

The progress in the feedback stability and resolution in such membrane investigations is very promising. In contrast to many other experiments, the resolving power of the instrument is a major issue here, because the concentration in these experiments cannot simply be diluted to make it convenient for standard microscopy. Furthermore, because the light field does not really extend into the cell, background fluorescence is a minor issue in the near-field. Finally, only NSOM offers the advantage of synchronous topography and light detection.

12.4 Special Near-Field Techniques for Biological Applications

This section provides an overview of some promising but not yet established techniques and approaches to obtain near-field optical resolution. Only time will tell whether these methods can compete with the methods currently used.

12.4.1 Fluorescence Resonance Energy Transfer

Fluorescence resonance energy transfer (FRET) is a method that uses the distance dependence of non-radiative energy transfer from an excited donor molecule to an acceptor molecule. The transfer efficiency is given by a sixth-power dependence on the intermolecular separation:

$$E = 1 / (1 + (R/R_0)^6),$$

where R is the distance between donor and acceptor and R_0 is the distance at which 50% of the energy is transferred. Consequently, this interaction is sensitive even to angstrom scale distance changes.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ Experimentally, a pair of fluorescing molecules is needed, only one of which (the donor) can be excited directly with the excitation source. The acceptor dye only emits light if it is in close proximity to an excited donor. In an experimental setup one has to separate donor and acceptor fluorescence spectrally. A red shifted fluorescence then means that a donor resonantly transferred its energy to an acceptor. The relevant distance is on the order of a few nanometers, which is ideal for monitoring conformation changes in proteins or events in biomembranes.^{106,108-112}

Discussing the details of this technique is beyond the scope of this chapter; we outline only the results achieved in biology using a near-field aperture. In a simple scheme, a near-field microscope can be applied within a dual color mode scan (as already mentioned) to find resonant pairs simply with higher resolution.^{113,114} Sekatskii and Letokhov¹¹⁵ proposed an experimental setup that, in principle, could result in a resolution of a few nanometers. In their setup, the Förster pair is composed of an acceptor attached to the near-field aperture, whereas the donor is on the sample surface. The distance between donor and acceptor can then be controlled by the tip sample feedback regulation. Vickery and Dunn¹¹⁶ applied this technique to the near-field investigation of Langmuir-Blodgett films and observed an improvement in resolution; however, the results using this method are still at an early stage and no biosamples have been investigated.

12.4.2 "Apertureless" Near-Field Microscopy

The main restriction of near-field optical microscopy is the aperture. Although an aperture is necessary to achieve the resolution, it also imposes serious limitations. A different approach is the use of an active light source with subwavelength dimensions. Zenhausern and co-workers were the first to report that an externally illuminated sharp tip can serve as such a light source.^{51,117} These investigators used an elaborate setup to distinguish the minute differences of light intensity when the vibrating tip was either close to or away from the sample. Sanchez and co-workers utilized the strongly enhanced electric field at a metal tip to induce two-photon fluorescence.³⁶ The spatial resolution on β -aggregates was about 20 nm, very

difficult
by usin
with on
observe

Anot
propose
Raman
a simila
were the
reports
reported
far from
there is
used or
advanta
can be c
resoluti

12.4.3

In the p
possible
uous-w:
approac
mention
source,
enhance
wavelen
destruct
with tw
been re
olution

The
where U
that abs
may be

12.4.4

A uniqu
The spe
authors
is wash
of the
indirect
et al.¹²⁵

This
cannot
and str
with hi

difficult to achieve with standard NSOM. The problem of background fluorescence signal was avoided by using two-photon excitation. In general, the signal was spectrally far from the fluorescence excited with one photon; furthermore, without the enhancing tip, no two-photon fluorescence signal at all was observed.

Another approach that involves field enhancement with metal was suggested by Wessel in 1985.¹¹⁸ He proposed that a sharp metal tip brought very close to the external sample surface would enhance the Raman signal in the same way as do the well-known rough metal surfaces used for SERS. Interestingly, a similar but much weaker enhancement effect exists for infrared spectroscopy; here, Knoll and Keilmann were the first to observe a vibrational signal that was enhanced by the presence of a metal tip.³⁵ The first reports on probe-enhanced Raman scattering followed shortly thereafter;^{37,119,120} the enhancement factors reported were on the order of several thousand compared to the background Raman signal.³⁷ This is still far from the maximum enhancement factors achieved with rough surfaces or even colloids;^{87,121} thus, there is room for improvement. Thus far, apertureless Raman or infrared spectroscopy have not been used on biological samples; however, there are no indications that the method would fail. All the advantages of Raman spectroscopy are maintained and the disadvantage of low scattering cross sections can be overcome. Thus, apertureless or probe-enhanced techniques may well be the future of high spatial resolution spectroscopy.

12.4.3 Multiphoton Near-Field Microscopy

In the previous section a type of multiphoton near-field microscopy was mentioned.³⁶ However, it is also possible to excite two- or three-photon processes with a standard near-field probe. Pulsed¹²² and continuous-wave (CW)¹²³ near-field experiments on cell material have been reported. The advantage of this approach, the high signal-to-background level, is identical to the two-photon probe enhanced technique mentioned in the previous section. The detected signal is blue shifted with respect to the excitation source, so that normal fluorescence is spectrally far away and can easily be filtered. In addition, a resolution enhancement occurs because the two-photon energy is the same as one single UV-photon of half the wavelength. Using a UV source directly can be disadvantageous because of absorption effects and possible destruction of the specimen. The advantage of using a longer wavelength laser source in combination with two-photon processes is therefore twofold. Very good results, with respect to the signal level, have been reported using two- and three-photon excitation on polytene chromosomes.^{122,123} The spatial resolution in these first experiments was below 200 nm but further improvement appears possible.

The application of this technique appears straightforward, at least for the CW technique. In cases where UV-dyes are the only choice, this method is a good alternative to direct excitation. For dye labels that absorb in the visible region the availability of an affordable laser source for two-photon excitation may be a problem.

12.4.4 Nonoptical Near-Field Microscopy

A unique scheme of observing biological specimens has been proposed by Kawata and coworkers.^{124,125} The specimens are on top of a photosensitive copolymer. Instead of raster scanning the sample, the authors illuminate the whole area of interest with a short laser pulse. After the illumination the sample is washed and the polymer is then scanned with a standard AFM. Depending on the optical properties of the specimen and the polymer, a different corrugation is detected and the specimen is scanned indirectly. Using multiple illumination, even moving cells can be detected, as demonstrated by Kawata et al.¹²⁵

This method will probably not become a general tool for detecting subwavelength features because it cannot correlate topographical features with molecular contrast. Nevertheless, it is a surprisingly simple and straightforward technique that allows observation of dynamic phenomena on a rather large scale with high resolution.

12.5 Outlook and Conclusions

Since the first experiments about 20 years ago, near-field optics has been applied in many research fields. Particularly in biological and biomedical applications, the possibility of observing features below 100 nm is very tempting and it is not surprising that many NSOM applications are used in biology-related material. The most successful near-field application to date is fluorescence NSOM. A "down scaling" from standard microscopy rather than a new technique, it combines high lateral optical resolution with the synchronous detection of the sample topography. This combination is a unique advantage of near-field microscopy. Similar to microscopy, the sensitivity of the fluorescence NSOM is down to the single-molecule level, despite the notoriously low efficiency of the near-field probes.

Other spectroscopic techniques such as infrared or Raman are much more limited by restrictions imposed by the aperture. Collection of near-field Raman images, for example, still takes a matter of hours. The emergence of probe-enhanced or "apertureless" techniques might well change that situation. The implementation and testing of these new methods is still at an early stage. The enhancement factors found in macroscopic experiments and theoretically predicted have not yet been demonstrated in the near-field. Basic research in these fields is still required.

Compared to normal microscopy the market share of NSOM today is quite small. It will probably remain a specialized technique for some time to come. Interestingly, the development of new techniques in standard microscopy (for example, the 4Pi microscope¹²⁶ and the solid immersion lens microscope¹²⁷) that improve resolution, for the first time after almost a century, correspond to the rise of near-field techniques. Coincidence or not, developments in the two techniques will likely improve the applications of both in the future.

References

1. Abbé, E., Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung, *Arch. Mikroskop.*, 9, 413, 1873.
2. Syngé, E.H., A suggested method for extending microscopic resolution into the ultra-microscopic region, *Phil. Mag.*, 6, 356, 1928.
3. Ash, E.A. and Nicholls, G., Super-resolution aperture scanning microscope, *Nature*, 237, 510, 1972.
4. Pohl, D.W., Denk, W., and Lanz, M., Optical stethoscopy: image recording with resolution 1/20, *Appl. Phys. Lett.*, 44, 651, 1984.
5. Lewis, A., Isaacson, M., Harootunian, A., et al., Development of a 500 Å spatial resolution light microscope. Light is efficiently transmitted through 1/16 diameter apertures, *Ultramicroscopy*, 13, 227, 1984.
6. Binnig, G., Quate, C.F., and Gerber, C., Atomic force microscope, *Phys. Rev. Lett.*, 56, 930, 1986.
7. Binnig, G. and Rohrer, H., Scanning tunneling microscopy, *Helv. Phys. Acta*, 55, 726, 1982.
8. Pohl, D.W., Ed., *Advances in Optical and Electron Microscopy*, Bd. 12, Academic Press, New York, 1991, p. 243.
9. Heinzelmänn, H. and Pohl, D.W., Scanning near-field optical microscopy, *Appl. Phys. A*, 59, 89, 1994.
10. Girard, C. and Dereux, A., Near-field optics theories, *Rep. Prog. Phys.*, 59, 657, 1996.
11. Dunn, R.C., Near-field scanning optical microscopy, *Chem. Rev.*, 99, 2891, 1999.
12. Barbara, P.F., Adams, D.M., and O'Connor, D.B., Characterization of organic thin film materials with near-field scanning optical microscopy (NSOM), *Annu. Rev. Mater. Sci.*, 29, 433, 1999.
13. Fillard, J.P., *Near-Field Optics and Nanoscopy*, World Scientific, Singapore, 1996.
14. Paesler, M.A. and Moyer, P.J., *Near-Field Optics: Theory, Instrumentation, and Applications*, John Wiley & Sons, New York, 1996.
15. Ohtsu, M. and Hori, H., *Near-Field Nano-Optics: From Basic Principles to Nano-Fabrication and Nano-Photonics*, Kluwer Academic, New York, 1999.
16. Ohtsu, M., *Near-Field Nano/Atom Optics and Technology*, Springer-Verlag, Tokyo, 1998.

17.
18.
19.
20.
21.
22.
23.
24.
25.
26.
27.
28.
29.
30.
31.
32.
33.
34.
35.
36.
37.
38.
39.
40.
41.
42.
f

17. Hecht, B., Sick, B., Wild, U.P., et al., Scanning near-field optical microscopy with aperture probes: fundamentals and applications, *J. Chem. Phys.*, 112, 7761, 2000.
18. Goodman, J.W., *Introduction to Fourier Optics*, McGraw-Hill, New York, 1968.
19. Born, M. and Wolf, E., *Principles of Optics*, 6th ed., Cambridge University Press, Cambridge, U.K., 1980.
20. Wilson, T. and Sheppard, C.J.R., *Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy*, Academic Press, London, 1984.
21. Dürig, U., Pohl, D.W., and Rohner, F., Near-field optical-scanning microscopy, *J. Appl. Phys.*, 59, 3318, 1986.
22. Pohl, D., U.S. patent 4,604,520, optical near-field microscope, 1986.
23. Harootunian, A., Betzig, E., Isaacson, M., et al., Super-resolution fluorescence near-field scanning optical microscopy, *Appl. Phys. Lett.*, 49, 674, 1986.
24. Betzig, E., Isaacson, M., and Lewis, A., Collecting mode near-field scanning optical microscopy, *Appl. Phys. Lett.*, 51, 2088, 1987.
25. Betzig, E. and Trautman, J. K., Near-field optics: microscopy spectroscopy and surface modification beyond the diffraction limit, *Science*, 257, 189, 1992.
26. Courjon, D., Sarayeddine, K., and Spajer, M., Scanning tunneling optical microscopy, *Opt. Commun.*, 71, 23, 1989.
27. Reddick, R.C., Warmack, R.J., and Ferrell, T.L., New form of scanning optical microscopy, *Phys. Rev. B*, 39, 767, 1989.
28. Marti, O., Bielefeldt, H., Hecht, B., et al., Near-field optical measurement of the surface plasmon field, *Opt. Commun.*, 96, 4, 1993.
29. Krenn, J.R., Dereux, A., Weeber, J.C., et al., Squeezing the optical near-field zone by plasmon coupling of metallic nanoparticles, *Phys. Rev. Lett.*, 82, 2590, 1999.
30. Fischer, U.C. and Pohl, D.W., Observation of single-particle plasmons by near-field optical microscopy, *Phys. Rev. Lett.*, 62, 458, 1989.
31. Zenhausern, F., Martin, Y., and Wickramasinghe, H.K., Scanning interferometric apertureless microscopy: optical imaging at 10 angstrom resolution, *Science*, 269, 1083, 1995.
32. Inouye, Y. and Kawata, S., A scanning near-field optical microscope having scanning electron tunnelling microscope capability using a single metallic probe tip, *J. Microsc.*, 178, 14, 1995.
33. Girard, C., Martin, O.J.F., and Dereux, A., Molecular lifetime changes induced by nanometer scale optical fields, *Phys. Rev. Lett.*, 75, 3098, 1995.
34. Koglin, J., Fischer, U.C., and Fuchs, H., Scanning near-field optical microscopy with a tetrahedral tip at a resolution of 6 nm, *J. Biomed. Opt.*, 1, 75, 1996.
35. Knoll, B. and Keilmann, F., Near-field probing of vibrational absorption for chemical microscopy, *Nature*, 399, 134, 1999.
36. Sanchez, E.J., Novotny, L., and Sunney Xie, X., Near-field fluorescence microscopy based on two-photon excitation with metal tips, *Phys. Rev. Lett.*, 82, 4014, 1999.
37. Stockle, R.M., Suh, Y.D., Deckert, V., et al., Nanoscale chemical analysis by tip-enhanced Raman spectroscopy, *Chem. Phys. Lett.*, 318, 131, 2000.
38. Toledo Crow, R., Yang, P.C., Chen, Y., et al., Near-field differential scanning optical microscope with atomic force regulation, *Appl. Phys. Lett.*, 60, 2957, 1992.
39. Betzig, E., Finn, P.L., and Weiner, J.S., Combined shear force and near-field scanning optical microscopy, *Appl. Phys. Lett.*, 60, 2484, 1992.
40. Novotny, L., Pohl, D.W., and Hecht, B., Scanning near-field optical probe with ultrasmall spot size, *Opt. Lett.*, 20, 970, 1995.
41. Heinzlmann, H., Freyland, J.M., Eckert, R., et al., Towards better scanning near-field optical microscopy probes-progress and new developments, *J. Microsc.*, 194, 2, 1999.
42. Kim, Y.J., Kurihara, K., Suzuki, K., et al., Fabrication of micro-pyramidal probe array with aperture for near-field optical memory applications, *Jpn. J. Appl. Phys. Part 1*, 39, 1538, 2000.

43. Minh, P.N., Ono, T., and Esashi, M., Microfabrication of miniature aperture at the apex of SiO₂ tip on silicon cantilever for near-field scanning optical microscopy, *Sensors Actuators A*, 80, 163, 2000. 67.
44. Noell, W., Abraham, M., Ehrfeld, W., et al., Microfabrication of new sensors for scanning probe microscopy, *J. Micromech. Microeng.*, 8, 111, 1998. 68.
45. Schurmann, G., Indermuhle, P.F., Staufer, U., et al., Micromachined SPM probes with sub-100 nm features at tip apex, *Surf. Interface Anal.*, 27, 5, 1999. 69.
46. Young Joo, K., Kurihara, K., Suzuki, K., et al., Fabrication of micro-pyramidal probe array with aperture for near-field optical memory applications, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 39, 1538, 2000. 70.
47. Münster, S., Werner, S., Mihalcea, C., et al., Novel micromachined cantilever sensors for scanning near-field optical microscopy, *J. Microsc.*, 186, 17, 1997. 71.
48. Betzig, E., Trautman, J.K., Harris, T.D., et al., Breaking the diffraction barrier: optical microscopy on a nanometric scale, *Science*, 251, 1468, 1991. 72.
49. Valaskovic, G.A., Holton, M., and Morrison, G.H., Parameter control, characterization, and optimization in the fabrication of optical fiber near-field probes, *Appl. Optics*, 34, 1215, 1995. 73.
50. Turner, D.R., U.S. patent 4,469,554, etch procedure for optical fibers (AT&T Bell Laboratories, Murray Hill, New Jersey), 1983. 74.
75.
51. Hoffmann, P., Dutoit, B., and Salathe, R.P., Comparison of mechanically drawn and protection layer chemically etched optical fiber tips, *Ultramicroscopy*, 61, 1, 1995. 76.
52. Zeisel, D., Nettesheim, S., Dutoit, B., et al., Pulsed laser-induced desorption and optical imaging on a nanometer scale with scanning near-field microscopy using chemically etched fiber tips, *Appl. Phys. Lett.*, 68, 2491, 1996. 77.
78.
53. Yatsui, T., Kourogi, M., and Ohtsu, M., Increasing throughput of a near-field optical fiber probe over 1000 times by the use of a triple-tapered structure, *Appl. Phys. Lett.*, 73, 2090, 1998. 79.
54. Lambelet, P., Sayah, A., Pfeffer, M., et al., Chemically etched fiber tips for near-field optical microscopy: a process for smoother tips, *Appl. Opt.*, 37, 7289, 1998. 80.
55. Stockle, R.M., Schaller, N., Deckert, V., et al., Brighter near-field optical probes by means of improving the optical destruction threshold, *J. Microsc. (Oxford)*, 194(Part 2-3), 378, 1999. 81.
56. Karrai, K. and Grober, R.D., Piezo-electric tuning fork tip-sample distance control for near field optical microscopes, *Ultramicroscopy*, 61, 1, 1995. 82.
57. Ruiter, A.G.T., Veerman, J.A., van der Werf, K.O., et al., Dynamic behavior of tuning fork shear-force feedback, *Appl. Phys. Lett.*, 71, 28, 1997. 83.
58. Betzig, E., in *Near-Field Optics*, Pohl, D. and Courjon, D., Eds., Kluwer Academic Publishers, Arcet-Senans, France, 1993, p. 7. 84.
59. Zenobi, R. and Deckert, V., Scanning near-field optical microscopy and spectroscopy as a tool for chemical analysis, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 39, 1747, 2000. 85.
60. Doyle, R.T., Szulzcewski, M.J., and Haydon, P.G., Extraction of near-field fluorescence from composite signals to provide high resolution images of glial cells, *Biophys. J.*, 80, 2477, 2001. 86.
61. Ziegler, R., Vickier, A., Kernen, P., et al., Preparation of basal cell membranes for scanning probe microscopy, *Microsc. Res. Tech.*, 1, 1997. 87.
62. Hecht, B., Bielefeld, H., Inouye, Y., et al., Facts and artifacts in near-field optical microscopy, *J. Appl. Phys.*, 81, 2492, 1997. 88.
63. Lei, F.H., Shang, G.Y., Troyon, M., et al., Nanospectrofluorometry inside single living cell by scanning near-field optical microscopy, *Appl. Phys. Lett.*, 29, 2489, 2001. 89.
64. Keller, T.H., Rayment, T. and Klenerman, D., Optical chemical imaging of tobacco mosaic virus in solution at 60-nm resolution, *Biophys. J.*, 74, 2076, 1998. 90.
65. Keller, T.H., Rayment, T., Klenerman, D., et al., Scanning near-field optical microscopy in reflection mode imaging in liquid, *Rev. Sci. Instrum.*, 68, 1448, 1997. 91.
66. Betzig, E. and Chichester, R.J., Single molecules observed by near-field scanning optical microscopy, *Science*, 262, 1422, 1993. 92.
93.

67. Moerner, W.E., High-resolution optical spectroscopy of single molecules, *Acc. Chem. Res.*, 26, 563, 1996.
68. Moerner, W.E. and Orrit, M., Illuminating single molecules in condensed matter, *Science*, 283, 1670, 1999.
69. Xie, X.S., Single-molecule spectroscopy and dynamics at room temperature, *Acc. Chem. Res.*, 26, 598, 1996.
70. Xie, X.S. and Trautman, J.K., Optical studies of single molecules at room temperature, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 49, 441, 1998.
71. Basché, T., Moerner, W.E., Orrit, M., and Wild, U.P., Eds., *Single Molecule Optical Detection, Imaging, and Spectroscopy*, VCH, Weinheim, Germany, 1997.
72. Goodwin, P.M., Ambrose, W.P., and Keller, R.A., Single molecule detection in liquids by laser-induced fluorescence, *Acc. Chem. Res.*, 26, 607, 1996.
73. van Hulst, N.F., Veerman, J. A., Garcia Parajo, M.F., et al., Analysis of individual (macro)molecules and proteins using near-field optics, *J. Chem. Phys.*, 112, 7799, 2000.
74. Chalfie, M. and Kain, S., John Wiley & Sons, New York, 1998.
75. Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., et al., Understanding, improving and using green fluorescent proteins, *TIBS*, 20, 448, 1995.
76. Dickson, R.M., Cubitt, A.B., Tsien, R.Y., et al., Improved green fluorescence, *Nature*, 388, 355, 1997.
77. Moerner, W.E., Petermann, E.J.G., Brasselet, S., et al., *Cytometry*, Optical methods for exploring dynamics of single copies of green fluorescent protein, 36, 232, 1999.
78. Garcia-Parajo, M.F., Veerman, J. A., Segers-Nolten, G.M.J., et al., Visualising individual green fluorescent proteins with a near field optical microscope, *Cytometry*, 36, 239, 1999.
79. Garcia-Parajo, M.F., Segers-Nolten, G.M. J., Veerman, J.-A., et al., Real-time light-driven dynamics of the fluorescence emission in single green fluorescent protein molecules, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97, 7237, 2000.
80. Manfait, M. and Nabiev, I., Raman microscopy applications to medicine, in *Raman Microscopy*, Corset, J., Ed., Academic Press, London, 1996, 379.
81. Carey, P.R., *Biochemical Applications of Raman and Resonance Raman Spectroscopies*, Academic Press, New York, 1982.
82. Asher, S.A., UV resonance raman spectroscopy for analytical, physical, and biophysical chemistry, *Anal. Chem.*, 65, 201A, 1993.
83. Chang, R.K. and Furtak, T.E., *Surface-Enhanced Raman Scattering*, Plenum Press, New York, 1982.
84. Moskovits, M., Surface-enhanced spectroscopy, *Rev. of Mod. Phys.*, 57, 783, 1985.
85. Kerker, M., in *Selected Papers on Surface Enhanced Raman Scattering*, Thomson, B.J., Ed., Milestone Series 10, SPIE, Bellingham, WA, 1990.
86. Vo-Dinh, T., Stokes, D.L., Griffin, G.D., et al., Surface-enhanced Raman scattering (SERS) method and instrumentation for genomics and biomedical analysis, *J. Raman Spectrosc.*, 30, 785, 1999.
87. Nie, S. and Emory, S.R., Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering, *Science*, 275, 1102, 1997.
88. Kneipp, K., Kneipp, H., Kartha, B., et al., Detection and identification of a single DNA base molecule using surface-enhanced Raman scattering (SERS), *Phys. Rev. B*, 57, R6281, 1998.
89. Deckert, V., Zeisel, D., Zenobi, R., et al., Near-field surface enhanced Raman imaging of dye-labeled DNA with 100 nm resolution, *Anal. Chem.*, 70, 2646, 1998.
90. Zeisel, D., Deckert, V., Zenobi, R., et al., Near-field surface-enhanced Raman spectroscopy of dye molecules adsorbed on silver island films, *Chem. Phys. Lett.*, 283, 381, 1998.
91. Gennis, R.B., *Biomembranes: Molecular Structure and Function*, Springer-Verlag, New York, 1989.
92. McConnel, H.M., Structures and transitions in lipid monolayers at the air-water interface, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 42, 171, 191.
93. Möhwald, H., Phospholipid and phospholipid-protein monolayers at the air/water interface, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 41, 441, 1990.

94. Hwang, J., Tamm, L.K., Böhm, C., et al., Nanoscale complexity of phospholipid monolayers investigated by near-field scanning optical microscopy, *Science*, 270, 610, 1995.
95. Tamm, L.K., Bohm, C., Yang, J., et al., Nanostructure of supported phospholipid monolayers and bilayers by scanning probe microscopy, *Thin Solid Films*, 285, 813, 1996.
96. Moers, M.H.P., Gaub, H.E., and van Hulst, N.F., *Langmuir*, 10, 2774, 1994.
97. Shiku, H. and Dunn, R.C., Direct observation of DPPC phase domain motion on mica surfaces under conditions of high relative humidity, *J. Phys. Chem. B*, 102, 3791, 1998.
98. Hollars, C.W. and Dunn, R.C., Submicron fluorescence, topology, and compliance measurements of phase-separated lipid monolayers using tapping-mode near-field scanning optical microscopy, *J. Phys. Chem. B*, 101, 6313, 1997.
99. Hollars, C.W. and Dunn, R.C., Submicron structure in L-alpha-dipalmitoylphosphatidylcholine monolayers and bilayers probed with confocal, atomic force, and near-field microscopy, *Biophys. J.*, 75, 342, 1998.
100. Hollars, C.W. and Dunn, R.C., Probing single molecule orientations in model lipid membranes with near-field scanning optical microscopy, *J. Chem. Phys.*, 112, 7822, 2000.
101. Hwang, J., Gheber, L.A., Margolis, L., et al., Domains in cell plasma membranes investigated by near-field scanning optical microscopy, *Biophys. J.*, 74, 2184, 1998.
102. Enderle, T., Ha, T., Chemla, D.S., et al., Near-field fluorescence microscopy of cells, *Ultramicroscopy*, 71, 303, 1998.
103. Nagy, P., Jenei, A., Kirsch, A.K., et al., Activation-dependent clustering of the erbB2 receptor tyrosine kinase detected by scanning near-field optical microscopy, *J. Cell Sci.*, 112, 1733, 1999.
104. Shinkarev, V.P., Brunner, R., and Wraight, C.A., Application of near-field scanning optical microscopy in photosynthesis research, *Photosynth. Res.*, 61, 181, 1999.
105. Enderle, T., Ha, T., Ogletree, D.F., et al., Membrane specific mapping and colocalization of malarial and host skeletal proteins in the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte by dual-color near-field scanning optical microscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94, 520, 1997.
106. Stryer, L., Fluorescent energy transfer as a spectroscopic ruler, *Annu. Rev. Biochem.*, 47, 819, 1978.
107. Lakowicz, J.R., *Principles of Fluorescence Microscopy*, Plenum Press, New York, 1983.
108. van der Meer, B.W., Coker, G., and Simon Chen, S.-Y., *Resonance Energy Transfer Theory and Data*, VCH Publishers, New York, 1994.
109. Chen, Q. and Lentz, B.R., Fluorescence resonant energy transfer study of shape changes in membrane-bound bovine prothrombin and meizothrombin, *Biochemistry*, 36, 4701, 1997.
110. Dos Remedios, C.G. and Moens, P.D.J., Fluorescence resonance energy transfer is a reliable ruler for measuring structural changes in proteins, *J. Struct. Biol.*, 115, 175, 1995.
111. Gonzales, J.E. and Tsien, R.Y., Voltage sensing by fluorescence resonance energy transfer in single cells, *Biophys. J.*, 69, 1272, 1995.
112. Miawaki, A., Llopis, J., Heim, R., et al., Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin, *Nature*, 388, 882, 1997.
113. Ha, T., Enderle, T., Ogletree, D.F., et al., Probing the interaction between two single molecules: fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93, 6264, 1996.
114. Ha, T., Ting, A.Y., Liang, J.W., et al., Single-molecule fluorescence spectroscopy of enzyme conformational dynamics and cleavage mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96, 893, 1999.
115. Sekatskii, S.K. and Letokhov, V.S., Nanometer-resolution scanning optical microscope with resonance excitation of the fluorescence of the samples from a single-atom excited center, *JETP Lett.*, 63, 319, 1996.
116. Vickery, S.A. and Dunn, R.C., Scanning near-field fluorescence resonance energy transfer microscopy, *Biophys. J.*, 76, 1812, 1999.
117. Zenhausern, F., O'Boyle, M.P., and Wickramasinghe, H.K., Apertureless near-field optical microscope, *Appl. Phys. Lett.*, 65, 1623, 1994.
118. Wessel, J., Surface-enhanced optical microscopy, *J. Opt. Soc. Am. B*, 2, 1538, 1985.

119.

120.

121.

122.

123.

124.

125.

126.

127.

119. Anderson, M.S., Locally enhanced Raman spectroscopy with an atomic force microscope, *Appl. Phys. Lett.*, 76, 3130, 2000.
120. Hayazawa, N., Inouye, Y., Sekkat, Z., et al., Metallized tip amplification of near-field Raman scattering, *Opt. Commun.*, 183, 333, 2000.
121. Kneipp, K., Wang, Y., Kneipp, H., et al., Single molecule detection using surface-enhanced Raman Scattering (SERS), *Phys. Rev. Lett.*, 78, 1667, 1997.
122. Jenei, A., Kirsch, A.K., Subramaniam, V., et al., Picosecond multiphoton scanning near-field optical microscopy, *Biophys. J.*, 76, 1092, 1999.
123. Kirsch, A.K., Subramaniam, V., Striker, G., et al., Continuous wave two-photon scanning near-field optical microscopy, *Biophys. J.*, 75, 1513, 1998.
124. Kawata, Y., Egami, C., Nakamura, O., et al., Nonoptically probing near-field microscopy, *Opt. Commun.*, 161, 1, 1999.
125. Kawata, Y., Murakami, M., Egami, C., et al., Nonoptically probing near-field microscopy for the observation of biological living cells, *Appl. Phys. Lett.*, 78, 2247, 2001.
126. Hell, S.W., Lindek, S., Cremer, C., et al., Measurement of the 4Pi-confocal point spread function proves 75 nm axial resolution, *Appl. Phys. Lett.*, 64, 1335, 1994.
127. Kino, G.S. and Mansfield, S.M., Solid immersion microscope for real-time near field imaging, *AIP Conf. Proc.*, 241, 61, 1991.

derung von Nukleinsäuren und Nukleinsäuren-DNS-Komplexen ist bis zu dem Punkt gediehen, wo zuverlässige Längenvermessungen routinemäßig durchgeführt werden können, ohne daß die helikale DNS-Topologie selbst aufgelöst werden kann [68].

Anders als bei der STM können mit dem AFM auch lebende Zellen abgebildet werden [z. B. 69], allerdings nicht mit molekularer Auflösung. Elemente des Zytoskeletts werden sichtbar, obwohl sie unter der Zellmembran liegen [z. B. 70]. Als Beispiel für die Beobachtung eines dynamischen Prozesses sei hier das Austreten von Viren aus lebenden infizierten Zellen erwähnt [71].

6.5. Optische Nahfeldmikroskopie

6.5.1. Licht und Materie in der SNOM

Die Interaktion von Licht mit Materie erschließt in den Lebenswissenschaften ein weites Feld an Struktur- und spektroskopischer Information. Spektroskopie im Infrarotbereich und die Ramanspektroskopie im sichtbaren Bereich des Lichtes enthalten bekanntlich reichhaltige chemische Information über die Probe. Die Absorption im UV-Bereich kann u. a. zur Messung der Protein- oder Nukleinsäurekonzentration herangezogen werden. Die klassische Abbildung mit Licht und die konfokale Lichtmikroskopie erlauben, lebende Organismen fast ungestört zu beobachten. Mittels einer breiten Palette von Kontrastarten und Färbetechniken kann inmitten einer großen Vielfalt von Strukturen der Werdegang eines einzelnen interessierenden Elementes verfolgt werden. Alle diese Aspekte der Lichtmikroskopie im „Fernfeld“ der Probe, der erfolgreichsten Mikroskopie in Biologie und Medizin überhaupt, werden an anderer Stelle dieses Buches ausführlich besprochen.

Die Auflösung der Fernfeldmikroskopie ist bekanntlich grundsätzlich durch die Beugung limitiert [72]. Für den Abstand zweier gerade noch getrennter Punkte gilt:

$$\Delta x = 0,61\lambda / (n \cdot \sin\phi) \quad (6.13.)$$

$n \cdot \sin\phi$ ist die numerische Apertur und λ die Wellenlänge des Lichtes. Im sichtbaren Bereich des Lichtes ist $0,2 \mu\text{m} \leq \Delta x \leq 0,4 \mu\text{m}$.

Diese als Rayleighkriterium bekannte Limitierung der Auflösung wird in der optischen Nahfeldmikroskopie weit unterschritten, indem die Wechselwirkung des Lichtes mit Materie in einem Volumen studiert wird, das viel geringer als der kleinstmögliche Beugungsfleck des entsprechenden Lichtes ist. Eine mögliche experimentelle Anordnung eines SNOM besteht aus einer Lichtquelle in Form einer beleuchteten Apertur, die im Nahfeld über die Probe gerastert wird. Die Größe der Apertur und der Abstand zwischen Spitze und Probe sind dabei viel geringer als die Lichtwellenlänge. Die Interaktion mit der Probe in dem der Sondengröße entsprechend kleinen Wechselwirkungsvolumen modifiziert das optische Nahfeld der Apertur und damit notwendigerweise auch ihr Strahlungsfeld aufgrund der lokalen Probeneigenschaften. Es wird im Fernfeld detektiert und als eine Funktion von x, y aufgezeichnet.

Die theoretische Behandlung des Verhaltens des Lichtes im Nahfeld der Probe kann nicht auf die traditionelle wellenoptische Betrachtungsweise gestützt werden. Vielmehr müssen

d
tr
tt
se
[
A
u
N
A
u
ti
re
B
N
R
a
lr
A

6

6
D
st
F
C
E
A
w
Je
Li
a
h
ei
h
„
zi
b.
Pi
m
zi
In
di
Pi

die Maxwell-Gleichungen für die spezifische Nahfeldsituation unter Einbezug der Geometrie und optischen Eigenschaften von Spitze und Probe gelöst werden. Die Entwicklung der theoretischen Grundlagen der spezifischen Phänomene der SNOM ist noch nicht abgeschlossen; eine Übersicht der Problematik findet sich z. B. bei VAN LABEKE und BARCHIESI [73] und weiteren Artikeln dieses Buches.

Allerdings ist experimentell bereits ein guter Teil der im Fernfeld bekannten Kontrastarten und Spektroskopien auch in der Nahfeldmikroskopie nachgewiesen worden. Spezifische Nahfeld-Kontraste mögen sich einstellen. Eine aktuelle Übersicht wird in [74] gegeben.

An kontrastgebenden Objekteigenschaften sind die optische Dichte, die Doppelbrechung und der Brechungsindex zur Abbildung herangezogen worden [75]. Weiter sind Polarisations-, Phasen- [76, 77] und – für die biologisch-medizinische Anwendung von besonderer Bedeutung – Fluoreszenzkontrast [78] demonstriert worden.

Besondere Beachtung fand eine Arbeit von BETZIG und CHICHESTER [8], in der mittels der Nahfeldmikroskopie die Fluoreszenz einzelner Farbstoffmoleküle mit sehr gutem Signal-zu-Rauschverhältnis dargestellt wurde. Sicher ist die Detektion einzelner Farbstoffmoleküle auch für biologische Präparate von grundsätzlichem Interesse. Versuche der SNOM im Infrarotbereich, ebenfalls für die Biologie von großem Interesse, befinden sich noch im Anfangsstadium [79].

6.5.2. Instrumentelle Aspekte und Abbildungsarten in der SNOM

6.5.2.1. Verschiedene SNOM

Die optische Nahfeldmikroskopie ist konzeptionell wohl die älteste der Rastersondenmikroskopien. Der oben beschriebene Aufbau einer über die Probe gerasterten Lichtquelle in Form einer Apertur wurde bereits 1928 von SYNGE [6] und offenbar unabhängig von O'KEEFE 1956 [7] vorgebracht. Die erste Umsetzung der SNOM ist allerdings erst nach der Erfindung des Tunnelmikroskopes erfolgt [80 – 83]. Die SNOM hat dabei durch manche Anleihen, u. a. der hoch präzisen Rastermechanik, von der STM profitiert. Im folgenden werden die wichtigsten experimentellen Anordnungen der verschiedenen SNOM erläutert.

Je nach experimenteller Anordnung gehen in der SNOM Lichtwellen von einer winzigen Lichtquelle aus, dringen in die Probenoberfläche ein oder werden an ihr reflektiert oder treten aus einer beleuchteten Probe in eine winzige Detektoröffnung ein. In allen diesen Fällen handelt es sich um propagierende Lichtwellen. Die Lichtquelle bzw. die Detektoröffnung ist eine Apertur, die viel kleiner als die Lichtwellenlänge ist. Die auf dieser Anordnung beruhenden Mikroskopien werden deshalb manchmal als „aperture SNOM“ bezeichnet. Die „aperture SNOM“ im „illumination mode“ ist der erste erprobte Aufbau [81, 83]. Ein scharf zugespitzter Lichtleiter, bis auf die kleine Öffnung am Apex mit Metall (meist Aluminium) bedampft, ist mit einem Laser verbunden. Diese Lichtquelle wird im Abstand $\ll \lambda$ über die Probe gerastert. Das Licht aus der Nahfeldinteraktion wird hinter der transparenten Probe mit einer Sammellinse auf einen Photomultiplier oder einen Avalanche-Photodetektor projiziert. Streulicht wird durch eine Blende abgefangen.

In einer Variante dieses Aufbaus, dem „reflexion SNOM“, wird das reflektierte Licht von der Probe durch die Sonde selbst aufgefangen. Damit lassen sich im Prinzip auch opake Proben untersuchen [84].

Im „collection mode“ (Abb. 6.12.) wird die gesamte Probe beleuchtet und der Apex der bedampften Spitze dient als Nahfeld-Kollektor. Allerdings machen sich in dieser Anordnung Streulicht und Interferenzeffekte in der Probe störend bemerkbar. Des weiteren ist dieser Aufbau für lichtempfindliche Proben von Nachteil (z. B. durch Ausbleichen der Fluoreszenz).

In einer deutlich anderen Anordnung wird die Lichtwelle in Totalreflexion in die Probe geleitet. An der Probenoberfläche fällt die Stärke des elektromagnetischen Feldes exponentiell ab. Das Feld pflanzt sich nicht fort und wird als evaneszent bezeichnet (die Voraussetzungen für propagierendes bzw. für evaneszentes Licht werden in [85] erläutert). Ein kleines Partikel, in diese evaneszente Lichtwelle eingetaucht, wandelt durch Streuung einen Teil der evaneszenten Lichtquelle in eine propagierende Lichtwelle um, d. h. die totale interne Reflexion in der Probe ist teilweise aufgehoben. Hängt das streuende Partikel mit einem Lichtleiter zusammen, kann die propagierende Welle zu einem Detektor geleitet werden. Die Intensität der abgeleiteten Lichtwelle ist exponentiell vom Abstand zwischen dem Streupartikel und der Probe abhängig. Die auf dieser Anordnung beruhende Nahfeldmikroskopie wird [86, 87] in Analogie zu der STM als Photonen-Rastertunnelmikroskopie (PSTM, Photon Scanning Tunneling Microscopy oder STOM, Scanning Tunneling Optical Microscopy) bezeichnet (Abb. 6.12.). In der PSTM werden stark zugespitzte Lichtfasern verwendet, die als Streuzentrum in das evaneszente Feld der Probe eingetaucht werden. Spitzen mit einem Apexradius von nur einem Nanometer konnten erzeugt und zur Abbildung verwendet werden [88]. Allerdings widerspiegelt das evaneszente Feld nur sehr beschränkt die lokale Probenstruktur, da sich Beugungs- und Streueffekte, insbesondere auf stark korrigierten Proben, sehr deutlich bemerkbar machen. Es ist bislang nicht erwiesen, daß eine einfache Glasspitze, auch wenn sie sehr spitz ist, tatsächlich als lokaler Detektor wirkt. Im Moment scheint deshalb die Anwendung der PSTM auf außerordentlich flache Objekte beschränkt zu sein.

6.5.2.2. Sonden

Die Art der Sonde ist das charakteristische Merkmal der SNOM. Die Auflösung und Qualität der Nahfeldabbildung wird entscheidend von ihr geprägt. Hier genügt es nicht wie bei der STM oder AFM, daß die Spitze aus einem bestimmten Material besteht und hinreichend spitz ist. Sie muß die Eigenschaft besitzen, möglichst viel Licht in eine Spitze nanoskopischer Dimension einzukoppeln und nur von hier zu emittieren bzw. genügend Licht aus einem möglichst kleinen Volumen zu detektieren. Die genaue Ausgestaltung der Sonde ist entscheidend für ihre Eigenschaft als nanoskopische Lichtquelle oder als Detektor.

Heute werden als Lichtquellen meist adiabatisch zugespitzte Monomode-Fasern verwendet, die mit einem Laser verbunden sind. Die Fasern sind bis auf die Öffnung am Apex der Spitze mit einem Aluminiummantel versehen. Unterhalb des „cut-off“ Durchmessers von $\lambda/2$ wird das Licht in der sich zunehmend verengenden Spitzenregion im Aluminiummantel absorbiert und erfährt starke Verluste durch Reflexion. Die Lichtdurchlässigkeit nimmt mit der Länge des konischen Bereiches und zunehmend geringerem Durchmesser der Öffnung im Aluminiummantel am Apex der Faser stärker als exponentiell ab. Die Verluste sind in der Monomode-Faser kleiner als etwa in den ehemals verbreiteten Mikropipetten, da sich alles Licht in der Grundmode befindet und Absorption und Reflexion erst im vordersten Bereich der Spitze wirksam werden. Der kleinstmögliche effektive Austrittsbereich des Lichts

tes am Ende der Faser ist nicht durch die Dimension der Austrittsöffnung gegeben, sondern durch die Eindringtiefe des Lichtes in die Aluminiumhülle. Die maximale Auflösung dieser Lichtquellen scheint dadurch auf etwa 12 nm begrenzt zu werden.

Die spitz zulaufende metallbeschichtete Faser ist allerdings nur eine der verwendeten Spitzenformen. Eine andere Möglichkeit ist eine beleuchtete pyramidenförmige Silizium-Nitrit-Spitze [89], die sich besonders gut zu gleichzeitiger SNOM/SFM eignet (s. u.). Metallische subwellenlängen Antennen [90, 91] sind grundsätzlich auch als Sonden denkbar. Sie haben den Vorteil einer potentiell höheren Auflösung als Apertur-Anordnungen, da keine propagierende Lichtwelle durch eine Öffnung gezwängt werden muß. Aus demselben Grund sind im Prinzip fluoreszierende Nanopartikel als Lichtquellen mit geringerer Dimension denkbar [92]. Hier kann das störende Anregungslicht spektral von der Emission der Spitze abgetrennt werden.

6.5.2.3. Abstandsregelung

Die Lichtintensität in der optischen Nahfeldmikroskopie eignet sich häufig nicht zur Einhaltung eines bestimmten Abstandes zwischen Probe und Spitze, u. a. weil durch Streuung und Beugungseffekte eine nicht-monotone Abhängigkeit der Intensität vom Abstand auftreten kann. Es sind deshalb eine Reihe unabhängiger Abstandssignale vorgeschlagen worden, z. B. ein Tunnelstrom oder die Kapazität. Die Kraftwechselwirkung hat allerdings zur einfachen, universalen Abstandsregelung die größte Verbreitung gefunden. Die Scherkraft zwischen Probe und Spitze eignet sich gut für die lang ausgezogenen Monomode-Fasern [93]. Hierfür wird die Faser nahe ihrer Eigenfrequenz zur Querschwingung angeregt und die Amplitude optisch gemessen. Wie in der oben beschriebenen dynamischen Kraftmessung des SFM nimmt die Amplitude bei Interaktion mit der Probe aufgrund von noch nicht im Detail verstandenen Reibungskräften ab.

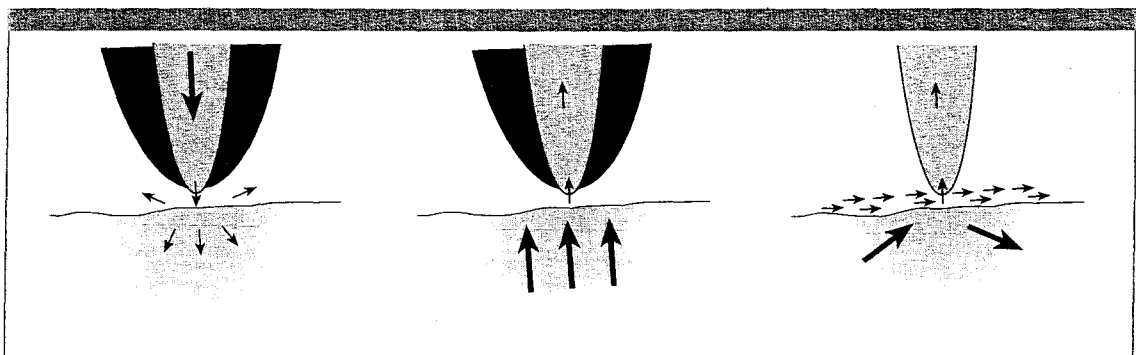


Abb. 6.12.:

Verschiedene Arten der SNOM. Links ist die SNOM im „illumination mode“ dargestellt. Licht gelangt aus dem Apex eines Lichtleiters in die Probe und wird im Fernfeld detektiert. Der Lichtleiter besteht z. B. aus einer adiabatisch zugespitzten Monomode Faser, die bis zum Apex mit einem Aluminiummantel umgeben wird. In der SNOM im „detection mode“ wird die gesamte Probe beleuchtet. Das Licht im Nahfeld der Probenoberfläche wird über die Sonde durch den Lichtleiter zum Detektor geleitet. Eine weitere optische Nahfeldmikroskopie ist die PSTM. Hier wird Licht in Totalreflexion in die Probe geleitet. Eine dielektrische Sonde, in das evaneszente Feld an der Probenoberfläche getaucht, frustriert die Totalreflexion und führt zu einer propagierenden Welle in der Sonde.

Eine gewisse Vorsicht ist allerdings bei der Interpretation der so erzeugten optischen Nahfeldbildern angebracht, da die effektive Lichtsonde i. allg. nicht exakt mit der wirksamen Kraftsonde übereinstimmt. Insbesondere ist die wirksame Kraftsonde meist stärker lokalisiert und ihr Zentrum fällt nicht mit dem wirksamen Zentrum der Lichtsonde zusammen. Der Abstand der Lichtsonde zur Probe bleibt damit nicht exakt konstant, sondern variiert mit der Objekttopologie. Der optische Bildkontrast widerspiegelt dann neben den optischen Eigenschaften auch die meist höher aufgelöste SFM-Topologie. Decken sich allerdings optischer Kontrast und SFM-Topologie nicht, sind die Bilder vertrauenswürdig [94].

6.5.3. Anwendungen in der Biologie

Im biologisch-medizinischen Bereich ist die SNOM vorerst auf die Demonstration einer Reihe möglicher Anwendungen beschränkt. Dies wohl nicht aus Mangel an Potenz der Methode, sondern weil die entscheidenden methodischen Entwicklungen neuesten Datums sind. So hat insbesondere die Abstandsregelung über die Kraft die systematische Anwendung der SNOM auf komplexen Oberflächen erst richtig ermöglicht. Die Stärke der SNOM innerhalb der SPM liegt nicht unbedingt in der erzielbaren Auflösung. Sie ist in der Tat in der STM und AFM meist deutlich besser. Vielmehr liegt die Potenz der SNOM in der Vielzahl der möglichen Kontrastarten, Färbetechniken (insbesondere mit Fluoreszenzfarbstoffen) und aussagekräftigen Spektroskopien mit Licht im UV-Bereich und über das sichtbare Spektrum bis hin zum Infrarot. Färbung ermöglicht die Identifikation spezifischer Strukturen innerhalb eines komplexen Systems. So ist z. B. das Aktinnetzwerk in einer Mäusefibroblastenzelle durch Fluoreszenzfärbung gleichzeitig zur hochaufgelösten SFM-Abbildung der Zelloberfläche gezeigt worden [94] (Abb. 6.13.). Über Spektroskopie lassen sich u. a. ganz spezifische Aussagen über die chemische Natur einer Probe machen [95]. Anwendungen der Nahfeld-Spektroskopie in der Biologie stehen z. Z. allerdings noch aus.

6.6. Zusammenfassung und Ausblick

Mikroskopie bedeutet in erster Linie Abbildung. Die Rastersondenmikroskopien beweisen sich hier oft durch hohe Auflösung und – vielleicht noch wichtiger – durch ein hohes Signal-zu-Rauschverhältnis. Makromolekulare Strukturen auf flachen Trägern lassen sich etwa mit STM und SFM zumindest molekular auflösen. Konformationsunterschiede sind auf Proteingittern beobachtet worden [67].

Die Rastersondenmikroskopien sind allerdings mehr als lediglich neue oberflächensensitive Abbildungsmethoden. Die Interaktion zwischen Probe und Sonde kann oft besser als lokales Experiment im Nanometer- bis atomaren Bereich aufgefaßt werden. Dabei eröffnet sich eine neue Sicht und ein genaueres Verständnis einer großen Zahl oberflächengebundener Phänomene, die bislang nur makroskopisch in Erscheinung getreten und verstanden worden sind. So kann etwa Reibung auf atomarer Ebene beobachtet und mit Computermodellierung der entsprechenden Austauschpotentiale in Beziehung gesetzt werden oder es können Austauschkräfte zwischen einzelnen Makromolekülen studiert werden [z. B. 96].

Ob Abbildung oder lokales Experiment, die SPM zeichnet sich oft dadurch aus, daß Einzelereignisse beobachtet werden können; einzelne Proteinmoleküle werden direkt sichtbar, die Fluoreszenzemission eines isolierten Dipols wird gemessen usw. Dies steht im Gegen-

satz etwa zu der Röntgenbeugung oder der Elektronenbeugung, wo die Objektstruktur aus der Mittelung über eine große Zahl von Struktureinheiten hervorgeht; ein weiteres Beispiel ist die traditionelle Spektroskopie, die an statistischen Mengen von Molekülen erfolgt. Für die biologische und medizinische Anwendung der SPM ist ganz wichtig, daß die Beobachtung häufig in einer nativen Umgebung vorgenommen werden kann.

Die SPM können zur Objektmanipulation verwendet werden. So sind zum Beispiel einzelne Atome willkürlich verschoben [97] oder Punkte in magneto-optischen Filmen [98] viel dichter geschrieben worden als dies mit Fernfeldmethoden möglich gewesen wäre. Letzteres ist im Zusammenhang neuer Datenträger mit sehr hohen Speicherdichten zu sehen.

Die Kombination mehrerer Sondenmikroskopen zu hybriden Mikroskopen erweist sich als besonders fruchtbar. In der kombinierten SNOM/SFM können die optischen Eigenschaften direkt einer hochaufgelösten SFM-Topologie überlagert werden. In ähnlicher Weise ist Kraft- und Tunnelmikroskopie zum simultanen Studium der elektrischen und mechanischen Eigenschaften einer Probe kombiniert worden [99, 100].

Grundsätzlich sind die Rastersondenmikroskopen nicht auf die besprochenen Wechselwirkungen beschränkt. Sobald sich mittels einer lokalen Sonde eine Objekteigenschaft aus einem geringen Wechselwirkungsvolumen erschließen läßt, wird mit dieser Wechselwirkung im Prinzip eine neue Rastersondenmikroskopie möglich. Eine originelle Verwirklichung dieses Gedankens findet sich im „scanning ion conductance microscope“ [101]. Hier wird der Ionenstrom aus einer winzigen Pipettenöffnung zur Abbildung von Probenoberflächen unter Wasser verwendet. Die Öffnung wird bei der Annäherung zunehmend durch die Probenoberfläche abgedichtet, so daß der Ionenstrom aus der Pipette zur Abstandsregelung herangezogen werden kann. KOPELMAN und Mitarbeitern [102] ist es gelungen, am Apex einer SNOM-Spitze durch Nahfeld-Photopolymerisierung ein winziges Copolymer aufwachsen zu lassen, dessen Fluoreszenzeigenschaften vom lokalen pH abhängt. Dieser submicrometer pH-Sensor mißt einen definierten pH-Wert bereits mit weniger als 3000 Protonen sehr lokal und mit einer Reaktionszeit im Millisekunden-Bereich. Diese Idee läßt sich natürlich beliebig ausweiten.

Die Rastersondenmikroskopie beinhaltet eine neue Art zu denken. Immer mehr phantasiebegabte Forscher erfinden und bauen einfach ihr eigenes Mikroskop, um ihre spezifischen Fragestellungen zu lösen!

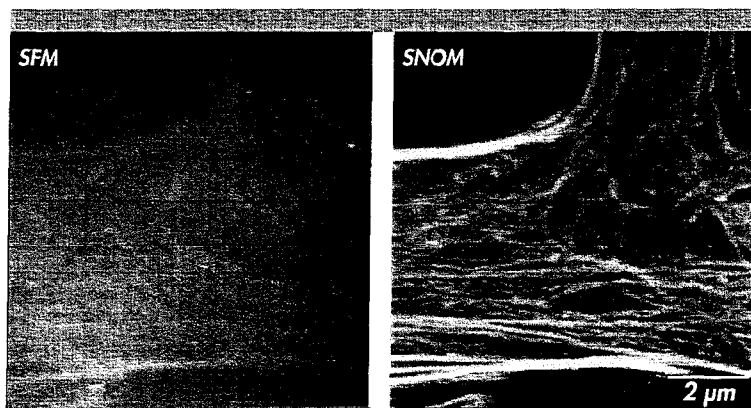


Abb. 6.13.:
Simultane SFM-Aufnahme (links) und SNOM-Aufnahme im Fluoreszenzkontrast (rechts) einer Mausfibroblastenzelle, deren Aktinnetzwerk mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt worden ist (aus BETZIG et al. [94], mit freundlicher Genehmigung von E. BETZIG, AT&T Bell Laboratories, New Jersey, USA und Kluwer Academic Publishers).

6.7. Dank

U. FISCHER (Inst. für Physik, Univ. Münster) hat durch Diskussion und Korrektur wesentlich zu dem Artikel beigetragen. Für Korrekturen danke ich P. DIETZ und R. REICHEL (IMPB, Univ. Münster). Wertvolle Gespräche habe ich mit R. GUCKENBERGER und T. HARTMANN (MPI für Biochemie, Martinsried, Deutschland), F. SCHABERT (MMI für hochauflösende Elektronenmikroskopie am Biozentrum der Univ. Basel, Schweiz), H. HÖRBER (EMBL, Heidelberg) und M. RADMACHER (Dept. Phys., Univ. California, Santa Barbara, USA) geführt. Für die Präparation der Aktinfilamente danke ich R. WEPF (EMBL, Heidelberg). Weiter bin ich R. GÖCKE für die SEM-Aufnahme und G. KIEFERMANN für photographische Arbeit verbunden. Meine Arbeit wird durch das Ministerium für Wissenschaft und Forschung, Nordrhein-Westfalen (IV A6-400 005 91), gefördert.

6.8. Literatur

- [1] BINNIG, G., ROHRER, H., GERBER, CH., WEIBEL, E.: *Phys. Rev. Lett.* 49, 57-61 (1982)
- [2] BINNIG, G., ROHRER, H., GERBER, CH., WEIBEL, E.: *Phys. Rev. Lett.* 50, 120-123 (1983)
- [3] BINNIG, G., QUATE, C. F., GERBER, CH.: *Phys. Rev. Lett.* 56, 930-933 (1986)
- [4] ALBRECHT, T., QUATE, C. F.: *J. Appl. Phys.* 62, 2599 (1987)
- [5] OHNESORGE, F., BINNIG, G.: *Science* 260, 1451-1456 (1993)
- [6] SYNGE, E.H.: *Phil. Mag.* 6, 356-362 (1928)
- [7] O'KEEFE, J. A.: *J. Opt. Soc. Am.* 46, 359 (1956)
- [8] BETZIG, E., CHICHESTER, R. J.: *Science* 262, 1422-1425 (1993)
- [9] SONNENFELD, R., HANSMA, P. K.: *Science* 232, 211-213 (1986)
- [10] MARTI, O., DRAKE, B., HANSMA, P. K.: *Appl. Phys. Lett.* 51, 484-486 (1987)
- [11] BINNIG, G., ROHRER, H.: *Helv. Phys. Acta* 55, 726 (1982)
- [12] BINNIG, G., SMITH, D. P. E.: *Rev. Sci. Instrum.* 57, 1688-1689 (1986)
- [13] MARTI, O.: In: *STM and SFM in Biology*. MARTI, O., AMREIN, M. (eds.), Academic Press, London, 1-124 (1993)
- [14] ROHRER, H.: In: *Scanning Tunneling Microscopy and Related Methods*. BEHM, R. J., GARCIA, N., ROHRER, H. (eds.), NATO ASI Series E 184, 1-25 (1990)
- [15] AMREIN, M., DÜRR, R., WINKLER, H., TRAVAGLINI, G., WEPF, R., GROSS, H.: *J. Ultrastruct. Res.* 102, 170-177 (1989)
- [16] AMREIN, M., GROSS, H., GUCKENBERGER, R.: In: *STM and SFM in Biology*. MARTI, O., AMREIN, M. (eds.), Academic Press, London, 127-175 (1993)
- [17] BARÓ, A. M., MIRANDA, R., ALAMAN, J., GARCÍA, N., BINNIG, G., ROHRER, H., GERBER, CH., CARRASCOSA, J. L.: *Nature (London)* 315, 253-254 (1985)
- [18] TRAVAGLINI, G., ROHRER, E., AMREIN, M., GROSS, H.: *Surface Science* 181, 380-390 (1993)
- [19] CLEMMER, C., BEEBE, T. P.: *Science* 251, 640-642 (1991)
- [20] LINDSAY, S. M., THUNDAT, T., NAGAHARA, L., KNIPPING, U., RILL, R. L.: *Science* 244, 1017-1116 (1989)
- [21] DELAMARCHE, E., MICHEL, B., GERBER, CH.: *Langmuir*, zur Publ. eingereicht
- [22] MAALOU, M., CHRÉTIEN, D., KARSENTI, E., HÖRBER, J. K. H.: zur Publ. eingereicht

- entlich
(IMPB,
ANN
Elek-
leidet-
rt. Für
in ich
rbun-
Nord-
- 124
- TO-
- .),
- ?)
- [23] KARRASCH, S., DOLDER, M., SCHABERT, F., RAMSDEN, J., ENGEL, A.: *Biophys. J.* 65, 2437-2446 (1987)
- [24] WANG, Z., HARTMANN, T., BAUMEISTER, W., GUCKENBERGER, R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 9343-9347 (1990)
- [25] GROSS, H.: In: *Cryotechniques in Biological Electron Microscopy*. STEINBRECHT, R. A., ZIEROLD, K. (eds.), Springer Verlag, Berlin, 205-215 (1987)
- [26] GERBER, CH., BINNIG, G., FUCHS, H., MARTI, O., ROHRER, H.: *Rev. Sci. Instrum.* 57, 221-224 (1986)
- [27] AMREIN, M., STASIAK, A., GROSS, H., STOLL, E., TRAVAGLINI, G.: *Science* 240, 514-516 (1988)
- [28] WEPF, R., AMREIN, M., BÜRCKLI, U., GROSS, H.: *J. Microscopy* 163, 51-64 (1991)
- [29] GUCKENBERGER, R., WIEGRÄBE, W., HILLEBRAND, A., HARTMANN, T., WANG, Z., BAUMEISTER, W.: *Ultramicroscopy* 31, 327-332 (1989)
- [30] GUCKENBERGER, R., HACKER, B., HARTMANN, T., SCHEYBANI, T., WANG, Z., WIEGRÄBE, W., BAUMEISTER, W.: *J. Vac. Sci. Technol. B* 9, 1227-1230 (1991)
- [31] GUCKENBERGER, R., HEIM, M., CEUC, G., KNAPP, H.F., WIEGRÄBE, W., HILLEBRAND, A.: *Science*, im Druck
- [32] FOSTER, J. S., FROMMER, J.: *Nature (London)* 333, 542-545 (1988)
- [33] SMITH, D. P. E., FROMMER, J. E.: In: *STM and SFM in Biology*. MARTI, O., AMREIN, M. (eds.), Academic Press, London, 205-227 (1993)
- [34] ALLEN, M. J., BALOOCH, M., SUBBIAH, S., TENCH, R. J., SIEKHAUS, W., BALHORN, R.: *Scan. Microsc.* 5, 625-629 (1991)
- [35] HECKL, W.M., SMITH, D.P.E., BINNIG, G., KLAGGES, H., HÄNSCH, T.W., MADDOCKS, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8003-8005 (1991)
- [36] SMITH, D.P.E., BRYANT, A., QUATE, C.F., RABE, J.P., GERBER, CH., SWALEN, J.D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 969-972 (1987)
- [37] MCMASTER, T.J., CARR, H., MILES, M.J., CAIRNS, P., MORRIS, V.J.: *J. Vac. Sci. Technol. A* 8, 648-651 (1990)
- [38] MILES, M.J., MCMASTER, T., CARR, H.J., TATHAM, A.S., SHEWRY, P.R., FIELD, J.M., BELTON, P.S., JEENES, D., HANLEY, B., WHITTAM, M., CAIRNS, P., MORRIS, V.J., LAMBERT, N.: *J. Vac. Sci. Technol. A* 8, 698-702 (1990)
- [39] WELLAND, M. E., MILES, M. J., LAMBERT, N., MORRIS, V. J., COOMBS, J. H., PETHICA, J. B.: *Int. J. Biol. Macromol.* 11, 29-32 (1989)
- [40] VOELKER, M. A., HAMEROFF, S. R., JACKSON, H.D., DERENIAK, E. L., MCCUSKEY, R. S., SCHNEIKER, C. W., CHVAPIL, T. A., BELL, L. S., WEISS, L. B.: *J. Microscopy* 152, 557-566 (1988)
- [41] STEMMER, A., HEFTI, A., AEBI, U., ENGEL, A.: *Ultramicroscopy* 30, 263-280 (1989)
- [42] AMREIN, M., DÜRR, R., STASIAK, A., GROSS, H., TRAVAGLINI, G.: *Science* 243, 1708-1711 (1989)
- [43] MILES, M. J.: In: *STM and SFM in Biology*. MARTI, O., AMREIN, M. (eds.), Academic Press, London, 177-204 (1993)
- [44] ARSCOTT, P. G., BLOOMFIELD, V. A.: In: *STM and SFM in Biology*. MARTI, O., AMREIN, M. (eds.), Academic Press, London, 259-272 (1993)
- [45] LINDSAY, S. M., TAO, N. J.: In: *STM and SFM in Biology*. MARTI, O., AMREIN, M. (eds.), Academic Press, London, 229-257 (1993)
- [46] BLACKFORD, B., JERICO, M.: *J. Vac. Sci. Technol. B* 9, 1253-1258 (1991)
- [47] ZASADZINSKI, J. A. N., SCHNEIR, J., GURLEY, J., ELINGS, V., HANSMA, P. K.: *Science* 239, 1013-1015 (1988)
- [48] WEPF, R., AMREIN, M., BREMER, A., AEBI, U., GROSS, H.: *Proceedings EUREM 92 (Granada, Spain), Electron Microscopy* 3, 751-753 (1992)
- [49] LENNARD-JONES, J. E.: *Trans-Farrady Soc.* 28, 334 (1932)

- [50] HEINZELMANN, H., MEYER, E., RUDIN, H., GÜNTHERODT, H.-J.: In: *Scanning Tunneling Microscopy and Related Methods*. BEHM, R. J., GARCIA, N., ROHRER, H. (eds.), NATO ASI Series E 184, 443-467 (1990)
- [51] ISRAELACHVILI, J. N.: *Intermolecular and Surface Forces*. Academic Press, London (1985)
- [52] BUTT, H.-J.: *Biophys. J.* 63, 578-582 (1992)
- [53] WHITEHOUSE, D. J.: In: *Characterization of Solid Surfaces*. KANE, P.E., LARRABEE, G.P. (eds.), Plenum Press, New York, 49-75 (1976)
- [54] MATE, C. M., MCCLELLAND, G. M., ERLANDSSON, R., CHINAG, S.: *Phys. Rev. Lett.* 59, 1942-1945 (1987)
- [55] OVERNEY, R. M., MEYER, E., FROMMER, J., BRODBECK, D., LÜTHI, R., HOWALD, L., GÜNTHERODT, H.-J., FUJIIHARA, M., TAKANO, H., GOTHO, Y.: *Nature (London)* 359, 133-135 (1992)
- [56] BURNHAM, N. A., COLTON, R. J.: *J. Vac. Sci. Technol. A* 7, 2906-2913 (1989)
- [57] RADMACHER, M., TILMANN, R. W., GAUB, H. E.: *Biophys. J.* 64, 735-742 (1993)
- [58] SAENZ, J. J., GARC'A, N., GRÜTTER, P., MEYER, E., HEINZELMANN, H., WIESENDANGER, R., ROSENTHALER, L., HIDBER, H. R., GÜNTHERODT, H.-J.: *J. Appl. Phys.* 62, 4293-4295 (1987)
- [59] TERRIS, B. D., STERN, J. E., RUGAR, D., MAMIN, H. J.: *Phys. Rev. Lett.* 63, 2669-2672 (1989)
- [60] HANSMA, P. K., CLEVELAND, J. P., RADMACHER, M., WALTERS, D. A., HILLNER, P. E., BEZANILLA, M., FRITZ, M., VIE, D., HANSMA, G. H.: *Appl. Phys. Lett.* 64, 1738-1740 (1994)
- [61] DRAKE, B., PRATER, C. B., WEISENHORN, A. L., GOULD, S. A., ALBRECHT, T. R., QUATE, C. F., CANNELL, D. S., HANSMA, H. G., HANSMA, P. K.: *Science* 243, 1586-1589 (1989)
- [62] RADMACHER, M., ZIMMERMAN, R. M., GAUB, H. E.: In: *The Structure and Conformation of Amphiphilic Membranes*. ZIPOWSKY, R., RICHTER, D., KREMER, K. (eds.), Springer Verlag, Berlin (1992)
- [63] FUCHS, H.: *J. Mol. Struct.* 292, 29-48 (1993)
- [64] BUTT, H.-J., DOWNING, K. H., HANSMA, P. K.: *Biophys. J.* 58, 1473-1480 (1990)
- [65] APPEL, H.-J., COLCHERO, J., LINDER, A., MARTI, O., MLYNEK, J.: *Ultramicroscopy* 42-44, 1133-1140 (1992)
- [66] HOH, J. H., SOSINSKY, G. E., REVEL, J.-P., HANSMA, P. K.: *Biophys. J.* 65, 149-163 (1993)
- [67] SCHABERT, F. A., HOH, J. H., KARRASCH, S., HEFTI, A., ENGEL, A.: *J. Vac. Sci. Technol. B*, im Druck
- [68] HANSMA, H. G., BEZANILLA, M., ZENHÄUSERN, F., ADRIAN, M., SINSHEIMER, R. L.: *Nucl. Acid Res.* 21, 505-512 (1990)
- [69] BUTT, H.-J., WOLFF, E. K., GOULD, S. A. C., DIXON, N. B., PETERSON, HANSMA, P. K.: *J. Struct. Biol.* 105, 54-61 (1990)
- [70] HENDERSON, E., HAYDON, P. G., SAKAGUCHI, D. S.: *Science* 257, 1944-1946 (1992)
- [71] HAEBERLE, W., HÖRBER, J. K., OHNESORGE, F., SMITH, D. P., BINNIG, G.: *Ultramicroscopy* 42-44, 1161-1167 (1992)
- [72] ABBÉ, E.: *Archiv f. Mikroskop. Anat.* 9, 413 (1873)
- [73] VAN LABEKE, D., BARCHIESI, D.: In: *Proc. NFO I, Near Field Optics*. POHL, D. W., COURJON, D. (eds.), NATO ASI Series E 242, 157-178 (1993)
- [74] HEINZELMANN, H., POHL, D. W.: im Druck
- [75] TRAUTMANN, J. K., BETZIG, E., WEINER, J. S., DIGIOVANNI, D. J., HARRIS, T. D., HELLMAN, F., GYORGY, E. M.: *J. Appl. Phys.* 71, 4659-4663 (1992)
- [76] BETZIG, E., TRAUTMAN, J. K., WEINER, J. S., HARRIS, T. D., WOLFE, R.: *Appl. Opt.* 31, 4563-4571 (1992)
- [77] VAEZ-IRAVANI, M., TOLEDO-CROW, R.: *Appl. Phys. Lett.* 62, 1044-1046 (1993)
- [78] BETZIG, E., TRAUTMANN, J. K.: *Science* 257, 189-195 (1992)
- [79] PIEDNOIR, A., CREUZET, T., LICOPPE, C., DE FORNEL, F.: In: *Proc. NFO I, Near Field Optics*. POHL, D. W., COURJON, D. (eds.), NATO ASI Series E 242, 309-316 (1993)

- [80] LEWIS, A., ISAACSON, M., HAROOTUNIAN, A., MURAY, A.: *Ultramicroscopy* 13, 227-232 (1984)
- [81] POHL, D. W., DENK, W., LANZ, M.: *Appl. Phys. Lett.* 44, 651-653 (1984)
- [82] FISCHER, U. CH.: *J. Vac. Sci. Technol. B* 3, 386-390 (1985)
- [83] DÜRIG, U., POHL, D. W., ROHNER, F.: *J. Appl. Phys.* 59, 3318-3327 (1986)
- [84] FISCHER, U. CH., DÜRIG, U. T., POHL, D. W.: *Appl. Phys. Lett.* 52, 249-251 (1988)
- [85] VIGNERON, J. P.: In: *Proc. NFO I, Near Field Optics*. POHL, D. W., COURJON, D. (eds.), NATO ASI Series E 242, 121-130 (1993)
- [86] REDDICK, R., WARNACK, R., FERRELL, T.: *Phys. Rev. B* 39, 767-770 (1989)
- [87] COURJON, D., SARAYEDDINE, K., SPAJER, M.: *Optics Commun.* 71, 23-27 (1989)
- [88] OHTSU, M., JIANG, T., PANGARIBUAN, T., KOZUMA, M.: In: *Proc. NFO I, Near Field Optics*. POHL, D. W., COURJON, D. (eds.), NATO ASI Series E 242, 131-139 (1993)
- [89] MOERS, M. H. P., TACK, R. G., NOORDMAN, O. F. J., SGERINK, F. B., VAN HULST, N. F., BÖLGER, B.: In: *Proc. NFO I, Near Field Optics*. POHL, D. W., COURJON, D. (eds.), NATO ASI Series E 242, 79-86 (1993)
- [90] FISCHER, U., CH., POHL, D. W.: *Phys. Rev. Lett.* 62, 458-461 (1989)
- [91] SPECHT, M., PEDARNIG, J. D., HECKL, W. M., HÄNSCH, T. W.: *Phys. Rev. Lett.* 68, 476-479 (1992)
- [92] LEWIS, A., LIEBERMAN, K.: *Nature (London)* 354, 214-218 (1991)
- [93] BETZIG, E., FINN, P. L., WEINER, S. J.: *Appl. Phys. Lett.* 60, 2484-2486 (1993)
- [94] BETZIG, E.: In: *Proc. NFO I, Near Field Optics*. POHL, D. W., COURJON, D. (eds.), NATO ASI Series E 242, 7-15 (1993)
- [95] KOPELMAN, R., TAN, W., SHI, Z.-Y., BIRNBAUM, D.: In: *Proc. NFO I, Near Field Optics*. POHL, D. W., COURJON, D. (eds.), NATO ASI Series E 242, 17-24 (1993)
- [96] FLORIN, E.L., MOY, V.T., GAUB, H.E.: *Science* 264, 415-417 (1994)
- [97] EIGLER, D. M., SCHWEIZER, E. K.: *Nature (London)* 344, 524-526 (1990)
- [98] BETZIG, E., TRAUTMAN, J. K., WOLFE, R., GYORGY, E. M., FINN, P. L., KRYDER, M., H., CHANG, C.-H.: *Appl. Phys. Lett.* 61, 142-144 (1992)
- [99] ANSELMETTI, D., GERBER, C., MICHEL, B., GÜNTHERODT, H.-J., ROHRER, H.: *Rev. Sci. Instrum.* 63, 3003-3006 (1992)
- [100] ENG, L. M., JANDT, K. D., DESCOUTS, D.: *Rev. Sci. Instrum.* 65, 390-393 (1994)
- [101] HANSMA, P. K., DRAKE, B., MARTI, O., GOULD, S. A. C., PRATER, C. B.: *Science* 243, 641-643 (1989)
- [102] TAN, W., SHI, Z.-Y., KOPELMAN, R.: *Anal. Chem.* 64, 2958-2990 (1992)