

# 3 Experiment

## 3.1 Aufbau des konfokalen Spektrometers

### 3.1.1 Einführung

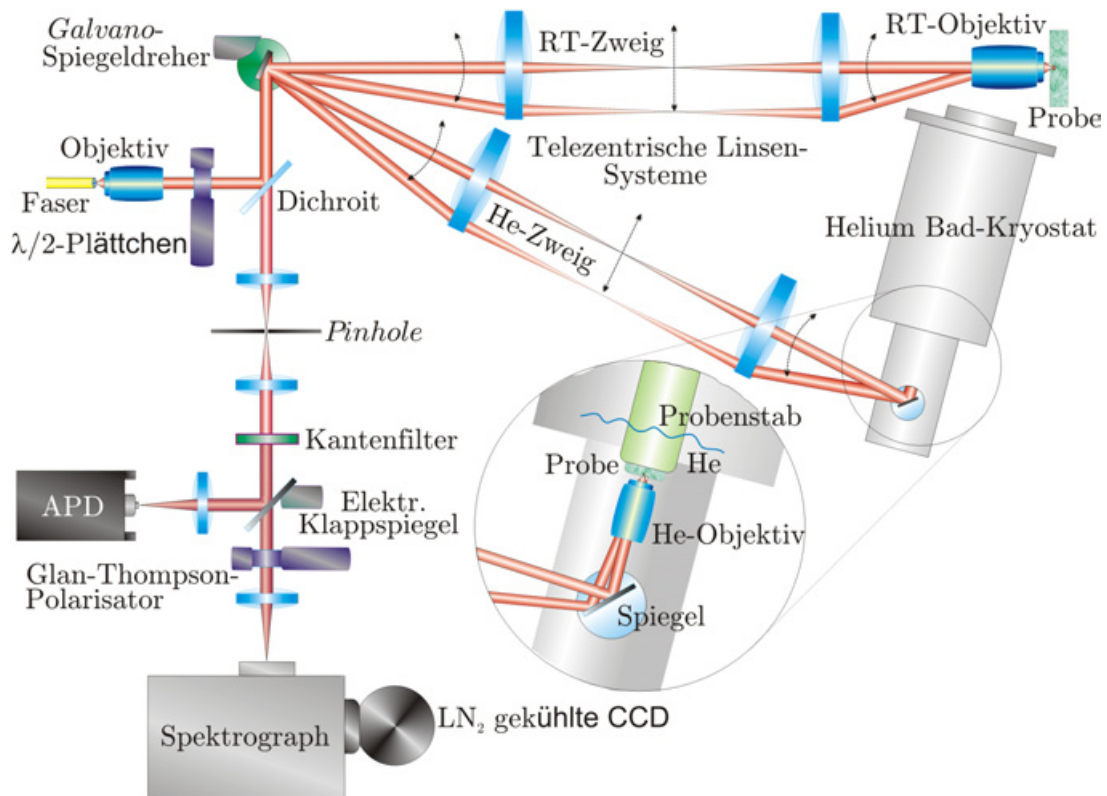
Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein konfokales Spektrometer für Raum- und Tieftemperatur-Messungen aufgebaut. Für Experimente am PS I lag der Anspruch darin, die Fluoreszenz einzelner Moleküle bei tiefen Temperaturen detektieren zu können. Da sich bei Raumtemperatur diverse technische Details einfacher lösen lassen, wurde zunächst ein Aufbau zur Messung von Proben bei Raumtemperatur erstellt. Als ein wesentlicher Punkt von vielen sei diesbezüglich beispielsweise das Objektiv genannt. Da ein einzelnes Molekül nicht viel Licht abgibt und darüber hinaus im allgemeinen in alle Raumrichtungen abstrahlt, sollte das Objektiv möglichst viel Licht einsammeln können, also eine möglichst große numerische Apertur haben. Für die Mikroskopie bei Raumtemperatur ist der Markt sehr groß, so dass das Sortiment an Objektiven mit großer numerischer Apertur und immer kleineren optischen Aberrationen ständig erweitert wird. Der größte erreichbare Wert für die numerische Apertur liegt bei  $NA = 1,65$ <sup>1</sup>. Nun stellt man fest, dass für Tieftemperatur-Anwendungen nur eine ganz begrenzte Anzahl von Herstellern überhaupt Objektive anbietet, da der Markt vergleichsweise sehr klein ist. Beim Abkühlen im flüssigen Helium ist das Objektiv großen mechanischen Belastungen ausgesetzt. Ungünstigerweise sind gerade die Objektive mit großer numerischer Apertur bei zugleich möglichst klein gehaltener optischer Aberration die mechanisch empfindlichsten. Dennoch lassen sich geeignete Objektive finden, die sogar die theoretisch größtmögliche numerische Apertur im flüssigen Helium von  $NA \approx 0,95$  beinahe erreichen. Allerdings sind aufgrund der Verzerrungen bei tiefen Temperaturen die optischen Aberrationen entsprechend größer als bei Raumtemperatur. In diesem Kapitel werden einige Details beschrieben, wie man dieses und einige andere Probleme löst, um schließlich ein messbereites Einzelmolekül-Spektrometer für tiefe Temperaturen fertigzustellen. Dafür wird zunächst eine Funktionsübersicht gegeben, bevor im Anschluss einzelne Komponenten näher erläutert werden.

---

<sup>1</sup>Dieser Wert wird nur mit Hilfe von speziellem Immersionsöl und speziellen Deckgläschen erreicht

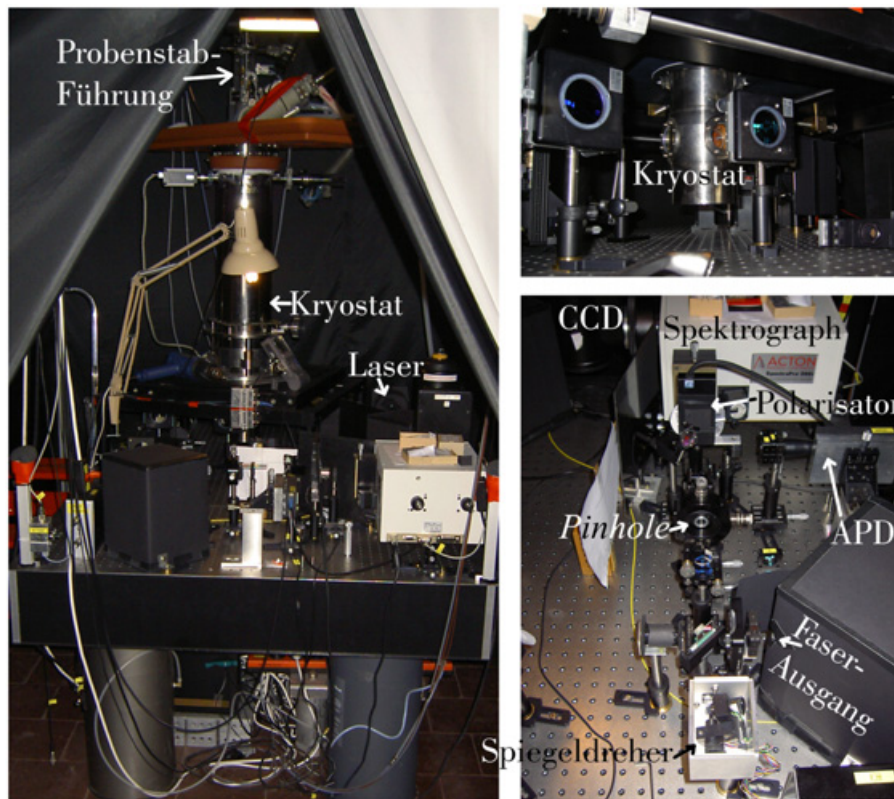
#### 3.1.2 Funktionsweise und Übersicht

Abbildung 3.1 zeigt eine schematische Darstellung des optischen Gesamtaufbaus. Er untergliedert sich in einen Raumtemperatur- und einen Tieftemperaturaufbau. Beide teilen sich aus ökonomischen Gründen den Anregungs- und Detektionszweig. Man beachte, dass im Schema sämtliche Lichtwege simultan aufgezeigt werden. Dies dient nur der Anschauung und hat messtechnisch keinerlei Relevanz. Um die Funktionsweise der Apparatur am einfachsten nachzuvollziehen, ist es hilfreich den Lichtweg von Quelle bis Detektor zu verfolgen. Der aus der Faser austretende Laserstrahl wird durch ein Objektiv in geeignetem Abstand kollimiert und über einen dichroitischen Strahlteiler in den Strahlengang des konfokalen Mikroskops eingespeist. Von dort an bis zur Probe sind der Anregungsstrahl und der Strahl der Fluoreszenz, der nachgewiesen werden soll, deckungsgleich. Wie bereits im Abschnitt 2.3.2 erwähnt wurde, besteht beim konfokalen Mikroskop die Notwendigkeit, die Probe abzurastern, um ein vollständiges Bild der Probe zu erhalten. Technisch wird dies realisiert, indem entweder die Probe orthogonal zum Anregungsstrahl verschoben wird oder der Anregungsstrahl über die Probe bewegt wird. Letztere Lösung hat gegenüber der ersteren einige wesentliche Vorteile. Zum einen liegt die Rastergeschwindigkeit höher, zum anderen ist die mechanische Toleranz aufgrund der verkleinernden Wirkung des Objektivs weniger kritisch. Darüber hinaus erfordert erstere Methode insbesondere bei tiefen Temperaturen einen großen technischen Aufwand und wird daher von den wenigsten Gruppen praktiziert. Dementsprechend verwendet das im Rahmen dieser Arbeit aufgebaute konfokale Mikroskop auch die letztere Methode. Die nächste optische Komponente im Strahlengang in Richtung zur Probe ist daher ein Galvano-Spiegeldreher, der den Anregungsstrahl in x- und in y-Richtung ablenken kann. Somit kann von hier aus mit dem Laserstrahl z.B. eine Kegel- oder Pyramidenoberfläche abgefahren werden. Um diese Strahlablenkung zum Abrastern der Probe nutzen zu können, muss sie in eine fokussierende Bewegung überführt werden. Die einfachste optische Lösung bietet ein telezentrisches System, das aus zwei Linsen besteht. Im Fokuspunkt der ersten Linse befindet sich der Galvano-Spiegeldreher. Des Weiteren überlagern sich die Fokuspunkte beider Linsen in der Mitte zwischen sich. Der zweite Fokuspunkt der zweiten Linse fällt mit der Hauptebene des Objektivs zusammen, so dass diese immer im gleichen Punkt jedoch unter anderem Winkel getroffen wird. Dadurch bewegt sich der Fokuspunkt des Anregungsstrahls in der Fokusebene des Objektivs über die Probe. Beim Betrachten des Strahlengangs in Abbildung 3.1 beachte man, dass der Anregungsstrahl selbst zwischen den Linsen divergiert, während er außerhalb des Linsensystems stets kollimiert ist. Um bei Raum- und bei Tieftemperatur messen zu können, besitzt der Aufbau zwei unabhängige telezentrische Systeme. Das eine System mündet in einem Immersionsöl-Objektiv und das andere in einem Tieftemperatur-Objektiv innerhalb eines Helium-Badkryostaten. Nach erfolgter Anregung der Probe hat das jeweilige Objektiv die Aufgabe, einen möglichst großen Teil der Fluoreszenz aus dem konfokalen Volumen zu sammeln und schließlich kollimiert genau dem Anregungsstrahl entgegenzusenden. Auf diese Weise gelangt, während der Galvano-Spiegeldreher Punkt für Punkt die Probe abrastert, die jeweils zu jedem



**Abbildung 3.1:** Schema des optischen Gesamtaufbaus. Über die Faser wird ein kollimierter Anregungsstrahl in das System eingespeist. Im Bereich der telezentrischen Linsen-Systeme für Raum- und Tieftemperatur sind jeweils zwei Strahlrichtungen eingezeichnet, die über den Spiegeldreher eingestellt werden. Bei jedem Rasterschritt wird Licht von der Probe auf demselben optischen Pfad bis hinter den dichroitischen Strahlteiler gelenkt. Mit Hilfe der Lochblende wird Licht aus dem Anregungsvolumen in der Probenebene selektiert. Der Kantenfilter lässt nur längerwellige Anteile als das Laserlicht passieren. Der Nachweis erfolgt entweder über eine Lawinen-Photodiode (*avalanche photodiode* - kurz: APD) oder eine stickstoffgekühlte, von der Rückseite her beleuchtete (*back-illuminated*) charge coupled device-Kamera (CCD).

Punkt zugehörige Fluoreszenz bis zum dichroitischen Strahlteiler, an dem der Laser in den Strahlengang reflektiert wird. Anders als die ebenfalls hier ankommende Rückstreuung des Laserlichts kann die stokesverschobene Fluoreszenz den Strahlteiler zu 95 % passieren. Auf dem Weg in den Detektionskanal wird nun der kollimierte Anteil der Fluoreszenz mit Hilfe einer Linse auf die Lochblende abgebildet und dahinter mittels einer zweiten Linse wieder kollimiert. Die divergierenden Anteile der Fluoreszenz stammen von außerhalb des konfokalen Volumens und werden an dieser Stelle größtenteils abgeschnitten (s. Abschnitt 2.3.2). Um die Laserrückstreuung möglichst vollständig abzublocken, befinden sich im weiteren Strahlenverlauf einige Langpass-Kantenfilter. Im Schema Abbildung 3.1 ist einer exemplarisch dargestellt. Der Aufbau bietet zwei verschiedene Detektionsmöglichkeiten, zwischen denen mit Hilfe eines elektrisch klappbaren Spiegels ausgewählt werden kann. Die erste dient zum messen der integrierten Intensität. Hierzu wird die Fluoreszenz



**Abbildung 3.2:** Photo von Teilen des erstellten Messaufbaus. Das **linke Bild** zeigt einen Einblick in die Dunkelkammer, in der das Experiment abläuft. Die Steuerung erfolgt von außerhalb. Im Teilbild **rechts oben** sieht man den optischen Zugang zum Kryostaten. **Rechts unten** ist der Detektionskanal dargestellt.

mittels einer Linse auf eine Avalanche Photodiode (APD) abgebildet. Die zweite Möglichkeit besteht darin, dass die Fluoreszenz spektral aufgelöst erfasst wird. Dafür wird die Fluoreszenz ebenfalls mit einer Linse in einen Gitterspektrographen fokussiert. Die spektral aufgespaltene Fluoreszenz wird dann simultan mit Hilfe einer Stickstoff-gekühlten *back illuminated charge-coupled-device*-Kamera (CCD-Kamera) aufgezeichnet. Die Datenakquisition und Steuerung des Experiments erfolgt über einen Linux-Computer. In Abbildung 3.2 sind wichtige Teile des Aufbaus auf Photos festgehalten. Nicht dargestellt ist die instrumentelle Peripherie wie z.B. das Pumpensystem.

### 3.1.3 Lichtquelle: Laser und Einmoden-Lichtwellenleiter

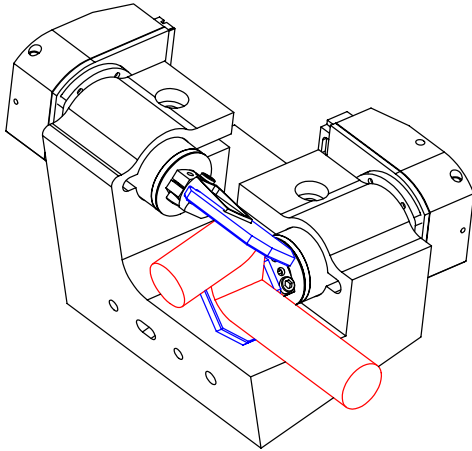
Da das hier beschriebene konfokale Mikroskop dazu gebaut ist, Moleküle räumlich zu selektieren, werden an die Schmalbandigkeit des Lasers keine hohen Ansprüche gestellt. Hohe Anforderungen hingegen werden an seine Leistungsstabilität gestellt, denn die Detektion der Fluoreszenz eines einzelnen Moleküls reagiert sehr sensibel auf Schwankungen

der Anregungsintensität. Eine kostengünstige und zugleich sehr Platz sparende Alternative zum Farbstofflaser bietet das Littman-System. Bei diesem Diodenlaser befindet sich innerhalb der Kavität ein verstellbares Gitter. Dadurch kann die emittierte Frequenz verstimmt werden. Zudem verleiht diese Konstruktion in Verbindung mit einer sehr hochwertigen Diode dem Laser eine gute Leistungsstabilität und geringe Bandbreite. Das verwendete Lasersystem wurde von der Firma Sacher entwickelt und vertrieben. Es besteht aus einer Kontrolleinheit (MLD 1000) und zwei Lasern (TEC-500-0685-05 und TEC-500-0635-05). Damit während des Experiments in verschiedenen Wellenlängenbereichen angeregt werden kann, sind die beiden Laser so montiert, dass innerhalb von ca. zehn Minuten von einem Laser zum anderen gewechselt werden kann. Die beiden zur Verfügung stehenden Bereiche erstrecken sich über  $676 \text{ nm} < \lambda < 688 \text{ nm}$  und  $634 \text{ nm} < \lambda < 643 \text{ nm}$ . Die Bandbreite der Laser beträgt über einen Zeitraum von 20 s nicht mehr als 5 MHz (typ. 2 MHz). Beide Laser strahlen kontinuierlich (*cw*).

Die Hauptschwierigkeit liegt darin, beide Laser in ein und dieselbe polarisationserhaltende Einmoden-Faser einzukoppeln, wobei mit Hilfe eines klappbaren Spiegels zwischen den Lasern ausgewählt wird. Die Faser dient dem Aufbau als nahezu ideale Punktlichtquelle. Diese Eigenschaft ist jedoch weniger entscheidend. Hingegen ist wichtig, dass nur eine Mode in den Strahlengang eingekoppelt wird. Denn wie aus der Gaußschen Strahlenoptik bekannt ist, führt ein Gaußsches Strahlprofil bei Abbildung mit einer Linse zum kleinsten Fokuspunkt. Daher ist diese Eigenschaft des Anregungsstrahls für die Größe des konfokalen Volumens von Bedeutung, damit einzelne Moleküle räumlich selektiert werden können. Der Durchmesser der verwendeten Faser beträgt ca.  $7 \mu\text{m}$ . Sie ist bereits vom Hersteller Schäfter-Kirchhoff konfektioniert. Zum Ein- bzw. Auskoppeln dienen Standard-Faserkoppler (Newport). Der Auskoppler wird so justiert, dass der ausgekoppelte Strahl kollimiert ist. Die Einstellung des Strahldurchmessers erfolgt durch geeignete Wahl des Auskoppler-Objektivs.

#### 3.1.4 Rastermethode: Galvano-Spiegeldreher

Das Abrastern der Probe erfolgt mit Hilfe eines Galvano-Spiegeldrehers in Kombination mit einem telezentrischen Linsensystem. Der Spiegeldreher stammt vom italienischen Hersteller Galvoline (G1222HS). Er besteht aus zwei Servomotoren, die auf dem Prinzip sich bewegender Magneten basieren. Jeder dieser Motoren trägt einen Silberspiegel, so dass ein eintreffender Strahl sowohl in x- als auch in y-Richtung abgelenkt werden kann (s. Abbildung 3.3). Die Größe der Spiegel beträgt  $8 \times 6 \text{ mm}^2$  und  $6 \times 14 \text{ mm}^2$ . Ein sinnvolles Maß für die Rastergeschwindigkeit ist die Zeit für einen Schritt, die so genannte „Absetzzeit“. Sie hängt unter anderem von den Trägheitsmomenten und dem beschleunigendem Drehmoment ab. Mit einer Trägheit der Rotoren von  $1,5 \cdot 10^{-9} \text{ kg} \cdot \text{m}^2$  und einer Drehmomentkonstante von  $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ Nm/A}$  kann in guter Qualität mit einer maximalen Frequenz von ca. 5 kHz gerastert werden. Die daraus resultierenden großen Beschleunigungen belasten die Spiegel und Rotoren stark, so dass hohe Ansprüche an deren Steifig-



**Abbildung 3.3:** Technische Zeichnung des prinzipiellen Aufbaus der Galvano-Spiegeldreher. Die beiden Galvano-Servomotoren sind fest in eine massive Aluminium-Halterung eingespannt, um eine hohe Verwindungssteifigkeit zu gewährleisten. Auf die Rotoren sind jeweils ein Silberspiegel montiert, hier blau eingezeichnet. Die Ablenkung eines auftreffenden Lichtstrahls wird in rot angedeutet.

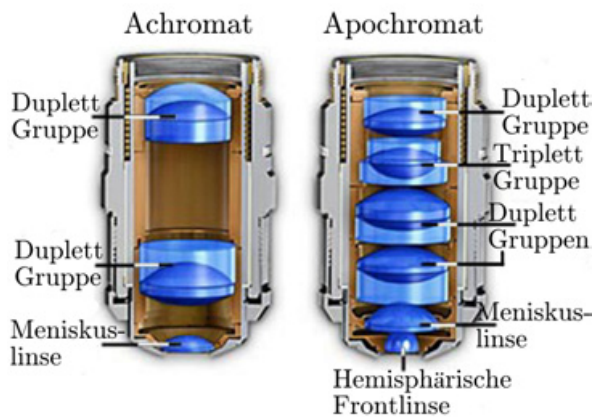
keit gestellt werden. Die üblicherweise beim Experiment gewählte Rastergeschwindigkeit lag jedoch eine ganze Größenordnung darunter. Denn beim Abrastern einer Fläche von zum Beispiel  $50 \times 50 \mu\text{m}^2$  in der Probenebene und einer Schrittweite von  $1/3 \mu\text{m}$  wird das Signal-zu-Rausch-Verhältnis bei geringeren Verweilzeiten als ca. 2 ms pro Punkt unvernünftig, da dieser Wert nur noch eineinhalb Größenordnungen von der Detektortotzeit (50 ns) entfernt liegt.

Die Ansteuerung der Servomotoren erfolgt über eine Treiberkarte (C355). Diese verarbeitet zwei analoge Signale in Form von Spannungen im Bereich von  $\pm 10 \text{ V}$ . Den gegebenen Spannungen sind entsprechende Spiegelpositionen zugeordnet. Zur präzisen Signaleingabe dient eine 16 Bit Digital-Analog-Wandler-Karte (Meilhaus ME-6000). Um eine möglichst hohe Winkelauflösung zu erreichen, wird die ausgegebene Spannung mit Hilfe eines Spannungsteilers geeignet verringert. Die Auflösung der lateralen Schrittweite in der Probenebene beträgt dadurch weniger als 30 nm. Zur Lokalisierung einzelner Moleküle genügt in der Regel eine um mindestens eine Größenordnung geringere Abtastung der Probe. Jedoch wird nach Selektion eines Moleküls die volle Auflösung des Galvano-Spiegeldreher genutzt, um das Fluoreszenz-Signal zu optimieren.

#### 3.1.5 Ansprüche an das Objektiv

Ein wichtiger Bestandteil des konfokalen Mikroskops ist sein Objektiv. Wie in Abschnitt 3.1.2 bereits erwähnt, wird das Objektiv in zweifacher Weise benutzt: einmal für die Beleuchtung der Probe und ebenso zum Sammeln des Lichts von der Probe. Daher wird die Qualität der Apparatur maßgeblich von der Güte des Objektivs bestimmt. Von der Industrie wird ein großer Entwicklungsaufwand betrieben, um Objektive mit immer geringeren optischen Aberrationen zu erschaffen. Die kritischsten Abbildungsfehler sind die sphärische sowie die axiale und laterale chromatische Aberration, Koma, Bildfeldwölbung





**Abbildung 3.4:** Schematische Darstellung zweier Objektivtypen im Querschnitt. Die Bauform eines Achromaten kann wesentlich kompakter sein als hier gezeigt. Die zugrunde liegende Abbildung stammt aus Ref. [Spr98].

und Astigmatismus. Nicht allen dieser Aberrationen kann auf einfache Art und Weise begegnet werden. Eine ausführlichere Beschreibung dieser Problematik wird z.B. in [Zan02] gegeben. Gegenüber einer herkömmlichen Linse bietet ein so genannter Achromat die erste deutliche Verbesserung hinsichtlich des Farbfehlers. Dieser besteht aus zwei gleichgroßen Linsen, deren Gläser zwei unterschiedliche Abbesche Zahlen

$$V = \frac{n_D - 1}{n_F - n_C}$$

aufweisen, wobei  $n_D$ ,  $n_F$  und  $n_C$  den Brechzahlen des jeweiligen Materials bei den Wellenlängen der D-, F-, und C-Fraunhoferlinien (589,2 nm, 486,1 nm und 656,3 nm) entsprechen. Im Allgemeinen wird eine konvexe Linse aus Kronglas und eine konkave Linse aus Flintglas verwendet. An ihrer Kontaktfläche können die Linsen entweder verkittet sein, oder einen dünnen Luftspalt bilden, der im Idealfall als zusätzliche Luftlinse zur Korrektur weiterer optischer Aberrationen genutzt wird. Einem achromatischen Linsensystem gelingt die Beseitigung der chromatischen Aberration in zwei Farben. Der verbleibende Farbfehler wird sekundäres Spektrum genannt. Dieses kann durch Einbringen eines dritten Linsenmaterials ebenfalls eliminiert werden. Eine solche Linsenkonstruktion, die alle Lichtfarben in einen gemeinsamen Punkt fokussiert, wird apochromatisch genannt. Zur Anschauung sind in der Abbildung 3.4 beide Objektivtypen in ihrem prinzipiellen Aufbau gegenübergestellt. Im Apochromaten werden Gläser mit außergewöhnlichen Eigenschaften, wie Langkronglas (Fluorkronglas und Kalziumfluorid) und spezielles Kurzflintglas, verwendet.

Für die Nutzung der konfokalen Mikroskopie als Nachweismethode für die Fluoreszenz einzelner Moleküle steht neben dem hohen Anspruch geringer optischer Aberrationen noch eine weitere Anforderung an das Objektiv an oberster Stelle. Die Emission eines einzelnen Moleküls besitzt im Allgemeinen keine Vorzugsrichtung, so dass in alle drei Raumrichtungen gleichermaßen abgestrahlt wird. Da die Anzahl emittierter Photonen eines einzelnen Chromophors im Vergleich zu einem Ensemble aus üblicherweise größenordnungsmäßig  $10^{17} - 10^{19}$  Molekülen pro Küvette ohnehin relativ geringfügig ist, wird von dem Objektiv verlangt, einen möglichst großen Raumwinkelbereich abzudecken. Wie

### 3 Experiment

bereits in der Einleitung erwähnt, stellt sich daraus an das Objektiv die Maßgabe einer möglichst großen numerischen Apertur. Bei einem Öffnungswinkel von  $\varphi \simeq 70^\circ$  wird das optische Limit erreicht. Für Anwendungen bei Raumtemperatur kann mit Hilfe von Immersionsöl daraus eine numerische Apertur von  $NA = 1,45$  realisiert werden. Wie bereits eingangs erwähnt wurde, wird in Verbindung mit Spezialdeckgläschen und einem speziell darauf korrigierten Objektiv sogar eine  $NA$  von 1,65 erreicht. Für unseren Raumtemperaturaufbau wurde das Objektiv mit dem besten Preis/Leistungsverhältnis gewählt (Olympus PLAPO60XO3). Seine numerische Apertur liegt bei  $NA = 1,40$ . Der genaue Aufbau des Objektivs unterliegt einem strengen Firmengeheimnis. Jedoch weiß man, dass mehr als 15 Einzellinsen verbaut sind, wobei diverse Zwischenräume gekittet sind. Die Abbildungseigenschaften dieses Planapochromats erfüllen die höchsten Ansprüche, so dass beim Messen der Fluoreszenz von einzelnen Molekülen bei Raumtemperatur keinerlei optische Aberrationen hinsichtlich des Objektivs ins Gewicht fallen. Insbesondere gibt es keine mit unseren Mitteln messbare chromatische Aberration. Zusammengefasst begünstigen sowohl die große numerische Apertur als auch die geringen optischen Aberrationen das Einzelmolekül-Experiment. Jedoch kann dieses Objektiv nur bei Raumtemperatur und mit Immersionsöl benutzt werden. Bei tiefen Temperaturen sind Objektive aus verschiedenen Materialien starken mechanischen Spannungen ausgesetzt. Nach unseren Erfahrungen übersteht ein gekitteter Achromat nicht einmal einen Kältezyklus. Ein herkömmlicher Apochromat kommt demzufolge nicht in Betracht und eine Einzelanfertigung ohne Garantie, dass die Konstruktion auch nur einen Kältezyklus verträgt, ist preislich unerschwinglich. Ein unverkitteter Achromat vom Hersteller Microthek hat sich im Experiment bei tiefer Temperatur bewährt. Das Objektiv ist plan- und auf unendlich korrigiert und hat eine 60-fache Vergrößerung. Die Konstruktion dieses preiswerten Objektivs hält erstaunlicherweise mehr als 50 Kaltzyklen durch, ohne dabei in der Qualität beeinträchtigt zu werden. Auch die numerische Apertur liegt mit  $NA = 0,85$  nahe dem erreichbaren Maximum von  $NA = 0,95$  für Luftobjektive. Da der Brechungsindex von suprafluiden Helium (He-II) in der Nähe von  $n \simeq 1$  liegt, ist dieser Wert für Experimente im He-II relevant. Dennoch sind die optischen Eigenschaften dieses Achromaten im Vergleich zu denen des verwendeten Raumtemperaturobjektivs eingeschränkt. Um die optischen Aberrationen möglichst gering zu halten, nutzt man möglichst Probenabschnitte, die sich nahe der optischen Achse befinden. Die gesamte sichtbare Fläche in der Probenebene beläuft sich auf ca.  $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ . Im Experiment bei tiefen Temperaturen wird jedoch effektiv nur eine Fläche in der Mitte von insgesamt maximal  $150 \times 150 \mu\text{m}^2$  ausgeschöpft, wobei diese in kleineren Teilbereichen abgearbeitet wird.

#### 3.1.6 Badkryostat und Pumpensystem

Zur Messung von Proben bei tiefer Temperatur wurde ein vorhandener Helium-Badkryostat restauriert und modifiziert. In Abbildung 3.5 kann sein Aufbau betrachtet werden. Der Probenraum umfasst ca. sieben Liter und hat eine Länge von ca. einem Meter. Der

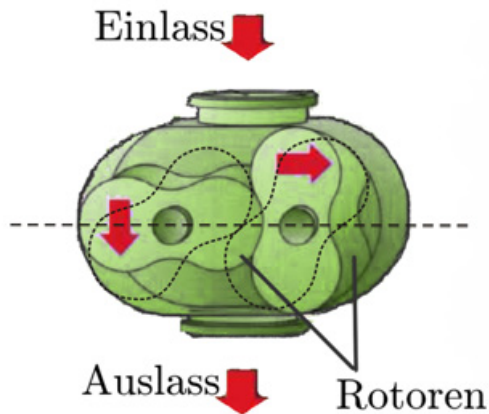


### 3.1 Aufbau des konfokalen Spektrometers



**Abbildung 3.5:** Photographische Darstellung der einzelnen Elemente des verwendeten Helium-Badkryostaten in zerlegtem Zustand. An den Rumpfteilen erkennt man einige der mit Indium gedichteten Quarzglasfenster. Der Rumpfbereich wird durch einen kupfernen Strahlungsschild, der eine gute Wärmeanpassung an das Stickstoffreservoir besitzt, weitgehend vor Wärmeeinträgen geschützt. Im oberen Bereich befinden sich ebenfalls Strahlungsschilde aus Kupfer, die an den Stickstofftank angeschlossen, damit die Innenraumwände möglichst keiner Fläche mit Raumtemperatur zugeneigt sind.

optische Zugang zur Probe wird von vier Quarzglasfenstern am Rumpf ermöglicht. Eine Röhre aus Epoxidharz-Glasfilament-Gewebe (HGW2375 Hesselmann) bildet die Mimik zur Halterung eines Umlenkspiegels und des Tieftemperatur-Objektivs im flüssigen Helium. Dieses steht senkrecht mit der Beobachtungsrichtung nach obenweisend. Auf diese Weise kann konzentrisch zur ersten Röhre der Probenstab eingeführt werden, um die Probe über dem Objektiv in das konfokale Volumen zu positionieren. Zur Feinjustage der Probenhöhe kann der Probenstab mit Hilfe einer Motorvorrichtung schrittweise gefahren werden. Das Kernstück dieser Vorrichtung besteht in einem Schiebepult der Firma Micos mit einem angeflanschten Faulhaber-Motor mit spielarmem Stirnradgetriebe und Inkrementscheibe als Impulsgeber. Dieser ermöglicht die Kontrollierbarkeit der tatsächlich mit dem Probenstab gefahrenen Wege. Zur Justage des Kryostaten im Strahlengang dient ein speziell angefertigter Manipulator, mit dessen Hilfe der gesamte Kryostat in  $x$ -,  $y$ - und  $z$ -Richtung verschoben und auch um die eigene Längsachse gedreht werden kann. Zum Messen wird der gesamte Innenraum des Kryostaten mit Helium geflutet. Die Befüllung erfolgt über einen zwei Meter langen, starren Heber mit zwei teleskopischen Enden. Da das siedende Helium ( $T = 4,21$  K) den optischen Weg zur Probe stark beeinträchtigt, kann nur in der suprafluiden Phase gemessen werden. Um den Lambdapunkt  $T_\lambda = 2,17$  K zu passieren, wird das gesamte Helium des Innenraums mit Hilfe eines zweistufigen Pumpensystems der Firma BOC Edwards expandiert. Den Vordruck liefert eine große Drehschieberpumpe (El/2M40). Für eine entscheidende Steigerung des Durchsatzes von bis zu  $225$  m<sup>3</sup> pro Stunde sorgt schließlich eine Roots-pumpe (EH250), deren Funktionsprinzip in der Abbildung 3.6 verdeutlicht wird. Um der Anregung von Eigenschwingungen des Gebäudes vorzubeugen, ist das gesamte System federnd in einer Raumecke gelagert. Der hohen Pumpleistung zu Folge wird der Lambdapunkt innerhalb von fünf Minuten unterschritten. Bis zu dem Zeitpunkt, an dem die Temperatur stabil bleibt, vergehen weitere ca. 10–15 Minuten. Die typische Messtemperatur liegt unterhalb von  $T = 1,45$  K. Gemäß der Dampfdruckkurve für <sup>4</sup>He beträgt der Druck im Kryostaten-



**Abbildung 3.6:** Schematische Darstellung der Funktionsweise einer Roots-pumpe. Zwei Rotoren drehen in entgegengesetzter Richtung zueinander in einem Stator. Während sich die Rotoren in der Mitte permanent tangieren, so dass im Betrieb zwischen ihnen kein wesentliches Gasvolumen eingeschlossen wird, löst sich nach einer viertel Umdrehung im Wechsel ein Rotor von der Wand des Stators unten ab, entlässt das zwischen Rotor und Stator eingeschlossene Gas und setzt oben wieder an, so dass ohne interne Kompression effektiv Gas vom Einlass zum Auslass befördert wird.

innenraum dann ca.  $p = 2$  mbar. Bei vollem Kryostaten stehen ca. vier Stunden Messzeit zur Verfügung. Beim Abpumpen bildet das Helium an der Kryostateninnenwand einen Meniskus. Die Gasatome werden durch die van der Waals Kraft von der Wand angezogen und erzeugen einen dünnen Film, dessen Schichtdicke von der Sauberkeit, insbesondere dem Wassergehalt, an den Wänden abhängt. Der Film kriecht bis zu einer Höhe, bei der die Temperatur der Sprungtemperatur für den Phasenübergang entspricht  $T = T_\lambda$ . Die tiefste erreichbare Temperatur wird durch das Filmkriechen bestimmt, so dass die Sauberkeit des Kryostateninneren für die Effektivität des Abpumpens ausschlaggebend ist.

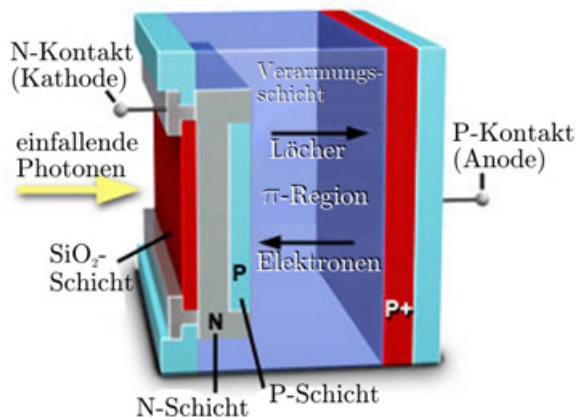
Innerhalb des Probenstabes in unmittelbarer Nähe zur Probe ist eine kalibrierte Siliziumdiode (Lakeshore DT-670-SD) als Temperatursensor montiert. Sie besitzt im Temperaturbereich von 1,4 – 10K eine Präzision von  $\pm 12$  mK. Auf der Strecke durch das flüssige Helium bilden vier induktionsfreie Phosphor-Bronze Drähte (Lakeshore *Quad-Lead Cryogenic Wire* QL-36) ihre Verbindung bis zum Außenraum. Zur Ansteuerung dient eine Temperatur-Steuereinheit (Lakeshore Model 332), die gleichsam mit einem ihrer Heizausgänge an einen Keramikwiderstand angeschlossen ist, der sich im unteren Bereich des Probenraums im flüssigem Helium befindet. Mit seiner Hilfe kann im Bedarfsfall Druck von Innen her aufgebaut werden. Dies ist immer dann erforderlich, wenn bei kaltem Kryostat ein vorhandener Unterdruck im Probenraum ausgeglichen werden soll. Üblicherweise kann während einer Messung nicht verhindert werden, dass die Heliumgasleitung einfriert und somit einige KF-Dichtungen in sehr geringem Maße Fremdgase durchlassen. Daher führt ein Druckausgleich mit Heliumgas durch die Leitung dazu, dass der Probenraum und insbesondere der Umlenkspiegel beschlagen. Auch die großen Flansche auf der Oberseite des Kryostaten werden üblicherweise mit O-Ring-Dichtungen aus Fluor-Kautschuk (Viton) abgedichtet. Somit entstehen auch hier sowohl beim Befüllen mit Helium als auch beim Abpumpen des Heliums undichte Stellen, wenn ein Einfrieren der Flansche nicht permanent durch kontrollierte Wärmezufuhr verhindert wird. Ein Eindringen von Fremdgasen an einem dieser Flansche führt unweigerlich dazu, dass die Messung abgebrochen werden muss. Um dieser Schwachstelle dauerhaft zu begegnen, wurde von mir eine neuar-

tige Indiumdichtung vorgeschlagen, die trotz der großen Abmessungen insbesondere bei tiefen Temperaturen den Kryostaten ausreichend abdichtet. Sie besteht aus einem Edelstahlring mit jeweils einer versetzten Einkerbung auf jeder Seite, in die ein Indiumdraht eingelassen wird. Diese Neuerung bewirkt, dass die Flansche an der Kryostatenoberseite auch bei völligem Einfrieren die Messung nicht gefährden und somit äußerst pflegeleicht sind.

#### 3.1.7 Die Lochblende

Ein weiteres Kernstück des konfokalen Mikroskops ist die Lochblende, englisch: *pinhole*. Wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben wurde, dient sie dazu, Streulicht und Fluoreszenzlicht von außerhalb des konfokalen Volumens abzublocken. Der entscheidende Kontrastvorteil gegenüber einem herkömmlichen Lichtmikroskop rührt hauptsächlich von der stark gesteigerten axialen Auflösung durch die Lochblende her. Je kleiner man die Lochblende wählt, desto geringer wird das Hintergrundrauschen. Allerdings wird gleichzeitig das Signal reduziert. Idealerweise wird die Lochblende in der Größe ausgesucht, die der vollen Halbwertsbreite des Airy-Beugungsmusters an der Stelle der Lochblende entspricht. Unter der Voraussetzung, dass ein kollimierter Anregungsstrahl mit Gaußschem Strahlprofil verwendet wird, sind die optischen Eigenschaften des Objektivs und der Linse vor der Lochblende maßgeblich. Die Vergrößerung der benutzen Objektive beträgt sowohl für den Raum- als auch den Tieftemperaturteil  $V = 60$ . Dabei wird von den Herstellern von einer Tubuslänge von 160 mm ausgegangen. Die vor der Lochblende positionierte Linse besitzt jedoch nur eine Fokusslänge von 60 mm. Daraus ergibt sich eine Vergrößerung von  $V = 22,5$  für das gesamte System. Bei Annahme einer Fokusgröße des Objektivs am Beugungslimit von ca.  $1 \mu\text{m}$  erhält man also an der Position der Lochblende eine ungefähre Größe der Airy-Scheibe von  $20 \mu\text{m}$ . Da jedoch bei kleinem Strahldurchmesser die numerische Apertur der Linse vor der Lochblende sehr klein wird, fällt ihr Beugungslimit stark ins Gewicht und die Rechnung muss korrigiert werden. Bei einem realistischen Strahldurchmesser von ca. 2 mm ergibt sich die numerische Apertur der Linse zu  $NA = 1/60$ . Im uns interessierenden Wellenlängenbereich der Fluoreszenz von ca.  $\lambda \simeq 700 \text{ nm}$  erhöht in Folge dessen die begrenzte Auflösung der Linse von  $r \simeq 26 \mu\text{m}$  den Durchmesser der Airy-Scheibe beträchtlich. In der Praxis hat sich für die Detektion einzelner Moleküle eine Lochblendengröße von ca.  $d_{\text{pinhole}} = 50 \mu\text{m}$  als am besten geeignet herausgestellt. Daraus resultiert ein konfokales Volumen von ungefähr einem Femtoliter. Um Streulicht zu minimieren wird eine schwarze Lochblende (OptoSigma) verwendet. Zur Feinjustage seiner Position dient ein hochpräziser xy-Manipulator, dessen Stellschrauben eine Genauigkeit von 100 nm erlauben.

### 3 Experiment



**Abbildung 3.7:** Schematische Darstellung einer *Avalanche-Photodiode* für nahes Infrarot (*reach-through type*). Die positive Hochspannung liegt an der N-Schicht an, so dass die elektrischen Feldlinien in Richtung der Anode weisen. Beim Einfall von Photonen werden in der  $\pi$ -Region Elektron-Loch-Paare generiert. Bei genügend starker Beschleunigung entstehen durch Stoßionisation weitere Paare. Die zugrunde liegende Abbildung stammt aus Ref. [Spr00a].

#### 3.1.8 Optisches Filtersystem

Die rückgestreute Laserintensität wird durch den dichroitischen Strahlteiler nicht vollständig abgeschnitten (AHF z680rdc für  $\lambda_{\text{Laser}} \simeq 680$  bzw. z633rdc für  $\lambda_{\text{Laser}} \simeq 640$ ). Daher ist eine zusätzliche Filterung notwendig. Zu diesem Zweck steht ein Kantenfilter (AHF Langpass HQ695LP für  $\lambda_{\text{Laser}} \simeq 680$  bzw. HQ645LP für  $\lambda_{\text{Laser}} \simeq 640$  jeweils mit  $OD = 6$ ) im Detektionskanal. Zur Aufnahme von Spektren mit der CCD-Kamera trennt der vorgeschaltete Spektrograph die Laserrückstreuung ohnehin von dem interessierenden Wellenlängenbereich der Fluoreszenz ab. Jedoch verhindert der Kantenfilter die Sättigung und starke Überstrahlung der betroffenen Pixel, die sich andernfalls über viele Pixel fortpflanzt und letztlich die Nutzbarkeit des gesamten CCD-Chips unterbindet. Im Gegensatz dazu zählt die Avalanche Photodiode (APD) die ankommenden Photonen ohne zu selektieren, so dass zwischen Laserrückstreuung und Fluoreszenzsignal nicht unterschieden werden kann. Demzufolge ist zur Lokalisierung der einzelnen Moleküle unerlässlich, dass Streulicht vom Laser möglichst vollständig abgeblockt wird. Hierfür befindet sich noch ein Kantenfilter (Alphafilter  $OD = 4$ ) im Strahlengang vor der APD. Zur weiteren Kontraststeigerung kann noch ein dritter Kantenfilter (AHF Bandpass HQ750/100  $OD = 6$ ) hinzugefügt werden, um insbesondere zurückgestreute langwellige Lumineszenz der Laserdiode abzublocken. Beim Wechsel des Bereichs der Anregungswellenlänge wird auch der gesamte Filtersatz inklusive dem dichroitischen Strahlteiler gewechselt.

#### 3.1.9 Lawinenphotodiode und Spektrometer mit CCD-Kamera

Zum Nachweis von Fluoreszenz-Photonen existiert eine ganze Reihe an verschiedenen Detektortypen. Hier wird kurz geschildert, welche Ansprüche an einen Detektor für ein Einzel-Molekül-Experiment gestellt werden. Des Weiteren wird ein knapper Einblick in das Funktionsprinzip der verwendeten Detektoren gewährt. Da einzelne, fluoreszierende Moleküle nur eine sehr begrenzte Anzahl an Photonen pro Sekunde emittieren können, ist eine hohe Quanteneffizienz des Detektors grundlegend erforderlich. Dazu ist ebenso

wichtig, dass er nur ein sehr geringes Dunkelrauschen aufweist. Generell kommen als Detektoren zwei verschiedene Systeme in Betracht: zum einen die *Photo Multiplier Tube* (PMT) und zum anderen die Lawinenphotodiode oder auch *Avalanche photodiode* (APD). Als Flächendetektor eignet sich ein *Charge Coupled Device* (CCD). Alle drei Detektoren können vom nahen Ultraviolett bis zum nahen Infrarot eingesetzt werden. Jedoch liegt die Quantenausbeute der PMT insbesondere im roten bis infraroten Spektralbereich nur bei ca. 20 %. Dafür besitzt die PMT ein äußerst geringes Dunkelrauschen und zudem eine sehr kurze Reaktionszeit, so dass sie im blauen Spektralbereich mit einer Quanteneffizienz von bis zu ca. 40 % durchaus zum Nachweis einzelner Moleküle bestens geeignet ist. Gleichwohl übertreffen die APD und auch die CCD im uns interessierenden, roten Spektralbereich die PMT deutlich in der Quantenausbeute bei ebenfalls adäquatem Dunkelrauschen. Daher werden in unserem Aufbau eine APD (PerkinElmer SPCM-AQR-15) und eine CCD (Princeton Instruments Spec10:100BR (*back-illuminated, deep depletion*)) als Nachweisinstrumente betrieben. Die Werte für die Quanteneffizienz betragen bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 700$  nm bei der verwendeten APD ca. 65 % und bei der verwendeten CCD ca. 85 %. Zur Veranschaulichung der prinzipiellen Funktionsweise einer APD dient die Abbildung 3.7. Bei Lichteinfall werden Elektron-Loch-Paare erzeugt, vorausgesetzt, dass die eingestrahlte Energie ausreicht, damit die Bandlücke im Halbleiter überwunden werden kann. Diese beträgt bei Raumtemperatur bei Silizium 1,12 eV, so dass Licht mit geringerer Wellenlänge als  $\lambda = 1100$  nm absorbiert wird. Über der Verarmungsschicht liegt eine Hochspannung in Sperrrichtung an. Demzufolge werden die Elektronen in Richtung der N-Schicht mit positivem Potential beschleunigt und die Löcher entgegengesetzt in Richtung der P-Schicht. Ab einer gewissen Feldstärke werden Kollisionen mit dem Kristallgitter immer wahrscheinlicher, so dass sich eine mittlere Driftgeschwindigkeit einstellt. Bei weiterem Anstieg der Feldstärke besitzen einige Ladungsträger, die noch nicht mit dem Gitter kollidiert sind, genügend hohe Energie, um über Stoßionisation weitere Elektron-Loch-Paare zu bilden. Diese wiederum bekommen teilweise ebenfalls eine ausreichend hohe Energie übertragen, so dass sie nicht rekombinieren können. Die Anzahl an Ladungsträgern im Leitungsband steigt somit exponentiell an. Der bei dieser Feldstärke auftretende Effekt wird Lawinen- oder *Avalanche*-Durchbruch genannt. Wie bei allen Verstärkungsprozessen entsteht auch beim *Avalanche*-Effekt ein Hintergrundrauschen. Der durch thermisches Rauschen fließende Dunkelstrom in Verbindung mit dem statistischen Schrotrauschen generiert in der Summe bei der verwendeten APD insgesamt ein Dunkelrauschen von weniger als 27 Zählereignissen pro Sekunde.

Im nun folgenden Abschnitt wird kurz auf die CCD-Kamera und den ihr vorgeschalteten Spektrograph eingegangen. Die ursprüngliche Idee bei der Entwicklung des ersten CCD in den späten 1960er Jahren war, eine neue Art von Speicherbaustein für Computer zu erhalten. Später erkannte man, dass er aufgrund seiner Fähigkeit Ladungen zu übertragen und seiner photoelektrischen Wechselwirkung mit Licht, eher für die Signalverarbeitung und Bildgebung geeignet ist. Ein CCD besteht aus einer dichten Matrix aus Photodioden, den so genannten Pixeln, die eine integrierte Schaltung bilden. Als Basismaterial dient Silizium. Bei Lichteinfall wird durch den inneren photoelektrischen Effekt die Pho-

### 3 Experiment

tonenenergie in elektrische Ladungstrennung umgewandelt. Dabei werden die Elektronen in einem Potentialwall, in einer tief im Silizium gelegenen Verarmungsschicht, gespeichert. Nach der Belichtung werden die Elektronen schrittweise über den Chip durch ein Register geschoben. Auf diese Weise erreicht ein Ladungspaket nach dem anderen den Ausleseverstärker und es entsteht aus dem ursprünglich parallel aufgenommenen Bild ein seriellles Ausgangssignal. Die ausgegebene Spannung ist proportional zur eingefangenen Lichtmenge des jeweiligen Pixels. Die in unserem Aufbau verwendete CCD-Kamera weist gegenüber einer herkömmlichen CCD-Kamera allerdings einige Besonderheiten auf. Zum einen wird der CCD-Chip mit flüssigem Stickstoff gekühlt, wobei die Chip-Temperatur durch Gegenheizen auf ca.  $-120^{\circ}\text{C}$  gehalten wird. Dadurch wird das Dunkelrauschen minimiert. Zum anderen wird der Chip von der äußerst lichtempfindlichen Rückseite her beleuchtet, wodurch eine insgesamt deutlich gesteigerte Quanteneffizienz erreicht wird, wobei sich der Effekt insbesondere im blauen Spektralbereich stark auswirkt. Zusätzlich dazu besitzt der Chip eine besonders tiefe Verarmungsschicht, so dass sich in der Kombination die Quantenausbeute auch in dem uns interessierenden, roten Spektralbereich drastisch erhöht. Die nutzbare Fläche des CCD-Chips beinhaltet  $1340 \times 100$  Pixel. In Verbindung mit der selbst geschriebenen Steuerungssoftware liegt der Wert der typischen Auslesezeit für die durchgeführten Messungen zwischen  $0,1 - 0,2$  s. Demzufolge beträgt z.B. die Messzeit einer Sequenz aus 100 Spektren mit je 1 s Akkumulationszeit ca. 112 s. Die gesamte CCD-Kamera mit ihrem Stickstofftank ist fest an einen Gitterspektrographen (Princeton Instruments Acton300i) montiert. In diesem befindet sich ein Drehkreuz für bis zu drei Gitter, deren Ausleuchtung über zwei große Parabolspiegel bewerkstelligt wird. Die Brennweite beträgt 300 mm. In unserem Spektrometer werden bislang zwei verschiedene Gitter verwendet: eins mit 300 Linien/mm und eins mit 1200 Linien/mm, beide mit einer *blaze*-Wellenlänge<sup>2</sup> von 750 nm. Die *blaze*-Wellenlänge ist so gewählt, dass der Reflexionsgrad dieser Gitter auf den uns interessierenden Spektralbereich optimiert ist, so dass die aufgenommenen Spektren so wenig wie möglich verfälscht sind. Beim 300er-Gitter reicht der Wert der Reflektivität für s-polarisiertes Licht von 92 % bei 700 nm bis 86 % bei 800 nm und für p-polarisiertes Licht von 83 % bei 700 nm bis 75 % bei 800 nm. Bei Verwendung dieses Gitters entspricht ein CCD-Pixel 0,206 nm. Das 1200er-Gitter besitzt für Licht beider Polarisationsrichtungen bei 700 nm eine Reflektivität von ca. 80 %. Zu größeren Wellenlängen hin driften die beiden Werte jedoch etwas auseinander. Die Auflösung beträgt mit diesem Gitter 0,041 nm pro Pixel. Vor dem Eintrittsspalt des Spektrographen ist eine Linse positioniert. Bei optimaler Justage wird die Fluoreszenz der Probe, die die Lochblende passiert, genau so auf den Eintrittsspalt fokussiert, dass bei der Gitterstellung der nullten Ordnung weniger als  $5 \times 5$  Pixel belichtet werden. Der Großteil des Lichts verteilt sich dabei auf eine Fläche, die kleiner als  $3 \times 3$  Pixel ist.

---

<sup>2</sup>Die Gitter-Rillen eines *blaze*-Gitters bilden eine Stufenstruktur. Der *blaze*-Winkel ist der Winkel zwischen der Gitternormalen und der Stufennormalen. Durch die Form der Gitterelemente ist das Gitter auf die Beugung einer bestimmten Kombination von Wellenlänge (*blaze*-Wellenlänge) und Beugungsordnung optimiert.

### 3.1.10 Detektionseffizienz

Die Detektionseffizienz der Apparatur hängt von sehr vielen Faktoren ab und kann nicht präzise berechnet werden. Für den Fall einer isotrop emittierenden Punktlichtquelle kann sie zumindest abgeschätzt werden. Einen erheblichen Einfluss nimmt die numerische Apertur des Objektivs. Bei einem Wert von  $NA = 0,85$  und dem zugehörigen Öffnungswinkel von ca.  $60^\circ$  entspricht die Lichtausbeute  $S_{\text{Obj}}$  auf den vollen Raumwinkel bezogen ca. 25 %. Ferner führen sämtliche optische Komponenten zu weiteren Verlusten der Fluoreszenz. Das Tieftemperatur-Objektiv lässt ca.  $T_{\text{Obj}} \simeq 65\%$  des Fluoreszenzlichts im Spektralbereich von 700 – 750 nm durch. Der dichroitische Strahlteiler sowie der Kantenfilter im Strahlengang vor dem Spektrometer transmittieren ca.  $T_{\text{Dichro}} \simeq T_{\text{Filt}} \simeq 95\%$ . Alle Glasflächen im Strahlengang weisen eine spezielle Antireflexions-Beschichtung (Linos NIR ARB2) für nahes Infrarot auf. Daher werden pro Fläche nur maximal 0,5 % des Signals reflektiert, d.h. bei den beschichteten Linsen liegt der Transmissionswert bei mindestens  $T_{\text{Linse}} \geq 99\%$  bzw.  $T_{\text{Tele}} \geq 98\%$  und bei den beschichteten Quarzglasfenstern des Kryostaten bei  $T_{\text{Kryo}} \geq 98\%$ . Demgegenüber reflektieren die verwendeten Silberspiegel in dem Spektralbereich alle um die  $\sim 98\%$ , d.h.  $R_{\text{Kryo}} \simeq 98\%$  und  $R_{\text{Scan}} \simeq 96\%$ . Schließlich lässt die Lochblende von dem Beugungsmuster nur die Airy-Scheibe passieren, die ca.  $T_{\text{Pin}} \simeq 80\%$  der Intensität beinhaltet. Die Quanteneffizienz der CCD-Kamera liegt bei  $QE_{\text{CCD}} \simeq 85\%$ , wobei noch der Reflexionsgrad  $T_{\text{Spektr}}_{\text{Spektro}}$  des Spektrographen von 80 – 92 % je nach Gitterauswahl berücksichtigt werden muss. Insgesamt ergibt sich daraus theoretisch für die Detektionseffizienz des konfokalen Mikroskops bei tiefer Temperatur als Abschätzung

$$\begin{aligned}
 DE_{\text{gesamt}} &\simeq S_{\text{Obj}} \cdot T_{\text{Obj}} \cdot R_{\text{Kryo}} \cdot T_{\text{Kryo}} \cdot T_{\text{Tele}} \cdot R_{\text{Scan}} \cdot T_{\text{Dichro}} \\
 &\quad \cdot T_{\text{Linse}} \cdot T_{\text{Pin}} \cdot T_{\text{Linse}} \cdot T_{\text{Filt}} \cdot T_{\text{Linse}} \cdot R_{\text{Spektr}}_{\text{Spektro}} \cdot QE_{\text{CCD}} \\
 &\simeq 0,25 \cdot 0,65 \cdot 0,98 \cdot 0,98 \cdot 0,98 \cdot 0,96 \cdot 0,95 \\
 &\quad \cdot 0,99 \cdot 0,80 \cdot 0,99 \cdot 0,95 \cdot 0,99 \cdot 0,80 \cdot 0,85 \\
 &\simeq 0,07.
 \end{aligned} \tag{3.1}$$

Die Abstrahlcharakteristik eines Dipols ist jedoch in der Regel anisotrop. Demzufolge beeinflusst seine Orientierung stark, wie viel des emittierten Lichts vom Objektiv eingesammelt wird. Darüber hinaus kann sich auch die Umgebung auf die Abstrahlcharakteristik des Dipols auswirken. Die Ausbreitung in Richtung optischer Medien mit höherem Brechungsindex ist begünstigt. So beträgt z.B. der Anteil der abgestrahlten Leistung bei einer Immobilisierung des emittierenden Moleküls auf Quarzglas ca. 70 % [Luk79]. In unserem Fall wird die Quanteneffizienz durch diesen Effekt gesteigert. Die reale Quanteneffizienz kann jedoch auch durch Faktoren, wie z.B. Staub auf den optischen Komponenten, verringert werden. Daher wird als vernünftige Abschätzung der experimentellen Quanteneffizienz ein Wert von  $DE_{\text{gesamt}} \simeq 5\%$  angenommen.



#### 3.1.11 Computergestützte Datenakquisition

Der gesamte Messvorgang wird von einem Linux-Rechner aus gesteuert. Die verwendete Software besteht aus einem auf C basierenden Interpreter (FSC2) [Tör07], in den die Treiber der einzelnen Komponenten implementiert sind. Die Programme zur Bedienung des gesamten Experiments und zur Datenakquisition wurden von mir erstellt. Wie bereits in Abschnitt 3.1.4 beschrieben, werden die Galvano-Spiegeldreher über eine Digital-Analog-Wandler-Karte (Meilhaus ME-6000) angesteuert. Dieselbe Karte kontrolliert außerdem den klappbaren Spiegel vor der APD und die Frequenzverstimmung der verwendeten Laser, sowie die Fahrimpulse für die Dreheinrichtung, von der ein Polarisator vor dem Schlitz des Spektrographen gedreht werden kann. Die TTL-Zählimpulse der APD werden von einer *Counter*-Karte (National Instruments 6601 GPCT) gezählt. Zur Datenübertragung von Spektren besitzt die CCD-Kamera ein eigenes Steuergerät, das mit einer zugehörigen Karte im Rechner verbunden ist.

## 3.2 Präparation der Proben

### 3.2.1 Einführung

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurden einzelne Moleküle dadurch selektiert, dass sie mit Hilfe des aufgebauten konfokalen Mikroskops räumlich von einander getrennt detektiert wurden. Hierfür ist eine sehr starke Verdünnung der Probe notwendig. Gemäß der Auflösung der Apparatur, die im Abschnitt 2.3.3 ausführlich behandelt wird, ist ein Mindestabstand der einzelnen Moleküle von 10 – 20  $\mu\text{m}$  erforderlich, damit die Detektion von immer nur einem Molekül zur Zeit sichergestellt ist. Zur Realisierung des Experiments muss die Probenebene optisch zugänglich im konfokalen Volumen positioniert werden. Dazu wurden verschiedene Verfahren und zugehörige Probenhalter entwickelt. In den folgenden Abschnitten werden Details über die Auswahl an PS I-Proben und die verschiedenen Präparationsprozeduren mit den dafür eigens konstruierten Probenhaltern ausgeführt.

### 3.2.2 Photosystem I-Proben

Zur Untersuchung standen PS I-Komplexe verschiedener Cyanobakterien zur Verfügung. Eine wichtige Quelle stellt die thermophile Spezies *T. elongatus* dar. Die Isolierung von stabilen PS I-Komplexen dieser Spezies wurde mit Hilfe von stereochemisch reiner  $\beta$ -Dodecylmaltoside in der Arbeitsgruppe von Eberhard Schlodder durchgeführt. Eine ausführliche Beschreibung dieser Präparation liefert Ref. [Fro98]. Das Verfahren bringt isolierte PS I-Partikel von sowohl trimerer Form als auch eine kleine Fraktion Monomere hervor, die ebenfalls untersucht wurden. Des Weiteren wurden ebenfalls von Eberhard

Schlodder PS I-Trimere der mesophilen Spezies *Synechocystis* sp. PCC 6803 bezogen. Das PS I dieses Organismus ist mit dem von *T. elongatus* hochgradig sequenzhomolog [Nak02]. PS I-Komplexe einer dritten, weniger bekannten Spezies, *Synechococcus* sp. PCC 7002, stammen aus der Kooperation mit der Arbeitsgruppe von John Golbeck. Hier lag ein beinahe kompletter Satz von Mutanten vor, bei denen jeweils eine Proteinuntereinheit fehlte. Im Bestand befanden sich PS I-PsaC, -PsaE, -PsaF, -PsaI, -PsaJ, -PsaK, -PsaL und -PsaM. Die typische Chlorophyll a-Konzentration der Stammlösungen lag im millimolaren Bereich.

### 3.2.3 Lösungsmittel zur Verdünnung der Probe

Um einzelne Moleküle selektieren zu können, ist eine starke Verdünnung der Proben-Stammlösung erforderlich, wie bereits einführend erwähnt. Die Standard-Lösung dafür enthielt Tricine (20 mM) als Puffersubstanz, wobei ein pH-Wert von 7,5 eingestellt wurde. Zudem benötigen Proteine eine gewisse Ionenstärke, um nicht zu aggregieren. Dem Puffer wurde Magnesiumdichlorid (25 mM) als Salz hinzugefügt. Eine ebenfalls sehr wichtige Komponente für die Stabilität und Isolierung der einzelnen PS I-Komplexe ist ihre Detergenzhülle [Muh05]. Hierfür wurde das Detergenz n-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltoside (0,4 mM) beigefügt. Außerdem enthielt der Puffer noch Natrium-Ascorbat zur Vorreduktion von P700. Die Verdünnung der millimolaren PS I-Stammlösung erfolgte in mehreren Stufen und führte zu einer Endkonzentration im Bereich von 20 pM PS I (in monomerer Form). Zur Präparation von teildeutierten Proben wurde jeder einzelne Verdünnungsschritt mit einem Puffer ausgeführt, in dem statt Wasser schweres Wasser verwendet wurde. Die Probe wurde für ca. 15 Minuten inkubiert. Bei bestimmten Proben wurde je nach gewünschter Konsistenz der Lösung im letzten Schritt alternativ Polyvinylalkohol (1 % (w/v)), Glycerin (60 % (v/v)) oder Gelatine (6 – 7 % (w/v)) dem Puffer beigemischt. Über die verschiedenen Anordnungen der Probe wird im folgenden Abschnitt berichtet.

### 3.2.4 Anordnung der Probe

Die Standard-Methode der Probenpräparation besteht darin, eine geringe Menge Probe ( $< 1 \mu\text{l}$ ) zwischen zwei Deckgläschen zu platzieren. Dafür wurden runde Gläschen mit einem Durchmesser von  $\varnothing = 5 \text{ mm}$  und einer Dicke  $< 0,2 \text{ mm}$  verwendet. Gewöhnliches Schichtsilikatglas erwies sich insbesondere für Messungen bei tiefer Temperatur aufgrund starker Streueffekte als ungeeignet. Daher wurden spezielle Gläschen aus Suprasil-Quarzglas [Min06] angefertigt. Auf der linken Seite der Abbildung 3.8 ist der Probenhalter abgelichtet, der zur Aufnahme der Gläschen dient. Dieser Probenhalter kann darüber hinaus auch in einen eigens dafür gebauten Rotationsbeschichter (*spin coater*) geschraubt werden. Bei einer Probe mit einem Anteil von 1 % Polyvinylalkohol können auf diese Weise dünne Filme produziert werden. Direkt nach Auftragung der Probe wurde der

### 3 Experiment



**Abbildung 3.8:** Photographische Darstellung zweier verwendeter Probenhalter. **Links oben:** Standard-Probenhalter für Dünnschichtproben zwischen zwei Deckgläschen. Das untere Gläschen wird mit Vakuum-Silikonfett befestigt, während das obere von der Probenflüssigkeit selbst gehalten wird. Bei einer mittels Rotationsbeschichter hergestellten Filmprobe befindet sich diese auf der Oberseite und wird nicht durch ein zweites Deckgläschen abgedeckt. **Rechts oben:** Probenhalter zum Gelpressen in vertikaler Richtung. Bei aufgeschraubtem Deckel wird das Gel zwischen zwei Deckgläschen von einem Vierkant von unten her aufeinandergepresst. Man beachte die Luftauslässe am Deckel. Der zweite Deckel mit seinen beiden Presswerkzeugen wird auf einen hier nicht abgebildeten Probenhalter geschraubt. Die beiden Presswerkzeuge werden zwischen zwei Deckgläschen mit dem Gel in ihrer Mitte mit Hilfe einer M1-Madenschraube von der Seite her aufeinandergedrückt, so dass das eingeschlossene Gel horizontal gequetscht wird. Auch hier sind Luftauslässe erforderlich.

Probenstab in den auf tiefe Temperaturen vorgekühlten Kryostaten eingeführt. Bei diesem Prozess wird die Probe schockgefroren.

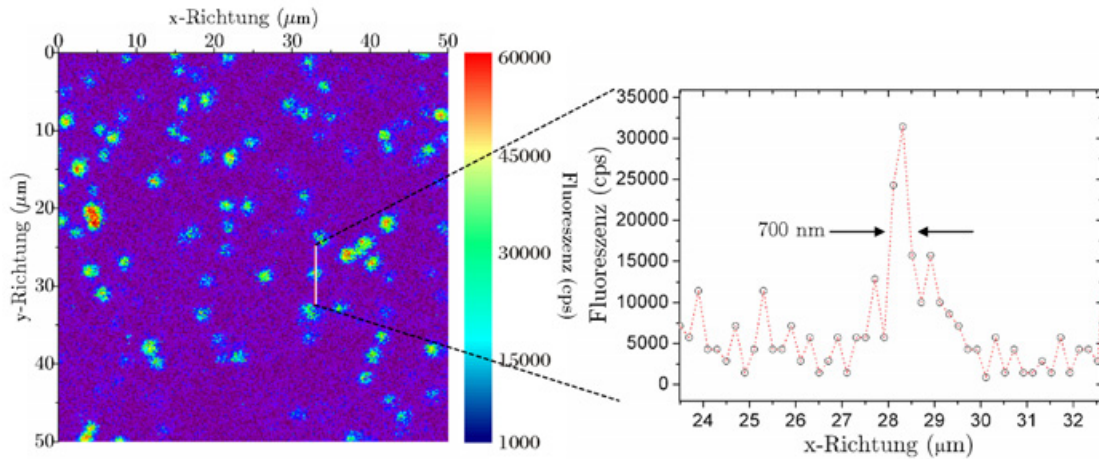
Bei einer weiteren Art der Präparation wird die Probe in einem gepressten Gel teilorientiert. Dazu wurden spezielle Titanprobenhalter konstruiert und gefertigt, die ebenfalls in der Abbildung 3.8 zu sehen sind. Die umfangreichen Messungen an teilorientierten PS I-Proben und deren Auswertungen werden in dieser Schrift nur kurz im Ausblick erwähnt, da ihre Berücksichtigung den Gesamtumfang der Arbeit zu sehr strecken würden.

## 3.3 Messbedingungen

Zur Spektroskopie einzelner Moleküle wird zunächst ein Rasterbild der Probe erstellt, um die Moleküle zu lokalisieren. Dann kann ein beliebiges Molekül selektiert werden, um seine Fluoreszenz gezielt zu untersuchen. In diesem Abschnitt wird kurz auf einige Details des Experiments eingegangen.

### 3.3.1 Experimentelle Auflösung bei tiefer Temperatur

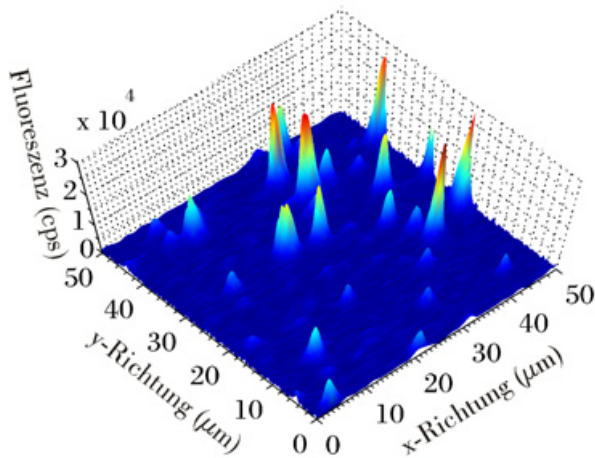
Die präzise Abrasterung der Probe mittels Spiegeldreher erfolgt in lateraler Richtung. In axialer Richtung kann die Probenschicht mit der im Abschnitt 3.1.6 beschriebenen Motorsteuerung schrittweise durch das konfokale Volumen bewegt werden. Aufgrund des Unterdrucks im Kryostaten und den Dichtungen am Probenstab treten jedoch zu große Kräfte auf, um mit der Motorvorrichtung präzise in axialer Richtung zu rastern, so dass die axiale Auflösung experimentell nicht bestimmt wurde. Folglich wird hier nur die laterale Auflösung der Apparatur ermittelt. Auf der linken Seite der Abbildung 3.9 ist dafür



**Abbildung 3.9:** Links: Digitales Rasterbild einzelner PS I-Trimere des Cyanobakteriums *Synechocystis*. Die Punkte hoher Intensität markieren die Positionen der Moleküle. Rechts: Profil des links eingezeichneten Schnitts entlang der y-Richtung. Anhand der Abbildungsgröße eines um Größenordnungen in der Ausdehnung geringeren Emitters als das Beugungslimit kann die Auflösung abgeschätzt werden. Das verhältnismäßig schwache Signal-zu-Rausch-Verhältnis entsteht durch die schnelle Rastergeschwindigkeit von 0,9 s pro Pixel.

ein Rasterbild einer hochverdünnten PS I-Probe vom Cyanobakterium *Synechocystis* dargestellt. Die Größe der abgerasterten Fläche beträgt  $50 \times 50 \mu\text{m}^2$  mit einer Auflösung von 150 Rasterschritten in beiden Richtungen. Jeder Punkt hoher Intensität zeigt die Position eines PS I-Partikels an. Dabei ist anzumerken, dass selbst wenn es sich bei dem Partikel um ein Aggregat handeln sollte, seine räumliche Ausdehnung dennoch Größenordnungen von der theoretisch erreichbaren Auflösung entfernt liegt und daher seine Emissionen für die Bestimmung der Auflösung geeignet sind. Im rechten Bild ist der links eingezeichnete Schnitt in y-Richtung durch einen Punkt dargestellt. Dem Profil wird eine Auflösung von  $\Delta x_{\text{exp}} \simeq 700 \text{ nm}$  (FWHM) entnommen. Diese laterale Punkt-Dimension erscheint im Vergleich zur Abschätzung der theoretisch möglichen Auflösung von  $\Delta x_{\text{theo}} \simeq 300 \text{ nm}$  für eine Wellenlänge von  $\lambda = 700 \text{ nm}$  (gemäß Gl. (2.39)) vernünftig, insbesondere unter Berücksichtigung der zusätzlichen Abbildungsfehler des Objektivs bei tiefen Temperaturen.  $\Delta x_{\text{exp}}$  hängt von der Fluoreszenzintensität ab. Diese Abhängigkeit fällt jedoch bei den im SMS-Experiment aufgetretenen Intensitäten nicht ins Gewicht. Das verhältnismäßig schwache Signal-zu-Rausch-Verhältnis beruht auf einer schnellen Rastergeschwindigkeit von 0,9 s pro Pixel. Die Wahl einer so kurzen Zeitspanne ist sinnvoll, damit zum einen so wenig Messzeit wie möglich auf die Lokalisierung der Moleküle verwendet wird und zum anderen damit die Lichtbelastung der Probe so gering wie möglich gehalten wird, um vorzeitigem Photobleichen vorzubeugen.

### 3 Experiment



**Abbildung 3.10:** Digitales Rasterbild. Die Aufnahme zeigt die Fluoreszenzintensität eines  $50 \times 50 \mu\text{m}^2$  großen Ausschnitts von einer dünnen Probenschicht, die einzelne PS I-Trimere vom Cyanobakterium *T. elongatus* enthält. Die Auflösung beträgt  $150 \times 150$  Pixel bei einer Akkumulationszeit von 0,9 s pro Pixel. Jedes Maximum markiert die Position eines individuellen PS I-Komplexes. Die Probenkonzentration lag bei ca. 20 pM PS I und die Schichtdicke des Anregungsvolumens wird auf  $\sim 4 \mu\text{m}$  abgeschätzt.

#### 3.3.2 Nachweis für die Detektion einzelner Moleküle

Als Voraussetzung für weitere Untersuchungen ist wichtig, dass die Punkte hoher Intensität von einzelnen Molekülen stammen und nicht alternativ von Molekülclustern. In Abbildung 3.10 wird ein Rasterbild einer Probe vom PS I der Spezies *T. elongatus* gezeigt. Die PS I-Konzentration liegt gemäß der Anleitung aus Abschnitt 3.2.3 bei ca.  $20/3 \text{ pM}^3$  PS I (in trimerer Form). Die abgerasterte Fläche umfasst  $50 \times 50 \mu\text{m}^2$  und die Schichtdicke des Anregungsvolumens wird gemäß Gl. 2.41 auf grob  $4 \mu\text{m}$  abgeschätzt, was einem Detektionsvolumen von  $10^4 \mu\text{m}^3$  entspricht. Das Produkt aus Probenkonzentration und abgerastertem Volumen beträgt demnach  $\sim 0,4 \cdot 10^{25} \cdot 10^{-12} \text{ l}^{-1} \cdot 10^{-11} \text{ l} = 40$ . Die Anzahl der sichtbaren Punkte hoher Intensität in Abbildung 3.10 liegt bei ca. 30 – 40. Diese qualitative Korrespondenz spricht für die Detektion einzelner PS I-Komplexe.

#### 3.3.3 Verwendete Anregungsleistung

Die übliche Anregungsleistung zur Beleuchtung von PS I-Komplexen in trimerer Form betrug vor dem telezentrischen System ca.  $100 \mu\text{W}$ . Daraus resultiert im Tieftemperatur-Aufbau eine Anregungsintensität von ca.  $3 \text{ kW} \cdot \text{cm}^{-2}$  im Fokuspunkt, was bei  $\lambda = 680 \text{ nm}$  als Anregungswellenlänge  $1,0 \cdot 10^{22} \text{ Photonen} (\text{cm}^2 \cdot \text{s})^{-1}$  entspricht. Dabei wurde die Verlustrate an den optischen Elementen bis zur Probenebene berücksichtigt (s. Abschnitt 3.1.10) und ein Fokusedurchmesser von  $1,5 \mu\text{m}$  angenommen. Um der Frage nachzugehen, wie viele Photonen unter diesen Bedingungen ein einzelner PS I-Komplex absorbiert, werden im Folgenden zwei verschiedene Abschätzungen gegeben: 1. über die Anregungsleistung und den Wirkungsquerschnitt und 2. über die detektierte Zählrate der Fluoreszenz.

<sup>3</sup>Es sei darauf hingewiesen, dass bei der Probe aus Abbildung 3.9 eine höhere Konzentration verwendet wurde.

1. Der Wirkungsquerschnitt für das PS I-200<sup>4</sup> bei Soret-Anregung (436 nm) wurde auf  $668 \text{ \AA}^2$  bestimmt [Zip91]. Wie im Abschnitt 1.2.1 erwähnt wurde, liegt das PS I von höheren Pflanzen im Gegensatz zum PS I von Cyanobakterien in monomere Form vor. Allgemein ist der Wirkungsquerschnitt proportional zur Absorption. Im Vergleich zur Soret-Bande absorbiert PS I im Bereich der  $Q_x$ - und  $Q_y$ -Bande schwächer. Zudem enthält ein cyanobakterieller PS I-Monomer nur ca. halb so viele Chlorophyll-Moleküle wie ein PS I-200-Partikel. Daraus wird die obere Grenze des Wirkungsquerschnitts eines cyanobakteriellen PS I-Monomers bei  $\lambda \simeq 680 \text{ nm}$  grob auf  $\sim 3 \text{ nm}^2$  abgeschätzt. Folglich ergibt sich ein Photonenfluss von  $\sim 3 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$ , der von einem einzelnen Monomer absorbiert wird. Für die Energie-Äquilibrierung von den Antennenpigmenten bis zu den roten Chlorophyllen benötigt das PS I von *Synechocystis* 2 – 5 ps [Has94, Has95, Tur96, Mel00, Sav00]<sup>5</sup> und das PS I von *T. elongatus* 8-15 ps [Tur93, Byr00], d.h. der Energietransfer bis zu den roten Zuständen erfolgt ca. 100 mal schneller als die Fluoreszenzlebensdauer eines Chl a ( $\sim 1,5 \text{ ns}$ ) [Byr00]. Bei der Annahme, dass sieben Chl a-Moleküle zu den roten Zuständen beitragen [Zaz02b], und unter Berücksichtigung, dass ca. 50 % der Anregungsenergie bei 5 K die roten Zustände erreichen [Pål98, Gob01a], liegt die Anregungsrate der roten Chlorophylle bei  $k_{\text{Anreg}} \simeq 2 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$  pro Chl a. Für den Fall, dass nur ein einziges Chl a die gesamte Anregung erhält, liegt der Wert bei  $k_{\text{Anreg}} \simeq 1,4 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$ .
2. Bei PS I-Trimeren und obiger Anregungsleistung wurden im Mittel ca.  $7,5 \cdot 10^4$  Photonen pro Sekunde<sup>6</sup> beobachtet. Unter der Annahme einer Detektionseffizienz von 5 % beträgt die reale Emissionsrate  $1,5 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$ , was einer mittleren Zeit von  $\tau_{\text{Emiss}} \simeq 6,7 \cdot 10^{-7} \text{ s}$  zwischen zwei Fluoreszenzphotonen entspricht. Entnimmt man nun Ref. [Pål98] für die Zerfallsrate des angeregten Zustands durch die photochemische Falle  $k_p \simeq (30 \text{ ps})^{-1}$  und für die Rate aller Verluste  $k_v \simeq (2 \text{ ns})^{-1}$ , woraus eine Quantenausbeute der Ladungstrennung von 98,5 % folgt, dann erhält man als obere Grenze der Fluoreszenzquantenausbeute bei Raumtemperatur  $\Phi_{\text{RT}} \leq 1,5 \text{ \%}$ . Die Größe der Verluste durch strahlungslose Kanäle ist unbekannt. Für die weitere Betrachtung wird ein Anteil von 50 % angenommen. Bei 5 K wurde experimentell eine Erhöhung der Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi_{\text{TT}}$  um Faktor 20 für PS I mit offenem Reaktionszentrum (RC) und um Faktor zehn für PS I mit geschlossenem RC<sup>7</sup> ermittelt [Byr00]. In unserem Fall liegt die Anregungsrate viel höher als die Rekombinationsrate des Phylloquinon-Akzeptors  $A_1^-$ . Demzufolge hält sich das Elektron die meiste Zeit beim Akzeptor  $A_1$  auf, d.h. wir haben geschlossenes PS I gemessen. Daraus kann grob ein Wert von  $\Phi_{\text{TT}} \simeq 8 \text{ \%}$  abgeschätzt werden, und man erhält für

<sup>4</sup>Präparation, bei der PS I mittels Detergenz isoliert wurde (gemäß Ref. [Mul80]) und ca. 200 Chl a+b/P700 enthält.

<sup>5</sup>Bei tiefer Temperatur (77 K) wurden geringfügig längere Zeiten ermittelt [Mel01b].

<sup>6</sup>Entspricht der über ein Spektrum ( $t = 1 \text{ s}$ ) integrierten Intensität vom PS I von *T. elongatus* in trimerer Form

<sup>7</sup>Das RC wird bei reduziertem primären Donator (P700) als offen bezeichnet und bei oxidiertem (P700<sup>+</sup>) als geschlossen.

### 3 Experiment

die Anregungsrate unter Berücksichtigung, dass ca. 80 % der Fluoreszenz bei 5 K von den roten Chlorophyllen emittiert wird [Pål98],  $\sim 2,3 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ , was unter der Annahme der Beteiligung von sieben roten Chlorophyllen zu einer Anregungsrate von  $k_{\text{Anreg}} \simeq 3,4 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$  pro Chl a führt.

Beide Abschätzungen führen zu dem Ergebnis, dass die Anregungsrate  $k_{\text{Anreg}}$  mindestens eine Größenordnung von der reziproken Fluoreszenzlebensdauer von Chl a entfernt liegt. Daher sind Doppelanregungen sehr unwahrscheinlich. Die Diskrepanz zwischen den beiden abgeschätzten Werten für  $k_{\text{Anreg}}$  von ca. einem Faktor sechs wird auf die ungenaue Abschätzung von unbekanntem Größen zurückgeführt, wie z.B. der Verlustrate durch strahlungslose Kanäle bei der Abschätzung der Fluoreszenzquantenausbeute.

#### 3.3.4 Hintergrundsignal bei der Aufnahme eines Spektrums

Das mittlere Hintergrundsignal, das von dem CCD-Chip im Spektralbereich zwischen 700 – 800 nm aus dem konfokalen Volumen im Tieftemperatur-Aufbau detektiert wurde, lag bei einer Standard-Messung<sup>8</sup> bei ca. 0,8 cps pro vertikal zusammengefasster Pixel<sup>9</sup>. In vertikaler Richtung wurden 21 Pixel vom Chip verwendet, die zu drei sogenannten Superpixeln zusammengefasst wurden, was einem *binning* von sieben Pixeln entspricht. Obiger Wert bezieht sich auf diese Einstellungen. In horizontaler Richtung wurde der gesamte Chip ohne *binning* genutzt. Bei Messungen mit Polarisator muss beachtet werden, dass  $\sim 50 \%$  weniger Intensität beim Chip ankommt und üblicherweise 3 s pro Spektrum akkumuliert wurde, d.h. das Hintergrundsignal lag in dem Fall bei ca. 1,2 Zählereignissen pro Spektrum pro Pixel. Das Hintergrundsignal hängt empfindlich von der Art der Probe ab, d.h. z.B. die Zugabe von Glycerin zum Lösungsmittel erhöht das Hintergrundsignal.

Bei ausgeschaltetem Laser beträgt der Dunkelstrom der Kamera typischerweise 1 Elektron/Pixel/s. Bei einer Akkumulationszeit von 1 s liegt das gemessene Gesamttrauschen pro oben genanntem Superpixel bei ca. 3 – 4 Zählereignissen. Nach den Herstellerangaben ergeben unsere typischen Messeinstellungen ein Ausleserauschen von 3 Elektronen/Pixel/s und ein Dunkelrauschen von 0,04 Elektronen/Pixel/s. Die in dieser Arbeit dargestellten Spektren wurden sowohl auf den Dunkelstrom der Kamera als auch auf das Hintergrundsignal der Probe sowie auf den von Hardware und Software gesetzten Ausgleich korrigiert, d.h. bei Spektren mit absoluten Zahlenangaben auf der Intensitätsachse wurde die Null auf das Hintergrundsignal der Probe unter Berücksichtigung des genannten Gesamtausgleichs gelegt.

---

<sup>8</sup>Beinhaltet: Anregung bei 680 nm mit  $3 \text{ kW} \cdot \text{cm}^{-2}$  im Fokuspunkt, wässrige Probe zwischen zwei Deckgläschen aus Suprasil-Quarzglas

<sup>9</sup>Eine vertikale Reihe von Pixeln verläuft senkrecht zur Richtung der spektralen Aufspaltung des Spektrographen.