

Präparation und Charakterisierung von
Goldnanokristallen und Nanomultilayerspiegeln für
Röntgenbeugungsexperimente

Dissertation zur
Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Physik
der Universität Bielefeld

vorgelegt von
Jawad Slied
geboren in Nazareth
Israel

Bielefeld, März 2009

Betreuer: Prof. Dr. U. Heinzmann
Dr. A. Brechling

Gutachter: Prof. Dr. U. Heinzmann
Prof. Dr. A. Hütten

Tag der Disputation: 03.04.2009

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	iv
Abbildungsverzeichnis	ix
Tabellenverzeichnis	x
1 Einleitung	1
2 Grundlagen	4
2.1 Erzeugung und Eigenschaften von Röntgenstrahlen	4
2.2 Wechselwirkung von Röntgenstrahlung mit Materie	6
2.2.1 Absorption von Röntgenstrahlung	7
2.3 Röntgenbeugung an Kristallen	7
2.3.1 Bestimmung der Kristallausrichtung	11
2.3.2 Bestimmung der lateralen Kristallgröße	12
2.4 Molekularstrahlepitaxie (MBE)	13
2.5 Die Dynamical X-Ray Tracking Technik	14
2.6 Rasterkraftmikroskopie	16
2.7 2-Cystein Peroxiredoxin (2-CP)	19
3 Geräte zur Präparation und Charakterisierung der Au-Nanokristalle	23
3.1 MBE-Apparatur	23
3.2 3-Zonen-Ofen	28
3.3 Röntgendiffraktometer	29
3.4 Omicron UHV AFM/STM	30
3.5 Agilent-AFM (Eigenbau)	31
3.6 Transmissionselektronenmikroskop (TEM)	31
3.7 Rasterelektronenmikroskop (SEM)	32

4	Aufbau und Charakterisierung des Röntgenmessplatzes	33
4.1	Experimentaufbau	33
4.1.1	Setup für Bestahlungsmessungen	38
4.2	Strahlprofil im Fokus	39
4.3	Strahldivergenz	41
4.4	Strahlspektrum	43
4.5	Intensität	49
5	Untersuchung der Strahlenschädigung von 2CP-Proteinen und deren selektive Anbindung an Goldkolloide	50
5.1	Nachweis der Strahlenschädigung	50
5.1.1	Nachweis der Strahlenschädigung ohne Au-Kolloide	50
5.1.2	Nachweis der Strahlenschädigung mit Au-Kolloide	52
6	Präparation der Nano-Röntgenspiegel und Au-Kristalle	56
6.1	Nano-Mo/Si Multilayerspiegel	56
6.2	Au-Nanokristalle	57
6.3	Au-Mikrokristalle	60
7	Charakterisierung von Au-Kristallen auf NaCl(100)-Oberflächen mit AFM, XRD und Röntgenbeugung	62
7.1	Charakterisierung des NaCl-substrates	62
7.2	Einfluss der deponierten Goldmenge	65
7.3	Einfluss der Substrattemperatur	70
7.4	Einfluss des Substratpotentials	77
7.5	Lauebeugung an Nano-Goldkristallen	78
8	Charakterisierung von Au-Kristallen auf Si(100)-Oberflächen mittels AFM, REM und Röntgenbeugung	82
8.1	Einfluss der deponierten Schichtdicke	86
8.2	Einfluss der Substrattemperatur	95
8.3	Einfluss der Annealing-Zeit	104
8.4	Beugungsaufnahme von Au-Einzelkristall	111
9	Strukturuntersuchungen von freien Nanokristallen mit TEM	116
9.1	Nano-Mo/Si-Multilayerspiegel	116
9.2	Au-Nanokristalle	116
9.3	Konjugation von Goldkolloiden an 2-CP	119
10	Zusammenfassung und Ausblick	123

INHALTSVERZEICHNIS

iv

Literaturverzeichnis

125

Danksagung

134

Eidesstattliche Erklärung

136

Lebenslauf

137

Abbildungsverzeichnis

2.1	Das theoretische Spektrum einer Röntgenröhre mit W-Anode	5
2.2	Schematische Darstellung der Bragg-Bedingung	8
2.3	Skizze der Geometrie des $\Theta/2\Theta$ -Verfahrens	12
2.4	Skizze der Geometrie des Rocking-Kurve-Verfahrens	13
2.5	Prinzip des DXT-Laborsystems	14
2.6	Prinzip des Dynamical X-Ray Trackings	15
2.7	Schematische Darstellung der Kraft-Abstand-Kurve beim AFM	17
2.8	Schematische Darstellung der Funktionsweise eines im statischen Modus arbeitenden AFMs	18
2.9	Monomere Struktur des pflanzlichen 2-CP	20
2.10	Struktur des dekameren 2-CP aus <i>Crithidia fasciculatum</i>	21
2.11	Reaktion und Regeneration des 2-CP	21
2.12	Reaktion und Regeneration des 2-CP im NADPH-abhängigen System	22
3.1	Schematische Darstellung der Aufdampfanlage	24
3.2	Foto der Schleusenkammer	24
3.3	Foto der Aufdampfkammer	25
3.4	Schematische Darstellung der Au-Deposition	26
3.5	Foto der Probenhalterung in der Aufdampf-Kammer	26
3.6	Kurve der Temperaturverläufe der Probenoberfläche und der Tantalklemme	27
3.7	Kurve der Temperaturverläufe der Probenoberfläche und der Tantalklemme mit zusätzlicher Elektronenstoßheizung	28
3.8	Der AST 3-Zonen-Ofen mit Eurotherm-Regler	29
3.9	Aufbau des Omicron UHV-AFM	30
3.10	Digitale Aufnahme des Agilent-Luft-AFM	31
4.1	Schematische Darstellung der geometrischen Parameter der Polykapillarlinsen	34
4.2	Foto des DXT-Laborsystems	35
4.3	3 dimensionale Darstellung des DXT-Laborsystems	37

4.4	Zeitverlauf der Intensität des Röntgenstrahls nach dem Einschalten der Röntgenquelle	37
4.5	Glasrohr zur Bestrahlung der verschiedenen 2 CP-Proteinlösungen . . .	39
4.6	Strahlprofil mit eingebautem Kollimator	40
4.7	Strahlprofil mit ausgebautem Kollimator	40
4.8	Schematische Darstellung zur Bestimmung der Strahldivergenz	41
4.9	Aufnahme des Strahlprofils in drei verschiedenen Abständen zur Bestimmung der Divergenz	41
4.10	Strahlprofile zur Bestimmung der Divergenz	42
4.11	Darstellung der Berechnung des Spektrums	44
4.12	Die beiden Spektren (theoretisches und berechnetes)	48
5.1	Effekt drei stündiger Röntgenbestrahlung auf das 2-CP	51
5.2	Effekt 16-stündiger Röntgenbestrahlung	52
5.3	Inhibition der H ₂ O ₂ -Entgiftungsaktivität des 2-CP nach 16-stündiger Röntgenbestrahlung	53
5.4	Die H ₂ O ₂ -Entgiftungsaktivität des 2-CP nach 16-stündiger Behandlung der Probe unter unterschiedlichen Bedingungen	54
5.5	H ₂ O ₂ -Entgiftungsaktivität des für 16 Stunden bestrahlten 2-CP	54
5.6	DNA-Schutzassay	55
6.1	Schematische Darstellung der Herstellung der Nano-Mo/Si-Multilyerspiegel	57
6.2	Schematische Darstellung der Präparation der Nanokristalle	58
6.3	Darstellung der chemischen Struktur von CHAPS	58
6.4	Schematische Darstellung der Einbettung der Goldkristalle	59
6.5	Schematische Darstellung des Temperaturverlaufs beim Annealing . . .	61
7.1	Schematische Darstellung des NaCl-Kristallaufbaus	63
7.2	$\Theta/2\Theta$ -Messung des NaCl-Kristalls	64
7.3	Rocking-Kurve des NaCl-Kristalls ((200)-Peak)	64
7.4	AFM-Aufnahmen der Oberfläche eines frisch gespalteten NaCl-Kristalls	65
7.5	$\Theta/2\Theta$ -Messungen der verschiedenen aufgedampften Au-Schichtdicken auf NaCl	66
7.6	Rocking-Kurven von Au(200) einer Probe mit 2 nm Au-Schichtdicke auf NaCl mit Gauss-Fit	66
7.7	AFM-Aufnahmen der verschiedenen aufgedampften Au-Schichtdicken auf NaCl	67
7.8	Graphische Darstellung des Einflusses der durchschnittlichen deponierten Goldschichtdicke	69
7.9	XRD-Messung ($\Theta/2\Theta$ -Geometrie) an Au-Kristallen auf NaCl, die bei einem Substrattemperatur von 180°C deponiert wurden	70

7.10	XRD-Messung ($\Theta/2\Theta$ -Geometrie) an Au-Kristallen auf NaCl, die bei einer Substrattemperatur von 215°C deponiert wurden	71
7.11	XRD-Messung ($\Theta/2\Theta$ -Geometrie) an Au-Kristallen auf NaCl, die bei einer Substrattemperatur von 250°C deponiert wurden	71
7.12	XRD-Messung ($\Theta/2\Theta$ -Geometrie) an Au-Kristallen auf NaCl, die bei einer Substrattemperatur von 275°C deponiert wurden	72
7.13	XRD-Messung ($\Theta/2\Theta$ -Geometrie) an Au-Kristallen auf NaCl, die bei einer Substrattemperatur von 295°C deponiert wurden	72
7.14	XRD-Messung ($\Theta/2\Theta$ -Geometrie) an Au-Kristallen auf NaCl, die bei einer Substrattemperatur von 310°C deponiert wurden	73
7.15	XRD-Messung ($\Theta/2\Theta$ -Geometrie) an Au-Kristallen auf NaCl, die bei einer Substrattemperatur von 330°C deponiert wurden	73
7.16	Einfluss der Substrattemperatur auf die Orientierung der Goldkristalle auf eine NaCl-Oberfläche	74
7.17	AFM-Aufnahmen von Au auf NaCl(100) präpariert bei verschiedenen Substrattemperaturen	75
7.18	Einfluss der Substrattemperatur auf laterale und vertikale Clustergröße (AFM-Messungen) verglichen mit der lateralen Kristallgröße (bestimmt aus XRD-Messungen)	76
7.19	AFM-Aufnahmen von Au auf NaCl bei verschiedenen Substratpotentialen	77
7.20	Beugungsbild von Goldkristallen, die von einer NaCl(100)-Oberfläche auf eine Polymere Membran übertragen wurden	78
7.21	Beugungsbild von Goldkristallen, die von einer NaCl(100)-Oberfläche in eine Sekundenklebermembran übertragen wurden	80
7.22	Kristallausrichtung Au auf NaCl	81
8.1	REM-Aufnahmen von Au-Clustern auf Si(100)	83
8.2	AFM-Aufnahme eines einzelnen Au-Kristalls auf Si(100)	83
8.3	$\Theta/2\Theta$ -Messungen von Au-Kristallen auf Si(100) unter UHV-Bedingung annealt	84
8.4	Rocking-Kurven von Au-Kristallen auf Si(100) unter UHV-Bedingung annealt	84
8.5	Lichtmikroskopie-Aufnahmen von Au auf Si(100)	85
8.6	REM-Aufnahmen von Au auf Si(100)	86
8.7	$\Theta/2\Theta$ -Messungen von Proben mit verschiedenen deponierten Goldmengen	87
8.8	Rocking-Kurven von Proben mit verschiedenen deponierten Goldmengen	88
8.9	Lichtmikroskopie-Aufnahmen von Au-Cluster auf der SiO ₂ bei verschiedenen aufgesputterten Goldmengen	89
8.10	REM-Aufnahmen von Au auf SiO ₂ bei verschiedenen aufgesputterten Goldmengen	89
8.11	AFM-Aufnahmen von Au auf SiO ₂	90

8.12	Abhängigkeit der Clusterhöhe von der deponierte Au-Schichtdicke . . .	91
8.13	REM-Aufnahmen mit kleinerer Vergrößerung einer aufgesputterte Probe mit 150 nm Au auf SiO ₂	91
8.14	Histogramm der Größenverteilung der lateralen Kristallflächen der Probe mit 50 nm deponierte Goldschichtdicke	93
8.15	Histogramm der Größenverteilung der lateralen Kristallflächen der Probe mit 100 nm deponierte Goldschichtdicke	93
8.16	Histogramm der Größenverteilung der lateralen Kristallflächen der Probe mit 150 nm deponierte Goldschichtdicke	94
8.17	Histogramm der Größenverteilung der lateralen Kristallflächen der Probe mit 250 nm deponierte Goldschichtdicke	94
8.18	$\Theta/2\Theta$ -Messungen von Proben bei verschiedenen Temperaturen	95
8.19	Rocking-Kurven von Proben bei verschiedenen Temperaturen	96
8.20	Lichtmikroskopie-Aufnahmen von Au-Cluster auf SiO ₂ bei verschiedenen Temperaturen	97
8.21	REM-Aufnahmen von Au auf SiO ₂ bei verschiedenen Annealing-Temperaturen	98
8.22	Graph zur Darstellung der Kristallhöhe in Abhängigkeit von der Substrattemperatur	99
8.23	Histogramm der Größenverteilung der lateralen Kristallflächen der Probe mit 900°C	100
8.24	Histogramm der Größenverteilung der lateralen Kristallflächen der Probe mit 930°C	101
8.25	Histogramm der Größenverteilung der lateralen Kristallflächen der Probe mit 960°C	101
8.26	Histogramm der Größenverteilung der lateralen Kristallflächen der Probe mit 990°C	102
8.27	Histogramm der Größenverteilung der lateralen Kristallflächen der Probe mit 1020°C	102
8.28	Histogramm der Größenverteilung der lateralen Kristallflächen der Probe mit 1050°C	103
8.29	Histogramm der Größenverteilung der lateralen Kristallflächen der Probe mit 1080°C	103
8.30	$\Theta/2\Theta$ -Messungen von Proben bei verschiedenen Annealing-Zeiten . . .	104
8.31	Rocking-Kurven von Proben bei verschiedenen Annealing-Zeiten	105
8.32	Lichtmikroskopie-Aufnahmen von Au auf SiO ₂ bei verschiedenen Annealing-Zeiten	106
8.33	REM-Aufnahmen von Au auf SiO ₂ bei verschiedenen Annealing-Zeiten	106
8.34	Kristallhöhe in Abhängigkeit von der Annealing-Zeit	107
8.35	Histogramm der Größenverteilung der lateralen Kristallflächen der Probe mit 2 h Annealing-Zeit	108

8.36	Histogramm der Größenverteilung der lateralen Kristallflächen der Probe mit 3 h Annealing-Zeit	109
8.37	Histogramm der Größenverteilung der lateralen Kristallflächen der Probe mit 7 h Annealing-Zeit	109
8.38	Histogramm der Größenverteilung der lateralen Kristallflächen der Probe mit 10 h Annealing-Zeit	110
8.39	REM-Aufnahmen von Au-Kristallen auf SiO ₂	111
8.40	REM-Aufnahmen von Au-Kristallen auf SiO ₂	112
8.41	REM-Aufnahme von einem Au Cluster/Kristall auf SiO ₂	113
8.42	Lichtmikroskopie-Aufnahme von Au-Einkristallen auf Tesafilm	113
8.43	Lichtmikroskopie-Aufnahmen von Au-Einkristall auf Polymer	114
8.44	Laue-Beugungsaufnahme von Au-Einkristall auf Polymer	115
9.1	TEM-Aufnahme eines Nano-Mo/Si-Multilyerspiegels	117
9.2	TEM-Aufnahme eines Gemisches von Au- und NaCl-Kristallen	118
9.3	TEM-Aufnahme von mehreren Nanogoldkristallen nach der Trennung von NaCl	118
9.4	TEM-Aufnahme von einzelnen Nanogoldkristallen nach Austausch des Lösungsmittel	119
9.5	Schematische Darstellung des Komplexes	120
9.6	TEM-Nachweis der Ankopplung der 2-CP-Cysteinylnvarianten Lys174, DKS und Cys-frei an 5 nm-Goldkolloide	121
9.7	TEM-Nachweis der vergleichenden Ankopplung der 2-CP-Cysteinylnvariante Lys174 an 15 nm-Goldkristalle	122

Tabellenverzeichnis

4.1	Die wichtigsten Eigenschaften der verwendeten Wolframsanode-Röntgenquelle	34
4.2	Die geometrischen und die Transmissionsparameter der Polykapillaro-optik	35
4.3	Die wichtigsten Parameter der verwendeten Röntgenkamera	36
4.4	Die wichtigsten Parameter des verwendeten Röntgen-PIN-Diode-Detektor-Systems	38
4.5	Die Bestimmung der Halbwertsbreiten und der Strahldivergenz	43
4.6	Die Bestimmung der Dicke	48
6.1	Die wichtigsten Parameter beim Sputtern von Gold auf frisch gereinigtem Si(100)-Substrat	60
8.1	Ergebnisse der Größenverteilung der lateralen Kristallflächen der Proben mit unterschiedlichen deponierten Schichtdicken	92
8.2	Ergebnisse der Größenverteilung der lateralen Kristallflächen der Proben mit unterschiedlichen Annealing-Temperaturen	100
8.3	Ergebnisse der Größenverteilung der lateralen Kristallflächen der Proben mit unterschiedlichen Annealing-Zeiten	108

Kapitel 1

Einleitung

W.C. Röntgen hat die nach ihm benannten Röntgenstrahlen im Jahr 1895 entdeckt [1, S. 1202]. Nachdem Max von Laue der Nachweis von Röntgenbeugung an Kristallgitter gelungen ist, hat sich diese Art von Strahlung als eine wertvolle Sonde zur Strukturbestimmung von Materie erwiesen [2, S. 1084]. Der Bereich, in dem sich Röntgenstrahlen als entscheidend für die Aufdeckung der Struktur eines bestimmten Materials erwiesen haben, ist erstaunlich. Dies beginnt bei der Strukturbestimmung einfacher Verbindungen (wie z.B. Kristallstrukturbestimmung [3, S. 3]), geht über zu komplexeren Strukturen, wie z.B. die DNA, die im Jahre 1962 [3, S. 3] mit Hilfe dieser Methode bestimmt wurde, bis zur Strukturuntersuchung von Proteinen und sogar von Funktionsbauteilen lebender Organismen [4, S. 1].

Für die moderne Biologie sowie Medizin bilden mittlerweile viele physikalische Messverfahren eine essentielle Hilfe [5, S. V]. Eines dieser Verfahren ist die Proteinkristallographie, bei der die Struktur von kristallisierten (denaturierten) Proteinmolekülen bestimmt wird [6] [7]. Um Untersuchungen zur Dynamik von Proteinmolekülen in ihrer natürlichen Umgebung zu ermöglichen, hat Sasaki in den letzten Jahren ein neues Röntgenbeugungsverfahren entwickelt [8]. Bei diesem Verfahren, das Dynamical X-Ray-Tracking (DXT) genannt wird, findet die Beugung nicht direkt am Proteinmolekül, sondern an einem starr an das Proteinmolekül gebundenen Nanospiegel statt. Gemessen wird hierbei die zeitliche Veränderung der Ausrichtung des Nanokristalls, die anhand der Lage der Laue-Beugungspunkte bestimmt wird. Anhand dieser Lageveränderungen lassen sich dann wieder Aussagen über Strukturänderungen des untersuchten Proteins mit einer hohen Ortsgenauigkeit in der Zeitdomäne herleiten [9].

Das Verständnis der Beziehung zwischen Funktion und Struktur ist eine hoch interessante, in weiten Teilen noch ungeklärte wissenschaftliche Fragestellung [10, S. 1]. Das DXT-Verfahren soll hierbei durch Untersuchung der Struktur- und Konformationsänderungen von Biomolekülen *in vivo*, mit einer Ortsauflösung im pm-Bereich und einer Zeitauflösung im ms-Bereich auf der Ebene eines Einzelmoleküls analysieren [11]. Die wissenschaftliche Zielsetzung dieser Arbeit ist der Aufbau eines DXT-Messplatzes sowie die Präparation der benötigten nanokristallinen röntgenbeugenden Proteinlabels einschließlich deren Charakterisierung. Die Anforderungen, die an diese Label gestellt wurden, waren einerseits eine möglichst geringe Größe, um die Eigenschaften bzw. das Verhalten der gelabelten Proteinmoleküle nicht signifikant zu beeinflussen, andererseits

groß genug, um ein detektierbares Beugungssignal zu erhalten, welches proportional zum Kristallvolumen ist. Weiterhin waren eine geringe Größenverteilung, ein hohes Reflektionsvermögen sowie die Stabilität in einem wässrigen Lösungsmittel erforderlich. Für die DXT-Technik kommen zwei unterschiedliche Typen röntgenbeugender Marker in Frage. Im weichen Röntgenbereich (bis ca. 1 keV) ist es möglich, Label zu verwenden, die aus einem künstlich erzeugten periodischen Schichtsystem (z. B. Mo/Si) bestehen. Bei diesen niedrigen Photonenenergien ist es allerdings erforderlich, die Messungen unter Hochvakuumbedingungen durchzuführen. Darüber hinaus ist in diesem weichen Röntgenbereich der Einsatz einer Nasszelle (Proteine im Lösungsmittel) praktisch unmöglich, so dass hier nur Proteine unter denaturierenden Bedingungen untersucht werden könnten. Im Energiebereich zwischen ca. 5 keV und 25 KeV, welcher Wellenlängen zwischen 0,25 nm und 0,05 nm entspricht, ist es dagegen möglich, die Röntgenstrahlung direkt an den Gitternetzebenen eines Einkristalls zu beugen. Auch ist Luft in diesem Energiebereich ausreichend transparent, so dass ein aufwändiger Vakuumaufbau entfallen kann. Daneben sind hier Untersuchungen an Proteinen unter nicht-denaturierenden Bedingungen in einer Nasszelle möglich. Gold ist auf Grund seiner hohen Kernladungszahl ($Z=79$) und seiner Reaktionsträgheit ein geeignetes Material für diese Anwendungen. Diese Arbeit wurde im Rahmen eines Projektes, das eine interdisziplinäre Zusammenarbeit zwischen der Abteilung Biochemie der Pflanzen (AG: Dietz, Biologie) und der Abteilung Molekül- und Oberflächenphysik (AG Heinzmann, Physik) ist, durchgeführt. Eine wichtige Fragestellung die sich aus dieser Kooperation ergab, war die Eignung des Proteins 2 Cystein-Peroxyredoxin (2CP) für diese Messmethode. Dazu wurden Strahlenschädigungsexperimente an verschiedenen 2CP-Varianten in An- und Abwesenheit von Goldkolloiden durchgeführt und die bestrahlten Proteine dann in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dietz auf ihre Funktionalität untersucht.

Es wird zunächst ein kurzer Überblick über die Grundlagen der Röntgenstrahlung und deren Wechselwirkung mit Materie, insbesondere unter Berücksichtigung von Röntgenbeugung an Kristallen, gegeben. Es werden die Messmethoden zur Bestimmung der Kristallausrichtung sowie der vertikalen und lateralen Kristallgröße dargestellt. Im darauf folgenden Kapitel soll ein umfassender Überblick über die verschiedenen zur Herstellung und Charakterisierung dieser Goldkristalle verwendeten Geräte und Analysemethoden vorgestellt werden. Zusätzlich wird hier mit genauen technischen Angaben der selbstgebauten MBE-Apparatur beschrieben. Diese Apparatur hat den Zweck, Nanogoldkristalle mit Hilfe des MBE-Verfahrens herzustellen. Im vierten Kapitel werden der Aufbau des DXT-Laborsystem dargestellt und sein Strahlprofil im Fokus, seine Divergenz und sein Strahlspektrum bestimmt. Hierauf aufbauend wird im fünften Kapitel die Untersuchung der Strahlenschädigung von 2CP-Proteinen und der Nachweis dieser Strahlenschädigung ohne Au-Kolloiden und mit Au-Kolloiden dargestellt. Der Hauptinhalt des sechsten Kapitels ist die genaue Beschreibung der Präparation von Nano- und Mikro-Goldkristallen. Die einzelnen Ergebnisse werden in den Kapiteln sieben und acht diskutiert. In diesen Kapiteln wird auf die Ergebnisse der Charakterisierung der nano- sowie mikrokristallinen Goldkristalle eingegangen. Insbesondere wird dabei der Einfluss verschiedener Präparationsparameter auf die Kristallgröße sowie Größenverteilung, die Kristallform, die Kristallausrichtung bezüglich des Substrates sowie der Anteil der Einkristalle untersucht. In Kapitel neun werden die mittels

TEM-Messungen durchgeführten Strukturuntersuchungen an freien Goldkristallen sowie nano-Mo/Si-Multilayerspiegeln vorgestellt. Eine Zusammenfassung und ein Ausblick schließen die Arbeit ab.

Kapitel 2

Grundlagen

Dieses Kapitel gibt einen kurzen Überblick über die theoretischen Grundlagen, die für diese Arbeit gebraucht werden. Zunächst wird eine kurze Beschreibung der Erzeugung von Röntgenstrahlung und deren Wechselwirkung mit Materie gegeben, insbesondere unter Berücksichtigung von Röntgenbeugung an Kristallen. Es werden die Messmethoden zur Bestimmung der Kristallausrichtung sowie der vertikalen und lateralen Kristallgröße dargestellt. Danach werden die Molekularstrahlepitaxie (MBE) und die Dynamical X-Ray Tracking Technik (DXT) erläutert. Weiterhin wird ein Überblick über die Rasterkraftmikroskopie im Abschnitt 2.6 gegeben. Zum Abschluss wird das verwendete Protein 2-CP beschrieben.

2.1 Erzeugung und Eigenschaften von Röntgenstrahlen

Röntgenstrahlen sind elektromagnetische Wellen [12, S. 179], die sich mit Lichtgeschwindigkeit ausbreiten. Ihre Wellenlänge λ liegt im Bereich zwischen 10^{-5} nm (harte Röntgenstrahlung) und 10^1 nm (weiche Röntgenstrahlung) [13, S. 267]. Der Energiebereich der Strahlung liegt zwischen ungefähr 0,1 eV und 500 KeV [4, S. I].

Zur Erzeugung der Röntgenstrahlung werden in kleinen Laboren Röntgenröhren verwendet. Die Elektronen werden von der Kathode durch die angelegte Spannung von einigen kV (ca. 30 - 60 kV) zur positiven Anode hin beschleunigt und erhalten kinetische Energie [14, S. 333].

$$eU = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (2.1)$$

e ist die Elektronenladung, U die angelegte Spannung, ν die Frequenz der emittierten Röntgenquanten, h das Plancksche Wirkungsquantum, λ die Wellenlänge der emittierten Röntgenquanten, c die Lichtgeschwindigkeit.

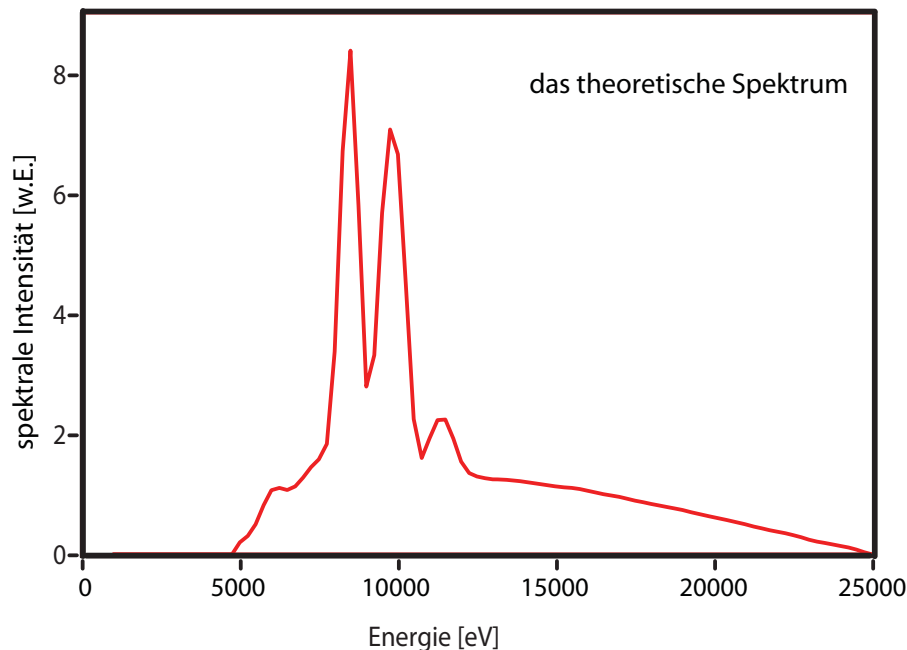


Abbildung 2.1: Das theoretische Spektrum der Röntgenröhre mit W-Anode, einer Beschleunigungsspannung von 25 kV und einem 1 mm starken Be-Austrittsfenster [15].

Die Röntgenerzeugung erfolgt in den oberen Schichten der Anode in Form von Bremsstrahlung und charakteristischer Röntgenstrahlung. In dem Prozess der Bremsstrahlung werden die Elektronen durch das elektrische Feld der Kerne mehr oder weniger stark abgebremst. Die Bremsstrahlung entsteht durch Verzögerung der Elektronen in den elektrischen Feldern der Atomkerne des Anodenmaterials. Die dabei entstehende Strahlung zeigt eine kontinuierliche Verteilung und hat zu kurzen Wellenlängen hin eine der kinetischen Energie der Elektronen entsprechende Grenzwellenlänge (siehe Gleichung 2.1) [16, S. 25]. Etwa 98-99 % der kinetische Energie der Elektronen wird bei diesem Prozess in Wärme umgewandelt [3, S. 6].

Die charakteristische Röntgenstrahlung entsteht durch hochenergetische Übergänge in den Elektronenhüllen der Metallatome. Sie weist ein Linienspektrum auf. Ein Elektron wird aus einer der unteren Schalen entfernt, wodurch ein instabiler Zustand erzeugt wird. Dieser lässt ein Elektron aus einer höheren Schale auf den frei gewordenen Platz übergehen, wobei Strahlung emittiert wird, die eine genaue definierte Wellenlänge hat. Die Übergänge sind nach folgendem Schema indiziert. Der erste Großbuchstabe gibt die Schale an, in die der Übergang stattfindet und beginnt mit K, L, M,.... . Die Schale aus der das Elektron kommt, wird durch einen griechischen Kleinbuchstaben festgelegt, wobei alpha, beta, gamma für die nächst, die übernächst und die über übernächst höheren Schalen stehen. Ein zusätzlicher Index (Zahl) berücksichtigt noch die aufgrund der Spin-Bahn-Wechselwirkung auftretenden Aufspaltung der einzelnen Schalen [16, S. 25].

Die Abbildung 2.1 zeigt das theoretische Spektrum der Röntgenröhre mit W-Anode [15].

Neben der Röntgenröhre gibt es mittlerweile eine Reihe weiterer Röntgenstrahlungs-

quellen, die eine deutlich intensivere Strahlung bei geringer Energiebandbreite und Divergenz erzeugen [17, S. 102]. Dazu zählen z.B. die im Jahre 1970 entwickelten Synchrotronstrahlungsquellen [4, S. 2].

In den letzten Jahren, ist mit dem Freien Elektron Laser die sogenannte vierte Generation der Synchrotronstrahlungsquellen entwickelt worden. Diese Röntgenquelle hat starke und vielfältige Möglichkeiten für Hochenergie- und Kernphysikexperimente.

2.2 Wechselwirkung von Röntgenstrahlung mit Materie

Trifft Strahlung der Wellenlänge λ auf die Oberfläche eines Mediums wird ein bestimmter Bruchteil der Strahlungsleistung reflektiert und der Rest dringt in das Medium ein. Bleibt die Strahlungsleistung beim Durchgang unverändert so bezeichnet man das Medium als durchlässig, im sichtbaren Bereich auch als durchsichtig. Nimmt die Strahlungsleistung ab, so kann dies zwei Ursachen haben, erstens kann das Licht teilweise absorbiert, zweitens kann es gestreut werden [18, S. 242].

Beim Zusammentreffen der Röntgenstrahlung mit Materie treten Wechselwirkungseffekte auf. Dabei wird die Energie und Intensität der Strahlung geschwächt (absorbiert), ebenso die Ausbreitungsrichtung der Strahlung in alle möglichen Richtungen gestreut [19, S. 373]. Weiche Röntgenstrahlung wechselwirkt mit Materie auf drei unterschiedliche Arten: elastische Streuung, inelastische Streuung und Photoabsorption [20, S. 5].

Elastische Streuung wird durch verschiedene Prozesse beschrieben: Thomson-Streuung ($\lambda \gg d$, Durchmesser der Streuteilchen), die Streuung an einzelnen Elektronen eines Atoms, die als frei betrachtet werden können. Rayleigh-Streuung ($\lambda \gg d$) ist die Wechselwirkung der Strahlung mit stark gebundenen Elektronen, die kollektiv schwingen [21, S. 1]. Bei der elastischen Streuung bleibt die Frequenz der Sekundärwelle unverändert gegenüber der einfallenden Welle.

Bei den inelastischen Streuprozessen zu denen die Compton-Streuung ($\lambda \prec d$) zählt, findet die Wechselwirkung der Photonen mit nur leicht gebundenen Elektronen statt [22, S. 65], bei der ein kleiner Teil der Energie des Photons an das Elektron abgegeben wird. Bei dieser Streuung ändert sich die Frequenz von der Primärwelle zu der Sekundärwelle und es besteht keine feste Phasenbeziehung zwischen dem einfallenden und gestreuten Licht [20, S. 5].

Man unterscheidet auch zwischen kohärenter und inkohärenter Streuung. Bei der kohärenten Streuung steht die Sekundärwelle in einer festen Phasenbeziehung zur Primärwelle. Wenn keine feste Phasenbeziehung zwischen Primär- und Sekundärwelle besteht, tritt die inkohärente Streuung auf [23, S. 731].

2.2.1 Absorption von Röntgenstrahlung

Die Absorption von Röntgenstrahlung findet größtenteils aufgrund des photoelektrischen Effektes statt. Hier geben die einfallenden Röntgenquanten ihre Energie vollständig an die inneren Elektronen des Atoms ab. Die Absorption ist für alle Materialien der dominierende Wechselwirkungsprozess im weichen Röntgenbereich. Sie trägt am stärksten zur Abschwächung der Intensität der einfallenden (weichen) Röntgenstrahlung bei, während der Anteil der kohärenten Streuung deutlich weniger als 1% beträgt und die inkohärente Streuung vollständig vernachlässigt werden kann [24, S. 11].

Die Wellengleichung 2.2 beschreibt die Amplitude der elektrischen Feldstärke E einer elektromagnetischen Welle die sich in einem Medium entlang der Wegstrecke x ausbreitet.

$$E = E_0 e^{-\frac{2\pi\beta x}{\lambda}} e^{-\frac{2\pi i}{\lambda}(nx - ct)} \quad (2.2)$$

E_0 ist dabei die Amplitude der einfallenden Welle bei $x = 0$, λ die Vakuumwellenlänge, c die Lichtgeschwindigkeit, β Dämpfungskonstante und n der Realteil des komplexen Brechungsindex \bar{n} des Materials [24, S. 11]:

$$\bar{n} = n + i\beta \quad (2.3)$$

Beim Durchgang von Röntgenstrahlung durch Materie ist die Wahrscheinlichkeit für Absorption zu der Dicke x des durchstrahlten Stoffes proportional. Daraus ergibt sich eine exponentielle Abschwächung der einfallenden Intensität I_0 der elektromagnetischen Strahlung in Materie auf dem Weg x , die sich als Produkt der elektromagnetischen Feldstärke E mit ihrem komplex konjugierten $I = E E^*$ berechnet [24, S. 11]:

$$I = I_0 e^{-\alpha x} \quad (2.4)$$

$$\alpha = \frac{4\pi\beta}{\lambda} \quad (2.5)$$

Der Massenabsorptionskoeffizient μ von Materie der Dichte ρ berechnet sich folgendermaßen aus dem linearen Absorptionskoeffizienten α [24, S. 11]:

$$\mu = \frac{\alpha}{\rho} \quad (2.6)$$

2.3 Röntgenbeugung an Kristallen

Die Röntgenstreuung befasst sich mit der winkelabhängigen Verteilung von gestreutem Röntgenlicht an einem Körper [25, S. 1]. Sind die untersuchten Proben auf atomarerer Skala geordnet, so ist dies ein Spezialfall für, die sogenannte Röntgenbeugung [26, S. 51]. Die Beugung hängt von der Kristallstruktur und der Wellenlänge ab [27, S. 47].

Treten überhaupt bei Beugungsaufnahmen Peaks auf, dann liegt eine kristalline Probe vor. Das gemessene Beugungsdiagramm wird nach der Zahl, der Lage, der Intensität und der Form der Beugungspeaks analysiert. Treten nur einzelne und sehr scharfe Beugungspeaks auf, kann ein Einkristall vorliegen. Treten sehr viele Beugungslinien

auf, dann kann eine niedrigsymmetrische Kristallstruktur oder ein Kristallgemisch aus vielen Phasen vorliegen. Treten keine Beugungspeaks auf, dann gibt es innerhalb des Eindringbereiches der Strahlung keine beugenden Netzebenen und es liegt eine röntgenamorphe Probe vor [3, S. 147].

Es ist möglich mit erheblicher Genauigkeit die Verteilung der Elektronen in Atomen durch Wissen über die Intensität der Reflexion der Röntgenstrahlen durch die Atome der Kristalle zu bestimmen [28]. Als nächstes wird die Bragg-Bedingung für die von einem Kristall gebeugten Strahlen erklärt. Die einfallenden Strahlen werden an den parallelen Atomebenen in einem Kristall gespiegelt (d.h. Einfallswinkel gleich Ausfallswinkel), wobei jedoch jede Ebene nur einen geringen Bruchteil der Strahlung reflektiert, wie ein schwach versilberter Spiegel. Gebeugte Strahlen findet man dann nur in den Richtungen, in denen die an parallelen Atomebenen reflektierte Strahlung konstruktiv interferiert wie in Abbildung 2.2 gezeigt wird [27, S. 47].

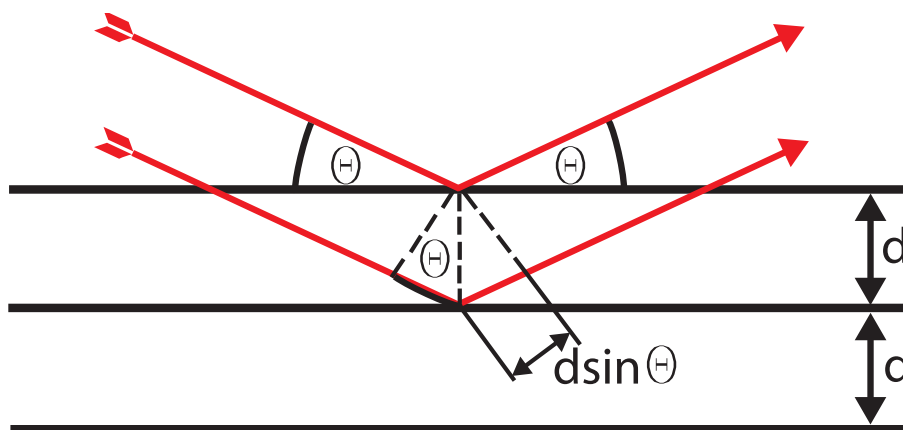


Abbildung 2.2: Ableitung der Bragg-Gleichung.

$2d \sin \Theta = n\lambda$; d ist der Abstand aufeinanderfolgender paralleler Netzebenen und $2\pi n$ die Phasendifferenz zwischen Strahlen, die an diesen Netzebenen reflektiert werden. Die reflektierenden Ebenen haben nichts mit der Oberfläche zu tun, die die einzelne Probe begrenzt.

Die Bragg-Gleichung lautet [12, S. 105]:

$$2d \sin \Theta = n\lambda \quad (n = 1, 2, 3\dots) \quad (2.7)$$

wobei d der Abstand zwischen parallelen Gitterebenen und $2d \sin \Theta$ der Gangunterschied ist. n ist eine natürliche Zahl, λ ist die Wellenlänge des Röntgenlichts. Der Winkel Θ zwischen Röntgenstrahl und Gitterebene ist der sogenannte Glanz- oder Braggwinkel. Er ist für jeden festen Netzebenenabstand und jede feste Beugungsordnung festgelegt. Man ordnet jeder echten Netzebenenschar mit der Gitterkonstante d zusätzliche Netzebenen d/n zu. Damit ist jeder Reflex durch die Angabe von drei Indizes beschrieben, somit muss der Parameter n nicht verwendet werden. Die Indizes der echten Netzebenen haben keinen gemeinsamen Teiler, weil die n -te Beugungsanordnung durch Abstände d/n beschrieben wird. Somit unterscheiden sie sich von den effektiven Indizes [16, S.

37]. Die Braggreflexion kann nur für Wellenlängen $\lambda \leq 2d$ auftreten. Das ist der Grund, warum man kein sichtbares Licht verwenden kann.

Die Braggsche Ableitung für die Beugungsbedingung 2.7 gibt eine genaue und klare Aussage für die Bedingung der konstruktiven Interferenz von Wellen, die durch Punktladungen auf den einzelnen Gitterplätzen gestreut werden. Um die Intensität der Streuung an Elektronen, die innerhalb einer Einheitszelle räumlich verteilt sind, zu bestimmen, ist eine Fourieranalyse notwendig [27, S. 50].

Am wichtigsten für die Fourieranalyse ist, dass die Elektronendichte $n(\mathbf{r})$ eine periodische Funktion von \mathbf{r} mit den Perioden \mathbf{a}_1 , \mathbf{a}_2 , \mathbf{a}_3 in Richtung der drei Kristallachsen. So wird

$$n(\mathbf{r} + \mathbf{T}) = n(\mathbf{r}) \quad (2.8)$$

wobei $\mathbf{T} = \mu_1 \mathbf{a}_1 + \mu_2 \mathbf{a}_2 + \mu_3 \mathbf{a}_3$ eine Gittertranslation ist, μ_1, μ_2, μ_3 ganze Zahlen sind, und $\mathbf{a}_1, \mathbf{a}_2, \mathbf{a}_3$ die Kristallachsen.

Die Erweiterung der Fourieranalyse auf periodische Funktionen $n(\mathbf{r})$ im Dreidimensionalen ergibt:

$$n(\mathbf{r}) = \sum_{\mathbf{G}} n_{\mathbf{G}} \exp(i\mathbf{G} \cdot \mathbf{r}) \quad (2.9)$$

\mathbf{G} ist die Menge von Vektoren, unter denen Gleichung 2.9 invariant gegenüber jeder Gittertranslation \mathbf{T} ist, die den Kristall in sich selbst überführt.

Die Inversion von 2.9 ergibt:

$$n_{\mathbf{G}} = V_c^{-1} \int_{cell} dV n(\mathbf{r}) \exp(-i\mathbf{G} \cdot \mathbf{r}) \quad (2.10)$$

Hier ist V_c das Volumen einer Zelle im Kristall. Es wird durch 2.10 gezeigt, dass die Amplitude der an einer Kristallstruktur gestreuten Röntgenstrahlung durch die Größe der Fourier-Koeffizienten $n_{\mathbf{G}}$ bestimmt ist [27, S. 52].

Um die Vektoren \mathbf{G} der Fouriersumme von Gl. 2.9 zu finden, werden die Achsenvektoren $\mathbf{b}_1, \mathbf{b}_2, \mathbf{b}_3$ des reziproken Gitters gebildet,

$$\mathbf{b}_1 = 2\pi \frac{\mathbf{a}_2 \times \mathbf{a}_3}{\mathbf{a}_1 \cdot \mathbf{a}_2 \times \mathbf{a}_3} ; \quad \mathbf{b}_2 = 2\pi \frac{\mathbf{a}_3 \times \mathbf{a}_1}{\mathbf{a}_1 \cdot \mathbf{a}_2 \times \mathbf{a}_3} ; \quad \mathbf{b}_3 = 2\pi \frac{\mathbf{a}_1 \times \mathbf{a}_2}{\mathbf{a}_1 \cdot \mathbf{a}_2 \times \mathbf{a}_3} \quad (2.11)$$

Wenn $\mathbf{a}_1, \mathbf{a}_2, \mathbf{a}_3$ die primitiven Vektoren des Kristallgitters sind, dann sind $\mathbf{b}_1, \mathbf{b}_2, \mathbf{b}_3$ die primitiven Vektoren des reziproken Gitters. Jeder Vektor des reziproken Gitters von Gleichung 2.11 steht orthogonal auf zwei der Achsenvektoren des Kristallgitters. Deshalb haben $\mathbf{b}_1, \mathbf{b}_2, \mathbf{b}_3$ die Eigenschaft,

$$\mathbf{b}_i \cdot \mathbf{a}_j = 2\pi \delta_{ij} \quad (2.12)$$

wobei $\delta_{ij} = 1$, wenn $i = j$ und $\delta_{ij} = 0$ wenn $i \neq j$.

Das reziproke Gitter eines Bravais-Gitters (Raum-Gitter) bezeichnet den Satz aller Vektoren \mathbf{G} , für die gilt $\exp^{i\mathbf{G} \cdot \mathbf{r}} = 1$ bzw. $\mathbf{G} \cdot \mathbf{r} = 2\pi n$. Punkte im reziproken Gitter sind durch die Reihe von Vektoren $\mathbf{G} = \nu_1 \mathbf{b}_1 + \nu_2 \mathbf{b}_2 + \nu_3 \mathbf{b}_3$ festgelegt, wobei ν_1, ν_2, ν_3 ganzzahlig sind. Ein Vektor dieser Form ist ein reziproker Gittervektor.

Jede Kristallstruktur hat zwei mit ihr verbundene Gitter, das Kristallgitter und das

reziproke Gitter. Ein Beugungsbild eines Kristalls ist die Darstellung des reziproken Gitters des Kristalls. Ein mikroskopisches Bild ist, wenn es gut genug aufgelöst ist, die Darstellung der Kristallstruktur im Realraum. Mit Gl. 2.11 sind die beiden Gitter miteinander verbunden. Wird der Kristall gedreht, drehen sich sowohl das Kristallgitter als auch das reziproke Gitter [27, S. 53]. Vektoren im Kristallgitter haben die Dimension [Länge]; Vektoren im reziproken Gitter haben die Dimension [Länge]⁻¹. Das Kristallgitter ist im reellen Raum; das reziproke Gitter ist im Fourier-Raum.

Die Menge der reziproken Vektoren \mathbf{G} bestimmt die möglichen Reflexe der Röntgenstrahlung. Man addiert den Streuvektor $\Delta\mathbf{k}$, der die durch die Streuung verursachte Veränderung des Wellenvektors ist, zum Wellenvektor des einfallenden Strahls \mathbf{k} , um den gestreuten Wellenvektor \mathbf{k}' zu erhalten,

$$\mathbf{k} + \Delta\mathbf{k} = \mathbf{k}' \quad (2.13)$$

Bei elastischer Streuung ist $|\mathbf{k}| = |\mathbf{k}'|$ erfüllt. Außerdem muss bei Bragg-Streuung an einem periodischen Gitter jedes erlaubte $\Delta\mathbf{k}$ gleich einem reziproken Gittervektor \mathbf{G} sein

$$\Delta\mathbf{k} = \mathbf{G} \quad (2.14)$$

Wird \mathbf{G} von Gl. 2.14 in Gl. 2.13 eingesetzt ergibt sich $\mathbf{k} + \mathbf{G} = \mathbf{k}'$. Nach der Quadrierung beider Seiten folgt $(\mathbf{k} + \mathbf{G})^2 = k'^2$ und kann umgeschrieben werden zu

$$2\mathbf{k} \cdot \mathbf{G} + G^2 = 0 \quad (2.15)$$

Dies ist das zentrale Ergebnis der Theorie der elastischen Streuung an einem periodischen Gitter. Und der folgende Ausdruck wird oft als Beugungsbedingung benutzt [27, S. 56],

$$2\mathbf{k} \cdot \mathbf{G} = G^2 \quad (2.16)$$

Wenn \mathbf{G} ein reziproker Gittervektor ist, dann gilt das auch für $-\mathbf{G}$.

Das ursprüngliche Ergebnis von Gleichung 2.14 der Beugungstheorie kann auch anders dargestellt werden, so dass man die Laue-Gleichungen erhält. Sie sind wegen ihrer geometrischen Darstellung sehr nützlich [27, S. 56].

$$\mathbf{a}_1 \cdot \Delta\mathbf{k} = 2\pi\nu_1 \quad ; \quad \mathbf{a}_2 \cdot \Delta\mathbf{k} = 2\pi\nu_2 \quad ; \quad \mathbf{a}_3 \cdot \Delta\mathbf{k} = 2\pi\nu_3 \quad (2.17)$$

Die erste Gleichung $\mathbf{a}_1 \cdot \Delta\mathbf{k} = 2\pi\nu_1$ sagt aus, dass $\Delta\mathbf{k}$ auf einem bestimmten Kegelmantel um die Richtung \mathbf{a}_1 liegt, für die zweite und dritte Gleichungen gilt dies entsprechend. Deshalb muss $\Delta\mathbf{k}$ bei einer Reflexion alle drei Gleichungen erfüllen, es muss in der gemeinsamen Schnittlinie dreier Kegelmäntel liegen, das ist eine scharfe Bedingung, die nur durch systematische Ablenkung oder durch Veränderung der Wellenlänge oder Kristallorientierung erfüllt werden kann [27, S. 57].

Wenn die Beugungsbedingung $\Delta\mathbf{k} = \mathbf{G}$ erfüllt ist, kann die Streuamplitude F für einen Kristall mit N Zellen bestimmt werden.

$$F_{\mathbf{G}} = N \int_{cell} dV n(\mathbf{r}) \exp(-i\mathbf{G} \cdot \mathbf{r}) = N S_{\mathbf{G}} \quad (2.18)$$

Die Größe S_G wird Strukturfaktor genannt und ist definiert als das Integral über eine einzelne Zelle, in der der Punkt $\mathbf{r} = 0$ ein Eckpunkt ist. $n(\mathbf{r})$ ist die Elektronenkonzentration in der Zelle [27, S. 65].

Die Streuamplitude in der Richtung $\Delta \mathbf{k} = \mathbf{k}' - \mathbf{k} = \mathbf{G}$ ist proportional zum geometrischen Strukturfaktor [27, S. 72] :

$$S_G \equiv \sum f_j \exp(-i\mathbf{r}_j \cdot \mathbf{G}) = \sum f_j \exp[-i2\pi(x_j\nu_1 + y_j\nu_2 + z_j\nu_3)] \quad (2.19)$$

wobei sich die Summation über alle Atome der Basis erstreckt, und f_j der Atomfaktor des j -ten Atoms in der Basis ist. Der Ausdruck auf der rechten Seite steht für einen $(\nu_1\nu_2\nu_3)$ Reflex, für den gilt: $\mathbf{G} = \nu_1\mathbf{b}_1 + \nu_2\mathbf{b}_2 + \nu_3\mathbf{b}_3$. Der Atomfaktor f_j ist ein Maß für die Streukraft des j -ten Atoms in der Einheitszelle. In den Wert von f_j geht sowohl die Zahl und Verteilung der atomaren Elektronen ein, als auch die Wellenlänge und der Streuwinkel der Strahlung [27, S. 68].

$$f_j = \int dV n_j(\mathbf{r}) \exp(-i\mathbf{G} \cdot \mathbf{r}) \quad (2.20)$$

Es ist oft von Vorteil die Elektronenkonzentration $n(\mathbf{r})$ in der Zelle als eine Überlagerung der Funktionen n_j zu schreiben, die die Elektronenkonzentration bezüglich des Atoms j in der Zelle angeben.

Die von einem einzelnen Atom gestreute Strahlung trägt den innerhalb des Atoms auftretenden Interferenzeffekten Rechnung. In Gleichung 2.20 ist der Formfaktor definiert worden, wobei sich das Integral über die Elektronenkonzentration erstreckt, die zu einem Atom gehört. Der Winkel zwischen \mathbf{r} und \mathbf{G} sei α ; dann gilt $\mathbf{r} \times \mathbf{G} = Gr \cos\alpha$. Ist die Elektronenverteilung kugelsymmetrisch zum Ursprung, dann ist.

$$f_j = 2\pi \int dr r^2 d(\cos\alpha) n_j(\mathbf{r}) \exp(-i\mathbf{G}\mathbf{r} \cos\alpha) = 2\pi \int dr r^2 n_j(\mathbf{r}) \cdot \frac{e^{iGr} - e^{-iGr}}{i\mathbf{G}\mathbf{r}} \quad (2.21)$$

nach der Integration über $d(\cos\alpha)$ von -1 bis 1. ist der Formfaktor gegeben durch

$$f_j = 4\pi \int dr n_j r r^2 \frac{\sin Gr}{\mathbf{G}\mathbf{r}} \quad (2.22)$$

Wäre die gleiche gesamte Elektronendichte am Ort $\mathbf{r} = 0$ konzentriert, würde $Gr = 0$ zum Integrand beitragen. In diesem Grenzfall gilt $(\sin Gr)/Gr = 1$, und

$$f_j = 4\pi \int dr n_j r r^2 = Z \quad (2.23)$$

ist die Zahl der atomaren Elektronen. Deshalb gibt f das Verhältnis der Strahlungsamplitude an, die von der tatsächlichen Elektronenverteilung im Atom gestreut wird, zur Strahlungsamplitude, die von einem einzelnen, punktförmigen Elektron gestreut wird.

2.3.1 Bestimmung der Kristallausrichtung

Mittels der kurzen Wellenlänge der Röntgenstrahlung (in der Größenordnung der Kristallnetzebenenabstände) ist es möglich Informationen zur Kristallanordnung und Kristallorientierung zu erhalten. Je nach Kristallisationsbedingungen können sich dabei

große Kristallbereiche völlig gleichartig anordnen. Bei einigen Kristallarten ist der Habitus (das Größenverhältnis der einzelnen Flächen eines Kristalls zueinander) im Einklang mit dem Kristallgitter, d. h. anhand der äußeren Form des Kristalls kann auf die Kristallorientierung einer bestimmten Fläche geschlossen werden [3, S. 435]. Kristalline Werkstoffe und der Realkristall sind fehlerbehaftet und weichen vom Idealkristall ab. Die Netzebenenormalen der Kristallite bei Polykristallen sind regellos im Raum verteilt. Dem Einkristall sind aber auch Abweichungen von der Idealform bzw. -ausbildung der Netzebenen eigen [3, S. 435].

Zur Vermessung der Kristallorientierung bezüglich der Oberflächennormalen kann das $\Theta/2\Theta$ -Verfahren (Abbildung 2.3) verwendet werden. Die Probe bzw. der Kristall wird bei diesem Verfahren um einen Winkel Θ gegen die Strahlrichtung gedreht und der Detektor wird durch doppelte Winkelgeschwindigkeit ständig auf den Winkel 2Θ eingestellt. Man bekommt ein Diffraktogramm, in dem die gemessene Intensität als Funktion von Θ dargestellt wird. Dort, wo Maxima entstehen, ist die Bragg-Bedingung erfüllt und die Gitterkonstante ist direkt berechenbar. Die dreidimensionale Formel 2.24, die analog zum Satz des Pythagoras ist, gibt uns den Netzebenenabstand d_{hkl} [29, S. 19]:

$$d_{hkl} = \frac{a}{\sqrt{h^2 + k^2 + l^2}} \quad (2.24)$$

Diese Gleichung ist ein Spezialfall, der nur bei einem kubischen Gitter gilt, wobei a die Gitterkonstante des Kristalls und hkl die Netzebenen indizes sind. Hier ist noch zu beachten, dass ein Reflex an mehreren Netzebenen entstanden sein kann.

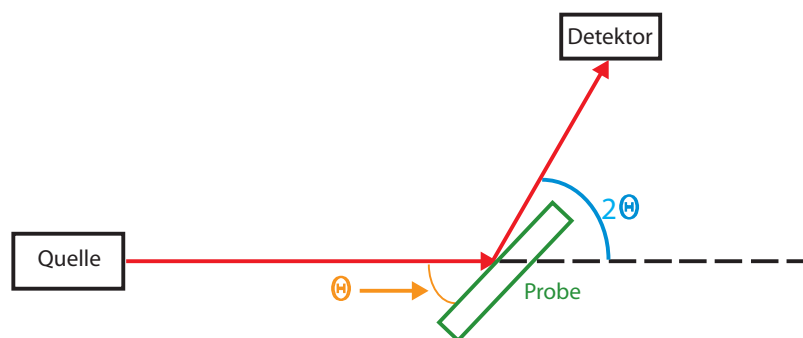


Abbildung 2.3: Skizze der Geometrie des $\Theta/2\Theta$ -Verfahrens

2.3.2 Bestimmung der lateralen Kristallgröße

Zur Bestimmung der lateralen Größe der Kristalle kann das Rocking-Kurve-Verfahren verwendet werden. Bei diesem Verfahren, das in Abbildung 2.4 schematisch skizziert ist, handelt es sich um eine asymmetrische Beugungsuntersuchung. Die Probe (der Kristall) wird von der Detektorbewegung entkoppelt. Sie wird in einem Intervall $\Delta\Theta$ um den festen Bragg-Winkel Θ gedreht, während der Detektor auf den Winkel 2Θ fixiert

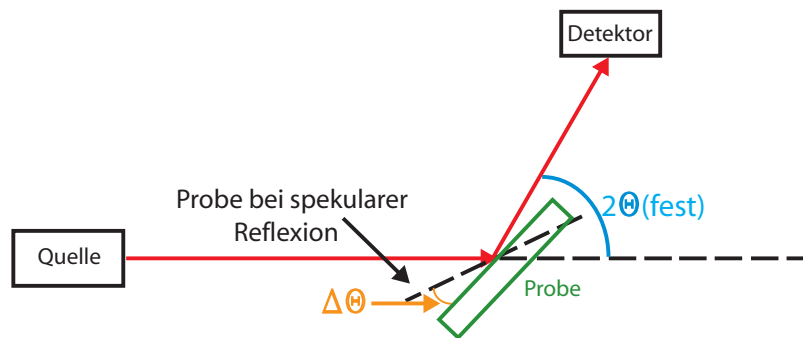


Abbildung 2.4: Skizze der Geometrie des Rocking-Kurve-Verfahrens

ist [3, S. 282].

Die Intensität und Halbwertsbreite dieser Kurve ist für Gleichmäßigkeit der Netzebenenorientierung senkrecht zur Probenoberfläche maßgebend [3, S. 282]. Mittels einer Rocking-Kurve und der Breite eines Beugungsreflexes (FWHM) lässt sich die kristalline Qualität des untersuchten Materials beschreiben. Rocking-Kurven werden meistens zur Beschreibung der Einkristallperfektion bzw. zur Bestimmung der Fehlorientierung der Netzebenen des Einkristalls zur Oberfläche benutzt [3, S. 282].

Man bekommt ein Diffraktogramm, in dem die Röntgenstrahlungsintensität in Abhängigkeit des Winkels aufgezeichnet wird. Dies wird als Rocking-Kurve bezeichnet. Die laterale Größe der Kristalle, die die gleiche Ausrichtung haben, wird durch die Halbwertsbreite der Kurve bestimmt. Mit Hilfe der Formel 2.25 bekommt man eine quantitative Aussage über die Kristallgröße [30] [29, S. 20]:

$$FWHM = \frac{\lambda}{2,25 \times L \times \sin \theta} \quad (2.25)$$

wobei λ die Wellenlänge der Röntgenstrahlung, (für CuK_α ist $\lambda = 0,154 \text{ nm}$) L die laterale Kristallgröße, θ der Winkel zur Orientierungsebene und $FWHM$ die Halbwertsbreite (Full Width at Half Maximum) ist [31, S. 115].

Die Halbwertsbreite wird mit dem Datenanalyse-Programm *Origin* aus der Standardabweichung einer Gaußkurve bestimmt, da diese aus der Theorie zu erwarten ist und sich sehr gut an die gemessenen Werte anpassen lässt.

Die laterale Größe ergibt sich dann aus der Gleichung 2.26, durch umstellen der Gleichung 2.25 erhalten wird:

$$L = \frac{\lambda}{2,25 \times FWHM \times \sin \theta} \quad (2.26)$$

2.4 Molekularstrahlepitaxie (MBE)

Die Molekularstrahlepitaxie ist eine vielseitige Technik zur Herstellung von dünnen epitaktischen Schichten aus Halbleitern, Metallen oder Isolatoren [32, S. 1]. Epitaktisch bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die Kristallstruktur der aufwachsenden Schicht

sich der des Substrates anpasst. Dabei werden die Stoffe, aus denen die Schicht bestehen soll, aus Effusionszellen verdampft und als gerichtete Molekülstrahlen auf ein Substrat deponiert. Die MBE-Technik setzt ein Ultrahochvakuum (UHV) voraus um Verunreinigungen durch Restgasatome auf ein Minimum zu beschränken. Um ein epitaktisches Schichtwachstum zu ermöglichen, ist es notwendig, dass die physikalischen Eigenschaften, insbesondere die Gitterparameter des Substrates und der deponierten Schicht nicht zu stark voneinander abweichen. Wenn sich die Gitterparameter stärker unterscheiden, kommt es zu Verspannungen in der aufgewachsenen Schicht. Bei noch größerer Verschiedenheit der Gitterparameter bilden sich Versetzungen (Defekte) in der aufgewachsenen Schicht [33, S. 215]. Auch lassen sich Atome in einer Schicht anders anordnen, als sie das von selbst tun. Die Schichten übernehmen dann sozusagen die Struktur des Substrats, auf das sie aufgedampft werden. Um ein möglichst homogenes Kristallwachstum zu erreichen, kann die Probe während der Herstellung rotiert und beheizt werden. Typische Wachstumsraten liegen bei 1-2 Ångström pro Sekunde.

MBE ist eine Untergruppe der PVD (Physical Vapor Deposition). Heute gibt es erhebliche Kenntnisse über das epitaktische Wachstum im Vakuum aufgedampfter Metalle auf Salz-Substraten [34] [35], und die Struktur und Orientierung der dünnen Filmen von diesen Metallen, insbesondere Gold, sind relativ gut bekannt [36] [37] [38].

2.5 Die Dynamical X-Ray Tracking Technik

Eine japanische Arbeitsgruppe hat ein Röntgenbeugungsverfahren entwickelt [8]. Mit diesem Verfahren kann die Untersuchung an Struktur- bzw. Konformationsänderungen von Proteinen im pm-Bereich bei einer Zeitauflösung von einigen Millisekunden ermöglicht werden [39] [40]. Diese neue Messtechnik wird Dynamical X-Ray Tracking (DXT) genannt (siehe Abbildungen 2.5 und 2.6).

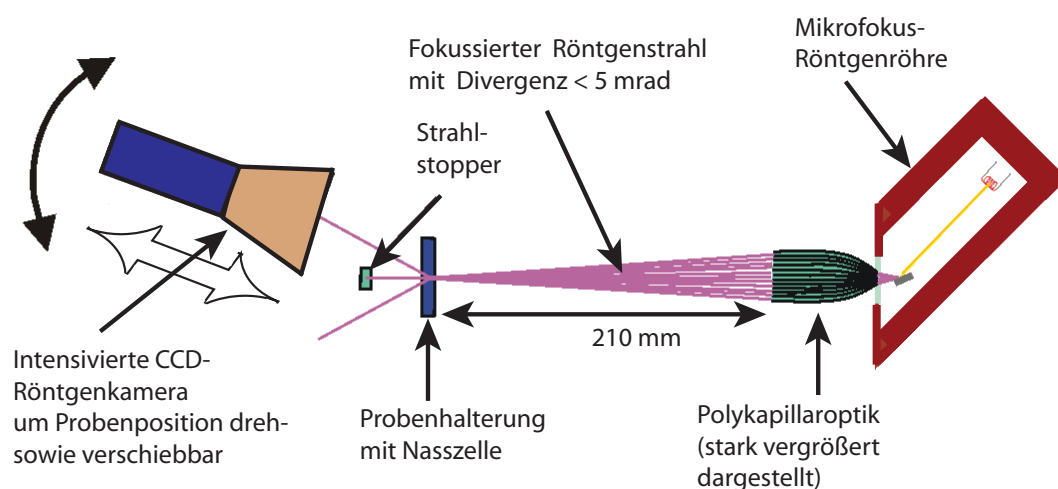


Abbildung 2.5: Prinzip des DXT-Laborsystems

Bei diesem Verfahren werden ca. 15 nm große Röntgenspiegel gezielt an bestimmte Bindungsstellen einzelner Proteinmoleküle geheftet, z. B. redoxaktive 2-Cystein Peroxiredoxin A (2-CP), die auf einer Oberfläche immobilisiert oder in eine Membranmimik eingebettet sein sollen. Hierbei werden Orientierungsänderungen (Drehung, Kippung) des Moleküls (keine translatorischen Bewegungen) zeitaufgelöst detektiert, beispielweise in Folge von Konformationsänderungen, als Änderungen in Reflexionswinkel [41] [42] [43].

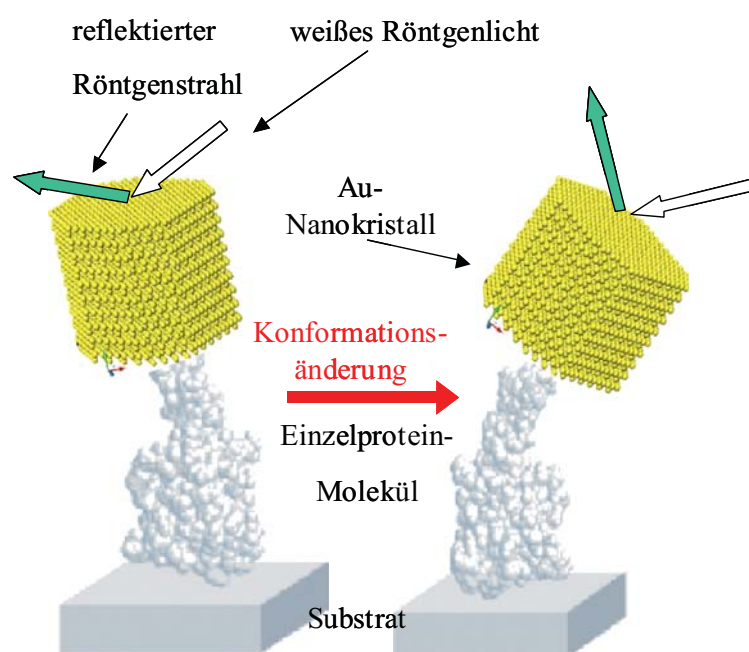


Abbildung 2.6: Prinzip des Dynamical X-Ray Trackings einer Einzelmoleküldynamik mittels eines nanokristallinen Labels

Die Technik ist geeignet, um langsame Molekularbewegungen von Einzelmolekülen in Flüssigkeitsumgebung zu studieren. So wurde die Bewegung einzelner kurzkettiger und langkettiger DNA-Moleküle in Flüssigkeit zeitaufgelöst untersucht [8], an einem Ende an ein Substrat gebunden und an einem anderen Ende an Nanokristallen gelabelt (siehe Abbildung 2.6) [9].

Das weiße Röntgenlicht erzeugt vom Nanokristall ein Lauebild, dabei wird ein einzelnes Molekül gekennzeichnet und ein Teil der Beugung wird detektiert [44].

Weitere Experimente wurden von der gleichen Arbeitsgruppe zu lichtinduzierten Konformationsänderungen in genetisch modifizierten Bacteriorhodopsin-Einzelmolekülen, die mit Au-Nanokristallen gelabelt wurden, durchgeführt [45]. Die Gruppe hat auch über methodische Experimente zu Herstellung und Charakterisierung von künstlichen Mo/Si Nanospiegeln mit Größen von 30-40 nm zur Anwendung als Label für DXT berichtet [46].

2.6 Rasterkraftmikroskopie

Die Rasterkraftmikroskopie wird als Verfahren zur Charakterisierung von topographischen, elektronischen und magnetischen Materialoberflächen [47][48][49] mit atomarer Auflösung genutzt [50, S. 699].

Die Oberflächenphysik machte große Fortschritte, nachdem Binnig und Rohrer Anfang der achtziger Jahre des 20. Jh. das Rastertunnelmikroskop (Scanning Tunneling Microscope, abgekürzt STM) entwickelt haben [51][52]. Diese Entwicklung machte es möglich, Oberflächenstrukturen, einschließlich nicht periodischer Strukturen im Realraum direkt zu bestimmen [53]. Danach wurde eine ganze Reihe verschiedener Mikroskope entwickelt, die die Strukturierung der Oberflächenphysik im Nanometerbereich noch präziser messen können. Dazu gehören das Wärmestrahlungsmikroskop (SThM) [54], das Magnetkraftmikroskop (MFM)[55], das optische Rasternahfeldmikroskop (SNOM) [47] und das Rasterkraftmikroskop (AFM) [56].

Der Einsatz des AFM bringt entscheidende Vorteile gegenüber dem STM mit sich. Es kann zur Charakterisierung von Oberflächen leitender als auch nichtleitender Materialien in Luft [57], unter UHV-Bedingungen [58] sowie in Flüssigkeiten [59] verwendet werden, wobei die Tunnelmikroskopie nur auf leitfähige Proben beschränkt ist.

Bei der Rasterkraftmikroskopie nutzt man die Wechselwirkung zwischen einer Messspitze, die an einem Cantilever (Blattfeder) befestigt ist, und der Oberfläche der zu untersuchenden Probe. Die Van-der-Waals-Wechselwirkungen, die magnetischen und die elektrostatischen Kräfte spielen eine Rolle bei größeren Abständen ($d \approx 10$ nm)[60], wobei die Van-der-Waals-Kräfte bei einer kontaminationsfreien, ungeladenen und nicht magnetischen Probe dominieren. Dies betrifft die Dispersionskräfte (Wechselwirkung zwischen zwei induzierten Dipolen), die Orientierungskräfte (Wechselwirkung zwischen zwei permanenten Dipolen), und die Induktionskräfte (Wechselwirkung zwischen permanenten und induzierten Dipolen). Die Ersten werden auch Londonsche Dispersionskräfte genannt, sie sind anziehend und fallen proportional zu d^{-6} ab [27, S. 86]. Die quantenmechanischen Austauschwechselwirkungen sowie die Coulombkraft und die Pauliabstoßkräfte überwiegen bei kleineren Abständen d im Bereich von einigen Zehntelnanometer zwischen den Atomrümpfen von Spitze und Probe.

In Abbildung 2.7 sind die wirkenden Kräfte zwischen Spitze und Probe als Funktion des Abstands schematisch dargestellt. Mit dem Rasterkraftmikroskop lassen sich diese Kräfte in zwei Betriebsarten detektieren. Im *contact mode* (statischer Modus), ist die Messspitze ständig im Kontakt mit der Oberfläche der Probe [61]. Die Kraftmessung erfolgt über den Nachweis der Auslenkung des Cantilevers. In diesem statischen Modus treten zusätzlich noch lateral wirkende Reibungskräfte auf, die mit Adhäsionskräften und chemischen Kräften verknüpft sind [62]. Im dynamischen Modus (*non contact mode*) wird die Probenoberfläche nicht berührt, im *tapping mode* (*intermittent mode*) nur ganz kurz. Bei diesen Methoden wird eine Kraftgradientenmessung vorgenommen, die über eine Frequenzverschiebung, eine Phasenverschiebung oder eine veränderte Schwingungsamplitude eines nahe der Resonanzfrequenz angeregten Cantilever-Spitze-Systems detektiert wird [63].

Die Kraft-Abstandskurve in Abbildung 2.7 zeigt auch die speziellen Bereiche, mit denen jeder dieser drei Modi korrespondiert. In dem repulsiven Bereich arbeitet der

contact mode und in dem abnehmend attraktiven Bereich arbeitet der *non contact mode*. Der *tapping mode* erstreckt sich über einen größeren Bereich mit repulsiven und attraktiven Anteilen [64, S. 26].

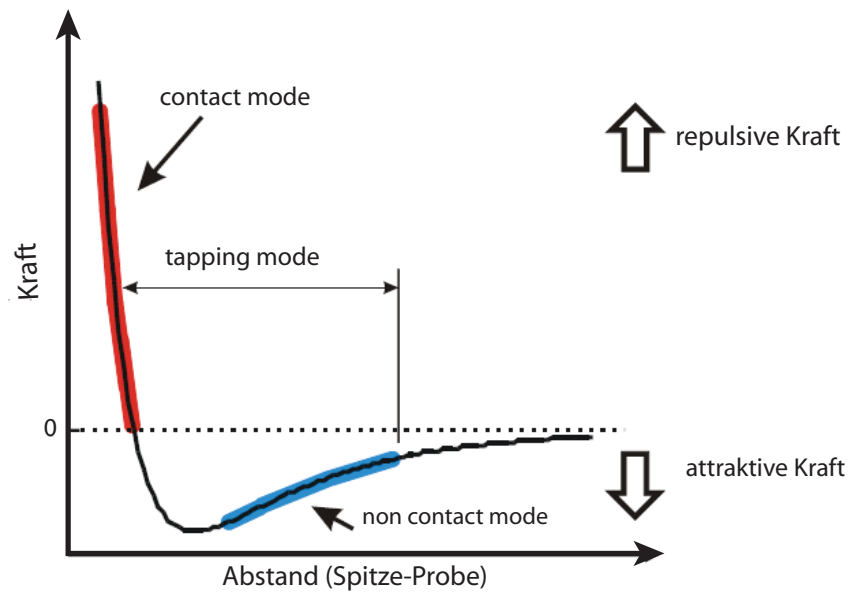


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der Kraft-Abstandkurve beim AFM [64, S. 26].

Da die Messungen, die in den Kapiteln 7 und 8 beschrieben werden, nur mit dem statischen Modus erfolgt sind, wird dieser Modus hier genauer beschrieben. Danach folgt nur eine sehr kurze Beschreibung des dynamischen Modus.

Statischer Modus: Im statischen Modus wird eine Spitze, die an einem Cantilever angebracht ist, mit der Probenoberfläche in Kontakt gebracht. Die Kraft wird auf quasi-statischem Weg bestimmt. Die Probe wird in x- und y-Richtung abgerastert. Die Spitze wird über ein definiertes Feld geführt. Die Daten über die Verbiegung und über die Verdrillung des Cantilevers werden beim Abrastern bestimmt, indem ein Reflex eines reflektierten Laserstrahls an der Rückseite des Cantilevers mittels einer Quadrantendiode detektiert wird.

Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Verbiegung des Cantilevers und der auf ihn wirkenden Normalkraft (Kraft senkrecht zur Oberfläche), wobei die Federkonstante des Cantilevers der Proportionalitätsfaktor ist. Ein Soll-Wert wird mit diesem Wert verglichen. Wenn beide Werte voneinander abweichen, wird ein Signal zur Steuerung des z-Piezos und zur Wiederherstellung der Soll-Verbiegung bzw. Soll-Kraft geliefert. Die Verknüpfung des Steuersignals des z-Piezos mit der x- y-Position während des Abrasterns wird aufgezeichnet und zum Aufbau eines Topografiebildes genutzt. Der prinzipielle Aufbau eines im *contact mode* arbeitenden AFMs wird in Abbildung

2.8 dargestellt.

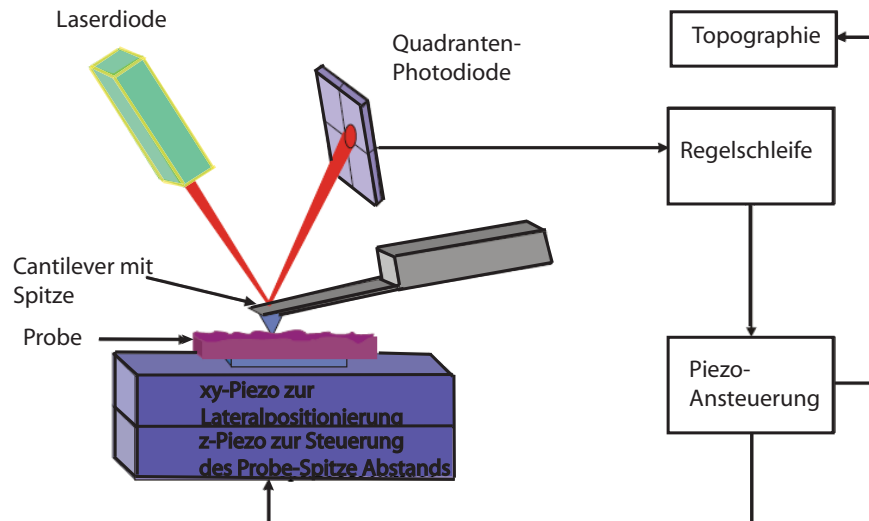


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines im statischen Modus arbeitenden AFMs [64, S. 27].

Die abstoßende Kraft, die zwischen Spitze und Probe wirkt, zeigt folgende Abstandsabhängigkeit [65, S. 191-249]:

$$F = k\sqrt{Rd^3} \quad (2.27)$$

wobei R der Radius des Kontaktbereiches, d der Abstand zwischen Spitze und Probe und k das effektive Elastizitätsmodul ist.

Die Formel 2.28 gibt den Winkel der Verdrillung (Torisonwinkel) des Cantilevers an. Diese Verdrillung wird durch parallel zur Oberfläche wirkende Kräfte hervorgerufen.

$$\Theta(F_l, x) = F_l \times \frac{3 Hx}{GWT^3} \quad (2.28)$$

wobei Θ der Torisonwinkel, F_l die Lateralkraft, H die Höhe der Spitze, W und T die Breite sowie die Dicke des Cantilevers, G Schermodul und x die Position längs des Cantilevers ist, an der der Winkel gemessen wird [66].

Die Kräfte, die auf einen Cantilever wirken, werden heutzutage durch theoretische Modelle in allen drei Raumrichtungen berücksichtigt [67] [68]. Bei dieser Abbildungsmethode sind sowohl das laterale als auch das vertikale Auflösungsvermögen sehr hoch [69] und reichen in den atomaren Bereich [70] [71]. Die Gruppe von Binnig berichtet, dass die monoatomaren Stufen bei zunehmender Kraft verschwinden und eine perfekt geordnete Oberfläche zurückbleibt [72].

Dynamischer Modus: Die Probe wird an der Spitze angenähert, dabei wirkt eine zusätzliche Kraft neben der Rückstellkraft des Federbalkens [73].

Beim niedrigen Temperaturen ist es mittels im *non contact mode* arbeitende AFMs gelungen eine reale atomare Auflösung zu erreichen [74] [75] [76].

Der MAC Modus ist eine Weiterentwicklung des im dynamischen Modus arbeitenden AFM. In diesem Modus wird ein magnetisch beschichteter Cantilever direkt durch ein alternierend magnetisches Feld angeregt. Dies führt zu einer deutlichen Erhöhung der Auflösung in Flüssigkeiten [77].

2.7 2-Cystein Peroxiredoxin (2-CP)

In diesem Abschnitt wird das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Protein beschrieben. Die Exprimierung dieses Protein fand in der AG von Prof. Dietz (Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld) statt.

Proteine sind in den meisten Zellen die am häufigsten vorkommenden Makromoleküle. Die Strukturproteine sind für Form und Stabilität der Zellen und Gewebe verantwortlich [78, S. 85-86]. Peroxiredoxine bilden eine überall vorkommende Familie von Peroxidasen (oxidierte Enzyme [78, S. 147] mit einer molaren Masse von 17 - 25 kDa (Dalton) [10], die geringe Sequenzhomologien zu den bisher bekannten antioxidativen Enzymen wie Katalase (Name des Enzym [78, S. 147]) [79]. Das Charakteristikum aller Peroxiredoxine (Prxe) ist die Reduktion von Hydroperoxiden (eine Klasse organisch-chemischer Verbindungen mit der allgemeinen Strukturformel R-O-OH, wobei R ein kohlenstoffhaltiger Rest ist [80]) wobei Thiole (zwei verschiedene Stoffgruppen der Organischen Chemie wie Ethanthiol [78, S. 70]) umgesetzt werden. In Pflanzen ist das 2-Cystein Peroxiredoxin ein im Kern kodiertes Protein, das mit Hilfe einer Signalsequenz in die Chloroplasten (Organellen der Zellen von Grünalgen und höheren Pflanzen, die Photosynthese betreiben [80]) importiert wird [81]. wo es eine Funktion in den antioxidativen Schutzmechanismen besitzt [10, S. 4]. Es existieren zwei unterschiedliche 2-Cystein Peroxiredoxine. Das 2-Cystein Peroxiredoxin A besteht aus 265 Aminosäuren. Das 2-Cystein Peroxiredoxin B besteht aus 271 Aminosäuren [10, S. 4]. In dieser Arbeit wurde das 2-Cystein Peroxiredoxin A untersucht. Dieses Protein ist an den antioxidativen Schutzmechanismen von *Arabidopsis thaliana* (als Modellorganismus in der Biologie [80]) beteiligt. Die Notwendigkeit der Schutzmechanismen liegt in der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) im Stoffwechsel der Pflanze wie Wasserstoffperoxid H_2O_2 , Hydroxylradikal (OH) und in dem Superoxidanion O_2^- [10, S. 1]. Die ROS-Konzentration kann in den Chloroplasten ansteigen, wenn sie nicht durch die antioxidativen Schutzsysteme entgiftet, führt dies zu erheblichen Schädigungen in den Zellen [82]. Die Entgiftung und Metabolisierung von ROS erfolgt durch die antioxidativen Schutzsysteme, die zum einen aus nicht-enzymatischen Verbindungen und zum anderen aus enzymatischen Systemen. Im Allgemeinen kann die Entgiftungs-Reaktion von 2-CP mit einem Hydroperoxid erfolgen [10, S. 1-5]. Die Erzeugung spezifischer Bindungsstellen für die Nanokristalle an 2-CP erfolgte durch das Einbringen von exponierten Cysteinyln-Resten als Thiolanker in das 2-CP durch ortsgerichtete Mutagenese (Erzeugung von Mutationen, eine Veränderung des Erbgutes eines Organismus [78, S. 379]) und heterologe Expression (Realisieren der Information, die in der DNA eines Gens gespeichert ist [80]) [83]. Die Auswahl der auszutauschenden Aminosäuren wurde nach Vergleich der Röntgenstrukturen und Aminosäuresequenzen des 2-CP aus verschiedenen Organismen vorgenommen, um eine

optimale Ausrichtung der Cysteinylgruppen sowohl im Monomer als auch im Dekamer zu gewährleisten, ohne funktionell konservierte Aminosäuren zu verändern. Ausgewählt wurden die Aminosäuren (Lys11), (His105), (Lys174) [83], die jeweils gegen eine Cysteinylgruppe ausgetauscht wurden (siehe Abbildung 2.9). 2-Cystein Peroxredoxine kommen in allen Organismen vor [84].

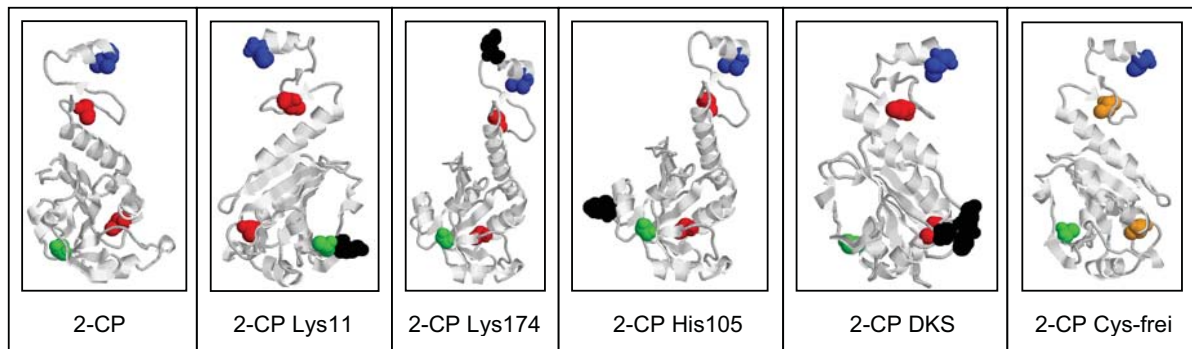


Abbildung 2.9: Monomere Struktur des pflanzlichen 2-CP aus *A. thaliana* mit Markierung der zur Variation ausgewählten Aminosäuren.

Die konservierten Cysteine wurden rot, der N-Terminus wurde grün und der C-Terminus blau dargestellt. Zusätzlich exponierte Cysteine (schwarz) wurden mittels ortsgerichteter Mutagenese eingeführt. In der Cys-freien Variante wurden alle Cysteine gegen Serine (orange) ausgetauscht [83, S. 3]

Darüber hinaus wurde eine Variante erzeugt, die drei Cysteinylgruppen zur stärkeren Fixierung des Nanokristalls trägt (Asp89-Lys91-Ser92; DKS), und eine weitere, in der alle vorhandenen Cysteine gegen Serine ausgetauscht wurden (Cys-frei).

Abbildung 2.9 zeigt die monomere Struktur des pflanzlichen 2-CP aus *A. thaliana*. Abbildung 2.10 zeigt die dekamere Form aus *Crithidia fasciculatum* mit der Markierung der zur Mutagenese ausgewählten Aminosäuren.

Die Funktionalität der 2-CP-Varianten hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Peroxide zu entgiften, wird anhand der Peroxidase-Aktivität mit Hilfe des DTT-abhängigen (Dithiothreitol, eine chemische Verbindung) Xylenol-Orange-Assays bestimmt. Hierbei bildet der Farbstoff *o*-Kresolsulfonphtalein-3'-3''-bis-methylimidodiessigsäure (Xylenol-Prange) mit durch Peroxide oxidierten Fe^{3+} einen Farbkomplex, der bei 560 nm photometrisch bestimmt werden kann. Mit abnehmender Peroxid-Konzentration infolge der Reduktion durch 2-CP, fällt die Absorption der Röntgenstrahlung ab. Das durch die Peroxid-Reduktion oxidierte 2-CP wird durch DTT regeneriert (Abbildung 2.11) [83, S. 368].

Um die Funktionalität der Varianten Lys11, His 105, Lys174 und DKS zu überprüfen, wird die Aktivität der heterolog exprimierten Proteine in einem *in vitro*-Assay überprüft. Dieser Assay beruht auf der Reduktion von Peroxiden (in diesem Fall H_2O_2) zu Wasser und dem korrespondierenden Alkohol durch 2-CP, das seinerseits durch das NADPH-abhängige System aus Thioredoxin (Trx) und Thioredoxinreduktase (TR) regeneriert und somit wieder in den reduzierten aktiven Zustand versetzt wird (Abb.

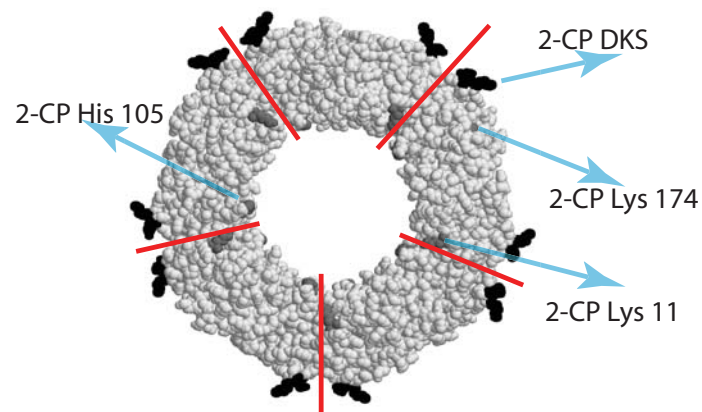


Abbildung 2.10: Struktur des dekameren 2-CP aus *Crithidia fasciculatum*. Markierte Aminosäuren entsprechen den ausgetauschten Aminosäuren in den Varianten Lys11, His105, Lys174 und DKS. Die fünf Dimere, die das Dekamer formen, sind durch eine rote Markierung getrennt [83, S. 3].

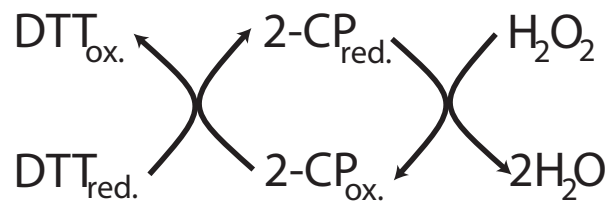


Abbildung 2.11: Reaktion und Regeneration des 2-CP. Das 2-CP reduziert H_2O_2 zu Wasser, wird selbst oxidiert und durch Reduktion durch DTT regeneriert (red: reduziert, ox: oxidiert)

2.12). Die Peroxidase-Aktivität des 2-CP kann über die Oxidation des NADPH und die damit verbundene Absorptionsabnahme bei 340 nm verfolgt werden. Allerdings war bei keiner Variante eine Peroxidase-Aktivität messbar [83, S. 369].

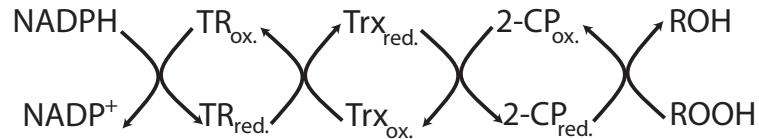


Abbildung 2.12: Reaktion und Regeneration des 2-CP im NADPH-abhängigen System (Trx: Thioredoxin, TR: Thioredoxinreduktase, red: reduziert, ox: oxidiert; NADP: Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, ist ein Hydridionen (Zwei-Elektronen/Ein-Proton) übertragendes Koenzym, das an zahlreichen Redoxreaktionen des Stoffwechsels der Zelle beteiligt ist.)

Kapitel 3

Geräte zur Präparation und Charakterisierung der Au-Nanokristalle

In diesem Kapitel werden die Messapparaturen bzw. die Geräte, mit denen die Au-Kristalle präpariert und charakterisiert wurden, vorgestellt. Die Nanogoldkristalle wurden mit der im Rahmen dieser Arbeit aufgebauten MBE-Apparatur hergestellt, die Mikrogoldkristalle mit einer Sputteranlage sowie mit Hilfe eines 3-Zonen-Ofens präpariert. Die Charakterisierung der Nano- und Mikrogoldkristalle erfolgte mit Hilfe verschiedener Geräte und Messapparaturen wie Lichtmikroskop, Röntgendiffraktometer, Rasterkraftmikroskop, Transmissionselektronenmikroskop sowie Rasterelektronenmikroskop.

3.1 MBE-Apparatur

Im Folgenden wird die im Rahmen dieser Arbeit aufgebaute Apparatur zur Präparation von Au-Nanokristallen mittels MBE beschrieben.

Abbildung 3.1 zeigt die schematische Darstellung dieser Apparatur. Sie besteht aus einer Hauptkammer und einer Schleusenkammer, die über ein Ventil miteinander verbunden sind.

In der Schleusenkammer ist zusätzlich eine Kristallspalteinrichtung untergebracht, die es ermöglicht, die zu bedampfenden NaCl-Substrate zu spalten um eine möglichst von Verunreinigungen freie Oberfläche zu bekommen. Ein Transfersystem ermöglicht es anschließend die so präparierten Substrate in die Hauptkammer ohne Bruch des Vakuums zu verbringen. In Abbildung 3.2 ist ein Foto des Innenraums der Schleuse-Kristallspaltkammer dargestellt.

Die Hauptkammer, in der die Deposition des Goldes auf dem NaCl-Substrate stattfindet ist in Abbildung 3.3. Im unteren Bereich der Hauptkammer befindet sich die Effusionszelle. Das Gold (Au 99,99% , Lieferant G-Material [85]) wird aus einem Mo-

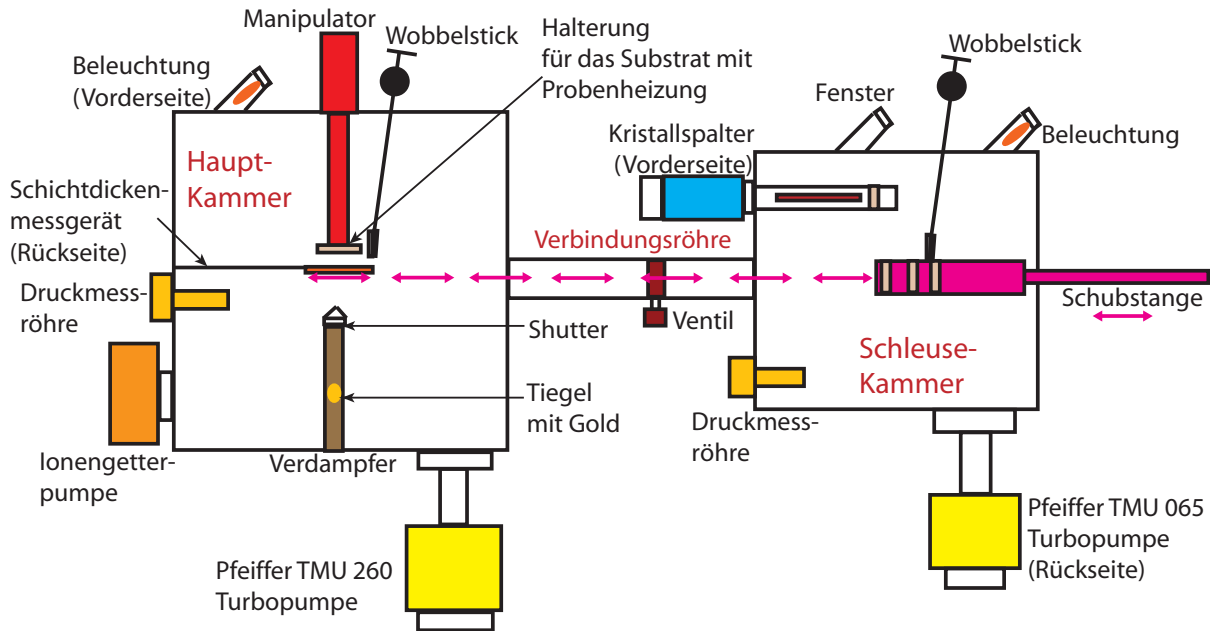


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Aufdampfanlage (nicht Maßstabgerecht).

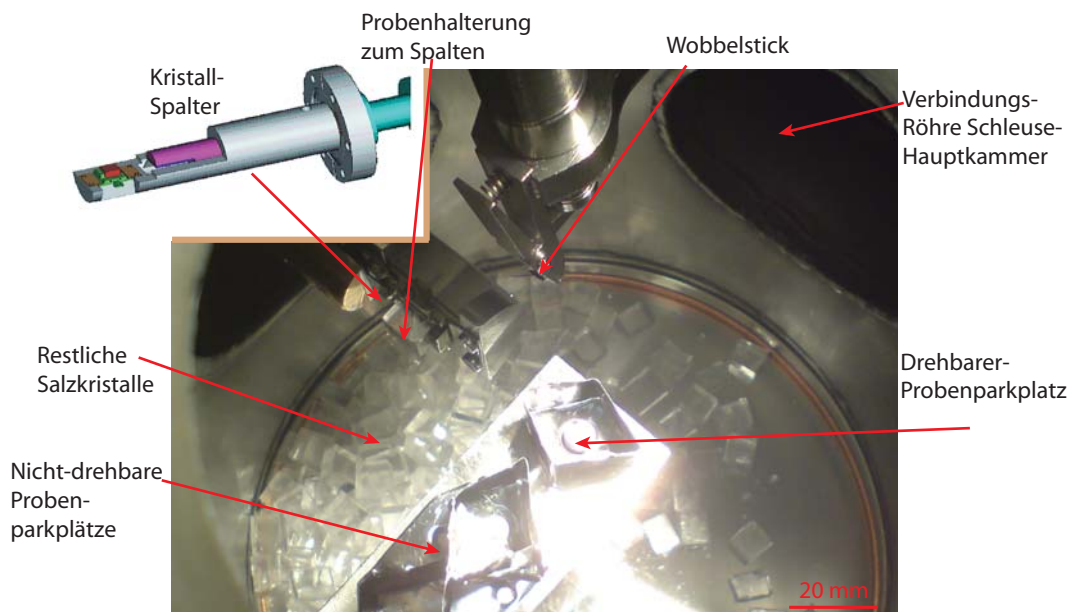


Abbildung 3.2: Foto der Schleusenkammer, wobei die Kristallspalteinrichtung, der Wobbelstick sowie das Probenmagazin zu erkennen sind.

Tiegel verdampft, der mittels einer Elektronenstoßheizung beheizt wird. Dazu ist ein Ringfilament aus Wolfram oberhalb des Tiegels angebracht. Die aus dem Filament austretenden thermischen Elektronen werden im elektrischen Feld zwischen Filament und Tiegel (typischerweise wurde eine Spannung von 700 v zwischen Filament und Tiegel angelegt) beschleunigt. Auf dem oberen Ende des Verdampfers befindet sich eine

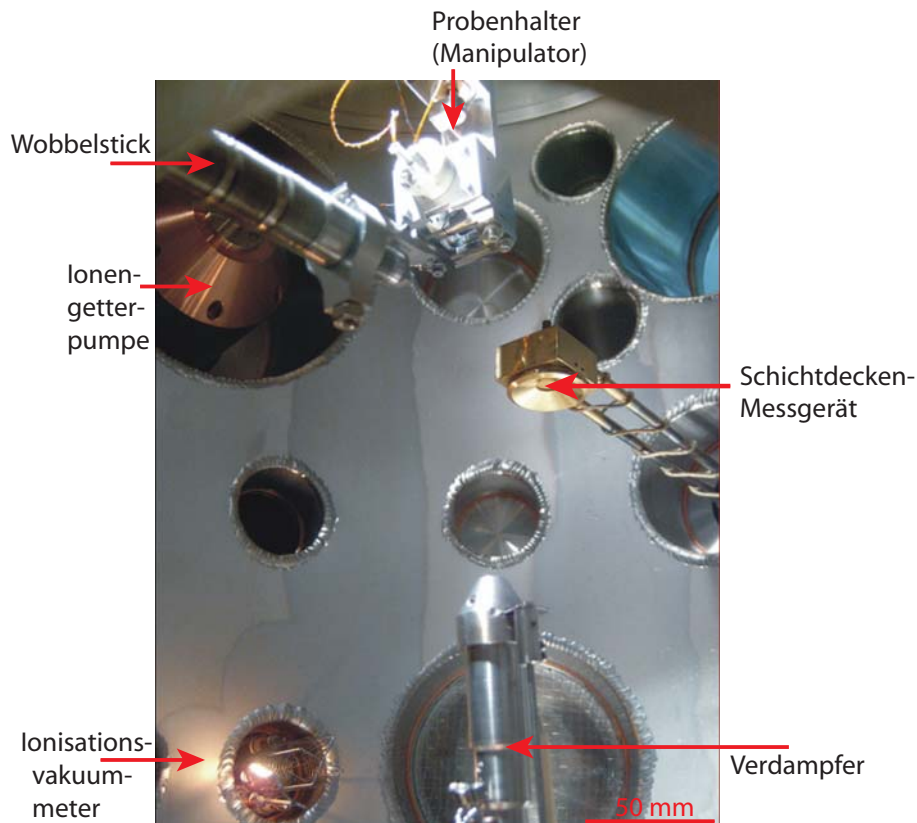


Abbildung 3.3: Foto der Aufdampfkammer, in der der Verdampfer, der Probenhalter und das Schichtdickenmessgerät zu sehen sind

schmale Öffnung mit einem Shutter, der den Goldfluss abblockt und bei Bedarf mechanisch geöffnet werden kann. Diese kleine Öffnung beschränkt den Goldfluss auf einen schmalen Austrittskegel. Im Abstand von 15 cm hat der Bereich, in dem homogene Schichtdicken erzielt werden, eine Breite von etwa 1,5 cm. Das Prinzip des Verdampfers ist in Abbildung 3.4 zu sehen.

Ein Manipulator, der sich auf der oberen Seite der Kammer gegenüber dem Verdampfer befindet, hat an seinem unteren Ende einen Probenplatz für die zu bedampfenden Substrate. Der Manipulator ermöglicht eine Probentranslation in allen drei Raumrichtungen sowie eine Probenverkipfung um zwei Achsen. Der Probenplatz mit der Probenplatte ist in Abbildung 3.5 zu sehen. Die Probenplatte kann auch beheizt und auf ein Potential zwischen 0 und 1000 V gelegt werden. Dies geschieht mit einem Heizdraht, der sich hinter der Probenplatte befindet und die Probe thermisch sowie zusätzlich durch Elektronenstöße heizt.

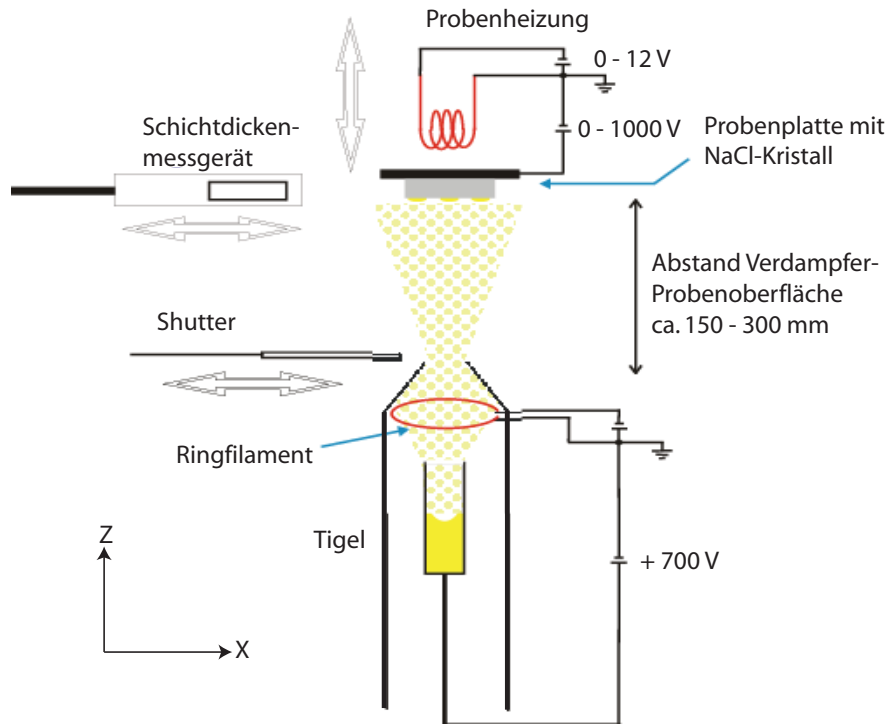


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der Au-Deposition.

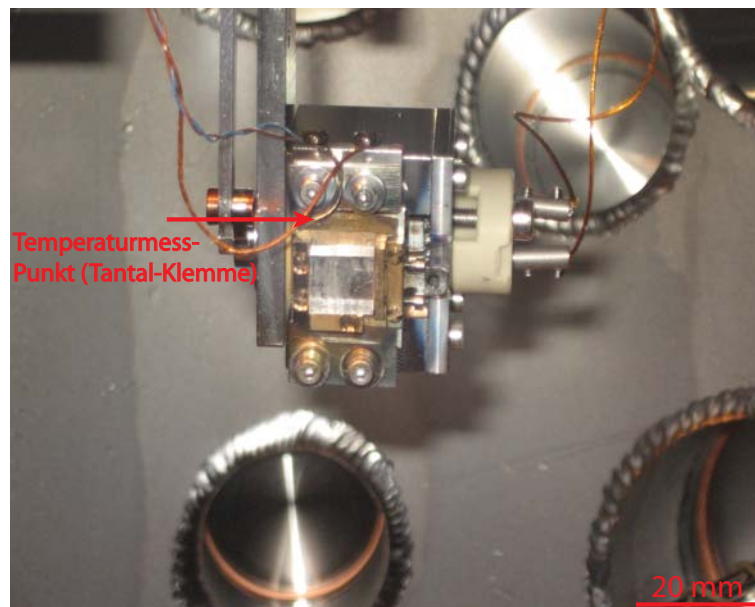


Abbildung 3.5: Foto der Probenhalterung in der Aufdampf-Kammer.

Da eine Temperaturmessung direkt auf der Substratoberfläche während des Verdampfens aufgrund des Probenwechsels nur sehr schwer realisieren ließe und es zusätzlich bei der Golddeposition zu Abschattungseffekten kommen würde, wurden Temperaturkalibrierungsmessungen vorgenommen. Dazu wurde die Temperatur mittels Thermocouple an einem zusätzlichen Messpunkt auf NaCl-Substratoberfläche bestimmt und mit den Messwerten des Standardmesspunktes (Tantalklemme) verglichen. Die Abbildungen 3.6 und 3.7 zeigen die zeitlichen Temperaturverläufe an den zwei Messstellen für verschiedene Heizserien. In Abbildung 3.6 sind nur Messserien in denen thermisch geheizt wurde, in Abbildung 3.7 sind Messserien in denen zusätzlich noch über Elektronenstoß geheizt wurde, dargestellt.

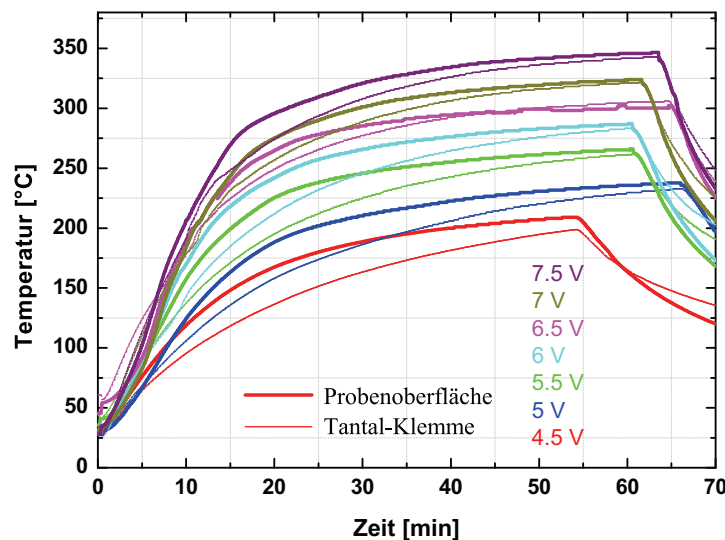


Abbildung 3.6: Kurve der Temperaturverläufe der Probenoberfläche und der Tantalklemme.

Die Temperaturmessung erfolgte über jeweils ein Thermoelement und ein digitales Thermometer der Firma Conrad. Diese Messreihen wurden durchgeführt, ohne dabei Gold zu verdampfen. Nach jeder Messung wurde gewartet, bis die Temperatur wieder die Raumtemperatur erreicht hat, dann wurde die nächste Messung gestartet.

Es ist bei allen Messreihen zu sehen, dass zu Beginn des Heizprozesses die Temperatur an der Probenoberfläche deutlich schneller ansteigt als bei der Tantalklemme. Der Temperaturverlauf fing nach ca. 20 Minuten deutlich flacher zu werden, und die Temperatur hinter der Tantalklemme höher ansteigt. Aus diesem Grund wurde immer mit dem Verdampfen erst 20 Minuten nach Beginn des Heizens gestartet (bzw. wurde der Shutter geöffnet). 20 Minuten sind die Zeit, in der die Temperaturkurven flacher werden.

Beim Aufdampfprozess wurden unterschiedliche durchschnittliche Schichtdicken auf-

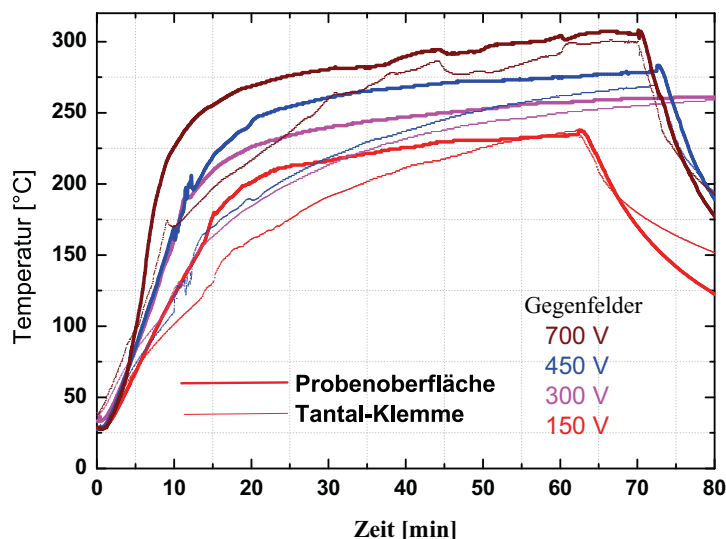


Abbildung 3.7: Kurve der Temperaturverläufe der Probenoberfläche und der Tantal-Klemme mit zusätzlicher Elektronenstoßheizung durch Anlegen einer elektrischen Spannung zwischen Filament und Probenplatte.

gebracht. Dies wird in Kapiteln 6 und 7 genauer erklärt. Aufgrund des sehr schmalen Dampfstrahls konnte keine Messung der Aufdampftrate während des Verdampfens durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurde jeweils nach Neubefüllung des Tiegels eine Kalibrierung der Effusionszelle durchgeführt. Dabei wurden die Parameter bestimmt, die ermöglichen eine Aufdampftrate von 0,25 nm/min zu erreichen. Zur Messung der Aufdampftrate wurde ein Schwingquarz - Schichtdickenmessgerät - verwendet. Das Kalibrieren und das Verdampfen geschahen erst, wenn ein Ultrahochvakuum erreicht wurde.

3.2 3-Zonen-Ofen

Die Mikrogoldkristalle wurden mit einer Sputteranlage sowie mit Hilfe eines 3-Zonen-Ofens präpariert. Die Sputteranlage und der Präparationsvorgang werden in Abschnitt 6.3 genauer beschrieben. Hier wird zunächst der 3-Zonen-Ofen der Firma AST (Modell 1000-200-A) beschrieben. Die Größe des Ofens beträgt 120 x 65 x 70 cm (Nr. 1 bei der Abbildung 3.8).

Er wird mit drei universellen Programmreglern und einer digitalen Alarmeinheit der Firma Eurotherm International bedient [86, S. 8-12] [87, S. 29]. Der Ofen erreicht Temperaturen bis 1600°C und kann für Prozesse bis zu einer Dauer von 600 Minuten programmiert werden [88]. Für die Temperatursteigerung lassen sich bis zu 10 Grad pro Minute einstellen.



Abbildung 3.8: Der AST 3-Zonen-Ofen mit Eurotherm-Regler bei Temperaturen von links 954°C, Mitte 1000°C und rechts 955°C.

3.3 Röntgendiffraktometer

Zur Charakterisierung der Orientierung der präparierten Goldkristalle auf der Oberfläche und deren lateraler Größe wurde das Röntgendiffraktometer, das im Rahmen einer Doktorarbeit in Bielefeld aufgebaut wurde [24], verwendet. Es besteht aus einer Röntgenröhre, die eine Kupferanode enthält und mit einer Spannung von 40 kV betrieben wird. Das Reflektometer arbeitet ausschließlich mit der CuK_α -Linie. Diese Linie wird in einem Germanium-Kristallmonochromator selektiert. Die Energie dieser Linie liegt bei 8,041 keV, dies entspricht einer Wellenlänge von 154 pm [24]. Bevor der monochrome Strahl streifend die Probe trifft, wird er durch ein Doppelschlitzenblenden-system (0,02 mm und 0,04 mm) kollimiert, woraus sich eine Winkeldivergenz von weniger als 0,2 mrad ergibt, was einer Winkelvariation von $0,01^\circ$ entspricht [64, S. 41].

Zur Begrenzung des Detektoröffnungswinkels durchläuft der an der Probe reflektierte Strahl ein zweites Doppelschlitzenblenden-system (0,2 mm und 0,3 mm) bevor der Strahl mit einem Proportional-Zähler detektiert wird. Die vertikale Ausdehnung des Strahls wird durch die Höhe der Schlitze auf 10 mm beschränkt. Der Strahl trifft die Probe ($10 \times 10 \text{ mm}^2$) aufgrund dieser Einstellung erst ab einem Glanzwinkel von $0,32^\circ$ vollständig [64, S. 42]. Die Fläche, die vom Röntgenstrahl getroffen wird, nimmt mit dem zunehmenden Glanzwinkel ab und beträgt bei 1° ca 34%, bei 2° dann nur noch 17% der Probenoberfläche. Die Untergrundzählrate des Gerätes bei geschlossenen Strahlaustrittsfenstern beträgt 0,04 cps (counts per sec)[64, S. 42]. Eine Zählrate vom 100000 cps im durchgehenden Strahl ermöglicht Reflektivitätsmessungen bis hinunter zu $\approx 10^{-6}$ [64, S. 42].

Zur Einstellung des Winkels der Probe und des Detektors relativ zum Strahl werden Schrittmotoren verwendet. Bestandteile des verwendeten Röntgenreflektometers wurden während dieser Arbeit ausgetauscht. Dazu zählt der Austausch des Ge-Monochromators gegen einen Göbel-Spiegel, der Einbau eines Filterrades mit einem Absorber ($50 \mu\text{m Cu}$)

[89] zur Strahlabschwächung des direkten Strahls bei kleinen Glanzwinkeln, was zu einer Erhöhung des Dynamikbereiches führt, und die Variation der Blendenöffnung des Doppelschlitzblendensystems [89]. Die Strahldivergenz beträgt $\theta_D = (1,1 \pm 0,08) \cdot 10^{-2^\circ}$, Divergenz (ohne Randbereich) beträgt $\theta_D = (7,4 \pm 0,8) \cdot 10^{-3^\circ}$ [89]. Die ganzen Änderungen haben keinen Einfluss auf die Ergebnisse, die im Kapitel 7 und 8 dargestellt sind.

3.4 Omicron UHV AFM/STM

Das Omicron AFM/STM lässt sich unter UHV-Bedingungen sowohl als Rastertunnelmikroskop (STM) als auch Rasterkraftmikroskop (AFM) betreiben [90].

Das Gerät ist in einer UHV-Kammer untergebracht, die mit einem Probenschleusensystem ausgestattet ist. Als AFM-Messmodus kann der statische *contact mode*, sowie der

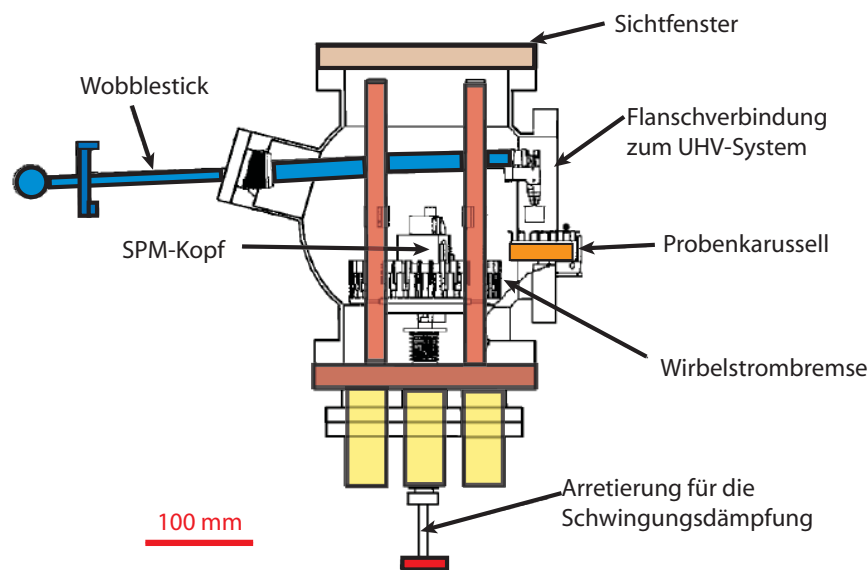


Abbildung 3.9: Aufbau des Omicron AFM [64, S. 41]

dynamische *non contact mode* bzw tapping mode gewählt werden [64, S. 40]. In dieser Arbeit wurde für die Untersuchung der Proben anschließend nur der *contact mode* verwendet.

Der SPM-Kopf (Scanning Probe Microscope)[91] besteht aus der Messsondenhalterung und der Raster-scaneinheit. Er hängt an vier Federn und wird mittels Wirbelströmen gedämpft. Ein Röhrencanner, der einen maximalen Bereich von $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ auf der Probenoberfläche abfahren kann, bildet die Raster-scaneinheit [90]. Die Scaneinheit kann zusätzlich um $\pm 4 \text{ mm}$ in die x-Richtung verschoben werden [64, S. 41]. Die Messungen erfolgten mit Cantilevern der Firma LOT-Oriel [29]. Die Spitzenradien für die Auflösung liegen standardgemäß bei 10 nm [92]. Sie haben eine dreieckige Form, bestehen aus Siliziumnitrit (Si_3N_4) und weisen eine Kraftkonstante von $0,06 \text{ N/m}$ auf. Die

Rastergeschwindigkeit läßt sich von 1 nm/s bis 13500 nm/s variieren [90]. Die Scangeschwindigkeit der AFM-Steuerung war auf 250-1000 nm/s eingestellt. Die niedrigste Geschwindigkeit wurde beim Scanbereich von 500 x 500 nm, die höchste Geschwindigkeit beim Scanbereich von 1000 x 1000 nm gewählt.

3.5 Agilent-AFM (Eigenbau)

Die Goldmikrokristalle, auf Silizium präpariert, wurden mit einem AFM (Scankopf von der Firma Agilent [92]) vermessen. Das AFM wurde in unserer Arbeitsgruppe im Rahmen einer Bachelorarbeit aufgebaut und getestet [93, S. 1-2]. Eine Übersicht des gesamten Aufbaus ist in Abbildung 3.10 dargestellt [93, S. 29].

Dieses AFM läßt Proben von etwa 70 x 70 mm² und einer maximalen Probenhöhe von 10 mm zu. Bei dem AFM ist ein Scanbereich von 25 x 25 μm² möglich. Der verwendete Cantilevertyp war identisch mit dem im Omicron-Gerät eingesetzt. Die vertikale Auflösung liegt bei 20 pm. Sie wurde anhand von HOPG-Stufen bestimmt [93, S. 59].

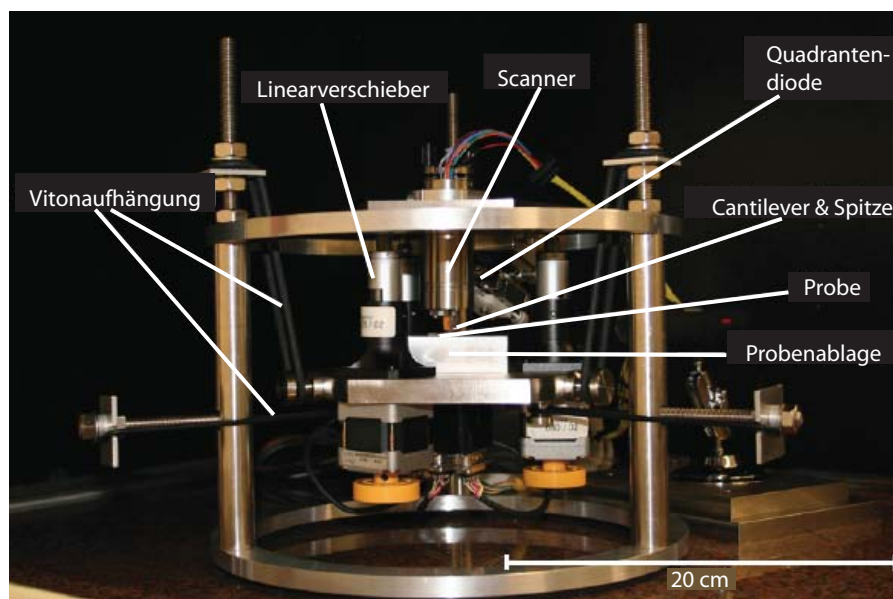


Abbildung 3.10: Digitale Aufnahme des Agilent-Luft-AFM [93, S. 29]

3.6 Transmissionselektronenmikroskop (TEM)

Die gezeigten Transmissionselektronenmikroskopie-Aufnahmen (TEM *Transmission Electron Microscope* [94, S. 683]) wurden mit einem CM200 Super Twin-α vom Hersteller Philips gemacht [95]. Die Punktauflösung dieses Gerätes beträgt 0,24 nm und die Lineauflösung von 0,14 nm bei einer Fokusslänge von 2 nm [96]. Das Gerät hat eine

LaB₆-Kathode [97].

3.7 Rasterelektronenmikroskop (SEM)

Das verwendete Rasterelektronenmikroskop (Scanning Electron Microscope SEM [98, S. 713]) ist ein Zeiss Digitales Raster Elektronen Mikroskop Typ DSM 982 Gemini [99], Es wurde mit 10 kV bei einem Abstand von 5 mm von der Probe betrieben [97].

Kapitel 4

Aufbau und Charakterisierung des Röntgenmessplatzes

Zur Charakterisierung der Nano- bzw. Mikrogoldkristalle (Kapitel 7 und 8) sowie zur Strahlenschädigungsexperimenten an Proteinen (Kapitel 5) wurde ein DXT-Laborsystem gebaut. Dieses System entspricht einem Laue-Aufbau, der in Transmissionsrichtung betrieben wird. Das Prinzip des DXT ist im Kapitel 2 Abschnitt 2.5 beschrieben und in der Abbildung 2.5 dargestellt. In diesem Kapitel werden der Aufbau des DXT-Laborsystems beschrieben und die Strahlparameter: Strahlprofil, Strahldivergenz, Strahlspektrum und Intensität charakterisiert.

4.1 Experimentaufbau

Auf einer Höhe von 90 cm liegt eine Marmorplatte (200 x 80 x 12 cm) auf zwei dicken Styroporplatten, deren untere Ecken und deren Mitte auf Blocksteinen, die eine Höhe von 15 cm haben, sitzen. Die Marmorplatte sowie die Styroporplatten dienen dazu den Aufbau von hochfrequenten Boden- bzw. Gebäudeschwingungen zu entkoppeln.

Für den Strahlenschutz wurde ein Kasten aus Stahl (160 x 80 x 90 cm mit 1 mm Wandstärke) gebaut, in dem sich das DXT-System befindet. Der Kasten hat eine Tür an der vorderen Seite, durch die man die Proben tauschen kann.

Als Röntgenquelle wurde eine Hochleistungs-Mikrofokus-Röntgenröhre verwendet. Die Quelle ist von der Firma Oxford Instruments [100]. Einige wichtige Parameter dieser Röntgenröhre sind in Tabelle 4.1 angegeben.

Die Halterung der Röntgenquelle ist auf einer optischen Bank befestigt. Die optische Bank ist lang genug und dient dazu, die Quelle und andere Komponenten in z-Richtung verschieben zu können. Die z-Richtung entspricht hier der Strahlrichtung (siehe Abbildung 4.2). Die Quelle kann auf einer bestimmten Höhe befestigt und in x- und y-Richtungen gekippt werden.

Die emittierte Röntgenstrahlung der Quelle wird mittels einer Polykapillaroptik auf die Probenposition fokussiert. Es wurden neue Methoden in der Materialanalyse durch die

Anode	Wolfram
Spannung	10 - 90 kV
Strom	1 - 2 mA
max. Leistung	80 W
Spot-Größe	13 μm - 40 μm

Tabelle 4.1: Die wichtigsten Eigenschaften der verwendeten Wolframsanode-Röntgenquelle [100, S. 3]

Entwicklung innovativer Röntgenoptik gefördert [101]. Besonders in den letzten zehn Jahren wurden erhebliche Fortschritte durch die Entwicklung von Polykapillaroptik erzielt, die auf der Grundlage von Führung und die Konzentration von Röntgenstrahlen mit externe Total-Reflexion basierend [102]. Die Polykapillaroptik (Polykapillar-Mikrolinse) wurde vom IFG (Institute for Scientific Instruments [103, S. 1]) gebaut. Tabelle 4.2 zeigt die geometrischen Parameter, die auch in Abbildung 4.1 zu erkennen sind, und die Transmissionsparameter der Polykapillarlinse. Die Polykapillare und ein Teil der vorderen Seite der Röntgenröhre befinden sich innerhalb der Streulichtabschirmung wie in Abbildung 4.2 gezeigt. Die an der Anode entstehende Wärme wird mittels eines aktiven Luftkühlung (Ventilator) abgekühlt.

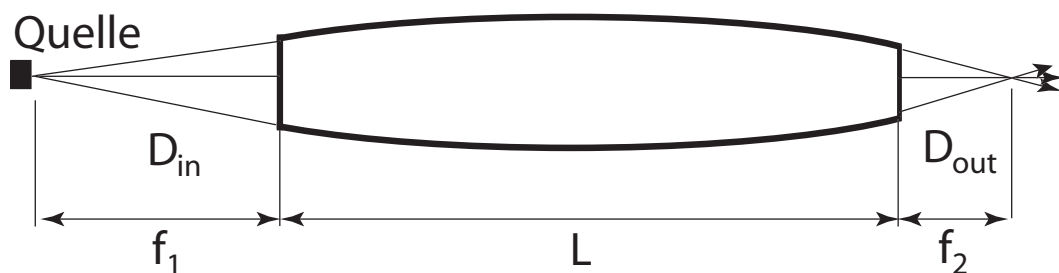


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der geometrischen Parameter der Polykapillarlinse [103, S. 1]

Die Probe befindet sich in einem Abstand von 210 mm von der Quelle. Der Strahl durchläuft als nächstes einen Kollimator. Seine vordere Öffnung liegt bei ca. 10 mm vor dem Fokuspunkt. Der Kollimator hat einen Öffnungsdurchmesser von 0,4 mm, wobei die komplette Strahlführung zur Vermeidung von Röntgenstreulicht gekapselt ist. Der Kollimator, dessen Halter ebenfalls auf der optische Bank montiert ist, lässt sich mittels zweier Linearverschieber in x- und y-Richtungen manuell positionieren. Die Probe ist

Geometrische Parameter		Transmissionsparameter	
f_1	4,6 mm	E	7,5-10 keV
f_2	$194 \pm 0,1$ mm	Spot Größe*	$800 \mu\text{m}$
L	13,3 mm	Spot Größe*	$540 \mu\text{m}$
D_{in}	0,97/1,75 mm	Gain**	171
D_{out}	2,1/3,4 mm		

Tabelle 4.2: Die geometrischen und die Transmissionsparameter der Polykapillarroptik [103, S. 1].

* FWHM, mit Blende $5 \mu\text{m}$ gescannt, $f_2 = 194$ mm

** Gain = Intensität im Fokus (210 mm) / Intensität des Primärstrahles im gleichen Abstand.

Der Durchmesser der verwendeten Blende beträgt $5 \mu\text{m}$.

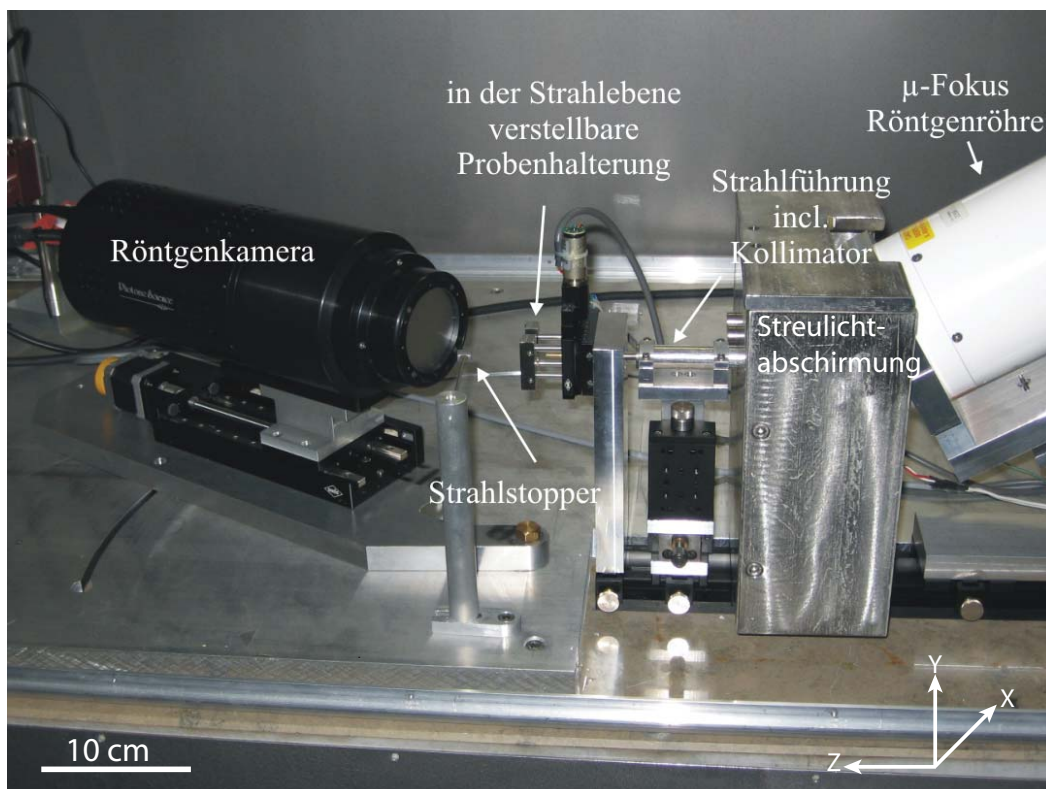


Abbildung 4.2: Foto des DXT-Laborsystems

im Gegensatz zum Kollimator mittels eines motorisierten Verschiebers in die beiden senkrecht zum Strahl liegenden Richtungen um $\pm 2,75$ mm verschiebbar. Der Probenhalter ist zur Aufnahme von Standard - Omicron - Probenplatten konzipiert. Er hat ein Fenster in der Mitte (5 x 5 mm), an dem die Goldkristalle und andere Proben mit Hilfe von Sekundenkleber oder Polymer befestigt werden. In Kapitel 6 wird die Präparation genauer beschrieben.

Die an der Probe gebeugte Röntgenstrahlung wird mit Hilfe einer intensivierten Röntgenkamera detektiert. Diese Kamera ist von der Firma Photonic Science, Typ X-Ray Gemstar HS 60 mm [104]. Die Eigenschaften der Kamera sind in der Tabelle 4.3 angegeben.

Der Abstand zwischen dem Fokuspunkt, also der Probenposition und der bildgebenden Schicht der CCD-Kamera, lässt sich ebenfalls mittels eines motorisierten Linearverschiebers zwischen 54 mm und 202 mm variieren. Der motorisierte Linearverschieber befindet sich auf einer Metallplatte, die direkt auf der Marmorplatte liegt. Zusätzlich ist es möglich die Röntgenkamera um eine Achse zu drehen, die durch dem Fokuspunkt auf der Probenoberfläche und dessen senkrechtem Lot besteht, wobei verschiedene Winkel zwischen 0° und 90° bezüglich des direkten Strahles möglich sind. Die Kamera wird mit einem mitgelieferten Programm (Image-Pro Express) bedient. Zum Schutz der CCD-Kamera ist es notwendig, den direkten Röntgenstrahl mittels eines Strahlstoppers zu blockieren.

Pixel Auflösung	1392 x 1040
Pixelgröße beim Eingang	ca. 60 Quadratmikrometer
Einganggröße	kreisförmig mit Durchmesser von ca. 60 mm
Belichtungszeit	100 μ sec bis 30 Minuten

Tabelle 4.3: Die wichtigsten Parameter der verwendeten Röntgenkamera [104, S. 10].

Die Intensität des Röntgenstrahls stabilisiert sich erst nach zwei Stunden, weil sich erst nach dieser Zeit die Temperatur der Röntgenröhre stabilisiert. Der Graph (in Abbildung 4.4) zeigt den Verlauf der Intensität in den ersten drei Stunden. Die rote Linie kann erst nach einem Tag Betrieb erreicht werden.

Die Strahlintensität wird mittels eines Röntgen-PIN-Detektors gemessen. Seine wichtigsten Eigenschaften sind in der Tabelle 4.4 dargestellt. Das XPD100 PIN-Diode-Detektorsystem ist für Anwendungen in Optik- und Lichtstrahlausrichtung sowie für Synchrotronquellen bestimmt. Der Detektor kann im direkten Röntgenstrahl verwendet werden.

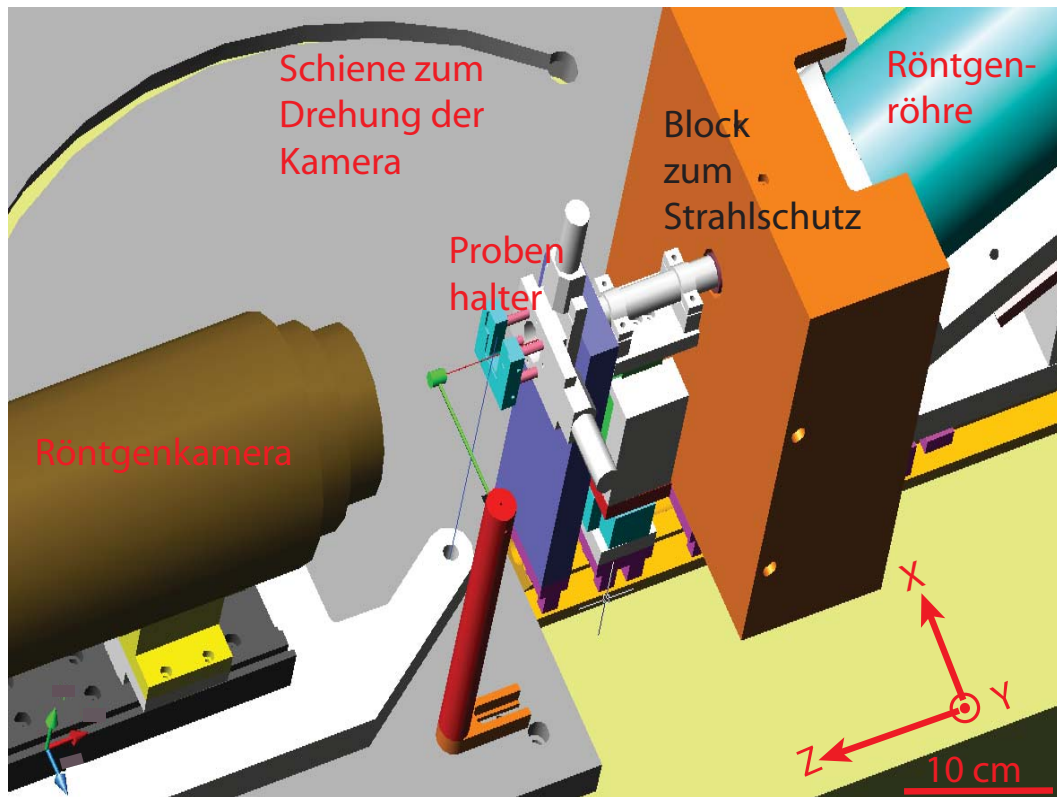


Abbildung 4.3: 3 dimensionale Darstellung des DXT-Laborsystems

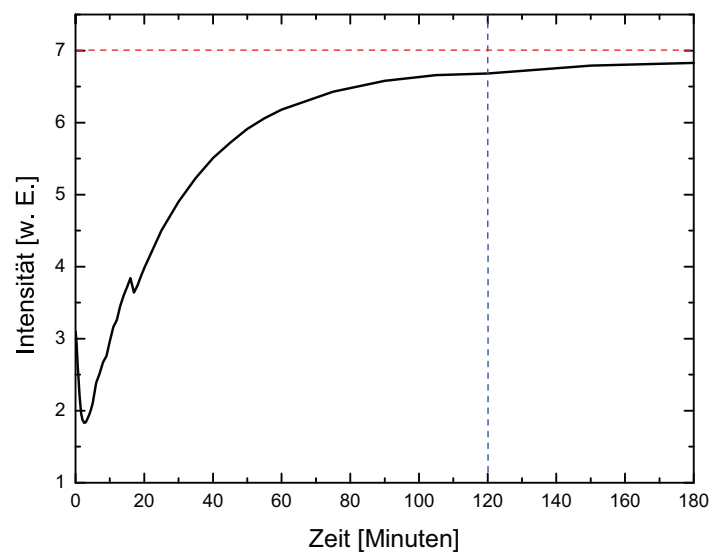


Abbildung 4.4: Zeitverlauf der Intensität des Röntgenstrahls nach dem Einschalten der Röntgenquelle

Detektor aktive Fläche	10 mm x 10 mm
Vorverstärker Gain	1, 10, 100, 1000
Ausgangsspannung	0 - 14 V
Ausgangsfrequenz	0 - 500 kHz
Linearität	besser als 2%
messbarer Fluss (8 keV)	$10^4 - 10^9$ Photonen / Sekunde
verwendbarer Energiebereich	4 keV - 20 keV

Tabelle 4.4: Die wichtigsten Parameter des verwendeten Röntgen-PIN-Diode-Detektor-Systems [105, S. 7].

4.1.1 Setup für Bestahlungsmessungen

Für das Bestahlungsexperiment an Proteinen wird der in Abschnitt 4.1 beschriebene Aufbau verwendet. An der Probenhalterung musste eine Modifikation durchgeführt werden, um eine Glaskapillare aufnehmen zu können.

Zur Bestrahlung wird die Proteinlösung in eine Glaskapillare, die an einem Ende verschlossen ist, gefüllt (siehe Abbildung 4.5). Die Kapillare hat eine Länge von ca. 14 mm und einen Innendurchmesser von 1,38 mm, was einem Volumen von 21 μl entspricht. Die Kapillare wird so justiert, dass der Röntgenstrahl entlang der Längsachse durch eine ca. 13 μm dicke Polyethylenfolie eingestrahlt wird. Die Glaskapillaren sind als Mikropipetten bei der Firma Duran gekauft worden, sie wurden mit einer Diamantensäge passend geschnitten und bei der Glaserei der Universität Bielefeld von einer Seite verschlossen. Bei der Wahl der Dimensionen der Kapillare werden zwei wichtige Punkte berücksichtigt. Erstens, dass der einfallende Röntgenstrahl möglichst effektiv von der Proteinlösung absorbiert wird, zweitens, dass die Menge des verwendeten Proteins klein gehalten werden kann, um signifikante Strahlenschädigungen zu erreichen.

Bei dem verwendeten Aufbau wird mehr als 93% der eintretenden Strahlung von der Proteinlösung absorbiert. Die mit diesem Aufbau deponierbaren Energiedosen im Kapillarvolumen (21 μl) lagen bei ca. 0,05 Gray/s (Beschleunigungsspannung 25 kV, Leistung 50 W). Nach einer 16-stündigen Bestrahlungszeit ergibt dies eine Gesamtdosis von ca. 2900 ± 500 Gy. (siehe Kapitel 5).

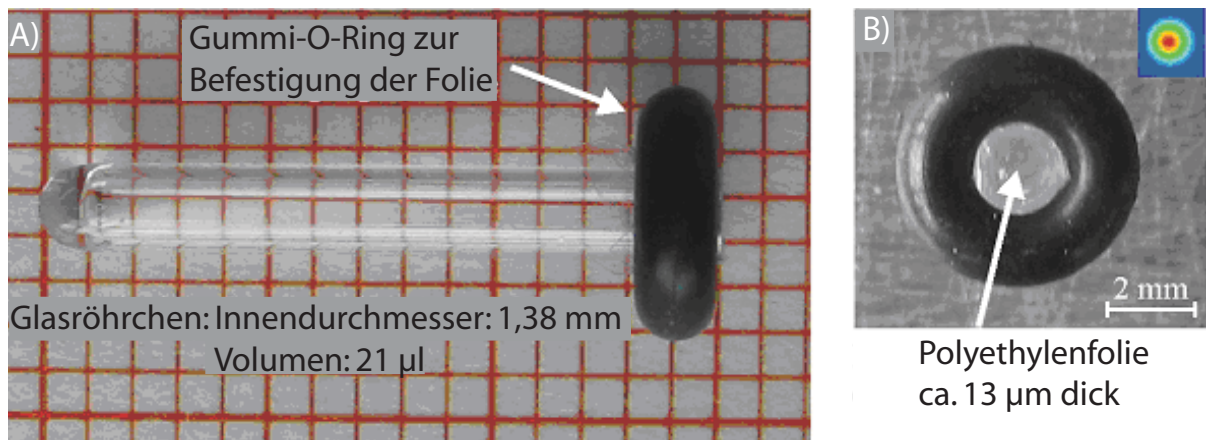


Abbildung 4.5: Glasrohr zur Bestrahlung der verschiedenen 2 CP-Proteinlösungen. A) Seitenansicht, B) Frontansicht

4.2 Strahlprofil im Fokus

Der Strahldurchmesser im Fokus wurde mittels einer Wolfram-Lochblende, die einen Durchmesser von $50\ \mu\text{m}$ aufweist, vermessen. Die Lochblende wird dazu in der Ebene senkrecht zum Strahlverlauf gerastert (31×31 -Punkte, Punktabstand $50\ \mu\text{m}$).

Die Messergebnisse des Strahlprofils, die in Abbildung 4.6 dargestellt sind, zeigen, dass die Intensitätsverteilung in der Fokalebene nahezu zentralsymmetrisch ist. Die Halbwertsbreite beträgt in der horizontalen Richtung $0,45\ \text{mm}$ und $0,44\ \text{mm}$ in der vertikalen Richtung.

Es wurden auch Strahlprofilmessungen ohne Kollimator durchgeführt. In Abbildung 4.7 ist das Ergebnis dieser Messung dargestellt. Zu erkennen ist ein deutlich breiteres Strahlprofil, dessen Halbwertsbreite horizontal $0,63\ \text{mm}$ und vertikal $0,62\ \text{mm}$ beträgt. Aufgrund des Ergebnisses, dass die Strahlungsintensität beim Aufbau ohne Kollimator um den Faktor 2,5 höher als beim Aufbau mit Kollimator ist, wird für die beschriebenen Strahlungsschädigungsexperimente am Protein in Kapitel 5 und Abschnitt 4.1.1 ein Aufbau ohne Kollimator verwendet.

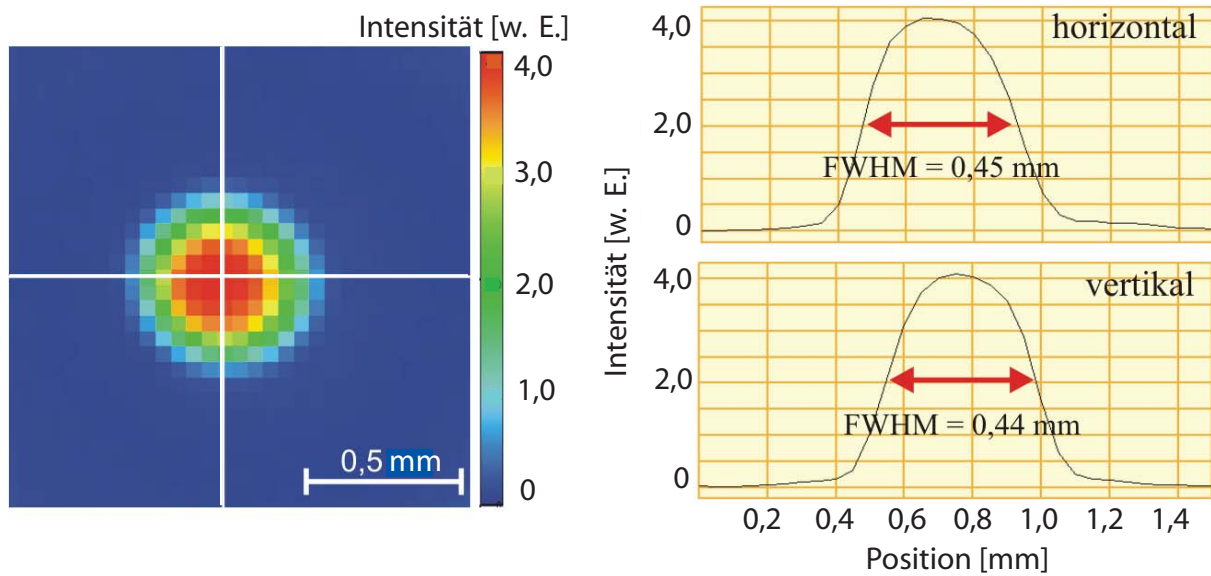


Abbildung 4.6: Strahlprofil mit eingebautem Kollimator in der Fokalebene. (Beschleunigungsspannung: 25 kV, Leistung: 50 W)

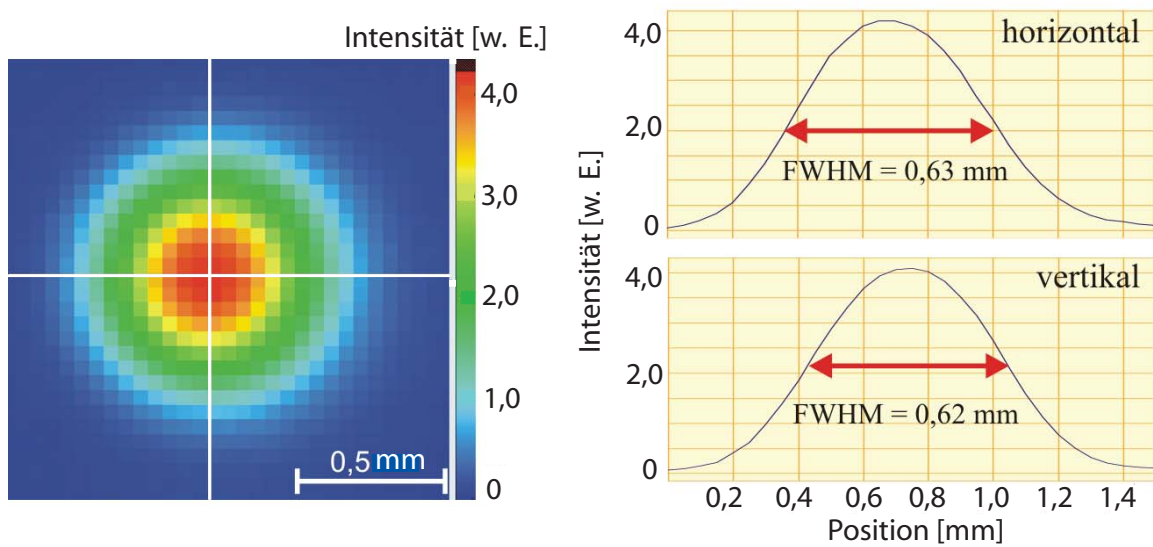


Abbildung 4.7: Strahlprofil mit ausgebautem Kollimator in der Fokalebene. (Beschleunigungsspannung: 25 kV, Leistung: 50 W)

4.3 Strahldivergenz

Die Bestimmung der Strahldivergenz des DXT-Experiments erfolgte mit der gleichen Methode, wie das Strahlprofil im Fokus mit Kollimator bestimmt wurde (siehe Abschnitt 4.2). Zusätzlich wurde aber der Abstand zwischen Röntgenquelle und Lochblende variiert und das Strahlprofil in zwei Ebenen hinter dem Fokus vermessen.

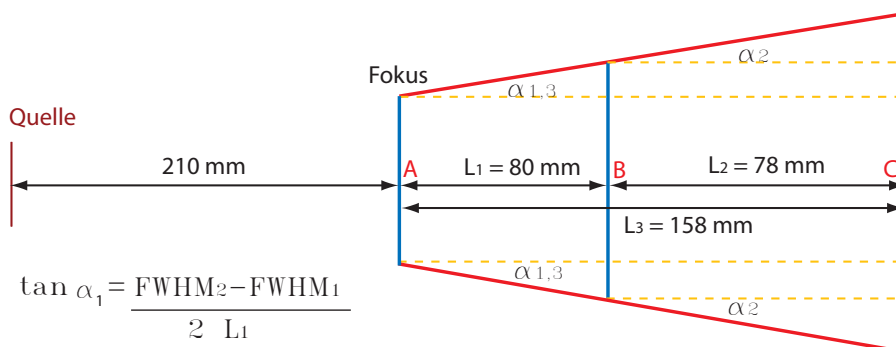


Abbildung 4.8: Schematische Darstellung zur Bestimmung der Strahldivergenz

Das Strahlprofil wurde dreimal mittels der $50 \mu\text{m}$ -Lochblende vermessen. Die erste Strahlrastrerung lag im Fokus, die zweite und die dritte in einem Abstand von 80 mm bzw. 158 mm hinter dem Fokus (siehe Abbildung 4.8). Die Lochblende wurde in der Ebene senkrecht zum Strahlverlauf gerastert. In der Abbildung 4.9 sind die Profile bei allen vermessenen Abständen zu sehen.

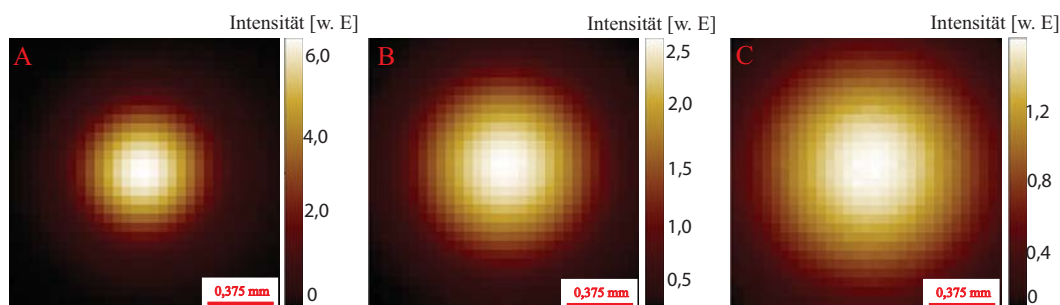


Abbildung 4.9: Aufnahme des Strahlprofils in drei verschiedenen Abständen zur Bestimmung der Divergenz.

(A) Das Profil im Fokus. (B) Das Profil bei einem Abstand von 80 mm vom Punkt A. (C) Das Profil bei einem Abstand von 158 mm vom Punkt A.

Zunächst sind die Winkel $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$, wie in der Abbildung 4.8 gezeichnet, zu bestimmen, wobei beispielweise für α_1 gilt:

$$\tan \alpha_1 = \frac{\text{FWHM}_2 - \text{FWHM}_1}{2L_1} \quad (4.1)$$

In Abbildung 4.10 ist der horizontale sowie der vertikale Intensitätsverlauf der dreigemessenen Strahlprofile dargestellt. Die Halbwertsbreite jedes Profils wurde bestimmt. In der Tabelle 4.5 sind die Werte der Halbwertsbreiten und daraus die berechneten Divergenzwinkel nach der Einsetzung der Halbwertsbreiten in der Formel 4.1 mit $L_1 = 80$ mm, $L_2 = 78$ mm und $L_3 = 158$ mm (mit einem geschätzten Meßfehler für L_1 , L_2 und L_3 von jeweils $\pm 0,5$ mm und einem Fehler für die Halbwertsbreite von $0,025$ mm als die halbe Rasterbreite) aufgeführt

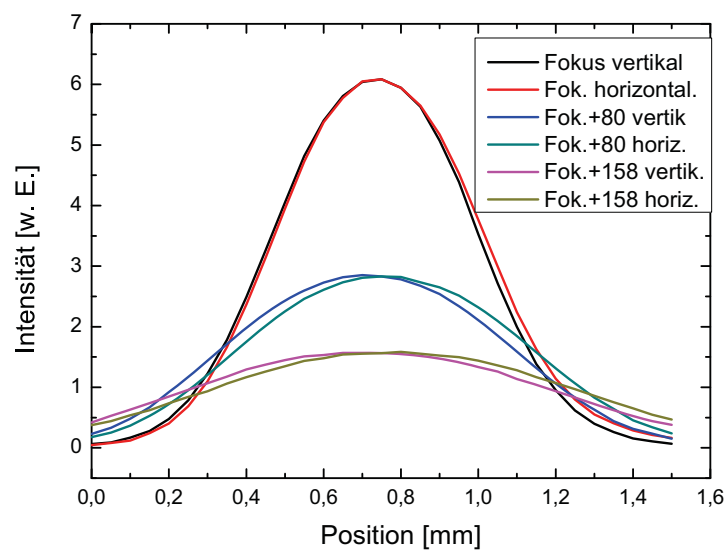


Abbildung 4.10: Strahlprofile zur Bestimmung der Divergenz

Die Divergenz entspricht dem doppelten Winkel α (siehe Abbildung 4.8). Dies ergibt einen Mittelwert der Strahldivergenz von $2\alpha = \Theta = 0,22^\circ \pm 0,02^\circ = 3,8$ mrad. Die Messunsicherheit des Winkels α wurde mittels gaußschen Fehlerfortpflanzung bestimmt. Der Fehler der Strahldivergenz von 2α ergibt sich hier aus dem doppelten Fehlerwert $0,22^\circ$ bei dem großen Abstand (Fokus + 158 mm).

Profil	Die Halbwertsbreite [mm]	Abstand [mm]	Winkel α [°]	Divergenz Θ [rad]
Fokus horizontal	$0,583 \pm 0,025$	210	$0,109 \pm 0,03$	0,0038
Fokus vertikal	$0,589 \pm 0,025$	210	$0,101 \pm 0,03$	0,0035
Fokus + 80 mm horizontal	$0,890 \pm 0,025$	290	$0,114 \pm 0,03$	0,0039
Fokus + 80 mm vertikal	$0,873 \pm 0,025$	290	$0,118 \pm 0,03$	0,0041
Fokus + 158 mm horizontal	$1,203 \pm 0,025$	358	$0,112 \pm 0,01$	0,0039
Fokus + 158 mm vertikal	$1,196 \pm 0,025$	368	$0,110 \pm 0,01$	0,0038

Tabelle 4.5: Die Bestimmung der Halbwertsbreiten und der Strahldivergenz

4.4 Strahlspektrum

Zur Bestimmung des absoluten Photonенflusses in der Fokalebene ist es erforderlich das Spektrum des Röntgenstrahls zu kennen. Der Grund dafür ist die energieabhängige PIN-Detektorsensitivität, die sich aus dem energieabhängigen Produkt aus Quanteneffizient und Quantenenergie ergibt. Die energieabhängige Detektorsensitivität ist bekannt und kann durch Gleichung 4.2 approximiert werden. Dafür wird ein für eine Röntgenröhre mit einer W-Anode, einer Beschleunigungsspannung von 25 kV und einem 1 mm starken Be-Austrittfenster berechnetes Röntgenspektrum von Unsworth verwendet [15]. Zur Bestimmung des Röntgenstrahlspektrums wird im Folgenden auf ein von Lounis [106, S. 19-25] beschriebenes Verfahren aufgebaut. Bei diesem Verfahren wird der emittierte Röntgenstrahl durch eine Serie von Absorbern, mit bekannter wellenlängenabhängiger Transmission geleitet. Die Intensität der transmittierten Röntgenstrahlen wird durch einen PIN-Detektor, der hinter dem Absorber steht, gemessen (siehe Abb. 4.11). Anhand dieser Messungen lässt sich dann der spektrale Intensitätsverlauf berechnen.

Die Herleitung beginnt man mit der Definition des integrierten quadratischen Fehlers (Integrated Square Error, Abk. ISE)

$$\text{ISE} = \int [f(x) - z(x)]^2 dx \quad (4.2)$$

der zur Quantifizierung der Genauigkeit einer Approximation $z(x)$ an eine Funktion $f(x)$ über einen kontinuierlichen Bereich (x_1, x_2) verwendet wird. Diese Formel erhöht wegen der zweiten Potenz die großen Unstimmigkeiten und unterdrückt die kleinen Unstimmigkeiten zwischen der Funktion und der Approximation.

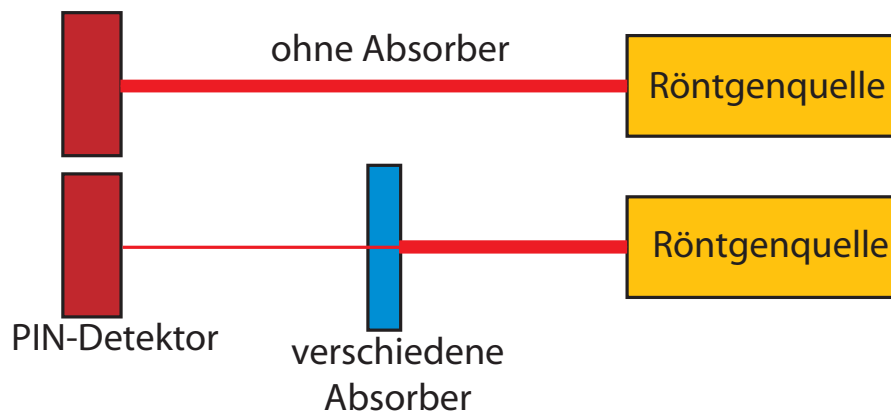


Abbildung 4.11: Darstellung der Berechnung des Spektrums

$$z(x) = \sum_k C_k \varphi_k(x) \quad (4.3)$$

wobei $\varphi_k(x)$ ein Satz von Basisfunktionen, die den erwünschten Bereich bedecken, und C_k Gewichtungskoeffizienten sind. Die Gewichtungskoeffizienten bestimmen wie stark die jeweilige Basisfunktion zur Endapproximation beitragen. Der Grund, sich für diese Approximation zu entscheiden, wird im Folgenden erklärt.

Setzt man Gleichung 4.3 in Gleichung 4.2 ein, so ergibt sich:

$$\text{ISE} = \int [f(x) - \sum_k C_k \varphi_k(x)]^2 dx \quad (4.4)$$

Das Ziel ist die Minimierung des ISE bzw. die Maximierung der Genauigkeit. Wird angenommen, dass die Basisfunktionen $\varphi_k(x)$ schon bekannt sind, so bleiben noch die Koeffizienten C_k als Variablen, die sich in der Formel noch ändern können. Der Lösungsansatz, um das Minimum zu finden, ist dass die partiellen Ableitungen von ISE nach den Variablen C_k gleich Null sein soll:

$$\frac{\partial(\text{ISE})}{\partial C_k} = 0 \quad (4.5)$$

Bei der Annahme, dass die Approximation nicht genau der tatsächliche Funktion entspricht ($z(x) \neq f(x)$) [106, S. 21]:

$$\begin{aligned}
& \frac{\partial}{\partial C_k} \left[\int \left(f(x) - \sum_k C_k \varphi_k(x) \right)^2 dx \right] = 0 \\
& \iff \int \frac{\partial}{\partial C_k} \left[\left(f(x) - \sum_k C_k \varphi_k(x) \right)^2 dx \right] = 0 \\
& \iff \int 2 \left(f(x) - \sum_k C_k \varphi_k(x) \right) \left(- \sum_n \varphi_n(x) \right) dx = 0 \\
& \iff -2 \int \left(f(x) \sum_n \varphi_n(x) - \sum_k C_k \varphi_k(x) \sum_n \varphi_n(x) \right) dx = 0 \\
& \iff \int f(x) \sum_n \varphi_n(x) dx = \int \sum_k C_k \varphi_k(x) \sum_n \varphi_n(x) dx
\end{aligned}$$

$$\boxed{\sum_k C_k \int \varphi_k(x) \varphi_n(x) dx = \int f(x) \varphi_n(x) dx} \quad (4.6)$$

Die Formel 4.6 kann auch als eine Matrix mit n Zeilen und k Spalten dargestellt werden [106, S. 22]. Ein Beispiel mit nur drei Basisfunktionen, welches drei Gleichungen liefert, ist:

$$\begin{aligned}
n = 1: & \quad C_1 \int \varphi_1 \varphi_1 + C_2 \int \varphi_2 \varphi_1 + C_3 \int \varphi_3 \varphi_1 = \int f(x) \varphi_1 dx \\
n = 2: & \quad C_1 \int \varphi_1 \varphi_2 + C_2 \int \varphi_2 \varphi_2 + C_3 \int \varphi_3 \varphi_2 = \int f(x) \varphi_2 dx \\
n = 3: & \quad C_1 \int \varphi_1 \varphi_3 + C_2 \int \varphi_2 \varphi_3 + C_3 \int \varphi_3 \varphi_3 = \int f(x) \varphi_3 dx
\end{aligned}$$

Übersichtlicher ist eine Darstellung in Matixschreibweise.

$$\boxed{\begin{pmatrix} \int \varphi_1 \varphi_1 d(x) & \int \varphi_2 \varphi_1 d(x) & \int \varphi_3 \varphi_1 d(x) \\ \int \varphi_1 \varphi_2 d(x) & \int \varphi_2 \varphi_2 d(x) & \int \varphi_3 \varphi_2 d(x) \\ \int \varphi_1 \varphi_3 d(x) & \int \varphi_2 \varphi_3 d(x) & \int \varphi_3 \varphi_3 d(x) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} C_1 \\ C_2 \\ C_3 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \int f(x) \varphi_1 dx \\ \int f(x) \varphi_2 dx \\ \int f(x) \varphi_3 dx \end{pmatrix}} \quad (4.7)$$

Jetzt muss noch ermittelt werden, wo der Messwert der Photodiode in die Gleichung 4.6 eingesetzt werden kann, um die Koeffizienten C_k unserer Annäherung zu bestimmen mit denen dann schließlich das Röntgenspektrum berechnet werden kann.

Das Produkt aus Quanteneffizienz Photonenenergie weist eine starke Energieabhängigkeit auf, was im folgenden berücksichtigt werden muss. Für den vom PIN-Detektor angegebenen Wert (PD) gilt folgender Zusammenhang:

$$PD = \alpha I = \acute{\alpha} \int S(E) \cdot N(E) dE \quad \text{mit } N(E) \propto EP_a(E) \quad (4.8)$$

mit I: Bestrahlungstärke [Energie/Zeit·Fläche].

$\alpha, \acute{\alpha}$: Proportionalitätskonstanten.

S(E): Energiespektrum der einfallenden Röntgenstrahlung [Photonen/Zeit·Energie]

N(E): das Produkt aus Quanteneffizienz und Energie [Energie]

Da die Fläche der Photodiode konstant bleibt, kann 1/Fläche in der Proportionalitätskonstante α integriert werden.

Mit einem zusätzlichen Absorptionsfilter mit energieabhängiger Transmission T(E) gilt:

$$PD = \acute{\alpha} \int \underbrace{S(E)}_{f(x)} \underbrace{T(E)N(E)}_{\varphi(x)} dE \quad (4.9)$$

S(E) entspricht jetzt dem zu bestimmenden Spektrum. T(E)N(E) steht andererseits für die Basisfunktionen.

Durch Einsetzen in Gleichung 4.6 ergibt sich:

$$\sum_k C_k \int T_k(E)N(E) \sum_n T_n(E)N(E)dE = \overbrace{\int S(E) \sum_n T_n(E)N(E)dE}^{PD_N} \quad (4.10)$$

Jetzt müssen noch die C_k bestimmt werden. Alle Terme im Integral auf der linken Seite sind bekannt. Die rechte Seite der Gleichung entspricht jetzt gerade dem mit dem PIN-Diodendetektor gemessenen Signal PD_N . D.h. je mehr Absorber man verwendet, desto besser wird die Approximation.

Die Koeffizienten C_k werden durch Lösen des Linearen Gleichungssystems bestimmt. Mittels der C_k lässt sich nun S(E) bestimmen.

$$S(E) = \sum_k C_k T_k(E)N(E) \quad (4.11)$$

Die folgenden Angaben und Formeln sind vom Hersteller der Diode angegeben [105, S. 5-9]:

$$\text{Flux } I_x = S_v \overbrace{(V_{\text{out}} - V_d)}^{V_s} \times 1000/\text{Gain} \quad (4.12)$$

mit S_v als energieabhängigem Konversionsfaktor, als Gain (1, 10, 100, 1000), V_{out} die Ausgangsspannung: 0 - 14 V ist und V_d (dark current) in eine Photodiode fließt, wenn keine Strahlung einfällt.

$$S_v = 546432 \cdot \frac{E}{8} \frac{1 - e^{-L/\alpha(E)}}{1 - e^{-L/69,55}} \quad (4.13)$$

mit $\alpha(E)$ als energieabhängiger Abschwächungslänge von Si. E die Photonenenergie, $L = 55 \pm 1,5 \mu\text{m}$ die Schichtdicke [105, S. 4-6].

Zunächst muss die Dicke der Absorber exakt bestimmt werden. Dafür wird die folgende Methode verwendet: Der Absorber wird mit dem Reflektometer senkrecht zum Strahl zwischen Detektor und Quelle gebracht. Die Intensität wird einmal vor der Positionierung des Absorbers abgelesen und dann, während der Absorber noch dazwischen positioniert ist, ein weiteres Mal. Dabei erfolgt eine Veränderung der Intensität dI durch den Absorber. Die Tabelle 4.6 gibt die Ergebnisse dieser Messung an. Wird Licht durch ein absorbierendes Medium geschickt, so nimmt seine Intensität mit der Dicke des Absorbers dabei exponentiell ab. Es gilt das Lambert-Beersches-Gesetz (Absorptionsgesetz) [107, S. 353]:

$$I = I_0 e^{-\mu x} \quad (4.14)$$

$$x = \frac{\ln \frac{I_0}{I}}{\mu} \quad (4.15)$$

$I(x)$ ist die Intensität des Lichtstrahls nach Durchlaufen des Absorbers. $I_{(x=0)}$ ist die Intensität des Lichtstrahls vor Durchlaufen des Absorbers. x ist die Schichtdicke des durchstrahlten Absorbers und μ der lineare Abschwächungskoeffizient (Absorptionskoeffizient). Die Werte dieser Koeffizienten verschiedener Materialien sind einem in Internet befindlichen Programm ermittelt worden [108]. Der Absorptionkoeffizient beschreibt, wie stark die Intensität elektromagnetischer Strahlung beim Durchgang durch ein gegebenes Material reduziert wird. Der Koeffizient ist nicht von der Dicke des Materials abhängig, sondern von der Energie. Die Tabelle 4.6 nennt die Abschwächungskoeffizienten der verwendeten Materialien und deren berechnete Dicke.

Bei der Messung der tatsächlichen Dicke mit dem Röntgendiffraktometer wurde die Totzeit berücksichtigt. Die mittlere Totzeit von $\bar{\tau} = 4,2 \mu\text{s}$ wurde in den folgenden Formeln verwendet.

Die Absorber, die in der Tabelle 4.6 (12 verschiedene Absorber: sieben verschiedene Materialien, sechs Al verschiedene Dicken) wurden nun verwendet, um das Röntgenspektrum zu bestimmen. Dazu werden jetzt die verschiedenen Absorber in den Röntgenstrahl (DXT) gebracht und das Intensitätenverhältniss I/I_0 bestimmt. Dieses Verhältnis entspricht gerade der rechten Seite von Gleichung 4.10. Nach der Bestimmung der C_k durch Lösen des linearen Gleichsystems erhält man für das Röntgenspektrum den in Abbildung 4.12 dargestellten Verlauf

Material	Abschw.Koeff. μ bei 8keV [$1/m$]	I_0^* [Photonen/s]	I^* [Photonen/s]	I/I_0	Dicke [μm]
Al	0,0126	129789	96167	0,740	$23,8 \pm 0,4$
Al	0,0126	129551	52031	0,401	$72,4 \pm 0,8$
Al	0,0126	154578	39324	0,254	$108,6 \pm 1$
Al	0,0126	151001	9753	0,064	$217,4 \pm 2$
Al	0,0126	149338	2442	0,016	$326,5 \pm 3,2$
Al	0,0126	145863	605	0,004	$435,3 \pm 4,9$
Cu	0,0449	146678	15760	0,107	$49,7 \pm 0,4$
Zn	0,0402	162479	74597	0,459	$19,4 \pm 0,2$
Ta	0,2642	164187	6352	0,038	$12,3 \pm 0,1$
Mo	0,1533	155389	2506	0,016	$26,9 \pm 0,3$
Nb	0,1212	144851	312	0,002	$50,6 \pm 0,6$
Zr	0,0852	141269	13089	0,092	$27,9 \pm 0,3$

Tabelle 4.6: Die Bestimmung der Dicke.

Der Fehler von I_0 und I wird als der Würzel des Wertes geschätzt. Die Messunsicherheit der Dicke wurde mittels gaußschen Fehlerforstpflanzung bestimmt. Der Fehler des Abschwächungskoeffizient ist auf 2% geschätzt

(*) Mittelwert von viermal wiederholten Messungen.

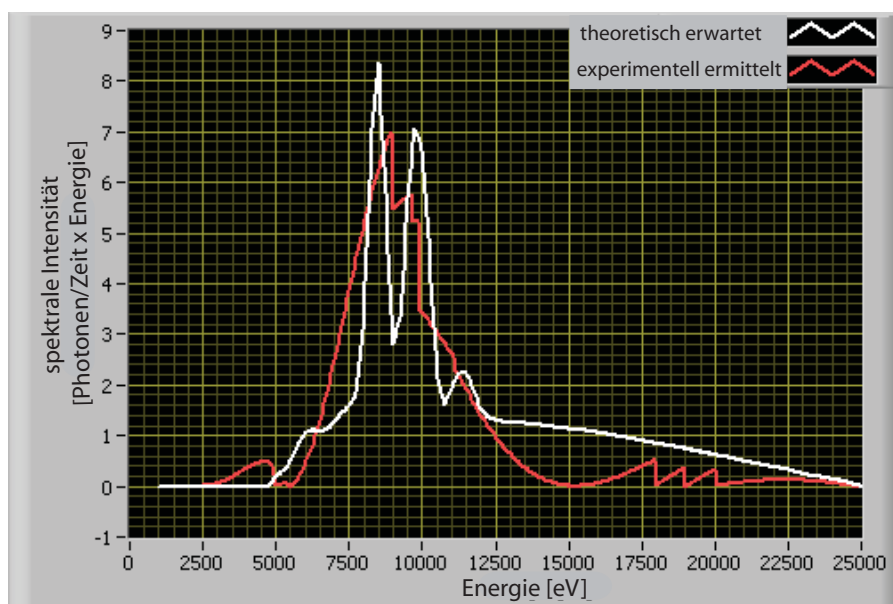


Abbildung 4.12: Die beiden Spektren (theoretisch erwartet und experimentell ermittelt).

4.5 Intensität

Anhand experimentell ermittelten Spektrum lässt sich unter Verwendung von Formel 4.12 der Photonenfluss bestimmen. Mit eingebautem Kollimator ergab sich ein Wert von $2,3 \pm 0,4 \times 10^8$ Photonen/s, ohne Kollimator ein Wert von $6 \pm 1 \times 10^8$ Photonen/s. Der angegebene Fehler beruht auf der Unsicherheit des bestimmten Spektrums, die wiederum von der Unsicherheit der bestimmten Absorberdicken und der Photodiodenmesswerten abhängt.

Diese Photonenflüsse entsprechen bei den gemessenen Strahlprofilen einem Photonenflächenfluss von ca. $1500 \text{ Photonen s}^{-1} \mu\text{m}^{-2}$ im Fokuspunkt. Bei einer Goldkristallgröße von 15 nm ergibt sich damit eine Rate von ca. $0,35 \text{ Photonen s}^{-1} \text{ Kristall}^{-1}$. Unter der sehr optimistischen Annahme, dass ein 15 nm Au-Kristall jedes 1000ste Photon in eine niedrigindizierte Richtung beugt, ergibt sich eine Rate von einem Photon / (Beugungsspot \times h), die um etwa zwei Größenordnungen unter der Nachweisgrenze der intensivierten CCD-Röntgenkamera liegt. Aus diesem Grund war es nicht möglich, mit dem DXT-Laborsystem Untersuchungen an einzelnen Goldkristallen in dieser Größenordnung (15 nm) vorzunehmen. Daher ergab sich die Motivation, Au-Kristalle in Mikrometerbereich herzustellen.

Kapitel 5

Untersuchung der Strahlenschädigung von 2CP-Proteinen und deren selektive Anbindung an Goldkolloide

5.1 Nachweis der Strahlenschädigung

Es sollte im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe weißer Röntgenstrahlung Konformationsänderungen des 2-CP in Abhängigkeit des umgebenden Redoxmilieus detektiert werden. Aus diesem Grund wurden Untersuchungen zur Strahlungsstabilität des 2-CP Protein durchgeführt, was in diesem Kapitel beschrieben wird.

Zur Durchführung der Bestrahlungsexperimente wurde das in Abschnitt 4.1.1 beschriebene Setup verwendet. Die im folgenden beschriebenen Strahlenschädigungsmessungen und deren Interpretation wurden von Simone Jacob in der AG von Professor Karl-Josef Dietz (Fakultät für Biologie Universität Bielefeld) durchgeführt und werde hier in stark zusammengefasster Form präsentiert. Ebenso fand die Vorbereitung der Proteine in dieser AG statt.

Zur Bestrahlung wurde die Proteinlösung (21 μ l) in eine Glaskapillare, die an einem Ende verschlossen ist, gefüllt (siehe Abbildung 4.5). Es wurden drei- und 16-stündige Röntgenbestrahlungen von 2-CP durchgeführt. Das 2-CP befindet sich entweder allein in der Lösung oder mit Gold-Kolloiden. Bei jeder Bestrahlung wurden immer zwei weitere identische Proben als Kontrollproben mitgeführt. Eine Kontrollprobe befand sich auf Eis und die andere wurde bei Raumtemperatur (RT) gehalten, während die Hauptprobe sich in dieser Zeit im Röntgenstrahl befand.

5.1.1 Nachweis der Strahlenschädigung ohne Au-Kolloide

Nach einer dreistündigen Röntgenbestrahlung mit einer Beschleunigungsspannung von 25 keV und einer Gesamtstrahlendosis von ca. 540 Gy wurde für das 2-CP weder eine

Veränderung in der Struktur noch hinsichtlich seiner ROS-entgiftenden Aktivität (reaktiver Sauerstoffspezies, siehe Abschnitt 2.7) im Vergleich zu den mitgeführten Kontrollproben detektiert. Die Abbildung 5.1 zeigt den Effekt dreistündiger Röntgenbestrahlung auf das 2-CP. (A) 2-CP wurde nach dreistündiger Röntgenbestrahlung und Kontrollinkubation auf Eis und bei Raumtemperatur in einem 12%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Silberfärbung detektiert. Es wurden keine Unterschiede hinsichtlich der auftretenden Bandenmuster und Proteinmengen beobachtet. (B) ROS-entgiftende Aktivität von 2-CP ist dargestellt im DNA-Schutzassay. Die verschiedenen Behandlungen wiesen keine Änderung der DNA-Schutzfunktion des 2-CP auf. 2 μg Plasmid-DNA wurde mit 6 μg BSA als Kontrolle oder mit 6 μg 2-CP, Lys11, His105, Lys174 oder DKS 5h bei 37°C inkubiert. K: unbehandeltes Plasmid [83, S. 376].

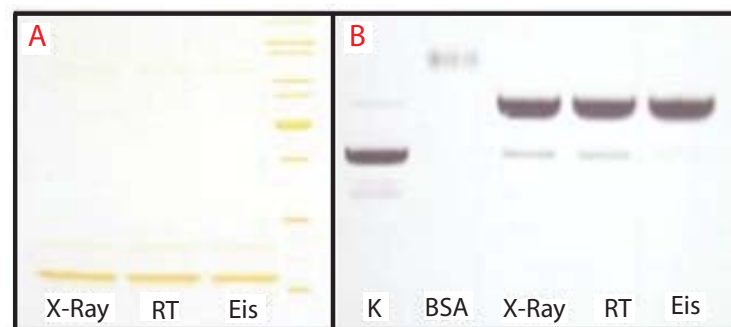


Abbildung 5.1: Effekt drei stündiger Röntgenbestrahlung auf das 2-CP (vergleiche Abbildung 3.20 Jacob [109]).

(A) 2-CP nach dreistündiger Röntgenbestrahlung und Kontrollinkubation auf Eis und bei Raumtemperatur. (B) ROS-entgiftende Aktivität von 2-CP ist dargestellt im DNA-Schutzassay.

Eine Erhöhung der Bestrahlungsdauer auf 16 Stunden entsprechend einer Gesamtdosis von ca. 2900 Gy verursachte im reduzierenden SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese [110, S. 25]) eine Abnahme der monomeren Form des 2-CP mit gleichzeitiger Zunahme der dimeren Form, sowie das Auftreten von Abbauprodukten, die im Western-Blot (die Übertragung von Proteinen, die anschließend über unterschiedliche Reaktionen nachgewiesen werden können, auf eine Trägermembran) durch einen 2-CP-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden konnten (Abb. 5.2). Vor dem Western Blot wird ein Proteingemisch mit Hilfe einer Gel-Elektrophoretetechnik in einer Trägermatrix entsprechend ihres Molekulargewichts oder Größe aufgetrennt. Hierbei werden die zu untersuchenden Proteine zuerst mit einem Polyacrylamid-Gel in Proteinbanden aufgetrennt. Beim Western Blot wird ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt. Somit wandern die Proteine aus dem Gel auf eine Membran. An der Membranoberfläche bleiben sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Die Proteine sind nun aber für weitere Methoden zugänglich. Durch Chemielumineszenz wurde ein Film belichtet und entwickelt. Der Western-Blot durch einen 2-CP-spezifischen Antikörper lässt auf eine spezifische

Schädigung des Proteins schließen. Die mit DTT (Dithiothreitol, eine chemische Verbindung) nicht zu reduzierenden Dimere (ein Molekül, das aus zwei oft identischen Untereinheiten) lassen vermuten, dass es während der Behandlung mit Röntgenstrahlung zu einer Überoxidation des Proteins kommt [83, S. 377].

5.1.2 Nachweis der Strahlenschädigung mit Au-Kolloide

Die Bestrahlung des Proteins in Anwesenheit von 40 nm Goldkolloiden sollte Aufschluss über eine zusätzliche Schädigung des Proteins in Anwesenheit von Au-Kristallen geben. Die Abbildung 5.2 zeigt den Effekt 16-stündiger Röntgenbestrahlung mit einer Gesamtstrahlendosis von etwa 2900 Gy. Sie verursachte eine Abnahme der monomeren Form des 2-CP zugunsten größerer Aggregate. (A) Das silbergefärbte 12%ige Polyacrylamidgel zeigt Proteinproben nach 16-stündiger Röntgenbestrahlung sowie Kontrollproben nach Inkubation auf Eis oder bei Raumtemperatur. Während die Proteinmenge in beiden Kontrollen unverändert blieb, führte die Röntgenbestrahlung zu einer Abnahme der monomeren Form des 2-CP (mit Pfeil gekennzeichnet) gleichermaßen in den Proben mit und ohne Gold. (B) Die Beladung des Polyacrylamidgels mit einer höheren Proteinmenge in Kombination mit einer intensiveren Silberfärbung indiziert einerseits das verstärkte Vorkommen eines kleineren Fragments (rote Markierung) und andererseits das Auftreten von 2-CP-Dimeren. (C) Der immunchemische Nachweis mit einem 2-CP-spezifischen Antikörper zeigte, dass es sich sowohl bei dem kleinen Fragment als auch bei den höheren Aggregaten um 2-CP handelte. Die Experimente wurden mindestens dreimal mit gleichem Ergebnis durchgeführt [83, S. 377].

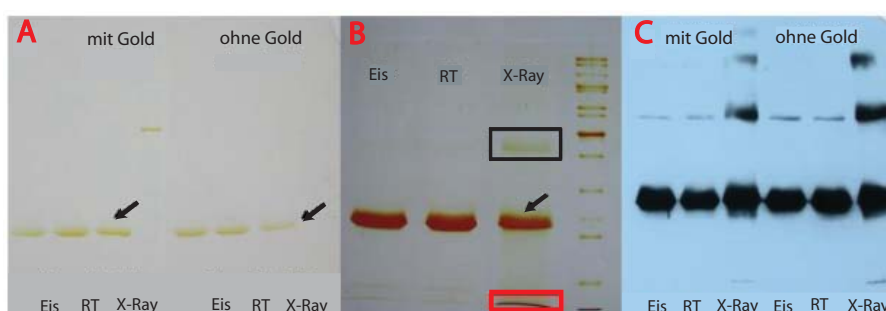


Abbildung 5.2: Effekt 16-stündiger Röntgenbestrahlung (vergleiche Abbildung 3.21 Jacob [109]).

(A) Das silbergefärbte 12%ige Polyacrylamidgel. (B) Die Beladung des Polyacrylamidgels mit einer höheren Proteinmenge in Kombination mit einer intensiveren Silberfärbung. (C) Der immunchemische Nachweis mit einem 2-CP-spezifischen Antikörper.

Auch bezüglich seiner Funktionalität konnten deutliche Unterschiede zwischen röntgenbestrahlten Proben und Kontrollproben von 2-CP beobachtet werden. Eine Untersuchung der Peroxidase-Aktivität im Trx- und TR-abhängigen Regenerationssystem (Abb. 2.12) zeigte eine signifikant verringerte H_2O_2 -Umsatzrate nach Röntgenbestrahlung in An- und Abwesenheit von Gold (Abbildung 5.3). Zusätzlich konnte ein signifi-

kanter Unterschied zwischen diesen beiden Proben gezeigt werden, was auf eine zusätzliche Schädigung von 2-CP in Anwesenheit von Gold-Kolloiden schließen lässt.

Die Abbildungen 5.3 und 5.4 zeigen die Inhibition der H_2O_2 -Entgiftungsaktivität des 2-CP nach 16-stündiger Röntgenbestrahlung, wobei Abbildung 5.3 die Zeitabhängigkeit des H_2O_2 -Umsatzes durch 2-CP als Absorptionsänderung bei 340 nm in Folge von NADPH-Oxidation zeigt (siehe Abschnitt 2.7. Bei der Abbildung 5.4 wurde die H_2O_2 -Entgiftungsaktivität des 2-CP nach 16-stündiger Behandlung der Probe unter unterschiedlichen Bedingungen bestimmt. Die Umsatzraten sind angegeben als Mittelwert \pm Standardfehler, $n = 8$ bis 38 (n ist die Stich-Probenmengen, siehe Abbildung). Unterschiedliche Buchstaben weisen auf signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen hin (Student's T-Test mit mindestens $p < 0,1$) [83, S. 378].

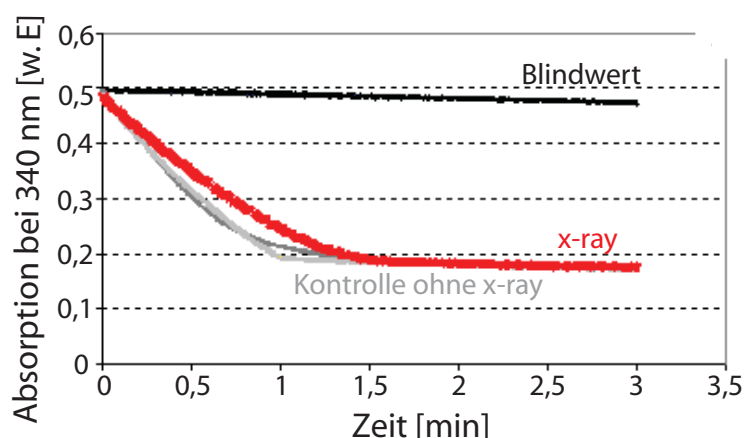


Abbildung 5.3: Inhibition der H_2O_2 -Entgiftungsaktivität des 2-CP nach 16-stündiger Röntgenbestrahlung (vergleiche Abbildung 3.27 Jacob [109]).

Das ist ein photometrischer Nachweis. Die schwarze Kurve ist für den Blindwert (ohne Proteine), rote Kurve ist mit Röntgenstrahlung und Proteine, die beiden grauen Kurven stehen für die Kontrollproben. Bei diesen Proben wurde das Protein bei 0°C (auf Eis) sowie bei Raumtemperatur gehalten und keiner Röntgenstrahlung eingesetzt.

In den Kontrollmessungen (Eis und Raumtemperatur) zeigten sich hingegen keine Unterschiede zwischen den Aktivitäten der jeweils mit und ohne Gold inkubierten Proben (Abb. 5.5). Darüber hinaus wurden Testmessungen mit verschiedenen Konzentrationen und Größen von Gold-Kolloiden durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Sie lassen für die eingesetzte Art und Konzentration der Kolloide eine Beeinträchtigung der Messungen ausschließen. Somit lässt sich sagen, dass die Hemmung der Peroxidase-Aktivität ursächlich auf die Behandlung mit Röntgenstrahlen zurückzuführen ist. Die Abbildung 5.5 zeigt die H_2O_2 -Entgiftungsaktivität des für 16 Stunden bestrahlten 2-CP (Eis, RT, X-Ray) in Anwesenheit (A) und Abwesenheit von Gold-Kolloiden (B). Die H_2O_2 -Umsatzraten sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 8$ bis 38 (n ist die Stich-Probenmengen, siehe Abbildung) [83, S. 379].

Während die Peroxidase-Aktivität der Proben durch Röntgenbestrahlung um nicht mehr als 25 % herabgesetzt wurde, zeigte sich im DNA-Schutzassay ein deutlich stärker-

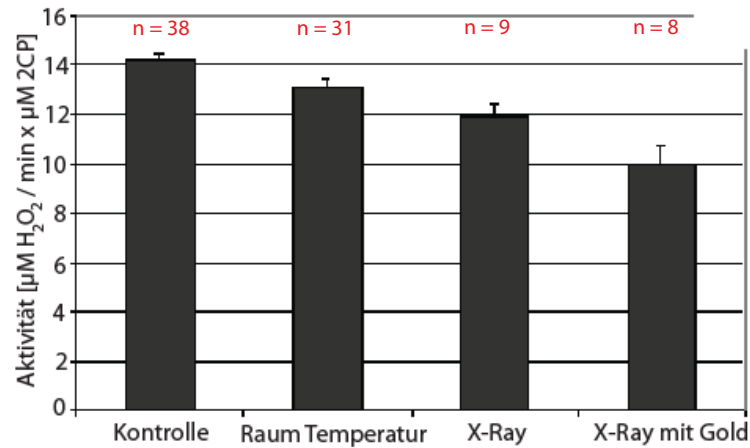


Abbildung 5.4: Die H₂O₂-Entgiftungsaktivität des 2-CP nach 16-stündiger Behandlung der Probe unter unterschiedlichen Bedingungen (vergleiche Abbildung 3.31 Jacob [109]). Die Fehlerbalken sind als Standardfehler (Standardabweichung/ \sqrt{n}). Der untere Balken ist im Histogramm verdeckt.

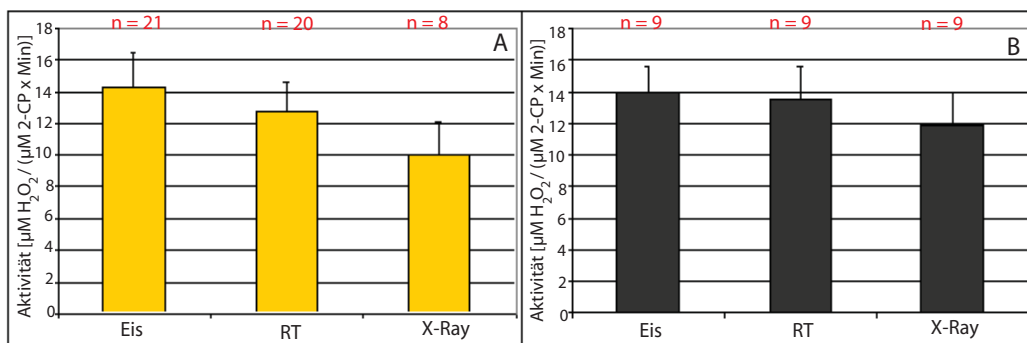


Abbildung 5.5: H₂O₂-Entgiftungsaktivität des für 16 Stunden bestrahlten 2-CP (vergleiche Abbildung 3.31 Jacob [109]). Die Fehlerbalken sind hier als Standardabweichung. Der untere Balken ist im Histogramm verdeckt.

rer Effekt. Die zugesetzte Plasmid-DNA wurde in Anwesenheit des röntgenbestrahlten 2-CP fast vollständig degeneriert, wohingegen die Kontrollproben eine Schutzfunktion aufwiesen (Abb. 5.6). Auch in diesem Ansatz zeigte sich erneut eine stärkere Schädigung der mit Gold-Kolloiden inkubierten Probe, die Plasmid-DNA war hier komplett abgebaut. Vergleichende Ansätze mit unterschiedlichen Konzentrationen unbehandelten Proteins zeigten sogar bei 1 pM 2-CP im Ansatz keine Beeinträchtigung der Schutzfunktion (Daten nicht gezeigt), was auf eine immense Schädigung der bestrahlten Proben (6 μg eingesetztes Protein entsprechen einer Konzentration von 6,2 μM) hinweist. Um die starke Diskrepanz der Funktionalitätsverluste zwischen Peroxidase-Aktivität und DNA-Schutzfunktion genauer zu charakterisieren, wurde letztere in Anwesenheit des 2-CP-Regenerationssystems aus Trx und TR untersucht (Daten nicht gezeigt). Durch Einsatz dieser Elektronendonoren konnte die DNA-Schutzfunktion der bestrahlten Proben verbessert werden [83, S. 19].

Die Abbildung 5.6 zeigt die DNA-Schutzassay nach Bernier-Villamor [82]. 16-stündige Röntgenbestrahlung des 2-CP führte zu einem Verlust von dessen DNA-Schutzfunktion in Gegenwart von ROS. Die eingesetzte Plasmid-DNA wurde im Gegensatz zu den Kontrollproben (Eis, RT) fast vollständig degeneriert. Dieser Effekt wurde bei Bestrahlung in Gegenwart von Gold-Kolloiden verstärkt. 2 μg Plasmid-DNA wurden mit 6 μg BSA als Kontrolle oder 6 μg behandeltem 2-CP 5h bei 37°C inkubiert.

K⁻: unbehandeltes Plasmid, K⁺: mit ROS-Ansatz inkubiertes Plasmid. Das Experiment wurde dreimal mit gleichem Ergebnis durchgeführt [83, S. 379].

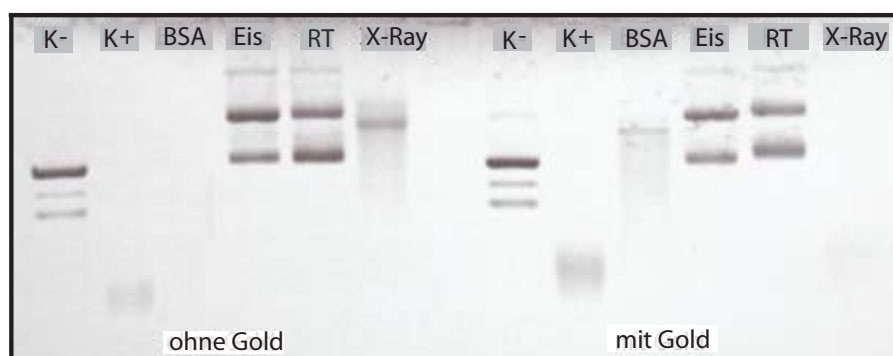


Abbildung 5.6: DNA-Schutzassay [83, S. 379]

Es ist noch darauf hinzuweisen, dass bei dem verwendeten Aufbau von Abschnitt 4.1.1 mehr als 93% der eintretenden Strahlung von der Proteinlösung absorbiert wird. Die mit diesem Aufbau deponierbaren Energiedosen im Kapillarvolumen (21 μl) lagen bei ca. 0,05 Gray/s (Beschleunigungsspannung 25 kV, Leistung 50 W). Nach einer 16-stündigen Bestrahlungszeit ergibt dies eine Gesamtdosis von ca. 2900 ± 500 Gy. Diese Messungen zeigen, dass die Stabilität des 2-CP Proteins nicht so stark ist, um seine Konformationsänderung mit Strahlung höhere Intensitäten wie mit Synchrotronstrahlung zu untersuchen.

Kapitel 6

Präparation der Nano-Röntgenspiegel und Au-Kristalle

Zur Herstellung von künstlichen Nanokristallen als Label für das DXT-Verfahren wurden verschiedenen Methoden angewandt, um Kristalle zu präparieren, die klein genug sein sollen, um die Bewegung der Proteine nicht zu beeinflussen, aber auch gleichzeitig groß genug, um Beugungsaufnahmen mit dem DXT-Experiment zu ermöglichen. Als erstes wurden Nano-Mo/Si Multilayerspiegel hergestellt. Sie haben sich aber später für den Einsatz im DXT-Experiment als ungeeignet erwiesen. Danach wurden Nano-Goldkristalle hergestellt. Sie waren jedoch zu klein, um Beugungsaufnahmen mit dem verwendeten DXT-Laborsystem an einem Einkristall zu ermöglichen. Deswegen wurden größere Goldkristalle im Mikrometerbereich präpariert.

6.1 Nano-Mo/Si Multilayerspiegel

Die Präparation der Mo/Si Nanokristalle ist schematisch in Abbildung 6.1 dargestellt. Das Mo/Si Multischichtsystem besteht aus fünf Doppellagen mit Doppelschichtdicken von 7 nm, aufgebracht auf einem photolackbeschichteten Si-Wafer. Anschließend wurde eine Ätzmaske aus SiO₂ (25 nm Durchmesser) auf der Oberfläche aufgebracht [111, S. 417]. Die Ätzung der Probe erfolgte durch reaktives Ionenätzen (RIE) in einem CF₄ Plasma. Hierbei wird ausgenutzt, dass sich der Multilayer schneller ätzt als die kolloidale Ätzmaske. Zunächst wurden die Kolloide abgespült und der geätzte Multilayer mit einem Resistremover vom Substrat abgelöst [111, S. 417]. Die in der Lösung vorhandenen geätzten Multischichtfragmente wurden auf eine Si₃N₄ Membran aufgebracht und anschließend im TEM abgebildet. Das Ergebnis wird in Kapitel 9 präsentiert.

Die Mo/Si Nanokristalle haben sich aber als ungeeignet für den Einsatz im DXT-Experiment erwiesen, weil sie die Bragg-Gleichung nur bei kleinem Glanzwinkel und kleinen Beschleunigungsspannungen erfüllen. Daraus erfolgt erstens eine starke diffuse

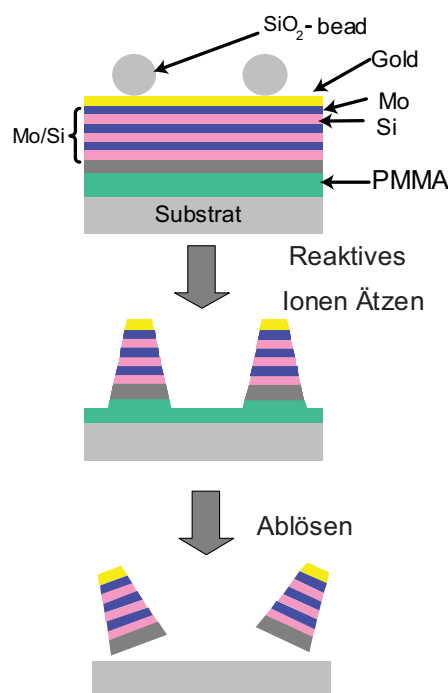


Abbildung 6.1: Schematische Darstellung der Herstellung der Nano-Mo/Si-Multilayerspiegel

Streuung unter diesem kleinen Winkel, zweitens ein maximaler detektierbarer Kippwinkel von etwa 1° (5 keV: $1,42^\circ$, 8 keV: 1° , 20 keV: $0,36^\circ$).

6.2 Au-Nanokristalle

Die Theorie der Entwicklung von Dünnschicht und Wachstum von verdampften Gold an der (100)-NaCl-Oberfläche wurde ausgiebig von vielen Forschern studiert [112]. Das Au-NaCl-System wird in der Regel für Studien über die Kondensation von Dampf von Metallen auf Oberflächen gewählt [113] [114].

Die Au-Nanokristalle wurden mit Hilfe eines Molekularstrahlepitaxieverfahren präpariert. Gold wurde mit Hilfe eines Verdampfers im UHV auf einem frisch gespalteten Salzkristall aufgedampft. Die Salzkristalle wurden von der Firma SPI Supplies Division of Structre Probe Inc. bezogen. Sie haben ein Würfelformat mit der Kantenlängen von ca. 12 mm und eine Dichte von $2,165 \text{ g/cm}^3$ [115]. Sie werden zunächst in der normalen Raumatmosphäre mit Hilfe eines Tapetenmessers und eines Hammers in eine für die Halterung in der Aufdampfanlage passende Größe ($8 \times 8 \times 3 \text{ mm}^3$) gebracht (siehe Abbildung 6.2 A).

Die Kristalle wurden in die Schleuse gebracht und dort werden sie ein zweites Mal unter HV-Bedingungen bei Druck $< 1 \cdot 10^{-4} \text{ Pa}$ gespalten. Der Kristall wird dann sofort in die Hauptkammer transferiert. In dieser Kammer herrscht ein Basisdruck vor dem Beginn des Verdampfverfahren von ca. 10^{-7} Pa .

Es wurden Proben mit unterschiedlichen Substrattemperaturen zwischen 180°C und

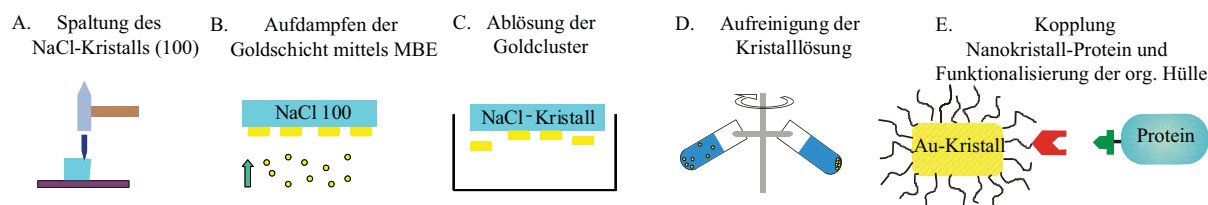


Abbildung 6.2: Schematische Darstellung der Präparation der Nanokristalle.

330°C, mit verschiedenen deponierten Goldmengen und mit unterschiedlichen Substratpotentialen hergestellt.

Nach dem Aufdampfen wurde für eine Zeit von 5 Minuten weiter geheizt, um der Oberflächendiffusion eine Nachlaufzeit zu geben. Nach einem ca. einstündigen Abkühlprozess wurde die Probe ausgeschleust und stand zur Charakterisierung zur Verfügung. Zur Untersuchung der Proben mittels AFM oder XRD ($\text{CuK}\alpha$) wurden keine weiteren Präparationsmaßnahmen durchgeführt. Für TEM-Untersuchungen sowie für Proteineanbindungsexperimente wurden die folgenden Schritte gem. Abbildung 6.2 durchgeführt: C und D für TEM dann E für die Anbindung an Proteine. Erst erfolgt die Ablösung der Goldkristalliten bzw. Cluster vom Salz. Dazu wurde die hergestellte Probe zur Ablösung der Au-Kristalle in eine wässrige CHAPS-Lösung (50 mMol) getaucht (CHAPS: 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethyl-ammino]-propan-Sulfonsäure (siehe Abbildung 6.3)). Es hatte die Funktion durch Ausbildung einer organischen Hülle mittels Selbstorganisation die Au-Nanokristalliten zu stabilisieren.

Die Aufreinigung der Kristalllösung wird durch Zentrifugieren (5 min / 16000g) durch-

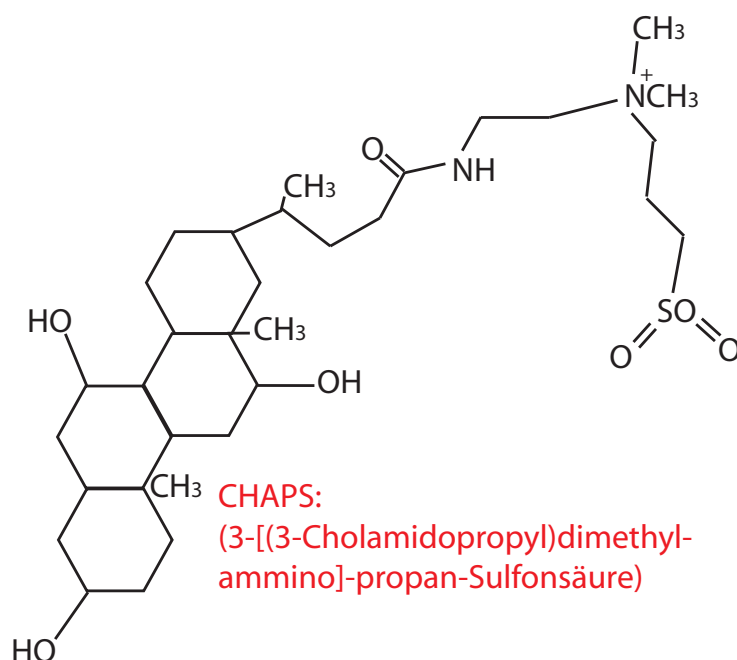


Abbildung 6.3: Darstellung der chemischen Struktur von CHAPS.

geführt. Aufgrund der hohen Dichte der Au-Kristalle ($19,3 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$ [116]) lassen sie sich sehr

leicht aus der Lösung sedimentieren (Abbildung 6.2 D). Der Lösungsmittelüberstand wurde entfernt und durch destilliertes Wasser ersetzt. Der Prozess des Zentrifugierens wurde ein zweitesmal durchgeführt, um NaCl- und CHAPS-Restkonzentration auf ein Minimum zu reduzieren.

Zur Untersuchung der Ausrichtung der Kristalle mittels des Laue-Verfahrens wurden die Goldkristalle durch Aufbringen eines Polymers oder Sekundenkleber (Firma UHU) auf der aufgedampften Oberfläche vom Salz getrennt (siehe Abbildung 6.4). Das Polymer der Firma Photonic Cleaning Technologies, bezeichnet als First Contact [117, S 1-5], wurde mit einem feinen Pinsel auf die aufgedampfte Oberfläche gestrichen. Nach einer Trockenzeit von 15 Minuten wurde die ganze Probe in destilliertes Wasser eingetaucht. Das Salz ließ sich ablösen, aber die Polymerfolie, auf der viele Goldcluster klebten, befand sich auf der Wasseroberfläche. Die Polymerfolie wurde noch einmal mit destilliertem Wasser gewaschen. Sie wurde ein paar Minuten getrocknet und dann auf einem Probenhalter aufgebracht. Das gleiche Verfahren wurde auch mit dem Sekundenkleber durchgeführt.

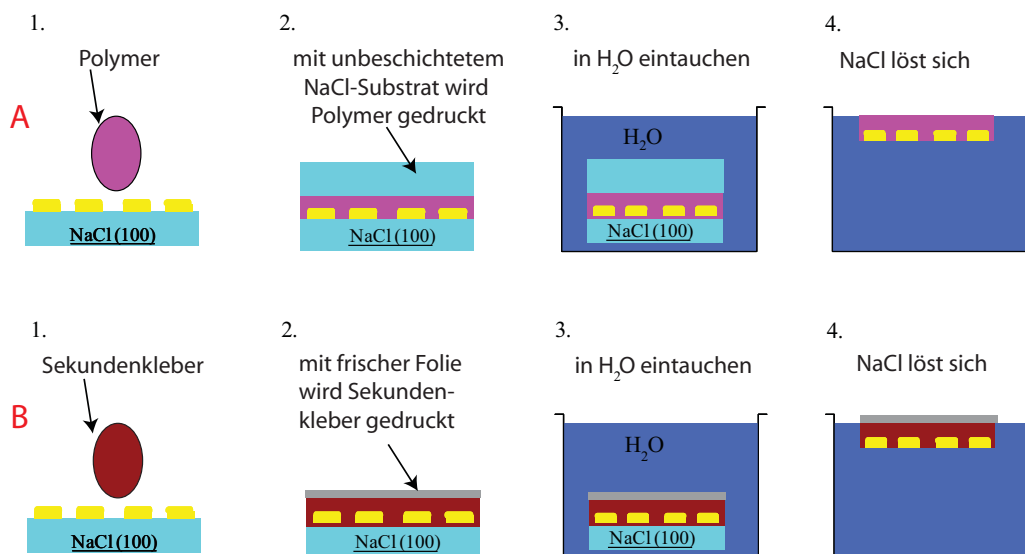


Abbildung 6.4: Schematische Darstellung der Enbettung der Goldkristalle in A) eine Polymerschicht und B) Sekundenkleber.

6.3 Au-Mikrokristalle

Zur Präparation der Au-mikrokristalle wurden zwei verschiedene Verfahren verwendet. Erstens wurde Gold auf Si-Substrate mit nativer Oxidschicht aufgesputtert, zweites auf Si-Substrate mit künstlich hergestellter Oxidschicht.

Es wurde als erstes eine 100 nm dicke Goldschicht mittels eines Sputterverfahrens auf ein Si-Waferstückchen aufgebracht (Si(100 n-type) [118], $10 \times 10 \text{ mm}^2$). Die Sputter-Parameter sind in der Tabelle 6.1 aufgetragen. Nach dem Sputternverfahren wurden die Si-Waferstückchen unter UHV-Bedingungen über einen Zeitraum von 1-18 h bei 600-900°C annealt.

Target	Goldring
Substrat	Si mit natürlicher sowie künstlicher SiO ₂ -Schicht
Sputtergas	Ar (100 mTorr, 13,3 Pa)
Spannung	900 V
Strom	23 mA
Sputterrate	0,11 nm/s dies entspricht 100 nm/ 15 min

Tabelle 6.1: Die wichtigsten Parameter beim Sputtern von Gold auf frisch gereinigtem Si(100)-Substrat.

Beim zweiten Verfahren wurden zunächst die Si-Waferstückchen wie beim ersten Verfahren aufgesputtert (die gleichen Parameter), aber anschließend in den 3-Zonenofen gebracht. Dieses Verfahren wurde auch mit SiO₂-Wafer durchgeführt.

Es wurde mit diesem Verfahren der Einfluss der Temperatur, der Temper-Zeit und der deponierten Menge auf die Mikrokristalle systematisch untersucht.

Zur Untersuchung des Einflusses der Temperatur auf die Au-Kristalle wurden die aufgesputterten Si-Proben bei verschiedenen Temperaturen zwischen 900°C und 1080°C in 30°C-Schritten bei der gleichen Temper-Zeit (Abbildung 6.5) von drei Stunden präpariert. Alle Proben hatten eine Au-Schichtdicke von 100 nm.

Abbildung 6.5 ist eine schematische Darstellung des Temperaturverlaufs beim Annealing. Die Temperatur steigt erstmal auf, bis die gewünschte Temperatur erreicht wird. Die Aufstieg-Zeit ist unterschiedlich je nach dem welche Soll-Temperatur erreicht werden soll. Sie bleibt in der gesamten Temper-Zeit (2, 3, 7, 10) konstant, danach fällt sie wieder langsam ab.

Zur Untersuchung des Einflusses der deponierten Goldmengen wurde Gold auf Si-

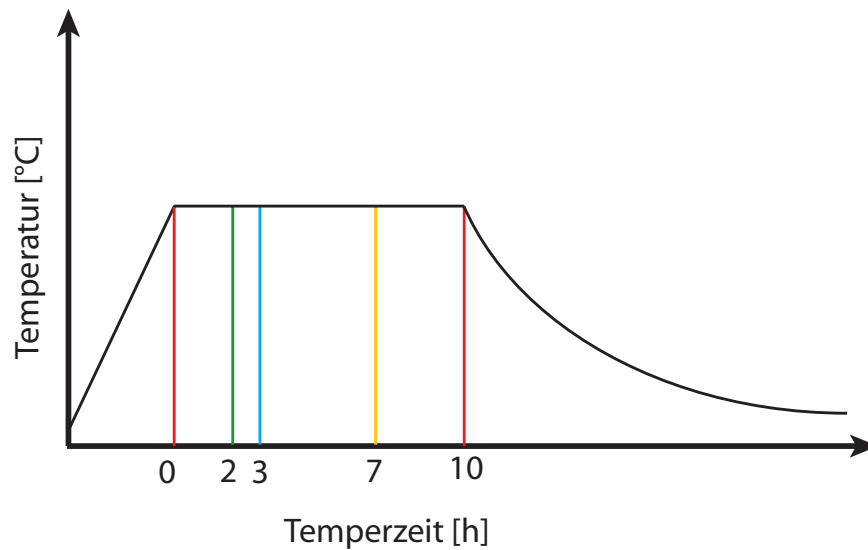


Abbildung 6.5: Schematische Darstellung des Temperaturverlaufs beim Annealing.

Substrate in verschiedenen Mengen zwischen 50 nm und 250 nm mit der Sputteranlage aufgebracht. Alle Proben waren bei der gleichen Temperatur von 1050°C und der gleichen Temper-Zeit (drei Stunden) im Ofen.

Zur Untersuchung des Einflusses der Temper-Zeit (Abbildung 6.5) wurden die aufgesputterten Si-Proben zwei, drei, sieben und zehn Stunden bei 1050°C annealt. Alle Proben hatten eine Sputtermenge von 100 nm.

Der Einfluss der Temperatur, der Temper-Zeit sowie der deponierten Goldmenge werden im Kapitel 7 gezeigt und deren Ergebnisse diskutiert.

Kapitel 7

Charakterisierung von Au-Kristallen auf NaCl(100)-Oberflächen mit AFM, XRD und Röntgenbeugung

In diesem Kapitel sollen nun die Ergebnisse der präparierten Nano-Goldkristalle auf NaCl im Bezug auf ihre Form, Größe, Höhe, Verteilung, Flächendichte und deren Ausrichtung auf der NaCl-Substratoberfläche dargestellt werden. Dabei werden die Ergebnisse nach den Einflüssen der unterschiedlichen durchschnittlichen Au-Schichtdicke, der Substrattemperatur und des Potentials der Probenhalterung geordnet. Zum Vergleich der Messungen von Au-NaCl-Proben wurden auch im ersten Abschnitt dieses Kapitel Messungen an einem reinem NaCl-Substrat durchgeführt.

Die Auswertungen der Nano-Goldkristalle in diesem Kapitel ergeben sich aus den AFM-Daten, den Röntgendiffraktometrie Messungen sowie den Beugungsaufnahmen des DXT-Experiments.

Die Ausrichtung der Kristalle auf dem Substrat sowie die Größe der Kristalle wurden bei der Röntgendiffraktometrie mit $\text{CuK}\alpha$ -Strahlung vermessen. Die Form der Kristalle sowie deren Größe, Höhe und Verteilung wurden anhand der AFM-Daten bestimmt.

Die Berechnung der lateralen Größe bzw. der Höhe und der Fläche der Kristalle erfolgte mit dem Programm SPIP.

7.1 Charakterisierung des NaCl-substrates

Die Kristallstruktur von NaCl ist in Abbildung 7.1 zu sehen. Sie hat ein kubisches Raumgitter mit einer Gitterkonstante von 0,5649 nm [1, S. 1340]. NaCl bricht bei der Kristallspaltung bevorzugt entlang der 100-Richtung (Würfelkanten) [119]. Dies ermöglicht eine definierte Substratoberfläche, die zumindest in kleinen Bereichen im mikroskopischen Maßstab atomar glatt ist.

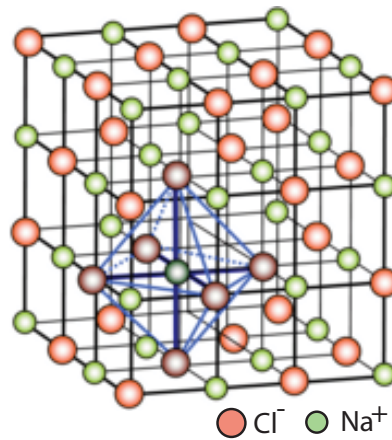


Abbildung 7.1: Schematische Darstellung des NaCl-Kristallaufbaus

Die Abbildungen 7.3 und 7.3 zeigen Röntgendiffraktometrie-messungen von einem gespaltenen NaCl-Kristall, wobei Abbildung 7.2 eine $\Theta/2\Theta$ -Messung wiedergibt. Die Messung wurde bei $2\Theta = 30^\circ$ gestartet, weil keine Peaks unter diesem Winkeln zu erwarten sind. Sie zeigt einen NaCl(200)-Peak bei $2\Theta = 31,6^\circ$ und einen NaCl(400)-Peak bei $2\Theta = 66,1^\circ$. Der Peak von NaCl(200) tritt sehr stark auf und hat fast das 10-fache an Counts als der NaCl(400) Peak. Die Abbildung 7.3 stellt die Rocking-Kurve des NaCl(200)-Peaks bei $\Theta = 15,8^\circ$ dar. Die Verteilung dieser Kurve ist asymmetrisch.

Die Abbildung 7.4 zeigt eine AFM-Aufnahme von der Oberfläche eines frisch gespaltenen Salzkristalls. Die einzelnen atomaren Stufen sind hier sehr gut zu erkennen. Die atomar glatten Flächen sind ca. $100 \times 100 \text{ nm}^2$ groß.

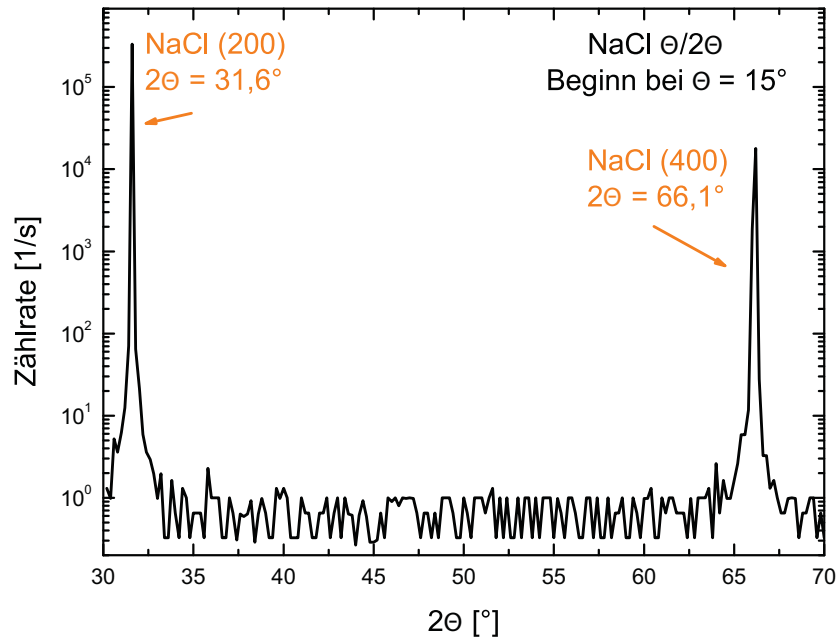


Abbildung 7.2: $\theta/2\theta$ -Messung des NaCl-Kristalls

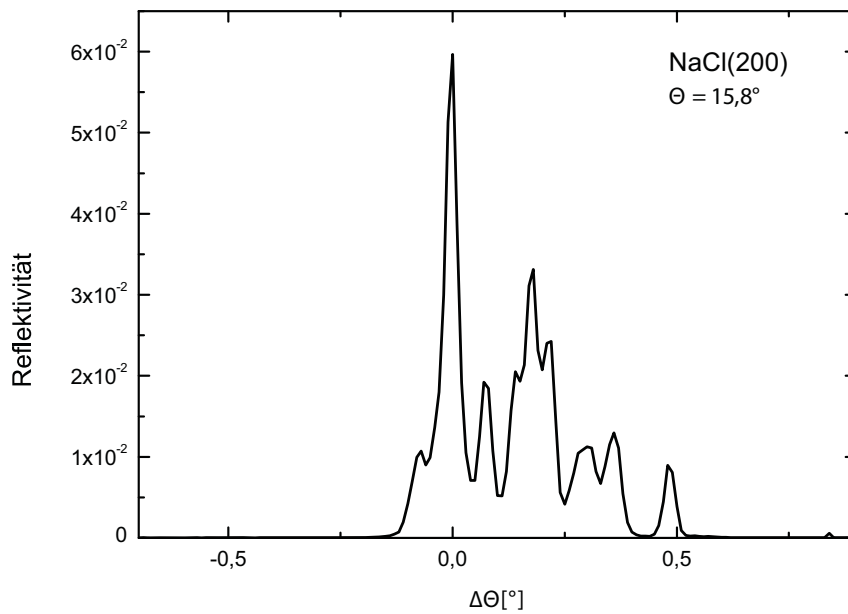


Abbildung 7.3: Rocking-Kurve des NaCl-Kristalls ((200)-Peak)

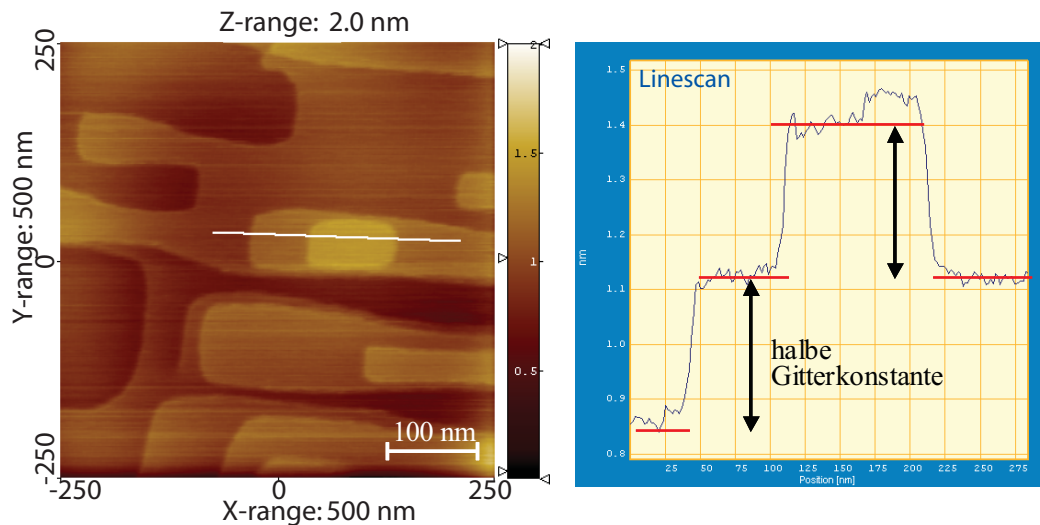


Abbildung 7.4: AFM-Aufnahmen der Oberfläche eines frisch gespaltenen NaCl-Kristalls.

7.2 Einfluss der deponierten Goldmenge

Die präparierten Schichtdicken von 1 nm, 2 nm, 4 nm und 8 nm wurden mit der gleichen Aufdampftrate von 0,25 nm/min und der gleichen Substrat-Temperatur von 250°C hergestellt.

Zunächst wurden die mit dem Gold bedampften NaCl-Kristalle mit dem Röntgendiffraktometer vermessen. Eine beispielhafte $\Theta/2\Theta$ -Messung und sowie die zum Au(200)-Peak gehörige Rocking-Kurve einer Probe mit einer durchschnittlichen aufgedampften Goldschichtdicke von 2 nm sind in den Abbildungen 7.5 und 7.6 dargestellt. Die $\Theta/2\Theta$ -Messungen und die Rocking-Kurve-Messungen von den anderen Proben mit 1 nm, 4 nm und 8 nm aufgedampften Goldschichtdicken werden hier nicht gezeigt, deren Ergebnisse sind aber in der Abbildung 7.8 dargestellt. Die Messungen zeigen im Vergleich zu $\Theta/2\Theta$ -Messungen von NaCl ohne Gold (Abbildung 7.3) einen deutlichen Peak bei einem Glanzwinkel von $\Theta = 22,2^\circ$ die dem Au(200)-Reflex zugeordnet werden kann. Andere Peaks sind sehr schwach ausgeprägt, sodass die Au(200)-Ausrichtung hier eindeutig dominiert (nur bezüglich zu anderen Au-Peaks). Die Au(111)-Ausrichtung ist nicht zu beobachten, sie ist bei $\Theta = 19,8^\circ$ zu erwarten.

Die Werte der lateralen Größe der Goldkristalle L , die aus den Röntgendiffraktometerdaten bestimmt wurden, sind in der Abbildung 7.8 dargestellt. Die laterale Größe beträgt durchschnittlich 5 nm bei einer Aufdampfmenge von 1 nm, sie wächst auf etwa 11 nm bei einer Aufdampfmenge von 2 nm und dann auf etwa 12 nm bei einer Aufdampfmenge von 4 nm. Sie erreicht ca. 14 nm bei einer Aufdampfmenge von 8 nm. Der Fehler der Messwerte ist in der Abbildung 7.8 zu sehen. Der Fehler der aufgedampften Schichtdicke ist abgeschätzt. Dafür wurden drei Messungen für jede aufgedampfte Schichtdicke vorgenommen. Dann wurden der Mittelwert und seine Standardabweichung bestimmt.

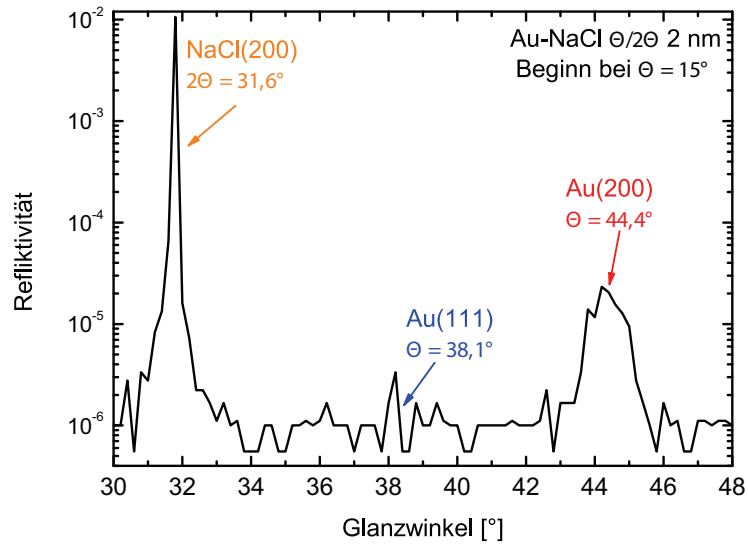


Abbildung 7.5: $\theta/2\theta$ -Messungen der verschiedenen aufgedampften Au-Schichtdicken auf NaCl

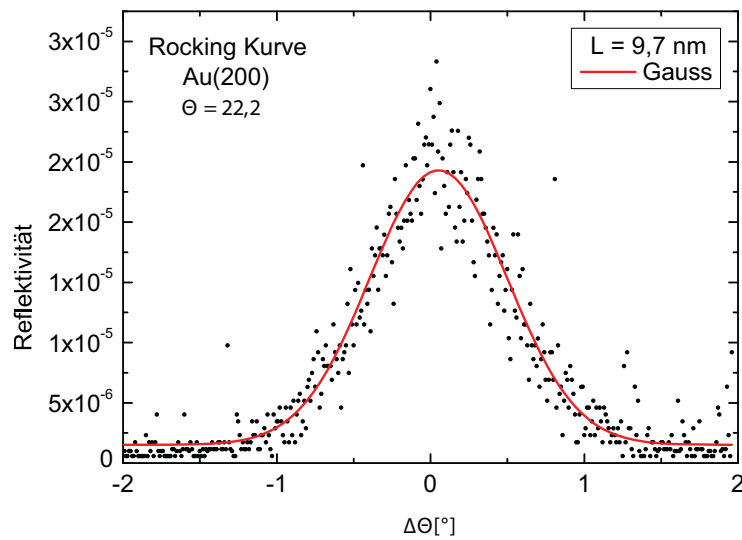


Abbildung 7.6: Rocking-Kurve von Au(200) einer Probe mit 2 nm Au-Schichtdicke auf NaCl

Nach der Charakterisierung der Proben mittels Röntgendiffraktometrie wurden die Proben mit dem AFM untersucht. Die Abbildung 7.7 zeigt beispielhafte AFM-Aufnahmen von Proben mit verschiedenen deponierten Goldmengen auf NaCl mit der Anordnung A für 1 nm, B für 2 nm, C für 4 nm und D für 8 nm. Es ergeben sich bei größeren Schichtdicken größere Cluster (laterale bzw. Fläche und vertikale Größe). Die laterale Größe wächst von durchschnittlich 8 nm bei 1 nm auf 14 nm bei 2 nm, dann auf 22 nm bei 4 nm bis auf 48 nm bei 8 nm (siehe Abbildung 7.8).

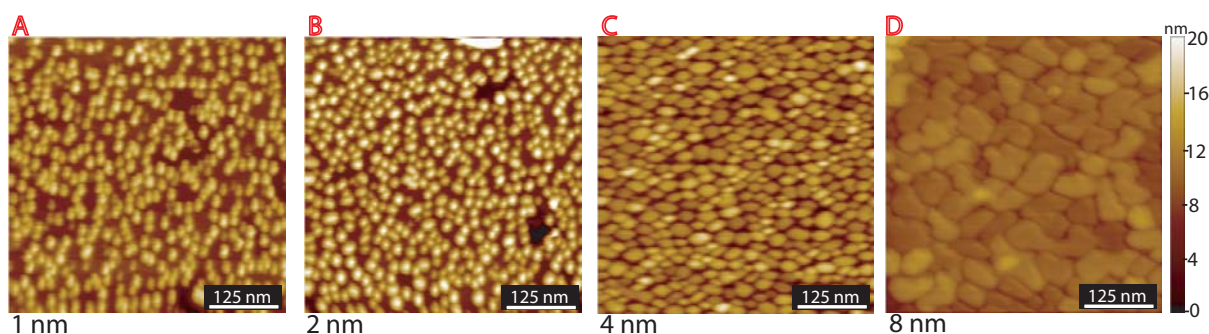


Abbildung 7.7: AFM-Aufnahmen der verschiedenen aufgedampften Au-Schichtdicken auf NaCl

Präparationsparameter: Substrattemperatur 250°C, Substratpotential 0 V, Aufdampftrate 0,25 nm/min

Ab einer Schichtdicke von 4 nm tritt eine Agglomeration der Goldcluster und damit ein Rückgang der Zahl der Cluster pro Fläche ein. Die Flächendichte die bei den Proben mit 1 nm, 2 nm und 4 nm Schichtdicke ein nahezu konstanter Wert von ca. $2000 \mu\text{m}^{-2}$ aufweist, bei 8 nm zeigt eine deutliche Abnahme auf gerade noch $300 \mu\text{m}^{-2}$. Dieses Verhalten ist ein Zeichen für das Wachstum von Clustern an Nucleationspunkten, vermutlich an Defekten des NaCl-Gitters.

In Abbildung 7.8 sind die Ergebnisse der AFM- und XRD-Messungen bezüglich der lateralen und vertikalen Cluster bzw. Kristallgröße dargestellt. Die Präparationsparameter der Proben waren, Substrattemperatur 250°C, Substratpotential 0 V, Aufdampftrate 0,25 nm/min. Es ist zu erkennen, dass eine Erhöhung der entsprechenden deponierten Goldmenge zu einem nahezu linearen Cluster-Wachstum führt, wobei dieses Kristallwachstum ab einer Goldschichtdicke von ca. 2 nm abnimmt und dann nahezu konstant bleibt. Die ungefähr gleichen Werte für die Kristall- bzw Clustergröße deuten auf einen hohen Prozentsatz von Einkristallen bis zu einer Goldschichtdicke von 2 nm hin. Werden hingegen größere Goldmengen aufgedampft, zeigen sich mit zunehmender deponierter Menge zunehmende Differenzen in den gemessenen Größen, die auf einen zunehmenden Anteil von Polykristallen deuten. Dieser Effekt wird wahrscheinlich durch das Zusammenwachsen von einzelnen Goldkristallen verursacht.

Die Clusterhöhe, mittels AFM vermessen, zeigt ein ähnliches Verhalten bezüglich der laterale Kristallgröße. Die vertikale Höhe bleibt als Funktion der Golddicke nahe zu konstant und gegen einem Wert von ca. 10 nm bis das laterale Clusterwachstum eine

vollständige Schicht erzeugt hat.

Der Übergang zwischen fast halbkugelförmigen Kristallen und Kristallen mit einer ebenen Oberfläche bei einer durchschnittlichen deponierten Goldschichtdicke von ca. 2 nm und einer Clusterhöhe von ca. 10 nm kann nicht zufrieden stellend durch einen größenabhängigen Clusterschmelzpunkt erklärt werden. Von Ph. Buffat und J-P Borel [120] durchgeführte Untersuchungen bezüglich der Größenabhängigkeit der Schmelztemperatur zeigten, dass der Schmelzpunkt von Goldclustern von ca. 250°C bei einer Größe von 2 nm auf ca. 800°C bei einer Größe von 5 nm ansteigt, was deutlich kleiner als die beobachtete Clustergröße ist.

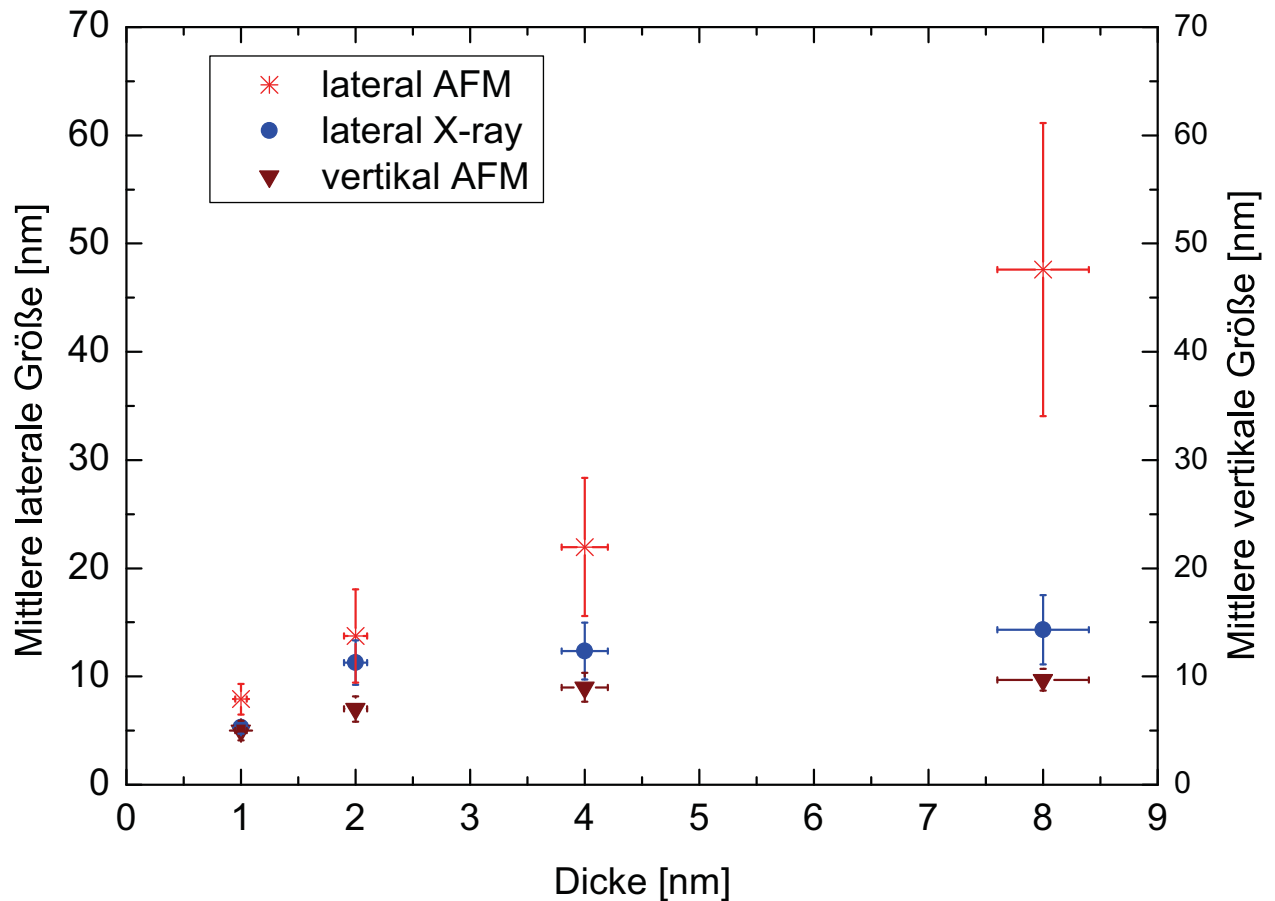


Abbildung 7.8: Graphische Darstellung des Einflusses der durchschnittlichen deponierten Goldschichtdicke auf NaCl-Oberflächen auf die laterale und vertikale Clustergröße mittels AFM gemessen sowie auf die laterale Kristallgröße mittels XRD bestimmt.

Präparationsparameter: Substrattemperatur 250°C, Substratpotential 0 V, Aufdampftrate 0,25 nm/min. Die Messungen sowohl mit AFM als auch mit XRD sind mindestens an zwei Proben durchgeführt worden. Die Charakterisierung mittels AFM wurde mindestens an drei Stellen jeder Probe durchgeführt. Jede Position wurde mindestens einmal mit einem Scan-Bereich von 500 x 500 nm² und einmal mit dem Scan-Bereich von 1 x 1 μm² aufgenommen.

7.3 Einfluss der Substrattemperatur

Zur Untersuchung des Einflusses der Substrattemperatur auf die Cluster- bzw. Kristallgröße wurde Gold bei verschiedenen Substrattemperaturen zwischen 180°C und 350°C aufgedampft. Als durchschnittliche deponierte Goldschichtdicke wurde ein Wert von 2 nm verwendet. Die Aufdampftrate von 0,25 nm/min, und die Probe wurde auf Kammerpotential gelegt. Als Substrattemperaturen wurden folgende Temperaturen verwendet: 180°C, 215°C, 250°C, 275°C, 295°C, 310°C, 330°C, 350°C.

Die Abbildungen 7.9 bis 7.15 zeigen $\Theta/2\Theta$ -Messungen von sieben bei verschiedenen Substrattemperaturen bedampften Proben. Es ist zu erkennen, dass bei Substrattemperaturen bis 275°C nur die Kristallausrichtung Au(200) bei einem Winkel von $\Theta = 22,2^\circ$ bzw. $2\Theta = 44,4^\circ$ vorkommt. Ab einer Substrattemperatur von 295°C taucht zusätzlich die Kristallausrichtung Au(111) bei einem Winkel $\Theta = 19,05^\circ$ bzw. $2\Theta = 38,1^\circ$ auf. Ab einer Substrattemperatur von 315°C werden beide Peaks, die für die Kristallausrichtungen Au(200) und Au(111) stehen, wieder schwächer.

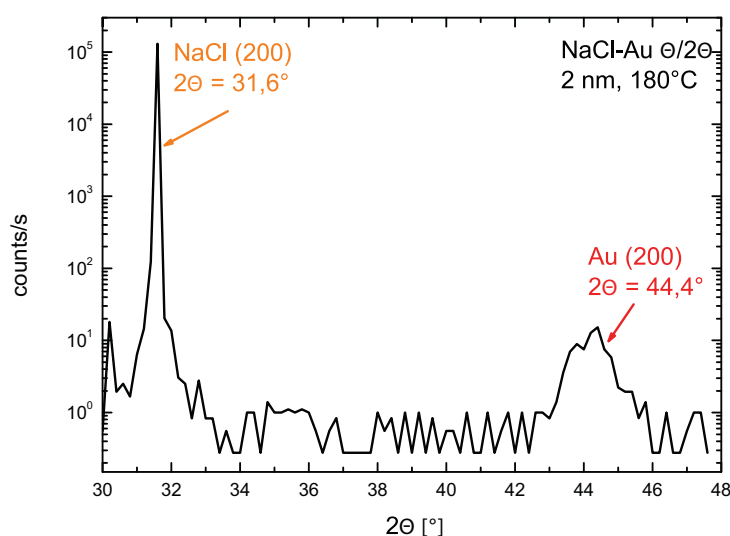


Abbildung 7.9: XRD-Messung ($\Theta/2\Theta$ -Geometrie) an Au-Kristallen auf NaCl, die bei einem Substrattemperatur von 180°C deponiert wurden.

Präparationsparameter: Durchschnittliche deponierte Goldschichtdicke 2 nm, Aufdampftrate: 0,25 nm/min, Probe lag auf Kammerpotential.

Die Abbildung 7.16 zeigt den Einfluss der verschiedenen Substrattemperaturen auf die Ausrichtung der Goldkristalle auf dem NaCl(100). Die XRD-Messungen ($\Theta/2\Theta$) zeigen, dass bis 295°C die Kristallausrichtung Au(200) deutlich auftritt. Oberhalb dieser Temperatur beginnt diese Ausrichtung abzufallen. Es tritt dann eine zusätzliche Orientierung der Goldkristalle(111) auf. Ab 315°C fallen die beiden gemessenen Intensitäten

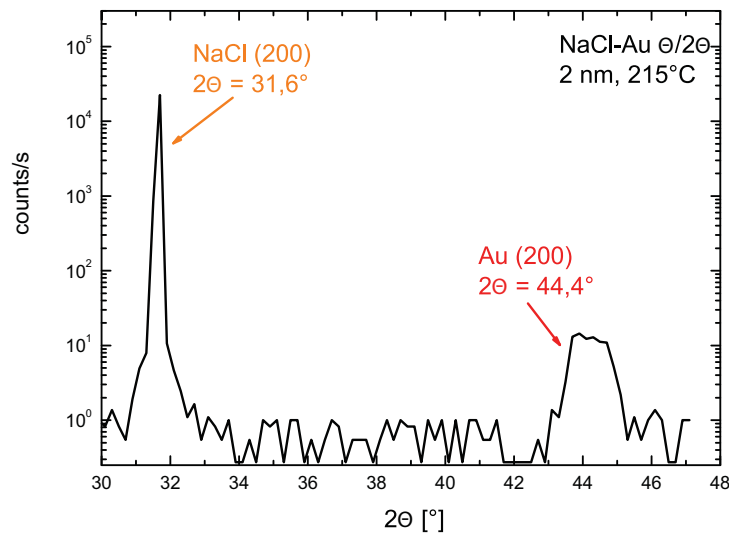


Abbildung 7.10: XRD-Messung ($\theta/2\theta$ -Geometrie) an Au-Kristallen auf NaCl, die bei einer Substrattemperatur von 215°C deponiert wurden.

Präparationsparameter: Durchschnittliche deponierte Goldschichtdicke 2 nm, Aufdampftrate: 0,25 nm/min, Probe lag auf Kammerpotential.

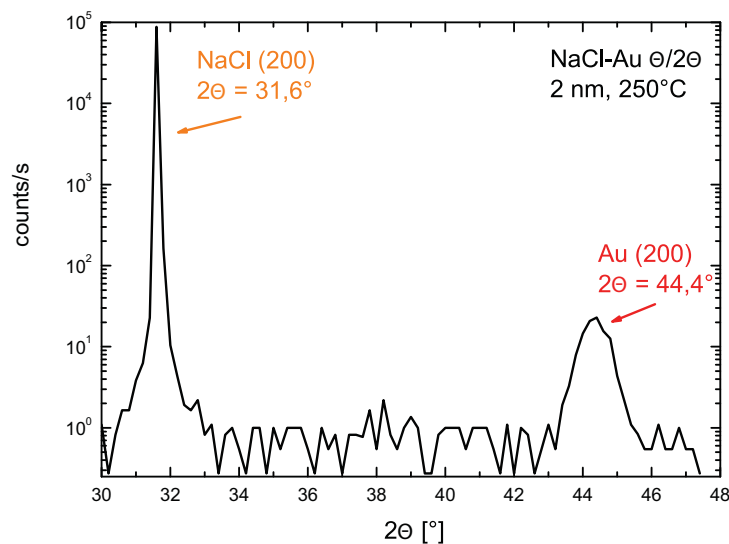


Abbildung 7.11: XRD-Messung ($\theta/2\theta$ -Geometrie) an Au-Kristallen auf NaCl, die bei einer Substrattemperatur von 250°C deponiert wurden.

Präparationsparameter: Durchschnittliche deponierte Goldschichtdicke 2 nm, Aufdampftrate: 0,25 nm/min, Probe lag auf Kammerpotential.

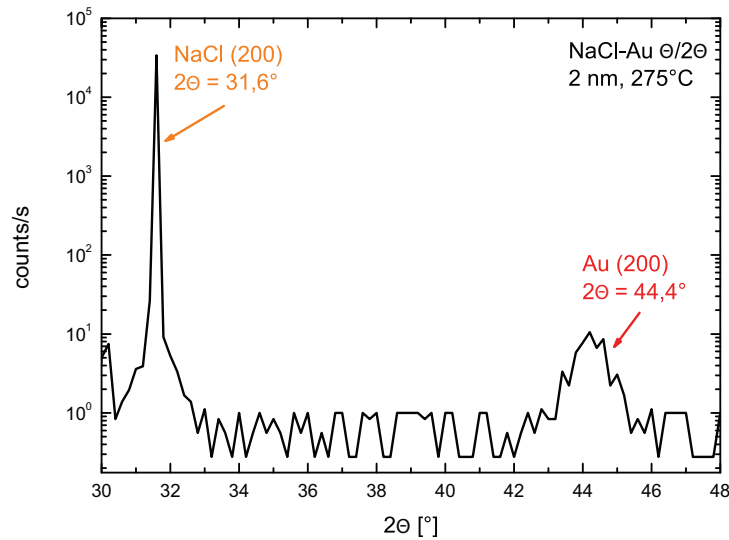


Abbildung 7.12: XRD-Messung ($\Theta/2\Theta$ -Geometrie) an Au-Kristallen auf NaCl, die bei einer Substrattemperatur von 275°C deponiert wurden.

Präparationsparameter: Durchschnittliche deponierte Goldschichtdicke 2 nm, Aufdampftrate: $0,25\text{ nm/min}$, Probe lag auf Kammerpotential.

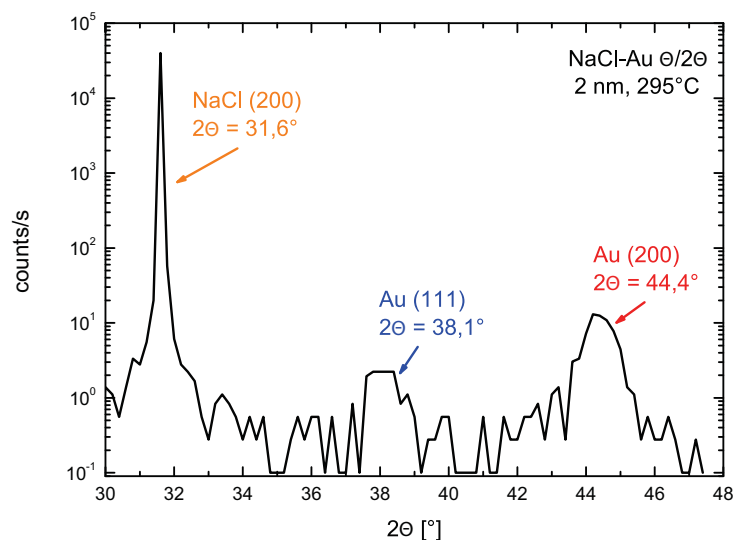


Abbildung 7.13: XRD-Messung ($\Theta/2\Theta$ -Geometrie) an Au-Kristallen auf NaCl, die bei einer Substrattemperatur von 295°C deponiert wurden.

Präparationsparameter: Durchschnittliche deponierte Goldschichtdicke 2 nm, Aufdampftrate: $0,25\text{ nm/min}$, Probe lag auf Kammerpotential.

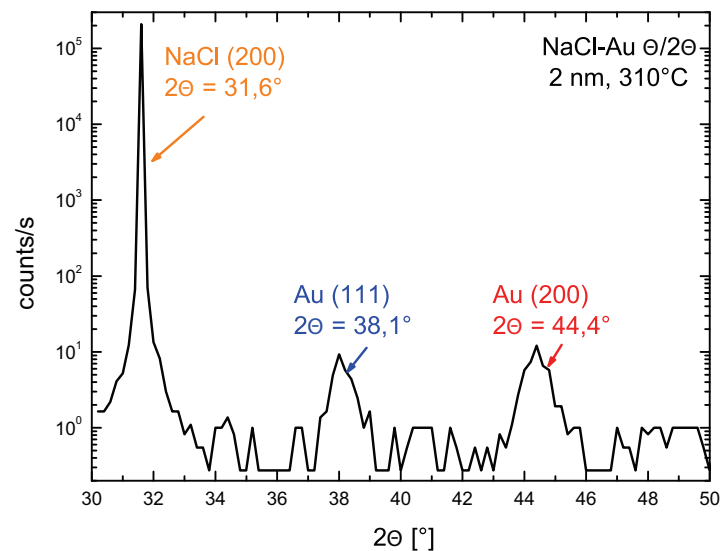


Abbildung 7.14: XRD-Messung ($\Theta/2\Theta$ -Geometrie) an Au-Kristallen auf NaCl, die bei einer Substrattemperatur von 310°C deponiert wurden. Präparationsparameter: Durchschnittliche deponierte Goldschichtdicke 2 nm, Aufdampfrate: 0,25 nm/min, Probe lag auf Kammerpotential.

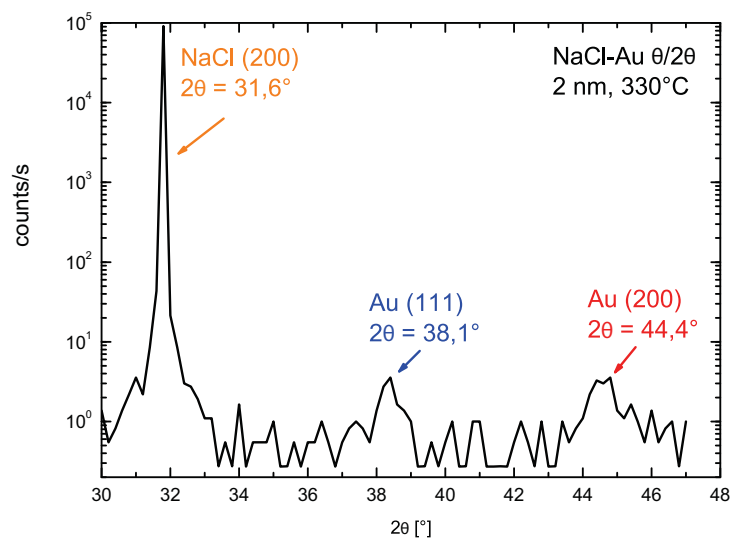


Abbildung 7.15: XRD-Messung ($\Theta/2\Theta$ -Geometrie) an Au-Kristallen auf NaCl, die bei einer Substrattemperatur von 330°C deponiert wurden. Präparationsparameter: Durchschnittliche deponierte Goldschichtdicke 2 nm, Aufdampfrate: 0,25 nm/min, Probe lag auf Kammerpotential.

stark ab. Das Auftreten von Au(200) in Verbindung mit NaCl(200) ergibt, dass Au(100)||NaCl(100) ist. Diese Ergebnisse sind mit anderen Studien verglichen [121] [122] [123], die den Einfluss der Substrattemperatur und der Schichtdicke auf die Kristallorientierung analysiert haben.

Die Abbildung 7.17 zeigt AFM-Aufnahmen von drei Proben, die bei verschiedenen

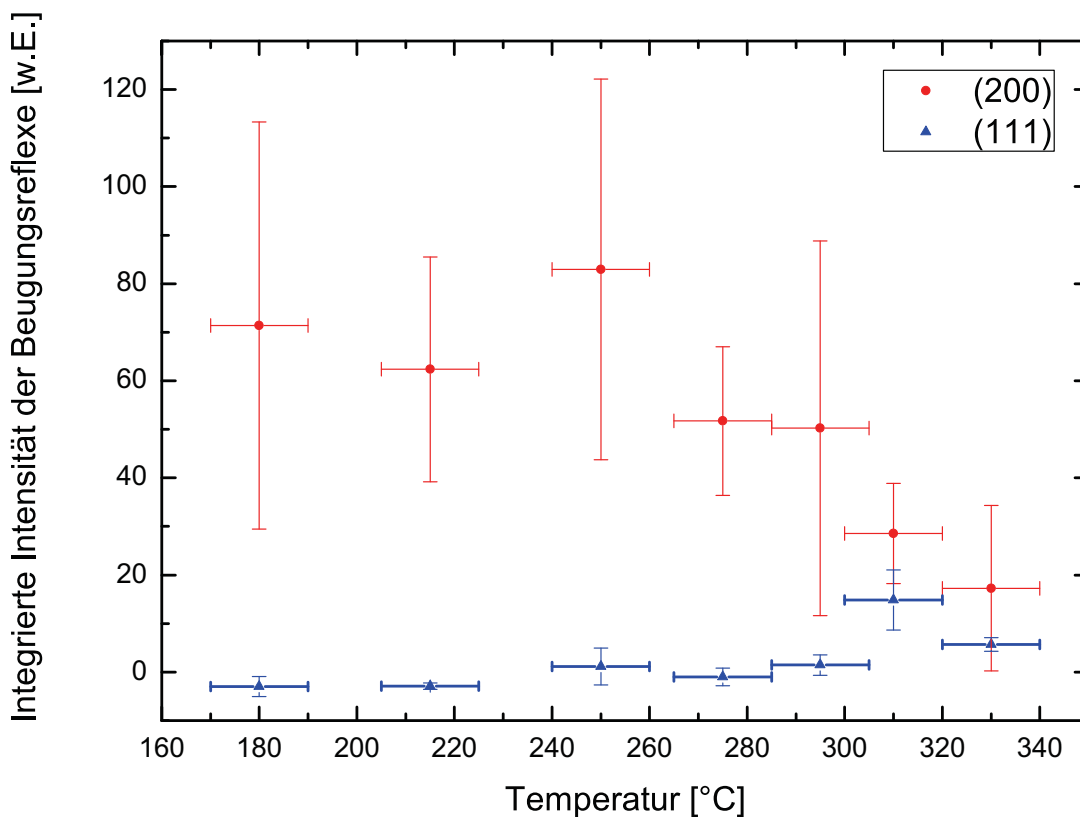


Abbildung 7.16: Einfluss der Substrattemperatur auf die Orientierung der Goldkristalle auf eine NaCl-Oberfläche. Die Datenpunkte basieren auf mindestens zwei Proben pro Substrattemperatur

Präparationsparameter: Aufgedampfte Schichtdicken 2 nm, das Substrat lag auf Kammerpotential, Aufdampftrate 0,25 nm/min

Substrattemperaturen von 215°C, 250°C und 310°C präpariert wurden. Das deponierte Gold bildet annähernd kreisförmige Cluster bei Substrattemperaturen von 215°C und 250°C. Die Cluster sind relativ homogen auf der NaCl(100)-Oberfläche verteilt. Bei einer Substrattemperatur von 310°C traten dagegen größere Cluster auf, die zum Teil aus Konglomeraten mehrerer Cluster bestanden.

Abbildung 7.18 zeigt die mittels AFM und XRD gemessenen mittleren lateralen Clustergrößen bzw. Kristallgrößen sowie die mittels AFM bestimmten mittleren Clusterhöhen.

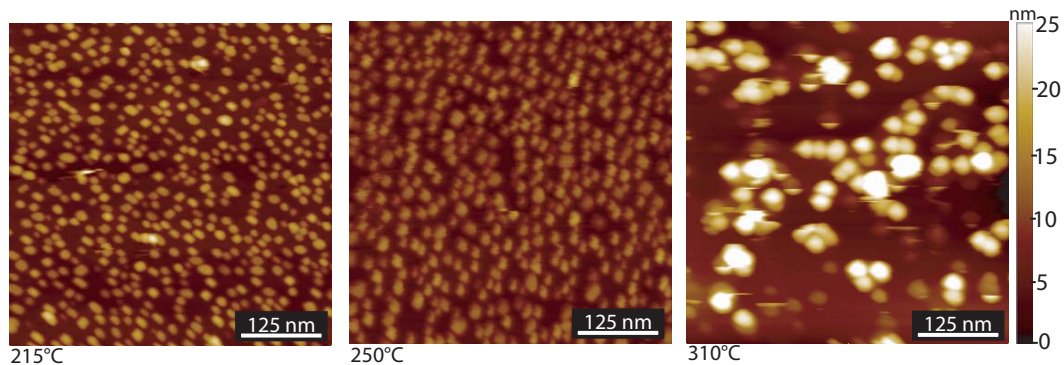


Abbildung 7.17: AFM-Aufnahmen von Au auf NaCl(100) präpariert bei verschiedenen Substrattemperaturen.

Präparationsparameter: Aufgedampfte Schichtdicken 2 nm, Substrat liegt auf Kammerpotential, Aufdampftrate 0,25 nm/min

Es ist ein leichter Anstieg der lateralen Clustergröße bei steigender Substrattemperatur zu beobachten. Bei einer Substrattemperatur von 180°C bilden sich größere laterale Cluster, sie sind aber nur 3,5 nm hoch.

Bei Temperaturen oberhalb 250°C nimmt die laterale und die vertikale Clustergröße zu. Daraus folgt eine Abnahme der Flächendichte der Cluster, dies ist auch in Abbildung 7.17 zu sehen. Die vertikale und laterale Clustergröße sind bei 215°C und 250°C nahezu identisch. Die ähnlichen Werten der AFM- und XRD-Messungen deuten, dass sich ein hoher Anteil an einkristallinen Clustern bei diesen Temperaturen bildet. Diese Vermutung wird durch TEM-Aufnahmen von abgelösten Goldkristallen bestätigt (siehe Abschnitt 7.5). Eine weitere Erhöhung der Temperatur auf 330°C führt zu einem dramatischen Rückgang des Sticking-Koeffizienten, was zu einer NaCl-Oberfläche ohne Goldbedeckung bzw. Goldcluster führt. Studien von C.A. D. Henning [124] [125], die den Sticking-Koeffizienten vom Gold auf reinen NaCl-Oberflächen untersucht haben, bestätigen dieses Resultat.

Es ist auch eine Abweichung zwischen der Clustergröße, gemessen mittels AFM, und der lateralen Kristallgröße, gemessen mittels XRD (Rocking-Kurve), zu beobachten. Dies ist durch die Besonderheit der XRD zu erklären, dass XRD zwischen Kristalle, Polykristallen und Amorph-Cluster mit individuellem Einfluss auf die Messung unterscheidet, dagegen wird bei AFM ein echtes Bild des Clusters aufgenommen, ohne zu unterscheiden zwischen Amorph-Cluster oder Kristall.

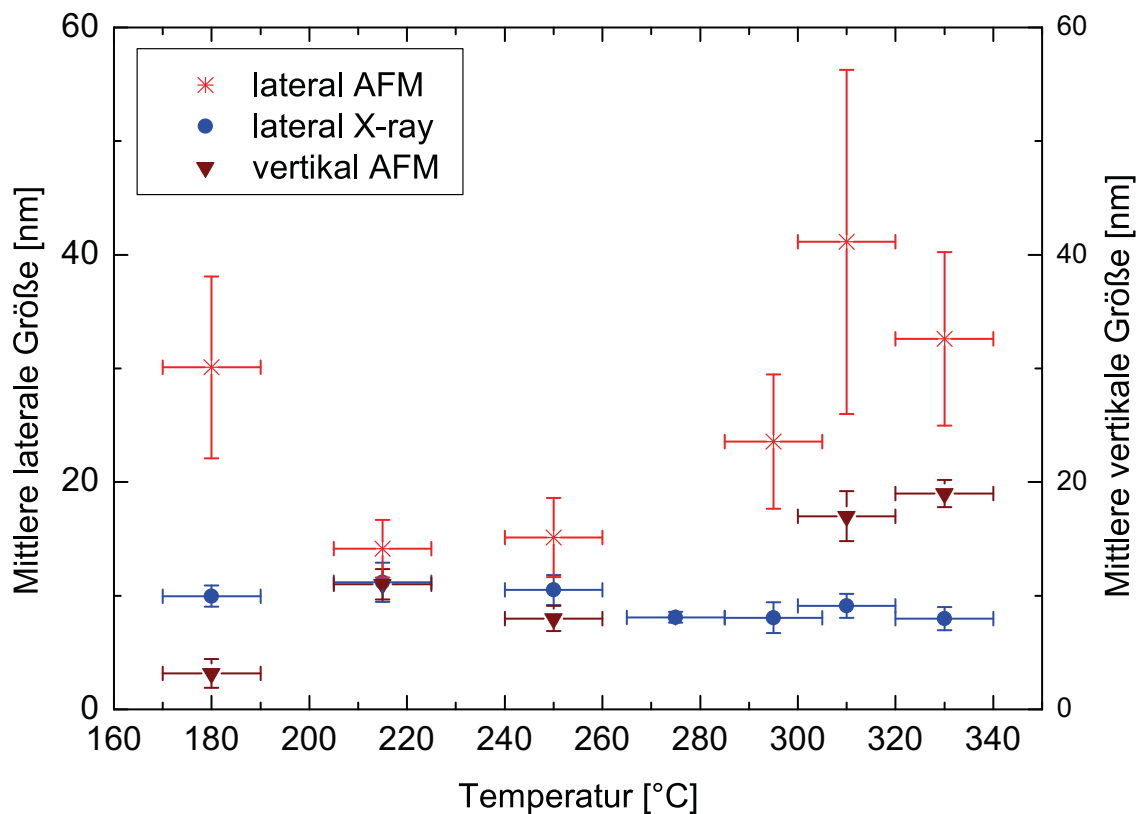


Abbildung 7.18: Einfluss der Substrattemperatur während der Golddeposition auf die gemittelte laterale und vertikale Clustergröße (AFM-Messungen) verglichen mit der lateralen Kristallgröße (bestimmt aus XRD-Messungen)

Präparationsparameter: Aufgedampfte Schichtdicke 2 nm, Substrat liegt auf Kammerpotential, Aufdampftrate 0,25 nm/min. Die Messungen sowohl mit AFM als auch mit XRD sind mindestens an zwei Proben pro Substrattemperatur durchgeführt worden. Die Charakterisierung mittels AFM wurde mindestens an drei Stellen jeder Probe durchgeführt. Jede Position wurde mindestens einmal mit einem Scan-Bereich von 500 x 500 nm² und einmal mit dem Bereich von 1 x 1 μm² aufgenommen.

7.4 Einfluss des Substratpotentials

Bei der Untersuchung des Einflusses des Substratpotentials auf die Cluster- bzw. Kristallgrößen wurden Proben mit unterschiedlichen Substratpotentialen zwischen 0 V und +700 V bezüglich des Kammerpotential präpariert. Die Proben sind mit der gleichen aufgedampften Schichtdicke von 2 nm bei einer Aufdampftrate von 0,25 nm/min hergestellt worden.

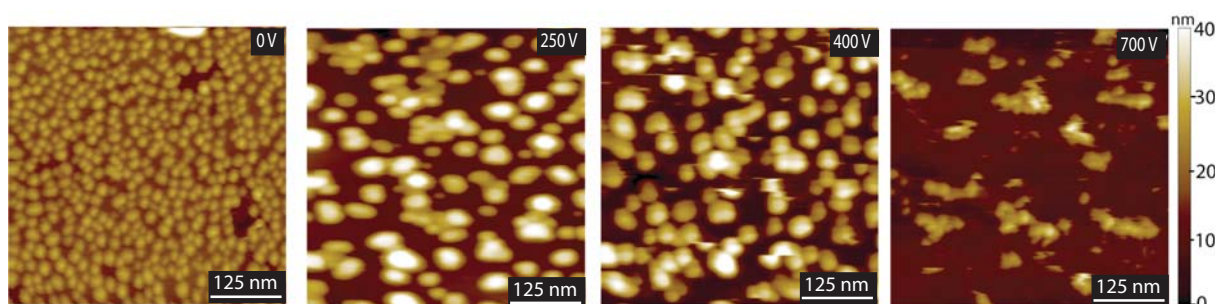


Abbildung 7.19: AFM-Aufnahmen von Au auf NaCl(100), das bei verschiedenen Substratpotentialen (0 V, 250 V, 400 V, 700 V) aufgedampft wurde.

Präparationsparameter: Aufgedampfte Schichtdicke 2 nm, Aufdampftrate 0,25 nm/min.

Der Einfluss des Substratpotentials bewirkt eine Änderung der Cluster- bzw. Kristallgröße, der Form und der Verteilung auf der NaCl(100)-Oberfläche [126]. Abbildung 7.19 zeigt AFM-Aufnahmen von Au auf NaCl(100)-Proben, dass bei verschiedenen Substratpotentialen (0 V, 250 V, 400 V, 700 V) aufgedampft wurde. Es ist zu beobachten, dass mit steigendem Substratpotential die laterale und die vertikale Clustergröße zunimmt, welche zu einer Abnahme der Flächendichte führt und größere Lücken zwischen den Clustern entstehen lässt. Bei 700 V bildeten sich schließlich größere unregelmäßige Konglomerate aus Clustern.

Ein Vergleich der Abbildungen 3.6 und 3.7 zeigt, dass auch das Anlegen eines elektrischen Potentials an das Substrat dessen Temperatur erhöht. Das Verhalten der Goldcluster bzw. Goldkristalle beim Einfluss des Substratpotentials ist sehr ähnlich zu dem Einfluss der Substrattemperatur, dass mit steigendem Substratpotential oder Substrattemperatur die laterale und die vertikale Clustergröße zunimmt, welche zu einer Abnahme der Flächendichte führt. Jedoch wird beim maximal verwendeten Substratpotential (700 V), das in Abbildung 7.19 gezeigt ist, nur eine Temperatur von etwa 275°C erreicht. Das Verhalten der Kristalle beim 400 V (225°C) ist allerdings eher mit dem bei 310°C Proben temperatur ohne Substratpotential vergleichbar. Dies zeigt, dass das Potential einen zusätzlichen Einfluss auf Größe und Form der Kristalle hat, auch wenn nicht eindeutig gesagt werden kann welchen Anteil Substratpotential und Temperatur an diesem Einfluss haben.

7.5 Lauebeugung an Nano-Goldkristallen

Unter der sehr optimistischen Annahme, dass ein 15 nm-Au-Kristall jedes 1000ste Photon in eine niedrigindizierte Richtung beugt, ergibt sich eine Rate von 1 Photon / (Beugungsspot·h), die um etwa zwei Größenordnungen unter der Nachweisgrenze der Intensivierten CCD-Röntgenkamera liegt. Aus diesem Grund war es nicht möglich mit dem DXT-Laborsystem, Untersuchungen an einzelnen Goldkristallen in dieser Größenordnung (15 nm) vorzunehmen.

Da Beugungsbilder von einzelnen nanokristallinen Goldpartikeln nicht detektiert werden konnten, wurden Beugungsaufnahmen eines Ensemble von gleichartig auf einer NaCl(100)-Oberfläche ausgerichteten Goldkristallen angefertigt. Dazu war es notwendig, die Goldkristalle unter Beibehaltung ihrer Ausrichtung in eine dünne Polymer-schicht zu übertragen um das starke von einem NaCl-Kristall erzeugte Untergrundsignal zu eliminieren.

In Abbildung 7.20 ist ein auf diese Weise angefertigtes Beugungsbild dargestellt, die durch Aufbringen eines Polymers auf der aufgedampften Oberfläche von Salz getrennt. Die Probe wurde mit den folgenden Parameter präpariert: Aufgedampfte Au-Schichtdicke 4 nm, Substrattemperatur 220°C, Beschleunigungsspannung der Röntgenquelle 25 kV, 50 W, Position der Kamera 40°, Aufnahmezeit 16 Minuten.

In der Aufnahme sind drei Kreissegmente zu erkennen. Der intensivste dieser Beugungs-

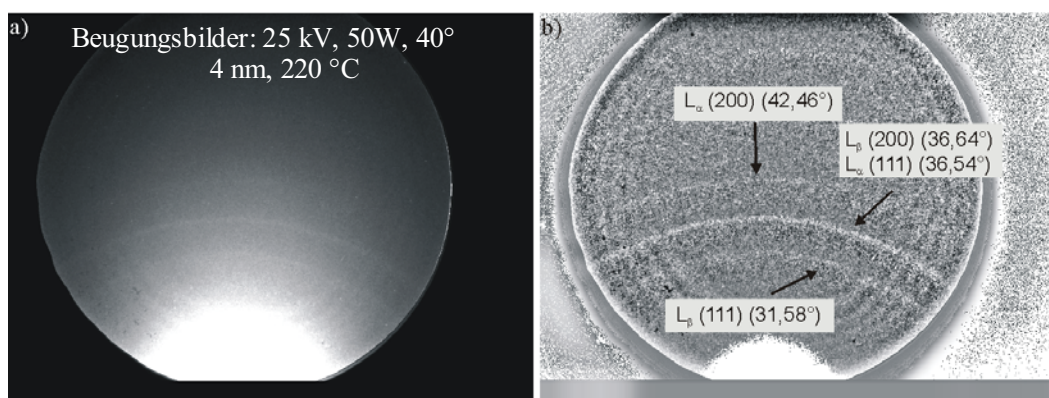


Abbildung 7.20: Beugungsbild von Goldkristallen, die von einer NaCl(100)-Oberfläche auf eine Polymermembran übertragen wurden. a) Originalbild b) Hervorhebung der Beugungsringe mittels Bildbearbeitungsprogramm

Präparationsparameter: aufgedampfte Schichtdicken: 4 nm, Aufdampftrate 0,25 nm/min, Substrattemperatur 250°C, Beschleunigungsspannung der Röntgenquelle 25 kV, 50 W, Position der Kamera 40°, Aufnahmezeit 16 Minuten, Abstand-Kamera-Probe 54 mm

ringe kann der (200)- als auch der (111)-Reflex des Goldes zugewiesen werden, die bei einem Beugungswinkel von 36,64° sowie 36,54° auftreten sollten, wenn die dem weißen Röntgenspektrum überlagerte diskrete L_{α} -Linie (8,396 keV) bzw. die L_{β} -Linie (9,670 keV) des Wolfram zur Berechnung herangezogen werden. Die weiteren Beugungsringe bei 42,46° und 31,58° können analog dazu der (200)-Reflexion mit der L_{α} -Linie sowie

der (111)-Reflexion mit der L_β -Linie zugewiesen werden. Die Beugungsringe entstehen sozusagen durch Beugung der intensiven L_α und L_β -Linien an statistisch orientierten Goldkristallen, was dem Debye-Scherrer-Verfahren entspricht [127]. Unter anderen Beugungswinkeln wurden keine weiteren Ringe sowie Beugungspunkte gefunden, was ebenfalls gegen eine Ausrichtung der Goldkristalle in der Polymerfolie spricht.

Anhand dieser Messung lassen sich leider keine Aussagen über die ursprüngliche Au-Kristallorientierung auf dem NaCl-Substrat treffen, da bei der Übertragung in den Polymerfilm die Orientierung verloren geht. Die XRD-Messung zeigte beide Kristallausrichtungen Au(111) und Au(200), aber nach der Übertragung vom Polymer deutet Debye-Scherrer darauf hin, dass jetzt die Kristallausrichtung statistisch verteilt ist. Wenn die Ausrichtung der Kristalle nicht zufällig verteilt ist, dann sollten die Ringe in anderen Winkeln auftreten.

Im Gegensatz dazu konnten auf Beugungsaufnahmen, der in eine Sekundenkleberschicht eingebetteten Au-Kristalle, Beugungspunkte nachweisen werden (Abbildung 7.21). Für diese Beugungsspot, war es möglich, eine Indizierung anzugeben. Durch Drehung der Probe konnte weiterhin gezeigt werden, dass das Beugungsbild eine vierzählige Symmetrie aufweist. Aus der Lage der $\prec 111 \succ$ -Beugungsreflexe bezüglich der ursprünglichen Orientierung des NaCl-Gitters sowie aus den weiter vorher beschriebenen XRD-Messungen lassen sich folgende Aussagen zur Orientierung der Au-Kristalle auf dem NaCl-Kristall machen: $\text{NaCl}(100) \parallel \text{Au}(100)$ und $\text{Au}[100] \parallel \text{NaCl}[100]$. Dieses Ergebnis stimmt mit einer frühen Studie von Pashley [128] überein. Dieser entdeckte die parallele Ausrichtung zwischen Au und NaCl-Gitter als normale epitaktische Angleichung von Gold an Natriumchlorid.

Die Abbildung 7.22 zeigt die gemessene Ausrichtung der Goldkristalle bezüglich der NaCl-Kristallrichtungen. A) Au-Gitter (100)-Ebene B) NaCl-Gitter (100)-Ebene C) erwartete Anordnung von Au auf NaCl. D) die gemessene Anordnung von Au auf NaCl. Die großen Differenzen zwischen den Gitterkonstanten sprechen bei dieser Au-Kristallausrichtung auf der NaCl-Kristalloberfläche gegen eine epitaktische Anpassung der beiden Gitter.

Bei diesem Beugungsexperiment wurde eine Fläche von ca. $0,2 \text{ mm}^2$ beleuchtet, auf der sich ca. 4×10^8 Goldkristalle (Durchmesser ca. 15 nm) befinden sollten. Um Beugungsreflexe an einzelnen Au-Kristallen mit dem aufgebauten DXT-Laborsystem detektieren zu können, wurden Au-Kristalle mit Größen im Bereich von $1 \mu\text{m}$ präpariert. Anhand der Beugungsintensitäten dieser Au-Kristalle sollte es dann möglich sein, die minimale Au-Kristallgröße, bei der noch beobachtbare Beugungsreflexe beim DXT-Laborexperiment auftreten, zu bestimmen (siehe Kapitel 8).

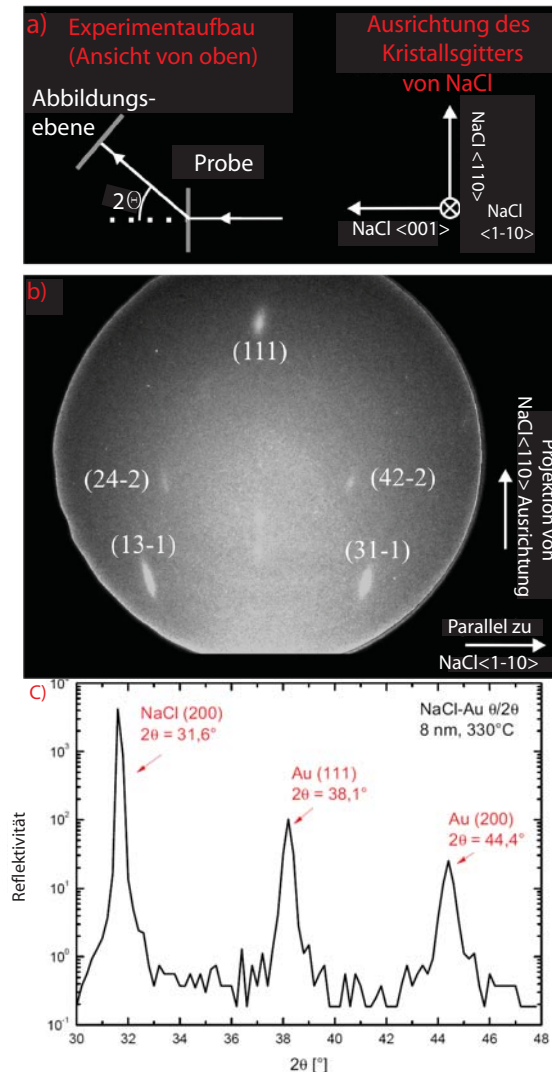


Abbildung 7.21: Beugungsbild von Goldkristallen, die von einer NaCl(100)-Oberfläche in eine Sekundenklebermembran übertragen wurden. Für deutlich zu erkennen Laue-Beugungsreflexe sind die Indizes angegeben

a) Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus sowie der ursprünglichen Orientierung des NaCl-Gitters. Die gezeigte Orientierung des NaCl bezieht sich auf die Probe sowie auf die Bildebene. b) Beugungsbild der Goldkristalle. Die zu erkennenen Beugungspunkte sind indiziert. Die ursprüngliche Richtung des NaCl-Gitters ist im rechten Bildbereich dargestellt. Die NaCl $\langle 1 - 10 \rangle$ -Richtung liegt in der Bildebene, wohingegen die $\langle NaCl/110 \rangle$ -Richtung als Projektion auf die Bildebene dargestellt ist. c) XRD-Messung ($\Theta/2\Theta$ -Geometrie) der Au-Kristalle auf dem NaCl(100)-Substrat vor der Einbettung in die Sekundenklebermembran und dem Ablösen vom Substrat
 Präparationsparameter: Aufgedampfte Schichtdicken 8 nm, Aufdampftrate 0,25 nm/min, Substrattemperatur 250°C, Einstellung der Röntgenquelle 25 kV, 50 W, Position der Kamera 52°, Aufnahmezeit 16 Minuten, Abstand-Kamera-Probe 54 mm.

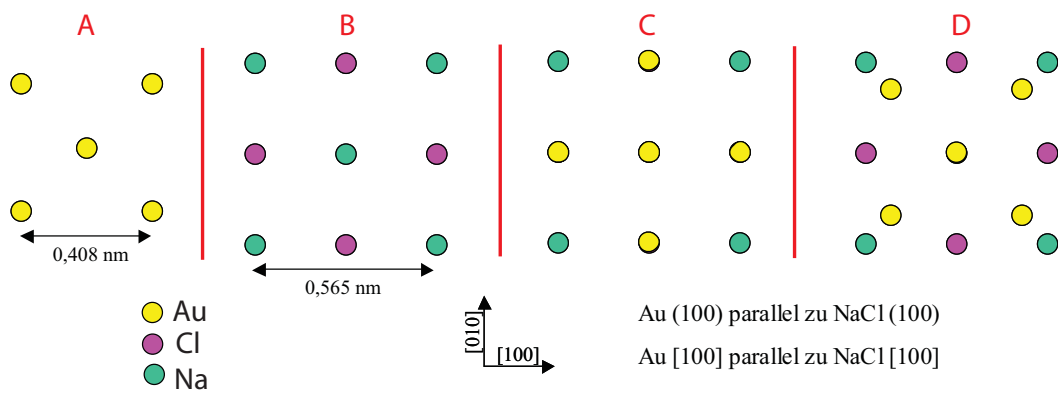


Abbildung 7.22: Kristallausrichtung Au auf NaCl.

A) Bau des Goldkristalls mit der Gitterkonstante: 0,408 nm. B) Aufbau des NaCl-Kristalls mit der Gitterkonstante: 0,565 nm. C) erwartete Anordnung von Au auf NaCl. D) tatsächliche Anordnung von Au auf NaCl.

Kapitel 8

Charakterisierung von Au-Kristallen auf Si(100)-Oberflächen mittels AFM, REM und Röntgenbeugung

Zur Erzeugung von Laue-Beugungspunkten, die durch unseren DXT-Aufbau noch detektierbar sind, ist die Präparation von deutlich größeren Goldkristallen erforderlich. Es wurde zu deren Herstellung ein anderes Präparationsverfahren verwendet (siehe Kapitel 6).

In diesem Kapitel sollen nun die Ergebnisse der präparierten Mikro-Goldkristalle auf Silizium und Siliziumdioxid im Bezug auf ihre Form, Größe, Höhe, Verteilung und Flächendichte dargestellt werden. Dabei sind die Ergebnisse nach den Einflüssen der unterschiedlichen durchschnittlichen Schichtdicke, der Substrattemperatur und der Temperatur geordnet.

Die Charakterisierung der Mikro-Goldkristalle fand mittels AFM, REM, XRD, Lichtmikroskop sowie den Laue-Beugung (DXT-Aufbau).

Die Ausrichtung der Kristalle auf dem Substrat sowie die Größe der Kristalle wurden mittels Röntgendiffraktometriemessungen bestimmt. Die Form der Kristalle sowie deren Verteilung auf dem gesamten Substrat wurden an Hand der Bilder des Zeiss-Lichtmikroskops beschrieben. Auch die REM-Aufnahmen geben Informationen über die Größe der Kristalle sowie deren Form und Verteilung. Die Höhe der Kristalle wurde mittels Luft-AFM bestimmt.

Die Goldkristalle wurden mittels eines Sputterverfahrens auf einem Si-Waferstückchen (Si(100) $10 \times 10 \text{ mm}^2$, Goldschichtdicke 100 nm) aufgesputtert und anschließend unter UHV-Bedingungen über einen Zeitraum von einer Stunde bis zu 18 Stunden bei Temperaturen zwischen 600°C und 900°C annealt.

In Abbildung 8.1 sind rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von drei auf diese Weise präparierten Proben dargestellt. Zu erkennen sind einzelne kreisförmige Goldcluster, aber auch längliche Goldcluster bei A sowie verzweigte Strukturen bei B und C.

In Abbildung 8.2 ist ein AFM-Bild eines einzelnen Goldkristalls dargestellt. Gut zu

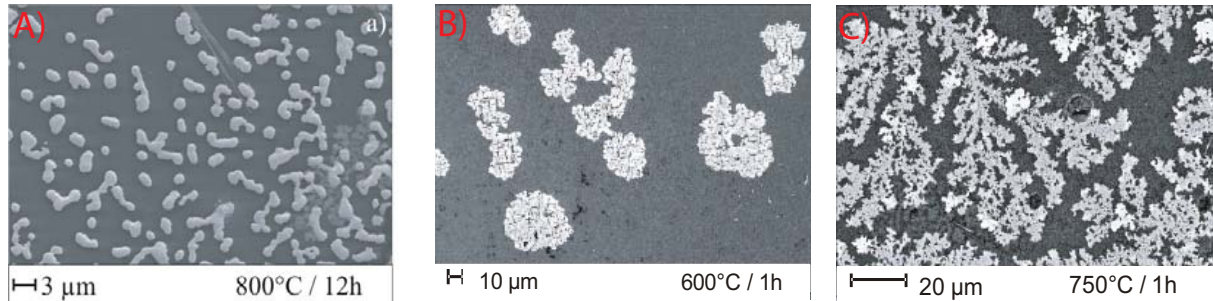


Abbildung 8.1: REM-Aufnahmen von Au-Clustern auf Si(100).

Bei allen drei Proben wurden 100 nm Gold auf Si(100) aufgesputtert und unter UHV-Bedingung annealt.

A) 12 Stunden bei 800°C, B) eine Stunde bei 600°C, C) eine Stunde bei 750°C

erkennen ist die pyramidenartige Form des Au-Kristalls, der wahrscheinlich durch eine Au(100)-Grundfläche und Au(111)-Seitenflächen begrenzt ist.

Die SEM- und XRD-Messungen dieser Proben (Abbildung 8.4) zeigen allerdings, dass

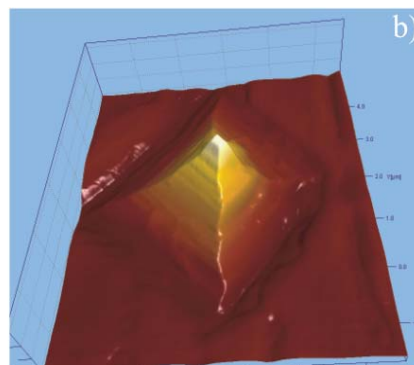


Abbildung 8.2: AFM-Aufnahme eines einzelnen Au-Kristalls auf Si(100).

Zur Präparation dieser Probe wurden 100 nm Au auf ein Si(100)-Waferstückchen aufgesputtert und die Probe dann über 12 h bei ca. 800°C annealt.

die Goldkristallgröße über einen sehr weiten Größenbereich verteilt ist und die oben abgebildete Pyramide eine Ausnahme darstellt.

Die Abbildungen 8.3 und 8.4 zeigen Röntgendiffraktometrienmessungen von Au-Kristallen auf Si(100) unter UHV-Bedingung bei verschiedenen Temperaturen zwischen 500°C und 900°C und unterschiedlichen Zeiten zwischen einer Stunde und 12 Stunden annealt, wobei Abbildung 8.3 eine $\Theta/2\Theta$ -Messung wiedergibt. Der auftretende Peak lässt sich als Au(111)-Reflex identifizieren.

Diese Methode zur Präparation der Mikro-Goldkristalle wurde nicht mehr weiter verwendet. Der Hauptgrund war dass diese Ergebnisse kaum reproduzierbar waren, und der Anteil an quader oder halbkugelförmige Kristallen nur sehr gering war. Deswegen

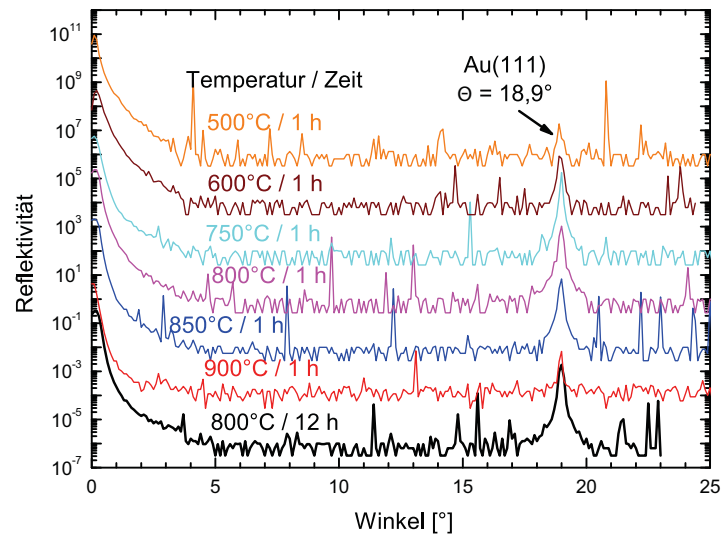


Abbildung 8.3: $\Theta/2\Theta$ -Messungen von Au-Kristallen auf Si(100). Die Kurven wurden jeweils um zwei Größenordnung gegeneinander verschoben
 Alle Proben wurden mit 100 nm Gold auf Si(100) gesputtert und unter UHV-Bedingung bei verschiedenen Temperaturen und Zeiten annealt.

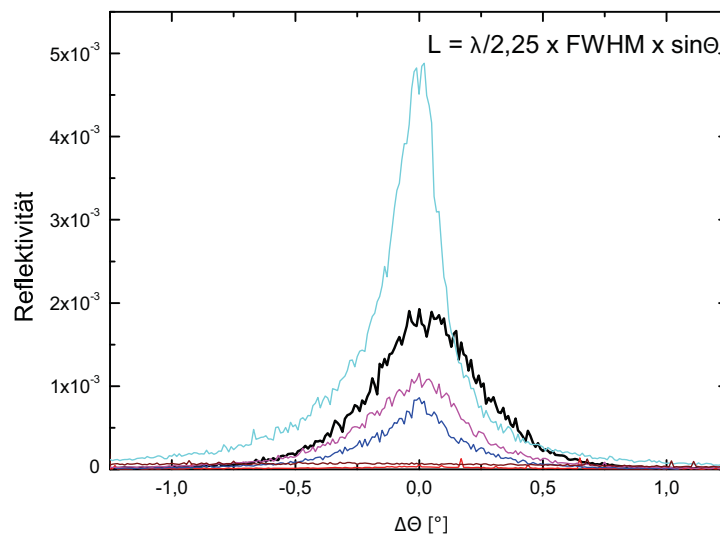


Abbildung 8.4: Rocking-Kurven von Au-Kristallen auf Si(100).
 Alle Proben wurden mit 100 nm Gold auf Si(100) gesputtert und unter UHV-Bedingung bei verschiedenen Temperaturen und Zeiten annealt.

wurde zu einer anderen ähnlichen Methode gewechselt (siehe Kapitel 6). Eine andere Forschungsgruppe hat auch eine ähnliche Präparation von Goldkristalle mit einem Durchmesser von einigen μm durchgeführt. Die Gruppe benutzte Graphit als Substrat und hat 70 Stunden getempert bei einer Temperatur von 1273 K [129]. Dabei wurde weiterhin mit einem Sputterverfahren 100 nm Gold auf einem Si-Waferstückchen (Si(100) $10 \times 10 \text{ mm}^2$) aufgebracht, aber anschließend nicht unter UHV-Bedingungen annealt sondern mit Hilfe des 3-Zonen-Ofens annealt.

Abbildung 8.5 zeigt mehrere Lichtmikroskopieaufnahmen von so präparierten Proben, die im Ofen sieben Stunden bei verschiedenen Temperaturen annealt wurden. Zu erkennen sind runde leere Flächen, auf denen sich in der Mitte des Kreises vermutlich ein großes Gemisch in quadratischer Form von Gold und Silizium bildet. Am Rande dieser Flächen sammeln sich Goldcluster, die runde und längliche Formen. An einigen Stellen der Oberfläche ist die Anordnung von Goldcluster zu längen Ketten zu beobachten.

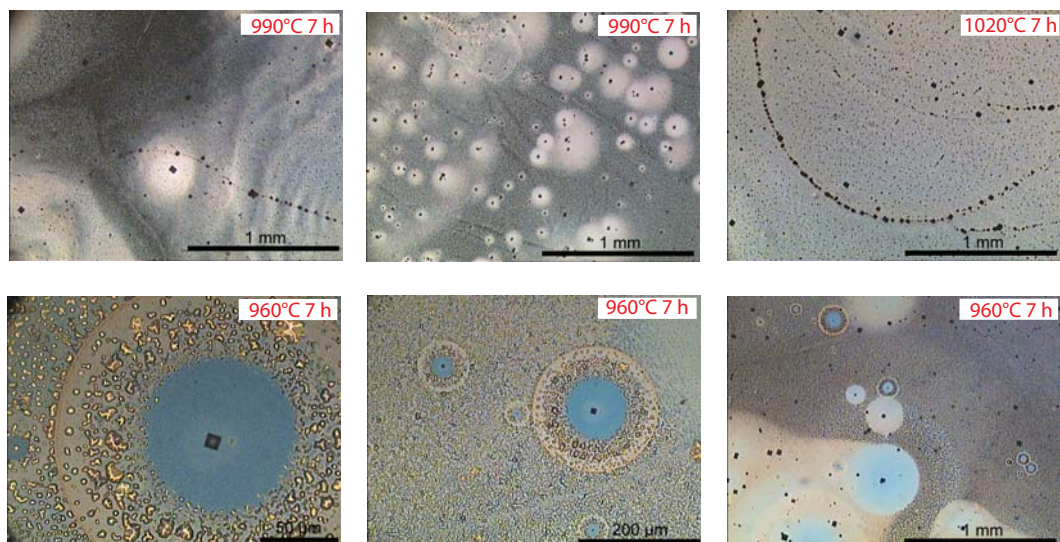


Abbildung 8.5: Lichtmikroskop-Aufnahmen von Au auf Si(100).

Alle Proben wurden mit 100 nm Gold beschichtet und anschließend sieben Stunden bei verschiedenen Temperaturen annealt.

In Abbildung 8.6 sind rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen einer auf diese Weise präparierten Probe dargestellt. Die Probe wurde mit 100 nm Gold auf Si(100) gesputtert und im Ofen sieben Stunden bei einer Temperatur von 1000°C annealt. Zu erkennen sind vier verschiedene Vergrößerungen von zwei verschiedenen Stellen der Probenoberfläche. Zu erkennen sind einzelne kreisförmige Goldcluster, aber auch längliche sowie quadratische und rhomboedrische Strukturen.

Diese Methode hat sich ebenfalls als nicht zur Präparation der Mikro-Goldkristalle geeignet erwiesen. Durch Oxidation des Silizium vor dem Aufputtern soll dies gerade verhindert werden. So wurden die Siliziumwafer vor der Deposition des Goldes durch sputtern thermisch oxidiert. Diese thermische Oxidation hat viel geholfen, dass die Goldkristalle eine runde Form bekommen und auf der Siliziumoxid-Wafer-Oberfläche besser verteilt sind. Diese Oxidation führte schließlich zu den erwünschten Resultate

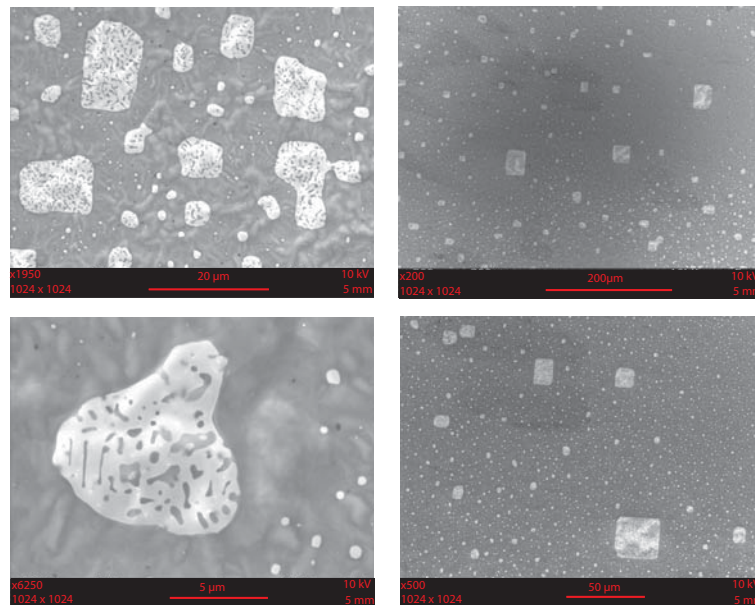


Abbildung 8.6: REM-Aufnahmen einer Probe (Au auf Si(100)) an verschiedenen Stellen der Oberfläche.

Die Probe wurde mit 100 nm Gold beschichtet und anschließend sieben Stunden bei einer Temperatur von 1000°C annealt.

(siehe Abschnitte 8.1-8.3).

Die benutzten Silizium-Wafer(100), die in den nächsten Abschnitten vorkommen, wurden acht Stunden bei 1000°C in dem 3-Zonen-Ofen thermisch oxidiert. Es sollte sich laut [130, S. 94-97] eine Oxiddicke von ca. 200 nm ergeben. Die Messung dieser Silizium-Wafer mit dem Ellipsometer ergab nur eine Oxiddicke von ca. 160 nm. Der Grund für diesen Unterschied ist, dass die Proben nicht mit 100%-tigem Sauerstoff oxidierten sondern mit normaler Luft [130, S. 94-97].

8.1 Einfluss der deponierten Schichtdicke

Die präparierten Schichtdicken von 50 nm, 100 nm, 150 nm und 250 nm wurden mit der gleichen Sputterrate von 0,11 nm/s also 100 nm/15 min, bei einem Ar-Partialdruck von 13,3 Pa hergestellt. Die Au-SiO₂-Proben wurden anschließend drei Stunden mit dem 3-Zonen-Ofen bei einer Temperatur von 1050°C annealt.

Röntgendiffraktometrie-messungen von Proben mit Au-Kristallen auf SiO₂-Substraten mit verschiedenen deponierten Goldmengen sind in den Abbildungen 8.7 und 8.8 zu sehen. Das Bild 8.7 zeigt die $\Theta/2\Theta$ -Messungen. Der bei einem Glanzwinkel von $\Theta = 19,1^\circ$ auftretende Peak lässt sich als Au(111)-Reflex identifizieren. Die Probe mit 250 nm Goldschichtdicke wurde nur von 15° bis 22° vermessen. Bei allen anderen wurde die Messung bei 0° gestartet und bei etwa 35° beendet (die Probe mit 50 nm Goldschichtdicke wurde bei etwa 27° beendet). Im Bild 8.8 sind die zugehörigen Rocking-Kurven

bei $\Theta = 19,1^\circ$ zu sehen. Die größte integrierte Reflektivität weist die Rocking-Kurve der Probe mit einer ursprünglichen deponierten Goldschichtdicke von 100 nm auf. D.h. die Au-Kristalle, die aus dieser deponierten Goldschicht entstehen weisen den höchsten Anteil an der Ausrichtung: Au(111) parallel zur Oberflächennormalen der Probe auf.

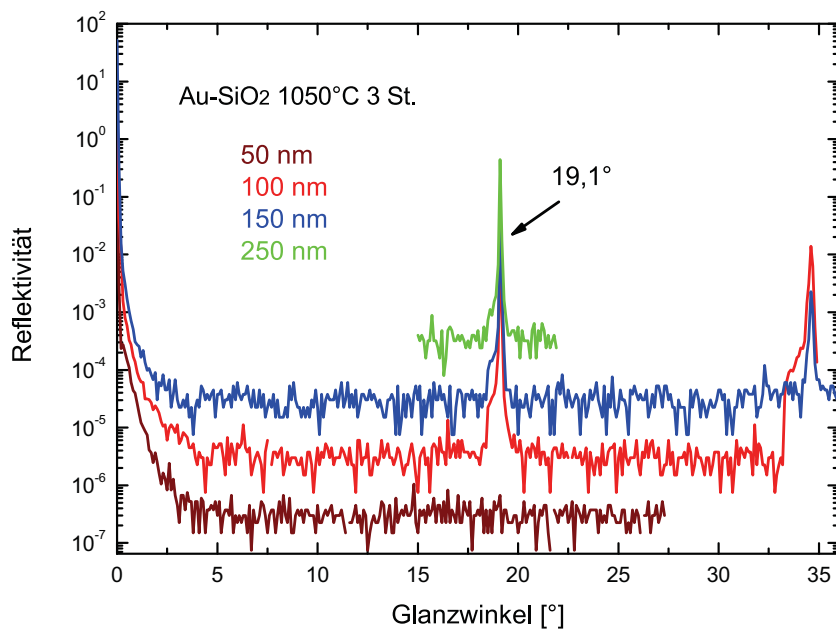


Abbildung 8.7: $\Theta/2\Theta$ -Messungen von Proben mit verschiedenen deponierten Goldmengen. Die Kurven wurden jeweils um eine Größenordnung gegeneinander verschoben. Präparationsparameter: drei Stunden im Ofen bei einer Temperatur von 1050°C annealt.

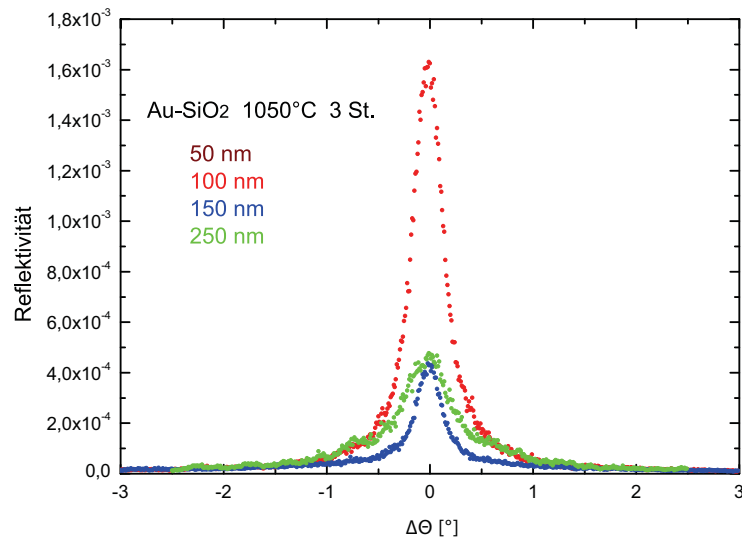


Abbildung 8.8: Rocking-Kurven bei $\Theta = 19,1^\circ$ von Proben mit verschiedenen deponierten Goldmengen.

Präparationsparameter: drei Stunden im Ofen bei einer Temperatur von 1050°C annealt.

Die Abbildung 8.9 ist eine Serie von Lichtmikroskopischen Aufnahmen von Proben mit unterschiedlichen ursprünglichen Goldschichtdicken. Durch die geringe Vergrößerung mit dem Lichtmikroskop sind die Aussagen über die Goldkristalle begrenzt. Es ist aber möglich zu erkennen, dass sich eine gleichmäßige Verteilung der Goldkristalle auf der SiO₂-Oberfläche gebildet hat. Bei der 50 nm Probe entstehen die kleinsten Goldkristalle. Bei den 100 nm und 150 nm Proben entstehen fast gleiche Kristallgrößen. Wie erwartet, entstanden bei der 250 nm Probe die größten Kristalle. Die kleinste Flächendichte der Goldkristalle auf der Oberfläche ist bei 250 nm Probe festzustellen danach bei 50 nm und dann fast identisch, bei 100 nm und 150 nm.

Abbildung 8.10 zeigt rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von den mit verschiedenen aufgesputterten Goldmengen hergestellten Proben. Diese REM-Aufnahmen zeigen im Vergleich zu den lichtmikroskopischen Aufnahmen eine um den Faktor 10 höhere Vergrößerung. Zu erkennen sind runde, quadratische und ellipsenförmige Strukturen. Bei 250 nm aufgesputterter Goldmenge haben die Kristalle nahezu eine runde Struktur mit Faceten. Hier ist noch zu erkennen, dass sich bei der 150 nm Probe viele kleine runde Kristalle bilden, im Gegensatz zu der Probe mit 100 nm Probe. Aber dafür ist die Flächendichte und die Höhe der Kristalle bei 150 nm Probe größer (siehe AFM-Daten und die zugehörige Histogramme). Dieses Ergebnis beruht nur auf einer Messung. Die Größe bzw. Fläche der Goldkristalle wurden anhand der REM-Aufnahmen mittels der Software SPIP ermittelt. Die Größenverteilung der Kristallflächen ist in Histogrammen (Abbildungen 8.14 bis 8.17) dargestellt.

Die Abbildung 8.11 zeigt AFM-Aufnahmen einer auf diese Weise präparierten Probe

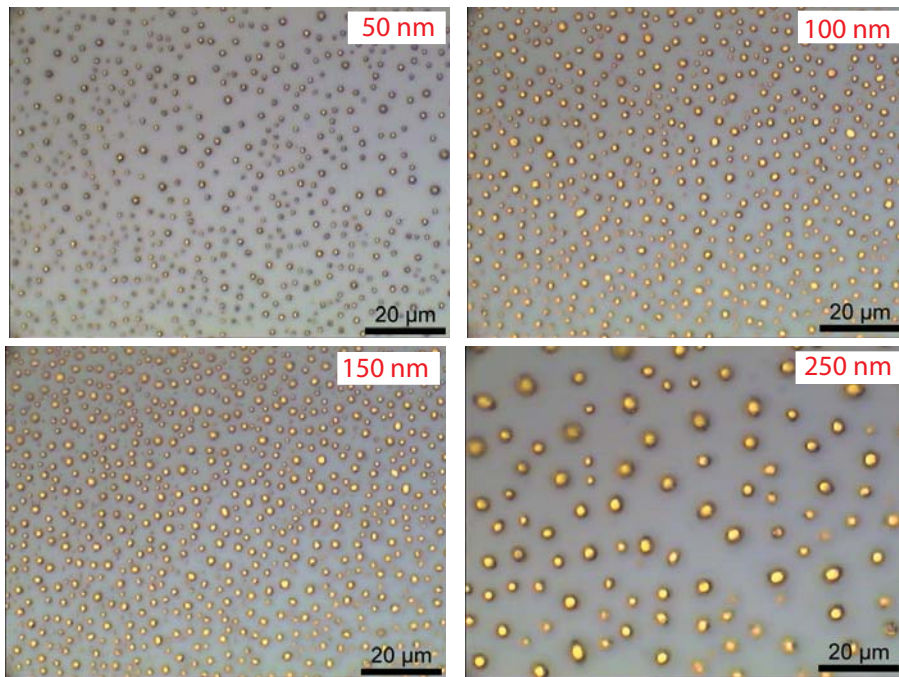


Abbildung 8.9: Lichtmikroskopie-Aufnahmen von Au-Cluster auf SiO₂ bei verschiedenen aufgesputterten Goldmengen.

Präparationsparameter: drei Stunden im Ofen bei einer Temperatur von 1050°C annealt.

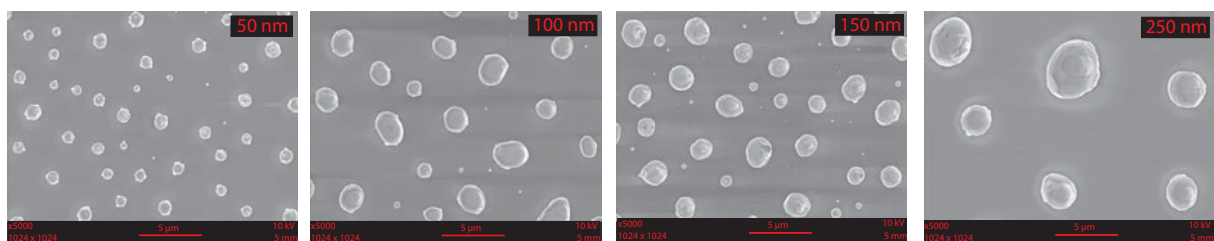


Abbildung 8.10: REM-Aufnahmen von Au auf SiO₂ bei verschiedenen aufgesputterten Goldmengen.

Präparationsparameter: Sputterdeposition von 50/100/150/250 nm, drei Stunden bei einer Temperatur von 1050°C annealt.

(100 nm) mit zwei verschiedenen Vergrößerungen. Die genaue Form der Au-Kristalle ist mit den verwendeten Cantilevern nicht abbildbar, da es hier zu einer teilweise Abbildung der Spitzenform kommt. Dieses Abbildungsproblem hat aber keinen Einfluss auf die Bestimmung der maximalen Kristallhöhen. Deswegen werden in diesem Kapitel keine AFM-Aufnahmen mehr gezeigt. Die Ergebnisse der mittels AFM bestimmten Kristallhöhen werden in Abbildung 8.12 gezeigt .

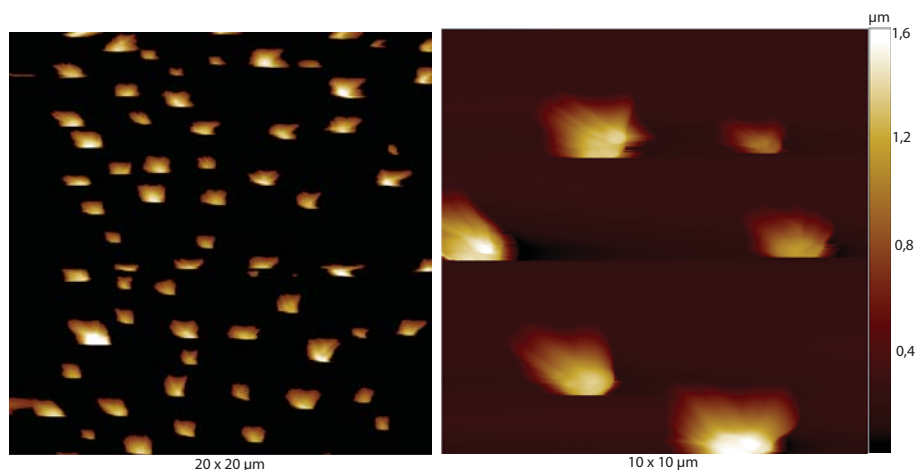


Abbildung 8.11: AFM-Aufnahmen von Au auf SiO₂.

Präparationsparameter: Sputterdeposition von 100 nm, drei Stunden bei einer Temperatur von 1050°C annealt.

In Abbildung 8.12 ist die Kristallhöhe in Abhängigkeit von der deponierten Au-Schichtdicke dargestellt. Diese Daten wurden von Proben mit 50 nm, 100 nm, 150 nm und 250 nm aufgesputtert und anschließend im Ofen drei Stunden bei einer Temperatur von 1050°C annealt. So nimmt die Höhe der Kristalle von etwa 1,2 µm bei 50 nm auf ca. 2,8 µm bei 250 nm ursprünglicher Goldschichtdicken. Die 250 nm Probe weist ebenfalls die größte Kristallhöhenvariation.

Zur Charakterisierung der Kristallflächen mittels REM-Daten entstand eine sehr breite Größenverteilung, so dass sich viele kleine Kristallite zwischen den großen Kristallen gebildet haben. Dieser Größenunterschied macht es schwierig einen realistischen Mittelwert der Flächen zu bestimmen. Eine Standardabweichung ist in diesem Fall nicht sinnvoll, da es sich um eine Größenverteilung handelt, die stark vom einer gaußförmigen Verteilung abweicht. Deswegen wird die laterale Kristallgröße mit Hilfe von Histogrammen dargestellt. Die in den Histogrammen dargestellt Größenverteilung ist in der Tabelle 8.1 noch einmal in einer vereinfachten Form aufgeführt. Für diese Messwertung wurden REM-Aufnahmen mit 500-facher Vergrößerung aufgenommen (Abbildung 8.13) und diese Bilder dann mittels der Software SPIP bezüglich der lateralen Kristallflächen ausgewertet. Die Abbildungen 8.14 bis 8.17 sind Histogramme, die die Größenverteilung der Kristalle jeder Probe bei den unterschiedlichen aufgesputterten Goldmengen auf SiO₂ zeigen.

Die Tabelle 8.1 gibt die Zahl der Kristalle in 6 verschiedene lateralen Größenbereichen

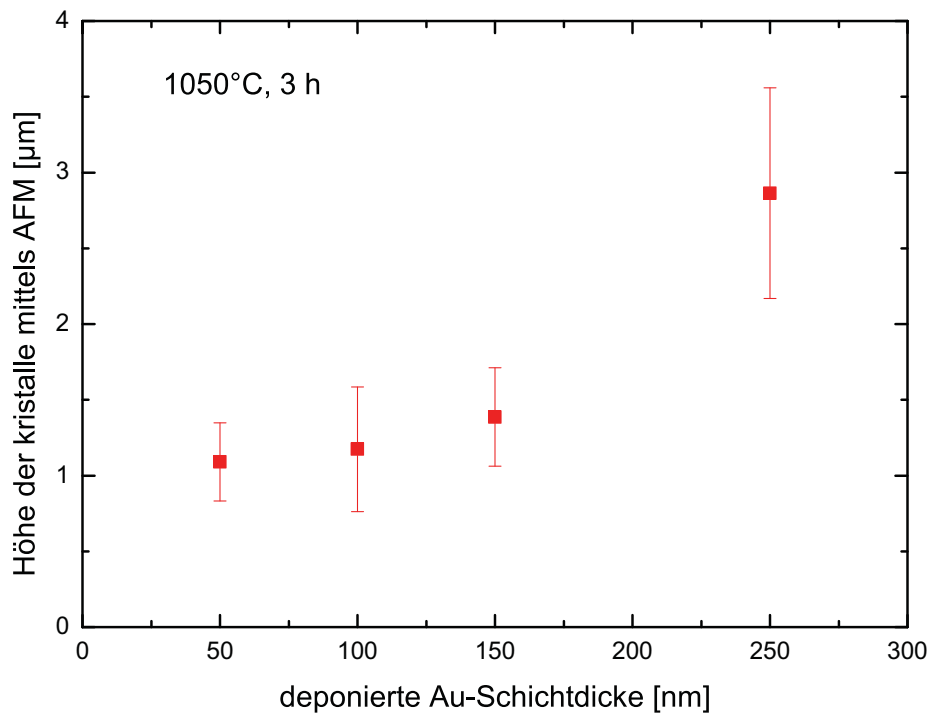


Abbildung 8.12: Abhängigkeit der Clusterhöhe von der deponierten Au-Schichtdicke. Präparationsparameter: Sputterdeposition von 50/100/150/250 nm, drei Stunden bei einer Temperatur von 1050°C anneal.

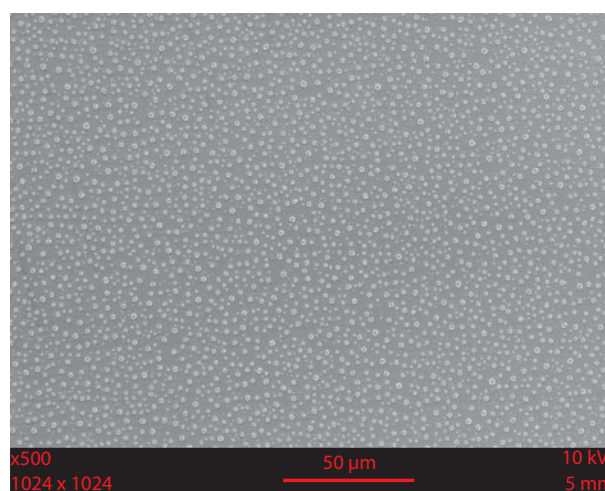


Abbildung 8.13: REM-Aufnahmen mit kleinerer Vergrößerung (500 fach) einer Probe mit 150 nm, die anschließend drei Stunden bei 1050°C anneal wurde. Die dargestellte REM-Aufnahme zeigt eine Fläche von 0,04 mm².

von Proben mit unterschiedlichen deponierten Schichtdicken an. Die Kristalle, die für Beugungsaufnahmen unseres DXT-Aufbaus interessant sind, haben Flächen zwischen 1 - 5 μm^2 . Es ist zu sehen, dass die 50 nm Probe die größte Menge von Kristallen besetzt, die diese Flächengröße (zwischen 1 - 5 μm^2) haben. Die AFM-Daten zeigen, dass die Kristalle dieser Probe die niedrigste Höhe haben. Diese Probe hat auch eine hohe Zahl von Kristallen die eine Fläche zwischen 0,5 - 1 μm^2 haben. In der zweite Stelle kommt die 150 nm Probe, die größte Menge von Kristallen, die die Flächengröße (zwischen 1 - 5 μm^2), besetzt, aber diese Probe hat im Vergleich zu allen anderen Proben eine extrem hohe Zahl von Kristallen, die eine Fläche kleiner als 0,5 μm^2 haben. Leider wurde jede Probe nur ein Mal hergestellt, dewegen besteht nur die Vermutung dass diese Probe einen Fehler hatte oder nicht sauber war. Die Probe mit der deponierten Goldmenge von 250 nm hat die höchste Zahl von Kristallen, die eine Fläche zwischen 5 - 10 μm^2 aufweisen. Die Probe hat aber die kleinste Zahl von Kristallen zwischen 1 - 5 μm^2 . Die Probe mit der deponierten Goldmenge von 100 nm hat zwar nicht die höchste Anzahl von Kristallen zwischen 1 - 5 μm^2 , sie hat aber eine ausreichliche Anzahl von Kristallen in diesem Bereich. Diese Probe hat aber gegenüber den 50 nm und 150 nm Proben eine deutlich geringere Anzahl von kleineren Kristallen im Größenbereich kleiner als 1 μm^2 . Aus diesem Grund wurde bei weiteren Untersuchungen bezüglich der Annealing-Temperatur und -Zeit eine deponierte Au-Schichtdicke von 100 nm verwendet.

	50 nm	100 nm	150 nm	250 nm
$< 0,5 \mu\text{m}^2$	550	780	2780	135
0,5 - 1 μm^2	1000	357	760	10
1 - 5 μm^2	2400	1536	1905	61
5 - 10 μm^2	50	63	68	213
10 - 20 μm^2	26	0	0	177
20 - 50 μm^2	5	0	0	6

Tabelle 8.1: Ergebnisse der Größenverteilung der lateralen Kristallflächen der Proben mit unterschiedlichen deponierten Schichdicken (siehe Histogramme 8.14 bis 8.17). Angegeben ist die Anzahl der Kristalle.

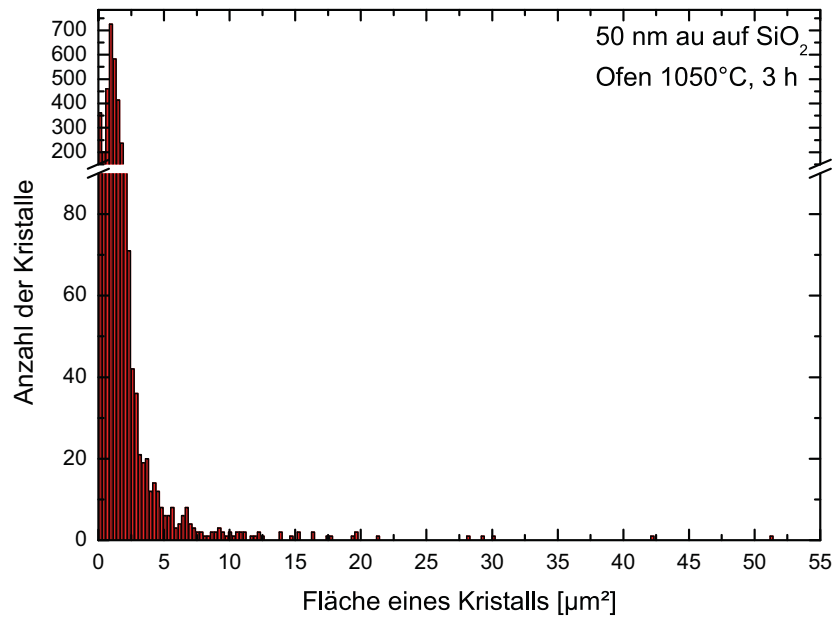


Abbildung 8.14: Histogramm der Größenverteilung der lateralen Kristallflächen der Probe mit 50 nm deponierte Goldschichtdicke.

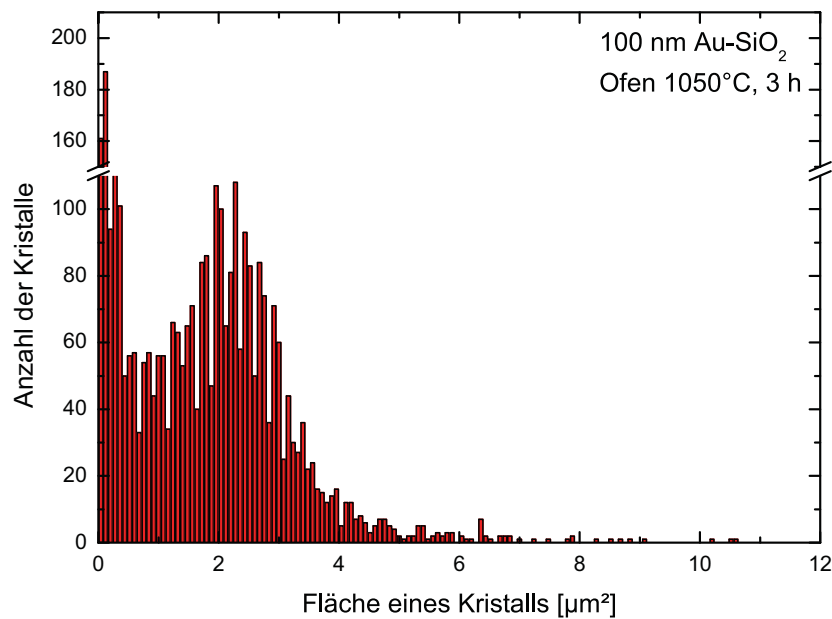


Abbildung 8.15: Histogramm der Größenverteilung der lateralen Kristallflächen der Probe mit 100 nm deponierte Goldschichtdicke.

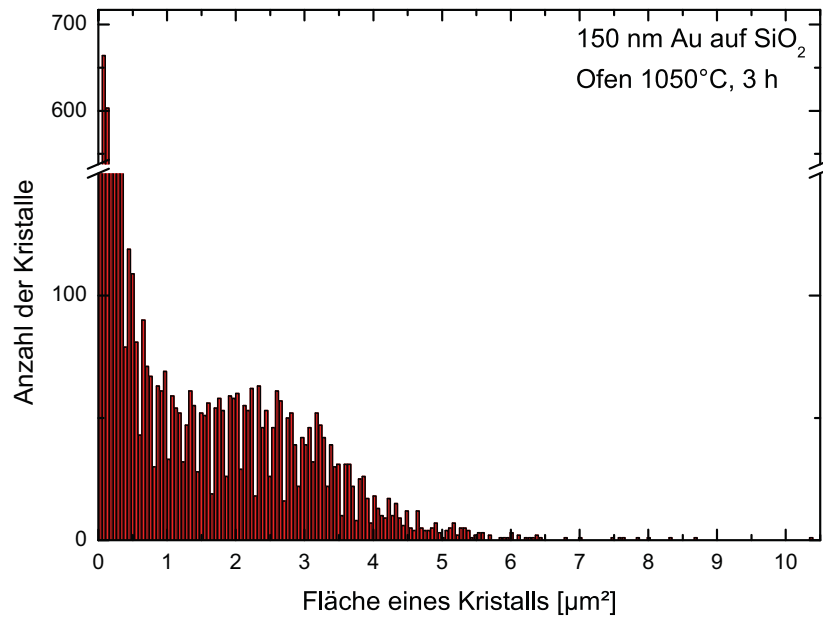


Abbildung 8.16: Histogramm der Größenverteilung der lateralen Kristallflächen der Probe mit 150 nm deponierte Goldschichtdicke.

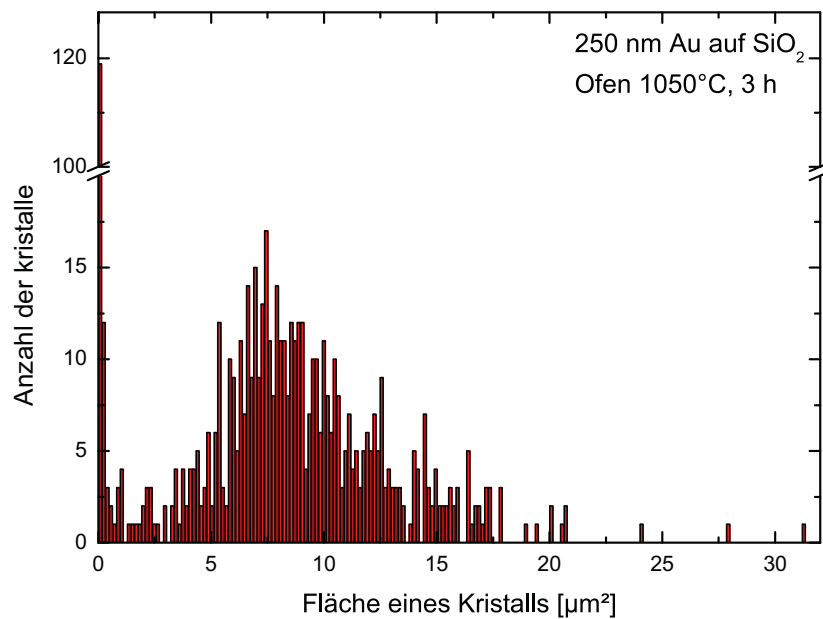


Abbildung 8.17: Histogramm der Größenverteilung der lateralen Kristallflächen der Probe mit 50 nm deponierte Goldschichtdicke.

8.2 Einfluss der Substrattemperatur

Zur Untersuchung des Einflusses der Substrattemperatur auf die Mikro-Kristalle wurden Proben mit 100 nm Au auf SiO₂ aufgeputtert und anschließend im Ofen drei Stunden bei unterschiedlichen Temperaturen zwischen 900°C und 1080°C annealt. Die Proben sind mit der gleichen Sputterrate von 0,11 nm/s, bei einem Ar-Partialdruck 13,3 Pa hergestellt wurden. Die Annealing-Temperaturen waren, 900°C, 930°C, 960°C, 990°C, 1020°C, 1050°C und 1080°C.

Röntgendiffraktometermessungen der Au-Kristalle auf SiO₂-Substraten bei verschiedenen Temperaturen sind in den Abbildungen 8.18 und 8.19 dargestellt. In Abbildung 8.18 sind die $\Theta/2\Theta$ -Messungen dargestellt. Der Au(111)-Peak bei $\Theta = 19,1^\circ$ Glanzwinkel ist hier wieder zu beobachten. Die 960°C-Probe wurde nur von 15° bis 22° vermessen. Bei allen anderen wurde die Messung bei 0° gestartet und bei etwa 35° beendet. In Abbildung 8.19 sind die zugehörigen Rocking-Kurven bei $\Theta = 19,1^\circ$ dargestellt. Der größte Anteil von Kristallen mit der Ausrichtung Au(111) parallel zur Substratoberfläche ist bei der Probe, der bei einer Temperatur von 1050°C annealt wurde, festzustellen.

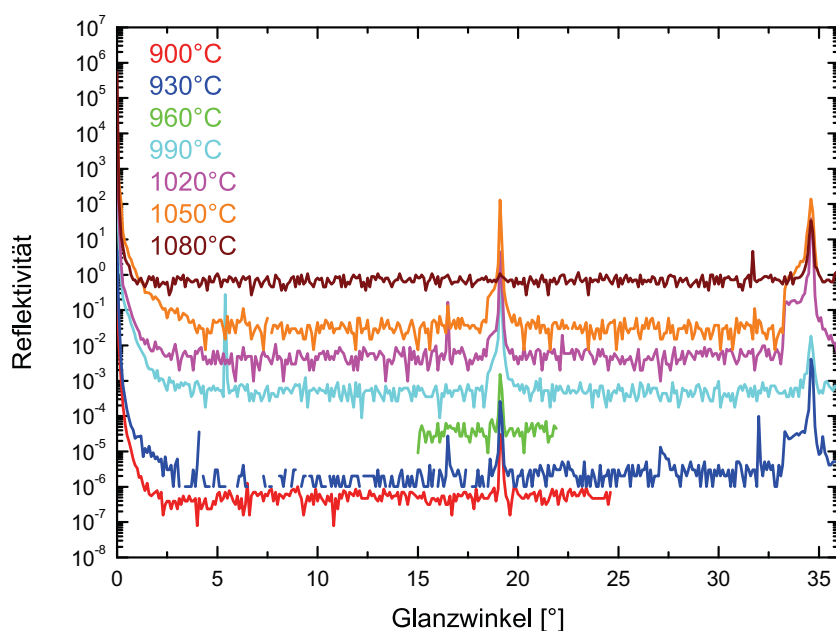


Abbildung 8.18: $\Theta/2\Theta$ -Messungen von Proben bei verschiedenen Temperaturen. Präparationsparameter: Sputterdeposition 100 nm Au auf SiO₂-Oberfläche, drei Stunden bei Temperaturen von 900°C, 930°C, 960°C, 990°C, 1020°C, 1050°C und 1080°C annealt.

Die Abbildung 8.20 zeigt die Lichtmikroskopie-Aufnahmen der bei verschiedenen

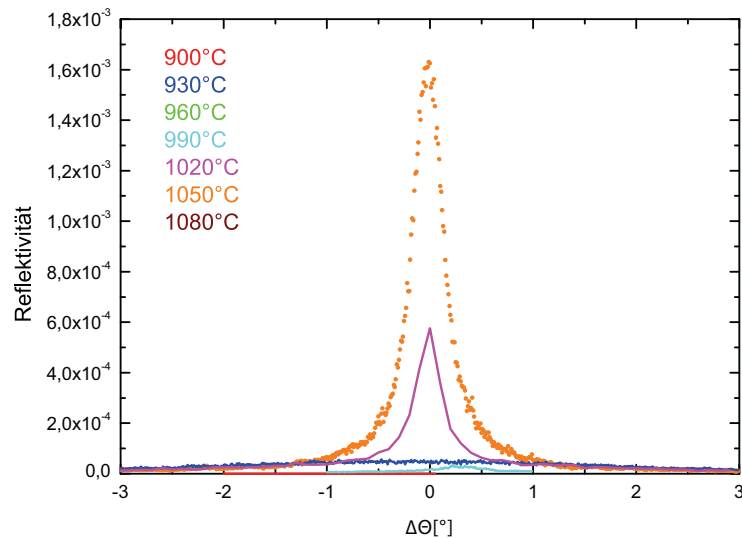


Abbildung 8.19: Rocking-Kurven von Proben bei verschiedenen Temperaturen. Präparationsparameter: Sputterdeposition 100 nm Au auf SiO_2 -Oberfläche, drei Stunden bei Temperaturen von 900°C, 930°C, 960°C, 990°C, 1020°C, 1050°C und 1080°C annealt.

Temperaturen hergestellten Proben. Zu sehen sind längliche unregelmäßige Strukturen bei niedrigen Temperaturen. Erst ab 960°C werden diese etwas kürzer und fangen an, runde und elliptische Formen zu bilden. Bei Temperaturen ab 1020°C sind fast nur kreisförmige Kristalle zu sehen. Die Verteilung der Kristalle auf der Substratoberfläche ist fast überall gleichmäßig. Die Flächendichte der Goldkristalle auf der Oberfläche wird mit höheren Temperaturen kleiner. Der Grund dafür ist, dass die Kristalle sich zusammen lagern und ein Teil des Goldes verdampft.

Abbildung 8.21 zeigt rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von den hergestellten Proben mit 100 nm aufgesputterter Goldschichtdicke, anschließend drei Stunden bei Temperaturen von 900°C, 930°C, 960°C, 990°C, 1020°C, 1050°C und 1080°C annealt. Bei den niedrigen Temperaturen 900°C, 930°C sind Goldcluster mit unregelmäßigen Strukturen zu erkennen. Erst ab 960°C bilden die Cluster kreisförmige und elliptische Formen aus. Bei Temperaturen ab 1020°C sind fast nur kreisförmige Cluster zu beobachten. Die Verteilung der Cluster auf der Substratoberfläche ist fast überall gleichmäßig. Die Oberflächendichte der Goldcluster auf der Oberfläche wird mit höheren Temperaturen kleiner. Der Grund dafür ist, dass die Kristalle sich zusammen lagern und ein Teil des Goldes verdampft.

In Abbildung 8.22 ist die Kristallhöhe in Abhängigkeit von der Annealing-Temperaturen dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Temperatur einen Einfluss auf die Höhe der Kristalle bzw. Cluster hat. Die Höhe steigt mit steigenden Temperaturen von $0,7 \mu\text{m}$ bei der Probe mit der niedrigen Temperatur 900°C auf $1,2 \mu\text{m}$ bei den Proben mit

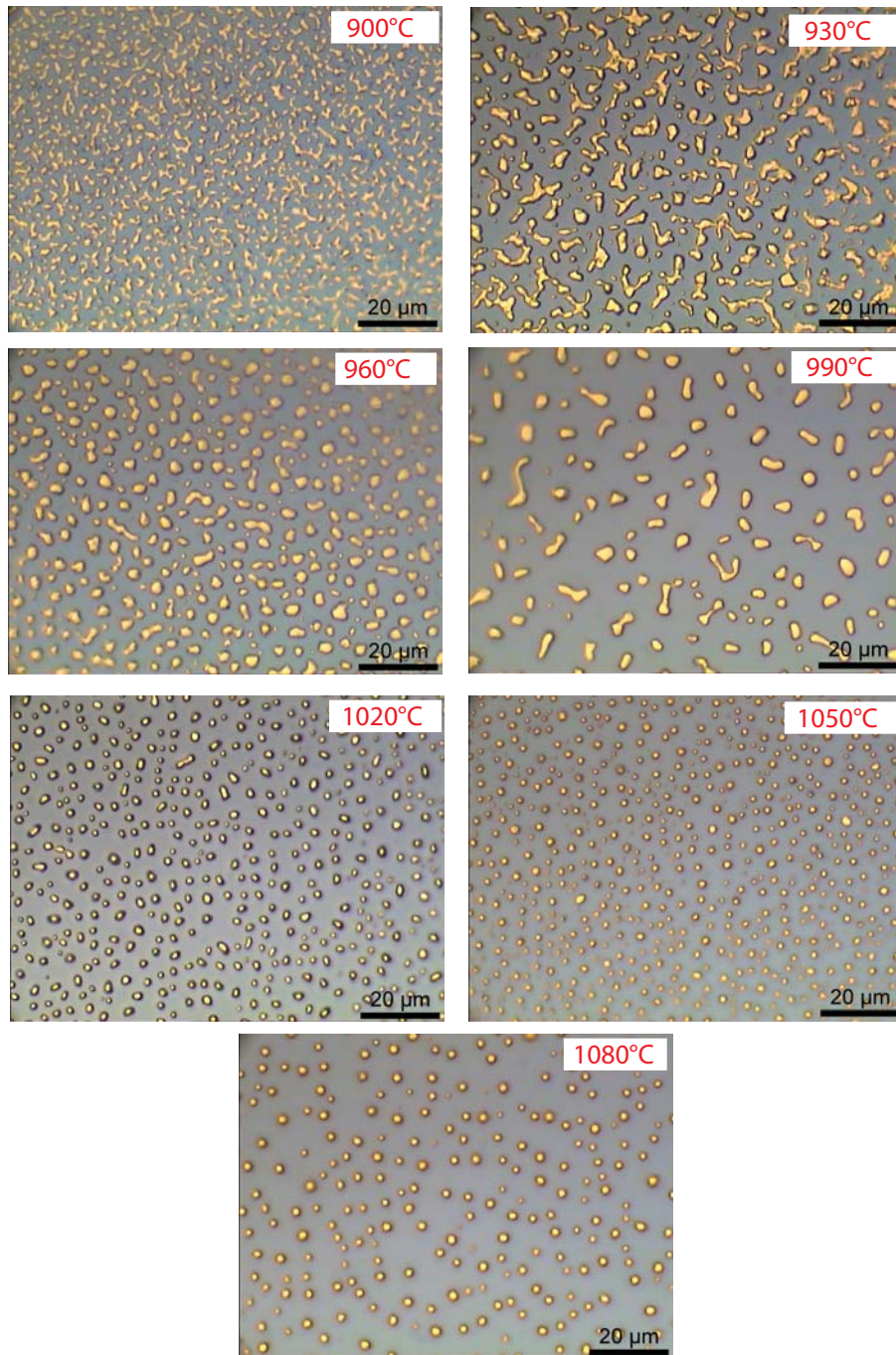


Abbildung 8.20: Lichtmikroskopie-Aufnahmen von Au-Cluster auf SiO₂ bei verschiedenen Temperaturen präpariert.

Präparationsparameter: Sputterdeposition 100 nm Au auf SiO₂-Oberfläche, drei Stunden bei Temperaturen von 900°C, 930°C, 960°C, 990°C, 1020°C, 1050°C und 1080°C annealt.

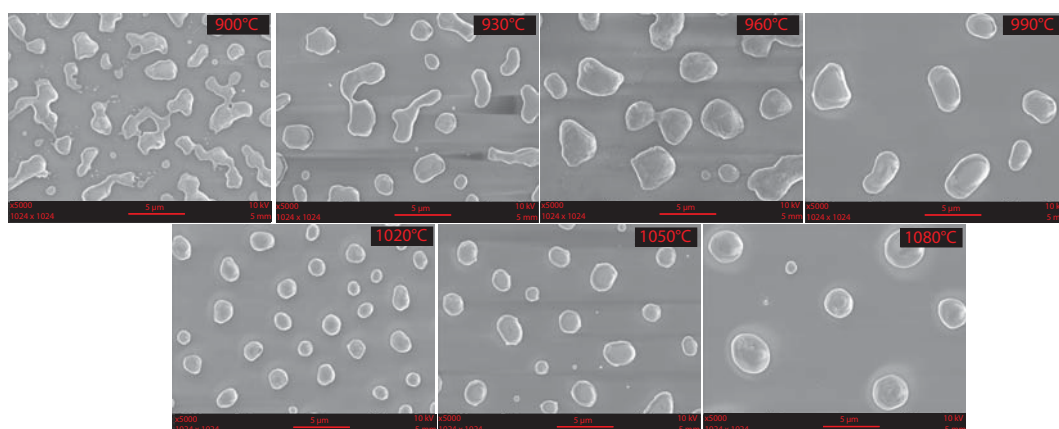


Abbildung 8.21: REM-Aufnahmen von Au auf SiO₂ bei verschiedenen Annealing-Temperaturen präpariert.

Präparationsparameter: Sputterdeposition 100 nm Au auf SiO₂-Oberfläche, drei Stunden bei Temperaturen von 900°C, 930°C, 960°C, 990°C, 1020°C, 1050°C und 1080°C annealt.

930°C und 960°C. Bei 990°C steigt die mittlere Höhe auf 1,5 µm. Danach fällt die Höhe wieder auf 1,3 µm bei 1020°C und auf 1,1 µm bei 1050°C ab. Aber bei der Temperatur von 1080°C steigt die Höhe wieder stark an und erreicht 1,8 µm.

Die Tabelle 8.2 gibt die Anzahl der Kristalle in verschiedenen Größenbereichen der lateralen Kristallflächen für Proben, die bei unterschiedlichen Temperaturen annealt wurden. Wie vorher erwähnt wurde, ist ein hoher Anteil an Kristallen im Größenbereich zwischen 1 - 5 µm² erwünscht. Proben, die mit Annealing Temperaturen von 900°C und 930° präpariert wurden, weisen die höchste Anzahl von Kristallen/Cluster in diesem Größenbereich auf. Diese Proben haben aber Kristalle mit der niedrigsten Höhe (Abbildung 8.22). Sie haben auch im Vergleich zu allen anderen Proben eine extrem hohe Anzahl von Clustern, die eine Fläche kleiner als 1 µm² haben. Die Probe mit der Annealing-Temperatur von 960°C hat fast die gleiche Anzahl von Clustern in allen anderen Größenklassen. Die Probe mit der Annealing-Temperatur von 990°C hat keine kleinen Cluster, sondern fast alle Cluster haben eine Fläche zwischen 10 - 50 µm². Die meisten Cluster der Proben mit den Annealing-Temperaturen von 1020°C und 1050°C haben eine Fläche zwischen 1 - 5 µm², aber die Höhe der Cluster mit der Annealing-Temperatur von 1020°C, die mit AFM vermessen wurde, ist höher als die Cluster mit der Annealing-Temperatur von 1050°C. Die Probe mit der Annealing-Temperatur von 1080°C hat die Kristalle/Cluster mit der größten Kristallhöhe (Abbildung 8.22) aber verglichen mit Proben, die bei anderen Annealing-Temperaturen präpariert wurden, eine deutliche geringere Anzahl von Kristallen im Größenbereich zwischen 1 - 5 µm² (außer bei 990°C). Die Proben, die die größte Kristallhöhe und die größte Anzahl von Kristallen, die eine laterale Fläche zwischen 1 - 5 µm² haben, sind die Proben, die bei Annealing-Temperaturen zwischen 1020°C und 1080°C präpariert wurden. Auf diesen Grund wurde für den nächsten Abschnitt bei der Untersuchung von Annealing-Zeit eine Temperatur von 1050°C gewählt. Dabei wurden die XRD-Daten von Abbildung 8.19

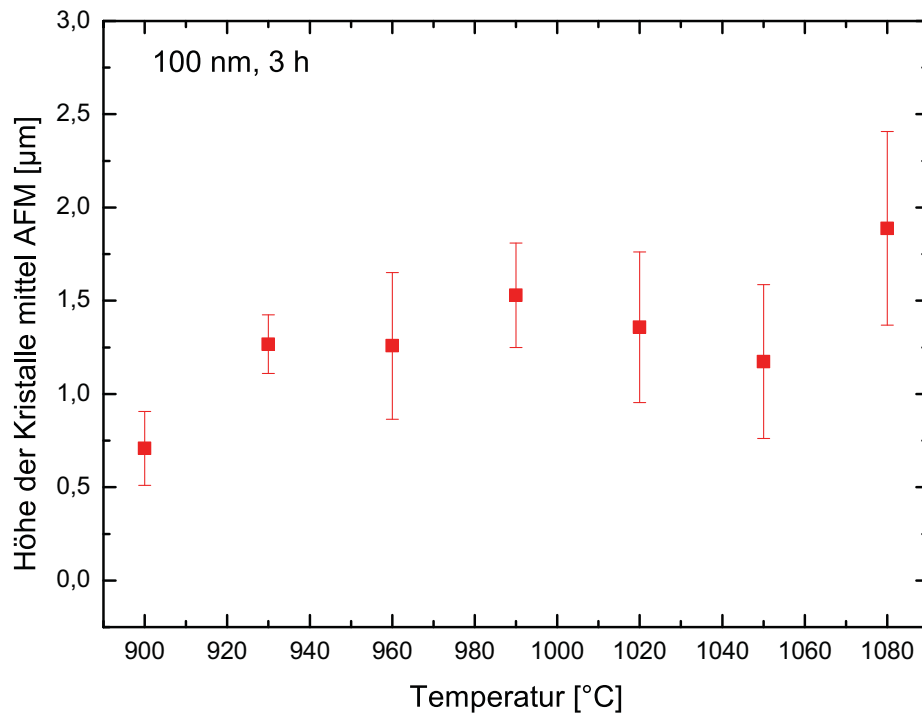


Abbildung 8.22: Graph zur Darstellung der Kristallhöhe in Abhängigkeit von der Substrattemperatur.

Präparationsparameter: Sputterdeposition 100 nm Au auf SiO₂-Oberfläche, drei Stunden im Ofen bei einer Temperaturen von 900°C, 930°C, 960°C, 990°C, 1020°C, 1050°C und 1080°C getempert.

berücksichtigt. Der größte Anteil von Kristallen mit der Ausrichtung Au(111) parallel zur Substratoberfläche ist bei der Probe, die bei einer Temperatur von 1050°C annealt wurde, festzustellen.

Die Abbildungen 8.23 bis 8.29 sind Histogramme, die die Größenverteilung der Kristalle jeder Probe bei den unterschiedlichen Annealing-Temperaturen zeigen.

	900°C	930°C	960°C	990°C	1020°C	1050°C	1080°C
$< 0,5 \mu\text{m}^2$	4000	0	750	0	260	780	68
$0,5 - 1 \mu\text{m}^2$	4000	2750	110	0	140	357	17
$1 - 5 \mu\text{m}^2$	6500	2750	395	0	2324	1536	248
$5 - 10 \mu\text{m}^2$	1025	2700	570	0	77	63	354
$10 - 50 \mu\text{m}^2$	225	250	365	600	10	0	17
$50 - 400 \mu\text{m}^2$	8	0	38	0	0	0	0
$> 400 \mu\text{m}^2$	0	1	0	32	0	0	0

Tabelle 8.2: Ergebnisse der Größenverteilung der lateralen Kristallflächen der Proben mit unterschiedlichen Annealing-Temperaturen (siehe Histogramme 8.23 bis 8.29). Angegeben wird Anzahl der Kristalle.

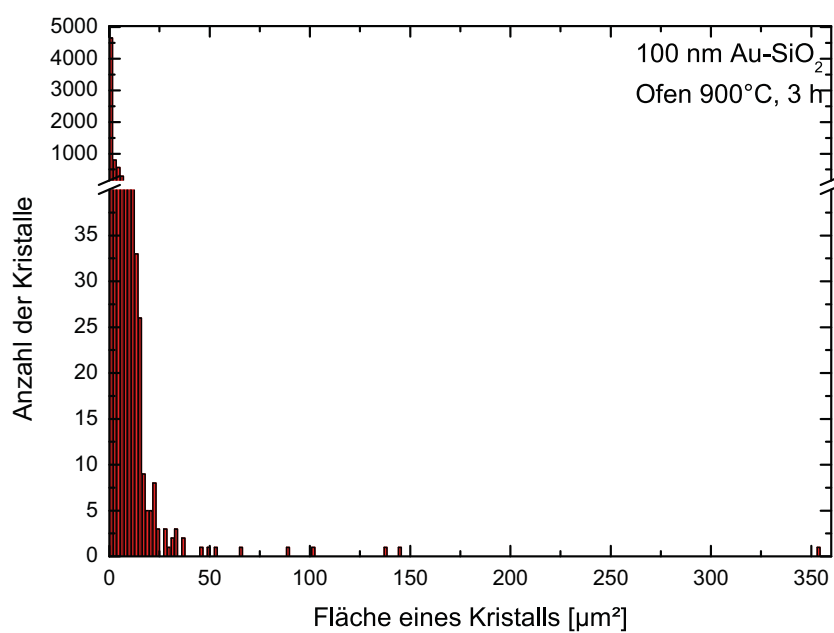


Abbildung 8.23: Histogramm der Größenverteilung der lateralen Kristallflächen der Probe mit 900°C.

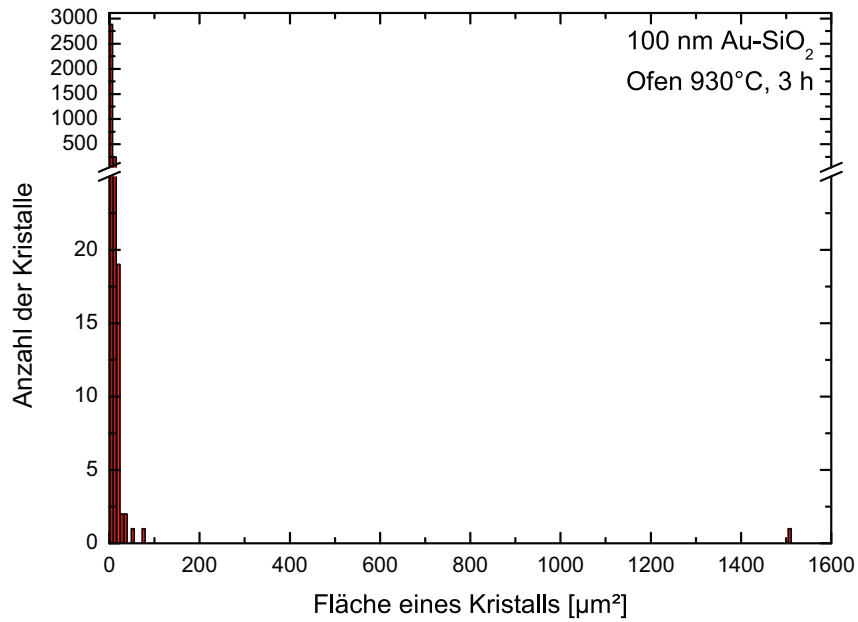


Abbildung 8.24: Histogramm der Größenverteilung der lateralen Kristallflächen der Probe mit 930°C.

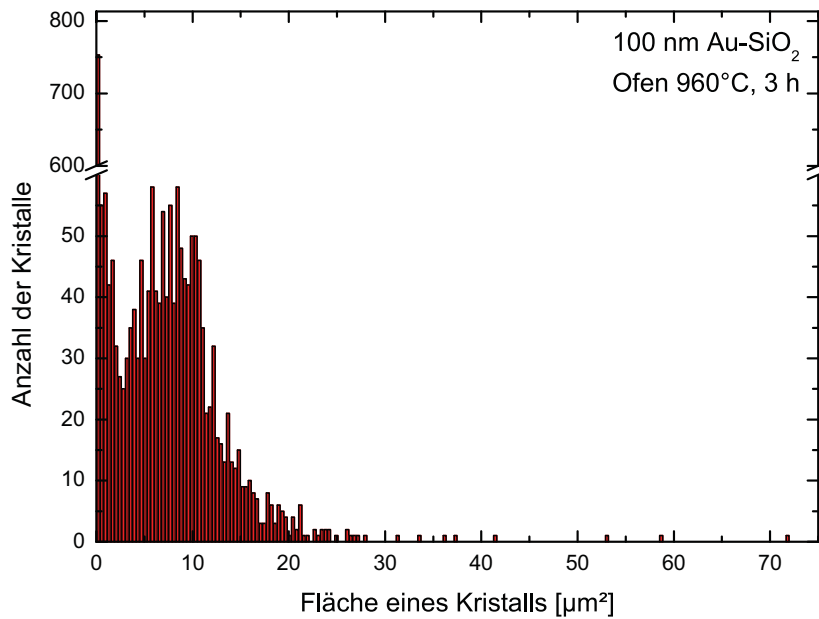


Abbildung 8.25: Histogramm der Größenverteilung der lateralen Kristallflächen der Probe mit 960°C.

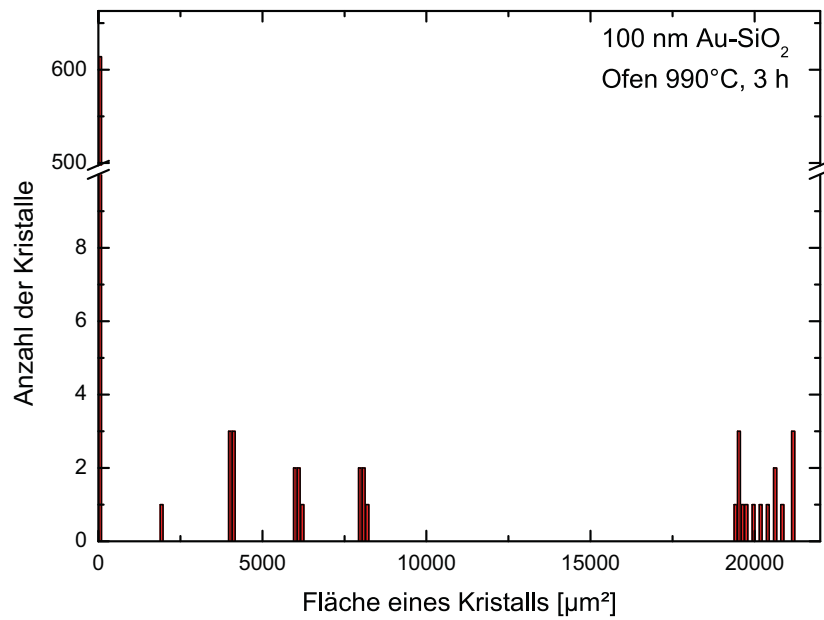


Abbildung 8.26: Histogramm der Größenverteilung der lateralen Kristallflächen der Probe mit 990°C.

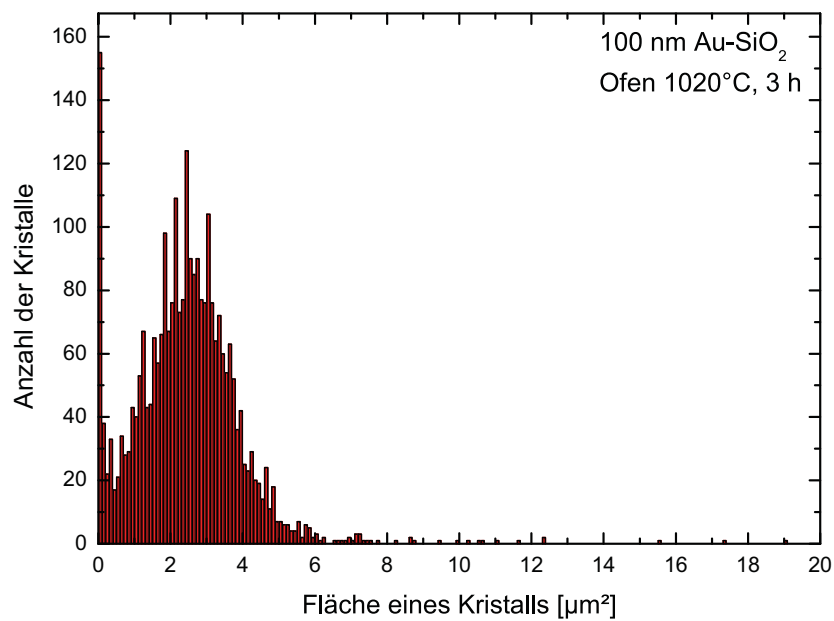


Abbildung 8.27: Histogramm der Größenverteilung der lateralen Kristallflächen der Probe mit 1020°C.

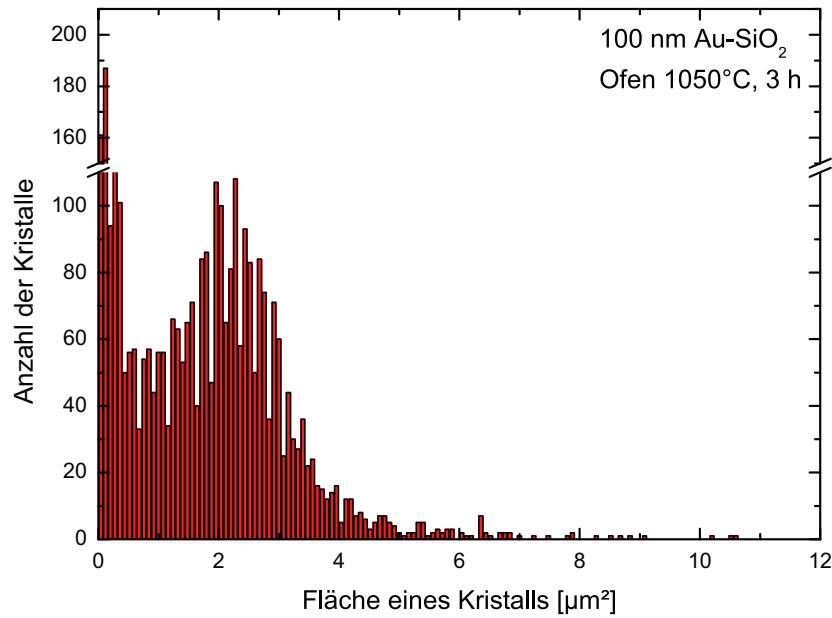


Abbildung 8.28: Histogramm der Größenverteilung der lateralen Kristallflächen der Probe mit 1050°C.

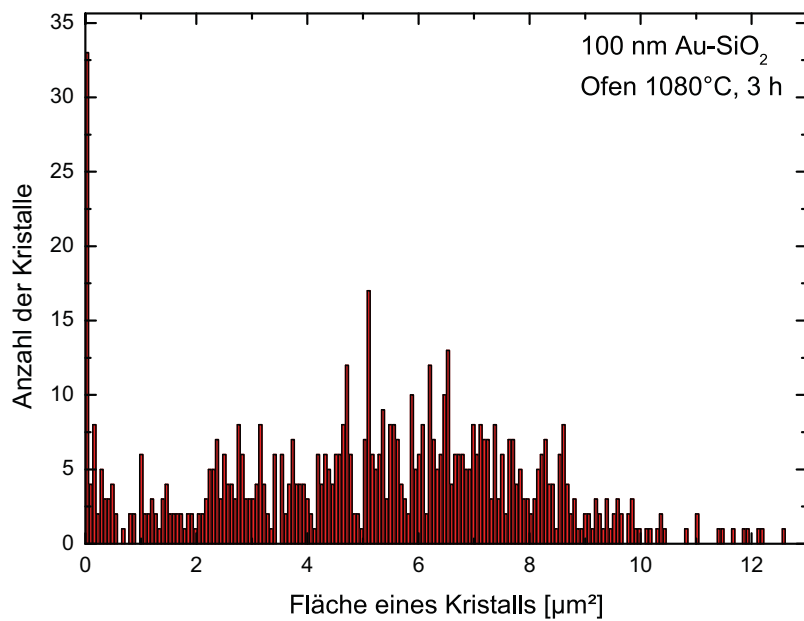


Abbildung 8.29: Histogramm der Größenverteilung der lateralen Kristallflächen der Probe mit 1080°C.

8.3 Einfluss der Annealing-Zeit

Zur Untersuchung des Einflusses der Annealing-Zeit wurden die Proben für zwei, drei, sieben und zehn Stunden annealt. Bei allen Proben wurde 100 nm bei der gleichen Sputterrate von 0,11 nm/s, bei einem Ar-Partialdruck 13,3 Pa aufgesputtert. Anschließend wurden die Proben im Ofen bei 1050°C annealt.

Röntgendiffraktometermessungen von Proben mit Au-Kristallen auf SiO₂-Substraten mit verschiedenen Annealing-Zeiten sind in den Abbildungen 8.30 und 8.31 zu sehen. In Abbildung 8.30 sind die $\Theta/2\Theta$ -Messungen dargestellt. Der Au(111)-Peak bei $\Theta = 19,1^\circ$ Glanzwinkel ist hier wieder zu beobachten. Die 10 Stunden-Probe wurde nur von 15° bis 22° vermessen. Bei allen anderen wurde die Messung bei 0° gestartet und bei fast 35° beendet. In Abbildung 8.31 sind die zugehörigen Rocking-Kurven bei $\Theta = 19,1^\circ$ dargestellt. Der größte Anteil von Kristallen mit der Ausrichtung Au(111) parallel zur Substratoberfläche ist bei der Probe, die mit drei Stunden annealt wurde, festzustellen.

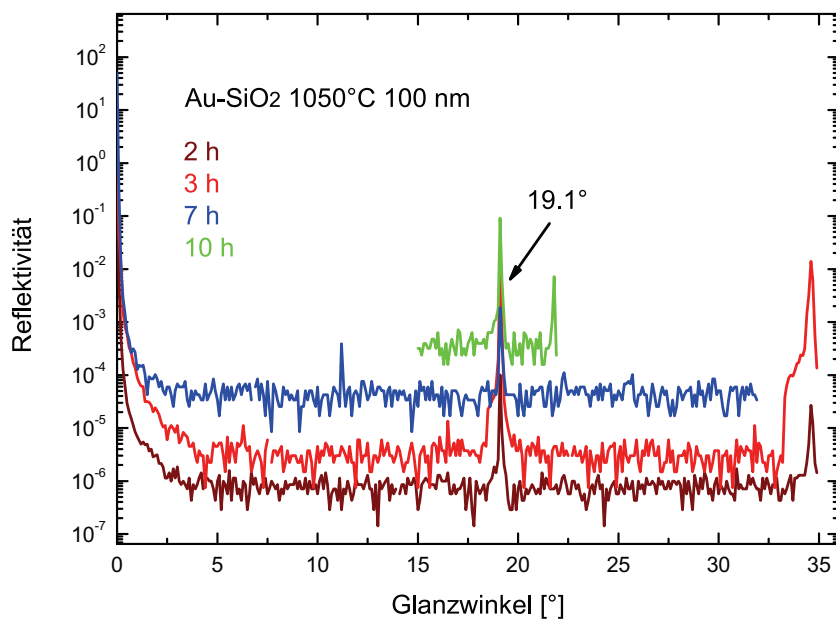


Abbildung 8.30: $\Theta/2\Theta$ -Messungen von Proben bei verschiedenen Annealing-Zeiten. Präparationsparameter: Sputterdeposition 100 nm Au auf SiO₂-Oberfläche, zwei, drei, sieben und zehn Stunden bei einer Temperatur von 1050°C annealt.

Abbildung 8.32 zeigt die Lichtmikroskopie-Aufnahmen der mit verschiedenen Annealing-Zeiten hergestellten Proben. Zu sehen sind kreisförmige und elliptische aber auch kleine längliche ungeordnete Strukturen bei einer Annealing-Zeit von zwei Stunden. Erst nach drei Stunden sind die länglichen ungeordneten Formen nicht mehr zu beobachten. Es

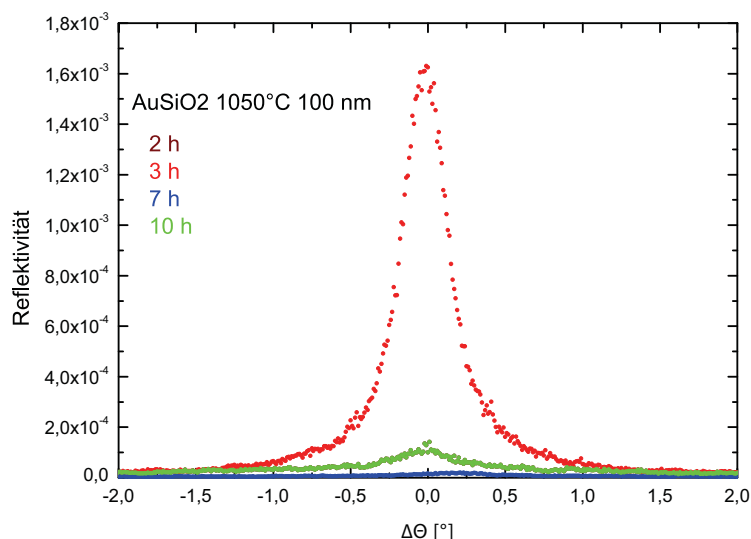


Abbildung 8.31: Rocking-Kurven von Proben bei verschiedenen Annealing-Zeiten. Präparationsparameter: Sputterdeposition 100 nm Au auf SiO₂-Oberfläche, zwei, drei sieben und zehn Stunden bei einer Temperatur von 1050°C annealt.

bilden sich fast nur kreisförmige und elliptische Strukturen. Die Verteilung der Kristalle auf der Substratoberfläche ist fast überall gleichmäßig. Die Oberflächendichte der Goldkristalle auf der Oberfläche wird mit höheren Annealing-Zeiten kleiner. Der Grund ist, dass die Kristalle sich zusammen lagern und auch ein Teil des Goldes verdampft.

Abbildung 8.33 zeigt rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von den mit verschiedenen Annealing-Zeiten hergestellten Proben. Anhand der REM-Aufnahmen kann kein signifikanter Einfluss der Annealing-Zeit auf die Form der Cluster festgestellt werden. Sie ist kreisförmig und ellipsenförmig bei allen Annealing-Zeiten.

In Abbildung 8.34 ist Clusterhöhe in Abhängigkeit von der Annealing-Zeit dargestellt. Die Höhe der Cluster (mittels AFM bestimmt) zeigt ebenfalls keine signifikante Abhängigkeit bezüglich Dauer des Annealing. Sie liegt zwischen $1,1 \mu\text{m}$ (3 h) und $1,6 \mu\text{m}$ beim Annealing von zehn Stunden.

Die Tabelle 8.3 gibt die Anzahl der Kristalle in verschiedenen Größenbereichen der lateralen Kristallflächen für Proben, die bei unterschiedlichen Annealing-Zeiten an. Es ist zu erkennen, dass es keinen großen Unterschied in der Flächenverteilung bei den Proben von zwei, drei und sieben Stunden Annealing-Zeiten gibt. Die Zahl der Cluster bei diesen drei Proben ist fast gleich bei der Fläche kleiner als $0,5 \mu\text{m}^2$ und bei der Fläche zwischen $0,5 - 1 \mu\text{m}^2$. Bei der Fläche zwischen $1 - 5 \mu\text{m}^2$ hat die Probe mit der zwei Stunden Annealing-Zeit die größte Anzahl von Cluster. Die Probe mit der zehn Stunden Annealing-Zeit hat die wenigstens Cluster, die eine Fläche zwischen $1 - 5 \mu\text{m}^2$ haben, aber die Höhe der Cluster die mit dem AFM vermessen wurde zeigt, dass

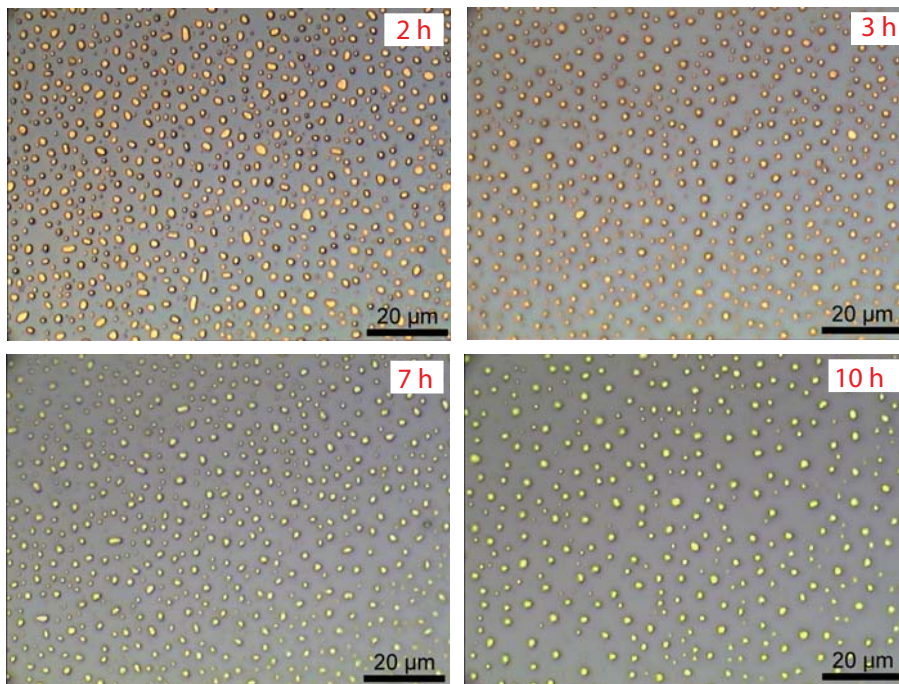


Abbildung 8.32: Lichtmikroskopie-Aufnahmen von Au auf SiO₂ bei verschiedenen Annealing-Zeiten. Alle Proben wurden mit 100 nm Gold auf SiO₂-Oberfläche gesputtert und bei 1050°C annealt.

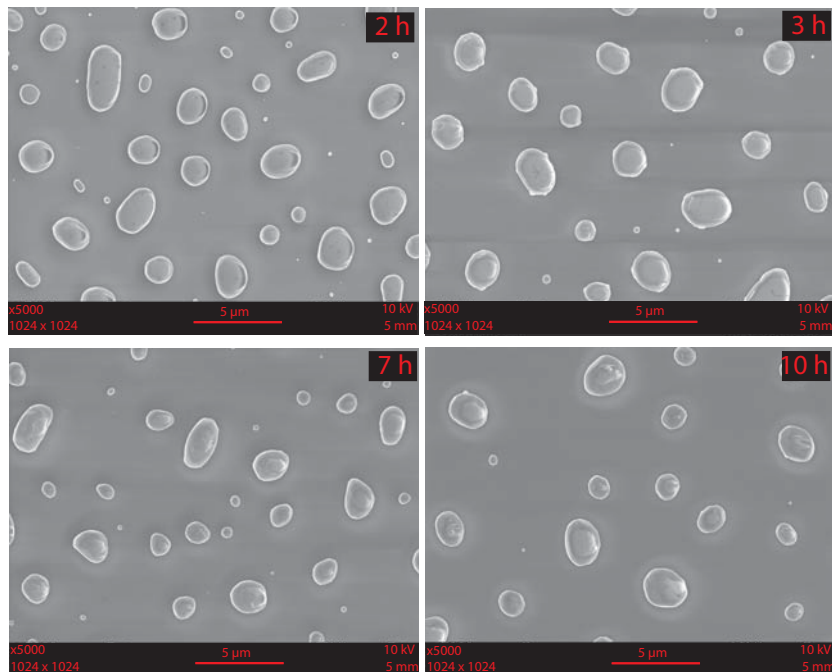


Abbildung 8.33: REM-Aufnahmen von Au auf SiO₂. Bei allen Proben wurden mit 100 nm Gold auf eine SiO₂-Oberfläche aufgesputtert und bei 1050°C über verschiedene Zeiten annealt.

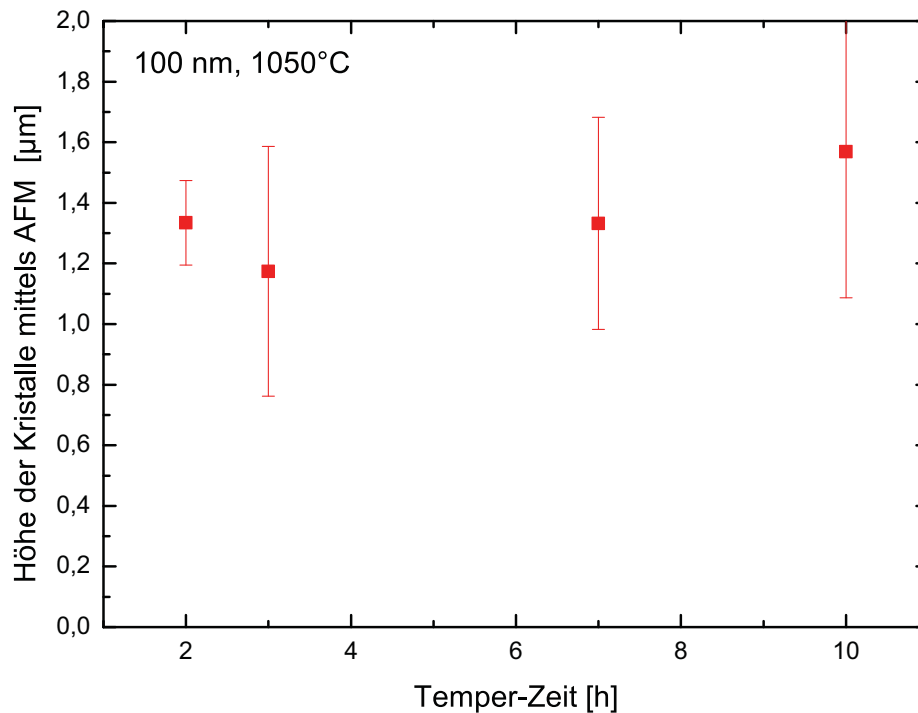


Abbildung 8.34: Kristallhöhe in Abhängigkeit von der Annealing-Zeit
Präparationsparameter: Sputterdeposition 100 nm Au auf SiO₂-Oberfläche, zwei, drei, sieben und zehn Stunden bei einer Temperatur von 1050°C annealt.

diese Cluster die höchsten sind, im Vergleich zu den anderen Annealing-Zeiten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Annealing-Zeit bis zehn Stunden nur eine gewisse Rolle spielt im Bezug auf die Form der Cluster, wenn die Cluster in z-Richtung wachsen, werden sie etwas größer und nehmen eher die Form einer Halbkugel an. Eine andere Forschungsgruppe, die ähnliche Präparation durchgeführt hat, war der Meinung, diese Präparation bei einer niedrigeren Temperatur von 1000°C aber mit 20 Stunden Annealing-Zeit durchzuführen ist [131].

Die Abbildungen 8.35 bis 8.38 sind Histogramme, die die Größenverteilung der Kristalle jeder Probe bei den unterschiedlichen Annealing-Zeiten zeigen.

	2 h	3 h	7 h	10 h
$< 0,5 \mu\text{m}^2$	1005	780	950	313
$0,5 - 1 \mu\text{m}^2$	538	357	474	112
$1 - 5 \mu\text{m}^2$	2017	1536	1541	512
$5 - 10 \mu\text{m}^2$	202	63	49	427
$10 - 50 \mu\text{m}^2$	36	0	0	27

Tabelle 8.3: Ergebnisse der Größenverteilung der lateralen Kristallflächen der Proben mit unterschiedlichen Annealing-Zeiten (siehe Histogramme 8.35 bis 8.38). Angegeben wird die Anzahl der Kristalle

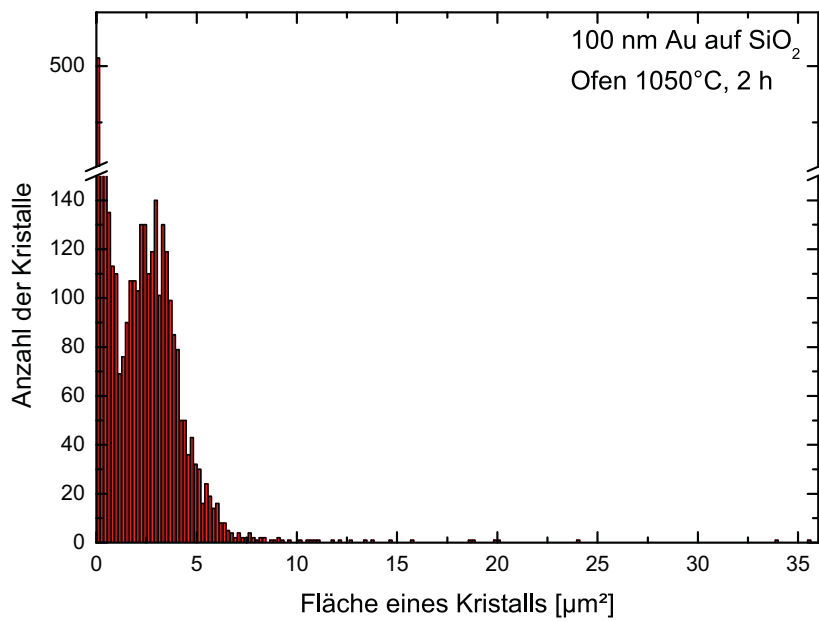


Abbildung 8.35: Histogramm der Größenverteilung der lateralen Kristallflächen der Probe mit 2 h Annealing-Zeit.

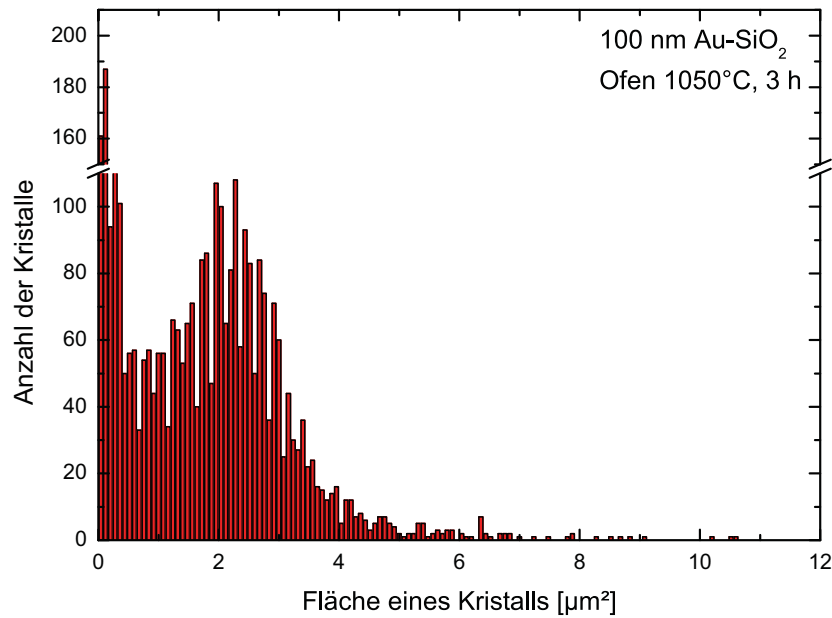


Abbildung 8.36: Histogramm der Größenverteilung der lateralen Kristallflächen der Probe mit 3 h Annealing-Zeit.

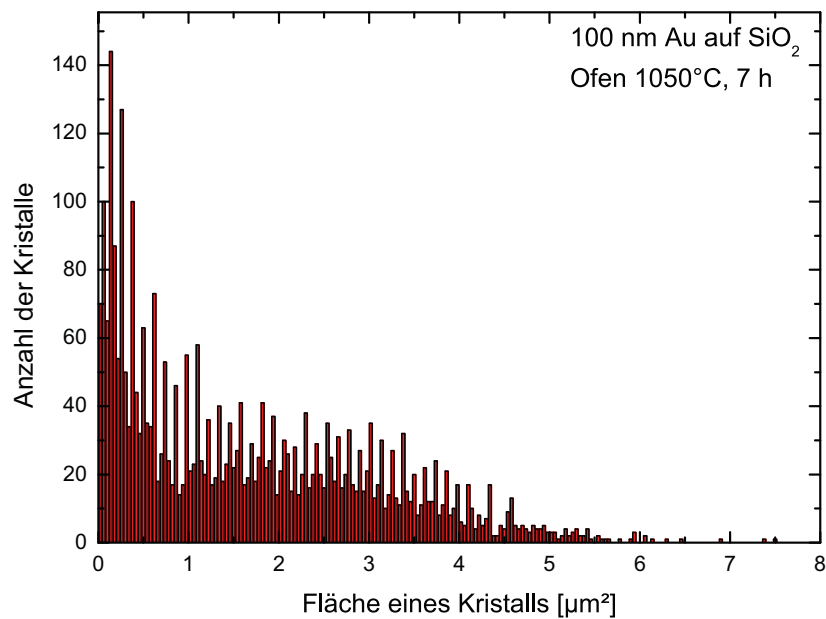


Abbildung 8.37: Histogramm der Größenverteilung der lateralen Kristallflächen der Probe mit 7 h Annealing-Zeit.

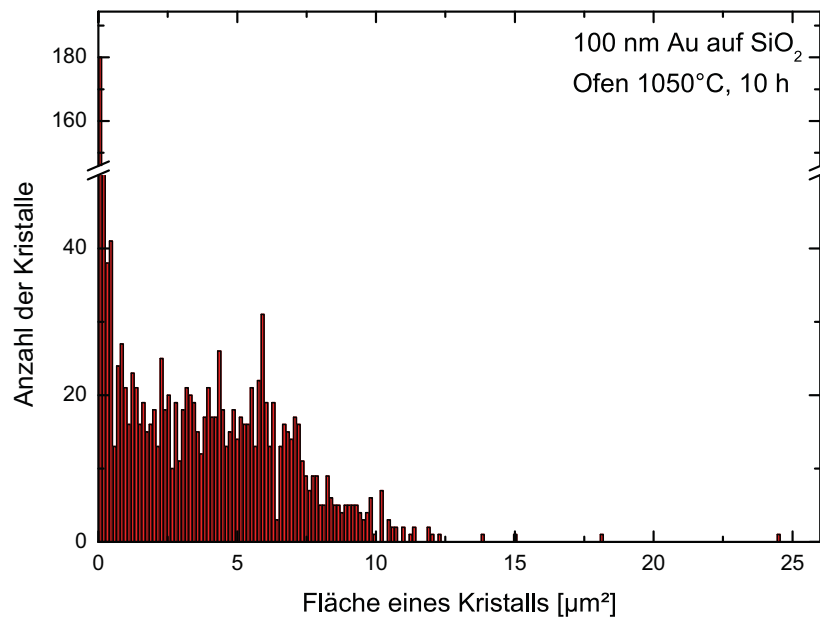


Abbildung 8.38: Histogramm der Größenverteilung der lateralen Kristallflächen der Probe mit 10 h Annealing-Zeit.

Die nächsten Abbildungen (8.39 und 8.40 dieses Abschnittes) sind REM-Aufnahmen mit verschiedenen Vergrößerungen an verschiedenen Proben. Dabei werden die Cluster in einer hohen Vergrößerung gezeigt, die es ermöglicht Details der Cluster- bzw. Kristallstruktur zu erkennen. Diese Kristalle sind nicht speziell ausgewählt worden, sondern sie treten in großer Anzahl auf den Proben auf.

Die fazettenartige Oberflächenstruktur einiger Cluster gibt einen starken Hinweis für eine einkristalline Struktur. Die größte Menge von Kristallen ist bei der Probe von 100 nm aufgespatteten Goldschichtdicke bei Temperaturen zwischen 1020°C bis und 1080°C und die Annealing-Zeit von 3 Stunden entstanden. Aber Kristalle mit Facetten sind bei der Probe von 250 nm aufgespatteten Goldschichtdicke bei einer Temperatur von 1050°C die Annealing-Zeit von 3 Stunden entstanden.

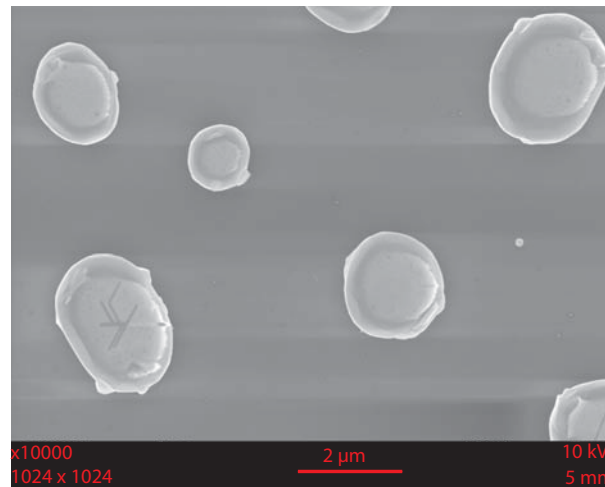


Abbildung 8.39: REM-Aufnahme von Au-Kristallen auf SiO₂.

Die Aufnahme ist mit einer Vergrößerung von 10000 erstellt worden. Die Kristalldurchmesser liegen zwischen ca. ein und drei Mikrometern.

Präparationsparameter: deponierte Schichtdicke: 100 nm, Annealing-Temperatur: 1050°C, Annealing-dauer: 3 h.

8.4 Beugungsaufnahme von Au-Einzelkristall

Die Abbildung 8.41 zeigt einen Cluster/Kristall, der mit dem REM aufgenommen worden ist. Der Clusterdurchmesser beträgt ca. 1,5 µm groß. Die Abbildungen 8.42 und 8.43 zeigen Lichtmikroskopie-Aufnahmen von Einzelkristallen, die mit Hilfe eines Tesakleberbandes oder einer Polymerschicht von der Probenoberfläche abgehoben wurden. Sowohl auf Tesa als auch auf Polymer sind Abdrücke von den Goldkristallen zu erkennen, die nicht an diesen Materialien kleben blieben, sondern auf der SiO₂-Oberfläche geblieben sind. Diese Abdrücke sehen wie Luftblasen aus, einige sind mit blauen Kreise markiert. Die roten Kreise markieren einzelne Goldkristalle.

Abbildung 8.44 ist eine Laue-Beugungsaufnahme eines einzelnen Au-Einkristall. Die Aufnahme wurde drei Mal wiederholt, um sicher zu sein dass die Spots keine Störungen (Rauschen) sind sondern wirklich vom Goldkristall stammen.

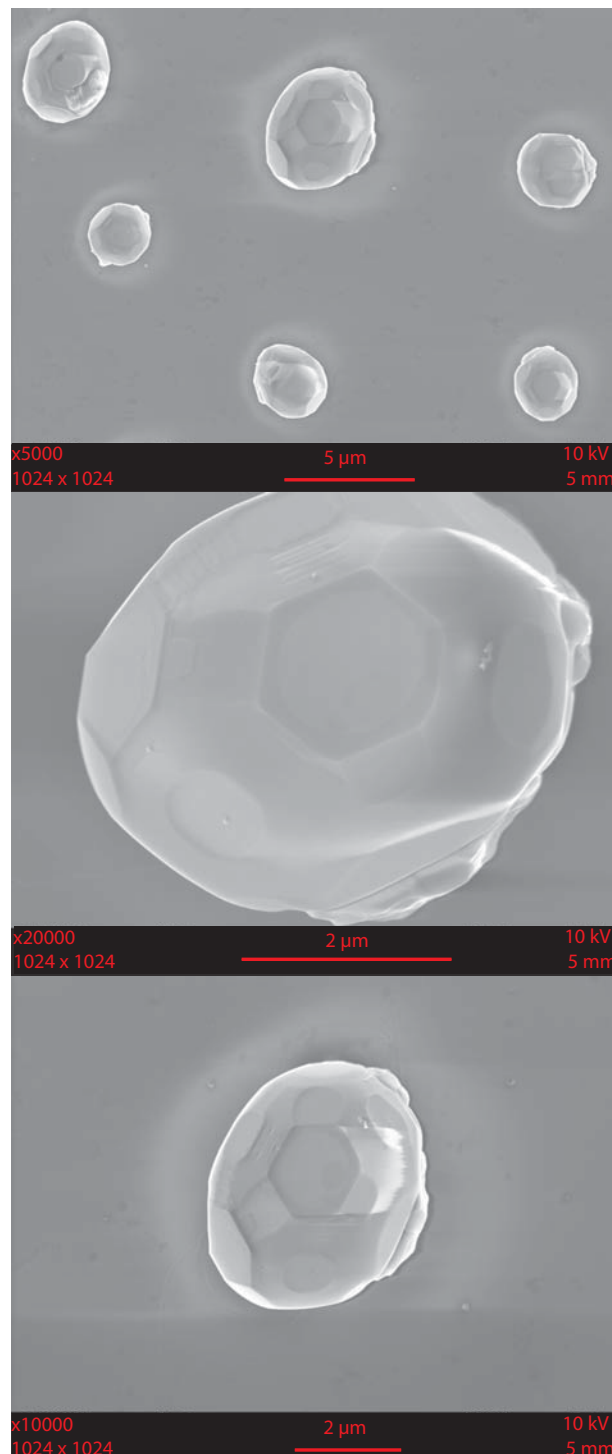


Abbildung 8.40: REM-Aufnahmen von Au-Kristallen auf SiO₂. Die Aufnahmen sind mit drei verschiedene Vergrößerungen x5000 oben, x10000 unten und x20000 in der Mitte erstellt worden. Es ist ganz deutlich die halbkugelförmige Form mit den Fazetten zu erkennen. Die Kristalldurchmesser liegen zwischen ca. zwei und drei Mikrometern. Präparationsparameter: deponierte Schichtdicke: 250 nm, Annealing-Temperatur: 1050°C, Annealing-dauer: 3 h.

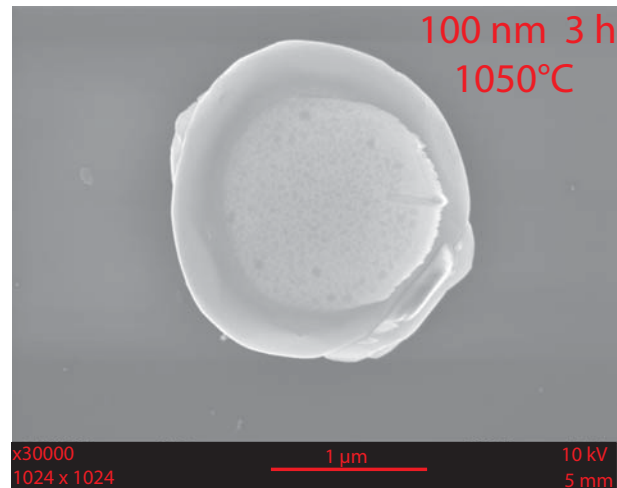


Abbildung 8.41: REM-Aufnahme von einem Au ClusterCluster/Kristall auf SiO₂. Vergrößerung der Aufnahme ist x30000. Präparationsparameter: deponierte Schichtdicke: 100 nm, Annealing-Temperatur: 1050°C, Annealing-dauer: 3 h.

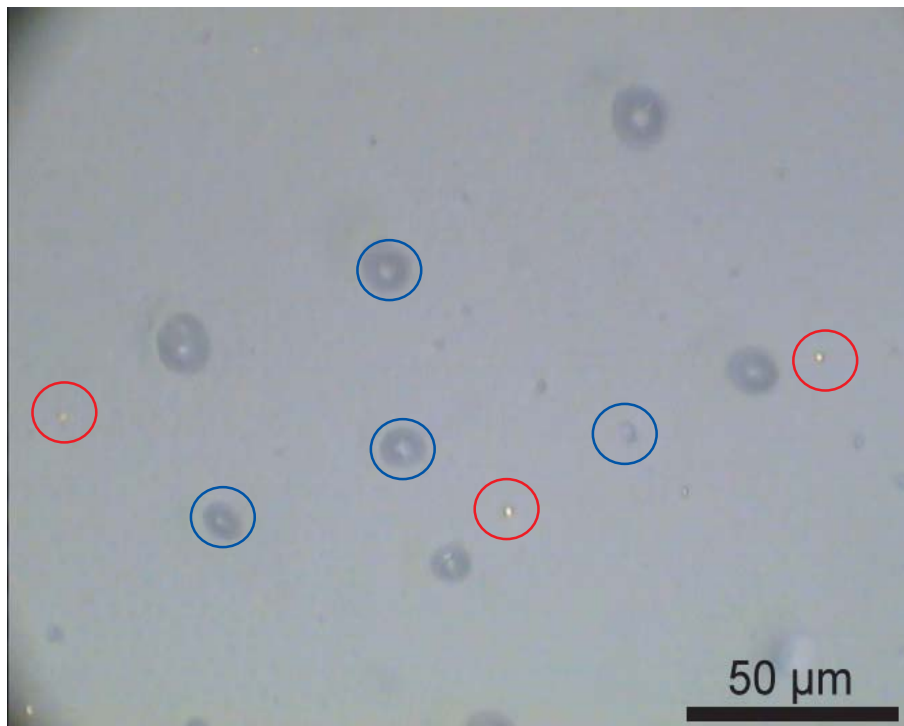


Abbildung 8.42: Lichtmikroskopie-Aufnahmen von Au-Einkristalle auf Tesafilm. Präparationsparameter: deponierte Schichtdicke: 100 nm, Annealing-Temperatur: 1050°C, Annealing-dauer: 3 h.

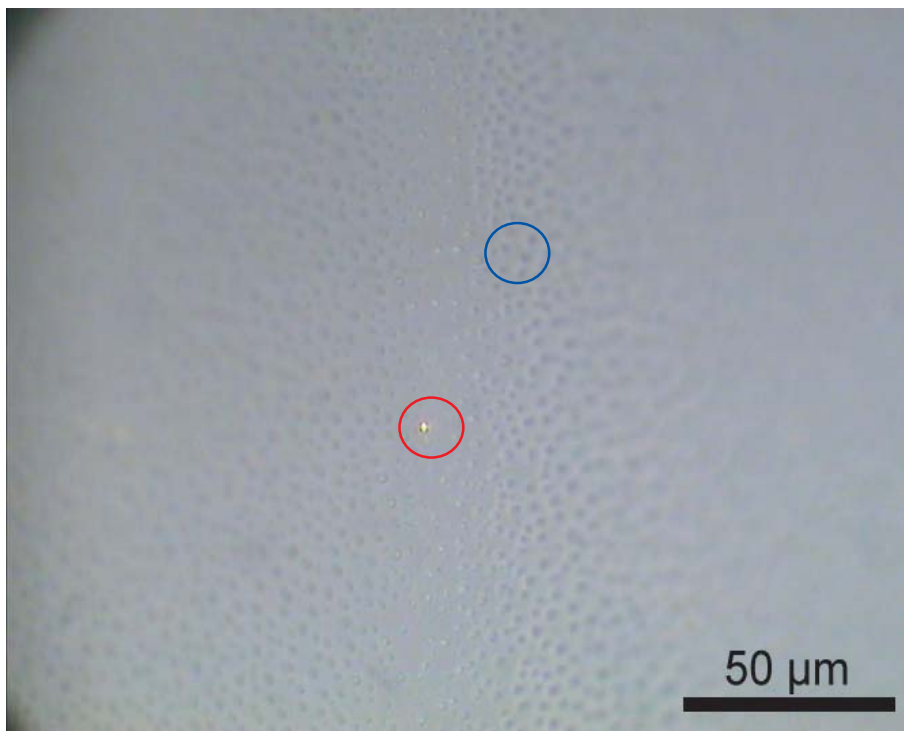


Abbildung 8.43: Lichtmikroskopie-Aufnahmen von Au-Einkristall auf Polymer. Präparationsparameter: deponierte Schichtdicke: 100 nm, Annealing-Temperatur: 1050°C, Annealing-dauer: 3 h.

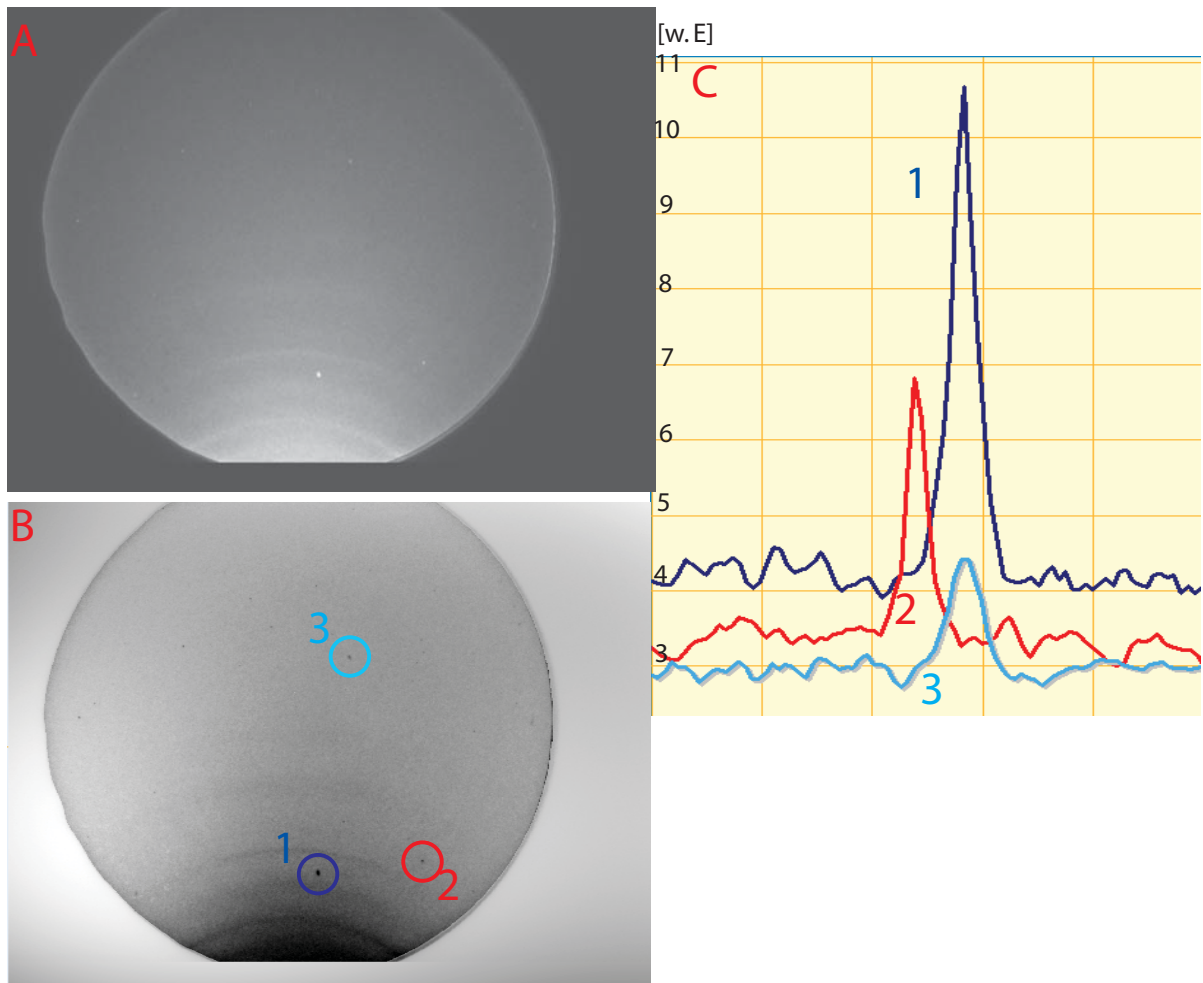


Abbildung 8.44: Laue-Beugungsaufnahme von Au-Einkristall auf Polymer. A) Original Bild graue Skala B) mit der Grau-Reverseskala bearbeitet C) Linescane Helligkeitsverhältnis Hintergrund-Spots.

Präparationsparameter: deponierte Schichtdicke: 100 nm, Annealing-Temperatur: 1050°C, Annealing-dauer: 3 h.

Aufnahme-Parameter: Beschleunigungsspannung 25 kV, Aufnahme-Zeit: 16 min, Beugungswinkel (2θ) des Bildzentrums: 45°, Abstand zwischen Kamera und Probe: 54 mm.

Kapitel 9

Strukturuntersuchungen von freien Nanokristallen mit TEM

In diesem Kapitel werden die TEM-Aufnahmen von Nano-Mo/Si-Multilayerspiegel und Nanogoldkristallen gezeigt. Alle Nanospiegel und Nanokristalle mussten zu diesem Zweck auf der Kohlenstoffschicht eines TEM-Netzchen abgeschieden werden.

9.1 Nano-Mo/Si-Multilayerspiegel

Die erste Abbildung 9.1 in diesem Kapitel ist eine TEM-Aufnahme von einem der hergestellten Nano Mo/Si-Multilayerspiegel. Der in der Abbildung dargestellte Nanospiegel, der ca. 80 nm groß ist, zeigt fünf Mo/Si-Perioden. Eine Röntgenfluoreszenzanalyse (EDX) selektiv im Bereich der untersuchten Nanospiegel bestätigt die chemische Zusammensetzung aus Molybdän und Silizium und gibt damit ein starkes Indiz dafür, dass es sich tatsächlich um die hergestellten nano Mo/Si-Multilayerspiegel handelt, die in Abschnitt 6.1 beschrieben sind.

9.2 Au-Nanokristalle

Die nächsten Abbildungen in diesem Kapitel zeigen TEM-Aufnahmen von freien Nanokristallen. Abbildung 9.2 zeigt eine TEM-Aufnahme, die durch Abscheidung der Au-Kristalle aus der nicht aufgereinigten CHAPS-Lösung auf ein TEM-Netzchen aufgenommen wurde. In der CHAPS-Lösung befand sich zusätzlich noch NaCl, das bei dem Ablösprozess der Au-Kristalle vom NaCl-Substrat in der Lösung verbracht wurde (siehe Abschnitt 6.2). Auf der TEM-Aufnahme sind eine große Anzahl von Würfelförmigen, einige 100 nm großen Kristallen sowie viele ca. 10 nm große Punkte zu erkennen. Die Würfelförmigen Strukturen bzw. Kristalle bestehen wahrscheinlich aus NaCl, das in dieser Form kristallisiert. Die kleinen dunklen Punkte bestehen auf Grund ihres starken Kontrastes zur Unterlage aus einem Material mit einer hohen Kernladungszahl, so

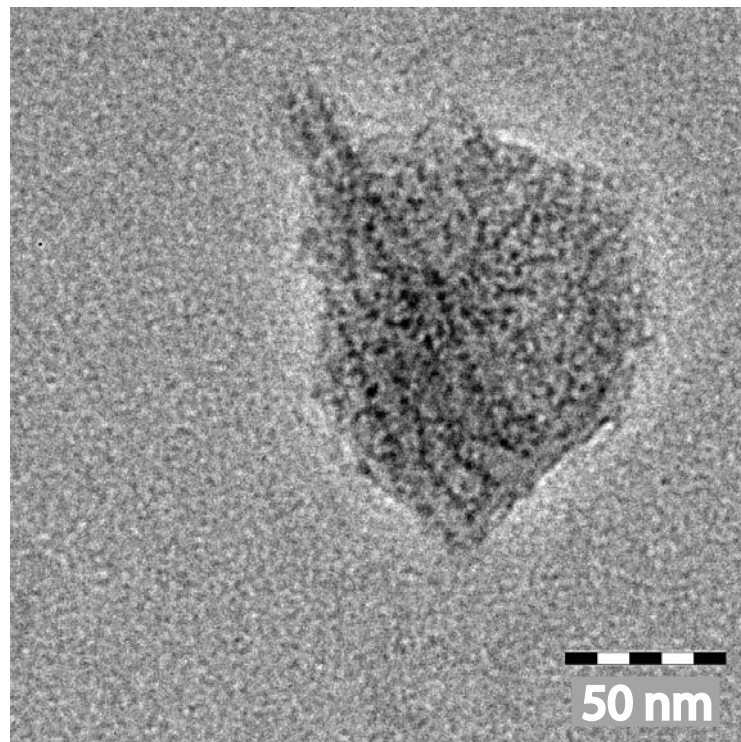


Abbildung 9.1: TEM-Aufnahme eines Nano-Mo/Si Multilyerspiegels.

dass hier nur die Au-Cluster/Kristalle in Frage kommen können. Die Au-Kristalle wurden bei einer Substrattemperatur von 250°C und mit 2 nm aufgedampfter Schichtdicke präpariert. Über das Lösungsmittel CHAPS, das durch Selbstorganisation eine organische Hülle auf den Au-Kristallen bildet, kann man anhand dieser Aufnahme keine Aussagen machen.

In Abbildung 9.3 ist eine TEM-Aufnahme von mehreren Nanogoldkristallen nach dem Austausch des Lösungsmittels dargestellt. Die Reinigung der Kristalle bzw. das Zentrifugieren wurde zweimal durchgeführt um wirklich sicher zu sein, dass das Au sich vom NaCl und CHAPS getrennt hat (siehe Schritte C,D und E der Abbildung 6.2). Die Goldkristalle mussten zu diesem Zweck auf der Kohlenstoffschicht eines TEM-Netzchen abgeschieden werden. Ca. $5\ \mu\text{l}$ Goldkristalllösung wurde auf das Netzchen getropft. Nach einer Trockenzeit von zwei Minuten wurde die Restflüssigkeit entfernt. Das linke und das rechte Bild zeigen Goldkristalle von der gleicher Probe, aber mit unterschiedlicher Vergrößerung (siehe Skala im Bild). Das mittlere Bild ist eine AFM-Aufnahme der selben Goldkristalle vor dem Ablösen vom NaCl (Schritte A und B der Abbildung 6.2)

Auf der TEM-Aufnahme sind Goldkristalle unterschiedlicher Formen (quadratisch, rhomboedrisch, ellipsenförmig, rund und unregelmäßige) zu erkennen. Die durchschnittliche Größe dieser Goldkristalle ist ca. 15 nm.

Abbildung 9.4 ist eine Darstellung von zwei vergrößerten Kristallen, die so günstig

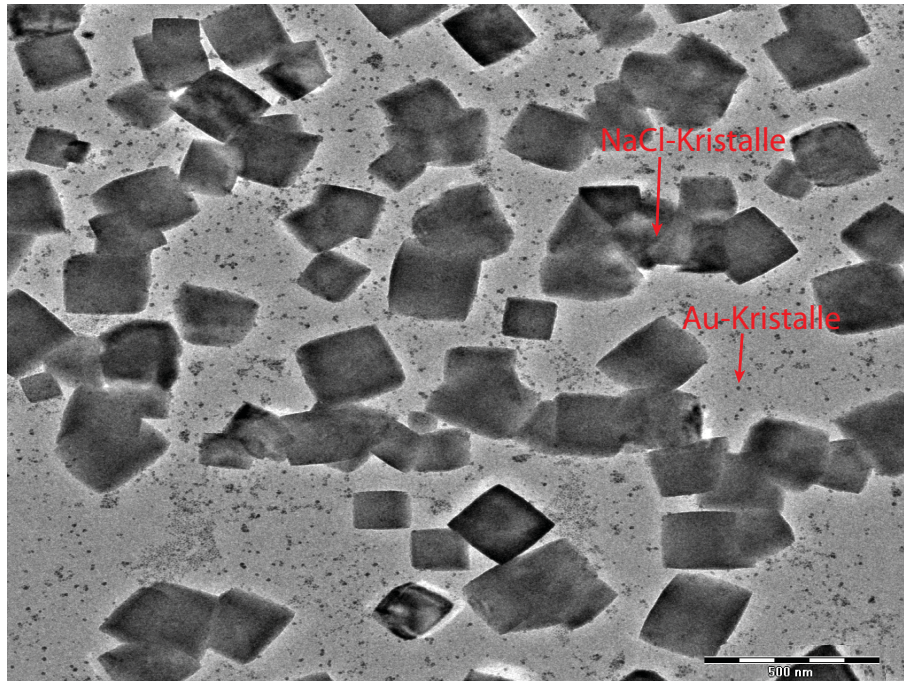


Abbildung 9.2: TEM-Aufnahme eines Gemisches von Au- und NaCl-Kristallen. auf einen TEM-Netzchen abgeschieden.

Präparationsparameter: Deponierte Schichtdicke 2 nm Au auf NaCl, Substrattemperatur 250°C, Probe lag auf Kammerpotential.

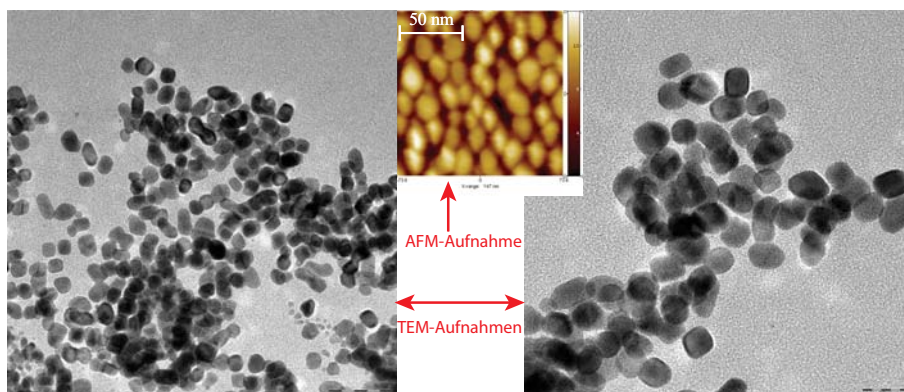


Abbildung 9.3: TEM-Aufnahme von mehreren Nanogoldkristallen nach der Trennung von NaCl.

Präparationsparameter: Deponierte Schichtdicke 2 nm Au auf NaCl, Substrattemperatur 250°C, Probe lag auf Kammerpotential.

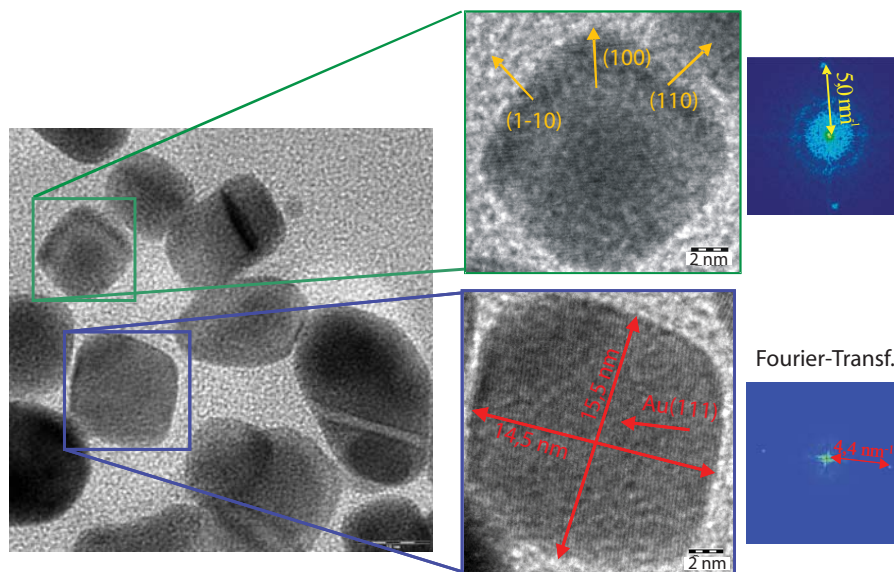


Abbildung 9.4: TEM-Aufnahme von einzelnen Nanogoldkristallen nach Austausch des Lösungsmittel.

Präparationsparameter: 250°C, Probe lag auf Kammerpotential. (links) Übersichtsbild, (mitte) vergrößerte Darstellung von 2 Nanokristallen, (rechts) Fouriertransformation der unten (in der mitte) dargestellten Bilder.

liegen, dass es möglich ist, einzelne Gitterlinien zu erkennen. Fouriertransformationen der Bilder dieser beiden Kristalle ermöglichten es, die Abstände der Gitternetzlinien sehr genau zu bestimmen und so Aussagen über die Kristallausrichtung zu machen. Auf der TEM-Aufnahme ist auch noch ein größerer Kristall zu erkennen, der offensichtlich nicht einkristallin ist (in gelb markiert). Die laterale Größe des Kristalls unteren vergrößerten Bildes beträgt $15,5 \times 14,5 \text{ nm}^2$.

Die mittels TEM beobachteten Kristallgrößen zeigen eine gute Übereinstimmung zu den durch AFM-Messungen bestimmen Clustergrößen.

9.3 Konjugation von Goldkolloiden an 2-CP

Abbildung 9.5 zeigt die 2CP Protein-Kennzeichnung mit Au-Kolloiden (kleinen Körner dieses Metall [132, S. 593]). Um die Konjugation von Au-Kolloiden oder Kristallen an dem Protein 2-CP nachzuweisen wird über ein weiterer Antikörper angebunden, der mit einem ca. 15 nm großen Au-Kolloid gelabelt ist. In Abbildung 9.5 ist der dann entsprechende Komplex schematisch dargestellt.

Die selektive Anbindung (Konjugation) von Au-Kristallen oder Cluster lässt sich nun wie folgt nachweisen:

Kristall-Protein-Antikörper-Kolloid-Komplexen wird auf einen TEM-Netzchen abgeschieden und mikroskopiert. In dem TEM-Aufnahmen sind nun die Au-Kristalle oder Kolloide sichtbar. Anhand der dann zu beobachtenden Paare, Konglomerate oder ein-

zelenen Au-Cluster lassen sich dann Aussagen über die Au-Kristall-2CP-Anbindung machen. Abbildung 9.5 zeigt die 2CP Protein-Kennzeichnung mit Au-Kolloiden. Um die Konjugation von Au-Kolloiden oder Kristallen an dem Protein 2-CP nachzuweisen wird über ein weiterer Antikörper angebunden, der mit einem ca. 15 nm großen Au-Kolloid gelabelt ist. In Abbildung 9.5 ist der dann entsprechende Komplex schematisch dargestellt. Bei diesen Untersuchungen wurden die 2CP-Proteine mit Kommerziellen verfügbaren 5 nm Goldkolloiden gebunden. Der Beweis dieser Bindung wurde durch noch eine Bindung eines zweiten größeren Goldkolloid zu 2CP mit einem Antikörper-Reaktion nachgewiesen. So ist das Auftreten von Paaren (rote Kreise) mit einem kleinen (5nm) und einem großen (15 nm) Goldkolloid in den TEM-Aufnahmen (Abbildungen 9.6 und 9.7) ein Beweis für eine bevorzugte Bindung des Nano-Goldpartikels an eine bestimmte bevorzugte Bindungsstelle, vermutlich die zusätzlichen Cystein-Gruppen. Weitere Kombinationen wurden beim Austauschen des größeren 15 nm Goldkolloid mit noch einem kleineren Kolloid von 5 nm beobachtet (siehe Abbildung 9.6 [133]).

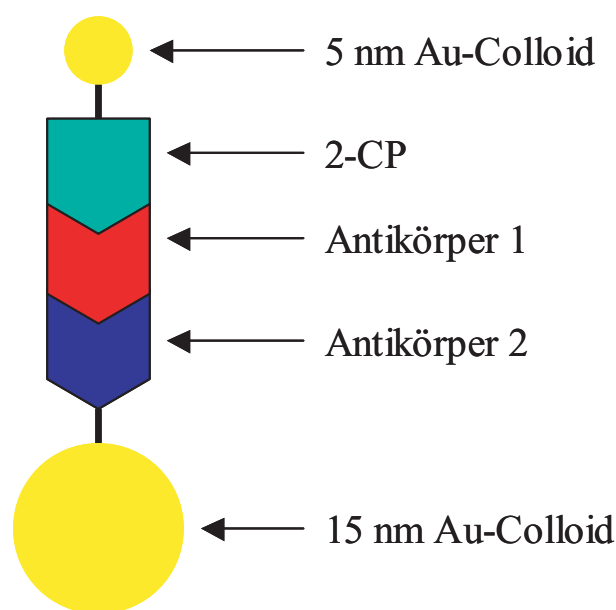


Abbildung 9.5: Schematische Darstellung des Komplexes.

Abbildung 9.6 zeigt eine Ankopplung verschiedener 2-CP-Cysteinylylvarianten an kommerziell erworbene 5 nm-Goldkolloide, die mit Hilfe von 15 nm-Gold-gelabelten Antikörpern im TEM sichtbar gemacht wurden. Da auch in der Cystein-freien Variante positive Labeling-Ereignisse detektiert werden konnten, musste hier eine unspezifische Kopplung aufgrund hydrophober oder ionischer Wechselwirkungen zwischen Protein und Goldoberfläche in allen Varianten angenommen werden. Aus diesem Grund erfolgte im Folgenden eine Optimierung der Ankopplungsbedingungen zur Spezifizierung der Schwefel-Gold-Bindung [83].

Eine Konjugation von Gold an Cysteinylylvarianten sollte neben den kommerziell erworbenen 5 nm-Kolloiden auch für 15 nm-Kristalle untersucht werden. Diese Kristalle wurden mit der Aufdampfanlage präpariert. Aufgrund der limitierenden Konzentration

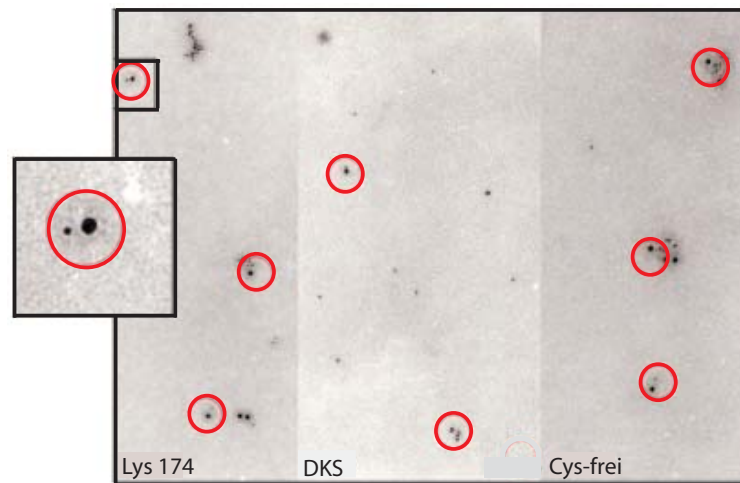


Abbildung 9.6: TEM-Nachweis der Ankopplung der 2-CP-Cysteinylnvarianten Lys174, DKS und Cys-frei an 5 nm-Goldkolloide [134].

Die Kombination zweier verschieden großer Goldkolloide (roter Kreis) zeigt Immundetektion von 2-CP-Gold-Konjugaten. Da diese auch bei der Cystein-freien Variante auftraten, ist von einer Bindung durch unspezifische Wechselwirkungen auszugehen.

konnte diese Konjugation allerdings nur für eine Variante - Lys 174 - gezeigt werden (Abbildung 9.7). Ihre Spezifität konnte ebenfalls aufgrund zu geringer Konzentrationen der 15 nm-Goldkristalle nicht weitergehend untersucht werden. Allerdings konnte auch hier eine Bindung aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen nicht ausgeschlossen werden [83].

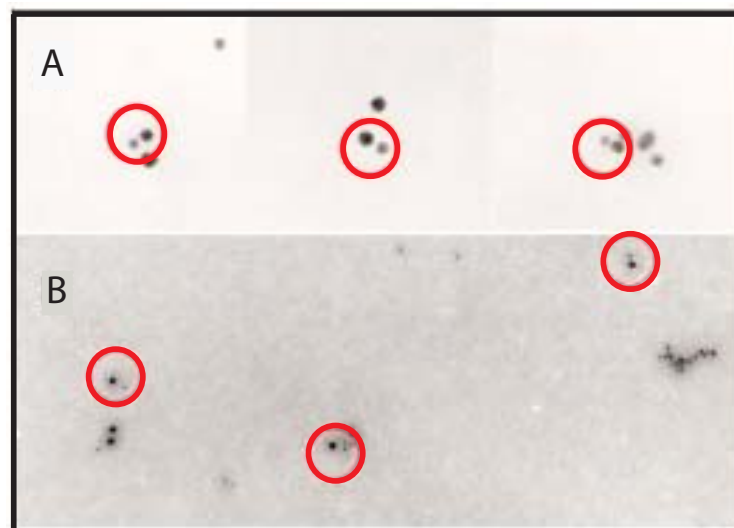


Abbildung 9.7: TEM-Nachweis der vergleichenden Ankopplung der 2-CP-Cysteinylvariante Lys174 an 15 nm-Goldkristalle (A) und 5 nm-Goldkolloide (B) [134].

Die Kombination zweier Goldpartikel (roter Kreis) zeigt Immundetektion von 2-CP-Gold-Konjugaten. Auch mit 15 nm-Goldkristallen konnte eine Bindung gezeigt werden.

Kapitel 10

Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein DXT-Laborsystem aufgebaut. Dieses System entspricht einem Laue-Aufbau, der in Transmissionsrichtung betrieben wird. Sein Strahlprofil, seine Strahldivergenz, sein Strahlspektrum sowie seine Intensität wurden charakterisiert. Die Halbwertsbreite betrug mit Kollimator in der horizontalen Richtung $450 \mu\text{m}$ und in der vertikalen Richtung $440 \mu\text{m}$. Ohne Kollimator entstand ein deutlich breiteres Strahlprofil, dessen Halbwertsbreite horizontal $630 \mu\text{m}$ und vertikal $620 \mu\text{m}$ betrug. Bei der Bestimmung des Photonенflusses mit eingebautem Kollimator ergab sich ein Wert von $2,3 \pm 0,4 \times 10^8$ Photonen/s, ohne Kollimator ein Wert von $6 \pm 1 \times 10^8$ Photonen/s. Diese Photonенflüsse entsprechen bei den gemessenen Strahlprofilen einem Photonенflächenfluss von ca. 1500 Photonen $\text{s}^{-1} \mu\text{m}^{-2}$. Bei einer Goldkristallgröße von 15 nm ergibt sich damit eine Rate von ca. $0,35$ Photonen $\text{s}^{-1} \text{Kristall}^{-1}$. Die Strahldivergenz des Röntgenmessplatzes wurde bestimmt. Diese ergab einen ungefähren Wert von $\Theta \approx 0,22^\circ \approx 3,8 \text{ mrad}$. Der emittierte Röntgenstrahl wurde durch eine Serie von Absorbern mit bekannter wellenlängenabhängiger Transmission geleitet. Die nicht absorbierten Photonen wurden durch einen PIN-Detektor, der hinter dem Absorber stand, detektiert. Anhand dieser Messungen ließ sich dann der spektrale Intensitätsverlauf berechnen. Das Röntgenspektrum wies oberhalb von ca. 12 keV geringere Intensitäten als erwartet auf.

Der Aufbau des DXT-Laborsystem ohne Kollimator wurde aufgrund seiner um den Faktor 2,5 höheren Strahlungsintensität für die beschriebenen Strahlungsschädigungsexperimente am Protein verwendet. Nach einer dreistündigen Röntgenbestrahlung mit einer Beschleunigungsspannung von 25 keV und einer Gesamtstrahlendosis von ca. 750 Gy wurde für das 2-CP weder eine Veränderung in der Struktur noch hinsichtlich seiner ROS-entgiftenden Aktivität im Vergleich zu den mitgeführten Kontrollproben detektiert. Eine Erhöhung der Bestrahlungsdauer auf 16 Stunden verursachte im reduzierenden SDS-PAGE eine Abnahme der monomeren Form des 2-CP mit gleichzeitiger Zunahme der dimeren Form sowie das Auftreten von Abbauprodukten, die im Western-Blot durch einen 2-CP-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden konnten. Die Bestrahlung des Proteins in Anwesenheit von 15 nm Goldkolloiden gab Aufschluss über eine zusätzliche Schädigung des Proteins durch langsame Elektronen, welche durch Photoeffekt von Goldkristallen bei der Bestrahlung entstanden sein könnten. Nach 16-stündiger

Bestrahlung konnte eine starke Strahlenschädigung an 2-CP nachgewiesen werden.

Um Beugungsaufnahmen mit dem DXT-Experiment zu ermöglichen, wurden Nano-Mo/Si Multilyerspiegel sowie Nano-Goldkristalle und Goldkristalle im Mikrometerbereich hergestellt. Die Nano-Goldkristalle wurden mit Hilfe eines Verdampfers im UHV auf einem frisch gespaltenen Salzkristall verdampft. Zu diesem Zweck wurde eine MBE-Anlage aufgebaut, in der Gold auf im Vakuum gespaltene NaCl-Kristalle aufgedampft wurde. Der Einfluss der unterschiedlichen deponierten Goldmenge, der Substrattemperatur und des Substratpotentials auf die Nano-Goldkristalle wurde untersucht. Die optimalen Goldkristallpräparationsparameter im Nanometerbereich lagen bei einer Substrattemperatur von 250°C, einer deponierten Schichtdicke von 2 nm und einem Substratpotential von 0 V bezüglich des Kammerpotentials. Mit diesen Parameter konnten ca. 15 nm große Goldkristalle präpariert werden. Die Kristalle waren zum Teil monokristallin, ihre Ausrichtung auf dem NaCl-Substrat war $\text{Au}[100] \parallel \text{NaCl}[100]$ und $\text{Au}(100) \parallel \text{NaCl}(100)$. Sie waren aber zu klein, um Beugungsaufnahmen mit dem DXT-Aufbau an einem Einkristall zu ermöglichen.

Die Mikro-Goldkristalle wurden mit Hilfe einer Sputteranlage und eines 3-Zonen-Ofens hergestellt. Der Einfluss der unterschiedlichen deponierten Goldmenge, der Annealing-Temperatur und der Annealing-Zeit auf die Mikro-Goldkristalle wurde untersucht. Die optimalen Goldkristallpräparationsparameter im Mikrometerbereich lagen bei einer deponierten Schichtdicke von 100 nm und bei Annealing-Temperaturen zwischen 1020°C und 1080°C. Die Annealing-Zeit hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Kristalle im Bezug auf die Form, aber bei höheren Annealing-Zeiten bis zu zehn Stunden entstanden höhere Kristalle. Kristalle, die mit diesen Parameter präpariert wurden, ermöglichten Beugungsaufnahmen an Goldeinkristallen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit dem aufgebauten DXT-Laborsystem Beugungsaufnahmen von Goldkristallen, erst ab ein Kristallgröße von ca. $1 \mu\text{m}^3$ möglich sind. Dies ist aber deutlich zu groß um das Protein (ca. 2 - 5 nm) nach einer Anbindung nicht signifikant zu beeinflussen.

Zweitens ist das gewählte 2-CP nicht stabil genug im Hinblick auf Strahlenschäden um mit deutlich hohen Intensitäten wie sie von Synchrotronsstrahlungsquellen erzeugt werden, die aber bei kleineren Goldkristallen notwendig sind, Konformationsänderungen zu untersuchen.

Weitergehende Untersuchungen müssten sich mit der Anbindung der Präparierten 15 nm Goldkristalle an deutlich Strahlenstabile Proteine beschäftigen. Außerdem ist für Experimente, die die Dynamik von Konformationsänderungenuntersuchungen zum Ziel haben, erforderlich die ca. 10^6 -fach intensivere Röntgenstrahlung einer Synchrotronstrahlungsquelle zu nutzen.

Literaturverzeichnis

- [1] A. Tipler, *Physik*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 2000.
- [2] D. Halliday, R. Resnick, and J. Walker, *Physik, Kapitel Optik*, Wiley VCH GmbH & Co KGaA, Weinheim, 2003.
- [3] L. Spieß, R. Schwarzer, H. Behnken, and G. Teichert, *Moderne Röntgenbeugung*, B. G. Teubner Verlag, Wiesbaden, 2005.
- [4] J. A. Nielsen, *Elements of Modern X-Ray Physics*, John Wiley and Sons, Ltd, New York, 2004.
- [5] H. A. Tritthart, *Medizinische Physik und Biophysik*, Schattauer, Stuttgart, New York, 2001.
- [6] F. Schotte, Watching a protein as it functions with 150 ps time-resolved X-ray crystallography, *Science* **300**, 1944–1947 (2003).
- [7] R. Baxter, N. Ponomarenko, V. Srajer, R. Pahl, K. Moffat, and J. Norris, Time-resolved crystallographic studies of light-induced structural changes in the photosynthetic reaction center, *PNAS* **101** (16), 5982–5987 (2004).
- [8] Y. Sasaki, Y. Suzuki, N. Yagi, S. Adachi, M. Ishibashi, H. Suda, K. Toyoda, and M. Yanagihara, Tracking of individual nanocrystals using diffracted x-rays, *Phys Rev. E* **Vol 62 Nr. 3**, 3843 (2000).
- [9] Y. Sasaki, Y. Okumura, S. Adachi, Y. Suzuki, and N. Yagi, Diffracted X-ray tracking: new system for single molecular detection with X-rays, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A* **467-468**, 1049–1052 (2001).
- [10] A. Goergens, *Diplomarbeit: Erzeugung ortsgerichtet mutierter Varianten von Proteinen zur dualen Kopplung an funktionalisierte Oberflächen*, Technische Fakultät, Universität Bielefeld, 2005.
- [11] T. Basche, *Singel Molecule Optical Detection, Imaging and Spectroscopy*, Wiley VCH, München, 1997.
- [12] H. Paul, *Lexikon der Optik Teil 1 A-L*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 1999.

- [13] H. Paul, *Lexikon der Optik Teil 2 M-Z*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 1999.
- [14] W. Kleber, *Einführung in die Kristallographie 17. Aufl.*, Verlag Technik GmbH, Berlin, 1990.
- [15] M. H. Unsworth and J. R. Greening, Experimental Continuous L-Characteristic X-Ray Spectra for Tungsten Target Tubes Operated at 15 to 30 kV, *Phys. Med. Biol.* **15**, 631–642 (1970).
- [16] W. Massa, *Kristallstrukturbestimmung*, Teubner Verlag 5. Aufl., München, 2005.
- [17] S. Lipson and H. Lipson, *Optik*, Springer-Lehrbuch, Berlin, 1997.
- [18] B. Schaefer, *Experimentalphysik Optik Band III 10. Aufl.*, Walter de Gruyter, Berlin, New York, 2004.
- [19] D. S. Falk, D. R. Brill, and D. G. Stork, *Ein Blick ins Licht 1. deutsche Aufl.*, Birkhäuser Verlag und Springer Verlag, Berlin, 1990.
- [20] T. E. Westerwalbesloh, *Otimierung der Schichstrukturen, Grenzflächen und Pufferschichten von Mo/Si-Multischichten in Hinsicht auf die EUV Reflektivität*, PhD thesis, Universität Bielefeld, 2003.
- [21] A. Michette, *Optical Systems for Soft X-Rays*, Plenum Press, New York, 1986.
- [22] H. Haken and H. Wolf, *Atom- und Quantenphysik*, Springer-Lehrbuch 6 Aufl., Berlin, Heidelberg, 1996.
- [23] H. J. Paus, *Physik in Experimenten und Beispielen 2. Aufl.*, Karl Hanser Verlag, München, 2002.
- [24] U. Kleineberg, *Röntgenoptische Charakterisierung von Multilayer-Röntgenspiegeln und Multilayer-Röntgenreflexionsgittern*, PhD thesis, Universität Bielefeld, 1994.
- [25] A. Frömsdorf, *Skript zum Themenbereich Röntgenmethoden*, Universität Hamburg, Hamburg, 2008.
- [26] H. Ibach and H. Lüth, *Festkörperphysik, Einführung in die Grundlagen*, Springer Lehrbuch, Berlin, 1999 5.Auflage.
- [27] C. Kittel, *Einführung in die Festkörperphysik 8. Aufl.*, R. Oldenburg Verlag, München, 1989.
- [28] R. J. Havighurst, The Effect Of Crystal Size Upon The Intensity Of X-Ray Reflection, *Physics* **12**, 375 (1926).

- [29] A. Winter, *Bachelorarbeit: Präparation von Nanokristallen aus Gold auf NaCl(100)-Oberflächen und ihre Charakterisierung mittels Rasterkraftmikroskopie und Röntgendiffraktometrie bezüglich Form, Größe und Ausrichtung*, Fakultät für Physik, Universität Bielefeld, 2006.
- [30] J. Nogues, I. Zakharchenko, and K. Rao, Comparative scanning tunneling microscopic and rocking-curve X-ray characterization of metallic thin films, *Thin Solid Films* **325**, 30–35 (1998).
- [31] H. Zimmermann and A. Weigert, *Lexikon der Astronomie 8. Aufl.*, Franz Spiegel Buch GmbH, Ulm, 2000.
- [32] M. A. Hermann and H. Sitter, *Molecular Beam Epitaxy*, Springer Verlag, Berlin, 1989.
- [33] W. Ott, *Kristallographie. Eine Einführung für Naturwissenschaftler*, Springer Verlag, Berlin, 1976.
- [34] E. F. Wassermann and R. L. Hines, Growth of Thin Gold Films on Rocksalt from 80°K to 475°K, *Journal of Applied Physics* **38**, 196–201 (1966).
- [35] R. L. Hines and E. F. Wassermann, Observation of Gold Films on Thinned Rocksalt, *Journal of Applied Physics* **38**, 412–413 (1966).
- [36] W. Wagner, Epitaxial Growth of Copper, Silver, Gold and Aluminium Evaporated Films of Different Orientations on Rocksalt, *Surface Science* **41**, 591–594 (1974).
- [37] J. C. Lombaard, I. A. Kotze, and C. A. O. Henning, The epitaxy of Gold Evaporated Onto Rocksalt In An Argon Atmosphere, *Solid State Communications* **14**, 217–220 (1974).
- [38] T. Schober, Comments on the Vapor Deposition of Epitaxial Silver and Gold Films on Rocksalt, *Journal of Applied Physics* **40**, 4658–4659 (1969).
- [39] Y. Sasaki and Y. Okumura, Picometer-Scale dynamical Observation of Individual Membrane Proteins, *Physical Review E* **70**, 021917 (2004).
- [40] Y. Sasaki, S. Adachi, Y. Suzuki, and N. Yagi, Time-resolved X-Ray Diffraction with Rotating Nanocrystal, *JST-Japan* ., 1–2 (2000).
- [41] H. Shimizu, M. Iwamoto, T. Konno, A. Nihei, Y. Sasaki, and S. Oiki, Global Twisting Motion of Single Molecular KcsA Potassium Channel upon Gating, *Cell* **132**, 67–78 (2008).
- [42] Y. Sasaki, Y. Okumura, T. Miyazaki, and T. Higurashi, Observations of x-ray radiation pressure force on individual gold nanocrystals, *Applied Physics Letters* **89**, 053121 (2006).

- [43] T. Sagawa, T. azuma, and Y. Sasaki, Dynamical regulations of protein-ligand bindings at single molecular level, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **355**, 770–775 (2007).
- [44] Y. Sasaki, Y. Okumura, S. Adachi, H. Suda, Y. Taniguchi, and N. Yagi, Picometer-Scale Dynamical X-Ray Imaging of Single DNA Molecules, *Physical Review Letters* **87** Nr. **24**, 248102 (2001).
- [45] Y. Sasaki, Single protein molecular dynamics determined with ultra-high precision, *Biochemical Society .*, 761–763 (2004).
- [46] Y. Okumura, Y. Taniguchi, and Y. Sasaki, Dispersive one-dimensional (Mo/Si) nanocrystals for single molecular detection systems using x-rays, *Journal of Applied Physics* **92** Nr. **12**, 7469–7474 (2002).
- [47] H. Heinzelmann and D. W. Pohl, Scanning near-field optical Microscopy, *Appl. Phys. A.* **59**, 89–101 (1994).
- [48] K. Dransfeld, Atomare Bewegungen in der Tunnel- und Kraftmikroskopie, *Phys. Bl. (Physik Journal)* **46**, 307 (1990).
- [49] H. Fuchs, Organische Moleküle, sichtbar gemacht mit dem Raster-Tunnelmikroskop, *Phys. Bl. (Physik Journal)* **45**, 105 (1989).
- [50] B. Schaefer, *Experimentalphysik Band VI, Festkörperphysik*, Walter de Gruyter, Berlin, 2. Aufl. edition, 2005.
- [51] G. Binnig, H. Rohrer, C. Gerber, and E. Weibel, Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy, *Physical Review Letters* **49** (**1**), 57 (1982).
- [52] G. Binnig, H. Rohrer, C. Gerber, and E. Weibel, Tunneling through a controllable vacuum gap, *Appl. Phys. Lett.* **40** (**2**), 178 (1982).
- [53] J. Tersoff and D. Hamann, Theory and Application for the Scanning Tunneling Microscope, *Physical Review Letters* **50** (**25**), 1998–2001 (1983).
- [54] C. C. Williams and H. K. Wickramasinghe, Microscopy of chemical-potential variations on an atomic scale, *Letters To Nature* **49**, 1587 (1986).
- [55] Y. Martin, C. Williams, and H. K. Wickramasinghe, Scanning Microscopy, *Appl. Phys. Lett.* **50**, 1455 (1987).
- [56] G. Binnig and C. F. Quate, Atomic Force Microscope, *Physical Review Letters* **56** (**9**), 930 (1986).
- [57] T. Yang, B. Keller, and E. Magyari, AFM investigation of cement paste in humid air at different relative humidities, *J. Appl. Phys.* **35**, 25 (2002).
- [58] F. J. Giesibl, Atomic Resolution of the Silicon (111)-(7x7) Surface by Atomic Force Microscopy, *Science* **267**, 68 (1995).

- [59] O. Marti, B. Drake, and P. K. Hansma, Atomic force microscopy of liquid-converted surfaces: Atomic resolution images, *Applied Physics Letters* **51**, 484 (1987).
- [60] U. Hartmann, Theory of van der Waals microscopy, *American Vacuum Society* **B9(2)**, 465 (1991).
- [61] Y. Martin, C. Williams, and H. K. Wickramasinghe, Atomic force microscope-force mapping and profiling on sub 100-Å scale, *J. Appl. Phys.* **61**, 4723 (1987).
- [62] H. Yoshizawa, Y. L. Chen, and J. Israelachivili, Fundamental Mechanisms of Interfacial Friction, *J. Phys. Chem.* **97**, 4128 (1993).
- [63] T. Albrecht, P. Gütter, D. Horne, and D. Ruger, Frequency modulation detection using high-Q cantilevers for enhanced force microscope sensitivity, *J. Appl. Phys.* **69**, 668 (1991).
- [64] A. Brechling, *Charakterisierung von Phospholipid Mono- Bi- und Multilayern auf funktionalisierten Alkylsiloxan Self-Assembled Monolayern auf Si(100) Substraten*, PhD thesis, Universität Bielefeld, 2003.
- [65] N. Burnham and R. Colton, *Force Microscopy In Scanning Tunneling Microscopy and Spectroscopy (Seiten 191-249)*, VCH, New York, 1993.
- [66] D. F. Ogletree, R. W. Carpick, and M. Salmeron, Calibration of frictional forces in atomic force microscopy, *Rev. Sci. Instrum.* **67 (9)**, 3298 (1996).
- [67] H. Hölscher, U. D. Schwarz, O. Zwörner, and R. Wiesendanger, Consequences of the stick-slip movement for the scanning force microscopy imaging of graphite, *Physical Review B* **57 (4)**, 2477 (1998).
- [68] H. Hölscher, U. D. Schwarz, and R. Wiesendanger, Modelling of the scan process in lateral force microscopy, *Surface Science* **375**, 395 (1997).
- [69] G. Meyer and N. M. Amer, Optical-beam-deflection atomic microscopy: The NaCl(001) surface, *Applied Physics Letters* **56**, 2100 (1990).
- [70] F. J. Giesibl, C. Gerber, and G. Binnig, A low-temperature atomic force/scanning tunneling microscope for ultrahigh vacuum, *J. Vac. Sci. Technol.* **B9 (2)**, 984 (1991).
- [71] M. R. Jarvis, R. Perez, and M. C. Payne, Can Atomic Force Microscopy Achieve Atomic Resolution in Contact Mode, *Physical Review Letters* **86 (7)**, 1287 (2001).
- [72] F. Ohnesorge and G. Binnig, True Atomic Resolution by Atomic Force Microscopy Though Repulsive and Attractive Forces, *SCIENCE* **260**, 1451 (1993).
- [73] R. Erlandsson, G. M. McClelland, C. M. Mate, and S. Chiang, Atomic force microscopy using optical interferometry, *J. Vac. Sci. Technol.* **A6 (2)**, 266 (1988).

- [74] W. Allers, A. Schwarz, U. D. Schwarz, and R. Wiesendanger, Dynamic scanning force microscopy at low temperatures on a van der Waals surface: graphite (0001), *Applied Surface Science* **140**, 247 (1999).
- [75] A. Schwarz, W. Allers, U. D. Schwarz, and R. Wiesendanger, Simultaneous imaging of the In and AS sublattice on InAs(110)-(1X1) with dynamic scanning force microscopy, *Applied Surface Science* **140**, 293 (1999).
- [76] A. Schwarz, U. D. Schwarz, S. Langkat, H. Hölscher, W. Allers, and R. Wiesendanger, Dynamic force microscopy with atomic resolution at low temperatures, *Applied Surface Science* **188**, 245 (2002).
- [77] W. Han and S. M. Lindsay, A magnetically driven oscillating probe microscope for operation in liquids, *Applied Physics Letters* **69**, 4111 (1996).
- [78] N. A. Campbell and J. B. Reece, *Biologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 2003.
- [79] J. König, K. Lotte, R. Plessow, A. Brockhinke, M. Baier, and K. J. Dietz, Reaction mechanism of the 2-Cys peroxiredoxin: Role of the C-terminus and the quarternary structure, *J. Biol. Chem.* **278**, 24409 – 24420 (2003).
- [80] Wikipedia, *der freien Enzyklopädie*, www.wikipedia.de, Jan.2008.
- [81] M. Baier and K. J. Dietz, 2-Cystein Peroxiredoxinbas 1 from Arabidopsis thaliana, *Plant Phys.* **111**, 651 (1996).
- [82] L. Bernier-Villamor, E. Navarro, F. Sevilla, and J. Lazaro, Cloning and characterization of a 2-Cys peroxiredoxin from Pisum sativum, *J. Exp. Bot.* **55**, 2191–2199 (2004).
- [83] U. Kleineberg, U. Heinzmann, A. Kandlbinder, and K. Dietz, *Dynamische Echtzeitbeobachtung von Protein-Einzelmolekülen mittels Röntgenstrahlung*, Sonderforschungsbereich 613 Teilprojekt D9, Universität Bielefeld, 2008.
- [84] B. Hoffmann, H. Hecht, and L. Flohe, Peroxiredoxins, *Biol. Chem* **383**, 347–364 (2002).
- [85] G Material, *Produckt Beschreibung*, G Material, Deutschland, 2005.
- [86] Eurotherm International, *Bedienungsanleitung für Digitale-Alarmeinheit 92*, Eurotherm, Deutschland, 1991.
- [87] Eurotherm International, *Bedienungsanleitung für Universal PID- und Programmregler 818*, Eurotherm, Deutschland, 1991.
- [88] AST GmbH, *Parameter des DFS-Ofen, Aufkleber auf dem Ofen*, AST, Deutschland, 1991.
- [89] S. Steppeler, *persönliche Mitteilung*, ., Uni-Bielefeld, 2008.

- [90] Omicron GmbH, *UHV-AFM/STM, Technisches Manuell*, Omicron, Deutschland, 1997.
- [91] J. Hartwich, *Herstellung und Untersuchung lateraler Nanostrukturen in Resist-schichten und Absorberfilmen auf EUV-Multischichtsystemen mittels Rastersondenmethoden*, PhD thesis, Universität Bielefeld, 1999.
- [92] A. Brechling, *persönliche Mitteilung*, ., Uni-Bielefeld, 2007.
- [93] V. Mönkemöller, *Bachelorarbeit: Aufbau und Charakterisierung eines Rasterkraftmikroskops*, Fakultät für Physik, Universität Bielefeld, 2008.
- [94] B. Schaefer, *Experimentalphysik Band I, Mechanik, Relativität, Wärme*, Walter de Gruyter, Berlin, 11. aufl. edition, 1998.
- [95] F. Lükermann, *Bachelorarbeit: Querschnittspräparation von Dünnschichtsolarzellen und Multischichtspiegeln und deren transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung hinsichtlich Schichtaufbau und -zusammensetzung*, Fakultät für Physik, Universität Bielefeld, 2006.
- [96] Philips Electron Optics, *Transmission Electron Microscope CM200, Angaben des Hersteller*, Philips, Deutschland, .
- [97] W. Hachmann, *persönliche Mitteilung*, ., Uni-Bielefeld, 2008.
- [98] B. Schaefer, *Experimentalphysik Band II, Elektro-Magnetismus*, Walter de Gruyter, Berlin, 9. aufl. edition, 2006.
- [99] Carl Zeiss, Elektronen optische Geräte, *Gebrauchsanleitung*, Zeiss, Oberkirchen, DSM 982 Gemini.
- [100] Oxford Instruments, *X-Ray Technology, Technisches Manuell*, X-Ray Technology Inc., Scotts Valley , Kalifornien USA, 2005.
- [101] A. Bjeoumikhov, S. Bjeoumikhova, N. Langhoff, and H. Wolff, Capillary optics for real time X-ray diffraction, *Journal of X-Ray Science and Technology* **13**, 185–190 (2005).
- [102] A. Bjeoumikhov, S. Bjeoumikhova, N. Langhoff, and R. Wedell, Polycapillary optics for energy dispersive micro X-ray diffraction, *Applied Physics Letters* **86**, 144102 (2005).
- [103] IFG Institute for Scientific Instruments, *Zertifikat, Polykapillar Mikrolins 58mkl 05*, IFG Institute, Berlin, 2005.
- [104] Photonic Science, *X-Ray Gemstar HS 60 mm, Technisches Manuell*, Photonic Science, Robertsbridge, UK, 2005.
- [105] Forvis Technologie Inc., *XPD100 X-ray PIN Diode Detector System, User Manual*, Forvis Technologie Inc., Santa Barbara, Kalifornien USA, 2005.

- [106] S. D. Lounis, *Characterization of Manson X-Ray Source Energy Spectrum for use in X-Ray Diagnostics Research*, University of Michigan, Michigan USA, 2007.
- [107] W. Demtröder, *Experimentalphysik 3, Atome, Moleküle und Festkörper*, Springer-Verlag, 3 Auflage, Berlin, Heidelberg, 2005.
- [108] www.henke.lbl.gov/optical/constants, -, Internetseite, 2007.
- [109] S. Jacob, *Functional Stability of Plant Peroxiredoxins*, PhD thesis, Universität Bielefeld, 2008.
- [110] B. Demmig, W. Adams, and A. Mattoo, *Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation and Environment*, Springer, Netherlands, 2006.
- [111] U. Kleineberg, U. Heinzmann, A. Kandlbinder, and K. Dietz, *Dynamische Echtzeitbeobachtung von Protein-Einzelmolekülen mittels Röntgenstrahlung*, Sonderforschungsbereich 613 Teilprojekt D9, Universität Bielefeld, 2005.
- [112] R. A. Outlaw and J. H. Heinbockel, Simulation of the initial stages of nucleation and growth Au/NaCl(100), *Thin Solid Films* **123**, 159–172 (1985).
- [113] M. Harsdorff and W. Jark, Nucleation and growth kinetics of gold films deposited onto rock salt single-crystal (100) surfaces by sputtering with helium, *Thin Solid Films* **128**, 79–92 (1985).
- [114] R. Conrad and M. Harsdorff, Nucleation and growth kinetics of gold films on NaCl(100) cleaving planes under carefully controlled, *Thin Solid Films* **192**, 163–171 (1990).
- [115] SPI Supplies, *SPI-Chem Sodium Chloride Single Crystal Substrates*, SPI Supplies and Structure Probe, Inc, England, 1996.
- [116] Fluck and Heumann, *Periodensystem der Elemente*, Wiley-VCH Verlag 2 Aufl., Deutschland, 1999.
- [117] Photonic Cleaning Technologies, *Der innovative High-Tech Reiniger*, Photonic Cleaning Technologies, Deutschland, 2007.
- [118] Matek Material Technologie GmbH, *Produkt Beschreibung*, Matek-Material, Ulich Deutschland, 2008.
- [119] G. E. Ewing, H_2O on NaCl: From single Molecule, to Clusters, to Monolayer, to Thin Film, to Deliquescence, *Stuct Bond* **116**, 1–25 (2005).
- [120] P. Buffat and J. Burel, Size effect on the melting temperature of gold particles, *Phys. Rev. A* **13**, 2287 (1976).
- [121] J. Matthews and E. Grünbaum, The Structure of Gold Films in Ultra-high Vacuum on Sodium Chloride Substrates, *Phila. Mag.* **11**, 1233 (1965).

- [122] E. Grünbauma and J. Matthews, Influence of Substrate Steps on the Orientation of Nuclei in Thin Deposits of Gold on Rocksalt, *Phys. stat. sol* **9**, 731 (1965).
- [123] E. Grünbauma and J. Matthews, The Need For Contaminants In The Epitaxial Growth of Gold on Rocksalt, *Applied Physics Letters* **5**, 106–108 (1964).
- [124] C. Henning, The Growth Of Gold Films On Rocksalt In High Vacuum, *Surface Science* **9**, 277–295 (1968).
- [125] C. Henning, The Growth Of Gold Films On Rocksalt In High Vacuum - Growth Model, *Surface Science* **9**, 296–305 (1968).
- [126] C. Schalansky and Z. Munir, The influence of an electric discharge on the growth of Au crystallites on cleaved (100) NaCl substrates, *Journal of Crystal Growth* **97**, 310–318 (1989).
- [127] J. C. Sousa, I. L. Torriani, C. A. Luengo, J. R. Fusco, and A. L. Cukierman, Microporosity and Surface-Area Study of Pine Wood Charcoal by SAXS and CO_2 adsorption Technigues, *J. Appl. Cryst.* **24**, 803–808 (1991).
- [128] D. Pashley, ,, *Adv. Phys.* **5**, 173 (1956).
- [129] Y. Heyraud and J. Metois, Equilibrium Shape Of Gold Crystallites On A Graphite Cleavage Surface: Surface Energies And Interfacial Energy, *Acta Metallurgica* **28**, 1789–1797 (1980).
- [130] Schlachetzki and Schulz, *Mikromechanik*, B.G. Teubener, Stuttgart, 1994.
- [131] G. williams, M. Pfeifer, I. Vartanyants, and I. Robinson, Three-Dimensional Imaging of Microstructure in Au Nanocrystals, *Physical Review Letters* **Vol. 90 Nr. 17**, 175501–4 (2003).
- [132] G. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, 1996.
- [133] S. Jacob, *persönliche Mitteilung*, ,, Uni-Bielefeld, 2007.
- [134] U. Kahrmann, *Diese TEM-Aufnahme wurde freundlicherweise von U. Kahrmann Fakultät für Biologie angefertigt*, ,, Uni-Bielefeld, 2006-2007.

Danksagung

Diese Arbeit entstand im Rahmen des Sonderforschungsbereiches D9 der Universität Bielefeld als Zusammenarbeit zwischen der Fakultät für Biologie, Abteilung Biochemie der Pflanzen und der Fakultät für Physik, Abteilung Molekül- und Oberflächenphysik, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. U. Heinzmann. Ihm danke ich für die äusserst interessante und hochaktuelle Aufgabenstellung, das entgegengebrachte Vertrauen, die gute Ausstattung der Experimente, die freundliche und sinnvolle Beratung bei fachlichen Problemen im Rahmen des von ihm angebotenen Seminars und in persönlichen Gesprächen. Ich habe ihm auch zu danken für die Arbeitsstelle als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Physik-Fakultät der Universität Bielefeld.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. A. Brechling für die großartige Betreuung und tatkräftige Unterstützung. Seine Erfahrungen und seine Übersicht halfen, mehrere experimentelle Sackgasen zu vermeiden.

Für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit mit der Fakultät für Biologie, Abteilung Biochemie der Pflanzen, danke ich ganz herzlich Herrn Prof. Dr. K. J. Dietz, Frau Dr. A. Kandlbinder und Frau S. Jacob für die Bewertung der Ergebnisse der Strahlenschädigungsexperiments und dazugehörige Abbildungen.

Eine wertvolle und sehr zuverlässige Hilfe bekam ich von Herrn A. Winter bei der Zusammenarbeit während seiner Bachelor-Arbeit, von Frau Dr. W. Hachmann durch die Messung der Proben mit TEM und REM, von Herrn A. Gryzia und Frau V. Mönkemöller durch die Messung der Proben mit AFM, von Herrn C. Meier durch die Auflösung mehrerer Software Probleme, von Herrn V. Schimmang durch die technische Unterstützung beim Aufbau mehreren Komponenten, von Herrn Dr. U. Kahrmann durch die Messung zweier Proben von Gold-Proteinen-Ankopplung mit TEM. Dafür danke ich alle genannten Personen ganz herzlich.

Vielen Dank auch an Frau A. K. Lofthouse und Frau K. Wisotzky für ihre gute Organisationsarbeit. Sie haben immer für hervorragendes Arbeitsklima gesorgt. Mein Dank gilt auch Frau Lacy und Frau Schneider von der Verwaltung des Sonderforschungsbereichs 613.

Alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Molekül- und Oberflächenphysik von Prof Heinzmann danke ich für mehrmalige Hilfsstellungen, anregenden Diskussionen und konstrukt-

tiven Kritikpunkte. Auch den Mitarbeiter der mechanischen und elektronischen Werkstatt der Fakultät für Physik möchte ich für die Herstellung der mechanischen Komponenten und der Reparatur der elektrischen Geräte ganz herzlich danken.

Auch im privaten Leben bin ich verpflichtet, einer Menge von Freunden zu danken. Ein besonderer und herzlicher Dank an Familie Tiemann, Familie Voigt und Familie Tanus für jede Unterstützung während dieser Zeit. Mein bester Dank gilt auch Frau Klara Leonhardt, Herrn Samy Slaih, Frau Anette Edler und Frau Elina Oberländer.

There are also some special people in Israel, Italy and USA I would like to thank for their help, their trust in me during the past years. I am very grateful to my parents, my brother and my sister. They always encouraged me to pursue my goals. I would like also to thank all my friends, without their support, things would have been more difficult.

Jawad Slieh

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit bis auf die dem Aufgabensteller bekannten Hilfen selbstständig angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel unter Angabe der Literaturstellen kenntlich gemacht habe.

Jawad Slied

Lebenslauf

Name: Jawad Slieh
Geburtsdatum: 09 Mai 1972
Geburtsort: Nazareth, Israel

Schulbildung:

September 1977 - Juni 1984	Grundschule Eilaboun
September 1984 - Juni 1987	Mittelschule Eilaboun
September 1987 - Mai 1990	Galilee-Christian-High-School in Eilaboun
Juni 1990	Abitur

Studium:

Juni 2005	Abschluß der Diplomarbeit an der Universität Bielefeld bei Prof. Dr. U. Heinzmann mit dem Thema: Aufbau und Test eines Experiments zur nicht linearen Photoemissions-Elektronen-Mikroskopie sowie zur EUV-Photoemissions-Mikroskopie
-----------	--

Seit September 2005	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Fakultät für Physik der Universität Bielefeld
---------------------	---