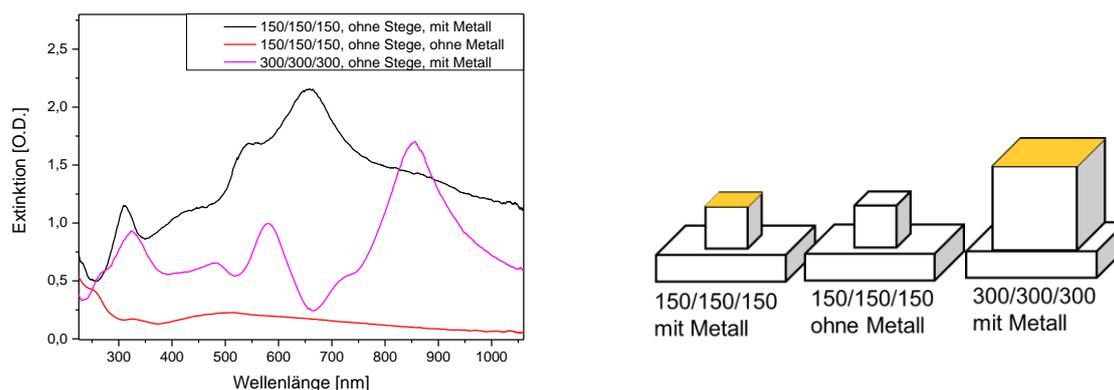


Abb. 114: Links: Vergleich der Extinktionsspektren von würfelförmigen metallisierten Strukturen ohne Verbindungssteg mit Metall für die 300 nm Würfelstruktur und mit und ohne Metall für die 150 nm Würfel. **Rechts:** Schematische Darstellung.

Einen wichtigen Hinweis auf die Signalursache liefert der Vergleich von metallisierten und nicht metallisierten Proben (Abb. 114). Durch das Metall wird die Extinktion erhöht. Die stark ausgeprägten Peaks um 600 nm entstehen in Folge der Metallisierung. Es handelt sich dabei nicht nur um eine Zunahme im Absorptionsquerschnitt durch die zusätzliche Metallschicht sondern vielmehr um lokalisierte plasmonische Anregungen, die zur Signalverstärkung führen. Die Peakform ist für Strukturen mit 300 nm Abmessungen klar erkennbar. Für Strukturen ohne Stege sind aufgrund der Linienform große Würfelstrukturen zu bevorzugen.

Im Rahmen der Mie-Theorie können Partikel, die kleiner als die Wellenlänge des verwendeten Lichtes sind als Dipol beschrieben werden. Der Peak bei langen Wellenlängen entspricht der Dipolresonanz.^[267] Im Modell der Plasmonenresonanz werden die Elektronen als freies Elektrogas beschrieben, das durch den positiven Hintergrund eine Rücktreibende Kraft erfährt. Die Polarisation des dielektrischen Materials reduziert die rücktreibende Kraft. Für große Nanopartikel ist die Resonanzenergie herabgesetzt und der Peak zu großen Wellenlängen verschoben.

Strukturen mit Stegen

Eine Skalierung der Struktur 300/300/300-300 mit Verbindungsstegen um den Faktor 0,5 bzw. 2 (Abb. 115) führt zu klaren, scharfen Spektren für die kleinste Strukturabmessung. Für Seitenlängen von 600 nm treten Peaks mit Schultern auf (Abb. 116, links).

4.5 Optische Eigenschaften elektronenstrahlolithographisch hergestellter Proben

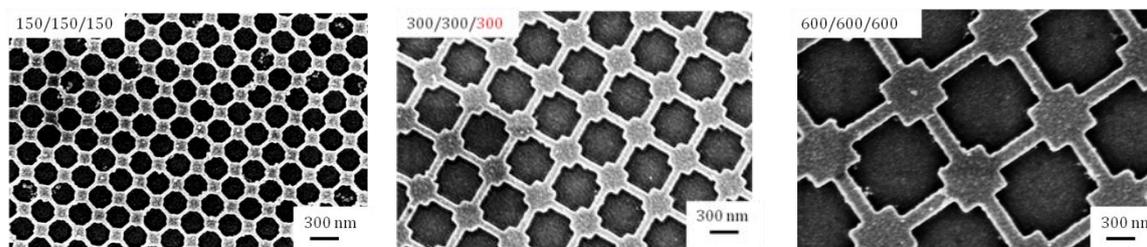


Abb. 115: Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme der Nanostrukturen bestehend aus mit Stegen in Verbindung stehenden Würfeln mit Variation der Dimensionen von 150 nm (**links**), 300 nm (**Mitte**) und 600 nm (**rechts**).

Ohne Metall

Bereits die Extinktionsspektren der Strukturen ohne Metallisierung zeigen mehrere Resonanzen im Spektrum (Abb. 116, rechts). Dies deutet erneut darauf hin, dass Interferenz zum Signal beiträgt. Die optische Dichte der nicht metallisierten Struktur 600/600/300-600 mit 2,5 O.D. ist am höchsten. Der Wert ist um den Faktor 5 höher als die optische Dichte des nicht metallisierten PMMA-Films gleicher Höhe.

Für diese Struktur ist nicht nur die Länge und Breite der Quader doppelt so groß, wie die ursprüngliche Teststruktur, sondern auch der Abstand der Nanopartikel verdoppelt. Zusätzlich zur Größe der Quader wurde also die Verbindungssteglänge und damit Abstände benachbarter Nanopartikel geändert. Dadurch ändert sich das Kopplungsverhalten der plasmonischen Anregungen. Aus diesem Grund wird der Einfluss der Verbindungssteglänge auf die Extinktion getrennt untersucht.

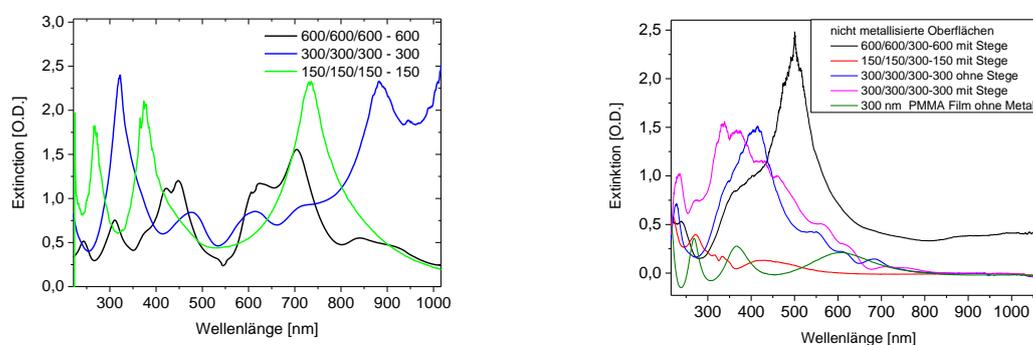


Abb. 116: Links: Extinktionsspektren skaliert metallisierter Nanostrukturen. Abhängigkeit der optischen Sensorantwort der Nanostrukturen bestehend aus Würfeln, die mit Stegen in Verbindung stehen, von der Dimension der Struktur von 150 nm (grün), 300 nm (blau) und 600 nm (schwarz). **Rechts:** Extinktionsspektrum nicht metallisierter Nanostrukturen. Die Strukturen sind unterschiedlich skaliert. Zum Vergleich ist das Extinktionsspektrum eines planaren nicht metallisierten Films der Höhe 300 nm dargestellt.

Abschließende Bemerkung

Durch die Untersuchung von Strukturen mit und ohne Verbindungsstege sowie durch die Skalierung der Strukturgeometrie konnten wichtige Erkenntnisse gewonnen werden. Die Peakposition ist unabhängig vom Vorhandensein von Verbindungsstegen. Die Peakposition könnte daher von Partikelplasmonen bestimmt werden. Durch Metallisierung isolierter Würfeln mit einer Kantenlänge von 150 nm wurde das Signal bei 600 nm deutlich verstärkt. Dies zeigt die Wichtigkeit von Partikelplasmonen auf die Signalentstehung.

4 Ergebnisse und Diskussion

Die Extinktionsspektren größerer Strukturen zeigen allerdings bereits für nicht metallisierte Nanopartikel eine hohe optische Aktivität. Das Verhalten beruht auf Interferenzen von gestreutem Licht am Gitter. Zusätzlich wurde beobachtet, dass die Extinktionsspektren mit Stegen schärfere Peaks aufweisen. Dies könnte ein Effekt von propagierenden Plasmonen in der oberen Metallschicht sein, die sich zwischen benachbarten Nanopartikeln ausbreiten. Im Folgenden wird zur Klärung die Verbindungssteglänge variiert. Auch die Untersuchung der Strukturen mit polarisiertem Licht kann Hinweise auf die Signalursache geben, dies wird in einem separaten Kapitel 4.5.3.8 behandelt.

4.5.3.4 Variation der Verbindungssteglänge

Gegenstand der Untersuchungen ist der Einfluss der Verbindungssteglänge auf die optischen Eigenschaften. Die Verbindungssteglänge wird ausgehend von der 300/300/300-300 Struktur und der halb so hohen 300/300/150 Struktur variiert. Die Steglängen betragen 150 nm, 300 nm, 600 nm und 900 nm (Abb. 117).

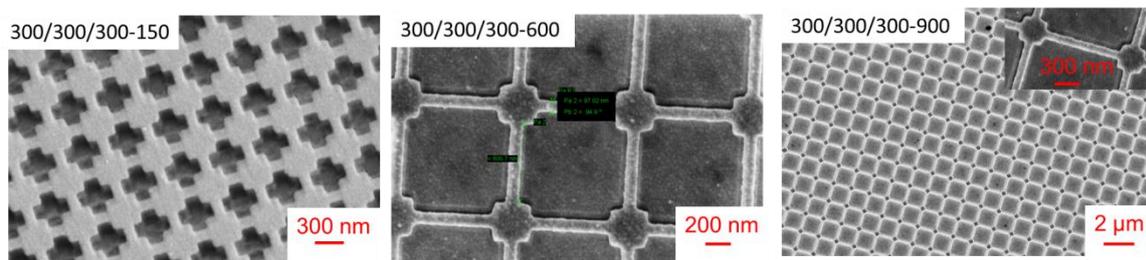


Abb. 117: Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme der Nanostruktur bestehend aus Würfeln mit der Kantenlänge von 300 nm, die mit unterschiedlich langen Stegen verbunden sind. Die Steglänge beträgt 150 nm (**links**), 600 nm (**Mitte**) und 900 nm (**rechts**).

Die Extinktionsspektren sind deutlich von der Verbindungssteglänge abhängig. Die Extinktion von Strukturen mit einer Steglänge von 150 nm unterscheidet sich von der Extinktion des geschlossenen PMMA-Films (Abb. 118, IV.) nur durch die Stärke der Peaks und minimal verschobene Peakpositionen. Die Struktur zeigt das Interferenzverhalten des dünnen Films, wobei die Intensität durch plasmonische Effekte infolge der Nanopartikelabmessungen verstärkt wird. Die Extinktion nimmt mit wachsender Steglänge ab, da die Oberfläche eine geringere Dichte von Nanostrukturen aufweist. Für Steglängen von 600 nm und 900 nm werden breite Peaks beobachtet (Abb. 118, I. und II.).

Die Verbreiterung von Peaks wurde auch für isolierte Nanopartikelkugeln mit wachsendem Abstand beobachtet. Hier liegt eine fest definierte Strukturgeometrie vor, es ist daher kein Effekt der Polydispersität. Breite Signale können auf eine erhöhte Dämpfung hindeuten. Eine mögliche Ursache ist Streuung.

Messung unter Flüssigkeit

Erfolgt die Messung unter Flüssigkeit spaltet sich der breite Peak in drei Peaks auf (Abb. 118, III.). Durch die Erhöhung des Brechungsindex in der Sensorumgebung werden die Randbedingungen geändert. Dies scheint für die elektronenstrahlolithographisch hergestellten Strukturen einen größeren Effekt zu haben als für Nanopartikelfilme.

4.5 Optische Eigenschaften elektronenstrahlolithographisch hergestellter Proben

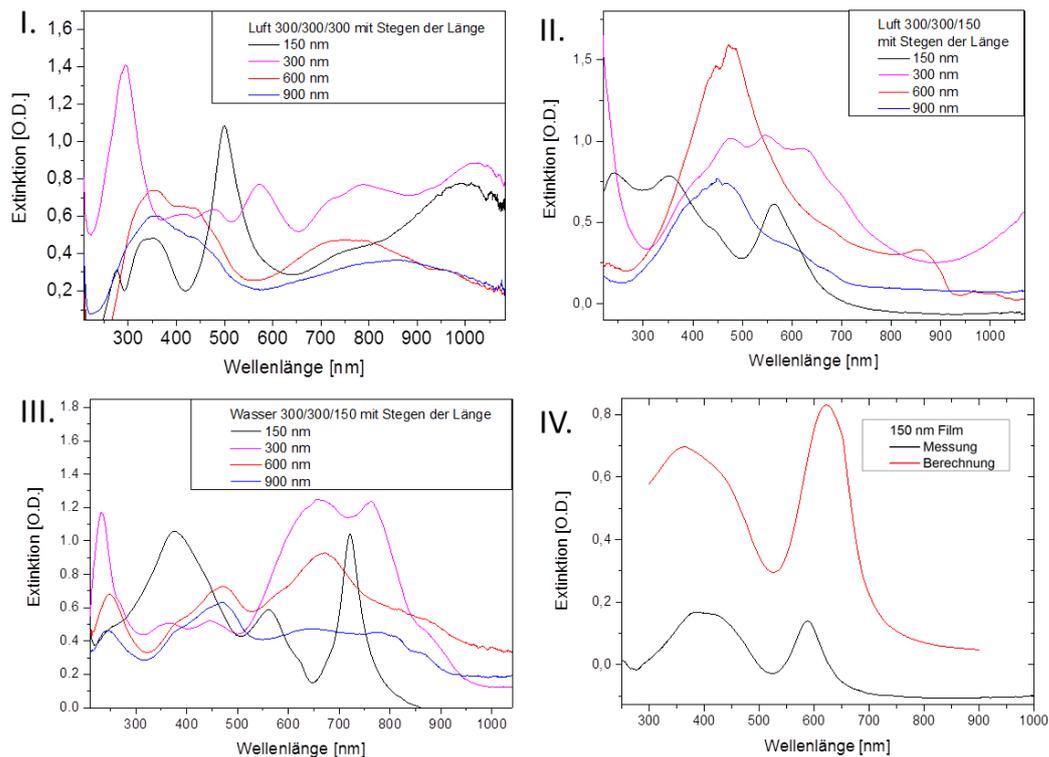


Abb. 118: Abhängigkeit der Extinktionsspektren von der Verbindungssteglänge für die Nanostruktur 300/300/300 (I.) im Medium Luft und 300/300/150 im Medium Luft (II.) und Wasser (III.). Die Steglänge beträgt 150 nm (**schwarze Kurve**), 300 nm (**mangane Kurve**), 600 nm (**rote Kurve**) und 900 nm (**blaue Kurve**). Der Lichteinfall ist parallel zur Probennormalen. IV. Extinktionsspektrum eines mit 30 nm Gold metallisierten PMMA-Films der Dicke 150 nm. Die schwarze Kurve wurde gemessen, die rote Kurve wurde mit RSOFT berechnet. Die Berechnung und Messung stimmen bezüglich der Resonanzlagen überein.

Abschließende Bemerkung

Es wurde gezeigt, dass die Verbindungssteglänge einen großen Einfluss auf die optischen Eigenschaften hat. Kürzere Stege führen zu deutlicher ausgeprägten Peaks. Auch im Fall von Kern-Schale-Nanopartikelfilmen führen kleine Partikelabstände im Hinblick auf die Linienform, Intensität und Halbwertsbreite der Peaks, zu besseren Spektren für sensorische Anwendungen. Die hergestellten Strukturen sind ein gelungenes Modell für Kern-Schale-Nanopartikelfilme. Für sensorische Anwendungen steht natürlich die Eignung zur in situ Detektion und eine hohe Sensitivität gegenüber Bindungsereignissen im Vordergrund.

4.5.3.5 Abhängigkeit vom Reflexionswinkel

Im Folgenden wird Abhängigkeit der Peakpositionen vom Reflexionswinkel und Brechungsindex untersucht, um einen magischen Winkel zu ermitteln. Anschließend werden Sensitivitätstests durchgeführt.

Die elektronenstrahlolithographisch hergestellten Strukturen sind aufgrund der bisherigen Untersuchungen für den Einsatz als Biosensor geeignet. Ein wichtiger Aspekt hierbei ist der magische Winkel. Hierzu werden die optischen Eigenschaften sowohl winkelabhängig als auch in Abhängigkeit vom Brechungsindex untersucht (Abb. 119).

Mit wachsendem Reflexionswinkel wird eine Verschiebung der Resonanzpeaks ins Blaue beobachtet. Die Änderung der Resonanzwellenlänge ist linear abhängig vom Reflexionswinkel und beträgt $-0,34 \pm 0,46 \text{ nm}/^\circ$. Im Vergleich zu Kern-Schale-Nanopartikeln ist die Abhängigkeit vom

4 Ergebnisse und Diskussion

Reflexionswinkel um den Faktor 10 geringer. Der Bereich, in dem Absorption stattfindet, kann durch die Einstellung des Winkels bestimmt werden. Anwendungen hierfür können optische Filter sein, z. B. um die Fluoreszenz von Farbstoffmolekülen gezielt zu löschen oder Signale aus einem Gemisch von Fluorophoren zu selektieren, die bei unterschiedlichen Wellenlängen emittieren. Anwendungen im Bereich der Sensorik können davon profitieren, dass die Position der Resonanz über einen Bereich von 500 nm gezielt eingestellt werden kann. So können mögliche Absorptionsbanden von Störkomponenten umgangen werden.

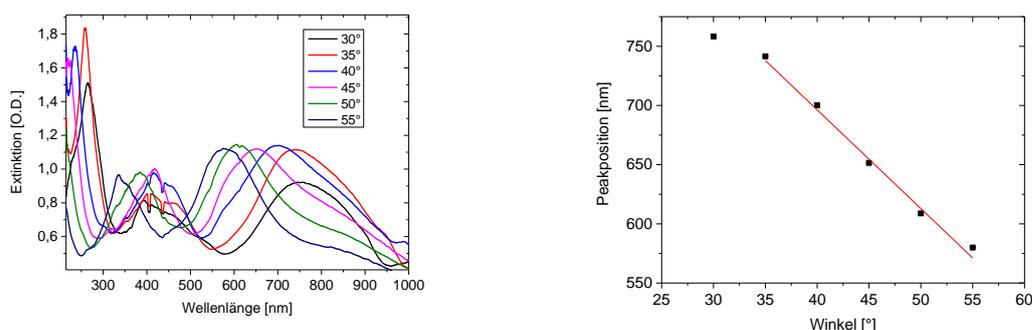


Abb. 119: Links: Extinktionsspektren der 300/300/300-300 Nanostruktur mit 100 nm breiten Stegen unter Variation des Reflexionswinkel von 30° bis 55° in 5°-Schritten zur Probenormalen für Probenorientierung 1. Rechts: Die Verschiebung des Peaks bei großen Wellenlängen im Extinktionsspektrum in Abhängigkeit vom Reflexionswinkel im Medium Luft.

4.5.3.6 Abhängigkeit vom Brechungsindex und Eignung zur *in situ* Detektion

Entscheidend ist der Einsatz der Sensoren unter Flüssigkeit. Zum Test der Sensitivität bezüglich der Volumenphase in der Sensorumgebung wurde die Oberfläche mit Flüssigkeiten von unterschiedlichem Brechungsindex bedeckt und das Extinktionsspektrum unter Lichteinfall entlang der Probenormalen gemessen. Zur Variation des Brechungsindex wurden Wasser und Glycerin-Wasser-Gemische eingesetzt. Das Absorptionsmaximum verschiebt sich bei Untersuchungen der nanostrukturierten Oberflächen unter Flüssigkeiten linear mit dem Brechungsindex. Die Peakposition wurde in Abhängigkeit vom Brechungsindex aufgetragen und die Kurve linear angepasst (Abb. 120, links). Die Proportionalitätskonstante gibt die Sensitivität gegenüber von Bulkbrechungsindexänderungen an. Für die Nanostruktur 150/150/150-150 ohne Stege beträgt die Sensitivität bezüglich der Volumenphase 413 ± 47 nm/RIU. Dies ist im Vergleich zu Oberflächen mit Kern-Schale-Nanopartikeln eine Steigerung um den Faktor 4. Die Sensitivität variiert in Abhängigkeit von der Geometrie der Nanostruktur und dem Reflexionswinkel des Lichtes (Abb. 121). Für Strukturen mit quadratischem Querschnitt der Kantenlänge 300 nm, die Verbindungsstege haben, wird ein magischer Winkel gefunden, unter welchem die Änderung des Extinktionsspektrums bei Variation des Brechungsindex der Flüssigkeit über der Probe vernachlässigbar ist. Strukturen ohne Stege haben keinen magischen Winkel. Es ist zu bemerken, dass der Peak für Luft leicht verschoben ist. Der magische Winkel gilt daher in einem kleineren Brechungsindexbereich.

4.5 Optische Eigenschaften elektronenstrahlolithographisch hergestellter Proben

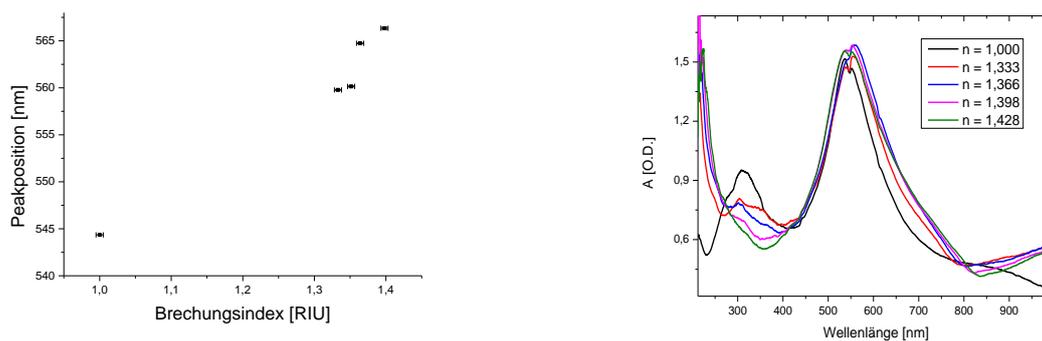


Abb. 120: Links: Peakposition als Funktion des Brechungsindex für die 150/150/150 Struktur ohne Stege mit Metall. Rechts: Extinktionsspektren unter dem magischen Winkel von Orientierung 1 der Nanostruktur 300/300/300-300 mit Stegen.

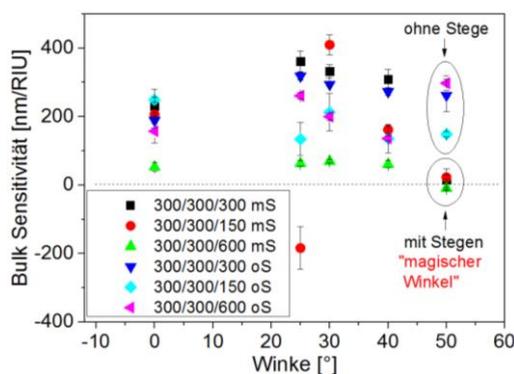


Abb. 121: Bulk-Sensitivität als Funktion des Reflexionswinkels für Nanostrukturen mit würfelförmigem horizontalen Querschnitt der Kantenlänge 300 nm mit (mS) und ohne Verbindungsstegen (oS) unter Höhenvariation von 150 nm (rot bzw. hellblau), 300 nm (schwarz bzw. grün) und 600 nm (blau bzw. pink).

Abschließende Bemerkung

Der magische Winkel ist eine entscheidende Voraussetzung für den Einsatz der Substrate zur *in situ* Detektion von Proteinadsorptionsprozessen. Durch den Adsorptionsprozess induzierte Verschiebungen des Extinktionspeaks dürfen nicht durch Signale überlagert werden, die durch Brechungsindexänderungen der wässrigen Phase hervorgerufen werden. Strukturen ohne Stege verfügen nicht über einen solchen Winkel. Aufgrund des linearen Zusammenhangs von Peakposition und Reflexionswinkel (Abb. 119) kann ausgeschlossen werden, dass der magische Winkel für diese Strukturen nur nicht getroffen wurde.

4.5.3.7 Messung und Modellierung der Sensitivität gegenüber Fibrinogen-Adsorption

Zum Test der Eignung der Nanostrukturen als biosensorisches Element wurde die Bindung des Modellproteins Fibrinogen an die Oberfläche detektiert. Nach dem Trocknen der Proben wurden die Extinktionsspektren an Luft gemessen. Durch Vergleich von Extinktionsspektren vor und nach Proteinadsorption wurde die Sensitivität des Biosensors bestimmt (Abb. 123). Für einen Reflexionswinkel von 0° wurde die Verschiebung mit RSOFT berechnet (Abb. 122 und 123). Die berechneten Spektren stimmen hinsichtlich der Peak Position mit den Messungen überein.

4 Ergebnisse und Diskussion

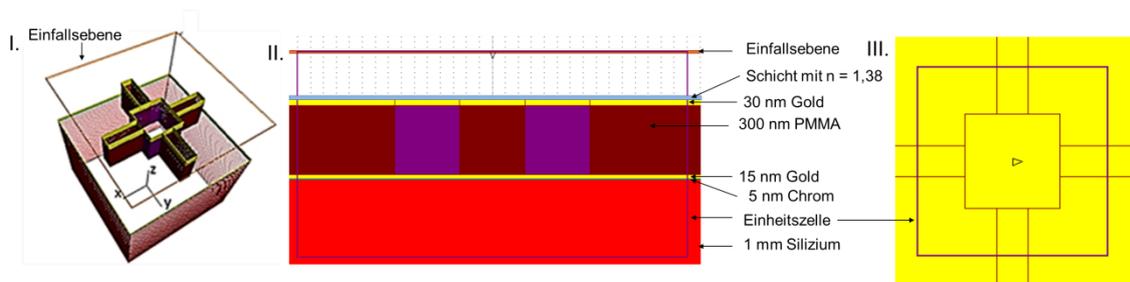


Abb. 122: Darstellung der verwendeten Geometrie zur Modellierung der Nanostruktur, Elementarzelle und Einfallsebene. Die Ansicht ist in **I.** 3 dimensional, in **II.** von der Seite und **III.** Sicht von oben.

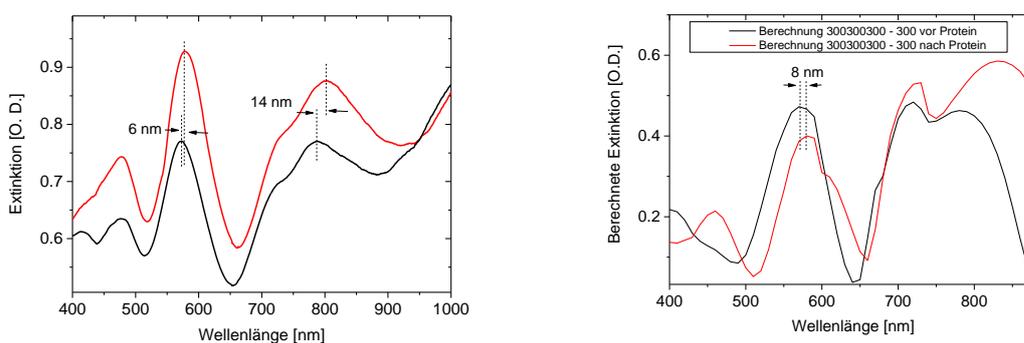


Abb. 123: Sensitivitätstest der Struktur 300/300/300-300 mit Stegen. **Links:** Verschiebung der Peaks durch Proteinadsorption, beobachtet im Medium Luft unter einem Einfallswinkel von 0° zur Probenormalen. **Rechts:** Berechnete Sensorantwort vor und nach Proteinadsorption für die Struktur 300300300-300 mit Verbindungsstegen. Die Berechnung erfolgte mit dem Programm RSOFT. Die Proteinschicht wurde als Film modelliert mit einem nicht wellenlängenabhängigen Brechungsindex von 1,38 und einer Dicke von 30 nm. Die Dicke wurde anhand von Ellipsometrie-Messungen auf planaren Oberflächen ermittelt.

Abweichung in der optischen Dichte können auf die Metallisierung der Strukturen zurückgeführt werden. Zum einen wurde die Rauheit nicht in den Berechnungen berücksichtigt, zum anderen wurde angenommen, dass eine Metallisierung der Struktur nur auf der Oberfläche erfolgt. Studien an Nanoschlitzten gezeigt,^[268] dass die Sensorantwort zu einem hohen Maße von der Metallisierung der Seitenwände der Nanostruktur abhängt. Bei den Anregungen handelt es sich um Fabry-Perot-Moden innerhalb der Schlitze in den horizontalen Hohlräumen. Zusätzlich besteht eine Abhängigkeit von der Neigung der Seitenwände. Eine kleine Neigung von wenigen Grad in den Wänden der Schlitze verursacht bemerkbar Wellenlängenverschiebungen und Intensitätsvariationen in den Spektren.

Die Peakpositionen von Berechnung und Messung stimmen gut übereinstimmen, das lässt auf die hohe Qualität der KNMF-Proben schließen.

Abhängigkeit der Sensitivität vom Reflexionswinkel

Die Untersuchungen im Medium Luft unter Variation des Reflexionswinkels und der Probenorientierung zeigen, dass die detektierten Peak-Verschiebungen in der gleichen Größenordnung wie für Kern-Schale-Nanopartikel liegen. Die Wahl des optimalen Winkels hängt vom Anwendungszweck ab. Soll die Kinetik *in situ* beobachtet werden, muss der magische Winkel gewählt werden. Ist lediglich eine *ex situ* Detektion durch Vergleich der Spektren vor und nach der Proteinadsorption im gleichen Medium gewünscht, kann der Winkel oder die Orientierung mit maximaler

4.5 Optische Eigenschaften elektronenstrahlolithographisch hergestellter Proben

Verschiebung genutzt werden. Die Maximale Verschiebung wird im Fall der Struktur 300/300/300-300 für den 2. Peak bei 20° und Probenorientierung 1 bzw. für den 3. Peak für Probenorientierung 1 beobachtet (Abb. 124). Es liegt kein Winkel vor, unter dem die Verschiebungen aller Peaks im Spektrum maximal werden.

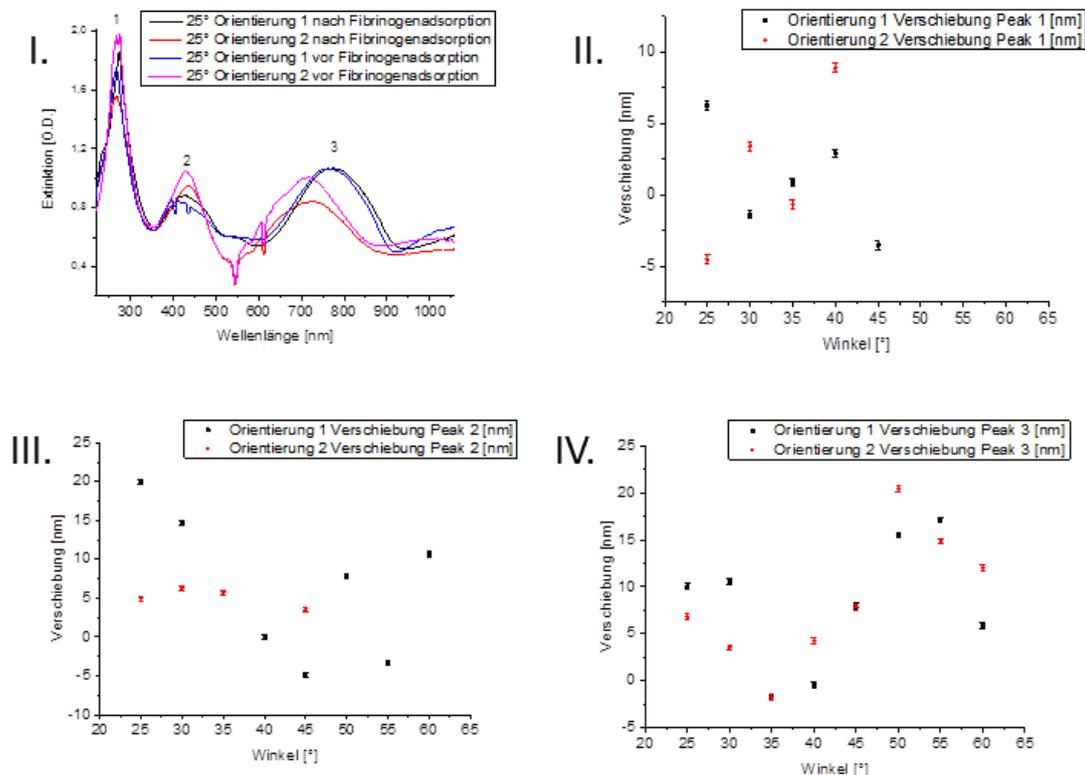


Abb. 124: I.: Verschiebung der Peaks durch Proteinadsorption für die Struktur 300/300/300-300 mit Stegen. Die Messung erfolgte im Medium Luft unter einem Einfallswinkel von 25° zur Probennormalen. II., III. und IV.: Dargestellt ist die Verschiebung des ersten (II.), zweiten (III.) und dritten (IV.) Peaks durch Proteinadsorption als Funktion des Winkels. Es wurden die Probenorientierungen 1 (schwarz) und 2 (rot) im Medium Luft gemessen. Die Verschiebung ist wesentlich abhängig von der gewählten Orientierung der Probe und dem Detektionswinkel. Die Maximale Verschiebung wird für den 2. Peak bei 20° und Probenorientierung 1 bzw. für den 3. Peak für Probenorientierung 1 beobachtet.

Messung unter Flüssigkeit

Zum Vergleich erfolgten Messungen unter Flüssigkeit. Hierzu wurden die Extinktionsspektren vor und nach der Adsorption von Fibrinogen im Medium Wasser verglichen. Es wurden Peakverschiebungen von mehr als 30 nm beobachtet (Abb. 125). Für kugelförmige Kern-Schale-Partikel war die Verschiebung unter Flüssigkeit im Vergleich zu Luft deutlich erniedrigt. Die Sensitivität unter Flüssigkeit konnte daher verbessert werden. Eine Messung unter dem Magischen Winkel der elektronenstrahlolithographisch hergestellten Struktur für den mittleren Peak ergibt eine Verschiebung von mehr als 5 nm.

4 Ergebnisse und Diskussion

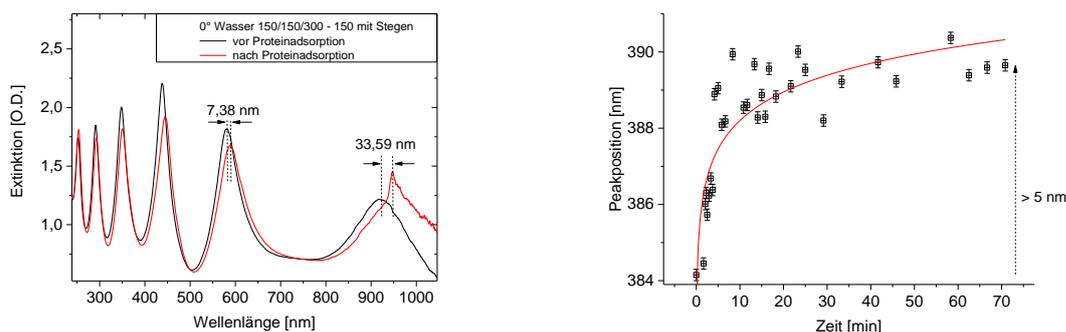


Abb. 125: Links: Verschiebung der Peaks durch Proteinadsorption für die Struktur 150/150/300-300 mit Stegen. Die Messung erfolgte im Medium Wasser unter Lichteinfall entlang der Probenormalen. Rechts: In situ Detektion unter dem magischen Winkel. Ausgewertet wurde der mittlere Peak, der unter dem magischen Winkel zu kleineren Wellenlängen als für 0° verschoben wurde.

Abschließende Bemerkung

Die Sensitivität hängt von mehreren Faktoren ab, nicht nur die Strukturabmessungen und Probenorientierung sondern auch der Detektionswinkel beeinflussen die Verschiebung, die infolge des Reflexionswinkels beobachtet wird. Hinzu kommt die Beobachtung, dass die elektronenstrahlolithographisch hergestellten Strukturen unter Wasser zum Teil sensitiver als an Luft sind. Ein wichtiger Aspekt dieser Experimente ist die Suche nach hohen Wellenlängenverschiebungen rund um den magischen Winkel, da dies eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Adsorption Prozesse garantiert und störende Volumeneffekte unterdrückt. Neueste Untersuchungen zeigen, dass die Empfindlichkeit gegenüber Protein-Adsorption auch kritisch vom Polarisationswinkel des Lichtes abhängen kann (ohne Abb.). Durch die große Anzahl an Parametern, die die beobachtete Sensitivität beeinflussen, sind theoretische Berechnungen unverzichtbar. Anhand eines vereinfachten Ansatzes, indem der Proteinfilm als homogen betrachtet wurde mit einem Brechungsindex von 1,38 RIU, konnten Verschiebungen im Medium Luft berechnet werden, die mit den experimentellen Beobachtungen vereinbar sind.

4.5.3.8 Einfluss der Polarisation des Lichtes

Eine weitere Verbesserung des Signals könnte durch Verwendung von polarisiertem Licht beobachtet werden. In diesem Teil der Arbeit werden die optischen Eigenschaften in Abhängigkeit von der Polarisierung des Lichtes untersucht. Dadurch können weitere Erkenntnisse zur Signalentstehung und Sensitivität gewonnen werden.

Kern-Schale-Nanopartikelfilme

Für Nanopartikelfilme, die aus nasschemisch metallisierten dielektrischen Partikeln bestehen, ist die Abhängigkeit von der Polarisationsrichtung vernachlässigbar (Abb. 126, I. und II.). Die Schwankungen der Optischen Dichte betragen 0,02 O.D. (Abb. 126, III.) und sind vermutlich auf den Polarisator zurückzuführen.

4.5 Optische Eigenschaften elektronenstrahlolithographisch hergestellter Proben

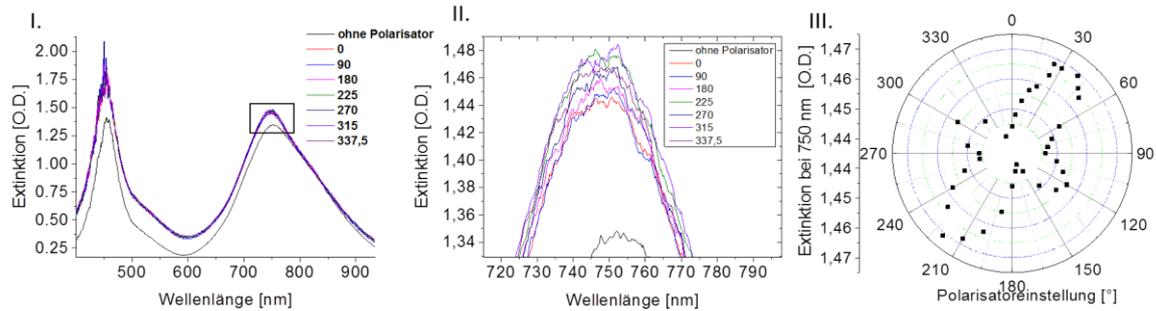


Abb. 126: I.: Darstellung der Abhängigkeit der Extinktionsspektren von der Polarisator-Einstellungen. Als Probe wurden nasschemisch metallisierte Silika-Nanopartikel untersucht. Die dielektrischen Partikel sind auf dem Substrat hexagonal dicht gepackt angeordnet. Das Substrat besteht aus einem Glasobjektträger, der mit 5 nm Titan und 100 nm Gold bedampft ist. II.: Vergrößerter Ausschnitt des markierten Bereichs von I. III.: Extinktion bei 750 nm in Abhängigkeit von der Polarisator Einstellung. Die Messungen erfolgen unter einem Reflexionswinkel von $55,6^\circ$, dem Brewster-Winkel von Glas, zur Probennormalen im Medium Luft.

KNMF-Strukturen

Das Signal der KNMF-Strukturen kann unter Verwendung von polarisiertem Licht verbessert werden. Es wurden Würfelstrukturen mit 150 nm und 300 nm Abständen mit Stegen betrachtet. Für geringere Abstände zwischen benachbarten Würfeln (Abb. 127, I.) ist s-polarisiertes Licht zu bevorzugen, für doppelt so große Abstände p-polarisiertes Licht (Abb. 128, links). Die optimale Polarisation ist dabei von der Nanostruktur abhängig. Für Strukturen ohne Stege ist die Abhängigkeit gering (Abb. 127, II). Für PMMA-Filme besteht keine Abhängigkeit der Extinktion von der Polarisation des Lichtes (Abb. 128, rechts). Es könnte sein, dass die Orientierung der Probe relativ zur Polarisationsrichtung eine Rolle spielt. Deshalb wurden die Proben auf einem Rotationstisch befestigt und die Extinktionsspektren bei fester Polarisationsrichtung und fester Probenorientierung (Orientierung 1) gespeichert.

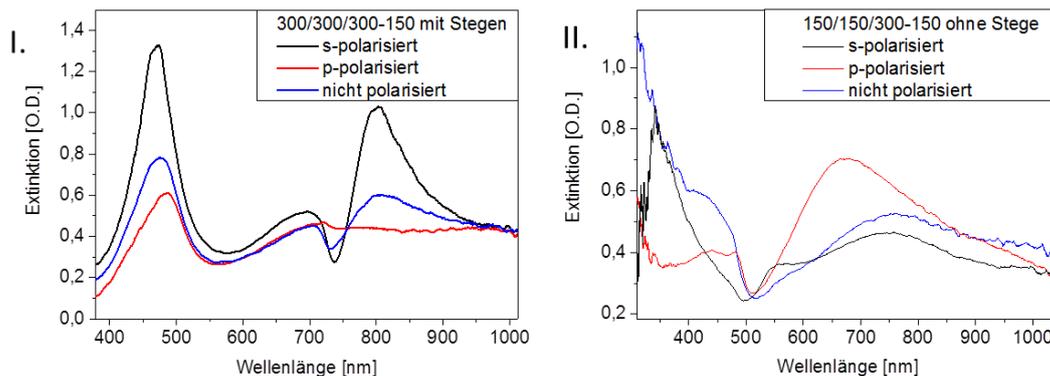


Abb. 127: Darstellung der Abhängigkeit der Extinktionsspektren der KNMF-Strukturen von der Polarisation des Lichtes. Dargestellt sind die Extinktionsspektren der Strukturen I. 300/300/300-150 mit Stegen und II. 150/150/300-150 ohne Stege. Die schwarzen Kurven sind bei s-polarisiertem Licht aufgenommen, die roten Kurven bei p-polarisiertem Licht und die blaue Kurve bei nicht polarisiertem Licht.

4 Ergebnisse und Diskussion

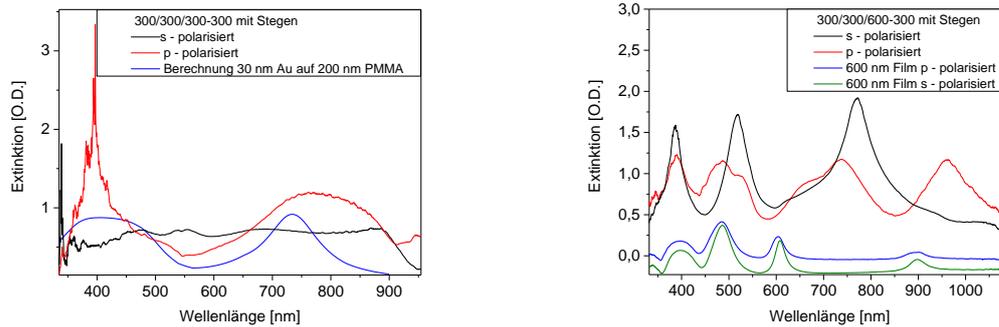


Abb. 128: Polarisationsabhängigkeit der Extinktionsspektren der Strukturen 300/300/300-300 (links) und der doppelt so hohen Struktur 300/300/600-300 (rechts). Die Sensorantwort eines 200 nm dicken PMMA-Films, der mit 30 nm Gold bedeckt ist wurde berechnet.

Effektive Filmdicke

P-polarisiertes Licht kann in zwei Komponenten aufgeteilt werden, parallel und senkrecht zur Probenoberfläche (Abb. 33). Die Komponente senkrecht zur Oberfläche kann zu Interferenzeffekten führen. Die Sensorantwort der 300/300/300-300 Struktur beobachtet mit p-polarisiertem Licht ließ sich durch eine effektive Filmdicke von 200 nm modelliert. Die Berechnung erfolgt mit RSOF. Dies bestätigt die Wichtigkeit von Interferenzeffekten. Der Feldvektor des s-polarisierten Lichtes ist parallel zur Oberfläche, daher könnten durch s-polarisiertes Licht Partikelplasmonen angeregt werden. Für die 300/300/300-300 Struktur liegen aber für s-polarisiertes Licht keine Peaks vor. Für die doppelt so hohe Struktur ist s-polarisiertes Licht günstiger, das heißt die Peaks sind für s-polarisiertes Licht besser ausgeprägt (Abb. 128, rechts).

Abschließende Bemerkung

Das Spektrum für nicht polarisiertes Licht ergibt sich aus der Überlagerung von den Spektren von s- und p-polarisiertem Licht. Die Linienform der KNMF-Strukturen kann unter Verwendung von polarisiertem Licht verbessert werden.

4.6 Anwendungen

4.6.1 SPR-Imaging im Arrayformat

Eine wichtige Anwendung ist der Einsatz der Nanopartikelfilme als Peptidchip zur markierungsfreien Detektion von biospezifischen Bindungsereignissen in hochdichten Peptidarrays. Als Nanopartikelfilm werden nasschemisch metallisierte Silika-Nanopartikel eingesetzt (Abb. 130). Polystyrol-Nanopartikel würden zerstört werden durch die organischen Lösungsmittel, die für den Übertrag von Peptidarrays auf die Oberfläche benötigt werden. Für die Aufnahmen wird der SPR-Imaging-Aufbau nach Güvenc^[59] eingesetzt.

Kontrast

Es werden Graustufenbilder von der Oberfläche für eine feste Wellenlänge gespeichert. Anschließend wird die untersuchte Wellenlänge in 5 nm Schritten erhöht und erneut ein Bild gespeichert. Der Bildkontrast ändert sich an den Stellen, an denen Moleküle auf der Oberfläche gebunden sind (Abb. 131). Die Ursache des Kontrastes ist die komplexe dielektrische Funktion. Diese steht in direktem Zusammenhang zu den Brechungsindexunterschieden zwischen Probenpositionen mit Peptid (Spot) und ohne Peptid (Hintergrund). Als Folge ergibt sich eine Änderung der reflektierten Intensität (Grauwert) am Ort des Adsorptionsprozesses.^[6] Im Folgenden wird gezeigt, dass anhand dieser Änderung die Adsorbatmenge auf den Kern-Schale-Nanopartikelfilmen quantifiziert werden kann.

Quantisierung der gebundenen Adsorbatmenge

Zur Quantisierung der gebundenen Adsorbatmenge ist zuerst eine Eichmessung nötig, die eine Abschätzung der Schichtdicke bzw. Massendichte auf der Grundlage des Intensitätsunterschiedes des Bildes erlaubt. Zu diesem Zweck werden Alkanthiol-SAMs mit unterschiedlicher Kettenlänge flächig an die Nanopartikelfilme gebunden. Es werden Nanopartikelfilme ohne Adsorbat sowie mit Butanthiol, Dodecanthiol und Octadecanthiol eingesetzt. Die drei Proben mit SAMs und der Nanopartikelfilm ohne SAM (vierte Probe) werden nebeneinander auf dem Probenhalter positioniert und mit SPR-Imaging gemessen. Auf jeder Probe werden zwei lateralen Probenpositionen zufällig gewählt und die Intensitäten als Funktion der Wellenlänge aufgetragen (Abb. 130, IV.).

Bei einer Wellenlänge von 900 nm nimmt die detektierte Intensität mit wachsender Adsorbatdicke zu. Die Quantisierung erfolgt durch Vergleich des Kontrastes im SPR-Imaging-Bild bei 900 nm mit der Peakverschiebung dem Extinktionsspektrum gemessen unter Lichteinfall entlang der Probennormalen (Tabelle 14). Hierzu werden vor und nach der Alkanthioladsorption die Extinktionsspektren unter Lichteinfall entlang der Probennormalen im Medium Luft gespeichert. Die Verschiebung der Peakpositionen wird bestimmt.

Tabelle 14: Übersicht über die Vorgehensweise zur Empfindlichkeitskalibrierung des SPR-Imaging-Aufbaus

Method	Messgröße	Empfindlichkeitskalibrierung
UV-VIS-Aufbau	Peakverschiebung im Extinktionsspektrum	XPS ^[69]
Hier: SPR-Imaging	Intensität	UV-VIS-Aufbau

4 Ergebnisse und Diskussion

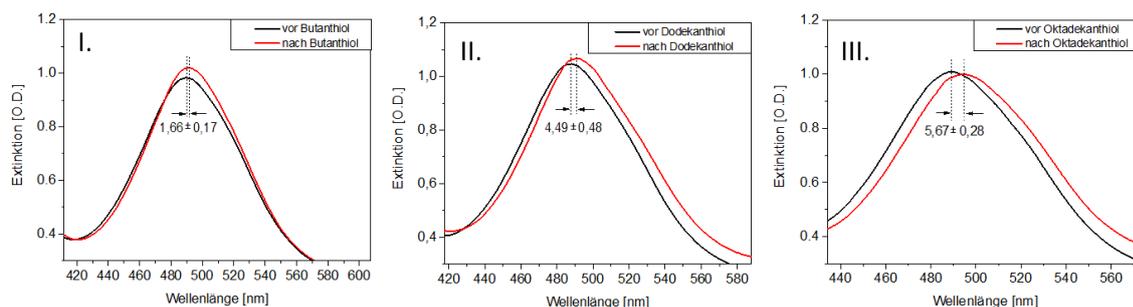


Abb. 129: Extinktionsspektren vor und nach der Adsorption von Alkanthiolen: I. Butanthiol, II. Dodekanthiol III. Oktadekanthiol.

Die Intensität des SPR-Imaging-Bildes bei 900 nm vergrößert sich linear mit der wachsenden Filmdicke. Die Filmdicke wird über die Verschiebung der Peakposition im Extinktionsspektrum ermittelt. Die Steigung der Ausgleichsgeraden im Plot der Intensität als Funktion der Verschiebung der Resonanzwellenlänge wird mit Origin angepasst (Abb. 130, V.). Die Intensitätsänderung pro 1 nm Verschiebung beträgt $0,011 \pm 0,001$.

Der Eichwertfaktor zwischen Massenbelegung und Resonanzpositionsänderung wurde bereits in einer früheren Arbeit aus dem Vergleich mit XPS-Daten gewonnen.^[9] Demnach entspricht eine Verschiebung um 1 nm einer Massendichte von $29 \pm 13 \text{ ng/cm}^2$.

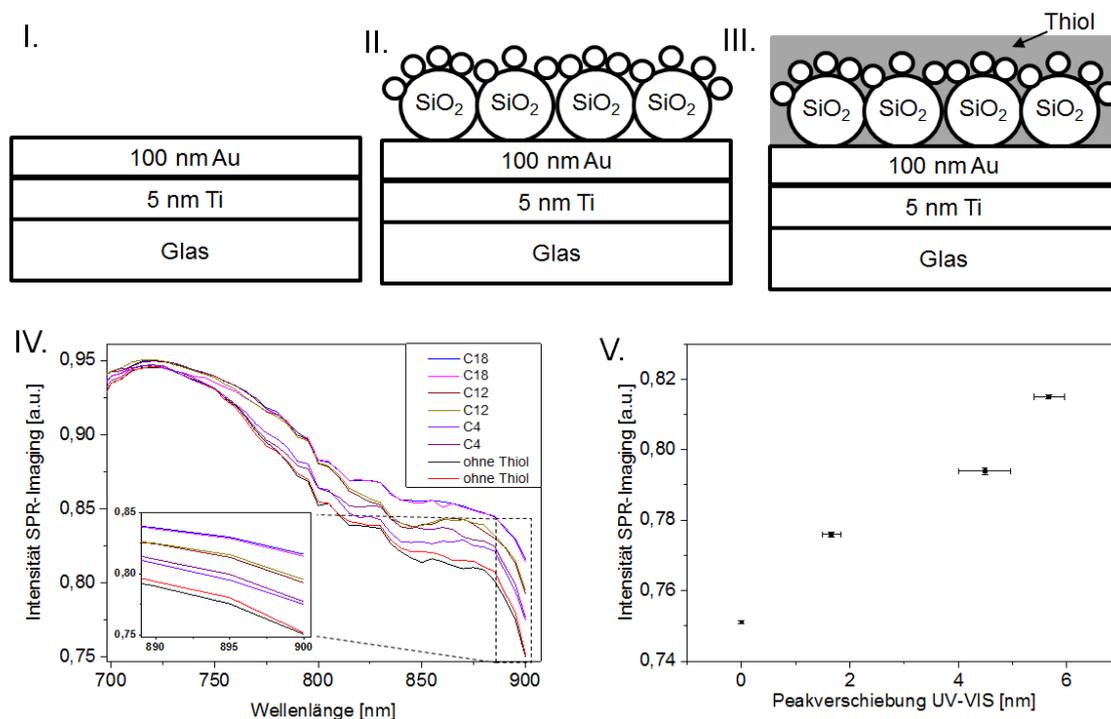


Abb. 130: Oben: Schematische Darstellung der Referenz für die Extinktionsaufnahmen (I.) sowie der Probe vor (II.) und nach (III.) der Adsorption des Alkanthiol-SAMs. Es werden Alkanthiole mit unterschiedlicher Kettenlänge eingesetzt. Unten: IV.: SPR-Imaging-Spektren von Alkanthiolen mit unterschiedlicher Kettenlänge an je zwei verschiedenen Probenpositionen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm HAUTE_CUISINE von Dr. J. Wagner. Die Integrationszeit betrug 2 s. Alle 5 nm wurde ein Bild gespeichert. V.: Plot der Intensität der SPR-Aufnahme bei 900 nm als Funktion der Peakverschiebung in den Extinktionsspektren. Letztere wurden mit dem UV-VIS-Aufbau für senkrechten Lichteinfall gemessen. Alle Messungen erfolgten in Medium Luft. Der Zusammenhang ist linear.

4.6 Anwendungen

Um die Leistungsfähigkeit des Biosensors zu untersuchen werden anschließend Peptide in einem hoch-komplexen Arrayformat auf die Nanopartikelfilme übertragen (für Details siehe Kapitel 3.6) und die SPR-Spektren ermittelt (Abb. 131). Der mittlere Intensitätsunterschied zwischen Spot und Hintergrund bei 900 nm beträgt $0,0201 \pm 0,0098$. Es wurde über vier Spots gemittelt. Dies entspricht einer Wellenlängenverschiebung von 2 nm. Der SPR-Imaging-Aufbau kann daher zur Quantisierung von Adsorptionsprozessen im Arrayformat eingesetzt werden.

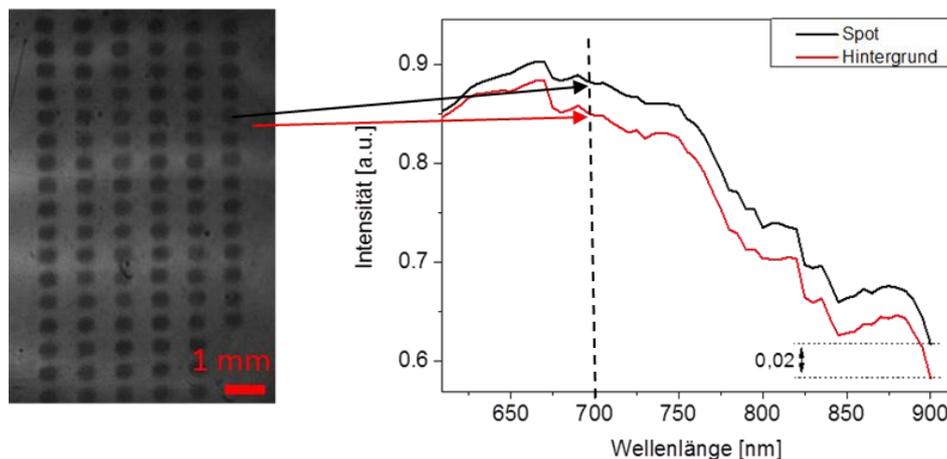


Abb. 131: Links: Beispiel einer SPR-Imaging Aufnahme des Peptidarrays (hier 700 nm). Rechts: SPR-Imaging-Spektren von Peptidspot (schwarze Kurve) und Hintergrund (rote Kurve). Der Hintergrund ist der Nanopartikelfilm ohne Peptid. Die Intensität wird gemessen in Grauwerten. Aus der abgelesenen Intensitätsdifferenz zwischen Spot und Hintergrund bei 900 nm kann die absorbierte Massendichte bestimmt werden.

Abschließende Bemerkung und Ausblick

Es konnte gezeigt werden, dass anhand des Kontrastes der SPR-Imaging-Aufnahme bei 900 nm Bindungsereignisse in Peptidarrays quantifiziert werden können. Warum gerade bei dieser Wellenlänge ein linearer Zusammenhang zwischen gebundener Massendichte und Grauwerten besteht, konnte nicht geklärt werden. Vermutlich liegt es daran, dass die Kern-Schale-Nanopartikel bei dieser Wellenlänge ein Maximum im Extinktionsspektrum haben (vergleiche Abb. 75).

Die Detektion von Bindungsprozessen ist möglich, da die Pixel des CCD-Detektors bei modernen Geräten simultan ausgelesen werden. Hierzu müsste bei einer Wellenlänge von 900 nm die Intensität als Funktion der Reaktionszeit ermittelt werden. In naher Zukunft sollte dieses Experiment durchgeführt werden.

4.6.2 Fluoreszenzmessungen mit Lokalisationsmikroskopie

Zur Untersuchung hoch-dichter Arrays ist eine hohe Ortsauflösung erforderlich. Eine Auflösung bis auf das Einzel-Molekül-Niveau wird mit der Lokalisationsmikroskopie erreicht. Drei Aspekte der Lokalisationsmikroskopie werden untersucht: es wird das Anwendungspotential der Lokalisationsmikroskopie als integriertes Verfahren zur Qualitätskontrolle, die Möglichkeit zur Kalibration von Fluoreszenzmikroskopen und der Einsatz im Hinblick auf die medizinische Diagnostik aufgezeigt.

Hierzu werden mit lithographischen Methoden, Elektronenstrahl-Lithographie und mizellarer Blockcopolymer Nanolithographie Oberflächen strukturiert und nanoskalige Adsorptionsplätze für Alexa-Moleküle geschaffen und diese ortsaufgelöst abgebildet. Die Bindung der Farbstoffe erfolgt teils elektrostatisch teils kovalent durch nukleophile Substitution an feste amino-terminierte Träger.

4.6.2.1 Kalibrationstest des Mikroskops

Zuerst erfolgt ein Kalibrationstest des SPDM-Mikroskops. Hierzu werden die elektronenstrahlithographisch hergestellten Strukturen eingesetzt (Abb. 132). Es werden zwei Proben mit unterschiedlichen Abmessungen verwendet: die Struktur 600/600/600-600 mit 170 nm breiten Stegen und die Struktur 300/300/300-300 mit 100 nm breiten Stegen. Die Kalibration erfolgt durch den Vergleich der Abmessungen in den lokalisationsmikroskopischen Aufnahmen und den Rasterelektronenmikroskop-Bildern.

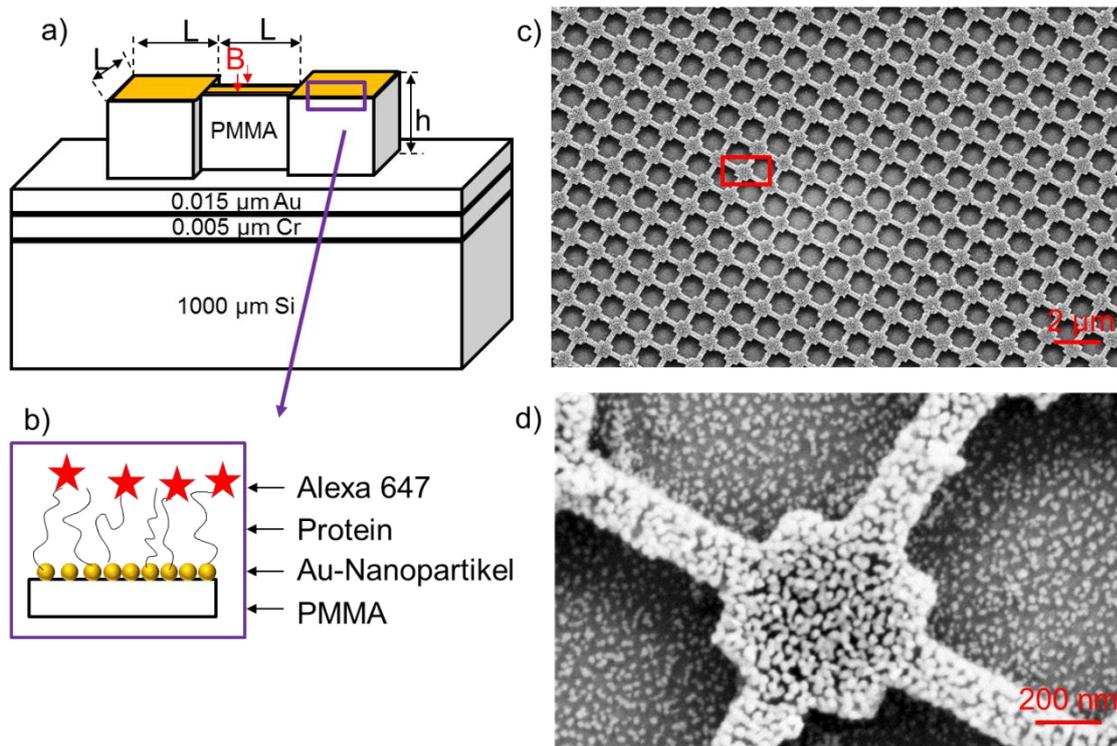


Abb. 132: **a)** Schemazeichnung der elektronenstrahlithographisch hergestellten Struktur, **b)** vergrößertes Bild von a). **c)** Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme der nasschemisch metallisierten mittels Elektronenstrahlithographie hergestellten Würfel mit der Kantenlängen 600 nm, die über genauso lange aber nur ein Drittel so breite Stege in Verbindung stehen, **d)** vergrößertes Bild von c).

Das Lokalisationsbild wird aus einem Bilderstapel von 10 000 Einzelaufnahmen rekonstruiert. Zu jeder Lokalisationsaufnahme wird eine Weitfeld-Aufnahme abgespeichert (Abb. 133, links). Die 100fache Vergrößerung der Probe durch das Ölimmersion-Objektiv verdeutlicht anhand der Weitfeldaufnahme die hohe Qualität der Strukturierung. Die Strukturlänge pro Einzelstruktur von 600 nm wird korrekt abgebildet. Eine Alternative zum Ausmessen der Strukturängen im Weitfeldbild bietet die Intensitätsverteilung des Weitfeldbildes entlang der x-Koordinate des Bildes. Die Intensität des Laserstrahls ist gaußverteilt mit einer Halbwertsbreite von $(8,58 \pm 0,29) \mu\text{m}$ und zeigt Modulationen. Die Modulation der Intensität wird durch die Streuung des Lichtes am betrachteten Objekt bewirkt. Der Abstand benachbarter Maxima entspricht dem Abstand benachbarter Stegmittelpunkte ($1,2 \mu\text{m}$) (Abb. 133, rechts).

4.6 Anwendungen

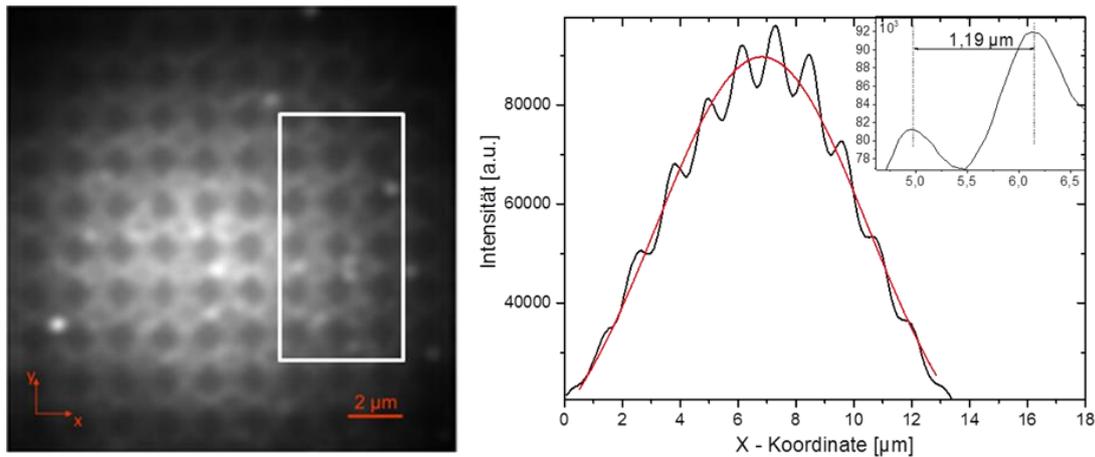


Abb. 133: Links: Dargestellt ist die Weitfeldaufnahme der elektronenstrahlolithographisch hergestellten Struktur. Der weiß umrandete Bereich ist in Abb. 134 dargestellt. Sieben Struktur­längen, gemessen in drei verschiedenen lateralen Bildbereichen ergaben im Mittel $(65,80 \pm 0,74)$ Pixel, das entspricht $600,20 \pm 5,66$ nm pro Einzelstruktur. **Rechts:** Intensitätsverteilung des Weitfeldbildes entlang der x-Koordinate. Die Modulation der Intensität entspricht dem Abstand benachbarter Stegmittelpunkte ($1,2 \mu\text{m}$).

Die Auflösung des Weitfeldbildes genügt nicht um die Breite der Verbindungsstege aufzulösen (Abb. 133). Die Lokalisationsaufnahmen (Abb. 134, a) und b)) sind nicht beugungslimitiert. Sie ermöglichen eine Lokalisation der Fluorophore mit einer mittleren Lokalisationsgenauigkeit von 6 nm. Die Auswertegenauigkeit folgt einer gaußförmigen Verteilung (Abb. 134, c)). Dies ist nach dem zentralen Grenzwertsatz zu erwarten, da eine große Anzahl von unabhängigen Ereignissen vorliegt. Die Auswertung der Lokalisationsaufnahmen erfordert einen korrekten Schwellwert, der Signale durch gebundene Farbstoffmoleküle vom Rauschen trennt. Hierzu wird die Anzahl der Fluoreszenzereignisse anhand der ersten 20 Einzelaufnahmen gezählt und die Gesamtanzahl der Fluoreszenzereignisse abgeschätzt. Die korrekte Dichte an Ereignissen erhält man mithilfe des Schwellwertes 4. Allerdings werden nur wenige Blinkereignisse detektiert. Diese zeichnen sich durch eine hohe Photonenzahl von $(4,2 \pm 0,3) \cdot 10^3$ aus. Deshalb können die Intensitätsverteilungen der Ereignisse mit großer Genauigkeit angepasst werden.

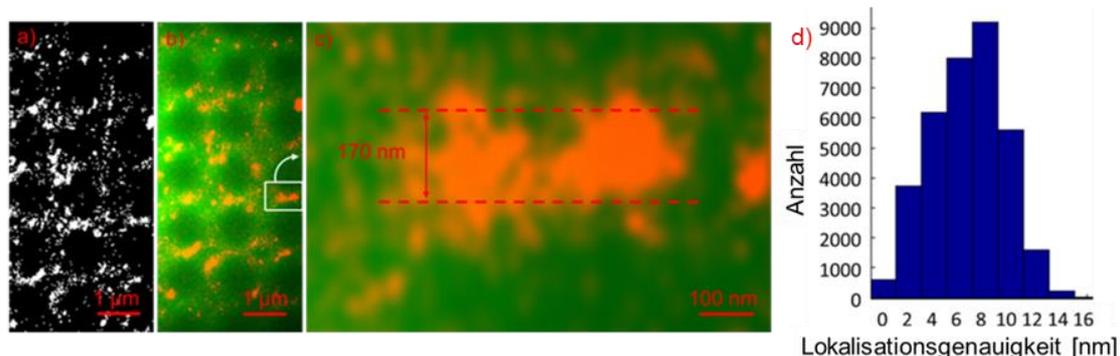


Abb. 134: Dargestellt ist **a)** die Lokalisationsaufnahme, **b)** die Überlagerung aus Weitfeld- (**grün**) und Lokalisationsaufnahme (**orange**) der mit Alexa 647 markierten elektronenstrahlolithographisch hergestellten Strukturen und **c)** der vergrößerte Bildausschnitt. Als Einbettmedium wurde ProLong®Gold verwendet. Die Integrationszeit betrug 227 ms. Es wurde ein Bildstapel aus 10000 Einzelaufnahmen gemessen. Die maximale Intensität von 212 mW wurde mit Filter 5 abgeschwächt. Die Auswertung erfolgte mit Schwellwert 4. d) Histogramm der Lokalisationsgenauigkeit aller Ereignisse.

Der Grund für die geringe Dichte an detektierbaren Fluorophoren ist der helle Hintergrund. Bei jeder Einzelaufnahme ist das Gitter analog zur Weitfeldaufnahme zu sehen und verursacht den

4 Ergebnisse und Diskussion

hellen Hintergrund. Das Gitter bietet allerdings auch einen Vorteil, da im Fall von Drift, die Verschiebung der Einzelaufnahmen gegeneinander korrigiert werden kann. Für die Messung der Probe trat eine deutliche Drift auf, die automatisch² anhand des Gitters der Weitfeldaufnahme korrigiert werden kann. Diese Methode ermöglicht das Erstellen einer neuen Orte-Matrix, in der die driftkorrigierten Intensitätsinformationen enthalten sind. Nach der Driftkorrektur kann die Gitterstruktur anhand der Fluoreszenzaufnahmen rekonstruiert werden (Abb. 135, II.).

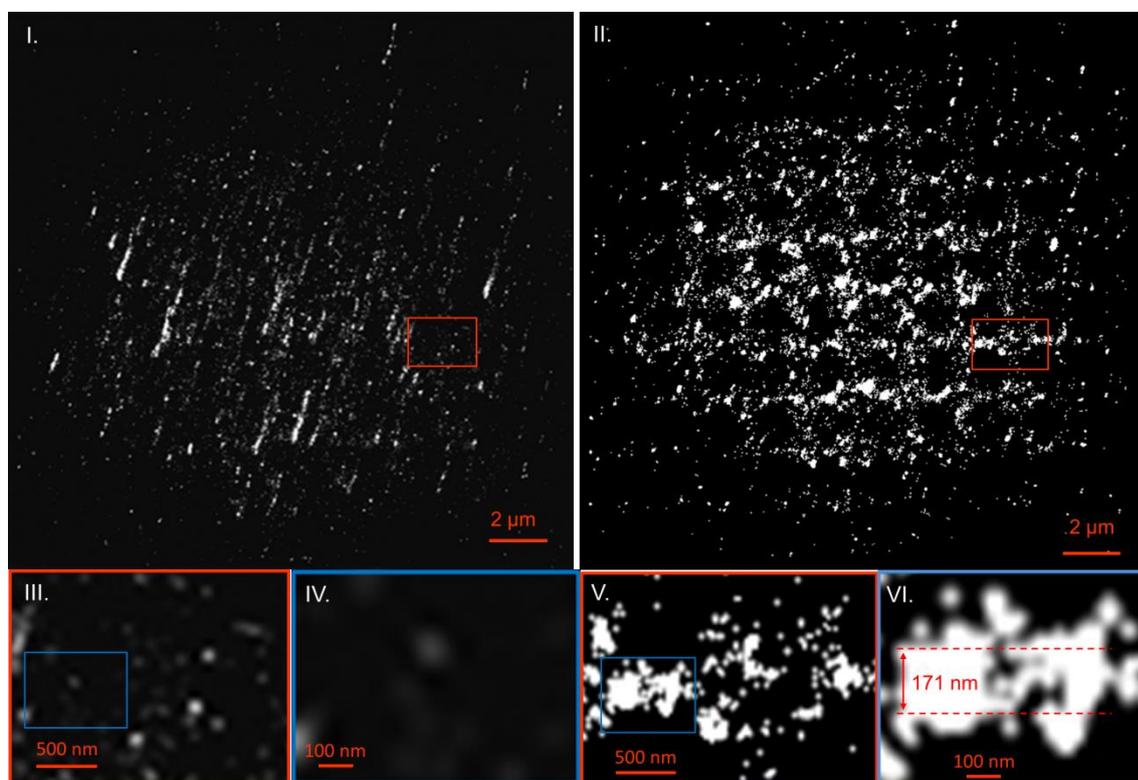


Abb. 135: Darstellung der detektierten Fluoreszenzereignisse vor (I.) und nach (II.) automatischer Driftkorrektur. III. und IV. sind vergrößerte Ausschnitte, je markiert mit einer roten bzw. blauen Box, aus I. Die Bilder V. und VI. sind entsprechende Vergrößerungen aus II.

Wählt man zu Demonstrationszwecken den Schwellwert bewusst zu niedrig, so führt z.B. eine Halbierung des Schwellwertes auf 2 zur Detektion photonenschwacher Ereignisse, die sich zwischen benachbarten Würfeln befinden (Abb. 136, Tabelle 15). Diese können durch Rauschen oder dort gebundene, 600 nm tiefer liegende, Farbstoffmoleküle ausgelöst werden.

Tabelle 15: Vergleich der Ergebnisse der Auswertung mit Schwellwert 2 und 4

Schwellwert	2	4
Mittlere Lokalisationsgenauigkeit [nm]	11,83	5,51
Mittlere Anzahl detektierter Photonen pro Ereignis	$(2,70 \pm 0,21) \times 10^3$	$(4,39 \pm 0,32) \times 10^3$

Zur Überprüfung wird mithilfe eines Piezoelementes die Fokusebene des Laserstrahls um 600 nm nach oben und unten verschoben. In beiden Ebenen können keine Blinkevents detektiert werden. Das heißt nur die Fluorophore auf der Struktur blinken und Signale zwischen den Stegen sind

² Das Programm wurde in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Dr. C. Cremer von Martin Hagmann geschrieben.

4.6 Anwendungen

Rauschen. Die mittlere Lokalisationsgenauigkeit unterscheidet sich um den Faktor 2, weil sich die Anzahl der Photonen pro detektiertem Ereignis stark auf die Lokalisationsgenauigkeit auswirkt (Formel 34).

Die Auswertung der Lokalisationsdaten mit Schwellwert 2 führt zu einer breiten Verteilung der Lokalisationsgenauigkeit (Abb. 136). Alle Signale mit höherer Lokalisationsgenauigkeit als 10 nm können auf Rauschen zurückgeführt werden, aufgrund ihrer geringeren Photonenzahl pro Ereignis. Der Schwellwert von 4 war daher korrekt.

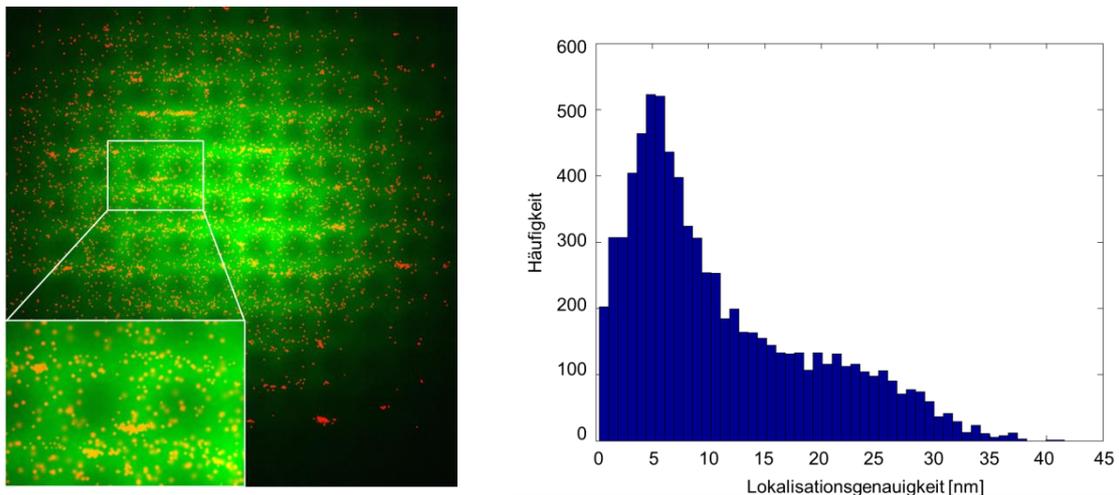


Abb.136: Links: Weitfeld- (grün) und Lokalisationsaufnahme (rot) der mit Alexa 647 markierten elektronenstrahlolithographisch hergestellten Strukturen. Für die Auswertung wurde der Schwellwert 2 gewählt. **Rechts:** Histogramm der Lokalisationsgenauigkeit der einzelnen Fluoreszenzereignisse.

Skalierte Struktur

Mit einer zweiten Struktur, deren Abmessungen um den Faktor zwei kleiner sind (Abb. 137, I.), wird analog verfahren. Die beobachtete Drift war bei dieser Messung vernachlässigbar klein. Das Ausmaß der Drift ist vom Messtag abhängig. Zur Vermeidung von Verschiebungen durch temperaturbedingte Längenausdehnungen der Mikroskopbestandteile, ist es von Vorteil nicht zu Beginn des Labortages und nicht bei zu hohen Raumtemperaturen zu messen. Zur Überprüfung der Kalibration werden die Strukturmaße, die anhand der Rasterelektronenmikroskopaufnahme ermittelt werden, mit den Abmessungen in den Fluoreszenzaufnahmen verglichen. Die Quader sind 600 nm hoch und 276 ± 7 nm breit und lang. Die Verbindungsstege sind genauso hoch aber nur 94 ± 5 nm breit. Als Gitterkonstante sei die Länge der Verbindungsstege plus die Breite der Quader definiert. Die Breite und Länge wird aus der Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme mit 615 ± 7 nm abgelesen. Anhand der Weitfeldaufnahme (Abb. 137, II.) kann die Gitterperiode in Übereinstimmung mit der Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme (Abb. 137, I.) zu 600 ± 30 nm bestimmt werden.

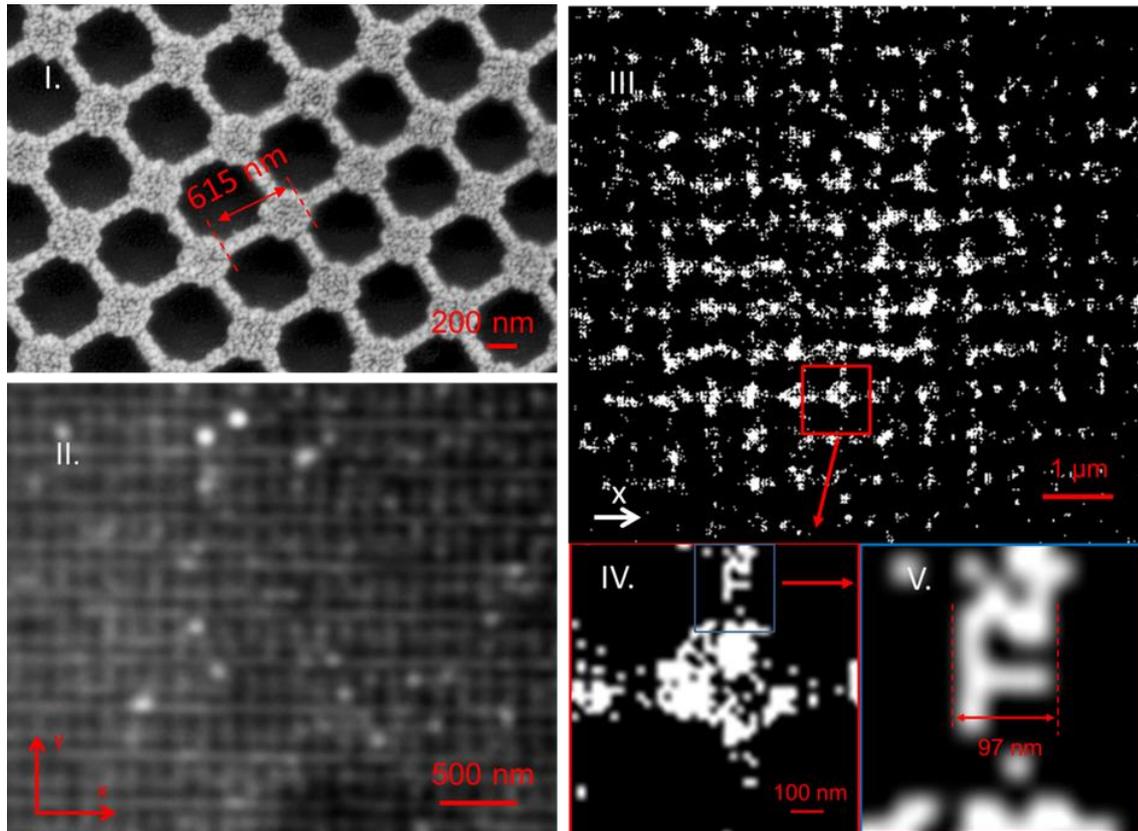


Abb. 137: I. REM-Aufnahme der um den Faktor 2 herabskalierten Struktur II. Weitfeld-Aufnahme und III. Lokalisations-Aufnahme der um den Faktor 2 herabskalierten Struktur. Die mit roten und blauen Kästen markierten Bereiche sind in IV. und V. vergrößert.

Eine genauere Analyse von Strukturgröße und Gitterkonstante ist durch die Intensitätsverteilung der Aufnahmen entlang der x -Koordinate von Weitfeld- und Lokalisationsaufnahme möglich (Abb. 138). Diese wird durch Summieren der Fluoreszenzereignisse als Funktion der x -Koordinate ermittelt und besteht aus mehreren Peaks, die den Quadern entsprechen. Die Halbwertsbreite der gaußförmigen Anpassung der Maxima erfolgt mit Origin nach dem Levenberg-Marquardt-Algorithmus und ergibt eine obere Grenze für die Strukturgröße. Der Peak-zu-Peak-Abstand entspricht dem Mittenabstand benachbarter Quader. Die Abmessungen, die sich aus der Lokalisationsaufnahme ergeben, liegen näher an den elektronenstrahlmikroskopisch bestimmten Werten als die entsprechenden Werte aus der Weitfeldaufnahme. Letztere sind beugungsbegrenzt.

4.6 Anwendungen

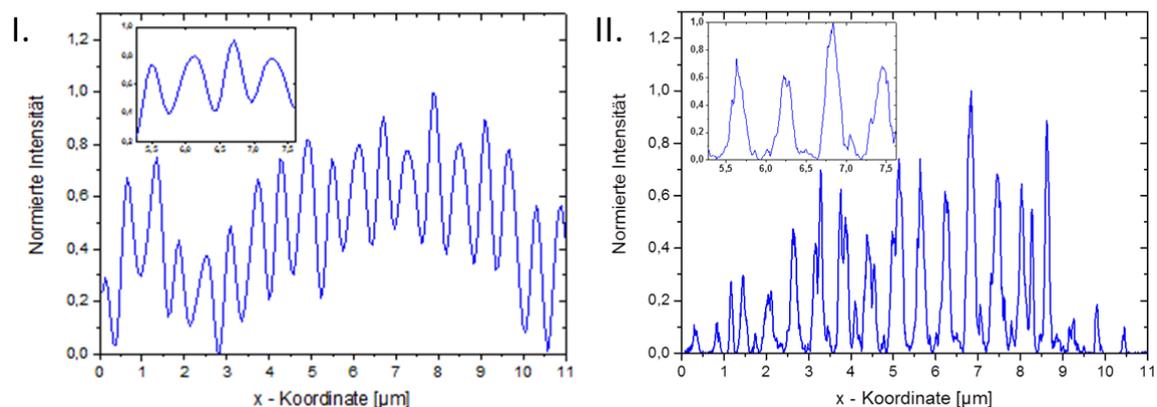


Abb. 138: Dargestellt ist die normierte Intensitätsverteilung der Weitfeld- (I.) und Lokalisationsaufnahme (II.) als Funktion der x-Koordinate. Die Intensitätswerte der einzelnen Pixel wurden hierzu für festgehaltene x-Koordinate der Bilder summiert. Die Halbwertsbreite der Modulation der Intensität aus der Lokalisationsaufnahme von $(217 \pm 29 \text{ nm})$ ist kleiner als der entsprechende Wert aus den Weitfeldaufnahmen ($401 \pm 84 \text{ nm}$). Der Peak-zu-Peak-Abstand im Intensitätsplot I. der Weitfeldaufnahme ist $590,0 \pm 9,4 \text{ nm}$ und im Intensitätsplot II. der Lokalisationsaufnahme ergeben sich $603,3 \pm 9,8 \text{ nm}$.

Es ist interessant, dass die meisten Signale auf der Struktur-Oberfläche liegen. Der Kontrast in den Lokalisationsaufnahmen kommt dadurch zustande, dass im Raum zwischen den Nanostrukturen keine oder wenige fluoreszierende Signale detektiert werden, deren Intensität im Bereich des Photonenrauschens liegt. Für diese ungleichmäßige Verteilung gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten. Einen wichtigen Hinweis könnte die inhomogene Verteilung der nasschemisch bei einer Inkubation von 48 Stunden abgeschiedenen Nanopartikel liefern (Abb. 139).

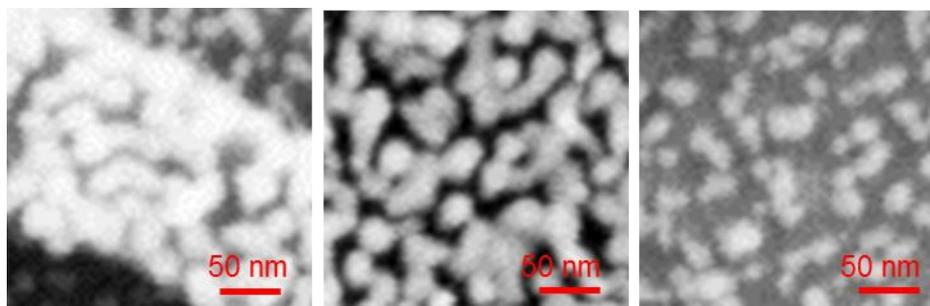


Abb. 139: Vergleich der Dichteverteilung der Goldnanopartikel auf den Verbindungsstegen der Struktur (links), dem Zentrum der Würfel (Mitte) und der Substratoberfläche zwischen den Quadern (rechts). Alle REM-Bilder sind Vergrößerungen der Abb. 132 (d).

Bedingt durch die Tiefe der Struktur bei einem Wasserkontaktwinkel von mehr als 100° ist die Anzahl der Nanopartikel pro Fläche auf dem Substrat reduziert. Hinzu kommt das Adsorptionsverhalten der Proteine auf der Nanostruktur. Theoretische Berechnungen^[169] zeigten eine erhöhte Adsorptionswahrscheinlichkeit an topographischen Ecken. Grundannahme hierfür ist die Betrachtung der Protein-Protein-Wechselwirkungen im Rahmen der DLVO-Theorie^[170] und die numerische Beschreibung der Protein-Nanostruktur-Wechselwirkung nach der Poisson-Boltzmann-Gleichung.^[173]

Eine zweite Erklärungsmöglichkeit könnte die kurze Inkubationszeit der Farbstofflösung von wenigen Sekunden sein. Die Diffusion könnte nicht ausreichen um die tieferliegende Fläche zu erreichen.

4 Ergebnisse und Diskussion

Ein dritter Einflussfaktor sind die Goldnanopartikel. Moleküle zwischen den Quadern befinden sich direkt auf dem vergoldeten Substrat und in der Umgebung der Goldnanopartikel, die an den Seitenwänden der Struktur abgeschieden wurden. Die Fluoreszenz könnte daher durch plasmoneische Anregungen absorbiert werden, die im Spektralbereich der Fluoreszenzemission liegen.

Abschließende Bemerkung und Ausblick

Anhand einer elektronenstrahlolithographisch hergestellten sehr regelmäßigen Nanostruktur, die mit Alexa 647-Farbstoffen markiert wurde, konnte die absolute räumliche Kalibrierung des SPDM-Mikroskops überprüft werden. Die Position der Farbstoffe auf nanostrukturierten Oberflächen wurde durchschnittlich auf 6 nm mit Lokalisationsmikroskopie bestimmt. Die Ergebnisse werden auf dem Gebiet der Produktkontrolle für industrielle Anwendungen und im Bereich von Langzeit-Fluoreszenzmessungen wichtig sein.

In weiteren Messungen könnte die Methode dahingehend untersucht werden, ob sie die Benetzbarkeit der Oberfläche aufzeigen kann. Dies gewinnt in Anlehnung an den im Pflanzenreich beobachteten Lotuseffekt zunehmend an Bedeutung im Bereich biomedizinischer Anwendungen, ökologischer Aspekte, Strömungsphänomene in Luft oder Wasser und selbstreinigender Oberflächen.

4.6.2.2 Kern-Schale-Nanopartikel-Monolage

In dieser Arbeit soll die Lokalisationsmikroskopie zum Nachweis von Bindungsereignissen zwischen Peptiden und Antikörpern eingesetzt werden. In den bisherigen Messungen wurde aber eine geringe Signaldichte auf den Strukturen beobachtet, weshalb eine lange Messzeit erforderlich war. Ein wichtiger Aspekt, der die Dichte an Signalen beeinflusst, ist die Markierungsdichte.

Durch die hohe Sensitivität der Extinktionsspektren von hexagonal dicht angeordneten Kern-Schale-Nanopartikeln, bestehend aus dielektrischem Kern und metallischer Hülle, ist eine Kontrolle der adsorbierten Farbstoffmenge anhand des Extinktionsspektrums möglich (Abb. 140). Die Resonanzlagen der Peaks verschieben sich im Rahmen der Messgenauigkeit nicht, das heißt nur eine geringe Menge an Farbstoff wurde gebunden. Die Oberfläche wird mit Lokalisationsmessung untersucht. Die Weitfeldaufnahme zeigt einen sehr hellen homogenen Hintergrund (Abb. 140), der in jeder Einzelaufnahme des gemessenen Stapels vorliegt. Dieses wird vermutlich durch die Streuung der Silika-Nanopartikel verursacht.

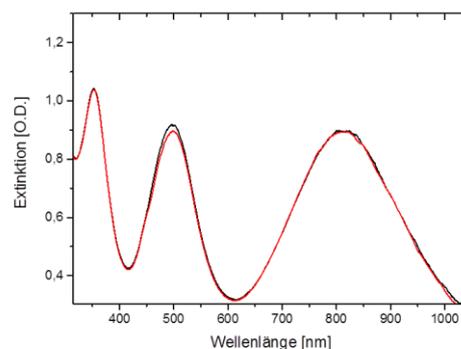
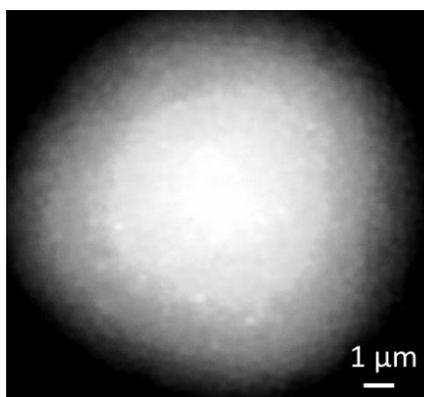


Abb.140: Links: Weitfeld-Aufnahme der mit Alexa647-Molekülen markierten Kern-Schale-Nanopartikel. **Rechts:** Extinktionsspektrum vor (**schwarze Kurve**) und nach (**rote Kurve**) der Adsorption von Alexa647-Molekülen.

4.6 Anwendungen

Abschließende Bemerkung

Die Lokalisationsmessungen von Farbstoffmolekülen auf Kern-Schale-Nanopartikelfilmen zeigen, dass die Oberflächen ein starkes Hintergrundsignal in den Fluoreszenzaufnahmen verursachen. Aufgrund der Streuung des Laserlichtes an den Silika-Nanopartikeln (Durchmesser 500 nm) sind Kern-Schale-Nanopartikel nicht als Proben für hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie geeignet.

Goldnanopartikel auf planaren Glaträgern

Um das Hintergrundsignal zu verbessern, werden Goldnanopartikel mit einer zufälligen Ordnung auf Glas adsorbiert. Die Abstände von bis zu 200 nm werden durch zufällige Adsorption von Gold-Nanopartikeln erreicht. In einem anschließenden Plating-Schritt von 10 s wachsen die Partikel auf ca. 65 nm an (Abb. 141, links). Dies bot eine Bindungsfläche für mehrere Alexamoleküle. Die Partikelzwischenräume werden mit PLL-g-PEG passiviert.

PLL-g-PEG trägt nicht zum Hintergrundsignal bei, wodurch ein gutes Signal zu Rausch-Verhältnis erhalten wird. Im Lokalisationsbild (Abb. 141, rechts) sind die Positionen benachbarter Fluoreszenzereignisse getrennt erkennbar, in der Weitfeldaufnahme kann aufgrund der Beugung des Lichtes nicht die Position der Moleküle ermittelt werden. In den Partikelzwischenräumen findet keine unspezifische Adsorption statt. Im Mittel aus drei Aufnahmen können die Fluoreszenzereignisse auf 24 ± 2 nm (Abb. 143) lokalisiert werden. Pro Signal wird eine Photonenzahl von 7739 ± 182 detektiert.

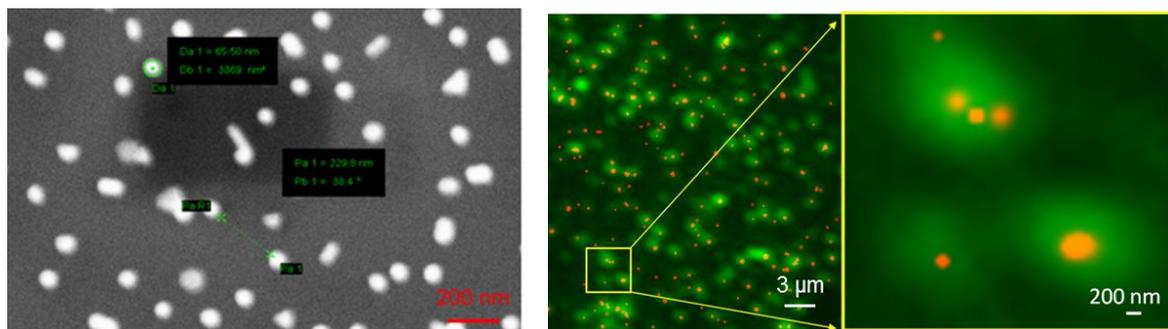


Abb. 141: Links: REM-Aufnahme der Oberfläche mit zufällig angeordneten Goldnanopartikeln nach 10 s Plating. **Rechts:** Weitfeld-Bild (grün) überlagert mit der Lokisationsaufnahme (rot) der mit Alexa 647 markierten Strukturen. Als Einbettmedium wurde ProLong®Gold verwendet. Die Messung erfolgt bei einer Laserleistung von 60 mW und Integrationszeit von 100 ms. Es werden 500 Einzelaufnahmen gespeichert.

Aus dem Blinkverhalten (Abb. 142), das heißt der Fluoreszenzemission als Funktion der Zeit für eine feste x-, y-, z- Position, erkennt man, dass entweder ein Molekül detektiert wird, dessen Fluoreszenz mehrfach angeht und erlischt, oder mehrere Moleküle detektiert werden, die in kurzer zeitlicher Folge nacheinander aufleuchten. Die Verdünnung der Farbstofflösung und Reaktionszeit ermöglichen die Beobachtung der Blinkereignisse. Gleichzeitig aufleuchtende Moleküle können beugungsbegrenzt nur ungenau lokalisiert werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

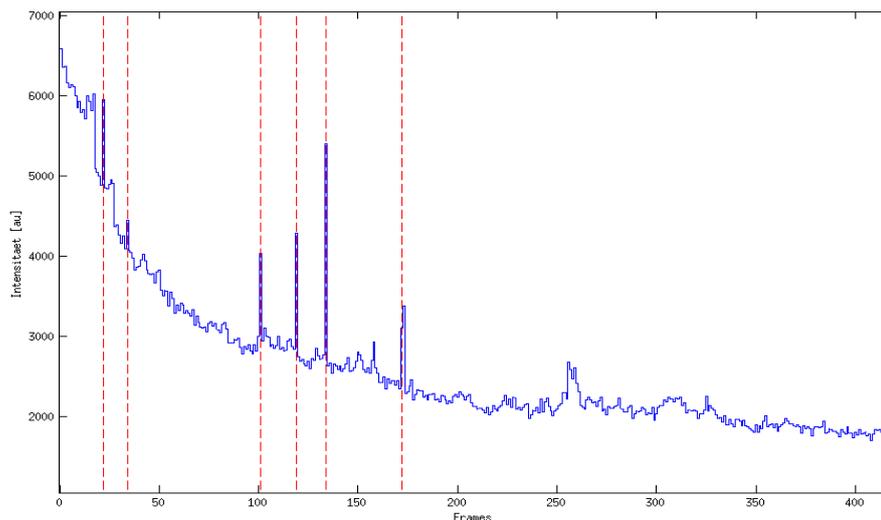


Abb. 142: Dargestellt ist die Fluoreszenzemission als Funktion der Zeit für eine feste x-, y-, z- Position. Es werden 1000 Bilder mit einer Integrationszeit von 100 ms aufgenommen. Es handelt sich um ein Molekül oder wenige Moleküle. (Frame = Anzahl der Einzelaufnahmen). Die rot markierten Peaks entsprechen den vom Auswertungsprogramm erkannten Fluoreszenzereignissen.

Die Häufigkeitsverteilung der Lokalisationsgenauigkeiten entspricht keiner idealen Gaußverteilung, weil nur endlich viele Messungen gemacht wurden.

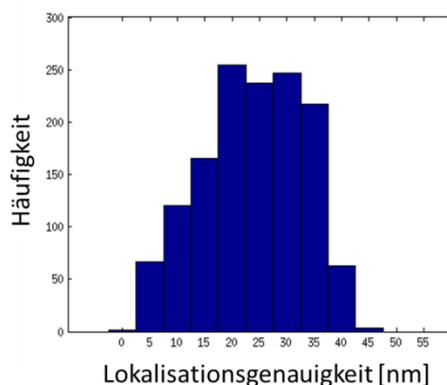


Abb. 143: Das Histogramm zeigt die Lokalisationsgenauigkeit für fluoreszierende Ereignisse. Die mittlere Lokalisationsgenauigkeit beträgt 23,8 nm. Die mittlere Anzahl an Photonen ist 7739 ± 182 pro Ereignis.

Abschließende Bemerkung

Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis konnte deutlich verbessert werden, indem die Farbstoffmoleküle über Thiole an Goldnanopartikeln auf Glaträgern gebunden wurden. Anhand des zeitlichen Emissionsverhaltens der Fluorophore konnte gefolgert werden, dass es sich um wenige gebundene Moleküle pro Goldnanopartikel handelt.

4.6.2.3 Untersuchung des Fluoreszenzverhaltens der Goldnanopartikel

Um auszuschließen, dass die Fluoreszenz von den Goldnanopartikeln kommt, werden Goldnanopartikel in Suspension untersucht. Die Messung der Fluoreszenz erfolgt mit einem Cary Eclipse Fluoreszenz Spektrophotometer in wässriger Lösung ohne Farbstoffmoleküle (Abb. 144). Die

4.6 Anwendungen

Emission von Tetrachlorgoldsäure und der Seeding-Lösung liegt bei Wellenlängen unterhalb von 500 nm. Dies beeinflusst die Ergebnisse der Lokalisationsmessung nicht, weil Störsignale durch den verwendeten Fluoreszenzfilter ausgeschlossen werden.

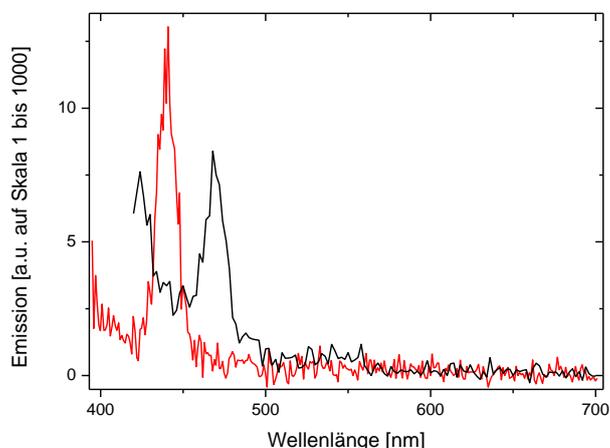


Abb. 144: Dargestellt ist das Emissionsverhalten von Tetrachlorgoldsäure (**schwarz**) und der Seeding-Lösung (**rot**). Die Fluoreszenzmessung erfolgte in der Gruppe von Prof. Dr. Dirk-Peter Herten mit dem Cary Eclipse Fluoreszenz Spektrophotometer (Varian, Darmstadt).

Abschließende Bemerkung

Die Goldnanopartikel zeigen keine Fluoreszenz. Die Signale der oben beschriebenen Proben stammen daher von den gebundenen Farbstoffmolekülen.

4.6.2.4 Einsatz im Hinblick zur medizinischen Diagnostik

Die Schlüsselkriterien für den erfolgreichen klinischen Einsatz eines Medikaments sind dessen Effizienz und Verträglichkeit.^[269] Im Rahmen eines Wirkstoff-Screenings ist dabei eine hochgradig parallelisierte Analytik auf kleinem Raum bevorzugt. Zu diesem Zweck werden Adsorptionsplätze mithilfe der mizellaren Blockcopolymer Nanolithographie geschaffen. Die hexagonal angeordneten Goldnanopartikel ermöglichen im Fall einer vollständigen Bedeckung einen gleichmäßigen Abstand der einzelnen Farbstoffmoleküle. Das Potential zum Einsatz als Peptidchip wird anhand eines einfachen Beispiels veranschaulicht. Hierzu wird ein Epitop auf den Nanopartikeloberflächen adsorbiert. Das Epitop verfügt über eine endterminale Bindungsstelle für farbstoffmarkierte Antikörper. Bei Zugabe eines passenden Enzyms, das entspricht dem Medikament, wird das Epitop gespalten und die Bindungsstelle verschwindet. Intakte Epitope können nach einer Antikörpermarkierung erkannt werden. Dadurch können Rückschlüsse auf die Wirksamkeit des Medikamentes gezogen werden. Zuvor wird allerdings anhand eines einfacheren Modellsystems bestehend aus einem Platzhalter und Farbstoffmolekülen die Einsetzbarkeit der hergestellten Nanopartikeloberfläche für das Wirkstoffscreening überprüft. Der Platzhalter dient als Modell für das Epitop. Die Farbstoffmoleküle entsprechen dem Antikörper.

In ersten Schritt wird ein hexagonales Gitter von Goldnanopartikeln auf einem Glassubstrat hergestellt (Abb. 145). Ein Platzhalter (hier 3-Amino-undecanthal) wird zur Vermeidung von Quenching an die Goldnanopartikel gebunden. Das Thiol bindet mit der Schwefelkopfgruppe an die Goldnanopartikel. Die Farbstoffmoleküle werden spezifisch kovalent an die Aminoendgruppe gebunden. Aufgrund des kleinen Partikeldurchmessers besteht nach Farbstoffadsorption eine hohe Wahrscheinlichkeit für einzeln gebundene Farbstoffmoleküle (Abb. 145). Pro Goldnanopar-

4 Ergebnisse und Diskussion

tikel können maximal drei Alexa-Moleküle binden.^[137] Der Bereich zwischen den Partikeln wird zur Verhinderung unspezifischer Adsorption mit PLL-g-PEG passiviert.

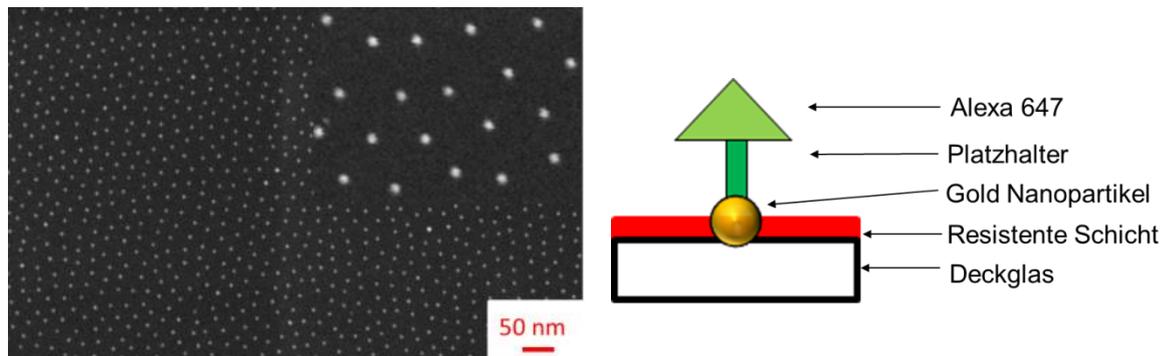


Abb. 145: Links: REM-Aufnahme der hexagonal nanostrukturierten Oberfläche, die mittels Blockcopolymer Mizellarer Lithographie hergestellt wurde. Der mittlere Abstand zwischen benachbarten Partikeln beträgt 38 nm. Der Partikeldurchmesser ist $8 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$. Rechts: Aufbau der Probe: Es wird ein Platzhalter an die Goldnanopartikel adsorbiert und an diesen Alexa647-Moleküle in alkalischem Puffer (hohe Reaktionsgeschwindigkeit) gebunden. Die Partikelzwischenräume werden passiviert.

Es werden an drei verschiedenen lateralen Probenpositionen Lokisationsaufnahmen angefertigt und die Lokisationsbilder aus 1000 Einzelaufnahmen rekonstruiert. Fluoreszenzereignisse auf den 8 nm großen Nanopartikeln werden im Mittel auf 14 nm genau lokalisiert. Messungen im nicht strukturierten Bereich führen in der identischen Fokusebene zu keinen Blinkereignissen. Die Passivierung mit PLL-g-PEG ist erfolgreich und sehr gut für Lokisationsmessungen geeignet, weil durch die PEG-Moleküle kein Hintergrundsignal verursacht wird.

Leider gelang es nicht, auf jedem Goldnanopartikel ein Fluorophor nachzuweisen (Abb. 146). Hierzu tragen mehrere Parameter bei: Die Markierungseffizienz der Goldnanopartikel mit dem Thiol, die Aktivierung der Amino-Gruppe im alkalischen Milieu und die Anbindung des Farbstoffs. Hinzu kommt die Blinkereffizienz der Moleküle. Eng benachbarte Moleküle, die eventuell auf einem Goldnanopartikel angeordnet sind, können sich zu Stapeln anordnen. Die Fluoreszenz kann dann gelöscht werden durch Umwandlung der Energie in Wärme. Ein weiterer Aspekt sind lokale Brechungsindexunterschiede, die die Fluoreszenzemission beeinflussen können oder der Energietransfer auf die Goldnanopartikel. Zusätzlich kann die Ausrichtung der Moleküle zur Polarisationsrichtung der Laserstrahlung die Photonenausbeute beeinflussen. Ein großer limitierender Faktor ist die beschränkte Messdauer, die auf 1,7 min gesetzt wurde. Das entspricht 1000 Einzelbildern. Nach dieser Detektionszeit wird immer noch ein Blinken beobachtet. Bei einer längeren Aufnahme ist eine Drift nicht auszuschließen.

Die Driftkorrektur kann z.B. anhand von fluoreszierenden Eichpartikeln oder Kratzern in der Probe erfolgen. Letztere streuen das Laserlicht und werden dadurch sichtbar. Die Notwendigkeit einer Driftkorrektur war vom Aufnahmetag abhängig, weil der Messraum nicht temperiert war und thermische Ausdehnungen des Mikroskops eine Drift des Probenhalters verursachen. Dennoch konnten an einigen Stellen ein Signal beobachtet werden, das auf eine hexagonale Anordnung der Fluorophore hindeutet. Theoretische Berechnungen von Dr. P. Lemmer bestätigen die Schwierigkeit eine hexagonale Struktur einzelner Moleküle nachzuweisen.^[137]

4.6 Anwendungen

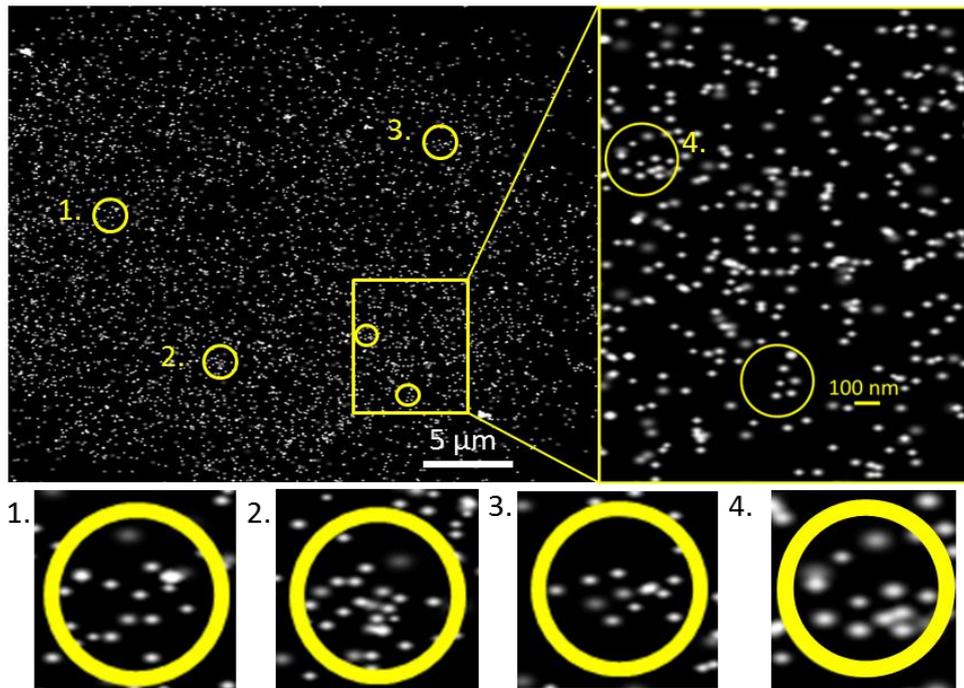


Abb. 146: Lokalisationsaufnahme der mit Alexa 647 markierten Strukturen rekonstruiert aus 1000 Einzelaufnahmen. Die Integrationszeit betrug 100 ms. Der mit einem gelben Rechteck gekennzeichnete Bereich ist rechts vergrößert dargestellt. Die mit Zahlen markierten gelben Kreise sind in den Bildern (1. - 4.) vergrößert. Die mittlere Lokalisationsgenauigkeit beträgt 14 nm. Im Rahmen der Messgenauigkeit entspricht der beobachtete Abstand der Fluoreszenzsignale an wenigen Stellen dem Abstand der Goldnanopartikel.

Es handelt sich bei den beobachteten Fluoreszenzereignissen um einzelne Moleküle. Dies kann anhand des zeitlichen Verlaufs der Photonenemission bestätigt werden (Abb. 147), da nur kurzzeitig im sogenannten „An-Zustand“ Photonen emittiert werden. Danach erlischt das Molekül und verbleibt für den Rest der Messung dunkel. Die hergestellten Oberflächen sind daher für den Einsatz als Peptidchip auf Einzelmolekülbasis einsetzbar.

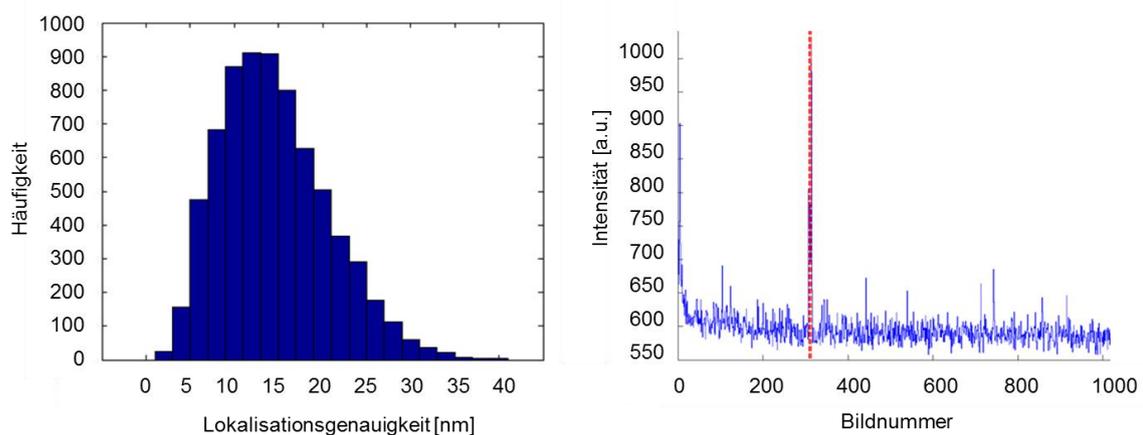


Abb. 147: Links: Histogramm der Lokalisationsgenauigkeit gemittelt aus 3 Messungen an verschiedenen lateralen Probenpositionen. **Rechts:** Anzahl der Photonen für eine feste x,y,z-Position als Funktion der Gesamtaufnahmedauer. Der rot markierte Peak entspricht dem vom Auswertungsprogramm erkannten Fluoreszenzereignis.

4 Ergebnisse und Diskussion

Im Folgenden wird die biologische Probe untersucht. Hierzu wird in Zusammenarbeit mit dem DKFZ das Epitop HA an die Nanopartikel gebunden. Der Partikelabstand ist 70 nm und Partikeldurchmesser 20 nm (Abb. 48, Seite 62). Das Epitop besteht aus der Aminosäuren-Sequenz „Tyrosyl, Prolyl, Tyrosyl, α -Aspartyl, Valyl, Prolyl, α -Aspartyl, Tyrosyl, Alanyl“. Die Markierung erfolgt über einen Antikörper mit einem Farbstoff. Die lateralen Positionen können mit Lokalisationsmikroskopie abgebildet werden. Allerdings bleichen die Fluorophore schnell, d.h. innerhalb der ersten 100 Einzelaufnahmen, aus. Deshalb lassen sich nur eingeschränkt Messungen durchführen. Dies hat eine geringe Signaldichte zur Folge. Die Ursache hierfür ist das Einbettmedium ProLong®Gold, das nicht optimal für den Farbstoff ATTO680 ist. Außerdem ist nicht sichergestellt, dass jeder Antikörper ein Fluorophor trägt.



Abb. 148: Aufbau der Probe (**links**): Es wurde ein HA Epitop an die Goldnanopartikel adsorbiert und an diesen ein anti-HA IgG Antikörper, der mit dem Farbstoff ATTO680 markiert war gebunden. Der Partikelabstand ist 70 nm und Partikeldurchmesser 20 nm. Die Partikelzwischenräume wurden passiviert. Die Lokalisationsaufnahme (**rechts**) zeigt die lateralen Positionen der mit Farbstoffmolekülen markierten Antikörper.

In weiteren Experimenten muss die Signaldichte erhöht werden. Eine Verbesserung kann unter Verwendung eines „switching“ Puffers erreicht werden, was aber unter Umständen zur Schädigung oder Beeinflussung der biologischen Proben führen kann. Alternativ könnten Antikörper eingesetzt werden, die mit Alexa-Farbstoffen markiert sind.

Abschließende Bemerkung und Ausblick

Die Experimente zeigten bisher, dass die Goldnanopartikel-Strukturen zum Einsatz als Peptidchip geeignet sind und in Kombination mit der Lokalisationsmikroskopie die Einzelmolekül-Auflösung ermöglichen. Allerdings sind hierzu hochdichte Peptidarrays erforderlich, die am KIT in der Gruppe von PD A. Nesterov-Müller angefertigt werden. Die Detektion auf Einzelmolekül-Niveau ermöglicht z.B. die Erkennung von Krankheiten im Frühstadium oder erlaubt die Wirksamkeit von Medikamenten zu testen. Dadurch kann die Spezifität eines Medikamentes in Erfahrung gebracht werden, d.h. ob das Medikament auch chemisch ähnliche Biomoleküle angreift. Neben der Anwendung im Bereich der medizinischen Diagnostik könnten die Nanostrukturen die Möglichkeit bieten die spektrale Signatur von kovalent gebundenen Farbstoff-Molekülen zu messen. Neben der Blinkfrequenz und Anzahl der Schaltzyklen könnte die Übergangsfrequenz der Elektronen ermittelt werden, sowie dessen Abhängigkeit von der Nähe der Nachbaratome. Durch Wahl der Goldnanopartikelgröße und des Partikelabstandes können Molekülcluster erzeugt und untersucht werden. Allerdings wären hierzu schnelle Kameras nötig, weil Fluoreszenzübergänge in der Regel im Nanosekundenbereich liegen. Alternativ wäre es auch interessant anorganische Farbstoffe, Quantendots, hexagonal auf den Oberflächen anzuordnen. Damit ließe sich die Markierungseffizienz anhand einer Elektronenmikroskop-Aufnahme bestimmen und die Detektionseffizienz des Mikroskops berechnen.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die optischen Eigenschaften von nanostrukturierten Oberflächen im sichtbaren Spektralbereich untersucht. Im Fokus stand die Signalentstehung in Kern-Schale-Nanopartikelfilmen, die Sensitivität der optischen Elemente und ihre Eignung zur markierungsfreien *in situ* Detektion von Bindungsereignissen im Array-Format in Echtzeit. Die Motivation hierzu ist der markierungsfreie Nachweis von Bindungsereignissen in Peptidchips. Dabei handelt es sich um einen festen Träger, auf dem Fangmoleküle adsorbiert sind, die selektiv, nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip, Krankheitsindikatoren aus dem Blutserum erkennen. Das Konzept, das zur Detektion verwendet wurde, ist ein Biosensor bestehend aus einem Substrat (Silizium-Wafer oder mit Gold bedampfter Glasträger), auf dem dielektrische Nanopartikel als Monolage abgeschieden wurden. Diese wurden anschließend metallisiert. Bei der Reflexion von weißem Licht auf der Oberfläche wurden mehrere Peaks im Extinktionsspektrum beobachtet, deren Resonanzlage sich infolge von Brechungsindexänderungen, z.B. durch Proteinadsorption, verschiebt. Es wurde gezeigt, dass das Signal drei Aspekte vereint: Lokalisierte Plasmonen, propagierende Plasmonen und Interferenz.

Hierzu wurde zuerst die Bedeutung dielektrischer Kontaktpunkte zwischen benachbarten Partikeln sowie zum Substrat in Erfahrung gebracht, indem zum Vergleich die optischen Eigenschaften von dielektrischen Partikeln mit vollständiger Metallhülle untersucht wurden. Ohne dielektrische Kontaktpunkte zum Substrat werden keine ausgeprägten Peaks im Extinktionsspektrum beobachtet. Als Ursache hierfür wurden Interferenzen im dielektrischen Film vermutet. Deren Existenz konnte durch einen Vergleich der optischen Eigenschaften von Nanopartikelfilmen mit planaren dielektrischen Filmen bewiesen werden. Die Extinktion der Nanopartikelfilme konnte experimentell durch planare dielektrische Filme moduliert werden.

Der nicht-lineare Zusammenhang zwischen Peakposition und Peaknummer zeigt, dass weitere Effekte die optische Antwort bestimmen. Zur Untersuchung wurden isolierte dielektrische Nanopartikel auf Silizium und Gold hergestellt. Dabei wurden Interferenz-Peaks für nicht metallisierte Partikel auf Silizium beobachtet, auf Gold-Substraten lag ein zusätzlicher Peak durch propagierende Plasmonen im Goldfilm vor. Infolge der Metallisierung wurden die Peaks verstärkt. Die Ursache hierfür sind lokalisierte Plasmonen in der Metallhülle. Mit zunehmender Dicke des Metallfilms auf den Kern-Schale-Nanopartikeln spalten die Peaks in Übereinstimmung mit theoretischen Berechnungen auf.

Im zweiten Teil wurden die Extinktionsspektren hinsichtlich ihrer Abhängigkeit vom Reflexionswinkel und vom Brechungsindex der Sensorumgebung untersucht. Die Messungen erfolgten in Luft sowie unter Flüssigkeiten mit unterschiedlichem Brechungsindex. Dabei wurde überprüft, ob sich die Sensoroberflächen zur *in situ* Detektion von molekularen Adsorptionsprozessen eignen, d.h. experimentell ein Winkel gefunden wird, unter dem der Einfluss des Brechungsindex in der Lösung auf die Peakposition im Extinktionsspektrum vernachlässigbar ist, so dass Adsorptionsprozesse ungestört beobachtet werden können. Unter diesem sogenannten magischen Winkel wurde die Detektion von Fibrinogen in Echtzeit verfolgt. Anhand einer vereinfachten Betrachtung konnte der magische Winkel für planare Filme berechnet werden und auf die Brechungsindexabhängigkeit der Phasen der interferierenden Teilstrahlen zurückgeführt werden.

Anschließend wurde die Sensitivität der Nanopartikelfilme gegenüber Diffusionsprozessen aus der Gasphase durch eine Beschichtung mit dreidimensionalen metall-organischen Gerüststrukturen verbessert.

5 Zusammenfassung

Die beschichteten Oberflächen waren zum Einsatz unter Flüssigkeiten nicht geeignet, weil durch die chemische Heterogenität der Oberfläche und fehlende kristalline Ordnung die Funktionalisierung der Oberfläche und damit Haftung der Gerüststrukturen nicht optimal waren.

Ein Beleg hierfür ist der polykristalline Wachstumsprozess der Gerüststrukturen auf den Nanopartikelfilmen (gemessen mit Röntgenbeugung (KIT)). Eine alternative Methode zur Steigerung der Sensitivität ist die Kombination von Kern-Schale-Nanopartikeln mit Gitterstrukturen. Es wurde keine Kopplung der Signale von Gittern und Nanopartikeln festgestellt. Die Sensitivität gegenüber Proteinadsorptionsprozessen konnte um den Faktor 2 erhöht werden. Dies ist vermutlich auf Feldverstärkungseffekte zurückzuführen. Ein großer Unsicherheitsfaktor ist dabei die tatsächlich adsorbierte Proteinmenge, weil unterschiedliche Oberflächen vorliegen.

Durch Vergleich von Nanopartikelfilmen und elektronenstrahlolithographisch hergestellten Nanostrukturen konnten Richtlinien für das Sensordesign aufgestellt werden. Hierzu erfolgte ausgehend von einer 300 nm Würfelstruktur, die über 300 nm lange und 100 nm breite Verbindungsstege verfügte, eine systematische Variation der Probenabmessungen. Vorteilhaft für ausgeprägte Peaks im Spektrum erwiesen sich Strukturen, die metallisiert waren und deren Quader über Verbindungsstege verfügten. Die Verbindungssteglänge muss kurz sein und die Quaderhöhe groß. Strukturen mit Verbindungsstegen bieten zusätzlich einen magischen Winkel. Diese Strukturen sind für den *in situ* Nachweis biospezifischer Bindungsprozesse geeignet. Strukturen ohne Stege verfügen nicht über einen solchen Winkel. Die optische Antwort ist eine komplexe Kombination aus plasmonischen Anregungen und Interferenz. Sie lässt sich durch eine effektive Schichtdicke modellieren. Die zu erwartende Verschiebung infolge der Adsorption von Fibrinogen auf der Sensoroberfläche konnte in Übereinstimmung mit den experimentellen Ergebnissen mit rigoroser Beugungsanalyse berechnet werden.

Zur Demonstration des Anwendungspotentials wurden Peptidarrays auf Kern-Schale-Nanopartikelfilme übertragen und die übertragene Menge quantifiziert. Eine Auflösung von Bindungsereignissen zwischen Peptiden und fluoreszenzmarkierten Antikörpern konnte auf Einzelmolekül-Niveau mit Lokalisationsmikroskopie nachgewiesen werden. Die hohe laterale Auflösung der Methode unterhalb des Abbe-Limits basiert auf der Beobachtung einzelner Moleküle. Der Beweis hierfür konnte anhand der Untersuchung des zeitlichen Emissionsverhaltens der Farbstoffe erbracht werden.

Es wurde ein integriertes bioanalytisches System auf Basis plasmonischer Nanostrukturen entwickelt, das die Detektion biospezifischer Bindungsereignisse in komplexen Peptidarrays ermöglicht. Diese kann entweder beugungsbegrenzt, markierungsfrei, parallel und *in situ* erfolgen oder hochaufgelöst *ex situ*. Die Möglichkeit des selektiven Nachweises von Proteinen aus einer komplexen Mischung ähnlicher Spezies sowie die Untersuchung biospezifischer Wechselwirkungen sind zentrale Fragestellungen in der biomedizinischen Analytik, Biophysik und Biotechnologie.

6 Verzeichnisse

6.1 Literaturverzeichnis

- [1] M. Quinten, *Optical properties of nanoparticle systems : Mie and beyond*, Wiley-VCH, Weinheim, **2011**, p.
- [2] G. Mie, *Annalen der Physik* **1908**, 330, 377-445.
- [3] A. P. Marc Lamy De La Chapelle, *Nanoantenna: Plasmon-Enhanced Spectroscopies for Biotechnological Applications*, Pan Stanford Publishing Pte. Ltd., Singapore, **2013**, p.
- [4] K. A. Willets and R. P. Van Duyne, *Annu Rev Phys Chem* **2007**, 58, 267-297.
- [5] M. Helm and S. Wölfl, *Instrumentelle Bioanalytik : Einführung für Biologen, Biochemiker, Biotechnologen und Pharmazeuten*, Wiley-VCH, Weinheim, **2007**, p.
- [6] C. T. Campbell and G. Kim, *Biomaterials* **2007**, 28, 2380-2392.
- [7] S. P. A. Fodor, R. P. Rava, X. C. Huang, A. C. Pease, C. P. Holmes and C. L. Adams, *Nature* **1993**, 364, 555-556.
- [8] K. Burkert, S. Dickopf, K. Schmidt and D. Vetter in *Spr-sensorsystem, Vol.* Google Patents, **2002**.
- [9] Buecker, *Langmuir* **2008**, 24, 8229-8239.
- [10] Dahint in *Label-Free In Situ Detection of Proteins and Celle Using Acoustic Plate Mode Sensors and Optical Diffraction at Chemically Microstructured Surfaces, Vol. Habilitation* Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Heidelberg, **1999**.
- [11] R. Dahint, *Biosensors & Bioelectronics* **2007**, 22, 3174-3181.
- [12] M. Beyer, A. Nesterov, I. Block, K. König, T. Felgenhauer, S. Fernandez, K. Leibe, G. Torralba, M. Hausmann, U. Trunk, V. Lindenstruth, F. R. Bischoff, V. Stadler and F. Breitling, *Science* **2007**, 318, 1888.
- [13] M. Fox, *Optische Eigenschaften von Festkörpern*, Oldenbourg, München, **2012**, p.
- [14] S. Hunklinger, *Festkörperphysik*, Oldenbourg, München ; Wien, **2007**, p. XII, 595 S.
- [15] C. Kittel, *Einführung in die Festkörperphysik*, Oldenbourg, München ; Wien, **2006**, p. XXII, 754 S.
- [16] D. Kölle, [http://www.pit.physik.uni-tuebingen.de/PIT-II/teaching/ExPhys-V_WS04-05/\(05.02.2014\)](http://www.pit.physik.uni-tuebingen.de/PIT-II/teaching/ExPhys-V_WS04-05/(05.02.2014)) **2005**.
- [17] F. Neubrech in *Oberflächenverstärkte Infrarot-Spektroskopie mittels Gold-Nanoantennen, Vol.* Heidelberg, Univ., Diss., 2008, **2008**, pp. Online-Ressource.
- [18] P. B. Johnson and R. W. Christy, *Physical Review B* **1972**, 6, 4370-4379.
- [19] J. Bochterle in *Nanoantennenverstärkte Infrarotspektroskopie von Molekülen, Vol.* Heidelberg, Univ., Diss., 2013, **2013**, pp. Online-Ressource (IV, 167 S.).
- [20] H. Raether, *Surface plasmons on smooth and rough surfaces and on gratings*, Springer, Berlin ; Heidelberg [u.a.], **1988**, p. X, 136 S.
- [21] W. Choi, A. Sahu, Y. Kim and G. Tae, *Annals of Biomedical Engineering* **2012**, 40, 534-546.
- [22] F. Aussenegg and H. Ditzbacher, *Physik in unserer Zeit* **2006**, 37, 220-226.
- [23] O. Perez-Gonzalez, N. Zabala, A. G. Borisov, N. J. Halas, P. Nordlander and J. Aizpurua, *Nano Lett* **2010**, 10, 3090-3095.
- [24] Hartstein, *Physical Review Letters* **1980**, 45, 201-204.
- [25] S. Cataldo, J. Zhao, F. Neubrech, B. Frank, C. Zhang, P. V. Braun and H. Giessen, *ACS Nano* **2012**, 6, 979-985.
- [26] R. Alvarez-Puebla, L. M. Liz-Marzan and F. J. G. de Abajo, *Journal of Physical Chemistry Letters* **2010**, 1, 2428-2434.
- [27] L. Jiang, T. You, P. Yin, Y. Shang, D. Zhang, L. Guo and S. Yang, *Nanoscale* **2013**, 5, 2784-2789.
- [28] A. Otto, *Journal of Raman Spectroscopy* **1991**, 22, 743-752.
- [29] Willets, *Annual Review of Physical Chemistry* **2007**, 58, 267-297.

- [30] C. Dupas, P. Houdy and M. Lahmani in *Nanoscience : nanotechnologies and nanophysics ; with ... 25 tables*, Vol. Springer, Berlin ; Heidelberg [u. a.], **2007**, pp. XXXIII, 823 S.
- [31] D. J. Campbell and Y. N. Xia, *Journal of Chemical Education* **2007**, *84*, 91-96.
- [32] J. Pischel, E. Welsch, O. Skibbe and A. Pucci, *Journal of Physical Chemistry C* **2013**, *117*, 26964-26968.
- [33] W. L. Barnes, A. Dereux and T. W. Ebbesen, *Nature* **2003**, *424*, 824-830.
- [34] W. Knoll, *Annual Review of Physical Chemistry* **1998**, *49*, 569-638.
- [35] W. Greiner in *Quantenmechanik : Teil 1, Einführung*, Vol. Deutsch, Thun, **1989**, pp. XV, 510 S.
- [36] G. Czycholl, *Theoretische Festkörperphysik : von den klassischen Modellen zu modernen Forschungsthemen ; mit über 60 Übungsaufgaben mit vollständigen Lösungen im Internet*, Springer, Berlin ; Heidelberg, **2008**, p.
- [37] W. Nolting in *Viel-Teilchen-Theorie*, Vol. Springer, Dordrecht ; Heidelberg [u.a.], **2009**, p. 594 S.
- [38] Wang in *Tunable plasmonic nanostructures: From fundamental nanoscale optics to surface-enhanced spectroscopies*, Vol. Rice University **2008**.
- [39] J. D. Jackson, *Klassische Elektrodynamik*, De Gruyter, Berlin [u.a.], **2014**, p.
- [40] K. Kurihara and K. Suzuki, *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 696-701.
- [41] W. N. Hansen, *Journal of the Optical Society of America* **1968**, *58*, 380-388.
- [42] Aussenegg, *Phys. Unserer Zeit* **2006**, *5*, 220-226.
- [43] in <http://www.chemievorlesung.ipn.uni-kiel.de/metalle/HSAB-Prinzip.pdf>, Vol. **03.04.2013**.
- [44] S. A. Maier in *Plasmonics : fundamentals and applications* Elektronische Ressource, Vol. Springer US, Boston, MA, **2007**, pp. Online-Ressource (XXV, 223p. 140 illus, digital).
- [45] J. Homola, *Sensors and Actuators B-Chemical* **1997**, *41*, 207-211.
- [46] J. Homola in *Surface Plasmon Resonance Based Sensors*, Vol. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2006**, pp. Online-Ressource (XII, 251 p. Also available online, digital).
- [47] J. Homola, I. Koudela and S. S. Yee, *Sensors and Actuators B-Chemical* **1999**, *54*, 16-24.
- [48] F. C. Liu in *Development of LSPR-based optical biosensors for the label-free detection of biomolecular interactions in high-density peptide arrays*, Vol. Heidelberg, Univ., Diss., 2011, **2011**, pp. Online-Ressource.
- [49] E. Hutter, *Advanced Materials* **2004**, *16*.
- [50] Stiles, *Annual Review of Physical Chemistry* **2008**, *1*, 601-626.
- [51] C. F. Bohren, E. E. Clothiaux and D. R. Huffman, *Absorption and scattering of light by small particles*, Wiley-VCH, Weinheim, Bergstr, **2009**, p.
- [52] E. Prodan, C. Radloff, N. J. Halas and P. Nordlander, *Science* **2003**, *302*, 419-422.
- [53] A. H. Panaretos and D. H. Werner, *Opt Express* **2013**, *21*, 26052-26067.
- [54] D. W. B. HUI WANG, PETER NORDLANDER AND NAOMI J. HALAS, *ACCOUNTS OF CHEMICAL RESEARCH* **2007**, *40*, 53-62.
- [55] S. Wang, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 18218-18222.
- [56] a) Preston, *American Chemical Society Nano* **2006**, *3*, 3696-3706; b) <http://www.optics.rochester.edu/workgroups/novotny/courses/OPT463/plasmonss.pdf> in *Chapter 12 Surface plasmons*, Vol.
- [57] C. Radloff and N. J. Halas, *Nano Lett* **2004**, *4*, 1323-1327.
- [58] S. J. Chen, F. C. Chien, G. Y. Lin and K. C. Lee, *Optics Letters* **2004**, *29*, 1390-1392.
- [59] H. O. Güvenç in *Label-free detection of biospecific interactions in peptide arrays using core-shell nanoparticle films*, Vol. Heidelberg, Univ., Diss., 2013, **2013**, pp. Online-Ressource.
- [60] N. Liu and H. Giessen, *Angewandte Chemie* **2010**, *122*, 10034-10049.
- [61] C. Yizhuo and K. B. Crozier, *Lasers and Electro-Optics (CLEO) and Quantum Electronics and Laser Science Conference (QELS), 2010 Conference on* **2010**, pp. 1-2.
- [62] W. Demtröder, *Experimentalphysik 1 : Mechanik und Wärme*, Springer, Berlin, Heidelberg, **2013**, p.
- [63] Jung, *Langmuir* **1998**, *14*, 5636-5648.
- [64] Himmelhaus, *Sensors and Actuators B: Chemical* **2000**, *63*, 24-30.
- [65] P. K. Jain and M. A. El-Sayed, *The Journal of Physical Chemistry C* **2007**, *111*, 17451-17454.
- [66] P. K. Jain and M. A. El-Sayed, *Chemical Physics Letters* **2010**, *487*, 153-164.
- [67] Haes, *J Phys Chem B* **2004**, *108*, 6961-6968.
- [68] G. Steiner and R. Salzer in *Biosensors based on SPR Imaging*, Vol. Universitätsbibliothek Tübingen, Tübingen, **2002**.

6.1 Literaturverzeichnis

- [69] Bücker in *Integration von Rezeptoren in inerte Matrices zur markierungsfreien und quantitativen Detektion biospezifischer Wechselwirkungen mit LSPR-aktiven Nanopartikeloberflächen*, Vol. Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, **2007**.
- [70] A. Tlili, *Sensors* **2004**, 4, 105-114.
- [71] M. Himmelhaus in *Untersuchung der Filmbildung von Alkanthiolen auf Gold und Silber mit Hilfe nichtlinearer optischer Vibrationspektroskopie (SFS)* Vol. Heidelberg, Shaker Verlag, **1998**.
- [72] X. Stammer in *Oberflächenmodifizierung und -funktionalisierung von selbst-assemblierten Monolagen und metall-organischen Gerüstverbindungen und die spektroskopische Charakterisierung*, Vol. Dissertation Ruhr-Universität Bochum, Ruhr-Universität Bochum, **2011**.
- [73] D. F. C. Liu in *Homogene und heterogene optisch aktive Nanopartikel-Oberflächen*, Vol. Diplom Universität Heidelberg, Universität Heidelberg, **2006**.
- [74] Y. Xia and G. M. Whitesides, *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, 37, 550-575.
- [75] K. Raiber in *Herstellung von Mikrosensoren durch Softlithographie unter Verwendung organischer Monoschichten*, Vol. Universität Hamburg, **2005**.
- [76] Prime, *Science* **1991**, 252, 1164-1167.
- [77] M. Himmelhaus and H. Takei, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2002**, 4, 496-506.
- [78] A. Bernard, J. P. Renault, B. Michel, H. R. Bosshard and E. Delamarche, *Advanced Materials* **2000**, 12, 1067-1070.
- [79] A. Kumar and G. M. Whitesides, *Applied Physics Letters* **1993**, 63, 2002-2004.
- [80] M. Rappold in *MIKROSTRUKTURIERUNG VON CORESHELL-NANOPARTIKELFILMEN MITTELS MICROCONTACT PRINTING*, Vol. Forschungsbericht Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, **2011**.
- [81] W. F. W. Walter, *Lehrbuch der Organischen Chemie*, , S. Hirzel Verlag, **2004**, p.
- [82] O. Shekhah, *Langmuir* 23, 7440-7442.
- [83] X. Stammer in *Oberflächenmodifizierung und -funktionalisierung von selbst-assemblierten Monolagen und metall-organischen Gerüstverbindungen und die spektroskopische Charakterisierung*, Vol. Dissertation Ruhr-Universität Bochum, Ruhr-Universität Bochum **2011**.
- [84] S. Hermes in *Poröse Metallorganische Netzwerkverbindungen als Trägermatrices für funktionelle Nanopartikel*, Vol. Dissertation Ruhr-Universität Bochum, Ruhr-Universität Bochum, **2006**.
- [85] O. Shekhah, *Materials* **2010**, 3, 1302-1315.
- [86] Wöll, <http://cordis.europa.eu/documents/documentlibrary/126792581EN6.pdf>, *Publishable Final Activity Report* **2009**, Project coordinator organisation name Ruhr-Universität Bochum, 1-50.
- [87] M. Tsotsalas, J. Liu, B. Tettmann, S. Grosjean, A. Shahnas, Z. Wang, C. Azucena, M. Addicoat, T. Heine, J. Lahann, J. Overhage, S. Bräse, H. Gliemann and C. Wöll, *J Am Chem Soc* **2013**, 136, 8-11.
- [88] O. Shimomura, F. H. Johnson and Y. Saiga, *J Cell Comp Physiol* **1962**, 59, 223-239.
- [89] O. Shimomura, *J Microsc* **2005**, 217, 1-15.
- [90] http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/press.html, http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/press.html **download 23.04.2014**.
- [91] <http://www.tlb.de/de/list/article/us-patent-granted-for-super-resolution-l.html>, *TLB, Technologie-Lizenz-Büro* **download vom 23.04.2014**.
- [92] J. Reymann, D. Baddeley, M. Gunkel, P. Lemmer, W. Stadter, T. Jegou, K. Rippe, C. Cremer and U. Birk, *Chromosome Res* **2008**, 16, 367-382.
- [93] P. Lemmer, M. Gunkel, D. Baddeley, R. Kaufmann, A. Urich, Y. Weiland, J. Reymann, P. Muller, M. Hausmann and C. Cremer, *Applied Physics B-Lasers and Optics* **2008**, 93, 1-12.
- [94] P. S. Dittrich and A. Manz, *Nat Rev Drug Discov* **2006**, 5, 210-218.
- [95] S. Hell in *Abbildung transparenter Mikrostrukturen im konfokalen Mikroskop*, Vol. Heidelberg, Univ., Diss., 1990, **1990**, p. 102 Bl.
- [96] F. Balzarotti and F. D. Stefani, *ACS Nano* **2012**, 6, 4580-4584.
- [97] J. Valentine, S. Zhang, T. Zentgraf, E. Ulin-Avila, D. A. Genov, G. Bartal and X. Zhang, *Nature* **2008**, 455, 376-379.
- [98] S. M. Stranahan and K. A. Willets, *Nano Lett* **2010**, 10, 3777-3784.
- [99] http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1986/, **download 23.04.2014**.
- [100] http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1994/, **download 23.04.2014**.
- [101] L. Reimer and G. Pfefferkorn, *Raster-Elektronenmikroskopie*, Springer, Berlin [u.a.], **1977**, p. XI, 282 S.

- [102] A. Küller in *Von der chemischen Nanolithographie zur dreidimensionalen Lithographie und freistehenden Nanofolien*, Vol. **2006**, p. 130 S.
- [103] W. Demtröder in *Experimentalphysik 3 : Atome, Moleküle und Festkörper*, Vol. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2005**, pp. Online-Ressource.
- [104] G. Bertsche, Dr. in *Das Rasterelektronenmikroskop*, Vol. Universität Tübingen.
- [105] B. Povh, K. Rith, C. Scholz, F. Zetsche and W. Rodejohann, *Teilchen und Kerne : Eine Einführung in die physikalischen Konzepte*, Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, **2014**, p.
- [106] C. Meier, *Arbeitsgruppe Biosensoren und Biomaterialien Wintersemester 2011/2012*.
- [107] R.-U. Bochum in *Vorlesung Kern- und Teilchenphysik WS12/13, Ruhr-Universität Bochum*
13. November 2012,
http://www.ep1.rub.de/lehre/veranstaltungen/ws1213/kerne/skript_kerne/kernphysik_vorlesung_ws1213_9.pdf, , Vol. **Download 11.01.2014**.
- [108] N. Meyerbröker in *Präparation und Charakterisierung ultradünner, biokompatibler Filme und Membranen auf Basis von Polyethylenglykolen*, Vol. Heidelberg, Univ., Diss., 2012, **2012**, pp. Online-Ressource.
- [109] Cremer, *Physik unserer Zeit* **2011**, 42.
- [110] R. Kaufmann in *Entwicklung quantitativer Analysemethoden in der Lokalisationsmikroskopie*, Vol. Heidelberg, Univ., Diss., 2011, **2011**, pp. Online-Ressource.
- [111] P. D. R. Gross in *Physik III optik und Quantenphänomene Vorlesungsskript zur Vorlesung im WS 2002/2003*, Vol. Vorlesungsskript Technische Universität München,
http://www.wmi.badw.de/teaching/LectureNotes/Physik3/Gross_Physik_III_Kap_1.pdf, Gariching, **2003**.
- [112] W. Heisenberg, *Die physikalischen Prinzipien der Quantentheorie*, Hirzel, Leipzig, **1944**, p.
- [113] *Nature Methods* **2008**, 5, 457-457.
- [114] F. Träger in *Springer handbook of lasers and optics : ... 163 tables*, Vol. Springer, Berlin ; Heidelberg [u.a.], **2012**, pp. XXXII, 1694 S.
- [115] S. F. Lee and M. A. Osborne, *Chemphyschem* **2009**, 10, 2174-2191.
- [116] T. Klein, S. Proppert and M. Sauer, *Histochem Cell Biol* **2014**, 1-15.
- [117] S. W. Hell, *Nature Methods* **2009**, 6, 24-32.
- [118] K. C. Neuman and A. Nagy, *Nature Methods* **2008**, 5, 491-505.
- [119] Hollas, *Moderne Methoden der Spektroskopie*, Vieweg, **1995**, p.
- [120] W. Demtröder, *Experimentalphysik 3 : Atome, Moleküle und Festkörper*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2009**, p.
- [121] Reinhard in *Mikro-Axial-Tomographie: Optimierung für die hochauflösende 3D-Rekonstruktion von zellulären Strukturen*, Vol. Ruprecht-Karls Universität, **2007**.
- [122] Cremer, *Principles of spectral precision distance confocal microscopy of molecular nuclear structure.*, Academic Press, **1999**, p.
- [123] a) http://www.kip.uni-heidelberg.de/AG_Cremer/de/content/lokalisationsmikroskopie-spdm/;
b) Cremer, http://www.kip.uni-heidelberg.de/AG_Cremer/pdf-files/KIP_Cremer_Lab_Overview_Oct_22_2009.pdf **2009**.
- [124] D.-P. Hertel, *Chemie in unserer Zeit* **2008**, 42, 192-199.
- [125] R. Kaufmann, P. Lemmer, M. Gunkel, Y. Weiland, P. Müller, M. Hausmann, D. Baddeley, R. Amberger and C. Cremer, **2009**, pp. 71850J-71850J-71819.
- [126] T. P. O'Brien, C. J. Bult, C. Cremer, M. Grunze, B. B. Knowles, J. Langowski, J. McNally, T. Pederson, J. C. Politz, A. Pombo, G. Schmahl, J. P. Spatz and R. van Driel, *Genome Res* **2003**, 13, 1029-1041.
- [127] D. Baddeley, M. B. Cannell and C. Soeller, *Microsc Microanal* **2010**, 16, 64-72.
- [128] M. Schwering in *Die Entwicklung neuer Methoden in der Fluoreszenzmikroskopie auf Basis reversibler chemischer Reaktionen*, Vol. Inaugural - Dissertation Heidelberg, http://archiv.ub.uni-heidelberg.de/volltextserver/13094/1/Dissertation_final.pdf, **2012**.
- [129] U. Kubitschek in *Fluorescence microscopy : from principles to biological applications*, Vol. Wiley-Blackwell
Wiley-VCH, [Oxford]
Weinheim, **2013**, pp. XX, 410 S.
- [130] L. L. Song, E. J. Hennink, I. T. Young and H. J. Tanke, *Biophys J* **1995**, 68, 2588-2600.
- [131] S. W. Hell and J. Wichmann, *Optics Letters* **1994**, 19, 780-782.
- [132] V. Westphal, S. O. Rizzoli, M. A. Lauterbach, D. Kamin, R. Jahn and S. W. Hell, *Science* **2008**, 320, 246-249.
- [133] E. Rittweger, D. Wildanger and S. W. Hell, *Epl* **2009**, 86.

6.1 Literaturverzeichnis

- [134] K. Altenhöner in *Synthese π -erweiterter Diarylethene Zugangswege zu photoschaltbarer Fluoreszenz*, Vol. Universität Bielefeld, Universität Bielefeld, **2010**.
- [135] F. Grull, M. Kirchgessner, R. Kaufmann, M. Hausmann and U. Keschull in *Accelerating Image Analysis for Localization Microscopy with FPGAs*, Vol. IEEE Computer Society, **2011**, pp. 1-5.
- [136] K. Grull, Kaufmann, Hausmann.
- [137] Lemmer in *Lichtmikroskopische Untersuchungen konventionell markierter Präparate weit unterhalb der Beugungsgrenze*, Vol. Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Heidelberg, **2009**.
- [138] C. B. G., *Astronomy and Astrophysics* **1980**, 89, 377-378.
- [139] a) Gunkel in *Lokalisationsmikroskopie mit mehreren Farben und ihre Anwendung in biologischen Präparaten*, Vol. Universität Bielefeld, Bielefeld, **2011**; b) Reinhard in *Mikro-Axial-Tomographie: Optimierung für die hochauflösende 3D-Rekonstruktion von zellulären Strukturen*, Vol. Diplomarbeit Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg, **2007**; c) Goodman, *Fourier Optics*, Roberts & Company, Englewood, **2005**, p.
- [140] M. Kirchgessner in *FPGA-Based Hardware Acceleration of Localization Microscopy*, Vol. diploma thesis in physics UNIVERSITY OF HEIDELBERG, UNIVERSITY OF HEIDELBERG, **2011**.
- [141] G. Frederik, **2011**, pp. 1-5.
- [142] K. Levenberg, *Quarterly Journal of Applied Mathematics* **1944**, II, 164-168.
- [143] D. W. Marquardt, *Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics* **1963**, 11, 431-441.
- [144] N. Bobroff, *Review of Scientific Instruments* **1986**, 57, 1152-1157.
- [145] R. E. Thompson, D. R. Larson and W. W. Webb, *Biophys J* **2002**, 82, 2775-2783.
- [146] W. Nolting, *Grundkurs Theoretische Physik 6 : Statistische Physik*, Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, **2014**, p.
- [147] T. Kreutzig, *Biochemie*, Jungjohann Verlag, Neckarsulm, **1987**, p. 405.
- [148] K. P. C. Vollhardt in *Organische Chemie/ [Hauptbd.]*, Vol. Wiley-VCH, Weinheim, **2007**, pp. XXVIII, 1542 S.
- [149] A. Welle in *Untersuchung der Blutkompatibilität von Poly[bis(trifluoroethoxy)phosphazen] - Oberflächen*, Vol. Heidelberg, Univ., Diss., 1998, **1998**, p. 192 S.
- [150] J. D. Andrade and V. Hlady, *Ann N Y Acad Sci* **1987**, 516, 158-172.
- [151] M. W. Mosesson, *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2005**, 3, 1894-1904.
- [152] A. Weller in *Untersuchung der Blutkompatibilität von Poly[bis(trifluoroethoxy)phosphazen] - Oberflächen*, Vol. Dissertation Universität Heidelberg, Universität Heidelberg, **1998**.
- [153] Weber, *Langmuir* **2007**, 23, 3298-3304.
- [154] a) Lederer, *Die Makromolekulare Chemie* **1975**, 176, 2641-2653; b) Bachmann, *Die Makromolekulare Chemie* **1975**, 176, 2603-2618; c) Hall, <http://jcb.rupress.org/content/5/1/11.full.pdf> **1959**.
- [155] Lederer, *Die Makromolekulare Chemie* **1975**, 176, 2619-2639.
- [156] M. Henzler and W. Göpel, *Oberflächenphysik des Festkörpers*, Teubner, Stuttgart, **1991**, p.
- [157] P. W. Atkins and J. De Paula in *Physikalische Chemie/[Hauptbd.]*, Vol. Wiley-VCH, Weinheim, **2013**, pp. XXXIV, 1036 S.
- [158] D. Leckband, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **2000**, 29, 1-26.
- [159] D. Leckband, *Curr Opin Struct Biol* **2004**, 14, 524-530.
- [160] D. Leckband and J. Israelachvili, *Q Rev Biophys* **2001**, 34, 105-267.
- [161] M. Bartelmann in *Theoretische Physik III: Elektrodynamik*, Vol. Vorlesungsskript Universität Heidelberg, Universität Heidelberg, **2010**.
- [162] F. Höök in *Development of a novel qcm technique for protein adsorption studies*, Vol. Chalmers University of technology Göteborg University, Göteborg, **2001**.
- [163] a) Israelachvili, *Intermolekular & surface forces*, Academic Press, New York, **1992**, p; b) http://de.wikipedia.org/wiki/Hydrophober_Effekt.
- [164] a) C. Dietschweiler, *Environmental Physics* **2008**; b) M. Wahlgren and T. Arnebrant, *Trends in Biotechnology* **1991**, 9, 201-208.
- [165] H. Chen, G. C. Schatz and M. A. Ratner, *Rep Prog Phys* **2012**, 75, 096402.
- [166] B. Nikoobakht and M. A. El-Sayed, *Chemistry of Materials* **2003**, 15, 1957-1962.
- [167] C. E. Hoyle and C. N. Bowman, *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, 49, 1540-1573.
- [168] T. T. Ehler, N. Malmberg and L. J. Noe, *Journal of Physical Chemistry B* **1997**, 101, 1268-1272.
- [169] A. Körtge, P. Elter, R. Lange and U. Beck, *J. Nanomaterials* **2013**, 2013, 50-50.

- [170] M. R. Oberholzer, N. J. Wagner and A. M. Lenhoff, *The Journal of Chemical Physics* **1997**, *107*, 9157-9167.
- [171] G. Brezesinski and H.-J. Mögel, *Grenzflächen und Kolloide : physikalisch-chemische Grundlagen ; mit ... 3 Tab*, Spektrum Akad. Verl., Heidelberg ; Berlin [u.a.], **1993**, p.
- [172] H.-D. Dörfler, *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme : Physik und Chemie ; mit ... 88 Tabellen*, Springer, Berlin ; Heidelberg [u.a.], **2002**, p.
- [173] M. S. Paul Labute, *Chemical Computing Group* **1997**, *107*:9157-9167.
- [174] G. Wedler and H.-J. Freund, *Lehrbuch der physikalischen Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, p.
- [175] O. Dannenberger, M. Buck and M. Grunze, *Journal of Physical Chemistry B* **1999**, *103*, 2202-2213.
- [176] K. A. Peterlinz and R. Georgiadis, *Langmuir* **1996**, *12*, 4731-4740.
- [177] J. R. Rahn and R. B. Hallock, *Langmuir* **1995**, *11*, 650-654.
- [178] I. Langmuir, *J Am Chem Soc* **1918**, *40*, 1361-1403.
- [179] Henninger in *Untersuchungen von Neuen Hochporösen Sorptionsmaterialien für Wärmetransformationsanwendungen*, Vol. Dissertation Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, **2007**.
- [180] Z. Adamczyk, J. Barbasz and M. Cieśla, *Langmuir* **2010**, *26*, 11934-11945.
- [181] C. F. Wertz and M. M. Santore, *Langmuir* **2001**, *18*, 706-715.
- [182] A. Sauter, G. Richter, A. Micoulet, A. Martinez, J. P. Spatz and S. Appel, *Biointerphases* **2013**, *8*, 14.
- [183] S. Herrwerth, T. Rosendahl, C. Feng, J. Fick, W. Eck, M. Himmelhaus, R. Dahint and M. Grunze, *Langmuir* **2003**, *19*, 1880-1887.
- [184] J. D. A. S.I Jeon, *Journal of Colloid and Interface Science* **1991**, *142*, 159-166.
- [185] Q. Xu, J. Mi and C. Zhong, *J Chem Phys* **2010**, *133*, 174104.
- [186] K. Devanand and J. C. Selser, *Macromolecules* **1991**, *24*, 5943-5947.
- [187] K. Antonsen and A. Hoffman in *Water Structure of PEG Solutions by Differential Scanning Calorimetry Measurements*, Vol. (Ed. J. M. Harris), Springer US, **1992**, pp. 15-28.
- [188] a) T. Vringer, J. G. H. Joosten and H. E. Junginger, *Colloid and Polymer Science* **1986**, *264*, 623-630; b) C. Dicke and G. Hahner, *J Am Chem Soc* **2002**, *124*, 12619-12625.
- [189] C. Dicke, *Journal of Physical Chemistry B* **2002**, *106*, 4450-4456.
- [190] S. L. Hager and T. B. Macrury, *Journal of Applied Polymer Science* **1980**, *25*, 1559-1571.
- [191] S. Lüsse and K. Arnold, *Macromolecules* **1996**, *29*, 4251-4257.
- [192] J. Fick in *Charakterisierung von biokompatiblen Oberflächen mittels Vibrations-Summenfrequenzspektroskopie und Neutronenreflektometrie*, Vol. Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, **2005**.
- [193] S. Herrwerth, W. Eck, S. Reinhardt and M. Grunze, *J Am Chem Soc* **2003**, *125*, 9359-9366.
- [194] M. Y. Koledintseva, R. E. Dubroff and R. W. Schwartz, *Progress in Electromagnetics Research-Pier* **2006**, *63*, 223-242.
- [195] S. Bosch, J. Ferre-Borrull, N. Leinfellner and A. Canillas, *Surface Science* **2000**, *453*, 9-17.
- [196] T. Weiland, *International Journal of Numerical Modelling-Electronic Networks Devices and Fields* **1996**, *9*, 295-319.
- [197] S. OSG in <http://optics.synopsys.com/rsoft/rsoft-passive-device-diffractMOD.html>, Vol. **2014**.
- [198] I. RSoft Design Group, *RSOFT* **2012**.
- [199] T. Geiler in *Polarisationsbildgebung in der industriellen Qualitätskontrolle*, Vol. Heidelberg, Univ., Diss., 2008, **2008**, pp. Online-Ressource.
- [200] L. Li, *Journal of the Optical Society of America A* **1993**, *10*, 2581-2591.
- [201] L. Li, *Journal of the Optical Society of America A* **1996**, *13*, 1870-1876.
- [202] L. Li, J. Chandezon, G. Granet and J.-P. Plumey, *Applied Optics* **1999**, *38*, 304-313.
- [203] A. P. Hibbins in *Grating coupling of surface plasmon polaritons at visible and microwave frequencies*, Vol. Dissertation University of Exeter, University of Exeter, **1999**.
- [204] T. Schuster in *Simulation von Lichtbeugung an Kreuzgitter-Strukturen und deren Anwendung in der Scatterometrie*, Vol. Dissertation Universität Stuttgart, Institut für Technische Optik der Universität Stuttgart, **2010**.
- [205] H.-C. Mertins and M. Gilbert, *Prüfungstrainer Experimentalphysik : Physik verstehen und lernen für die mündliche Prüfung im Bachelor (Haupt- und Nebenfach)*, Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, **2011**, p.
- [206] W. Demtröder, *Experimentalphysik 2 : Elektrizität und Optik*, Springer, Berlin, Heidelberg, **2013**, p.

6.1 Literaturverzeichnis

- [207] user_manual_HR4000_High-Resolution_Spectrometer, **2014**.
- [208] Ocean_Optics_user_instructions:_Balanced_Deuterium_Tungsten_Halogen_Light_Source, <http://www.oceanoptics.com/products/dh2000bal.asp> **2013**.
- [209] Reinhold_Jehle_Zeichnung_für_institutseigene_Werkstatt.
- [210] E. Hecht, *Optik*, Oldenbourg, München, **2009**, p.
- [211] in *Modul Grundpraktikum Physik – Teil II Polarisation von Licht*, Vol. Carl von Ossietzky Universität Oldenburg, Carl von Ossietzky Universität Oldenburg, **2013**.
- [212] Pco.imaging in *sensicam Bedienungsanleitung*, Vol. user manual Kelheim **2004**.
- [213] G. B. Sabrina Rossberger, David Baddeley, Rainer Heintzmann, Udo Birk, Stefan Dithmar and Christoph Cremer, *Journal of optics* **2013**, 15.
- [214] Y. J. Zhang, W. Li and K. J. Chen, *Journal of Alloys and Compounds* **2008**, 450, 512-516.
- [215] N. Waly in *Optimization of core-shell nanoparticle layers for optical biosensing*, Vol. Heidelberg, Univ., Diss., 2011, **2011**, pp. Online-Ressource.
- [216] J. Rybczynski, U. Ebels and M. Giersig, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2003**, 219, 1-6.
- [217] P. A. Kralchevsky and K. Nagayama, *Langmuir* **1994**, 10, 23-36.
- [218] N. Denkov, O. Velev, P. Kralchevski, I. Ivanov, H. Yoshimura and K. Nagayama, *Langmuir* **1992**, 8, 3183-3190.
- [219] A. S. Dimitrov and K. Nagayama, *Chemical Physics Letters* **1995**, 243, 462-468.
- [220] Zindel in *Experimentaltvortrag Anorganische Chemie Vom Gold machen zum Geld machen - Kurzüberblick zu kolloid dispersen Systemen in der anorganischen Chemie*, Vol. Philipps-Universität Marburg Marburg, **2009**.
- [221] K. R. Brown and M. J. Natan, *Langmuir* **1998**, 14, 726-728.
- [222] Pucci in http://www.kip.uni-heidelberg.de/AG_Pucci/vorlesungsskripte/APucci-SurfacesAndNanoStructures-WS10/SurfaceScience22WS10-11.pdf, Vol. **2011**.
- [223] Quinn, J. AM. CHEM. SOC. **2003**, 125, 6644-6645.
- [224] <http://www.halbleiter-scout.de/halbleitertechnologie/abscheidung/physikalische-dampfabcheidung/kathodenzerstaeubung-sputtern.html>.
- [225] L. Purwaningsih in *Fabrication of nanostructured materials and their applications*, Vol. Dissertation Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen Universität, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen Universität, **2011**.
- [226] Frens, *nature physical science* **1973**, 241, 20-22.
- [227] Z. Feldoto, I. Varga and E. Blomberg, *Langmuir* **2010**, 26, 17048-17057.
- [228] in *Zusammenarbeit mit Dipl.-Phys. Frieder Märkle (KIT)*.
- [229] K. S. Lin, A. K. Adhikari, C. N. Ku, C. L. Chiang and H. Kuo, *International Journal of Hydrogen Energy* **2012**, 37, 13865-13871.
- [230] R. Dahint, E. Trileva, H. Acunman, U. Konrad, M. Zimmer, V. Stadler and M. Himmelhaus, *Biosensors and Bioelectronics* **2007**, 22, 3174-3181.
- [231] J. P. Spatz, S. Mössmer, C. Hartmann, M. Möller, T. Herzog, M. Krieger, H.-G. Boyen, P. Ziemann and B. Kabius, *Langmuir* **1999**, 16, 407-415.
- [232] T. Lohmüller, D. Aydin, M. Schwieder, C. Morhard, I. Louban, C. Pacholski and J. Spatz, *Biointerphases* **2011**, 6, MR1-MR12.
- [233] J. P. Spatz, S. Sheiko and M. Moller, *Macromolecules* **1996**, 29, 3220-3226.
- [234] S. Kronholz, *Schriften des Forschungszentrums Jülich Reihe Informationstechnik / Information Technology Band* **2007**, 15.
- [235] A. S. Dimitrov and K. Nagayama, *Langmuir* **1996**, 12, 1303-1311.
- [236] invitrogen in *Alexa Fluor® Succinimidyl Esters*, Vol. **2009**.
- [237] W. Chiuman, *Nucleic Acids Research* **2007**, 35, 401-405.
- [238] Invitrogen in *Amine-Reactive Probes MP00143*, Vol. <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp00143.pdf>, **02.08.2013**.
- [239] m. probes in *Alexa Fluor® Succinimidyl Esters (NHS esters) MP10168*, Vol. <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp10168.pdf>, **02.08.2013**.
- [240] F. Staier, H. Eipel, P. Matula, A. V. Evsikov, M. Kozubek, C. Cremer and M. Hausmann, *Rev Sci Instrum* **2011**, 82, 093701.
- [241] O. Optics in *SpectraSuite® Spectrometer Operating Software Installation and Operation Manual*, Vol. user Manual, USA, **2009**.
- [242] R. P. Van Duyne and A. J. Haes, *Analytical and bioanalytical chemistry* **2004**, 379, 920-930.
- [243] Kralchevsky, *Particles at Fluid Interfaces and Membranes Attachment of Colloid Particles and Proteins to Interfaces and Formation of Two-Dimensional Arrays*, Elsevir, **2001**, p.

- [244] P. Frank in *Über die Stabilität frei fliegender flüssiger Filme*, Vol. Dissertation Universität Konstanz, Universität Konstanz, **2011**.
- [245] D. Megias-Alguacil and L. J. Gauckler, *Colloid and Polymer Science* **2010**, 288, 1501-1502.
- [246] Burmeister, *Physikalische Blätter* **2000**, 56, 49-51.
- [247] J. Tomas, *Fakultät für Verfahrenstechnik und Systemtechnik der Universität Magdeburg* http://www.mvt.ovgu.de/mvt_media/Seminare+Praktika/LoesungPartikelwechselwirkungen-p-1822.pdf **download 28.04.2014**.
- [248] G. A. http://web2.clarkson.edu/projects/crcd/me437/downloads/5_vanderWaals.pdf in *PARTICLE TRANSPORT, DEPOSITION AND REMOVAL*, Vol. Clarkson University, **14.04.14**.
- [249] Seehuber in *Konformation und Aktivität von Glucose Oxidase auf homogenen beschichteten und nanostrukturierten Oberflächen*, Vol. Ruprecht-Karls-Universität, **2011**.
- [250] H. Acunman in *Herstellung optisch aktiver Schichten in der Nanopartikeltechnologie*, Vol. *Diplomarbeit* Universität Heidelberg, Universität Heidelberg, **2004/2005**.
- [251] Hiep, *ACS Nano* **2009**, 3, 446-452.
- [252] D.-K. Kim, K. Kerman, M. Saito, R. R. Sathuluri, T. Endo, S. Yamamura, Y.-S. Kwon and E. Tamiya, *Analytical Chemistry* **2007**, 79, 1855-1864.
- [253] N. W. Ashcroft and N. D. Mermin, *Festkörperphysik*, Oldenbourg, München, **2013**, p.
- [254] S. Kawata and V. M. Shalaev, *Tip enhancement*, Elsevier, Amsterdam ; Boston, **2007**, p. xiv, 323 p.
- [255] M. A. Ordal, R. J. Bell, R. W. Alexander, Jr., L. L. Long and M. R. Querry, *Appl Opt* **1985**, 24, 4493.
- [256] H. H. Takei, Michael; Okamoto, Takayuki, *Optics Letters* **2002**, 27, 342-344.
- [257] s. p. f. o. s. SCOUT, including dielectric function database., *supplied by M. Theis Hard- and Software Aachen, Germany*.
- [258] M. Tsotsalas, *Persönliches Gespräch* **2014**.
- [259] Escher, <http://www.herakleidon-art.gr/detail.cfm?frompage=21&StartRow=21&ItemID=31&get=exhibits&maxrows=1> **1952**.
- [260] O. Zybaylo, O. Shekhah, H. Wang, M. Tafipolsky, R. Schmid, D. Johannsmann and C. Woll, *Phys Chem Chem Phys* **2010**, 12, 8092-8097.
- [261] C. Chen, N. Verellen, K. Lodewijks, L. Lagae, G. Maes, G. Borghs and P. Van Dorpe, *Journal of Applied Physics* **2010**, 108.
- [262] N. Guo, W. D. Hu, X. S. Chen, L. Wang and W. Lu, *Opt Express* **2013**, 21, 1606-1614.
- [263] P. Mandal, P. Gupta, A. Nandi and S. A. Ramakrishna, *Journal of Nanophotonics* **2012**, 6.
- [264] Z. Chen, I. R. Hooper and J. R. Sambles, *Journal of Modern Optics* **2006**, 53, 1569-1576.
- [265] A. Nesterov-Müller in *Ortsgenaue Ablagerung von Aminosäurepartikeln für die kombinatorische Synthese von Peptidarrays auf einen Chip*, Vol. Heidelberg, Univ., Diss., 2006, **2006**, pp. Online-Ressource.
- [266] Y. Yin, Y. Lu, B. Gates and Y. Xia, *J Am Chem Soc* **2001**, 123, 8718-8729.
- [267] S. L. Westcott, J. B. Jackson, C. Radloff and N. J. Halas, *Physical Review B* **2002**, 66.
- [268] V. I. Belotelov, A. N. Kalish, A. K. Zvezdin, A. V. Gopal and A. S. Vengurlekar, *Journal of the Optical Society of America B* **2012**, 29, 294-299.
- [269] T. Hirth, *Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB*, http://www.igb.fraunhofer.de/content/dam/igb/de/documents/broschueren/Zellbasierte_Assays_fuer_das_Wirkstoff_und_Target_Screening.pdf, 17.03.2014 **download 28.04.2014**.
- [270] Plutarch, http://de.wikipedia.org/?title=Liste_griechischer_Phrasen/Omikron **download 28.04.2014**.

6.2 Liste der betreuten Forschungsarbeiten

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit habe ich konsekutive, forschungsorientierte Praktika betreut. Meine Leistung bestand neben der Wahl und Planung des Themas besonders darin abhängig von den jeweiligen Vorkenntnissen der Studenten Wissen weiterzugeben, zu motivieren und gemeinsames Know-how nachhaltig und mit höchstem Nutzen für den Erfolg des Praktikums einzusetzen. Die Dauer der Forschungsarbeit bestand je aus 4 Wochen Laborarbeit und 2 Wochen schriftlicher Ausarbeitung. Ich danke den Teilnehmern:

M. Rappold,

Mikrostrukturierung von core-shell-Nanopartikelfilmen mittels Microkontakt Printing. Arbeitsgruppe Biosensoren und Biomaterialien, (Sommersemester 2011).

S. Langbein,

Auswirkung des Kern/Schale-Verhältnisses auf die Verschiebung des Absorptionsspektrums. Arbeitsgruppe Biosensoren und Biomaterialien, (Wintersemester 2011/2012).

C. Meier,

Magischer Winkel für nanostrukturierte Core-Shell-Oberflächen. Arbeitsgruppe Biosensoren und Biomaterialien, (Wintersemester 2011/2012).

A. Kretzschmar,

Optimierung von core-shell-nanoparticeln zur Verwendung als Biosensor. Arbeitsgruppe Biosensoren und Biomaterialien, (Wintersemester 2012/2013).

S. Mehlhose,

Brechungsindexsensitivität und Größeneffekt-Einfluss auf die Plasmonenresonanz von Goldnanopartikeln. Arbeitsgruppe Biosensoren und Biomaterialien, (Wintersemester 2012/2013).

K. Rübenacker,

Markierungsfreie Detektion von Proteinadsorptionsprozessen mittels nanostrukturierter Oberflächen. Arbeitsgruppe Biosensoren und Biomaterialien, (Wintersemester 2012/2013).

S. Aslan,

Optimierung von Kern-Schale Nanopartikel Monolagen zum optischen in situ Proteinnachweis. Arbeitsgruppe Biosensoren und Biomaterialien, (Wintersemester 2012/2013).

C. Benzin,

Untersuchung des Einflusses des Kern-Schalen-Verhältnisses und der Benetzbarkeit auf die optischen Eigenschaften und Sensitivität von Nanopartikelfilmen, Arbeitsgruppe Biosensoren und Biomaterialien, (Sommersemester 2013).

6.3 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Zwischen dem Volumeneffekt und dem Bindungsprozess muss separiert werden. I.: Eine Pufferlösung mit Brechungsindex n_1 befindet sich in Kontakt mit der Sensoroberfläche. II.: Eine Protein-Lösung mit Brechungsindex n_2 befindet sich in Kontakt mit der Sensoroberfläche. Infolge des Adsorptionsprozesses bildet sich ein Proteinfilm mit Brechungsindex n_3 auf dem Sensor. III.: Schematischer Aufbau des Sensors. 2
- Abb. 2:** Dielektrische Funktion von Gold im sichtbaren Spektralbereich. Schwarz sind die experimentellen Daten^[18], rot ist die Anpassung mit dem Drude-Modell (nach^[19]). 5
- Abb. 3:** Darstellung von der propagierenden Plasmonenresonanz,^[33] der gewählten Geometrie und des Koordinatensystems (**a, links**), der Abklinglängen im Metall und Dielektrikum (**b, Mitte**) und der Dispersionsrelation von Licht und Oberflächenplasmonen (**c, rechts**)^[34] Die Anregung kann mit einem Otto-Aufbau erfolgen, bei dem Laserlicht unter der Bedingung der Totalreflexion an der Basis eines Prismas reflektiert wird. Die Basis ist die Grenzfläche zu einem Goldfilm. Die Kurve **A** kennzeichnet den Fall ohne Prisma und stellt die Dispersionsrelation eines Photons, das sich als ebene Welle in Luft ausbreitet, dar. Es tritt kein Schnittpunkt mit der Dispersionskurve **B** auf. **B** ist die Dispersion des Oberflächenplasmons, das sich an der Metall/Dielektrikum-Grenzfläche ausbreitet. **C** ist die Dispersionsrelation eines Photons, das sich im Prisma fortbewegt. Im Schnittpunkt der Kurven **B** und **C** erfolgt die Anregung der Plasmonen. 6
- Abb. 4: Links:** Anregung der Oberflächenplasmonen mit Gitterkopplung (nach^[47]) und **Rechts:** Anregung der Oberflächenplasmonen mit dem Otto-Aufbau.^[48] θ ist der Einfallswinkel des Lichtes, m die Beugungsordnung, Λ die Gitterperiode, ϵ_m der Brechungsindex des Metalls, q der Abstand zwischen Prisma und Metallfilm. k_{ph} ist der Wellenvektor des Lichtes. n_p und n_d sind der Brechungsindex des Prismas bzw. der dielektrischen Schicht. 8
- Abb. 5:** Darstellung der Anregung der lokalisierten Plasmonenresonanz.(nach^[29]) 9
- Abb. 6:** Links: Darstellung des Energie-Diagramms für die Plasmon-Hybridisierung in Metall-Nanoschalen resultierend aus der Wechselwirkung zwischen Partikel-Plasmonen und Hohlraum-Plasmonen.^[52] Rechts: Schematische Darstellung der Nanopartikel Geometrie. R_1 ist der Radius der Kugel, die Differenz von R_2 und R_1 ist die Schalendicke. 10
- Abb. 7:** Vergleich der theoretisch berechneten Extinktionswerte im Fernfeld einer Nanokugel von 20 nm Radius (schwarze Kurve) und eines Core-Shell-Nanopartikels (blaue Kurve) bestehend aus 63 nm Silika und 10 nm (A) Silber bzw. (B) Gold. Als Umgebung der Partikel wurde Ethanol gewählt (Brechungsindex: 1,36). Der Real- (ϵ') und Imaginärteil (ϵ'') der dielektrischen Funktionen (rote Kurven) wird für (A) Silber bzw. (B) Gold dargestellt.^[55] 11
- Abb. 8:** I.: Schematische Darstellung konzentrischer Nanoschalen. Die Struktur besteht aus einem SiO_2 -Nanopartikel mit Radius R_1 , darauf aufgebracht ist eine Schale aus Gold mit dem Radius R_2 , eine Schale aus SiO_2 mit Radius R_3 und einer Goldschale mit Radius R_4 . II.: Veranschaulichung der induzierten Polarisation in den konzentrischen Schalen für die beobachteten Moden. III.: Gemessenes Extinktionsspektrum (durchgezogene Kurve) und beobachtete Eigenmoden nach dem Hybridisierungsmodell für $\text{SiO}_2/\text{Au}/\text{SiO}_2/\text{Au}$ -Nanoschalen mit Durchmessern $R_1/R_2/R_3/R_4 = 80 \text{ nm}/107 \text{ nm}/135 \text{ nm}/157 \text{ nm}$ ^[57]. 12
- Abb. 9:** Resonanzposition als Funktion des Durchmessers von Goldnanostrukturen mit einer Periode von 780 nm auf 31 nm SiO_2 (**links**).^[61] Schematische Darstellung der Verteilung der Oberflächenladungen für die asymmetrische, dipolaktive Mode im Fall isolierter, schwach und stark koppelnder Zylinder (**rechts**).^[17] 13

6.3 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 10:** Links: Abhängigkeit der Resonanzwellenlängenverschiebung vom Brechungsindex der Umgebung von goldbeschichteten Nanopartikelfilmen (20 nm Gold auf 100 nm Polystyrolkugeln)^[64] auf festem Träger. Experimentell erfolgt die Brechungsindexvariation durch Verwendung von Flüssigkeiten mit unterschiedlichem Brechungsindex z. B. Ethanol, Propanol und Glycerin-Wasser-Gemischen. Der Brechungsindex kann mit einem Abbe-Refraktometer gemessen werden oder nach der Clausius-Mossotti-Gleichung berechnet werden.^[14] Der untersuchte Brechungsindexbereich von 1,0 RIU bis 1,5 RIU umfasst 0,5 RIU (RIU=refractive index units). Rechts: Änderung der Resonanzwellenlänge infolge von Brechungsindexänderungen in der Umgebung eines SPR-Sensors, der aus einem planaren Prisma mit einem Gold-Film von 50 nm besteht.^[63] Der Verlauf ist in einem kleinen Brechungsindexbereich linear. Der dargestellte Bereich umfasst 0,0003 RIU. 14
- Abb. 11:** Links: Dargestellt ist die Verschiebung der Resonanzwellenlänge als Funktion des Brechungsindexes von Kern-Schale-Nanopartikeln mit unterschiedlicher Schalendicke aus Gold (schwarz 40 nm, rot 30 nm, grün 20 nm, blau 10 nm, hell blau 8 nm, magenta 4 nm) und einer SiO₂-Partikelgröße von 80 nm.^[65] Rechts: Abhängigkeit der Sensitivität vom Verhältnis aus Schalendicke t zum Partikelradius R .^[65] Die Werte basieren auf theoretischen Berechnungen auf Grundlage der Mie-Theorie für Kern-Schale-Nanopartikel. Für die Berechnungen wurden die Literaturwerte für die dielektrischen Daten der Goldschale nach Johnson und Christy^[18] verwendet. Für SiO₂ wurde ein konstanter Brechungsindex von 1,45 eingesetzt. 15
- Abb. 12:** Abhängigkeit der SPR-Resonanz von der Dicke des Adsorbates (links) und schematisches Diagramm der Zweilagengstruktur aus dem Adsorbat a mit der Dicke d , dem Brechungsindex n_a und der Flüssigkeit über dem Sensor mit Brechungsindex n_s (rechts).^[63] 16
- Abb. 13: Links:** Schematischer Aufbau selbstorganisierender Monolagen aus drei Komponenten: die Kopfgruppe bindet über Chemisorption an die Oberfläche, die intermolekularen Wechselwirkungen der Gerüstkomponenten bestimmen die räumliche Orientierung der Moleküle, die funktionellen Endgruppen steuern die physikalischen und chemischen Grenzflächeneigenschaften.^[71] **Rechts oben:** Darstellung der hochgeordneten Struktur von Alkanthiol-Molekülen auf einem Goldsubstrat. Die Verkippung der Alkankette bezüglich der Probenormalen beträgt etwa 30°. **Rechts unten:** Hochgeordnete Adsorptionsplätze der Alkanthiole auf einer Au(111)-Oberfläche.^[74] 18
- Abb. 14: Links:** Schematische Darstellung des μ C-Druck-Verfahrens auf Gold zur gezielten Adsorption von Nanopartikeln:^[77] a) Stempeln vom Oktadecanthal b) Füllen der Lücken mit Natriumthioglykolat (TG) c) Partikeladsorption. **Rechts:** Verfahren zur großflächigen Funktionalisierung von ebenen und nicht planaren Oberflächen. Hierzu können rollbare Stempel (**rechts, oben**) eingesetzt werden oder nicht ebene Gold-Oberflächen über den Stempel gerollt werden (**rechts, unten**).^[74] 19
- Abb. 15:** Carbodiimid-Methode zur Aktivierung der Carbonsäure.^[80] 20
- Abb. 16:** Schematische Darstellung der Herstellung von SURMOFs auf Substraten, die mit einem SAM funktionalisiert wurden.^[85] 21
- Abb. 17: Links:** Aufbau des Rasterelektronenmikroskops und Position des Inlens- und SE2-Detektors. **Rechts:** Vergrößerter Ausschnitt der Streubirne mit den Wechselwirkungsprodukten des Primärelektronenstrahls (nach ^[102]). 23
- Abb. 18:** Monte-Carlo Simulation der Trajektorien von Primär-Elektronen (3 keV, Strahldurchmesser 1 nm) beim Eintritt in einen Festkörper (aus Gold) als Tiefenprofil (a) und Flächenprofil (b). Nur Primär-Elektronen auf den rot gezeichneten Trajektorien verlassen die Probe.^[108] 24
- Abb. 19:** Darstellung des SE2- oder Everhart-Thornley-Detektor.^[101] PE sind die primären Elektronen, SE sind die Sekundärelektronen und RE sind Rückstreuerelektronen. 25
- Abb. 20:** Links: Darstellung des Streuscheibchens eines punktförmigen Emitters und des dreidimensionalen Intensitätspeaks (Airy-Funktion). Rechts: Grenze der Auflösung im Falle benachbarter Punkte. Die Intensität ist normiert und farbkodiert dargestellt (nach ^[109] ^[110]). 26
- Abb. 21:** Prinzipskizze zum Heisenbergschen Gedankenexperiment^[111] 27

- Abb. 22: Energieniveaus von Singulett-Grundzustand S_0 und Anregungszustand S_1 sowie Triplett-Zustand T_1 und deren Vibrationsniveaus v_i . IC=Internal Conversion, ISC= Inter System Crossing, Fl= Fluoreszenz und Ph= Phosphoreszenz.^[121] 28
- Abb. 23: Prinzip der SPDM a) Drei im Abstand von jeweils 50 nm liegende mit unterschiedlicher spektraler Signatur leuchtende Punkte b) das von ihnen erzeugte Beugungsbild und c) deren Intensitätsverteilung. Die einzelnen Punkte sind getrennt erkennbar (nach ^[122]). 28
- Abb. 24:** Dargestellt ist das Prinzip photochromer Fluoreszenzfarbstoffsysteme. Der An-Zustand (**oben**) des Farbstoffs bei offenem Photoschalter und die Unten: Fluoreszenzlöschung durch Ring-Schließung infolge der Wechselwirkung des Farbstoffs mit dem Photoschalter (Aus-Zustand, **unten**).^[134] 30
- Abb. 25:** Intensitätsverteilung eines Einzelmolekülsignals (links) und Anpassung einer 2D-Gaußfunktion mit zusätzlichem Hintergrundterm (rechts). Ein Pixel ist in x- und y- Richtung 65 nm groß.^[139a] 31
- Abb. 26:** Strukturmodell des Fibrinogen-Moleküls (oben) und die Nettoladungen der einzelnen Segmente (unten).^[150] 33
- Abb. 27: Links:** Veranschaulichung der Wahl einer Treppenstufe zur Berechnung beliebiger Profilformen^[196] **Rechts:** Beschreibung einer Gitterstufe durch vierzehn Koeffizienten eines Rechtecks.^[199] 40
- Abb. 28:** Darstellung der verwendeten Geometrie zur Modellierung der Nanopartikelfilme, Elementarzelle und Einfallsebene. Die Ansicht ist in **I.** 3 dimensional, in **II.** von der Seite und **III.** Sicht von oben. 40
- Abb. 29:** Die Intensitätsverteilung der Lichtquelle als Funktion der Wellenlänge. 42
- Abb. 30:** Gittermonochromator mit Eintrittsspalt S1, Hohlspiegeln Sp1 und Sp2, Gitter G, Austrittsspalt S2 und Photodetektor Ph.D.^[202] 42
- Abb. 31:** Aufbau einer Lichtleitfaser sowie Ausbreitung von Lichtwellen durch Totalreflexion an der Grenzschicht Kern-Mantel und radiales Brechzahlprofil für (a) eine Stufenindexfaser, (b) eine Gradientenfaser.^[202] 43
- Abb. 32:** UV-NIR-Aufbauten zur Untersuchung der Extinktionseigenschaften der Biosensoren unter Lichteinfall entlang der Probenormalen (links) und unter Winkeln im Bereich von 30° - 50° (rechts ^[205]). 44
- Abb. 33: Links:** UV-NIR-Aufbauten zur polarisationsabhängigen Untersuchung der Extinktionseigenschaften der Biosensoren unter Lichteinfall unter einem festen Reflexionswinkel zur Probenormalen. **Rechts:** Darstellung der Orientierung von s- und p-polarisiertem Licht. Als Beispiel für die verwendeten nanostrukturierten Proben ist hier ein Würfel aus PMMA, der mit Gold beschichtet ist, abgebildet. 45
- Abb. 34:** SPR-Imaging-Aufbau bestehend aus der Lichtquelle (1), der Glasfaser (2) mit 600µm Durchmesser, einem Kollimator (3), dem Monochromator (4), konkave (5) und konvexe (6) Linse, der Probe (7), der Abbildungslinse (8) und der CCD-Kamera (9) (nach ^[59]). Um eine größere Fläche auszuleuchten wurde die Linse (3 und 6) entfernt. 46
- Abb. 35:** Präparation der metallisierten Nanopartikeloberflächen. Das Substrat wird gereinigt, dielektrische Partikel werden in einem Langmuir-Blodgett ähnlichen Verfahren auf den Träger übertragen, darauf Metall-Nanopartikel aus einer Suspension abgeschieden (Seeding) und diese Nukleationskeime unter Verwendung von Hydroxylamin vergrößert (Plating). 49
- Abb.36:** Darstellung der Schrittfolge zur Übertragung dielektrischer Nanopartikel als dicht gepackte Monolage: (a) Übertrag der Partikel mit Hilfe eines Deckglases auf die Wasseroberfläche, (b) Hinzugabe von Detergenzien zur Verringerung der Oberflächenspannung und (c) Aufnahme der dicht gepackten Partikelschicht durch ein Substrat (nach ^[210]). 49
- Abb. 37:** Schematische Darstellung der mittels Citrat-Liganden stabilisierten Oberflächenladung der Goldkolloide.^[216] 50
- Abb. 38:** Schematische Darstellung der Goldabscheidung. Nukleation in Form neuer Partikel findet nicht statt (nach ^[217]). 51

6.3 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 39:** Darstellung des Herstellungsprozesses vollständig mit Gold umhüllter Nanopartikel. Nach elektrostatischer Aufladung der Partikeloberfläche mithilfe eines Polymers erfolgen die Abscheidung von Nukleationskeimen aus einer Lösung und die anschließende Vergrößerung der Goldnanopartikel zu einem geschlossenen Mantel. 52
- Abb. 40:** Herstellung isolierter Partikel mittels reaktiven Ionenplasmas. Infolge des Ätzprozesses nimmt der Partikeldurchmesser d_1 der hexagonal dicht gepackten Polystyrol-Nanopartikel auf den Durchmesser $d_2 < d_1$ ab. Die Partikel werden kleiner und der Partikelabstand erhöht sich. 53
- Abb. 41:** Aufbau zur Messung der Absorptionseigenschaften in Transmission. Eine Küvette aus Quarzglas wird mit polychromatischem Licht bestrahlt und das transmittierte Licht mit einem UV-VIS-Spektrometer (HR 2000) analysiert. 54
- Abb. 42:** Darstellung der Struktur, die durch Elektronenstrahlithographie erzeugt wird. Es wird im Folgenden die Bezeichnung (l/b/h- L_{VS}) verwendet für (Länge/Breite/Höhe-Abstand benachbarter Quader), B_{VS} und L_{VS} sind Breite und Länge der Verbindungsstege. Die Höhe der Verbindungsstege und Quader stimmen überein. 55
- Abb. 43:** Layout der Templat-Strukturen, d_1 ist der Durchmesser der zylinderförmigen Vertiefungen, d_2 ist die Distanz benachbarter Lochränder, t ist die Tiefe der Struktur. 56
- Abb. 44:** Herstellung von Nanopartikel Clustern mithilfe von Templatstrukturen. Im ersten Schritt wird die Probe mit zylinderförmigen Vertiefungen metallisiert. Auf den Templatstrukturen werden mit einer Langmuir-Blodgett ähnlichen Übertragungsmethode („Floating“) aminoterminierte Silikakugeln adsorbiert. Partikel, die sich nicht in den Vertiefungen befinden, werden durch Abwischen entfernt. 57
- Abb. 45:** Versuchsaufbau zur Messung der Pyridin Diffusion (links) und XRD-Diagramme (rechts). Rechts oben ist das Röntgendiffraktions-Diagramm von Probe 1, darunter von Probe 2 und unten rechts das theoretisch zu erwartende Spektrum. Das Röntgendiffraktions-Diagramm wurde am KIT in Zusammenarbeit mit Dr. H. Gliemann (KIT, IFG, Leitung Prof. Dr. Christof Wöll) gefertigt. 60
- Abb. 46:** Schematischer Aufbau zur winkelabhängigen Messung der optischen Eigenschaften unter Flüssigkeit und der Sensitivitätstests. 60
- Abb. 47:** Draufsicht zur Anordnung beim Übertrag des Peptidarrays (links) und Seitenansicht (rechts). 61
- Abb. 48:** Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme der verwendeten Oberflächentypen. Oben links: nasschemisch mit Gold metallisierter Nanopartikelfilm (SE2-Aufnahme) Oben rechts: Nasschemisch metallisierte elektronenstrahlithographisch hergestellte Würfelstruktur (600/600/600-600). Die Würfel mit der Kantenlängen 600 nm sind über genauso lange aber nur etwa ein Drittel so breite Stege verbunden. Unten: hexagonal geordnete Gold-Nanopartikel mit unterschiedlichen Partikelabständen. Die Proben wurden mit mizellarer Block-Copolymer-Nanolithographie hergestellt. Unten links: Der mittlere Abstand zwischen benachbarten Gold Nanopartikeln beträgt 38 nm und der Partikeldurchmesser $8 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$. Unten rechts: Der Partikelabstand ist 70 nm und Partikeldurchmesser 20 nm. Die Aufnahmen wurden mit dem Inlens-Detektor aufgenommen. 62
- Abb.49:** Schematische Darstellung nanostrukturierter Oberflächen mittels mizellarer Block-Copolymer-Nanolithographie (nach ^[228]). 63
- Abb. 50:** Dargestellt ist die chemische Struktur von Alexa 647 (**links**)^[234] und **rechts** das gemessene Absorptions- (schwarz) und Fluoreszenzspektrum (blau). Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte bei 630 nm um den Emissionspeak beobachten zu können. Die Stokes-Verschiebung beträgt 19,4 nm, was 0,06 eV entspricht. Die Fluoreszenzmessung erfolgte in der Gruppe von Prof. (apl.) Dr. Dirk-Peter Herten mit dem Cary Eclipse Fluoreszenz Spektrophotometer (Varian, Darmstadt). 64
- Abb.51:** Reaktionsgleichung des Alexa 647-Farbstoffmoleküls mit 11-Amino-1-undecanthiol, das an das mit Goldnanopartikeln beschichtete Deckglas gebunden vorliegt. R_2 ist das Farbstoffmolekül und R_1 das gebundene 11-Amino-1-undecanthiol ohne die NH-Gruppe. 65

- Abb.52:** Schematische Darstellung des Aufbaus der mittels hexagonal angeordneten Goldnanopartikeln strukturierten Probe. 11-Amino-1-undecanethiol Moleküle dienen als Platzhalter zwischen den Goldnanopartikeln und den Alexa 647-Molekülen. Die Bindung findet in alkalischem Milieu statt. 65
- Abb. 53:** Dargestellt ist die Referenz **I.** und die Proben mit unterschiedlicher Metallisierung: bedampftem dielektrischem Nanopartikelfilm **II.**, besputterten **III.**, nasschemisch auf der Oberfläche metallisierten **IV.** sowie nasschemisch in Lösung metallisierten und anschließend auf der Oberfläche abgeschiedenen Partikeln. **V.** Dielektrische Kontaktpunkte zwischen benachbarten Partikeln sind für die Proben vorhanden, bei denen die Metallisierung auf der Oberfläche erfolgt (II., III. und IV). d ist der Durchmesser der dielektrischen Nanopartikel. 69
- Abb. 54:** REM-Aufnahmen der geflooteten Silika-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 540 nm nach Besputtern mit 30 nm Gold **I.** und nach nasschemischer Metallisierung **II.** **III.** zeigt die Anordnung von geflooteten Polystyrol-Nanopartikeln mit einem Durchmesser von 190 nm, die Adsorption erfolgt in einer Monolage **IV.** und **V.** zeigen die Kontaktflächen zum Boden. In **VI.** sind die Kontaktpunkte zu den nächsten Nachbarpartikeln dargestellt. Die Aufnahmen wurden durch Abziehen der Partikel mit einem Klebeband aufgenommen. Untersuchungen der Nanopartikel auf dem Klebeband zeigen die Kontaktpunkte zur Oberfläche für die mit Floating übertragenen und nasschemisch metallisierten Polystyrol-Nanopartikel vom Durchmesser 380 nm **VII.** und 190 nm **VIII.** **IX.** zeigt Polystyrol-Nanopartikel, die in Lösung vollständig umhüllt wurden. Die Adsorption der vollständig umhüllten Partikel erfolgt in Multilagen. Aufgrund des Materialkontrastes erscheinen die Goldnanopartikel als helle Punkte. Die Plating-Zeit betrug 3 min. 70
- Abb. 55:** Schematische Darstellung zweier Partikel, die durch eine Flüssigkeitsbrücke verbunden sind.^[244] 71
- Abb. 56: Links:** Extinktionsspektren von geflooteten Polystyrol-Nanopartikeln mit einem Durchmesser von 191 nm (**blau**), 380 nm (**schwarz**) und 570 nm (**rot**), die nach der Adsorption auf dem Substrat nasschemisch metallisiert wurden, sowie das Spektrum vollständig mit Gold umhüllter, auf dem Träger abgeschiedener Nanopartikel mit einem Durchmesser von 384 nm (**grün**). Die Messungen erfolgten alle in Reflexion unter Lichteinfall parallel zur Probennormalen im Medium Luft. Der mit A gekennzeichnete Peak kommt von der Absorption der Polystyrol-Nanopartikel bei 238 nm. **Rechts:** Änderung der optischen Sensorantwort infolge des nasschemischen Metallisierungsprozesses der Polystyrol-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 570 nm. Die beiden Seeding-Schritte erfolgen jeweils über Nacht. Die Plating-Zeit betrug 3 min. 72
- Abb. 57: Links:** Extinktionsspektren des SiO₂-Nanopartikelfilms mit einem Partikeldurchmesser von 540 nm unter dem Reflexionswinkel von 0° und Extinktionsspektren eines SiO₂-Films der Dicke 250 nm unter 0° und 45° zur Probennormalen im Medium Luft. Beide Proben wurden mit 30 nm Gold besputtert. **Rechts:** Schematische Darstellung der Geometrie. 74
- Abb. 58: Links:** Optische Sensorantwort eines PMMA-Films mit einer Dicke von 600 nm ohne Metall (schwarze Kurve) und mit 30 nm Gold (rote Kurve) sowie eines Polystyrol-Nanopartikelfilms mit 30 nm Gold. Der Partikeldurchmesser beträgt 570 nm. Die Messung erfolgt im Medium Luft unter Lichteinfall entlang der Probennormalen. **Rechts:** Darstellung der inversen Peakposition als Funktion der Peaknummer. Der Zusammenhang für die PMMA-Filme ist linear. Für die Nanopartikel flacht die Kurve ab. 74
- Abb. 59:** Abscheidung von isolierten Nanopartikeln auf einem festen Träger. 75
- Abb. 60:** REM-Aufnahme der nicht metallisierten Polystyrol-Nanopartikelfilme nach unterschiedlichen Reaktionszeiten mit dem reaktiven Ionenplasma. Der Durchmesser der Nanopartikel vor dem Ätzen betrug 570 nm. Mit wachsender Reaktionszeit nahmen die Partikeldurchmesser ab und der Abstand benachbarter Partikel zu. Die Probe wurde während des Ätzvorgangs auf 20°C gekühlt, um ein Schmelzen der Partikel zu verhindern. Dargestellt sind die Proben nach Reaktionszeiten von (links nach rechts) 0,25 min, 0,50 min, 1,00 min, 1,50 min, 2,00 min und 4,00 min. Der gemessene Durchmesser ist in der Farbe Gelb notiert, der entsprechende Partikelabstand ist blau. 76

6.3 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 61: Links:** Partikeldurchmesser und Abstand benachbarter Partikeloberflächen als Funktion der Reaktionszeit. **Rechts:** Optische Sensorantwort nicht metallisierter Polystyrol-Nanopartikel nach unterschiedlichen Ätzzeiten. Vor dem Ätzen lagen die Partikel mit einem Durchmesser von 570 nm dicht gepackt auf den Silizium-Substrat vor. 76
- Abb. 62: Links:** Optische Sensorantwort nicht metallisierter Polystyrol-Nanopartikel nach einer Ätzzeit von 1,5 min auf einem Silizium-Substrat (**rote Kurve**) und einem mit Gold metallisierten Glasträger (**schwarze Kurve**). **Rechts:** Schematische Darstellung der Proben. 77
- Abb. 63: I.:** Optische Antwort der Sensoroberflächen mit 570 nm Polystyrol-Nanopartikeln nach verschiedenen Ätzzeiten und nasschemischer Metallisierung mittels Seeding und Plating. **II.-VI.:** Änderung der optischen Sensorantwort infolge des nasschemischen Metallisierungsprozesses der Polystyrol-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 570 nm nach dem reaktivem Ionenplasmaätzen. Die Ätzdauer betrug 0,50 min (**II.**), 1,00 min (**III.**), 1,50 min (**IV.**), 4,00 min (**V.**) und 7,00 min (**VI.**). Dargestellt sind je die Extinktionsspektren der nicht metallisierten Nanopartikel (schwarze Kurve), der Oberfläche nach dem Seeding-Schritt (rote Kurve) und nach dem Plating (blaue Kurve). 78
- Abb. 64: Links:** REM-Aufnahme der geätzten Polystyrol-Nanopartikel. Die Partikel sind diskusförmig. **Rechts:** REM-Aufnahme der metallisierten Nanopartikel. 78
- Abb. 65: Links:** REM-Aufnahme der nicht metallisierten Polystyrol-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 190 nm nach 0,5 min reaktivem Ionenplasmaätzen. **Rechts:** Änderung der optischen Sensorantwort infolge des nasschemischen Metallisierungsprozesses der Polystyrol-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 190 nm nach 0,5 min reaktivem Ionenplasmaätzen. Dargestellt sind je die Extinktionsspektren der nicht metallisierten Nanopartikel (schwarze Kurve), nach dem Seeding (rot) und nach dem Plating (blau). 78
- Abb. 66: I.:** Dargestellt ist die Peakposition in Abhängigkeit vom Teilchendurchmesser. Der Zusammenhang ist linear. **II.:** Resonanzwellenlänge einer festen Teilchengröße, hier der Seeding-Lösung (**schwarze Kurve**). Infolge der Verdünnung der Lösung (**rote Kurve**) tritt keine Änderung der Peakposition auf. Die Intensitätsabnahme beruht auf dem Lambert-Beer-Gesetz. 80
- Abb. 67: Links:** Extinktionsspektren von Goldnanopartikeln, die auf PAH beschichteten Trägern adsorbiert sind. Als Substrate werden mit 100 nm Gold bedampfte Glasträger oder Silizium-Wafern eingesetzt. Die Nanopartikel haben eine unterschiedliche Größe. Dargestellt ist das Extinktionsspektrum der Seedingpartikel auf einem Goldfilm (**schwarze Kurve**), einer Partikelmischung aus 17 nm und wenigen Nanometern großen Partikeln auf Silizium (**rote Kurve**) und auf einem Goldfilm (**blaue Kurve**). **Rechts:** Schematische Darstellung des Probenaufbaus und REM-Aufnahme der Silizium-Oberfläche, die mit Goldnanopartikeln mit zwei unterschiedlichen Durchmessern besetzt ist. Die Größe der kleinsten Partikel ist nicht anhand der Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme ablesbar. 81
- Abb. 68: Links:** Reproduzierbarkeit der Peak Position: Dargestellt ist das Extinktionsspektrum für Silika-Nanopartikel mit Plating-Zeiten von 3 min und 10 min an zwei verschiedenen Probenpositionen. **Rechts:** REM-Aufnahmen der gefloateten Silika-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 540 nm nach nasschemischer Metallisierung mit 10 min Plating. 82
- Abb. 69: Links:** Dargestellt ist die mit dem Programm DiffracMOD von RSOFT berechnete Reflexion bei der Wellenlänge von 1 μm als Funktion der Anzahl an berücksichtigten Oberschwingungen. Konvergenz tritt für 8 Oberschwingungen auf. **Rechts:** Die berechneten Extinktionsspektren von Silika-Nanopartikeln mit einem Durchmesser von 540 nm und einer Bedeckung mit 15 nm Gold (**rot**), 20 nm Gold (**blau**) und 30 nm Gold (**schwarz**). Die Wellenlängenauflösung beträgt 1 nm. 83
- Abb. 70: Links:** REM-Aufnahme der mit 30 nm Silber besputterten Silika-Nanopartikel. **Mitte:** REM-Aufnahme der mit 50 nm Silber bedampften Silika-Nanopartikel. **Rechts:** Schematische Darstellung des Probenaufbaus. 83
- Abb. 71: Links:** Optische Sensorantwort eines mit Silber beschichteten Silika-Nanopartikelfilms. Der Nanopartikeldurchmesser ist 540 nm. Die Silberdicke beträgt 20 nm, 30 nm und 50 nm. **Rechts:** Extinktionsspektrum eines PMMA-Films mit der Dicke 600 nm mit Silberdicken von

- 20 nm, 30 nm und 50 nm. Die Messung erfolgt im Medium Luft unter Lichteinfall entlang der Probennormalen. 84
- Abb. 72: Links:** Extinktionsspektren der nasschemisch metallisierten Silika-Nanopartikel auf der matten Seite einer Aluminiumfolie (schwarze Kurve), auf der reflektierenden Seite einer Aluminiumfolie (rote Kurve) und auf einem mit 100 nm Gold bedampften Glassubstrat. **Rechts:** Schematische Darstellung des Probenquerschnitts. 85
- Abb. 73: Links:** Änderung der Extinktionsspektren für Goldnanopartikel mit einer Größe von 32 nm durch die Adsorption von Fibrinogen. **Rechts:** Sensitivität gegenüber der Adsorption von Fibrinogen. Die Messung erfolgte in Transmission. 86
- Abb. 74: Links:** Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme der in Suspension metallisierten Polystyrol-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 380 nm. **Rechts:** Extinktionsspektrum vor (schwarz) und nach (rot) der Fibrinogen-Adsorption gemessen in Reflexion für vollständig umhüllte Polystyrol-Nanopartikelfilme mit einem Durchmesser von 380 nm. Das Substrat ist mit 30 nm Gold und 5 nm Titan beschichtet. Die Messung erfolgte unter einem Reflexionswinkel von 0° gemessen zur Probennormalen im Medium Luft. 87
- Abb. 75: Links:** Extinktionsspektren für 3 min Plating vor und nach der Adsorption von Fibrinogen. **Rechts:** Extinktionsspektren für 10 min Plating vor und nach der Adsorption von Fibrinogen. Die Messung erfolgte unter einem Reflexionswinkel von 0° an Luft. 88
- Abb. 76: Links:** Verschiebung der Peakposition infolge der Proteinadsorption auf Nanopartikelfilmen. Die Kern-Schale-Nanopartikel bestehen aus SiO₂-Nanopartikeln (Durchmesser = 540 nm), die nasschemisch mit 3 min Plating metallisiert wurden. Als Substrat wurde eine Aluminiumfolie verwendet. Die Detektion erfolgt im Medium Luft unter Lichteinfall entlang der Probennormalen. **Rechts:** Schematische Darstellung des Probenquerschnitts. 89
- Abb. 77:** Schematische Darstellung von der Referenz für die Extinktionsmessungen (I.) sowie der Schichtsysteme bestehend aus nicht metallisierten (II.) und metallisierten (III.) PMMA-Filmen. Das Substrat entspricht für alle Messungen dem Aufbau der Referenz. 89
- Abb. 78: I.:** Schematischer Aufbau der Proben. **II.-IV.:** Extinktionsspektrum für einen Sensor bestehend aus einem PMMA-Film der Dicke 150 nm (II.) bzw. 300 nm (III.) und 600 nm (IV.). Der Film ist je mit 30 nm Gold metallisiert. Die Spektren werden vor (schwarze Kurve) und nach (rote Kurve) der Fibrinogen-Adsorption aufgenommen. Die Messung erfolgte in Luft unter Lichteinfall entlang der Probennormalen. 90
- Abb. 79: I.** Dargestellt ist die Winkelabhängigkeit des Extinktionsspektrums von nasschemisch metallisierten Polystyrol-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 570 nm im Medium Luft und Wasser. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Extinktionswerte in Luft ein konstanter Offset von 1,2 addiert. Bei 25° liegt das Extinktionsmaximum unter Wasser bei höheren Wellenlängen, bei 45° bei kleineren Wellenlängen als der entsprechende Peak im Medium Luft. Bei 35° liegen die Resonanzmaxima in den Medien Luft und Wasser (rote gepunktete Linie) bei der gleichen Wellenlänge. **II.** zeigt die lineare Änderung der Resonanzlage mit dem Winkel im Medium Luft. Eine lineare Anpassung der Messwerte ergibt eine Steigung von $-3,91 \pm 0,03 \text{ nm/}^\circ$. In **III.** ist die Abhängigkeit der Peakposition vom Brechungsindex für einen Reflexionswinkel von 0° dargestellt. Die Steigung der Ausgleichsgeraden beträgt $89,34 \pm 10,89 \text{ nm/RIU}$. **IV.** zeigt die Abhängigkeit der Bulk-Sensitivität vom Winkel. Ist diese Null, so ist der Einfluss des Brechungsindex der Sensorumgebung auf die Resonanzlage vernachlässigbar. 93
- Abb. 80: I.:** Querschnitt der Sensorgeometrie der Core-Shell-Nanopartikel **II.:** Extinktionsspektren der mit 50 nm Silber metallisierten Silika-Nanopartikel unter Flüssigkeiten mit unterschiedlichem Brechungsindex. Der Lichteinfall ist entlang der Probennormalen. **III.:** Peak Position als Funktion des Brechungsindex für den Peak bei langen Wellenlängen. 94
- Abb. 81: I.:** Änderung der Resonanzwellenlänge einer festen Teilchengröße, hier $20 \pm 4 \text{ nm}$, vom Brechungsindex **II.:** „Bulk“-Sensitivität von Goldnanopartikeln mit unterschiedlichem Durchmesser gemessen in Transmission. 95
- Abb. 82: Links:** Abhängigkeit der Peakposition von Brechungsindexänderungen in der Umgebung der Polystyrol-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 570 nm nach 0,25 min,

6.3 Abbildungsverzeichnis

0,5 min und 1 min reaktivem Ionenplasmaätzen nach nasschemischen Metallisierung. Der Lichteinfall erfolgt entlang der Probenormalen. **Rechts:** Winkelabhängigkeit der Sensitivität gegenüber Brechungsindexänderungen in der Umgebung der Polystyrol-Nanopartikel (570 nm Durchmesser) nach 0,5 min reaktivem Ionenplasmaätzen und nasschemischer Metallisierung mit Luft. 96

Abb. 83: Brechungsindexabhängigkeit der gemessenen (**links**) und Berechnung Extinktionsspektren eines nicht metallisierten PMMA-Films der Dicke 600 nm auf mit Gold bedampftem Silizium-Wafer unter Lichteinfall entlang der Probenormalen (**rechts**). Es wurde das Programm Scout zusammen mit Dr. T. Glaser (KIP, Universität Heidelberg) verwendet. 97

Abb. 84: Links: Extinktionsspektren eines nasschemisch metallisierten PMMA-Films der Dicke 300 nm auf mit Gold bedampftem Silizium-Wafer unter Lichteinfall parallel zur der Probenormalen **Rechts:** Abhängigkeit der Peakposition vom Brechungsindex für Reflexionswinkel von 0° - 55°. Die Abhängigkeit wurde für den Peak zwischen 300 nm und 400 nm sowie den Peak zwischen 500 nm und 600 nm dargestellt. Die Messwerte liegen auf einer Geraden. Die Steigung der Ausgleichsgeraden gibt die Sensitivität bezüglich der Volumenphase an. 97

Abb. 85: Volumen-Sensitivität des mittleren Peaks von nasschemisch metallisierten PMMA-Filmen der Dicke 300 nm (rot) und 600 nm (schwarz) auf mit Gold bedampftem Silizium-Wafer in Abhängigkeit vom Reflexionswinkel. Die Steigung beträgt $-5,87 \pm 0,35$ nm für den 300 nm dicken Film und $-7,78 \pm 0,19$ nm im Fall des 600 nm dicken Filmes. 98

Abb. 86: Links: Extinktionsspektren für Polystyrol-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 190 nm vor und nach der Adsorption von Fibrinogen. Die Messung erfolgte unter einem Reflexionswinkel von 0° an Luft. **Rechts:** Winkelabhängigkeit der Verschiebung in Luft und PBS-Puffer gemittelt aus 2 Proben und je 3 Probenpositionen. Für Polystyrol-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 570 nm wird die Verschiebung des Peaks im Wellenlängenbereich von 400 - 600 nm in Luft und PBS dargestellt. Für Polystyrol-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 190 nm wird die Verschiebung des Peaks zwischen 200-300 nm und 300 - 400 nm im Medium Luft dargestellt. Die Nanopartikel sind nasschemisch metallisiert. Das Glas-Substrat ist mit 5 nm Titan und 100 nm Gold bedampft. 99

Abb. 87: Links: Winkelabhängigkeit der Verschiebung in Luft (schwarz) und PBS (rot) infolge der Fibrinogenadsorption auf nasschemisch metallisierten SiO₂-Nanopartikelfilmen (Durchmesser = 540 nm) auf 100 nm Gold gemittelt aus je 5 verschiedenen lateralen Probenpositionen für jeden Winkel. Die maximale Verschiebung wurde bei 38° detektiert. **Rechts:** Kinetik der Fibrinogen-Adsorption auf nasschemisch metallisierten Nanopartikelfilmen aus Polystyrol (schwarze Kurve entspricht dem Durchmesser 190 nm, rote Kurve 570 nm,) und aus Silika (blaue Kurve 540 nm,). Als Substrat wurde Glas, das mit 100 nm Gold bedampft war eingesetzt. Die Detektion erfolgte unter dem magischen Winkel. 100

Abb. 88: Links: Schematische Darstellung der Referenz, Probe und dem dreidimensionales Modell aus kubisch angeordneten Würfeln (3D Darstellung nach ^[256]) **Rechts:** REM-Aufnahme der mit SURMOFs beschichteten Kern-Schale Nanopartikeloberfläche. 101

Abb. 89: Links: Extinktionsspektren der mit unterschiedlich dicken HKUST-1 beschichteten Nanopartikelfilme. **Rechts:** Vergleich der Reproduzierbarkeit der Extinktionsspektren der Nanopartikelfilme, nach einer Beschichtung mit unterschiedlich dicken HKUST-1 Gerüststrukturen. 102

Abb. 90: Schematische Darstellung **I.** des Versuchsaufbaus, **II.** der Probe ohne SURMOF-Beschichtung, **III.** der Probe mit SURMOF-Beschichtung, **IV.** der Pyridin-Moleküle in den Poren. 103

Abb. 91: Links: Extinktionsspektren des Sensors ohne SURMOF-Beschichtung bei Reaktionszeiten von 1 min, 60 min und 120 min mit Pyridindampf bei 35°C. Rechts: Extinktionsspektren des Sensors mit 50 nm HKUST-1-Beschichtung bei Messung im Eisbad. Die dargestellten Messzeiten sind 0 min und 51 min. Die Resonanzlagen sind unverändert. 103

Abb. 92: Links: Messung der Diffusion (schwarze Kurve) und Anpassung mit Langmuir-Modell (rote Kurve). Bei einer Messung über Nacht bei 35 °C erwartet man infolge der Berechnung eine Verschiebung von 62 nm. Bei der Messung wurde nach 150 min das Pyridin-Reservoir entfernt und die Diffusion des Pyridins aus den Poren beobachtet. Rechts: Extinktionsspektren vor dem Kontakt mit Pyridin (schwarze Kurve), nach sechs Stunden Eindiffundieren bei einer Konzentration von 1,82 mol/m³ (rote Kurve) und nach einer Stunde Ausdiffundieren (blaue Kurve).

104

Abb. 93: Verschiebung der Peaks im Extinktionsspektrum von Nanopartikelfilmen, die mit unterschiedlich dicken HKUST-1-SURMOFs beschichtet sind. Die Dicke der Gerüststruktur beträgt im Fall von **I.** wenige Nanometer, **II.** 50 nm (zweite Messung), **III.** 200 nm und **IV.** 300 nm. Die Inkubationszeit beträgt jeweils 60 Stunden.

105

Abb. 94: Verschiebung der Peaks im Extinktionsspektren von Nanopartikelfilmen, die mit 50 nm dicken HKUST-1-Gerüststruktur (**I. und II.**) und einem SURGEL-Film (**III. und IV.**) beschichtet sind, bei Messung unter Flüssigkeit. **I. und III.** ist der Vergleich zu Beginn der Messung und nach einer Eintauchzeit von 58 min, in **II. und IV.** ist die Verschiebung der Peakmaxima als Funktion der Zeit dargestellt. Die Messung erfolgt unter einem Reflexionswinkel von 0°. Nach 30 min wird für die Probe mit SURMOF-Beschichtung ein konstanter Wert erreicht.

106

Abb. 95: Extinktionsspektren von Nanopartikelfilmen, die mit einer SURGEL-Gerüststruktur beschichtet sind im Medium Luft unter einem Lichteinfall parallel zur Probennormalen. **Schwarze Kurve:** Extinktionsspektrum vor dem Eintauchen in Wasser **Blaue Kurve:** Extinktionsspektrum nach dreistündigem Kontakt der Probe mit Wasser und Trocknen an Luft **Rote Kurve:** Extinktionsspektrum nach dem Trocknen an Luft und zusätzlichem Trocknen im Stickstoffstrom. Die Verschiebung der Resonanz beträgt 9 nm ins Blaue. Ein Teil des SURMOF-Films löst sich unter Wasser ab.

107

Abb. 96: Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme einer DVD vor der Adsorption von Nanopartikeln **I.** und nach der Adsorption von Nanopartikeln in niedriger **II.** und hoher Dichte **III.** sowie die schematische Darstellung des Probenaufbaus **IV.**

108

Abb. 97: Extinktionsspektren einer mit Gold metallisierten DVD mit Plastikabdeckung vor der Adsorption von Nanopartikeln (schwarze Kurve), nach der Adsorption von Nanopartikeln auf der DVD (rote Kurve), Extinktionsspektrum des Nanopartikelfilms auf einem flachen Goldsubstrat (blaue Kurve) und berechnete Summe (magenta). Die Aufnahmen erfolgten im Medium Luft unter Lichteinfall parallel zur Probennormalen.

109

Abb. 98: Extinktionsspektrum der DVD ohne Plastikabdeckung. Die Oberfläche wurde mit 100 nm Gold besputtert. Die Detektion erfolgt unter einem Lichteinfall parallel zur Probennormalen im Medium Luft.

109

Abb. 99: Extinktionsspektrum der CD mit Plastikabdeckung. Die Oberfläche wurde mit 100 nm Gold besputtert. Die Detektion erfolgt unter einem Lichteinfall parallel zur Probennormalen im Medium Luft.

110

Abb. 100: Links: Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme der Nanopartikeldoppellage. **Rechts:** Extinktionsspektrum einer Nanopartikelmonolage (schwarz) und Doppellage (rot). Die Detektion erfolgt unter einem Lichteinfall parallel zur Probennormalen im Medium Luft.

110

Abb. 101: Extinktionsspektrum des kombinierten Sensors aus Nanopartikelfilm und DVD-Substrat unter Flüssigkeit. Der Sensor befindet sich in Kontakt mit der Proteinlösung. Dargestellt sind die Spektren mit unterschiedlichen Reaktionszeiten (schwarze Kurve 0 s, blaue Kurve 1000 s, rote Kurve 1500 s und grüne Kurve 2000 s). Die Detektion erfolgte unter dem magischen Winkel des Nanopartikelfilmes.

111

Abb. 102: Selbstorganisation von Polystyrol-Nanopartikeln mit einem Durchmesser von 6 µm auf mit 100 nm Gold metallisierten Lochstrukturen mit unterschiedlichem Loch-Radius und Mittelpunktabständen.

112

Abb. 103: A.: Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme von Lochstrukturen, die mit einem Silika-Nanopartikelfilm bedeckt wurden. Der Partikelübertrag erfolgte mit Floating. **B.:** Oberfläche aus A. nach Abwischen der Partikel mit einem Tuch. **C.:** Der Partikelübertrag erfolgte mit Floating auf

6.3 Abbildungsverzeichnis

Lochstrukturen, deren Löcher mit Polystyrol-Nanopartikeln besetzt sind. Die Polystyrol-Nanopartikel liegen unter den Silika-Nanopartikeln. Die Probe wurde anschließend mit einem Tuch abgewischt. Der Durchmesser der Polystyrol-Nanopartikel beträgt 6 μm . Die Silika-Nanopartikel haben einen Durchmesser von 540 nm. 112

Abb. 104: **I.:** Extinktionsspektrum von Lochstrukturen mit unterschiedlichem Durchmesser D und Lochabstand A ohne Nanopartikel. Stellvertretend für Strukturen mit homogenem Nanopartikelfilm nach Abwischen der Nanopartikel wurde die Struktur $D = 10 \mu\text{m}$ und $A = 4 \mu\text{m}$ (rote Kurve) dargestellt. **II.:** Transmissionsspektrum vor (schwarz) und nach (rot) der Adsorption von Fibrinogen auf der Struktur $D = 10 \mu\text{m}$ und $A = 4 \mu\text{m}$. **III.:** Extinktionsspektren der Lochstrukturen $D = 7 \mu\text{m}$ und $A = 10 \mu\text{m}$ vor der Partikeladsorption (schwarze Kurve), nach der Nanopartikeladsorption ohne Abwischen (rote Kurve) (Abb. 103, A.) und des nasschemisch metallisierten Nanopartikelfilms auf einem homogenen Goldfilm (blaue Kurve). **IV.:** Extinktionsspektren der Lochstrukturen $D = 3 \mu\text{m}$ und $A = 7 \mu\text{m}$ mit Nanopartikel ohne Abwischen vor (schwarz) und nach (rot) der Proteinadsorption. Die Messung erfolgte in Luft. Der Lichteinfall ist entlang der Probennormalen. Als Referenz wurde für alle Spektren ein planarer Goldfilm der Dicke 100 nm verwendet. 113

Abb. 105: Abscheidung von Nanopartikel-Clustern 114

Abb. 106: Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen (SE2-Detektor) der mittels Mikrokontaktdruckens strukturierten Proben unter Verwendung eines (I.) Linienstempels und eines (II.) Kreisstempels. **III.** und **IV.** sind die entsprechenden Beugungsbilder, die man durch Projektion des von der Probe reflektierten Strahls eines Laserpointers erhält. 115

Abb. 107: Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen (SE2-Detektor) der mittels „umgedrehten“ Mikrokontaktdruckens strukturierten Proben unter Verwendung eines Linienstempels. 116

Abb. 108: Links: Extinktionsspektrum unter einem Reflexionswinkel von 30° zur Probennormalen der mittels Mikrokontaktdruckens strukturierten Probe und deren Sensitivität gegenüber Brechungsindexänderungen in der Umgebung nach nasschemischen Metallisierung. Rechts: Peakverschiebung infolge der Proteinadsorption auf einer mittels Mikrokontaktdruckens strukturierten Probe mit Silika-Nanopartikeln auf 30 nm Gold auf Glas. Die Messung wurde im Medium Luft durchgeführt. 116

Abb. 109: Links: Schematische Darstellung der vom KNMF gefertigten Nanostruktur 300/300/300-300 ohne Chrom als Haftvermittler. Es handelt sich um Würfel mit einer Kantenlänge von 300 nm. Benachbarte Würfel stehen über 300 nm lange, 300 nm hohe und 100 nm breite Stege in Verbindung. Rechts: Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme der Nanostruktur (ohne Chrom als Haftvermittler). Aufgrund des Einsatzes unter wässrigen Lösungsmitteln wurde die Nanostrukturierung partiell zerstört. 118

Abb. 110: Links: Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme der Nanostruktur 300/300/300 – 300 mit Verbindungsstegen. Die Aufnahme erfolgte unter Verwendung des Inlens-Detektors. Die Probenorientierungen 1 und 2 sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Rechts: Extinktionsspektrum der Struktur. Die Detektion erfolgte unter einem Reflexionswinkel von 30° zur Probennormalen. Das Spektrum für die Probenorientierung 1 ist schwarz und für Probenorientierung 2 ist rot. 119

Abb. 111: Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme der Nanostrukturen bestehend aus Quadern mit unterschiedlicher Höhe (150 nm, 300 nm, 600 nm), die über 300 nm lange Stege in Verbindung stehen. Der horizontale Quaderquerschnitt ist ein Quadrat mit 300 nm Seitenlänge. 120

Abb. 112: Gemessene (links) und berechnete (rechts) optische Sensorantwort der Nanostrukturen bestehend aus Quadern mit würfelförmigem horizontalen Querschnitt der Kantenlänge 300 nm mit einer Höhe von 150 nm (schwarz), 300 nm (rot) und 600 nm (blau), die über 300 nm lange Stege in Verbindung stehen. 120

Abb. 113: **Links:** Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme der 300/300/300-300 Struktur ohne Stege **Rechts:** Extinktionsspektren dieser Struktur unter Variation der Quaderhöhe (150 nm (schwarz), 300 nm (rot) und 600 nm (blau)) sowie die Spektren der um den Faktor 0,5 skalierten Struktur 150/150/150-150 (orange) und 150/150/300-150 (grün). Die Extinktionsspektren höherer

- Strukturen weisen eine größere Anzahl an Peaks auf. Zusätzlich sind die Peaks schärfer. OS steht für „ohne Stege“, MM bedeutet „mit Metall“. 121
- Abb. 114:** Links: Vergleich der Extinktionsspektren von würfelförmigen metallisierten Strukturen ohne Verbindungssteg mit Metall für die 300 nm Würfelstruktur und mit und ohne Metall für die 150 nm Würfel. Rechts: Schematische Darstellung. 122
- Abb. 115:** Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme der Nanostrukturen bestehend aus mit Stegen in Verbindung stehenden Würfeln mit Variation der Dimensionen von 150 nm (links), 300 nm (Mitte) und 600 nm (rechts). 123
- Abb. 116:** Links: Extinktionsspektren skalierteter metallisierter Nanostrukturen. Abhängigkeit der optischen Sensorantwort der Nanostrukturen bestehend aus Würfeln, die mit Stegen in Verbindung stehen, von der Dimension der Struktur von 150 nm (grün), 300 nm (blau) und 600 nm (schwarz). Rechts: Extinktionsspektrum nicht metallisierter Nanostrukturen. Die Strukturen sind unterschiedlich skaliert. Zum Vergleich ist das Extinktionsspektrum eines planaren nicht metallisierten Films der Höhe 300 nm dargestellt. 123
- Abb. 117:** Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme der Nanostruktur bestehend aus Würfeln mit der Kantenlänge von 300 nm, die mit unterschiedlich langen Stegen verbunden sind. Die Steglänge beträgt 150 nm (**links**), 600 nm (**Mitte**) und 900 nm (**rechts**). 124
- Abb. 118:** Abhängigkeit der Extinktionsspektren von der Verbindungssteglänge für die Nanostruktur 300/300/300 (**I.**) im Medium Luft und 300/300/150 im Medium Luft (**II.**) und Wasser (**III.**). Die Steglänge beträgt 150 nm (**schwarze Kurve**), 300 nm (**mangane Kurve**), 600 nm (**rote Kurve**) und 900 nm (**blaue Kurve**). Der Lichteinfall ist parallel zur Probenormalen. **IV.** Extinktionsspektrum eines mit 30 nm Gold metallisierten PMMA-Films der Dicke 150 nm. Die schwarze Kurve wurde gemessen, die rote Kurve wurde mit RSOFTE berechnet. Die Berechnung und Messung stimmen bezüglich der Resonanzlagen überein. 125
- Abb. 119: Links:** Extinktionsspektren der 300/300/300-300 Nanostruktur mit 100 nm breiten Stegen unter Variation des Reflexionswinkel von 30° bis 55° in 5°-Schritten zur Probenormalen für Probenorientierung 1. **Rechts:** Die Verschiebung des Peaks bei großen Wellenlängen im Extinktionsspektrum in Abhängigkeit vom Reflexionswinkel im Medium Luft. 126
- Abb. 120:** Links: Peakposition als Funktion des Brechungsindex für die 150/150/150 Struktur ohne Stege mit Metall. Rechts: Extinktionsspektren unter dem magischen Winkel von Orientierung 1 der Nanostruktur 300/300/300-300 mit Stegen. 127
- Abb. 121:** Bulk-Sensitivität als Funktion des Reflexionswinkels für Nanostrukturen mit würfelförmigem horizontalen Querschnitt der Kantenlänge 300 nm mit (mS) und ohne Verbindungsstegen (oS) unter Höhenvariation von 150 nm (rot bzw. hellblau), 300 nm (schwarz bzw. grün) und 600 nm (blau bzw. pink). 127
- Abb. 122:** Darstellung der verwendeten Geometrie zur Modellierung der Nanostruktur, Elementarzelle und Einfallsebene. Die Ansicht ist in I. 3 dimensional, in II. von der Seite und III. Sicht von oben.. 128
- Abb. 123:** Sensitivitätstest der Struktur 300/300/300-300 mit Stegen. Links: Verschiebung der Peaks durch Proteinadsorption, beobachtet im Medium Luft unter einem Einfallswinkel von 0° zur Probenormalen. Rechts: Berechnete Sensorantwort vor und nach Proteinadsorption für die Struktur 300/300/300-300 mit Verbindungsstegen. Die Berechnung erfolgte mit dem Programm RSOFTE. Die Proteinschicht wurde als Film modelliert mit einem Wellenlängen unabhängigen Brechungsindex von 1,38 und einer Dicke von 30 nm. Die Dicke wurde anhand von Ellipsometrie-Messungen auf planaren Oberflächen ermittelt. 128
- Abb. 124: I.:** Verschiebung der Peaks durch Proteinadsorption für die Struktur 300/300/300-300 mit Stegen. Die Messung erfolgte im Medium Luft unter einem Einfallswinkel von 25° zur Probenormalen. **II., III. und IV.:** Dargestellt ist die Verschiebung des ersten (II.), zweiten (III.) und dritten (IV.) Peaks durch Proteinadsorption als Funktion des Winkels. Es wurden die Probenorientierungen 1 (schwarz) und 2 (rot) im Medium Luft gemessen. Die Verschiebung ist wesentlich abhängig von der gewählten Orientierung der Probe und dem Detektionswinkel. Die

6.3 Abbildungsverzeichnis

- Maximale Verschiebung wird für den 2. Peak bei 20° und Probenorientierung 1 bzw. für den 3. Peak für Probenorientierung 1 beobachtet. 129
- Abb. 125: Links:** Verschiebung der Peaks durch Proteinadsorption für die Struktur 150/150/300-300 mit Stegen. Die Messung erfolgte im Medium Wasser unter Lichteinfall entlang der Probenormalen. Rechts: In situ Detektion unter dem magischen Winkel. Ausgewertet wurde der mittlere Peak, der unter dem magischen Winkel zu kleineren Wellenlängen als für 0° verschoben wurde. 130
- Abb. 126: I.:** Darstellung der Abhängigkeit der Extinktionsspektren von der Polarisator-Einstellungen. Als Probe wurden nasschemisch metallisierte Silika-Nanopartikel untersucht. Die dielektrischen Partikel sind auf dem Substrat hexagonal dicht gepackt angeordnet. Das Substrat besteht aus einem Glasobjektträger, der mit 5 nm Titan und 100 nm Gold bedampft ist. **II.:** Vergrößerter Ausschnitt des markierten Bereichs von I. **III.:** Extinktion bei 750 nm in Abhängigkeit von der Polarisator Einstellung. Die Messungen erfolgen unter einem Reflexionswinkel von 55,6°, dem Brewster-Winkel von Glas, zur Probenormalen im Medium Luft. 131
- Abb. 127:** Darstellung der Abhängigkeit der Extinktionsspektren der KNMF-Strukturen von der Polarisierung des Lichtes. Dargestellt sind die Extinktionsspektren der Strukturen **I.** 300/300/300-150 mit Stegen und **II.** 150/150/300-150 ohne Stege. Die schwarzen Kurven sind bei s-polarisiertem Licht aufgenommen, die roten Kurven bei p-polarisiertem Licht und die blaue Kurve bei nicht polarisiertem Licht. 131
- Abb. 128:** Polarisationsabhängigkeit der Extinktionsspektren der Strukturen 300/300/300-300 (links) und der doppelt so hohen Struktur 300/300/600-300 (rechts). Die Sensorantwort eines 200 nm dicken PMMA-Films, der mit 30 nm Gold bedeckt ist wurde berechnet. 132
- Abb. 129:** Extinktionsspektren vor und nach der Adsorption von Alkanthiolen: **I.** Butanthiol, **II.** Dodekanthiol **III.** Oktadekanthiol. 134
- Abb. 130: Oben:** Schematische Darstellung der Referenz für die Extinktionsaufnahmen (**I.**) sowie der Probe vor (**II.**) und nach (**III.**) der Adsorption des Alkanthiol-SAMs. Es werden Alkanthiole mit unterschiedlicher Kettenlänge eingesetzt. **Unten: IV.:** SPR-Imaging-Spektren von Alkanthiolen mit unterschiedlicher Kettenlänge an je zwei verschiedenen Probenpositionen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm HAUTE_CUISINE von Dr. J. Wagner. Die Integrationszeit betrug 2 s. Alle 5 nm wurde ein Bild gespeichert. **V.:** Plot der Intensität der SPR-Aufnahme bei 900 nm als Funktion der Peakverschiebung in den Extinktionsspektren. Letztere wurden mit dem UV-VIS-Aufbau für senkrechten Lichteinfall gemessen. Alle Messungen erfolgten in Medium Luft. Der Zusammenhang ist linear. 134
- Abb. 131: Links:** Beispiel einer SPR-Imaging Aufnahme des Peptidarrays (hier 700 nm). **Rechts:** SPR-Imaging-Spektren von Peptidspot (schwarze Kurve) und Hintergrund (rote Kurve). Der Hintergrund ist der Nanopartikelfilm ohne Peptid. Die Intensität wird gemessen in Grauwerten. Aus der abgelesenen Intensitätsdifferenz zwischen Spot und Hintergrund bei 900 nm kann die absorbierte Massendichte bestimmt werden. 135
- Abb. 132: a) Schemazeichnung der elektronenstrahlolithographisch hergestellten Struktur, b) vergrößertes Bild von a). c) Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme der nasschemisch metallisierten mittels Elektronenstrahlithographie hergestellten Würfel mit der Kantenlängen 600 nm, die über genauso lange aber nur ein Drittel so breite Stege in Verbindung stehen, d) vergrößertes Bild von c). 136
- Abb. 133: Links:** Dargestellt ist die Weitfeldaufnahme der elektronenstrahlolithographisch hergestellten Struktur. Der weiß umrandete Bereich ist in Abb. 134 dargestellt. Sieben Struktur-längen, gemessen in drei verschiedenen lateralen Bildbereichen ergaben im Mittel (65,80 ± 0,74) Pixel, das entspricht 600,20 ± 5,66 nm pro Einzelstruktur. **Rechts:** Intensitätsverteilung des Weitfeldbildes entlang der x-Koordinate. Die Modulation der Intensität entspricht dem Abstand benachbarter Stegmittelpunkte (1,2 µm). 137
- Abb. 134:** Dargestellt ist **a)** die Lokisationsaufnahme, **b)** die Überlagerung aus Weitfeld- (**grün**) und Lokisationsaufnahme (**orange**) der mit Alexa 647 markierten elektronenstrahlolithographisch hergestellten Strukturen und **c)** der vergrößerte Bildausschnitt. Als Einbettmedium wurde

- ProLong@Gold verwendet. Die Integrationszeit betrug 227 ms. Es wurde ein Bildstapel aus 10000 Einzelaufnahmen gemessen. Die maximale Intensität von 212 mW wurde mit Filter 5 abgeschwächt. Die Auswertung erfolgte mit Schwellwert 4. d) Histogramm der Lokalisationsgenauigkeit aller Ereignisse. 137
- Abb. 135:** Darstellung der detektierten Fluoreszenzereignisse vor (I.) und nach (II.) automatischer Driftkorrektur. III. und IV. sind vergrößerte Ausschnitte, je markiert mit einer roten bzw. blauen Box, aus I. Die Bilder V. und VI. sind entsprechende Vergrößerungen aus II. 138
- Abb.136: Links:** Weitfeld- (grün) und Lokisationsaufnahme (rot) der mit Alexa 647 markierten elektronenstrahlolithographisch hergestellten Strukturen. Für die Auswertung wurde der Schwellwert 2 gewählt. **Rechts:** Histogramm der Lokalisationsgenauigkeit der einzelnen Fluoreszenzereignisse. 139
- Abb. 137:** I. REM-Aufnahme der um den Faktor 2 herabskalierten Struktur II. Weitfeld-Aufnahme und III. Lokisations-Aufnahme der um den Faktor 2 herabskalierten Struktur. Die mit roten und blauen Kästen markierten Bereiche sind in IV. und V. vergrößert. 140
- Abb. 138:** Dargestellt ist die normierte Intensitätsverteilung der Weitfeld- (I.) und Lokisationsaufnahme (II.) als Funktion der x-Koordinate. Die Intensitätswerte der einzelnen Pixel wurden hierzu für festgehaltene x-Koordinate der Bilder summiert. Die Halbwertsbreite der Modulation der Intensität aus der Lokisationsaufnahme von (217 ± 29 nm) ist kleiner als der entsprechende Wert aus den Weitfeldaufnahmen (401 ± 84 nm). Der Peak-zu-Peak-Abstand im Intensitätsplot I. der Weitfeldaufnahme ist $590,0 \pm 9,4$ nm und im Intensitätsplot II. der Lokisationsaufnahme ergeben sich $603,3 \pm 9,8$ nm. 141
- Abb. 139:** Vergleich der Dichteverteilung der Goldnanopartikel auf den Verbindungsstegen der Struktur (links), dem Zentrum der Würfel (Mitte) und der Substratoberfläche zwischen den Quadern (rechts). Alle REM-Bilder sind Vergrößerungen der Abb. 132 (d). 141
- Abb.140: Links:** Weitfeld-Aufnahme der mit Alexa647-Molekülen markierten Kern-Schale-Nanopartikel. **Rechts:** Extinktionsspektrum vor (**schwarze Kurve**) und nach (**rote Kurve**) der Adsorption von Alexa647-Molekülen. 142
- Abb. 141:** Links: REM-Aufnahme der Oberfläche mit zufällig angeordneten Goldnanopartikeln nach 10 s Plating. Rechts: Weitfeld-Bild (grün) überlagert mit der Lokisationsaufnahme (rot) der mit Alexa 647 markierten Strukturen. Als Einbettmedium wurde ProLong@Gold verwendet. Die Messung erfolgt bei einer Laserleistung von 60 mW und Integrationszeit von 100 ms. Es werden 500 Einzelaufnahmen gespeichert. 143
- Abb. 142:** Dargestellt ist die Fluoreszenzemission als Funktion der Zeit für eine feste x-, y-, z-Position. Es werden 1000 Bilder mit einer Integrationszeit von 100 ms aufgenommen. Es handelt sich um ein Molekül oder wenige Moleküle. (Frame = Anzahl der Einzelaufnahmen). Die rot markierten Peaks entsprechen den vom Auswertungsprogramm erkannten Fluoreszenzereignissen. 144
- Abb. 143:** Das Histogramm zeigt die Lokalisationsgenauigkeit für fluoreszierende Ereignisse. Die mittlere Lokalisationsgenauigkeit beträgt 23,8 nm. Die mittlere Anzahl an Photonen ist 7739 ± 182 pro Ereignis. 144
- Abb. 144:** Dargestellt ist das Emissionsverhalten von Tetrachlorgoldsäure (**schwarz**) und der Seeding-Lösung (**rot**). Die Fluoreszenzmessung erfolgte in der Gruppe von Prof. Dr. Dirk-Peter Herten mit dem Cary Eclipse Fluoreszenz Spektrophotometer (Varian, Darmstadt). 145
- Abb. 145:** Links: REM-Aufnahme der hexagonal nanostrukturierten Oberfläche, die mittels Blockcopolymer Mizellarer Lithographie hergestellt wurde. Der mittlere Abstand zwischen benachbarten Partikeln beträgt 38 nm. Der Partikeldurchmesser ist $8 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$. Rechts: Aufbau der Probe: Es wird ein Platzhalter an die Goldnanopartikel adsorbiert und an diesen Alexa647-Moleküle in alkalischem Puffer (hohe Reaktionsgeschwindigkeit) gebunden. Die Partikelzwischenräume werden passiviert. 146
- Abb. 146:** Lokisationsaufnahme der mit Alexa 647 markierten Strukturen rekonstruiert aus 1000 Einzelaufnahmen. Die Integrationszeit betrug 100 ms. Der mit einem gelben Rechteck gekennzeichnete Bereich ist rechts vergrößert dargestellt. Die mit Zahlen markierten gelben

6.3 Abbildungsverzeichnis

Kreise sind in den Bildern (1. - 4.) vergrößert. Die mittlere Lokalisationsgenauigkeit beträgt 14 nm. Im Rahmen der Messgenauigkeit entspricht der beobachtete Abstand der Fluoreszenzsignale an wenigen Stellen dem Abstand der Goldnanopartikel. 147

Abb. 147: Links: Histogramm der Lokalisationsgenauigkeit gemittelt aus 3 Messungen an verschiedenen lateralen Probenpositionen. **Rechts:** Anzahl der Photonen für eine feste x,y,z-Position als Funktion der Gesamtaufnahmedauer. Der rot markierte Peak entspricht dem vom Auswertungsprogramm erkannten Fluoreszenzereignis. 147

Abb. 148: Aufbau der Probe (links): Es wurde ein HA Epitop an die Goldnanopartikel adsorbiert und an diesen ein anti-HA IgG Antikörper, der mit dem Farbstoff ATTO680 markiert war gebunden. Der Partikelabstand ist 70 nm und Partikeldurchmesser 20 nm. Die Partikelzwischenräume wurden passiviert. Die Lokisationsaufnahme (**rechts**) zeigt die lateralen Positionen der mit Farbstoffmolekülen markierten Antikörper. 148

6.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Wechselwirkungsprodukte des Primärelektronenstrahls mit Materie	23
Tabelle 2: Eigenschaften von Fibrinogen	34
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Geräte	41
Tabelle 4: Detektor des UV-VIS-Spektrometers (HR 4000, Ocean Optics) ^[203]	43
Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Chemikalien nebst Reinheitsgrad und Hersteller	47
Tabelle 6: Übersicht der verwendeten dielektrischen Nanopartikel	48
Tabelle 7: Parameter der Sputter-Anlage zur Metallisierung mit Silber und Titan zur Haftvermittlung	52
Tabelle 8: Übersicht der nanostrukturierten Oberflächen, die sowohl nicht metallisiert als auch mit 30 nm Gold bedampft sowie mit und ohne Verbindungsstegen (VS) untersucht werden. Die Höhe von Quadern und Verbindungsstegen ist herstellungsbedingt durch die PMMA-Filmdicke bestimmt und auf einer Probe gleich.	55
Tabelle 9: Tabellarische Übersicht der verwendeten Templat-Strukturen	56
Tabelle 10: Variation der Beschichtung der Templat-Strukturen	57
Tabelle 11: Übersicht der Proben mit Beugungsgitter	58
Tabelle 12: Am KIT hergestellte SURMOF HKUST-1-Proben. Mit einer Handsprühvorrichtung erfolgen die Waschschriffe, das Aufbringen Linker-Lösung und der Kupferacetat-Lösung. Das Substrat sind jeweils nasschemisch metallisierte SiO ₂ -Nanopartikel auf einer 100 nm dicken Goldschicht.	59
Tabelle 13: Magische Winkel für metallisierte Silika- und Polystyrol-Nanopartikel mit unterschiedlichem Durchmesser. Die Abkürzung PS steht für Polystyrol.	93
Tabelle 14: Übersicht über die Vorgehensweise zur Empfindlichkeitskalibrierung des SPR-Imaging-Aufbaus	133
Tabelle 15: Vergleich der Ergebnisse der Auswertung mit Schwellwert 2 und 4	138

6.5 Liste der Veröffentlichungen

Michael Himmelhaus, Elka Trileva, Haci Osman Guvenc, Anna Luise Grab and Reiner Dahint
On the Importance of Optical Contacts in Gold Hybrid Structures for Enhancement of Localized Surface Plasmon Resonance Sensing, *Sensors & Actuators B*, (eingereicht)

A. L. Grab, M. Hagmann, R. Dahint and C. Cremer
Localization microscopy (SPDM) facilitates high precision control of lithographically produced nanostructures, *Micron* (eingereicht)

A. L. Grab and R. Dahint
Magic angle facilitates *in situ* detection of fibrinogen adsorption by combining quartz crystal microbalance and localized surface plasmon resonance spectroscopy in nanoparticle films, (in preparation)

Konferenzbeiträge

Localization microscopy (SPDM) facilitates high precision control of lithographically produced nanostructures, (Poster)
International Microscopy Congress Prague (IMC 2014)

Label-free readout of binding events in high density peptide chips, (Poster)
ANKA/KNMF User Meeting (2012)

Label-free readout of binding events in high density peptide chips, (Poster)
EU Summer School on Plasmonics, Functionalization, and Biosensing (2011)

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken die zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. (apl.) Dr. Reiner Dahint und Herrn Prof. Dr. Dr. Christoph Cremer, die es mir ermöglicht haben, die vorliegende Arbeit in ihren Arbeitskreisen anzufertigen, für die hervorragende Betreuung, die zahlreichen Diskussionen, die großartige Unterstützung und hilfreichen Ratschläge, die Kontakte zu Kooperationspartnern, die Motivation und die interessante Themenstellung.

Vielen Dank gilt Herrn Prof. Dr. Joachim Spatz für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Vielen Dank gilt Herrn Prof. (apl.) Reiner Dahint, Herrn PD Dr. Alexander Nesterov-Müller (KIT) und Dr. Fanny Liu für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit und hilfreiche Unterstützung des KNMF-Projektes 2010-004-00301 und dessen Fortsetzung. Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Peter-Jürgen Jakobs (KNMF, KIT), Frau Nees (KNMF, KIT) und dem KNMF für die sehr präzise und freundliche Herstellung der lithographischen Proben.

Genauso dankbar bin ich für die Bereitstellung von Lochstrukturen von Herrn PD Dr. Alexander Nesterov-Müller, PD Dr. Frank Breitling sowie Dipl.-Phys. Frieder Märkle.

Vielen Dank an die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christof Wöll, Dr. Hartmut Gliemann (Gruppe: Chemie oxydischer und organischer Grenzflächen, KIT, IFG, Leitung Prof. Dr. Christof Wöll) und Dr. Manuel Tsotsalas (KIT) für die Zusammenarbeit und Probenbeschichtung mit oberflächenverankerten metallorganischen Gerüstverbindungen (SURMOFs) und SURGELe.

Ich danke den Mitarbeitern des RSOFT Support, PD Dr. Alexander Nesterov-Müller (KIT), Dr. Uwe Bog (KIT), Dr. Tobias Glaser (KIP) und Dr. Frank Neubrech (KIP) für die Hinweise und Unterstützung beim Berechnen der optischen Sensorantwort.

Mein weiterer Dank gilt Dr. Tamas Haraszi (MPI), Dr. Gunther Richter (MPI, ZWE Dünnschicht) und Frank Thiele (MPI) für die Hinweise und Unterstützung bei der Probenherstellung mittels reaktivem Ionenplasmaätzen.

Besonderer Dank gilt Dr. Nadine Perschmann, Dr. Janosch Deeg, Dr. Katharina Klein für die Hinweise zur mizellaren Block Copolymer Lithographie und Einweisung in die Details der Gerätehandhabung. Vielen Dank gilt auch Dr. Rebecca Medda, Dr. Maria Sundh, Maria Halbig, Elisabeth Schwab, Dr. Sebastian Rausch, Dr. Timo Maier, Dr. Martin Streichfuss, Dr. Sabri Rahmouni, Dr. Tobias Hoffmann, Franziska Schenk, Dr. Seraphine Wegner, Catharina Scheele, Bastian, Jan und besonders Viktoria für die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Besonderer Dank gilt Herrn Reinhold Jehle (APC) für die Hilfe bei der Anfertigung der Pläne für die Werkstatt und Ursular Scheurich (Glastechnik, Zentralbereich Neuenheimer Feld)) für die schnelle Anfertigung passgenauer Fenster und die freundlichen Diskussionen.

Vielen Dank an Dr. Jenny Wagner für die freundliche Implementierung des gelungenen Matlab Programms HAUTE_CUISINE, besonderer Dank gilt hierbei auch Dr. Haci Osman Güvenc und

7 Danksagung

apl. Prof. Dr. Reiner Dahint. Vielen Dank gilt auch Dipl.-Chem. Eric Dyrzcz und Dr. Christopher Schirwitz für die freundlichen Hinweise zum Peptidübertrag sowie Dr. Volker Stadler (PEPPER-PRINT), PD Dr. Frank Breitling (KIT), PD Dr. Ralf Bischoff (DKFZ) und Jürgen Kretschmer (DKFZ).

Vielen Dank für die Beschichtungen mittels PVD-Verfahren gilt Herrn Georg Albert (KIT) und besonders Herrn Volker Schultheiß (Reinraumtechnik, KIP).

Vielen Dank gilt Maria Halbig (MPI) und Dr. Ada Cavalcanti-Adam (Leiterin der ZWE Biomaterialien und molekulare Biologie, MPI) für die inspirierende Zusammenarbeit zur Oberflächenstrukturierung.

Herzlicher Dank für die Zeit, Unterstützung, Diskussionen und Hilfe bei der Auswertung der SPDM-Aufnahmen mit matlab gilt Frau Dipl.-Phys. Margund Bach, Frau Dipl.-Phys. Sabrina Rossberger, Herrn Dipl.-Phys. Florian Schock, Herrn Dr. Thomas Ruckelshausen, Herrn Dr. Rainer Kaufmann, Max Hartmann, Herrn Dipl.-Phys. Gerrit Best, Herrn Dipl.-Ing. Heinz Eipel. Ganz besonders danke ich Herrn Dipl.-Phys. Martin Hagmann für die Driftkorrektur meiner Messdaten, die gemeinsamen Messungen, die Hilfe bei der Auswertung, die Diskussionen und das Feedback für die gemeinsamen Veröffentlichungen in Form eines Papers und Posters.

Vielen Dank an die Mitglieder der Arbeitsgruppe von apl. Prof. Dr. Dirk-Peter Herten für die Unterstützung bei den Fluoreszenzmessungen in Lösung, insbesondere MSc. Dominik Brox und Dipl.-Chem. Andreas Haderspeck.

Vielen Dank gilt Herrn Günter Meinusch und Herrn Peter Jeschka für die Unterstützungen bei Computerfragen und Beratung beim Installieren neuer Programme.

Ich bedanke mich vielmals bei Herrn Prof. (apl.) Reiner Dahint, Herrn Prof. Dr. Dr. Christoph Cremer, Fachkollegen, Mitarbeitern und Forschungspraktikanten des Instituts für angewandte physikalische Chemie, PCI und MPI für die zahlreichen Diskussionen, Hilfsbereitschaft, die Arbeitsatmosphäre, sportliche Aktivitäten, wie Teilnahme am Sport-Dies 2012 oder Hochschulsport. Vielen Dank gilt Prof. (em.) Dr. Michael Grunze, apl. Prof. Dr. Michael Zharnikov, Dr. Michael Himmelhaus (Dr. Michael Himmelhaus – NanoBioAnalytics), Dr. Pavel Levkin, Prof. Dr. Axel Rosenhahn, Georg Albert, Chem. Maria Alles, Dr. Maria Pilar Arpa Sancet, Dipl.-Phys. Margund Bach, Dipl.-Chem. Stella Bauer, Dr. Gerrit Best, Dr. Udo Birk, Dr. Jörg Bochterle, Dipl.-Chem. Andreas Buck, Christine Dietrich, Dipl. Chem. Eric Dyrzcz, Dipl. Ing. Heinz Eipel, Thomas Gorniak, Frederik Grüll, Dr. Haci Osman Güvenc, Dipl. Phys. Martin Hagmann, Dipl. Chem. Maximilian Hanke, Max Hartmann, Dipl. Phys. Anton Hasenkampf, apl. Prof. Dr. Michael Hausmann, Dr. Md. Nuruzzaman Khan Hira, Dr. Tobias Hoffmann, Dipl.-Phys. Christian Huck, Reinhold Jehle, Peter Jeschka, Dipl. Phys. Heinrich Klein, Dr. Thomas Kriesche, Dr. Fanny Liu, Dr. Felix Löffler, Dr. Hao Lu, Günter Meinusch, Dr. Nikolaus Meyerbröker, Dr. Patrick Müller, Ramon Lopez Perez, Dipl.-Phys. Jan Pischel, Dr. Leo Pöttinger, besonders Dipl.-Chem. Yasaman Riahi und Dipl.-Chem. Viktoria Riedel, Dipl.-Phys. Sabrina Rossberger, MSc. Mustafa Sayin, Dipl.-Phys. Wladimir Schaufler, Franziska Schenk, Dr. Christopher Schirwitz, Tim Schlosser, Dipl.-Phys. Florian Schock, Dipl.-Phys. Swen Schuster, Dr. Andrea Seehuber, Dipl.-Phys. Tobias Senkbeil, Dr. Florian Staier, MSc. Felicitas Schwörer, Dr. Isabel Thomé, Dipl.-Chem. Svenja Vater, Dipl.-Phys. Kambiz Veshgini, Dr. Noha Waly, Dipl.-Biol. Yanina Weiland, Dr. Alexander W. Peterson (National Institute of Standards and Technology), Dr. Linlin Xiao.

Allemaal bedanke ich mich bei meinen Eltern und Bruder für das Interesse, die aufmunternden Worte und den guten Rat.

„The mind is not a vessel to be filled but a fire to be kindled.“ - Zitat nach Plutarch^[270]