

Phasenkontrast-Transmissionselektronenmikroskopie mit Dünnfilm- und elektrostatischen Phasenplatten

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
von der KIT-Fakultät für Physik
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte
DISSERTATION
von

Dipl.-Phys. Martin Obermair

aus Landau in der Pfalz

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Februar 2021

Referentin: Prof. Dr. D. Gerthsen
Korreferent: Prof. Dr. R. R. Schröder

angefertigt am
Laboratorium für Elektronenmikroskopie (LEM)
Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

Abstract

Phasenplatten (PP) für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ermöglichen die kontrastreiche Abbildung von Phasenobjekten. In der vorliegenden Arbeit wurden die kontraststeigernden Eigenschaften und Abbildungsartefakte elektrostatischer Zach-PP, lochfreier Dünnfilm-PP und Zernike-PP anhand experimenteller und simulierter Abbildungen untersucht. Als Modellobjekt diente eine biologische Probe (Bakteriophagen). Erstmals gelang im Rahmen dieser Arbeit auch die dreidimensionale Rekonstruktion der Struktur eines biologischen Objekts durch Tomografie mit Zach-PP-TEM-Abbildungen. Des Weiteren wurde die Reduktion von Intensitätsoszillationen („Fringing“-Artefakten) um die abgebildeten Objekte bei Zernike-PP-TEM-Abbildungen durch einen mikrostrukturierten Dickengradienten am Rand des Zernike-PP-Loches gezeigt.

Abstract (english)

Phase plates (PP) for transmission electron microscopy (TEM) enable imaging of phase objects with high contrast. In this work, the contrast-enhancing capabilities and artifacts of electrostatic Zach-PP, hole-free thin-film PP and Zernike PP were analyzed by experimental and simulated images of a biological model sample (bacteriophages). The three-dimensional structure reconstruction of a biological object was obtained for the first time by tomography on the basis of Zach-PP TEM images. Moreover, the reduction of intensity oscillations (“fringing” artifacts) around imaged objects in Zernike-PP TEM images was achieved by a microstructured thickness gradient at the edge of the Zernike-PP hole.

Inhaltsverzeichnis

Akronyme	VII
Symbole	IX
1 Einleitung	1
2 Grundlagen der Phasenkontrast-Transmissionselektronenmikroskopie	5
2.1 Aufbau eines Transmissionselektronenmikroskops	6
2.2 Wechselwirkung von Elektronen mit einer Probe	10
2.2.1 Näherung schwacher Phasenobjekte	14
2.3 Kontrastübertragung im Transmissionselektronenmikroskop	16
2.3.1 Die Aberrationsfunktion	17
2.3.2 Die Aperturfunktion	18
2.3.3 Dämpfung durch partielle Kohärenz	19
2.3.4 Die Phasenkontrasttransferfunktion	20
2.4 Phasenplatten in der Transmissionselektronenmikroskopie	26
2.4.1 Theoretische Funktionsweise physikalischer Phasenplatten	26
2.4.2 Historische Entwicklung und Stand der Forschung	28
2.5 Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie	37
2.5.1 Kryo-Probenpräparation	38
2.5.2 Kryo-Elektronentomografie	39
3 Techniken zur Herstellung von Phasenplatten	41
3.1 Fotolithografie	42
3.1.1 Rotationsbeschichtung	42
3.1.2 Maskenschreiber	42
3.1.3 Maskenausrichter	43
3.2 Rasterelektronenmikroskopie	44
3.3 Elektronenstrahllithografie	48
3.4 Mikrostrukturierung mit einem fokussierten Ionenstrahl	48
3.5 Dünnschichttechnologie	50
3.5.1 Physikalische Gasphasenabscheidung	50

3.5.2	Chemische Gasphasenabscheidung	52
3.5.3	Ätzverfahren	53
3.6	Abflottieren von Dünnfilmen	54
3.7	Weitere Techniken	57
4	Herstellung und Implementierung von Phasenplatten	59
4.1	Lochfreie Dünnfilmpphasenplatten (HFPP)	60
4.1.1	Herstellung und Charakterisierung	60
4.1.2	Implementierung einer HFPP in das JEOL JEM-3200FSC/PP	61
4.2	Elektrostatische Zach-Phasenplatten	63
4.2.1	Herstellung von freitragenden Siliziumnitrid-Membranen	63
4.2.2	Herstellung einer Standard-Zach-PP	68
4.2.3	Herstellung einer Zach-PP auf einem 3 mm Chip	75
4.2.4	Charakterisierung	76
4.2.5	Implementierung einer Zach-PP in das Philips CM200 FEG/ST	78
4.2.6	Implementierung einer Zach-PP in das JEOL JEM-3200FSC/PP	82
4.3	Konventionelle und dickengradierte Zernike-Phasenplatten	86
4.3.1	Herstellung	87
4.3.2	Charakterisierung	91
4.3.3	Implementierung einer Zernike-PP in das Philips CM200 FEG/ST	98
5	Anwendung von Phasenplatten und Analysemethoden	101
5.1	Anwendung von Phasenplatten	102
5.2	Analysemethoden	103
5.2.1	Bestimmung von Abbildungsparametern	103
5.2.2	Simulation von TEM-Aufnahmen mit PP	104
6	Experimentelle und simulierte Abbildung lebenswissenschaftlicher Kryo-Proben mit Zach-PP und HFPP	113
6.1	Experimentelle und simulierte TEM-Abbildung von T4	114
6.1.1	Probencharakterisierung und grundlegende Betrachtungen	114
6.1.2	Vergleich experimenteller CTEM-Aufnahmen und Phasenkontrast-TEM-Aufnahmen	114
6.1.3	Kontrastanalyse von experimentellen und simulierten TEM-Abbildungen mit HFPP	118
6.1.4	Kontrastanalyse von experimentellen und simulierten TEM-Abbildungen mit Zach-PP	120
6.2	Kryo-Elektronentomografie von Bakteriophagen T4 mit Zach-PP und HFPP	128

7 Experimentelle und simulierte Abbildung materialwissenschaftlicher Proben mit Zernike-PP mit gradiertem Lochrand	133
7.1 Kontrastanalyse von Fringing in TEM-Abbildungen mit dickengraduierten Zernike-PP von einer aC/Vakuum-Grenzfläche	134
7.2 Kontrastanalyse von Fringing in TEM-Abbildungen mit dickengraduierten Zernike-PP von einem CNT-Bündel	138
8 Zusammenfassung	147
A Anhang	151
A.1 Technische Zeichnungen von Halterplättchen für PP	152
A.2 Parameter für die Bildsimulation mit PPSim	158
A.3 Bestimmung des Dickenprofils einer aC/Vakuum-Grenzfläche	159
A.4 Simulation von CTEM-Aufnahmen einer aC/Vakuum-Grenzfläche	160
Abbildungsverzeichnis	166
Tabellenverzeichnis	167
Literaturverzeichnis	169
Geräte	185
Chemikalien und Materialien	187
Danksagung	189

Akronyme

BF	Hellfeld (Bright Field)
BFP	Hintere Brennebene (Back Focal Plane)
CCD	Ladungsgekoppeltes Bauelement (Charge-Coupled Device)
CNT	Kohlenstoff-Nanoröhren (Carbon Nanotubes)
CTEM	Konventionelle Transmissionselektronenmikroskopie (Conventional Transmission Electron Microscopy)
CTF	Kontrasttransferfunktion (Contrast Transfer Function)
CVD	Chemische Gasphasenabscheidung (Chemical Vapor Deposition)
DF	Dunkelfeld (Dark Field)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic Acid)
EDXS	Energiedispersive Röntgenspektroskopie (Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy)
ESL	Elektronenstrahllithografie
FEG	Feldemissionsquelle (Field Emission Gun)
FFT	Schnelle Fourier-Transformation (Fast Fourier-Transform)
FIB	Fokussierter Ionenstrahl (Focused Ion Beam)
FWHM	Volle Breite bei der Hälfte des Maximums (Full Width at Half of Maximum)
HAADF	Weitwinkeldunkelfeld (High-Angle Annular Dark Field)
HFPP	Lochfreie Phasenplatte (Hole-Free Phase Plate)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
KIT	Karlsruher Institut für Technologie
LEM	Laboratorium für Elektronenmikroskopie
MIP	Mittleres inneres Potenzial
MTF	Modulationstransferfunktion

Akronyme

NS	Nullstrahl
NTC	Negativer Temperaturkoeffizient (Negative Temperature Coefficient)
OL	Objektivlinse
PCTF	Phasenkontrasttransferfunktion (Phase Contrast Transfer Function)
PP	Phasenplatte
PSF	Punktspreizfunktion
PECVD	Plasmaunterstützte chemische Gasphasenabscheidung (Plasma-Enhanced Chemical Vapor Deposition)
PVD	Physikalische Gasphasenabscheidung (Physical Vapor Deposition)
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RIE	Reaktives Ionenätzen (Reactive Ion Etching)
SAED	Feinbereichsbeugung (Selected Area Electron Diffraction)
SE	Sekundärelektronen
STEM	Rastertransmissionselektronenmikroskopie (Scanning Transmission Electron Microscopy)
SSB	Einzelnes Seitenband (Single-sideband)
T4	Bakteriophage T4
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
UV	Ultraviolett
WPO	Schwaches Phasenobjekt (Weak-Phase Object)
ZPP	Zernike-Phasenplatte

Symbole

a_0	Amplitude der einfallenden Elektronenwelle
a	Amplitudenmodulation der Objektwelle
A	Amplitude der Objektwellenfunktion
A	Aperturfunktion
α	Konstante, $\alpha = 0,9788 \times 10^{-6} \text{ V}^{-1}$
B	Aberrationsfunktion
β_0	Semikonvergenzwinkel
c	Lichtgeschwindigkeit, $c = 2,99792458 \times 10^8 \text{ ms}^{-1}$
C	Kontrast
C_E	Wechselwirkungskonstante
C_C	Konstante der chromatischen Aberration
C_S	Konstante der sphärischen Aberration
χ	Wellenaberrationsfunktion
d_{hkl}	Abstand paralleler Netzebenen
d	Lochdurchmesser
D	Kantenlänge
δ	Delta-Funktion
δ	Abweichung des Defokus (<i>focal spread</i>)
Δ_{WFS}	Standardabweichung des Defokus
Δf	Defokus
Δf_S	Scherzer-Defokus
Δf_{PP}	Für den Einsatz von PP optimaler Defokus
e	Elementarladung, $e = 1,602176565 \times 10^{-19} \text{ C}$
E	Dämpfungsfunktion
E_0	Ruheenergie
E_e	Energie der Elektronen
E_{kin}	Kinetische Energie

Symbole

f_{OL}	Brennweite der Objektivlinse
f	Objektwelle
F	Fourier-transformierte der Objektwellenfunktion
\mathcal{F}	Fourier-Transformation
g	Bildwelle
\mathbf{g}_{hkl}	Reziproker Gittervektor
G	Fourier-transformierte der Bildwelle
h	Plancksches Wirkungsquantum, $h = 6,62606957 \times 10^{-34} \text{ Js}$
h	Punktspreizfunktion
H	Kontrasttransferfunktion
hkl	Millersche Indizes
I	Intensität
I_{L}	Linsenstrom
\mathbf{k}	Wellenvektor
λ	Wellenlänge
λ_{w}	Wärmeleitfähigkeit
λ_{MFP}	Mittlere freie Weglänge
m_0	Ruhemasse des Elektrons, $m_0 = 9,109382914 \times 10^{-31} \text{ kg}$
ν	Nyquist-Frequenz
ω_0	Frequenz der Elektronenwelle
φ	Phasenschiebung
φ_{PP}	Phasenschiebung der PP
ψ_{i}	Einfallende Elektronenwelle
\mathbf{r}	Ortsvektor, Position realer Raum
R	Lochradius
r_{B}	Radius der Blende
ρ	Phasenschiebung pro Längeneinheit
\mathbf{s}	Anregungsfehler

σ	Volle Breite bei der Hälfte des Maximums (FWHM)
t	Dicke
t	Zeit
T	Phasenkontrasttransferfunktion
θ	Bragg-Winkel
u	Raumfrequenzvektor
u_C	<i>Cut-on</i> -Frequenz
u_G	Grenzfrequenz
U	Beschleunigungsspannung
U_{PP}	Spannung an der PP
V	Potenzial
V_{MIP}	Mittleres inneres Potenzial
x	Pixelgröße der Kamera
Z	Elementordnungszahl

1

Kapitel 1

Einleitung

Der Wunsch den inneren Aufbau von Organismen, Zellen und Materie zu entschlüsseln und detailliert zu verstehen, geht weit in die Geschichte der Menschheit zurück. Ein erster Meilenstein auf diesem Weg war die Entdeckung der Lichtmikroskopie, durch die vielfältige Arten von biologischen Objekten stark vergrößert untersucht werden können. Die Lichtmikroskopie ist auch heute noch in einem breiten Spektrum von Anwendungen vertreten und in der modernen Forschung nicht mehr wegzudenken. Ungeachtet dessen bringt die konventionelle Lichtmikroskopie zwei wesentliche Nachteile mit sich. Zum einen ist ihre Auflösung durch die Wellenlänge des sichtbaren Lichts begrenzt [1] und eignet sich daher nicht zur Abbildung kleinstter Strukturen wie etwa dem atomaren Aufbau von Materie. Des Weiteren stößt die Lichtmikroskopie bei der Abbildung von transparenten Objekten an ihre Grenzen, wenn lediglich die Phase und nicht die Amplitude der einfallenden Welle durch das Objekt verändert wird. Diese kann für das Auge nur durch eine weitere optische Verarbeitung sichtbar gemacht werden. So entwickelte Zernike die sogenannte Phasenkontrastmikroskopie, bei der über eine Phasenplatte (PP), die historisch auch als $\lambda/4$ -Plättchen bezeichnet wird, eine Phasenschiebung von 90° zwischen gestreuten und ungestreuten Teilen der Lichtwelle erzwungen wird. Durch konstruktive Interferenz werden dabei selbst minimale Unterschiede im Brechungsindex der transparenten Probe mit gutem Kontrast in einer lichtmikroskopischen Abbildung sichtbar [107].

Wie bereits erwähnt, ist die Auflösung der Lichtmikroskopie viel mehr durch die im Bereich weniger hundert Nanometer liegende Wellenlänge des sichtbaren Lichts limitiert. Mit der Revolution der Quantenmechanik und der damit einhergegangenen Formulierung des Welle-Teilchen Dualismus [26] kam schließlich die Idee auf, Materiewellen anstatt sichtbarer Lichtwellen zur Abbildung zu verwenden. Als geeignete Teilchen wurden Elektronen identifiziert, die sich relativ einfach beschleunigen und durch elektrostatische und magnetische Felder ablenken lassen. So erreichen hochenergetische Elektronen eine Wellenlänge im Pikometerbereich, die deutlich unterhalb der Atomabstände in den meisten Festkörpern

liegt. Erste Transmissionselektronenmikroskope wurden durch Knoll und Ruska entwickelt [57], wobei elektromagnetische Linsensysteme verwendet wurden, um die Prinzipien der Mikroskopie mit Lichtwellen auf Elektronenwellen zu übertragen. Schnell stellte sich jedoch heraus, dass die erreichbaren Auflösungen hinter den Erwartungen zurückblieben und durch Abbildungsfehler der Linsen und eine Dämpfung durch die partielle Kohärenz der Elektronen limitiert werden.

Wie in der Lichtmikroskopie gibt es auch in der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) Phasenobjekte, die nur schwach mit der einfallenden Elektronenwelle wechselwirken. Dies betrifft überwiegend lebenswissenschaftliche Proben, die aus sehr leichten Materialien mit niedriger Ordnungszahl bestehen. Eine mögliche Methode, um solche Proben mit Phasenkontrast sichtbar zu machen, ist die Defokussierung der Objektivlinse [86]. Bei dieser Methode müssen allerdings erhebliche Verluste der Bildqualität in Kauf genommen werden, insbesondere wenn für größere Objekte im Bereich einiger zehn Nanometer ein starker Defokus gewählt werden muss.

Mit der Absicht die Verluste der Bildqualität zu umgehen, schlug Boersch vor, das aus der Lichtmikroskopie bekannte Prinzip der PP in der TEM zu realisieren, um elektronentransparente Proben mit Phasenkontrast fokussiert abzubilden [8]. Schon in seiner ursprünglichen Veröffentlichung im Jahre 1947 schlug Boersch vor, einen dünnen Materialfilm oder ein elektrostatisches Feld für die Phasenschiebung der gestreuten oder ungestreuten Elektronenwelle zu verwenden. Eine experimentelle Realisierung gelang schließlich erst Jahrzehnte später [13], nachdem die Strukturierung eines Dünnfilmes mit einem fokussierten *Ga*-Ionenstrahl (FIB) möglich wurde. Im Laufe der Zeit wurden zahlreiche PP-Konzepte entwickelt [40], wobei sich filmbasierte und elektrostatische PP vorwiegend durchgesetzt haben. Filmbasierte PP lassen sich in strukturierte und unstrukturierte PP unterteilen. Strukturierte PP nutzen das innere elektrostatische Potenzial eines Dünnfilmes aus, um die Phase von gestreuten Elektronen in der hinteren Brennebene (BFP) der Objektivlinse zu schieben, während die ungestreuten Elektronen einen vom Film befreiten Bereich durchlaufen und unbeeinflusst bleiben. Zernike-PP werden dazu mit einem kleinen Loch versehen, durch welches der Nullstrahl (NS) geführt wird [13]. Die Herstellung von Zernike-PP ist vergleichsweise einfach, und es konnten bereits in verschiedenen Anwendungsbereichen erfolgreich eingesetzt werden [11, 17]. Aufgrund der Streuung von Elektronen im Zernike-PP-Film und von *Fringing*-Artefakten um die abgebildeten Objekte, die durch die abrupsste Kante des Zernike-PP-Loches in der BFP entstehen, konnten sich Zernike-PP allerdings nicht bei einem breiten Nutzerbereich durchsetzen. Ähnliches gilt für die Hilbert-PP [19], die nur eine Hälfte der BFP mit einem Dünnfilm abdeckt und den abgebildeten Objekten durch helle und dunkle Säume ein plastisches Aussehen verleiht. Im Gegensatz dazu beruhen unstrukturierte lochfreie PP (HFPP), die oftmals auch als Volta-PP bezeichnet werden, auf einem nur wenige Nanometer dicken durchgängigen Film, der durch die Beleuchtung mit dem Elektronenstrahl einen geladenen Bereich („Fleck“) ausbildet und die Phase der

ungestreuten Elektronen schiebt [21, 67]. Die Streuung von Elektronen in dem sehr dünnen Film ist bei der HFPP deutlich geringer als bei Zernike-PP und es konnte eine Vielzahl beeindruckender Ergebnisse für die tomografische Rekonstruktion [4, 64] und Rekonstruktionen von Biomolekülen [56, 62] erzielt werden. Die sehr einfache Herstellung und Anwendung einer HFPP stellt einen entscheidenden Vorteil gegenüber anderen PP-Typen dar. Ein bedeutender Nachteil ist hingegen eine nur indirekt über die Filmtemperatur einstellbare Phasenschiebung und Artefakte durch die graduelle Phasenschiebungsverteilung der HFPP, die zu hellen Rändern („Halos“) um die abgebildeten Objekte führt.

Zach-PP haben sich unter den elektrostatischen PP durchgesetzt [90]. Sie beruhen auf einer mikrostrukturierten abgeschirmten Elektrode in der Mitte einer großen Apertur. Durch Anlegen einer Spannung bildet sich ein stark lokalisiertes inhomogenes Potenzial aus, das die Phase der ungestreuten Elektronen im NS schiebt. Die Abstimmbarkeit der generierten Phasenschiebung über die angelegte Spannung ist ein fundamentaler Vorteil der Zach-PP. Durch die große Apertur tritt keine Streuung von Elektronen beim Durchlaufen der PP-Struktur auf. Als Nachteil gilt, neben dem komplexen Herstellungsprozess, die Ausbreitung richtungsabhängiger Artefakte. Letzte treten in Form von Intensitätsoszillationen auf, die durch die abrupte Struktur des Zach-PP-Steges in der BFP verursacht werden. Zudem generiert das inhomogene Potenzial der Zach-PP eine richtungsabhängige Phasenschiebung. In Kontext mit dem gegebenen Überblick ergaben sich für diese Arbeit die folgenden Fragestellungen:

- Die kontrastverstärkenden Eigenschaften der Zach-PP wurden bisher fast ausschließlich an anorganischen Testobjekten untersucht. In dieser Arbeit sollten biologische Testobjekte (in Eis eingebettete T4-Bakteriophagen (T4)) verwendet werden und die Kontrastentstehung im Detail verstanden werden. Die Bildentstehung mit Hilfe einer Zach-PP sollte mit HFPP-Abbildungen der gleichen Objekte verglichen werden. Insbesondere sollten Artefakte in den Bildern im Detail verstanden werden.
- Für das quantitative Verständnis von experimentellen Zach-PP- und HFPP-Abbildungen sollten Bildsimulationen durchgeführt und die simulierten Bilder mit den experimentellen Bildern verglichen werden. Hierzu wurde eine bereits bestehende Simulationssoftware für diese Arbeit angepasst und erweitert. Für die Bildsimulationen mussten realistische Objektwellenfunktionen erstellt werden. Zentral war es außerdem, realitätsgetreue Phasenschiebungsverteilungen für die unterschiedlichen PP-Typen zu berechnen oder experimentell zu bestimmen.
- Erstmals sollte eine Zach-PP genutzt werden, um die dreidimensionale Struktur einer Probe mittels Elektronentomografie zu rekonstruieren.
- Es sollte ein Versuch unternommen werden, die Eigenschaften der einfach herzustellenden und zu nutzenden Zernike-PP zu verbessern und *Fringing*-Artefakte zu reduzieren.

zieren, die durch die abrupte Lochkante in der BFP verursacht werden. Dazu sollten Zernike-PP mit gradiertem Lochrand hergestellt und dessen Einfluss auf das *Fringing* untersucht werden. Die experimentellen Bilder sollten mit simulierten Bildern verglichen werden, um die Bildentstehung quantitativ zu verstehen.

Die Herstellung von filmbasierten PP ist vergleichsweise einfach durchzuführen, während die elektrostatische Zach-PP einem relativ komplexen Herstellungsverfahren unterliegen, welches in Vorgängerarbeiten weitestgehend optimiert wurde [45]. Dennoch mussten die Herstellungsverfahren in einzelnen Punkten optimiert und um weitere mögliche PP-Designs ergänzt werden.

Während die filmbasierten PP relativ einfach in ein Mikroskop zu implementieren sind und oftmals auch in einfache Aperturhalter eingebaut werden können, benötigen Zach-PP komplexere Positionierungssysteme und vakuumdichte Kabeldurchführungen für die Spannungsversorgung. Im Rahmen der Arbeit sollte solch ein Halter für ein Philips CM200 realisiert werden, in dem viele Experimente im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden.

Die Anwendung von HFPP wird von einigen Herstellern bereits mit fertigen HFPP-Positionierungssystemen ermöglicht. Im Rahmen der Arbeit sollte so ein System für den Einsatz einer elektrostatischen Zach-PP im JEOL JEM-3200 modifiziert werden.

Die vorliegende Arbeit ist in die nachfolgend beschriebenen Kapitel unterteilt. Kapitel 2 beschäftigt sich zunächst mit den Grundlagen der Phasenkontrast-TEM und der Vorstellung der verschiedenen PP-Konzepte. Kapitel 3 stellt hingegen die zur Herstellung von PP benötigten Mikrostrukturierungsmethoden vor. Im Kapitel 4 werden die Herstellungsverfahren der verwendeten PP vorgestellt sowie die anschließende Implementierung in die zur Verfügung stehenden Transmissionselektronenmikroskope. Die Anwendung einer Phasenplatte wird in Kapitel 5 zusammen mit der zur Auswertung von PP-TEM-Aufnahmen verwendeten Analysemethoden vorgestellt. Kapitel 6 birgt schließlich die experimentellen Ergebnisse mit Zach-PP und HFPP in der Kryo-TEM, gefolgt von den Ergebnissen mit konventionellen und dickengraduierten Zernike-PP in Kapitel 7. Die Arbeit schließt mit einer Zusammenfassung der relevanten Ergebnisse in Kapitel 8.

2

Kapitel 2

Grundlagen der Phasenkontrast- Transmissionselektronenmikroskopie

In diesem Kapitel wird zum einen Phasenkontrast-TEM und zum anderen die Funktionsweise der im Rahmen der Arbeit verwendeten Transmissionselektronenmikroskope grundlegend erklärt. Dabei werden die beschriebenen Grundlagen gemäß der im Bereich der Elektronenmikroskopie geläufigen Fachliteratur zusammengefasst [2, 27, 83, 104]. Zunächst erfolgt in Abschnitt 2.1 die Erläuterung einzelner Bestandteile und Funktionen eines Transmissionselektronenmikroskops anhand der verwendeten Geräte JEOL JEM-3200 und Philips CM200. Anschließend wird in Abschnitt 2.2 auf mögliche Wechselwirkungen von Strahlelektronen mit der Probe sowie in Abschnitt 2.3 auf die Kontrastübertragung, Bildentstehung und insbesondere die Erzeugung von Phasenkontrast in der TEM eingegangen. Der Abschnitt 2.4 wird schließlich genutzt, um verschiedene Arten von PP für die Erzeugung von Phasenkontrast in der TEM zu veranschaulichen und sowohl deren historische Entwicklung als auch den aktuellen Stand der Forschung näher zu beleuchten. Am Ende des Kapitels erfolgt in Abschnitt 2.5 eine kurze Beschreibung der Besonderheiten der Kryo-TEM und in Abschnitt 2.5.2 der Kryo-Elektronentomografie.

2.1 Aufbau eines Transmissionselektronenmikroskops

Ein Transmissionselektronenmikroskop besteht, wie in Abbildung 2.1 schematisch dargestellt, im Wesentlichen aus einer Elektronenquelle, einer beleuchtenden und einer abbildenden Elektronenoptik sowie einem Leuchtschirm bzw. einer Kamera. Die einzelnen Komponenten sind in einer evakuierten Elektronensäule vertikal übereinander angeordnet. Die Erzeugung des Vakuums in der Elektronensäule wird durch ein mehrstufiges Pumpsystem gewährleistet, sodass Stoßprozesse zwischen Elektronen und Gasmolekülen weitestgehend vermieden werden. Das mehrstufige Pumpsystem besteht aus einer Vorpumpe, einer Turbomolekularpumpe sowie in der Regel mehreren Iongetterpumpen und ist dabei so dimensioniert, dass der Druck im Bereich der Elektronenquelle möglichst klein ist und keinen größeren Schwankungen unterliegt. Moderne Geräte verfügen außerdem über eine computergestützte Steuerung einschließlich eines digitalen Bildaufnahmesystems.

Abhängig von den Anforderungen an das Transmissionselektronenmikroskop, werden die Elektronen in der Elektronenquelle durch thermionische Emission oder Feldemission erzeugt. Die freien Elektronen werden durch eine angelegte Hochspannung, die typischerweise zwischen 80 und 300 kV liegt, beschleunigt und zu einem Elektronenstrahl mit definierter Energie gebündelt. Als thermionische Quellen werden *W*-Filamente und *LaB₆*-Kathoden bezeichnet, bei welchen freie Elektronen mittels Glühemission erzeugt werden. Sie sind relativ kostengünstig und finden häufig in der TEM biologischer Proben Anwendung. Feldemissionsquellen (FEG) basieren auf dem quantenmechanischen Tunneleffekt und emittieren Elektronen durch Anlegen eines hohen elektrischen Feldes an einer feinen Metallspitze. FEG verfügen im Vergleich zu einfachen *LaB₆*-Kathoden über eine geringere Energiebreite der emittierten Elektronen, einen größeren Richtstrahlwert und daher über eine höhere Kohärenz. Somit werden letztere vorzugsweise in der hochauflösenden TEM verwendet.

Die hochenergetischen Elektronen durchlaufen nach dem Verlassen der Quelle die beleuchtende Optik, welche aus einem System von Kondensorlinsen und -blenden besteht. Sie bestimmt maßgeblich die Form, den Durchmesser und den Konvergenzwinkel des Elektronenstrahls, der dann auf das zu untersuchende Objekt trifft. In der konventionellen Transmissionselektronenmikroskopie (CTEM) wird meist ein Strahl möglichst parallel verlaufender Elektronen zur Beleuchtung der Probe verwendet. Für manche Anwendungen wird hingegen ein konvergenter Elektronenstrahl benötigt.

Die zu untersuchende Probe muss Elektronentransparenz aufweisen, damit die einfallenden Elektronen das Probenmaterial durchlaufen können. Ist das Ausgangsmaterial bereits elektronentransparent, kann es abhängig von seiner Beschaffenheit auf einen Dünnsfilm aufgebracht werden, während es andernfalls durch mechanisches Polieren und Ionenätzen auf etwa 10 bis 100 nm gedünnt werden muss. Die Probe wird anschließend in einem Proben-

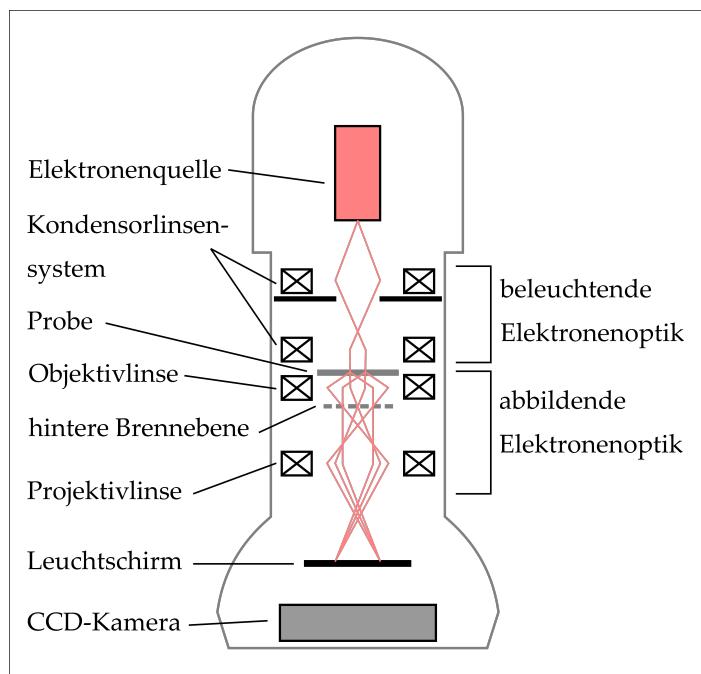


Abbildung 2.1: Aufbau eines Transmissionselektronenmikroskops. Schematische Darstellung der Bestandteile und vereinfachter Strahlengang.

halter positioniert und über eine Schleuse in die evakuierte Säule eingebbracht. Der Probenhalter verfügt über einen dreidimensional justierbaren Feintrieb und in der Regel über eine Kippvorrichtung um zwei Achsen, die beispielsweise zur Orientierung kristalliner Proben bezüglich des einfallenden Elektronenstrahls dient.

Die Kontamination der Probe, die durch intensive Bestrahlung von auf der Probenoberfläche adsorbierten Kohlenwasserstoffen mit hochenergetischen Elektronen entsteht, stellt ein verbreitetes Problem in der TEM dar. Zur Verminderung von Kontamination befindet sich der sogenannte Antikontaminator im Bereich der Probe. Dieser beruht auf dem Prinzip einer Kühlfallen und besteht aus einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Kupferkäfig. Restgasmoleküle und desorbierte Kohlenwasserstoffe in der Mikroskopsäule setzen sich bevorzugt an der kalten Oberfläche des Antikontaminators ab und dadurch weniger auf der Probenoberfläche.

Nachdem die Elektronen die Probe durchlaufen haben, erzeugt die Objektivlinse ein Beugungsbild in der hinteren Brennebene BFP und ein Zwischenbild in der ersten Bildebene. Durch Wahl eines geeigneten Linsenstroms zur Anregung der Zwischenlinse, kann diese entweder auf das Zwischenbild oder das Beugungsbild fokussiert werden. Abbildung 2.2 verdeutlicht die Strahlengänge der beiden Betriebsmodi, die auch als Abbildungs- (siehe Abbildung 2.2a) und Beugungsmodus (siehe Abbildung 2.2b) bezeichnet werden. Das Beugungsbild hat eine charakteristische Gestalt und ermöglicht durch seine raumfrequenzabhängige Darstellung der Probe detaillierte Rückschlüsse auf deren Struktur. Eine Objek-

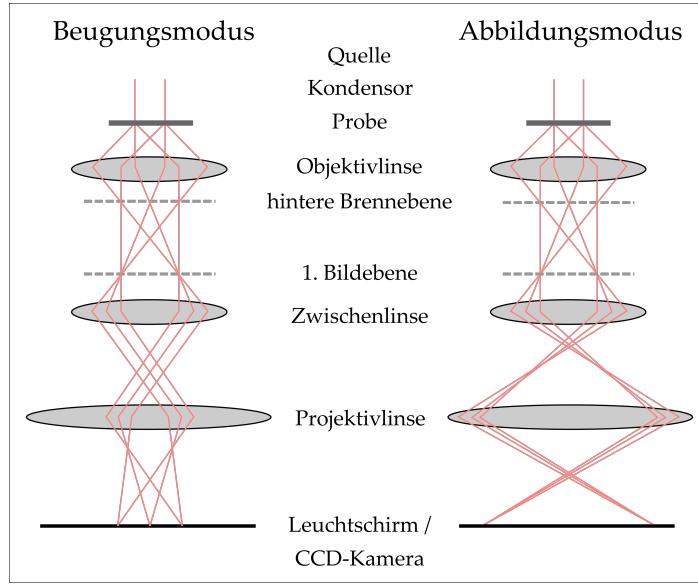


Abbildung 2.2: Strahlengänge in einem Transmissionselektronenmikroskop für verschiedene Betriebsmodi nach [104]. Die Objektivlinse erzeugt ein Beugungs- und ein Zwischenbild. Im Beugungsmodus wird die Zwischenlinse schwach angeregt und ein durch die Projektivlinse nachvergrößertes Beugungsbild der Probe auf den Leuchtschirm projiziert. Im Abbildungsmodus wird die Zwischenlinse stark angeregt und ein durch die Projektivlinse nachvergrößertes reales Abbild der Probe auf den Leuchtschirm projiziert.

tivblende, die in die BFP eingebracht wird, ermöglicht eine Kontrasterhöhung der resultierenden Abbildung. Des Weiteren können die an der Abbildung beteiligten Elektronen durch eine Objektivblende selektiert werden. Demnach entsteht bei der Selektion von gestreuten Elektronen, zum Beispiel einem bestimmten Bragg-Reflex bei kristallinen Proben, eine Dunkelfeld(DF)-Abbildung, während die Selektion von ungestreuten Elektronen, den sogenannten NS-Elektronen, zu einer Hellfeld(BF)-Abbildung führt.

Durch die Projektivlinse wird abhängig vom gewählten Betriebsmodus das Bild oder das Beugungsbild nachvergrößert und auf den Leuchtschirm beziehungsweise die Kamera projiziert. Der Leuchtschirm ist mit einem fluoreszierenden Material beschichtet. Sichtfenster ermöglichen die Beobachtung des Leuchtschirms. Mittels einer Klappvorrichtung kann der Leuchtschirm angehoben werden, sodass das Bild beziehungsweise das Beugungsbild auf die Kamera fällt. Um die verschiedenen Wechselwirkungen der Elektronen mit dem Probenmaterial zur weiteren Analytik der Probe heranzuziehen, kann ein Transmissionselektronenmikroskop mit zusätzlichen Detektoren und Spektrometern ausgestattet werden.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente wurden überwiegend an dem in Abbildung 2.3a dargestellten Philips CM200 und dem in Abbildung 2.3b dargestellten JEOL JEM-3200 durchgeführt. Die ungefähre Position der einzelnen Bestandteile beider Transmissionselektronenmikroskope kann anhand der Beschriftung zugeordnet werden. Während das Philips CM200 hauptsächlich für materialwissenschaftliche Untersuchungen

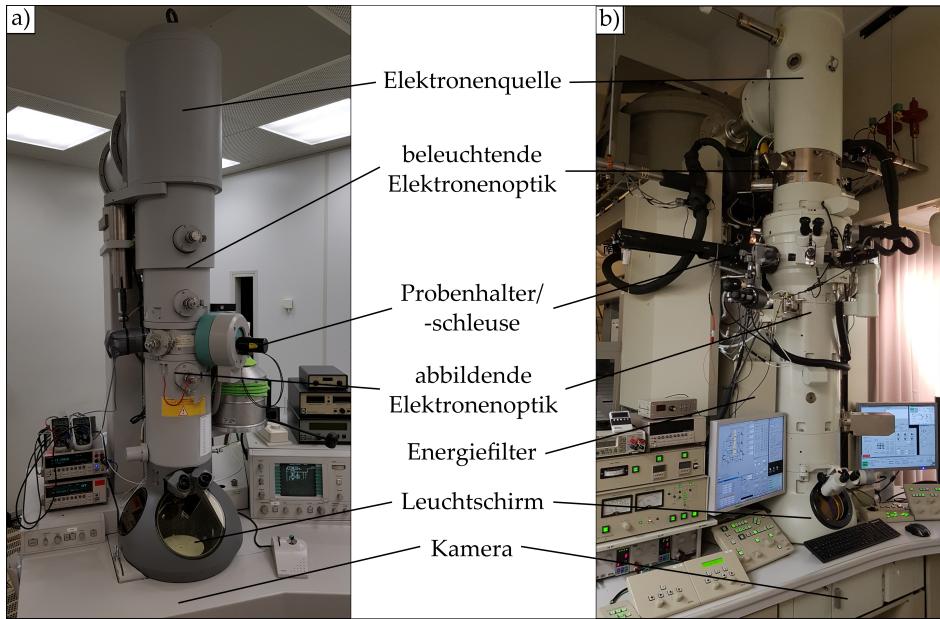


Abbildung 2.3: Fotografien der verwendeten Transmissionselektronenmikroskope. Die Anordnung der einzelnen Bestandteile (Elektronenquelle, beleuchtende und abbildende Elektronenoptik, Probenhalter/-schleuse, Energiefilter, Leuchtschirm und Kamera) ist verdeutlicht für a) das Philips CM200 und b) das JEOL JEM-3200.

verwendet wird, ist das JEOL JEM-3200 in der Wadsworth Center 3D-EM-Einrichtung für die Kryo-TEM biologischer Proben (siehe Abschnitt 2.5) optimiert. Dazu wird sowohl die Schleusenkammer als auch der Probentisch mit flüssigem Stickstoff gekühlt, sodass bis zu drei in vitrifiziertem Eis eingebettete biologische Proben für 48 Stunden im Mikroskop gelagert werden können. Der Probentisch verfügt über einen piezoelektrischen Antrieb mit großer Reichweite, der neben einer feinen Translation der Probe im zu untersuchenden Bereich auch eine weitreichende Verschiebung ermöglicht. So kann die Probe zur Justage des Mikroskops und zur Fokussierung an eine weniger interessante Probenstelle gefahren werden, um den zu untersuchenden Bereich vor Schädigung durch die einfallende Beleuchtung zu schützen. Des Weiteren kann der Probentisch in zwei senkrecht zueinander verlaufenden Richtungen um einen Winkel von -70° bis $+70^\circ$ verkippt werden, was für die Kryo-Elektronentomografie (siehe Abschnitt 2.5.2) verwendet wird. Als weiteren Unterschied zum Philips CM200 ist der Ω -Energiefilter zu nennen, der in der Elektronensäule des JEOL JEM-3200 integriert ist. Dieser verursacht eine Auffächerung der transmittierten Elektronen in Abhängigkeit ihres Energieverlusts und ermöglicht die Selektion der an der Abbildung beteiligten Elektronen sowie die Gewinnung analytischer Informationen. Das JEOL JEM-3200 verfügt außerdem über die Möglichkeit die normale BFP der Objektivlinse mit der Brennweite $f_{OL} = 5\text{ mm}$ in eine vergrößerte BFP mit der Brennweite $f_{OL} = 15,8\text{ mm}$ auf Höhe der ursprünglichen Ebene für die Feinbereichsblende, die für die Fein-

bereichsbeugung (SAED) verwendet wird, zu transferieren. In der SAED-Ebene wird normalerweise ein bestimmter Probenbereich, der an der Bildentstehung teilhaben soll, über eine Blende ausgewählt. Für den Betrieb des JEOL JEM-3200 mit der vergrößerten Brennebene wird das Mikroskop aus dem sogenannten normalen OL-Modus durch Umlegen eines Kippschalters in den SA-MAG-Modus versetzt (siehe Abbildung 2.4), wodurch sich die Konfiguration der Linsenströme ändert. Die Objektivminilinse, deren Spulen durch zusätzliche Windungen für eine höhere Stromaufnahme und die Erzeugung stärkerer Felder modifiziert wurde, wird über eine externe Spannungsquelle betrieben und dient als Transferlinse [76], um die BFP der Objektivlinse in vergrößerter Form auf die SAED-Ebene zu übertragen. Die Objektivlinse wird im SA-MAG-Modus ebenfalls angeregt und sorgt für eine nahezu gleichbleibende Qualität bei der elektronenoptischen Abbildung. Ein großer Vorteil den die Wechselmöglichkeit zwischen den beiden Modi bietet ist, dass das Mikroskop mit zwei unterschiedlichen PP abwechselnd betrieben werden kann. So kann beispielsweise eine HFPP in der normalen BFP im OL-Modus betrieben werden und eine Zach-PP in der vergrößerten BFP im SA-MAG-Modus (siehe Abschnitt 4.1.2 und 4.2.6).

2.2 Wechselwirkung von Elektronen mit einer Probe

Einem Strahl sehr schneller Elektronen, wie er in einem Transmissionselektronenmikroskop erzeugt wird, kann gemäß des Welle-Teilchen-Dualismus [26] ein Wellencharakter zugeordnet werden, um zahlreiche Phänomene zu beschreiben. So konnte die Welleneigenschaft von Elektronen in Beugungsexperimenten [25] und durch Beobachtung von Interferenzmustern [53, 77] experimentell nachgewiesen werden. Die Berechnung der Wellenlänge der Elektronen muss aufgrund ihrer hohen Geschwindigkeit im Elektronenstrahl relativistisch erfolgen und beträgt

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2m_0 e U \left(1 + \frac{e U}{2 m_0 c^2}\right)}} = \frac{1}{|\mathbf{k}|}, \quad (2.1)$$

mit dem Planckschen Wirkungsquantum h , der Lichtgeschwindigkeit c , der Ruhemasse der Elektronen m_0 , der Elementarladung e sowie der Beschleunigungsspannung U und dem Wellenvektor \mathbf{k} . Für typische Beschleunigungsspannungen von $U = 200 - 300$ kV ergeben sich Wellenlängen im Bereich von $\lambda = 2,51 - 1,97$ pm.

Da die Probe in der CTEM in der Regel mit einem Strahl möglichst parallel verlaufender Elektronen beleuchtet wird, können die einfallenden Elektronen als ebene Welle durch die Funktion

$$\psi_i(\mathbf{r}) = a_0 \cdot e^{i(2\pi\mathbf{k}\mathbf{r} - \omega t)}, \quad (2.2)$$

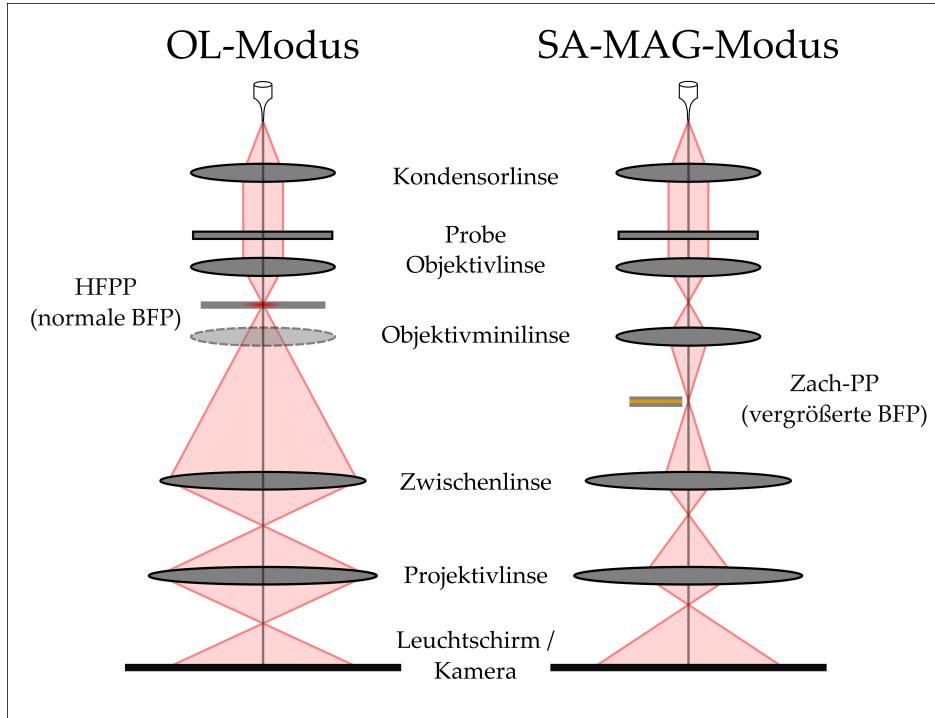


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der elektronenoptischen Konfiguration des JEOL JEM-3200 bei Betrieb im OL-Modus und SA-MAG-Modus. Durch Abänderung der normalen elektronenoptischen Konfiguration im OL-Modus kann die normale BFP der Objektivlinse im SA-MAG-Modus in eine vergrößerte BFP auf Höhe der SAED-Ebene transferiert werden. Dazu wird eine modifizierte Objektivminilinse als Transferlinse verwendet. Für bessere elektronenoptische Eigenschaften wird die Objektivlinse auch im SA-MAG-Modus betrieben. So wird ermöglicht zwei verschiedene PP, z.B. eine HFPP in der normalen BFP und eine Zach-PP in der vergrößerten BFP, abwechselnd zu betreiben.

mit der Ortskoordinate \mathbf{r} , der Zeit t , der Amplitude a_0 und der Frequenz der Elektronenwelle ω_0 beschrieben werden. Per Konvention wird der Vorfaktor 2π üblicherweise nicht in den Wellenvektor integriert, um ein einfacheres Umrechnen zwischen Orts- und Frequenzraum durch Kehrwertbildung zu ermöglichen.

Durchläuft die Elektronenwelle das Probenmaterial, kommt es zur Wechselwirkung der Elektronen mit den Atomen in der Probe. Dadurch ergibt sich an jedem Ortspunkt $\mathbf{r} = (x, y)$ eine von der Probe abhängige Beeinflussung von Amplitude und Phase der Elektronenwelle, sodass diese nach dem Austreten aus der Probe bzw. dem Objekt durch die Funktion

$$\psi_{\text{obj}}(\mathbf{r}) = f(\mathbf{r}) \cdot \psi_i(\mathbf{r}) \quad (2.3)$$

beschrieben werden kann. Die darin enthaltene Funktion

$$f(\mathbf{r}) = [1 - a(\mathbf{r})]e^{i\varphi(\mathbf{r})} \quad (2.4)$$

wird als Objektwellenfunktion bezeichnet und ist allein abhängig von der Amplitudenmodulation $a(\mathbf{r})$ und der Phasenmodulation $\varphi(\mathbf{r})$, die das Objekt der einfallenden Elektronenwelle ψ_i aufprägt. Die Amplitude und Phase von ψ_i kann in der Regel auf 1 gesetzt werden, sodass $f(\mathbf{r})$ die Elektronenwelle auf Austrittsebene des Objektes vollständig beschreibt. Die Kontrastübertragung der Objektwelleninformation bei der Propagation durch das abbildende System, die letzten Endes zur eigentlichen TEM-Abbildung führt, wird in Abschnitt 2.3 genauer beschrieben.

Die Wechselwirkungen zwischen den einfallenden Primärelektronen und dem dünnen Probenmaterial lassen sich grundsätzlich in elastische Prozesse, wie Streuung und Beugung an den Atomen der Probe, und inelastische Prozesse, die hauptsächlich auf Elektron-Elektron-Wechselwirkung zurückzuführen sind, unterteilen. Bei der Streuung stoßen die die Probe durchlaufenden Primärelektron mit den positiv geladenen Atomrumpfen zusammen und werden durch die Coulomb-Wechselwirkung abgelenkt. Im Wellenbild wird dieser Vorgang mit der Entstehung von Streuwellen beschrieben. Der Prozess ist elastisch, wenn die kinetische Energie und der Impuls des Gesamtsystems erhalten und damit die Wellenlänge der Elektronenwelle nahezu gleich bleibt. Die inelastische Wechselwirkung, bei der ein Teil der Energie durch Versetzen der Probenatome in Anregungszustände verloren geht, kann für analytische Zwecke eingesetzt werden, denn der Energieverlust inelastisch gestreuter Elektronen weist eine hohe Elementspezifität auf. In TEM-Abbildungen tragen inelastisch gestreute Elektronen durch die chromatische Aberration der magnetischen Linsen im abbildenden System hauptsächlich zu einem ungewünschten Hintergrundsignal bei und werden oftmals durch einen Energiefilter herausgefiltert.

Streuwahrscheinlichkeit und Streuwinkel hängen stark von der Ordnungszahl der Elemente in der Probe sowie der Probendichte und -dicke ab. Für eine genauere mathematische Beschreibung der Streuung können sogenannte Streufaktoren herangezogen werden, die auf der Berechnung spezifischer Atompotenziale basieren [29, 101]. Die Streuung an den Atomen prägt der einlaufenden Welle in erster Linie eine Amplitudenmodulation auf, die wiederum stark von der lokalen Elementverteilung in der Probe abhängt. Schwere Elemente mit hoher Ordnungszahl verursachen dabei eine stärkere Amplitudenmodulation als leichte Elemente mit niedriger Ordnungszahl. Obwohl der Bildkontrast in der TEM von weiteren Faktoren abhängt (siehe Abschnitt 2.3), führt eine stärkere Amplitudenmodulation der Objektwelle in vielen Fällen zu dunklerem Kontrast in der TEM-Abbildung. Dieses Phänomen wird daher auch als Massen-Dicken-Kontrast bezeichnet. Durch Einbringen einer Objektivblende in die BFP der Objektivlinse, welche in großer Winkel gestreute Elektronen ausblendet, kann der Massen-Dicken-Kontrast zusätzlich verstärkt werden.

Die Elektronenbeugung ist ein weiterer Effekt, der auftritt, wenn die Primärelektronenwelle durch eine kristalline Probe propagiert. In kristallinen Proben sind die Atome periodisch in einzelnen Kristallebenen angeordnet. Die Lage der Ebenen in der Elementarzelle des Kristalls wird durch die Millerschen Indizes hkl angegeben. Dabei kennzeichnen die Millerschen

Indizes einen Vektor im reziproken Raum, welcher einer Schar von Kristallebenen einen bestimmten Punkt im reziproken Gitter des Kristalls zuweist. Die reziproken Gittervektoren sind hierbei senkrecht zur betreffenden Kristallebene orientiert. Damit es zur konstruktiven Interferenz von Elektronenwellen an parallel liegenden Kristallebenen kommt, muss die Bragg-Bedingung

$$\lambda = 2 d_{hkl} \sin(\theta_B) \quad (2.5)$$

erfüllt sein. Der Bragg-Winkel θ_B hängt dabei von der Wellenlänge λ und den Abständen der Kristallebenen d_{hkl} ab.

Das Phänomen der Elektronenbeugung ist insbesondere nützlich, um genaue Informationen über die Kristallstruktur der Probe anhand des Beugungsbildes zu gewinnen. Wie in Abschnitt 2.1 beschrieben, kann das Transmissionselektronenmikroskop in den Beugungsmodus versetzt werden, sodass die abbildende Elektronenoptik auf die BFP fokussiert wird, welche gerade der ersten Beugungsebene entspricht. Gemäß der Fraunhofer-Näherung liegt die Elektronenwelle in der Beugungsebene als die Fourier-transformierte der Objektwelle, in Abhängigkeit der Raumfrequenz \mathbf{u} , vor. Demnach gilt:

$$F(\mathbf{u}) = \mathcal{F}(f(\mathbf{r})) = \int f(\mathbf{r}) e^{2\pi i \mathbf{u} \cdot \mathbf{r}} d(r). \quad (2.6)$$

Durch die reziproke Proportionalität der Raumfrequenzen $\mathbf{u} = \frac{1}{\mathbf{r}}$ zu den realen Abständen \mathbf{r} in der Probe, befindet sich die Bildinformation von kleinen Strukturen in der Probe bei großen Raumfrequenzen und die von großen Strukturen bei kleinen Raumfrequenzen.

Die Fourier-transformierte einer durch das periodische Gitter einer Kristallstruktur erzeugten Objektwellenfunktion ergibt selbst ein periodisches Gitter im reziproken Raum. Ist die Probe also in einer Zonenachse orientiert, sodass sich die Elektronenwelle entlang einer symmetrischen Kristallachse ausbreitet, liegt die gesamte Information der Kristallstruktur in einem symmetrischen Punktmuster aus Bragg-Reflexen im Beugungsbild. Auf den zentralen Reflex des Beugungsmusters bei $\mathbf{u} = 0$ fallen demnach die ungebeugten Elektronen, während die Raumfrequenzen der Bragg-Reflexe der gebeugten Elektronen durch den Betrag des Gittervektors $g_{hkl} = \frac{1}{d_{hkl}}$, also dem reziproken Kristallebenenabstand, gegeben sind. Die notwendige Bedingung, für die eine einfallende Elektronenwelle mit dem Wellenvektor \mathbf{k}_0 eine perfekt einkristalline Probe wieder verlassen kann, wird von der Laue-Bedingung abgeleitet und ergibt sich für eine austretende Welle mit Wellenvektor \mathbf{k} zu $\mathbf{k} - \mathbf{k}_0 = \mathbf{g}_{hkl} + \mathbf{s}$, wobei der Anregungsfehler \mathbf{s} miteinfließt.

Neben der genauen Bestimmung von Kristallebenenabständen aus einem Beugungsbild, kann dieses auch zur Untersuchung von Abweichungen von der perfekt einkristallinen Struktur, die beispielsweise durch Versetzungen oder Gitterfehler entstehen, herangezogen werden.

Neben der Amplitudenmodulation $a(\mathbf{r})$ unterliegt die Objektwelle auch einer Phasenmo-

dulation $\varphi(\mathbf{r})$, welche durch das innere Potenzial der Probe $V(\mathbf{r},z)$ hervorgerufen wird. Das dreidimensionale Potenzial verursacht eine Phasenschiebung der durchlaufenden Elektronenwelle, die sowohl von der Ruheenergie E_0 und der kinetischen Energie E_{kin} als auch von der Probendicke t abhängt und sich wie folgt berechnen lässt [73]:

$$\varphi(\mathbf{r}) = \frac{\pi e}{\lambda E_{\text{kin}}} \frac{2(E_0 + E_{\text{kin}})}{2E_0 + E_{\text{kin}}} \int_0^t V(\mathbf{r},z) dz. \quad (2.7)$$

Durch die starke Lokalisation von Ladung an den Atomrümpfen bildet sich ein positives Potenzial gegenüber den durchlaufenden negativ geladenen Strahlelektronen aus. Durch die anziehende Wirkung werden die Strahlelektronen beschleunigt und erhalten damit eine positive Phasenschiebung. Das innere Potenzial wird stark von der Elementzusammensetzung des Probenmaterials beeinflusst und nimmt meist mit steigender Ordnungszahl zu, was auch eine zunehmende Phasenschiebung auf transmittierende Elektronen nach sich zieht. Amorphe und kristalline Materialien ermöglichen die Einführung eines mittleren Potenzials V_{MIP} (MIP), welches als gleichbleibend über die gesamte Probendicke angenommen wird. Mit ihm lässt sich das Integral in Formel 2.7 lösen, sodass für die Phasenschiebung nach Einführung einer Wechselwirkungskonstante C_E vereinfacht angenommen werden kann:

$$\varphi(\mathbf{r}) = \frac{\pi e}{\lambda E} \frac{2(E_0 + E)}{2E_0 + E} \int_0^t V_{\text{MIP}} dz = C_E V_{\text{MIP}} t. \quad (2.8)$$

Eine weitere häufig verwendete Formel zur Bestimmung der durch ein amorphes Material mit einem bestimmtem V_{MIP} verursachten Phasenschiebung drückt die Energien in Formel 2.8, die in die Wechselwirkungskonstanten C_E eingehen, durch die Beschleunigungsspannung U und eine Konstante α aus [103]:

$$\varphi(\mathbf{r}) = \frac{\pi}{\lambda U} \frac{1 + 2\alpha U}{1 + \alpha U} V_{\text{MIP}} t, \quad \alpha = 0.9788 \cdot 10^{-6} \frac{1}{V}. \quad (2.9)$$

2.2.1 Näherung schwacher Phasenobjekte

Besteht ein Probenmaterial aus überwiegend leichten Elementen, wie es beispielsweise bei biologischen Objekten häufig der Fall ist, ist die Amplitudenmodulation der resultierenden Objektwelle vernachlässigbar ($a \approx 0$) und die Phasenschiebung, der die Elektronen unterliegen, nur sehr schwach ($\varphi(\mathbf{r}) \ll 1$). Ein solches Objekt wird auch als schwaches Phasenobjekt (WPO) bezeichnet. Für ein WPO lässt sich die Exponentialfunktion in Formel 2.4 entwickeln, sodass sich für die Objektwellenfunktion die Näherung

$$f(\mathbf{r}) \approx 1 + i\varphi(\mathbf{r}) \quad (2.10)$$

ergibt. Anhand dieser Näherung wird deutlich, dass die Objektwelle über einen gestreuten und einen ungestreuten Anteil verfügt, welche gerade um $\frac{\pi}{2}$ phasenverschoben sind. Eine anschauliche Darstellung der Erzeugung von Phasenkontrast ist anhand des Amplituden- und Phasendiagramms in Abbildung 2.5 möglich. Die schwarzen Vektoren in Abbildung 2.5a entsprechen Real- und Imaginärteil der Objektwellenfunktion. Der gestreute Anteil der Objektwelle befindet sich demnach im Imaginärteil. Die Bildintensität in der TEM-Abbildung entspricht in einer vereinfachten Beschreibung ungefähr dem Betragsquadrat der Objektwellenfunktion, sodass der gestreute Anteil nur in einem quadratischen Term zur Bildintensität beiträgt:

$$I \propto |f(\mathbf{r})|^2 \approx |1 + i\varphi(\mathbf{r})|^2 = 1 + \varphi^2(\mathbf{r}). \quad (2.11)$$

Da die Phasenmodulation der Objektwelle sehr klein ist, entspricht die Intensität der Objektwelle nahezu der Intensität der einlaufenden Welle. Wird der gestreute Anteil einer zusätzlichen relativen Phasenschiebung von $\pm\frac{\pi}{2}$ gegenüber dem ungestreuten Anteil unterzogen, geht die Phasenmodulation der Objektwelle in einem zusätzlichen linearen Term in die Bildintensität ein:

$$I \propto |1 \mp \varphi(\mathbf{r})|^2 = 1 \mp 2\varphi(\mathbf{r}) + \varphi^2(\mathbf{r}). \quad (2.12)$$

Wie durch die roten Pfeile in Abbildung 2.5b,c dargestellt, ergibt sich aus einer positiven relativen Phasenschiebung von $\frac{\pi}{2}$ positiver Phasenkontrast und aus einer negativen relativen Phasenschiebung $-\frac{\pi}{2}$ negativer Phasenkontrast.

Die Berechnung der Bildintensität aus der Objektwellenfunktion ist stark vereinfacht, da das abbildende Linsensystem des Elektronenmikroskops einen maßgebenden Einfluss auf die resultierende Abbildung hat. Eine detaillierte Einsicht in die Bildentstehung wird im nachfolgenden Abschnitt 2.3 gegeben. Es wird anhand der Betrachtungen im Zusammenhang mit Abbildung 2.5 jedoch schnell ersichtlich, dass eine zusätzliche relative Phasenschiebung zwischen dem gestreuten und ungestreuten Anteil der Objektwellenfunktion

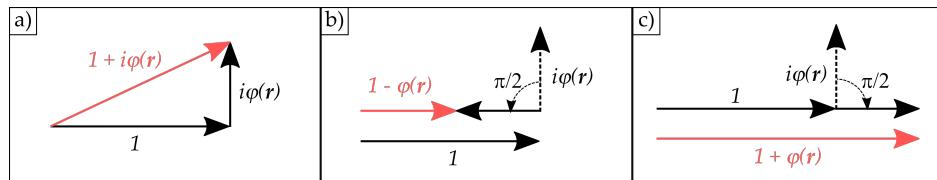


Abbildung 2.5: Amplituden- und Phasendiagramm zur schematischen Darstellung der Objektwelle eines WPO und Phasenkontrast nach [83]. a) Objektwelle ohne Phasenkontrast. b) Positive Phasenschiebung des gestreuten Anteils der Objektwelle führt zu positivem Phasenkontrast. Das Objekt erscheint dunkel auf hellem Hintergrund im Bild. c) Negative Phasenschiebung des gestreuten Anteils der Objektwelle führt zu negativem Phasenkontrast. Das Objekt erscheint hell auf dunklem Hintergrund im Bild.

nötig ist, um die durch das Objekt verursachte Phasenmodulation als Kontrast in der TEM-Abbildung sichtbar zu machen. Diese zusätzliche Phasenschiebung kann durch Defokussieren der Objektivlinse hergestellt werden, was allerdings auf Kosten der Bildauflösung geschieht. Dieses Problem war die hauptsächliche Motivation zur Entwicklung von Phasenplatten für die TEM, deren unterschiedlichen Konzepte in Abschnitt 2.4 beschrieben werden.

2.3 Kontrastübertragung im Transmissionselektronenmikroskop

Die Objektwelle $f(\mathbf{r})$ enthält direkte Informationen über die zu untersuchende Probe im Transmissionselektronenmikroskop, welche ihr in Form von Amplituden- und Phasenmodulation beim Durchlaufen der Probe aufgeprägt wurden. Die Objektwelle lässt sich jedoch nicht direkt untersuchen, da sie durch das abbildende Linsensystem in eine Bildwelle $g(\mathbf{r})$ umgeformt wird. Auf dem Leuchtschirm oder der Kamera des Transmissionselektronenmikroskops verursacht die Bildwelle in den einzelnen Bildpunkten eine Intensität, die gerade ihrem Betragsquadrat entspricht:

$$I(\mathbf{r}) = |g(\mathbf{r})|^2. \quad (2.13)$$

Der Kontrast C beschreibt die Bildintensität I eines Bildpunktes im Verhältnis zu einer Bezugsintensität I_0 :

$$C = \frac{I - I_0}{I_0} \quad (2.14)$$

Als Bezugsintensität eignet sich ein Vakuumbereich im Bild oder ein gleichmäßig heller Bereich eines Trägerfilmes, auf dem sich das zu untersuchende Objekt befindet. Die Propagation der Objektwelle durch das abbildende Linsensystem lässt sich mathematisch durch einen zweistufigen Prozess beschreiben. Wie bereits erwähnt, lässt sich das von der Objektivlinse in der BFP erzeugte Beugungsbild gemäß Gleichung 2.6 als Fourier-transformierte der Objektwelle $F(\mathbf{u})$ ausdrücken. Während eine Rücktransformation für ein ideales Linsensystem wieder zur Objektwelle selbst führen würde, ist ein reales Linsensystem von Linsenfehlern (Aberrationen), einer eventuell eingesetzten Objektivblende und einer Dämpfung durch partielle Kohärenz geprägt. Die gesamte Modulation der Objektwelle durch das abbildende Linsensystem ist darüber hinaus abhängig von der Raumfrequenz \mathbf{u} und kann durch die Kontrasttransferfunktion (CTF) $H(\mathbf{u})$ angegeben werden, die auf die Fourier-transformierte der Objektwelle wirkt:

$$G(\mathbf{u}) = F(\mathbf{u}) \cdot H(\mathbf{u}). \quad (2.15)$$

Durch Rücktransformation in den Ortsraum ergibt sich schließlich die Bildwelle, welche gerade der Faltung der Objektwelle mit der Fourier-transformierten $h(\mathbf{r})$ der CTF entspricht:

$$g(\mathbf{r}) = f(\mathbf{r}) \otimes h(\mathbf{r}). \quad (2.16)$$

Die Funktion $h(r)$ wird auch als Punktspreizfunktion PSF bezeichnet und ordnet der Objektwelle in jedem Punkt ein durch das Linsensystem verursachtes Fehlerscheibchen im Bild zu.

Wie oben bereits angedeutet, lassen sich die Eigenschaften der CTF auf drei Ursachen zurückführen, sodass sie in drei separate Terme zerlegt werden kann. Die Modulation durch Linsenfehler des abbildenden Systems lässt sich durch die Aberrationsfunktion $B(\mathbf{u})$ beschreiben, während der Einfluss der Objektivblende über die Aperturfunktion $A(\mathbf{u})$ und die Dämpfung durch partielle Kohärenz der Elektronen über die Dämpfungsfunktion $E(\mathbf{u})$ beschrieben wird. Demnach gilt für die CTF:

$$H(\mathbf{u}) = B(\mathbf{u})A(\mathbf{u})E(\mathbf{u}) \quad (2.17)$$

Die einzelnen Anteile der CTF sollen im Folgenden genauer beschrieben werden.

2.3.1 Die Aberrationsfunktion

Die Linsenfehler des abbildenden Systems prägen der Elektronenwelle eine raumfrequenz-abhängige Phasenschiebung auf. Bei der Bildaufnahme auf dem Schirm oder mit der Kamera gehen Informationen über die Phasenschiebung durch das Linsensystem und die Phase der Objektwelle wiederum verloren. Den stärksten Einfluss haben dabei die Linsenfehler der Objektivlinse, die bei der Erstellung des ersten Zwischenbildes wirken. Der Einfluss des nachvergrößernden Projektivlinsensystems ist um den Vergrößerungsfaktor der Objektivlinse abgeschwächt und in den meisten Fällen vernachlässigbar. Das liegt daran, dass der Einfluss der Linsenfehler mit zunehmendem Streuwinkel zunimmt und die Streuwinkel für das Projektivlinsensystem um den Vergrößerungsfaktor der Objektivlinse verkleinert sind. Die Aberrationen der Objektivlinse gehen über die Wellenaberrationsfunktion $\chi(\mathbf{u})$ in einer komplexen Exponentialfunktion in die Aberrationsfunktion $B(\mathbf{u})$ ein:

$$B(\mathbf{u}) = e^{-i\chi(\mathbf{u})} \quad (2.18)$$

Anhand der komplexen Exponentialfunktion wird auch deutlich, dass das Linsensystem ausschließlich auf die Phase der Objektwellenfunktion wirkt. Einen starken Einfluss auf die Wellenaberrationsfunktion hat dabei die sphärische Aberration, die auch als Öffnungsfehler der Linse bezeichnet wird. Durch sie werden Elektronen bei unterschiedlichen Einfallswinkel

keln in die Linse in unterschiedliche Ebenen fokussiert und erhalten dadurch in der Kameraebene eine zusätzliche Phasenschiebung. Die Stärke der sphärischen Aberration wird durch

$$\chi_{C_S}(u) = \frac{\pi}{2} C_S \lambda^3 u^4 \quad (2.19)$$

angegeben, wobei C_S die sphärische Aberrationskonstante ist [104].

Der Defokus Δf stellt eine weitere Aberration dar. Er entsteht wenn die Objektivlinse nicht genau auf die Objektebene fokussiert ist, z.B. durch eine Änderung der Probenposition oder einem nicht optimal eingestellten Linsenstrom. Auch durch den Defokus wird der Elektronenwelle eine zusätzliche Phasenschiebung aufgeprägt:

$$\chi_{\Delta f}(u) = \pi \Delta f \lambda u^2 \quad (2.20)$$

Die gesamte Wellenaberrationsfunktion setzt sich dann aus den einzelnen Anteilen zusammen:

$$\chi(u) = \pi \Delta f \lambda u^2 + \frac{\pi}{2} C_S \lambda^3 u^4. \quad (2.21)$$

Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass noch zahlreiche weitere Faktoren die Wellenaberrationsfunktion beeinflussen. So ist hier zum Beispiel der zweizählige Astigmatismus oder das axiale Koma zu nennen. Sowohl der Astigmatismus als auch das Koma wird durch eine sorgfältige Justage des Mikroskops möglichst gering gehalten, sodass sie nur einen untergeordneten Einfluss gegenüber der sphärischen Aberration haben und nur bei sehr hohen Vergrößerungen eine Rolle spielen. Da im Rahmen der Arbeit hauptsächlich bei geringer Mikroskopvergrößerung gearbeitet wurde, wird an dieser Stelle nicht weiter auf diese Aberrationen eingegangen. Es sei darüber hinaus noch erwähnt, dass die sphärische Aberration durch eine spezielle Elektronenoptik korrigiert werden kann [42]. Die für diese Arbeit verwendeten Mikroskope (siehe Abschnitt 2.1) sind allerdings nicht mit einem derartigen C_S -Korrektor ausgestattet.

2.3.2 Die Aperturfunktion

Anhand der Aperturfunktion $A(u)$ kann die Objektivblende in der BFP beschrieben werden, durch welche Raumfrequenzen oberhalb einer Grenzfrequenz u_G abgeschnitten werden:

$$A(\mathbf{u}) = \begin{cases} 1, & |\mathbf{u}| \leq u_G \\ 0, & \text{sonst.} \end{cases} \quad (2.22)$$

Für die Berechnung der Grenzfrequenz einer Blende mit dem Radius r_B gilt:

$$u_G = \frac{r_B}{\lambda \cdot f}. \quad (2.23)$$

Häufig kann die Aperturfunktion außer Acht gelassen werden, da die CTF gerade bei großen Vergrößerungen durch Einfluss der Dämpfung bereits unter der Grenzfrequenz stark abgefallen ist.

2.3.3 Dämpfung durch partielle Kohärenz

Auf den Wellencharakter von Elektronen wurde bereits in Abschnitt 2.2 in Kontext mit Gleichung 2.1 eingegangen. Ein typisches für Wellen geltendes Phänomen ist die Kohärenz. Ein aus einer Elektronenquelle emittiertes Elektron ist naturgemäß mit sich selbst kohärent. Werden mehrere Elektronen aus der Quelle emittiert, unterscheiden dieses sich zu einem gewissen Maße in ihrer Energie und dem Winkel, unter dem sie abgestrahlt werden. Dies führt letztendlich zu geringfügigen Abweichungen der Bildwellen eines jeden einzelnen Elektrons. Hinzu kommt, dass jede Bildwelle minimalen Schwankungen der Linsenströme des abbildenden Systems ausgesetzt ist und so jede einzelne Bildwelle unter leicht unterschiedlichen Abbildungsbedingungen durch das Linsensystem des Mikroskops propagiert. Bei der TEM-Aufnahme werden die Bildwellen der einzelnen Elektronen, die unter leicht unterschiedlichen Bedingungen erzeugt wurden, inkohärent aufsummiert. Die Bildwellen selbst bestehen dabei aus einer kohärenten Überlagerung ihrer ungestreuten und gestreuten Anteile. Dieses Phänomen wird auch als partielle Kohärenz beschrieben. Man unterteilt dabei die Schwankungen, denen das abbildende System des Mikroskops unterliegt, in räumliche und zeitliche Faktoren. Die Dämpfungsfunktion der partiellen Kohärenz $E(\mathbf{u})$ kann demnach durch räumliche (engl. *spatial*) Kohärenz $E_s(\mathbf{u})$ und zeitliche (engl. *temporal*) Kohärenz $E_t(\mathbf{u})$ ausgedrückt werden [34]:

$$E(\mathbf{u}) = E_s(\mathbf{u}) \cdot E_t(\mathbf{u}). \quad (2.24)$$

Eine reale Elektronenquelle emittiert Elektronen durch ihre räumliche Ausdehnung unter leicht unterschiedlichen Winkeln, sodass diese unter einem gewissen Winkel zur optischen Achse auf die Probe treffen. Diese Abweichung wird durch den Semikonvergenzwinkel β_0 beschrieben. Das Resultat ist eine raumfrequenzabhängige Dämpfung, die als räumliche Envelope E_s bezeichnet wird. Für eine gaußförmige Winkelverteilung mit Halbwertsbreite β_0 gilt:

$$E_s(\mathbf{u}) = \exp \left[\left(\frac{\beta_0}{2\lambda} \right)^2 \left(\frac{\partial \chi(\mathbf{u})}{\partial u} \right)^2 \right] = \exp \left[- \left(\frac{\pi \beta_0}{\lambda} \right)^2 (\Delta f \lambda u + C_S \lambda^3 u^3)^2 \right]. \quad (2.25)$$

Aus Schwankungen des Linsenstroms I_L , der Beschleunigungsspannung U und der Breite der Energieverteilung der Elektronen E_e beim Austritt aus der Quelle entsteht die partielle

zeitliche Kohärenz. Die genannten Schwankungen führen zur Abweichung δ des Fokuswertes gemäß der Gleichung:

$$\delta = C_C \sqrt{4 \left(\frac{\sigma(I_L)}{I_L} \right)^2 + \left(\frac{\sigma(U)}{U} \right)^2 + \left(\frac{\sigma(E_e)}{E_e} \right)^2}. \quad (2.26)$$

Dabei bezeichnet σ die einzelnen Schwankungen von I_L , U und E_e . Der Faktor C_C beschreibt die Konstante der chromatischen Aberration der Objektivlinse. Die durch die zeitliche partielle Kohärenz hervorgerufene Dämpfungsfunktion ergibt sich zu:

$$E_t(\mathbf{u}) = \exp \left[-\frac{\delta^2}{2} \left(\frac{\partial \chi(\mathbf{u})}{\partial \Delta f} \right)^2 \right] = \exp \left[-\frac{1}{2} (\pi \lambda \delta u^2)^2 \right]. \quad (2.27)$$

Aus den Gleichungen wird ersichtlich, dass über den Einfluss des Defokuswertes die Dämpfungsfunktion der räumlichen partiellen Kohärenz optimiert werden kann, während die Dämpfungsfunktion der zeitlichen partiellen Kohärenz einzig von den Parametern des Mikroskops abhängt.

2.3.4 Die Phasenkontrasttransferfunktion

Betrachtet man ausschließlich WPO welche die in Abschnitt 2.2.1 beschriebene Näherung erfüllen, kann die CTF in die Phasenkontrasttransferfunktion (PCTF) umgewandelt werden. Die PCTF ermöglicht einen anschaulicheren Zugang zum Kontrasttransfer in einem Transmissionselektronenmikroskop. Eine Herleitung der PCTF erfolgt nach [81, 104]. Nach den Gleichungen 2.13 und 2.16 ergibt sich für die Intensität unter Berücksichtigung der WPO-Näherung aus Gleichung 2.10:

$$I(\mathbf{r}) = |g(\mathbf{r})|^2 = |f(\mathbf{r}) \otimes h(\mathbf{r})|^2 = |1 \otimes h(\mathbf{r}) + i\varphi(\mathbf{r}) \otimes h((\mathbf{r}))|^2. \quad (2.28)$$

Nach dem Faltungstheorem kann die Faltung zweier Funktionen als das Produkt ihrer Fouriertransformierten ausgedrückt werden, sodass

$$1 \otimes h(\mathbf{r}) = \mathcal{F}^{-1} \left[\delta(\mathbf{u}) \cdot e^{-i\chi(u)} \right] = 1 \quad (2.29)$$

angenommen werden kann. Die Fourier-transformierte der 1 ergibt dabei gerade die Deltafunktion $\delta(\mathbf{u})$. Damit kann die Intensität als

$$I(\mathbf{r}) = 1 + \varphi(\mathbf{r}) \otimes i [h(\mathbf{r}) - h^*(\mathbf{r})] + \mathcal{O}(\varphi^2) = 1 - \varphi(\mathbf{r}) \otimes 2 \cdot \text{Im}[h(\mathbf{r})] + \mathcal{O}(\varphi^2), \quad (2.30)$$

mit der komplex Konjugierten der PSF $h^*(\mathbf{r})$, ausgedrückt werden. Da ein WPO nur eine schwache Phasenschiebung $\varphi(\mathbf{r})$ verursacht, können die quadratischen Terme vernachlässigt werden. Für die Fourier-transformierte der Bildintensität ergibt sich unter nochmaliger Verwendung des Faltungstheorems:

$$I(\mathbf{u}) = \delta(\mathbf{u}) - \varphi(\mathbf{u}) \cdot 2 \cdot \text{Im} [H(\mathbf{u})]. \quad (2.31)$$

Unter Berücksichtigung der Symmetrie zwischen Real- und Imaginärteil der PSF $h(\mathbf{r})$ [99] gilt:

$$\text{Im} [H(\mathbf{u})] = \mathcal{F} [\text{Im} [h(\mathbf{r})]]. \quad (2.32)$$

Demzufolge charakterisiert der Imaginärteil der CTF $H(\mathbf{u})$ bei Vorliegen eines WPO die Weitergabe der Phaseninformation im optischen System des Mikroskops in Abhängigkeit von der Raumfrequenz \mathbf{u} und definiert daher die sogenannte Phasenkontrasttransferfunktion PCTF $T(\mathbf{u})$:

$$T(\mathbf{u}) = -2 \cdot \text{Im} [H(\mathbf{u})] = 2 \sin (\chi(\mathbf{u})) A(\mathbf{u}) E(\mathbf{u}). \quad (2.33)$$

Anhand der PCTF kann also berechnet werden, wie stark die Phaseninformation eines Objektes mit einer bestimmten Raumfrequenz \mathbf{u} zur Bildintensität beiträgt. Für die Bildintensität $\tilde{I}(\mathbf{u})$ in Abhängigkeit der Raumfrequenzen \mathbf{u} gilt unter Berücksichtigung der WPO-Näherung in Gleichung 2.10 [104]:

$$\tilde{I}(\mathbf{u}) = \mathcal{F} (I(\mathbf{r})) = 1 + T(\mathbf{u}) \tilde{\varphi}(\mathbf{u}) = 1 + 2 \sin (\chi(\mathbf{u})) A(\mathbf{u}) E(\mathbf{u}) \tilde{\varphi}(\mathbf{u}) \quad (2.34)$$

Wird die Dämpfungsfunktion $E(\mathbf{u})$ und die Aperturfunktion $A(\mathbf{u})$ vernachlässigt, hängt die PCTF allein vom Sinus der Wellenaberrationsfunktion $\chi(\mathbf{u})$ in Gleichung 2.21 ab und ist damit eine oszillierende Funktion, welche Werte zwischen +2 und -2 annimmt. Dementsprechend erscheint die Bildinformation eines Teils der Raumfrequenzen mit positivem (hellem) Kontrast in der TEM-Abbildung, während andere Raumfrequenzen negativen (dunklen) Kontrast zeigen. Durch den sinusförmigen Verlauf der PCTF werden die Bildinformationen großer Strukturen mit kleinen Raumfrequenzen nur schwach übertragen und gehen für $|\mathbf{u}| \approx 0$ nahezu vollständig verloren, während sie für kleine Strukturen mit betragsmäßig größeren Raumfrequenzen gut übertragen werden. Der erste Nulldurchgang der PCTF wird als Punktauflösung des Transmissionselektronenmikroskops bezeichnet und gibt die Raumfrequenz an, bis zu der der Kontrast im entstehenden Bild direkt interpretierbar ist. Für Raumfrequenzen oberhalb der Punktauflösung wird der Kontrast in der Regel vom oszillierenden Charakter der PCTF dominiert.

Eine häufig angewandte Methode zur Verbesserung der Kontrastübertragung von Bildinformationen eines WPO bei niedrigen Raumfrequenzen ist die Defokussierung der Objektivlinse. Dabei verschiebt sich die Punktauflösung zu niedrigeren Raumfrequenzen, was

Tabelle 2.1: Ausgewählte Parameter der im Rahmen der Arbeit verwendeten Transmissionselektronenmikroskope.

Mikroskopparameter	CM200	JEM-3200 (OL-/SA-MAG-Modus)
Sphärische Aberration C_S	1,2 mm	5,2 mm/5,29 mm
Chromatische Aberration C_C	1,2 mm	3,9 mm/4,19 mm
Kathodentyp	FEG	FEG
Focal spread δ	6,5 nm	8 nm
Semikonvergenzwinkel β_0	0,2 mrad	0,4 mrad
Hochspannung U	200 kV	300 kV
Wellenlänge λ	2,51 pm	1,97 pm
Scherzer-Defokus Δf_S	-63 nm	-117 nm/-118 nm
Optimaler PP-Defokus Δf_{PP}	-40 nm	-74 nm

gleichzeitig zu einem schnelleren Anstieg der PCTF in der Nähe von $|\mathbf{u}| \approx 0$ führt. Eine Verschlechterung der Bildqualität durch die verringerte Punktauflösung ist bei dieser Methode jedoch als nachteilig anzusehen. Des Weiteren treten in defokussierten Abbildungen sogenannte Fresnel-Säume an den Grenzen der abgebildeten Objekte auf.

Bei einem geschickt gewählten Defokuswert lässt sich der Verlauf der PCTF soweit optimieren, dass möglichst viele Raumfrequenzen mit gutem Kontrast übertragen werden. Scherzer fand im Jahre 1949 heraus, dass ein idealer Kontrastübertrag erzielt werden kann, wenn die als Argument der Sinusfunktion in die PCTF eingehende Wellenaberrationsfunktion $\chi(\mathbf{u})$ über einen möglichst großen Raumfrequenzbereich Werte in der Nähe von $\frac{\pi}{2}$ annimmt [86]. Um das zu erreichen, muss die Wellenaberrationsfunktion die beiden folgenden Bedingungen erfüllen:

$$\chi(\mathbf{u}) = -\frac{2\pi}{3} \quad \text{und} \quad \frac{d\chi(\mathbf{u})}{d\mathbf{u}} = 0. \quad (2.35)$$

Mit der Wellenaberrationsfunktion in Gleichung 2.21 ergibt sich damit für den sogenannten Scherzer-Defokus

$$\Delta f_S = -\sqrt{\frac{4}{3}C_S\lambda}, \quad (2.36)$$

welcher sich durch sein negatives Vorzeichen im Bereich des Unterfokus befindet und dem positiven Term, der die sphärische Aberration beinhaltet, teilweise entgegenwirkt. Die wichtigsten Parameter der im Rahmen der Arbeit verwendeten Transmissionselektronenmikroskope sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Eine grafische Darstellung der PCTF $T(u)$ (blau) aus Gleichung 2.33 und der Dämpfungsfunktion $E(u)$ (rot) bei verschiedenen Defokuswerten für das JEOL JEM-3200 und das Philips CM200 ist in Abbildung 2.6 gezeigt. Da sich die elektronenoptischen Parameter des JEOL JEM-3200 (siehe Tabelle 2.1) bei Betrieb im SA-MAG-Modus nur schwach vom OL-Modus unterscheiden, wird für die Berechnung der PCTF vom OL-Modus ausgegangen. Es sei jedoch erwähnt, dass aufgrund der Verwendung der Objektivminilinse als Transfer-

linse im SA-MAG-Modus nur Mikroskopvergrößerungen bis 22 kx erzielt werden können. Abbildung 2.6a,b zeigt die PCTF bei dem jeweiligen Scherzer-Defokus Δf_S für a) das JEOL JEM-3200 ($\Delta f_S = -117 \text{ nm}$) und b) das Philips CM200 ($\Delta f_S = -63 \text{ nm}$). Beide Kurven zeigen ein breites Raumfrequenzband mit gutem Kontrasttransfer bis zum ersten Nulldurchgang der PCTF. Bei der PCTF für das JEOL JEM-3200 liegt sowohl die Punktauflösung als auch das Informationslimit, an welchem der Kontrasttransfer durch die Dämpfungsfunktion auf Null abgefallen ist, bei einer etwas niedrigeren Raumfrequenz als für das Philips CM200. Dies lässt sich durch den deutlich höheren C_S -Wert des JEOL JEM-3200 erklären (siehe Tabelle 2.1). Abbildung 2.6c,d zeigt die PCTF der beiden Mikroskope für einen Unterfokus von $\Delta f = -1000 \text{ nm}$, die im Vergleich mit der PCTF des jeweiligen Gerätes bei Scherzer-Defokus (siehe Abbildung 2.6a,b) einen deutlich steileren Anstieg bei niedrigen Raumfrequenzen aufweist. Gleichzeitig wird aber auch die Punktauflösung und das Informationslimit stark verringert. Bei der Wahl eines Überfokus von $\Delta f_S = 500 \mu\text{m}$ (siehe Abbildung 2.6e,f) beginnt die PCTF mit einem invertierten Vorzeichen bei sonst ähnlichem Verlauf. Dementsprechend kann durch geeignete Wahl des Defokus eine Kontrastumkehr der Phaseninformation in der Abbildung erreicht werden.

Wie im Kontext der Abbildung 2.6 anschaulich beschrieben, ist die Defokussierung der Objektivlinse eine brauchbare Methode zur Verstärkung des Kontrasttransfers bei niedrigen Raumfrequenzen, die allerdings gleichzeitig einige Nachteile mit sich bringt. Aufgrund der Nullstelle der sinusförmigen PCTF bei $u = 0$ ist der Kontrasttransfer kleiner Raumfrequenzen notwendigerweise schlecht. Mit einer möglichst hohen Defokussierung kann ein deutlich steilerer Anstieg der PCTF ermöglicht werden, was aber unausweichlich zur Verschlechterung der Auflösung und Verstärkung der Dämpfung durch partielle Kohärenz führt. Beispielsweise liegt die Punktauflösung des JEOL JEM-3200 bei einem Unterfokus von $\Delta f = -1000 \text{ nm}$ bei unter 1 nm^{-1} (siehe Abbildung 2.6c), während sie bei Scherzer-Defokus bei etwa $3,5 \text{ nm}^{-1}$ liegt. Darüber hinaus kommt es in der TEM-Abbildung bei starkem Defokus zu einer Delokalisierung der Bildinformation bei hohen Raumfrequenzen. Dies führt zu einer Missinterpretation der Abbildung, da die Position der darin enthaltenen Bildinformation von der realen Position im abgebildeten Objekt abweicht. Da die Delokalisation in erster Linie von der Steigung der PCTF abhängt [72], nimmt sie mit zunehmendem Defokus zu und betrifft besonders die hohen Raumfrequenzen oberhalb der Punktauflösung stark. Einen guten Kontrasttransfer bei niedrigen Raumfrequenzen zu erreichen und dabei die nachteiligen Effekte der Defokussierung zu vermeiden war eine der Hauptmotivationen zur Entwicklung von PP für die TEM [8], deren Konzepte in Abschnitt 2.4 detailliert besprochen werden.

Aufgrund des durch die PCTF definierten Kontrasttransfers, mit gut und schlecht übertragenen Raumfrequenzen, ist es anhand einer einzigen TEM-Aufnahme nicht möglich, die komplette Information des abgebildeten Objekts bis zum von der partiellen Kohärenz bestimmten Informationslimit vollständig zu gewinnen. Verschiedene Techniken ermöglichen

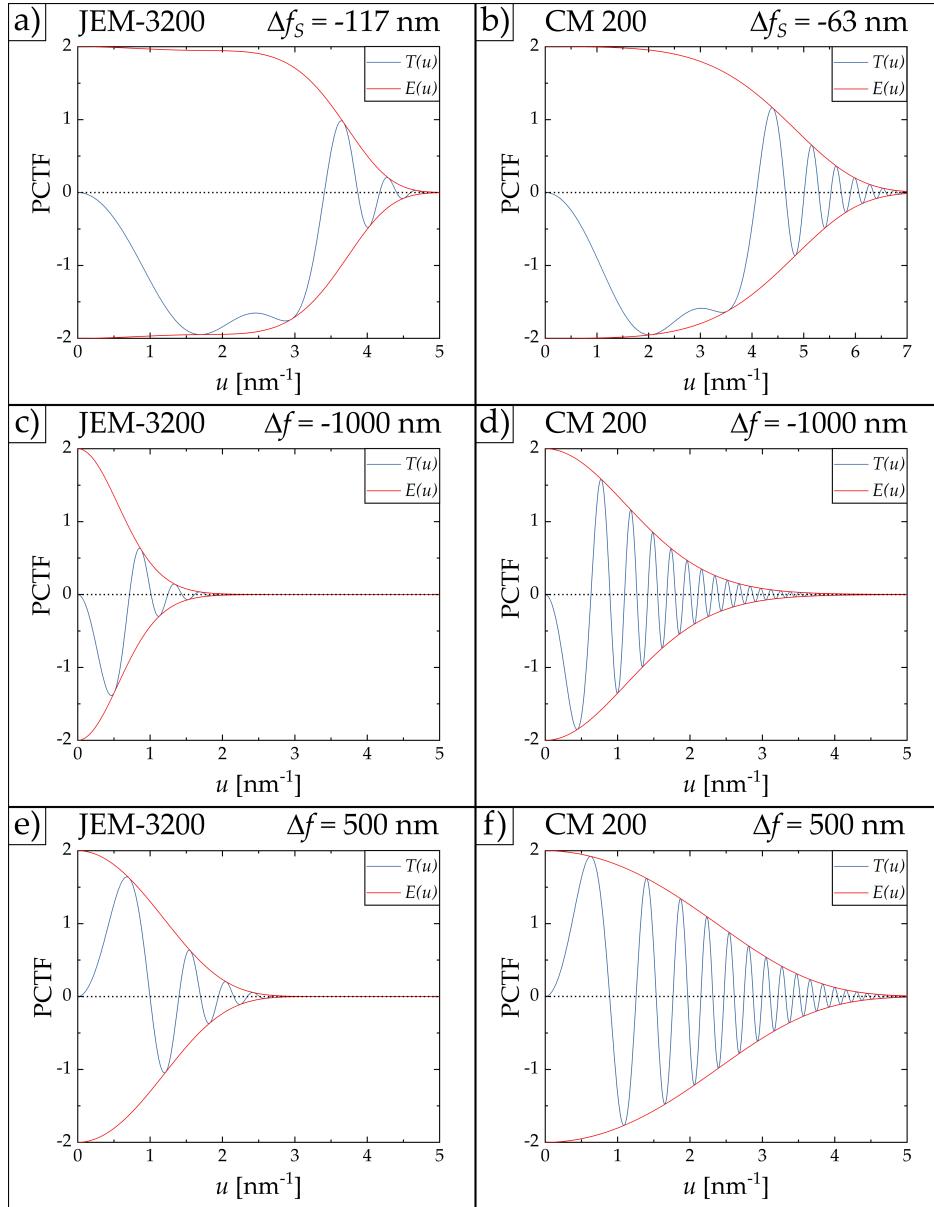


Abbildung 2.6: Grafische Darstellung der PCTF $T(u)$ (blau) unter Berücksichtigung der Dämpfungsfunktion $E(u)$ (rot) für a,c,e) das JEOL JEM-3200 und b,d,f) das Philips CM200 bei verschiedenen Defokuswerten. a,b) PCTF bei dem gerätespezifischem Scherzer-Defokus von a) $\Delta f_S = -117 \text{ nm}$ und b) $\Delta f_S = -63 \text{ nm}$. Ein möglichst großer Raumfrequenzbereich wird mit gutem Kontrast übertragen. c,d) PCTF bei einem Unterfokus von $\Delta f = -1000 \text{ nm}$. Der Kontrasttransfer niedriger Raumfrequenzen ist erhöht, während sich die Punktauflösung zu niedrigeren Raumfrequenzen verschiebt. e,f) PCTF bei einem Überfokus von $\Delta f = 500 \text{ nm}$. Das Vorzeichen der PCTF im Überfokus ist invertiert gegenüber der PCTF im Unterfokus. Zur Darstellung benötigte Mikroskopparameter können Tabelle 2.1 entnommen werden.

es jedoch aus einer Bildserie, die bei unterschiedlichen Bedingungen aufgenommen wurde und unterschiedliche Raumfrequenzbereiche mit gutem Kontrast überträgt, möglichst viel Bildinformation zu generieren. Auf diese Weise lässt sich die Objektwelle nahezu vollständig iterativ rekonstruieren. Neben einer Defokusserie [10] können dazu auch PP-Aufnahmen [13, 45] oder die Methode der Off-Axis-Holografie [63] verwendet werden.

Einen experimentellen Zugang zur PCTF bietet das Diffraktogramm, welches durch Berechnung der Fourier-Transformation der Bildintensität einer TEM-Aufnahme ($\tilde{I}(\mathbf{u}) = \mathcal{F}\{I(\mathbf{r})\}$) erstellt werden kann. Es beinhaltet das Quadrat der PCTF in radialer Darstellung und damit wichtige Informationen über die Wellenaberrationsfunktion $\chi(\mathbf{u})$ und die damit verknüpften Abbildungsbedingungen. Die maximale Raumfrequenz, bis zu der das Diffraktogramm dargestellt wird, ist durch die sogenannte Nyquist-Frequenz $\nu = \frac{1}{2x}$ gegeben, wobei x für die Pixelgröße der verwendeten Kamera bei einer bestimmten Mikroskopvergrößerung steht. An dieser Stelle sei noch erwähnt, dass für Kameras mit fasergekoppelten Szintillatoren in bestimmten Fällen die Modulationstransferfunktion (MTF) berücksichtigt werden muss, welche die Bildintensität von strukturellen Abmessungen der Probe in der Größenordnung der Pixelgröße x einer Dämpfung unterzieht [102].

Abbildung 2.7a zeigt eine TEM-Aufnahme eines amorphen Kohlenstoff(aC)-Films bei einem Unterfokus von -500 nm, welche das typische körnige Erscheinungsbild eines amorphen Materials aufweist. Das zugehörige Diffraktogramm ist geprägt von hellen und dunklen Ringen, die nach F. Thon als Thon-Ringe bezeichnet werden und den Extrema (hell) und Nulldurchgängen (dunkel) der PCTF zuzuordnen sind. Wie die Anzahl der Extrema der PCTF erhöht sich auch die Anzahl der Thon-Ringe bei zunehmender Defokussierung. Bei genauer Kenntnis der sonstigen Mikroskopparameter, kann die Position der Thon-Ringe zur Bestimmung des Defokus sowie der Phasenschiebungs- und Astigmatismus-Werte herangezogen werden (siehe Abschnitt 5.2.1), welche für die Diskussion des entstehenden Kontrasts in einer TEM-Aufnahme eine übergeordnete Rolle spielen.

Da die PCTF nur für den Kontrasttransfer von WPO eine brauchbare Näherung darstellt, muss sorgfältig evaluiert werden, ob die Amplitudeninformation der Objektwelle vernachlässigbar ist ($a(\mathbf{r}) = 0$). Ist dies nicht der Fall, muss eine detailliertere Betrachtung durchgeführt werden, welche sowohl Amplituden- als auch Phaseninformation der Objektwelle bei der Bildentstehung berücksichtigt. Führt das abgebildete Objekt nur zu einer sehr schwachen Amplitudenänderung der transmittierten Elektronenwelle, kann ähnlich der PCTF eine genäherte Kontrasttransferfunktion für die Amplitudeninformation der Objektwelle eingeführt werden, welche proportional zu $2 \cos(\chi)$ verläuft. Aus dem kosinusförmigen Verlauf der Transferfunktion wird direkt ersichtlich, warum Amplitudeninformation auch ohne Defokussierung mit gutem Kontrast übertragen wird.

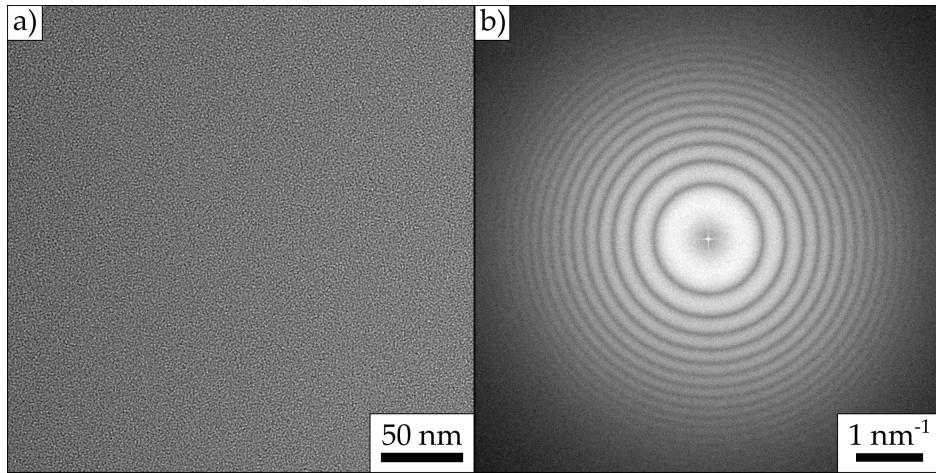


Abbildung 2.7: TEM-Aufnahme eines aC-Films am Philips CM200 und zugehöriges Diffraktogramm. a) Die TEM-Aufnahme bei $\Delta f = -500 \text{ nm}$ zeigt die amorphe Struktur des aC-Films. b) Das zu a) gehörige Diffraktogramm zeigt helle und dunkle Thon-Ringe sowie eine Dämpfung im Bereich hoher Raumfrequenzen.

2.4 Phasenplatten in der Transmissionselektronenmikroskopie

Dieser Abschnitt wird zur Einführung in den Themenbereich der PP für die TEM genutzt. Dabei soll nicht nur auf die theoretische Funktionsweise von physikalischen PP eingegangen werden, sondern auch auf deren historische Entwicklung sowie den aktuellen Stand der Forschung. Aufgrund ihrer besonderen Zweckmäßigkeit haben sich dünnfilmbasierte und elektrostatische PP-Konzepte in der praktischen Anwendung weitestgehend durchgesetzt. Darüber hinaus wurden jedoch bereits einige weitere Ansätze und Ideen zur Realisierung einer PP vorgeschlagen, die in diesem Kapitel kurz aufgezeigt werden.

2.4.1 Theoretische Funktionsweise physikalischer Phasenplatten

Bei der Herleitung der PCTF in Abschnitt 2.3.4 wird ersichtlich, dass die bei kleinen Raumfrequenzen gelegene Phaseninformation von großen Objekten bei der Bildentstehung in der CTEM nur unzureichend übertragen wird. Der Grund dafür ist der sinusförmige Charakter der PCTF und der dadurch geringe Kontrasttransfer bei niedrigen Raumfrequenzen. Der Kontrasttransfer von Phaseninformation bei niedrigen Raumfrequenzen kann jedoch gesteigert werden, wenn eine relative Phasenschiebung φ_{PP} zwischen gestreuten und ungestreuten Elektronen bzw. den jeweiligen Anteilen der Elektronenwelle hergestellt wird. Dadurch verändert sich der Phasenwert in der Exponentialfunktion der Aberrationsfunktion:

$$B(\mathbf{u}) = e^{-i\chi(\mathbf{u})} \cdot e^{i\varphi_{\text{PP}}(\mathbf{u})} = e^{i\chi_{\text{PP}}(\mathbf{u})}. \quad (2.37)$$

Dadurch ergibt sich für die Wellenaberrationsfunktion:

$$\chi_{\text{PP}}(\mathbf{u}) = \pi \Delta f \lambda u^2 + \frac{\pi}{2} C_S \lambda^3 u^4 + \varphi_{\text{PP}}(\mathbf{u}). \quad (2.38)$$

Die Phasenschiebung wird idealerweise so gewählt, dass die Sinusfunktion der PCTF in eine Kosinusfunktion übergeht, was für WPO gerade bei $\pm\pi/2$ der Fall ist:

$$T_{\text{PP}}(\mathbf{u}) = 2 \sin \left(\chi(\mathbf{u}) \pm \frac{\pi}{2} \right) A(\mathbf{u}) E(\mathbf{u}) = 2 \cos(\chi(\mathbf{u})) A(\mathbf{u}) E(\mathbf{u}). \quad (2.39)$$

Für einen optimalen Kontrasttransfer der Bildinformation eines WPO muss eine ideale PP dementsprechend eine Phasenschiebung von entweder

$$\varphi_{\text{PP}}(\mathbf{u}) = \begin{cases} \pm \frac{\pi}{2}, & \mathbf{u} = 0 \\ 0, & |\mathbf{u}| > 0, \end{cases} \quad (2.40)$$

auf die ungestreuten Elektronen im NS oder

$$\varphi_{\text{PP}}(\mathbf{u}) = \begin{cases} \pm \frac{\pi}{2}, & \mathbf{u} = 0 \\ 0, & |\mathbf{u}| > 0, \end{cases} \quad (2.41)$$

auf die gestreuten Elektronen induzieren. Um eine negative relative Phasenschiebung zu erreichen, muss also entweder eine Retardierung der Phase der NS-Elektronen oder eine Avancierung der Phase der gestreuten Elektronen erzielt werden. Abbildung 2.8 zeigt einige Beispiele für die PCTF der verwendeten Geräte JEOL JEM-3200 und Philips CM200 unter Berücksichtigung einer induzierten Phasenschiebung. Schon die Abbildungen 2.8a,b bei Scherzer-Defokus und einer relativen Phasenschiebung von $\varphi_{\text{PP}} = +\frac{\pi}{2}$ zeigen einen starken Kontrasttransfer für kleine Raumfrequenzen und zwar ohne dass eine starke Defokussierung nötig ist. Der von der Phasenschiebung verursachte kosinusförmige Verlauf der PCTF ist klar ersichtlich. Im Gegensatz zu den vergleichbaren Abbildungen 2.6a,b ohne Phasenschiebung fällt jedoch auf, dass der erste Nulldurchgang der PCTF in beiden Graphen bereits bei mittleren Raumfrequenzen liegt, nämlich etwa $1,75 \text{ nm}^{-1}$ für das JEOL JEM-3200 und $2,1 \text{ nm}^{-1}$ für das Philips CM200. Der Scherzer-Defokus ist bei Vorliegen einer zusätzlichen Phasenschiebung nicht mehr als ideal anzusehen, um ein möglichst breites Transferband in der PCTF zu erzielen. Beim Einsatz von PP ist vielmehr ein Defokus von

$$\Delta f_{\text{PP}} = -0,73 \sqrt{C_S \lambda} \quad (2.42)$$

als optimal anzusehen [14]. Dies ergibt für das JEOL JEM-3200 einen Wert von $\Delta f_{\text{PP}} = -74 \text{ nm}$ und für das Philips CM200 einen Wert von $\Delta f_{\text{PP}} = -40 \text{ nm}$. Die zugehörigen PCTF sind in den Abbildungen 2.8c,d dargestellt und zeigen ein breiteres Transferband bis hin zu deutlich höheren Raumfrequenzen. Unter Annahme einer negativen relativen Phasen-

schiebung von $\varphi_{PP} = -\frac{\pi}{2}$ (siehe Abbildungen 2.8e,f) wird das Vorzeichen der PCTF invertiert. Dementsprechend erscheint auch die Bildinformation mit invertiertem Kontrast in der TEM-Abbildung. Bei direktem Vergleich der Abbildungen 2.8c-f mit induzierter Phasenschiebung mit den PCTF ohne Phasenschiebung und bei Scherzer-Defokus in den Abbildungen 2.6a,b wird deutlich, dass der Einsatz von PP mit einer geringfügigen Verschlechterung der Punktauflösung einhergeht. Da das Haupteinsatzgebiet von PP allerdings häufig in der Abbildung von verhältnismäßig großen WPO mit Bildinformation bei sehr kleinen Raumfrequenzen liegt, ist dieser Nachteil nur selten in der Praxis wahrzunehmen.

2.4.2 Historische Entwicklung und Stand der Forschung

Die Problematik des schwachen Kontrasts biologischer Objekte, welche hauptsächlich aus leichten Materialien wie C und H_2O bestehen, bei der Abbildung in einem Transmissionselektronenmikroskop ist so alt wie die im Jahre 1931 erstmals eingesetzte Methode der TEM selbst. Die heute noch überwiegend zur Kontraststeigerung angewandte Defokussierung der Objektivlinse (siehe Abschnitt 2.3.4) bei der Abbildung solcher WPO war ebenfalls früh bekannt. Schon damals wurden die Nachteile dieser Methode, nämlich der Verlust von Auflösungsvermögen und die nicht zu vernachlässigende Delokalisierung von Bildinformationen bei starkem Defokus, die insgesamt zu einer Verschlechterung der Bildqualität führen, äußerst kritisch betrachtet. Ähnliche Probleme waren bereits aus der Lichtmikroskopie bekannt, wenn die Abbildung transparenter Objekte angestrebt wurde. Die von F. Zernike im Jahr 1942 eingeführten $\lambda/4$ -Plättchen [107], die in die BFP des Lichtmikroskops eingebaut werden und gestreute Photonen einer Phasenschiebung von $\pi/2$ unterziehen, boten dabei eine adäquate Abhilfe. H. Boersch zog erstmals 1947 in Betracht, die von Zernike etablierte Methode in der TEM einzusetzen [8]. Als naheliegendste Möglichkeit zur Realisierung einer Phasenschiebung zwischen gestreuten und ungestreuten Elektronen in der BFP eines Transmissionselektronenmikroskops wurden damals schon Dünnfilme oder elektrostatische Felder vorgeschlagen. Die ersten Vorstöße zur Realisierung einer Dünnfilm-PP [5, 54, 79] deuteten eine prinzipielle Machbarkeit an, scheiterten jedoch lange Zeit an mangelhaften Mikrostrukturierungsmöglichkeiten sowie unkontrollierter Aufladung und Kontamination des Dünnfilms in der BFP. Aufgrund einer stetigen Verbesserung der verfügbaren Mikrostrukturierungsmethoden, die eine immer feinere Bearbeitung von Dünnfilmen ermöglichen, und schließlich auch durch die Entwicklung des FIB, konnte eine erste funktionierende Dünnfilm-PP schließlich im Jahre 2001 entwickelt werden [14]. Die Entwickler Danev und Nagayama bezeichneten diesen PP-Typ in Anlehnung an das historische Vorbild als Zernike-PP. Der Aufbau der vorgestellten Zernike-PP basiert auf einem Dünnfilm aus aC, der mit einer genau vorbestimmten Dicke hergestellt wurde, sodass er transmittie-

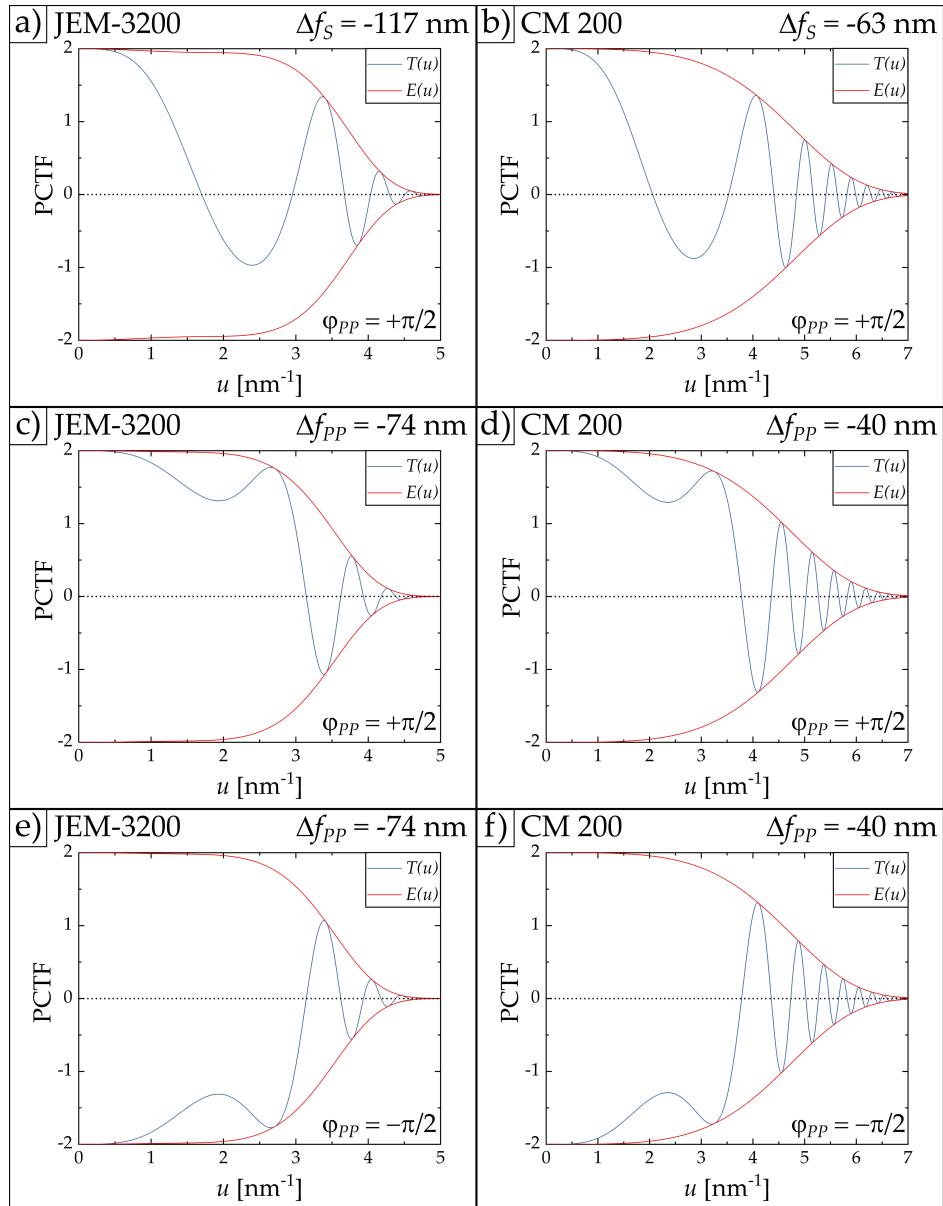


Abbildung 2.8: Grafische Darstellung der PCTF $T(u)$ (blau) unter Berücksichtigung der Dämpfungsfunktion $E(u)$ (rot) und einer zusätzlichen Phasenschiebung φ_{PP} für a,c,e) das JEOL JEM-3200 und b,d,f) das Philips CM200 bei verschiedenen Defokuswerten. a,b) PCTF bei Scherzer-Defokus Δf_S und für eine positive Phasenschiebung von $\varphi_{PP} = +\pi/2$. Aufgrund der zusätzlichen Phasenschiebung hat die PCTF einen kosinusförmigen Verlauf. Die Punktauflösung befindet sich bei mittleren Raumfrequenzen. c,d) PCTF bei einem für die Anwendung von PP optimalem Defokus Δf_{PP} und für eine positive Phasenschiebung von $\varphi_{PP} = +\pi/2$. Ein möglichst großer Raumfrequenzbereich wird mit gutem Kontrast übertragen. e,f) PCTF bei einem für die Anwendung von PP optimalem Defokus und für eine negative Phasenschiebung von $\varphi_{PP} = -\pi/2$. Bei negativer Phasenschiebung verläuft die PCTF mit umgekehrtem Vorzeichen. Zur Darstellung benötigte Mikroskopparameter können Tabelle 2.1 entnommen werden.

renden Elektronen durch das MIP des aC eine Phasenschiebung entsprechend Gleichung 2.9 aufprägt. Der NS wird durch ein FIB-strukturiertes Loch geführt, sodass die Phasenschiebung des Dünnfilmes nur auf die gestreuten Elektronen wirkt. Bei geeigneter Dicke des aC-Films ist das Ergebnis die gewünschte relative Phasenschiebung von $\varphi_{PP} = \frac{\pi}{2}$ zwischen gestreuten und ungestreuten Elektronen in der BFP.

Um das zweite von Boersch vorgeschlagene PP-Konzept zu realisieren, bei dem eine relative Phasenschiebung durch ein elektrostatisches Potenzial in einer Ringelektrode hervorgerufen werden sollte, war ein noch deutlich aufwendigerer Herstellungsprozess nötig. So musste zuerst eine mikroskopisch kleine Elektrodenstruktur hergestellt werden, die zum einen stabil in das Mikroskop implementiert werden kann und zum anderen möglichst wenig Information in der BFP blockiert. Zwar konnte bereits 1996 theoretisch gezeigt werden, dass das elektrostatische Potenzial im von Boersch vorgeschlagenen Ringelektroden-Design eine homogene Phasenschiebung der durchlaufenden Elektronen verursacht [73], die erste experimentelle Realisierung konnte jedoch erst im Jahre 2006 durch Schultheiss et al. am Laboratorium für Elektronenmikroskopie (LEM) des KIT erbracht werden [91].

Die heute gebräuchlichen PP gehen zurück auf die ursprünglich vorgeschlagenen Konzepte und lassen sich auch heute noch überwiegend in filmbasierte (HFPP, Zernike-, Hilbert-PP) und elektrostatische Ansätze (Zach-PP) kategorisieren. Eine schematische Darstellung der vier geläufigsten PP-Konzepte kann Abbildung 2.9 entnommen werden. Eine ideal funktionierende PP gibt es noch nicht und die bereits etablierten PP-Typen bringen allesamt ihre spezifischen Probleme mit sich. Diese sind beispielsweise Aufladung und Kontamination der PP sowie störende Artefakte, die von der intransparenten PP-Struktur in der BFP herrühren. Trotzdem konnten bereits beeindruckende Ergebnisse dank der kontraststeigernden Wirkung von PP erzielt werden, sodass einige Mikroskophersteller sogar kommerziell erwerbbare PP-Systeme für ihre Mikroskope anbieten, die meist auf dem Konzept der Zernike-PP oder der HFPP beruhen. Im Folgenden werden die filmbasierten und elektrostatischen PP-Konzepte genauer beleuchtet und der aktuelle Stand der Forschung vorgestellt. Darüber hinaus wird ein kurzer Überblick über weitere vielversprechende Ideen zur Realisierung einer PP gegeben.

Filmbasierte Phasenplatten

Filmbasierte PP nutzen das MIP eines strukturierten Dünnfilmes aus, um eine Phasenschiebung zu erzeugen. Die Phasenschiebung die den durchlaufenden Elektronen aufgeprägt wird, ist stark abhängig von ihrer Energie sowie der Dicke und dem Material des verwendeten Films. Sie kann mittels Gleichung 2.9 berechnet werden. Als Material kommt häufig gut leitfähiger aC zum Einsatz, welcher durch ein verhältnismäßig geringes MIP von

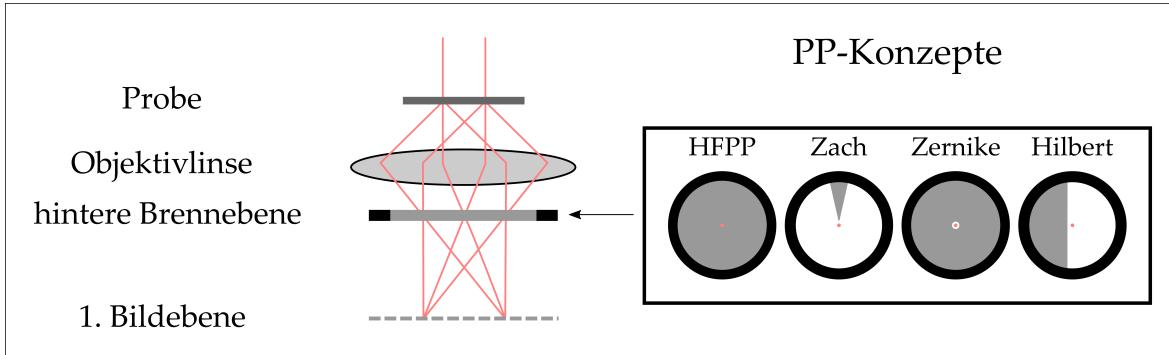


Abbildung 2.9: Zusammenfassung der gängigen PP-Konzepte. Die physikalische PP wird in die BFP des Mikroskops eingebracht und verursacht eine Phasenschiebung zwischen ungestreuten und gestreuten Elektronen. Die schematisch dargestellten PP-Konzepte lassen sich in strukturierte (Zernike, Hilbert) und unstrukturierte (HFPP) filmbasierte PP sowie elektrostatische (Zach) PP kategorisieren.

$V_{\text{MIP}} \approx 9 \text{ V}$ charakterisiert ist [14]. Die auch heute noch gebräuchlichste Form einer strukturierten Dünnfilm-PP ist die in Abbildung 2.10a dargestellte Zernike-PP, bei der ungestreute NS-Elektronen durch ein mikrostrukturiertes Loch im Dünnfilm geführt werden, sodass nur die gestreuten Elektronen eine Phasenschiebung beim Durchlaufen des Dünnfilmes erfahren. Bei einer idealen PP würden alle gestreuten Elektronen eine Phasenschiebung erfahren und alle ungestreuten Elektronen von der PP unberührt bleiben. Aufgrund des endlichen NS-Durchmessers, muss das Loch der Zernike-PP jedoch groß genug gewählt werden, um den NS nicht zu blockieren.

Aus diesem Grund transmittiert auch immer ein gewisser Anteil an gestreuten Elektronen, sodass erst Elektronen ab einer gewissen *Cut-on-Frequenz* u_C die angestrebte Phasenschiebung erhalten. Die Phasenschiebung der Zernike-PP in Abhängigkeit von der Raumfrequenz ist gegeben durch:

$$\varphi_{\text{PP},\text{Zernike}} = \begin{cases} 0, & u < u_C \\ \frac{\pi}{2}, & u \geq u_C. \end{cases} \quad (2.43)$$

Die *Cut-on-Frequenz* u_C kann anhand des Durchmessers der Zernike-PP durch Gleichung 2.23 berechnet werden. Raumfrequenzen unterhalb der *Cut-on-Frequenz* erfahren demnach keine Phasenschiebung und profitieren dadurch nicht von einer Kontrastverstärkung durch die Zernike-PP.

Eine weitere Variante einer Dünnfilm-PP ist die sogenannte Hilbert-PP (siehe Abbildung 2.10b,c), bei der die gestreuten Elektronen in der BFP durch einen Dünnfilm laufen, der lediglich einen Halbraum abdeckt. Die Dicke des Filmes muss so dimensioniert werden, dass die Phasenschiebung $\varphi_{\text{PP}} = \pi$ beträgt [15, 19]:

$$\varphi_{\text{PP},\text{Hilbert}} = \begin{cases} 0, & u < u_C \\ \pi, & u \geq u_C. \end{cases} \quad (2.44)$$

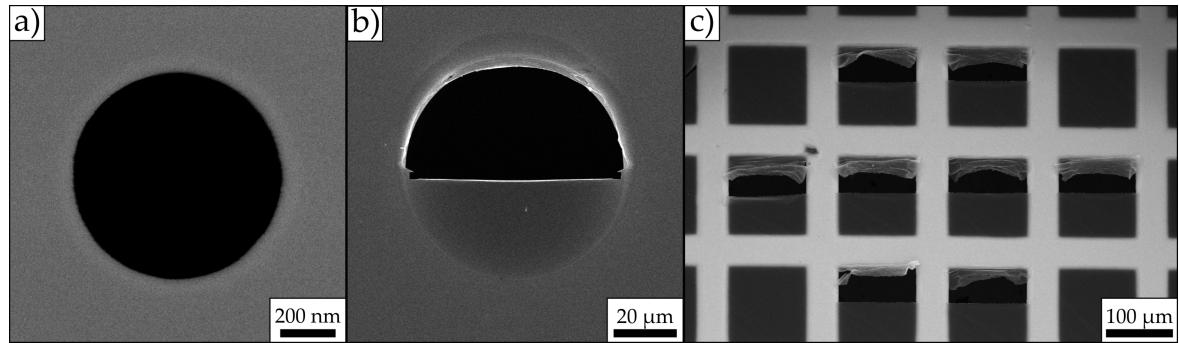


Abbildung 2.10: REM-Aufnahmen mit SE von filmbasierten PP. a) Eine Zernike-PP mit einem Lochdurchmesser von 750 nm. b) Hilbert-PP, die über den kompletten Durchmesser einer Pt-Blende mit einem Lochdurchmesser von 70 µm strukturiert wurde. c) Acht Hilbert-PP, die zwischen einzelne Maschen eines Au-Netzes in einen dünnen aC-Film strukturiert wurden. Die Maschenweite ist 100 µm.

Durch die asymmetrische PP-Struktur ist eine Phasenschiebung von $\varphi_{\text{PP}} = \pi$ nötig, damit ein kosinusförmiger Verlauf der PCTF entsteht.

Dünnfilm-PP sind relativ einfach herzustellen und die Implementation in das Transmissionselektronenmikroskop ist mit vergleichsweise wenig Aufwand durchführbar. Zudem konnten bereits einige Ergebnisse veröffentlicht werden, bei denen gerade die Zernike-PP zu einer erheblichen Kontraststeigerung von biologischen Objekten führte [11, 17, 37].

Trotzdem geht die Verwendung von Dünnfilm-PP auch mit einigen Nachteilen einher, die vorwiegend die Bildqualität der aufgenommenen TEM-Abbildungen betrifft. Beispielsweise degradiert der Dünnfilm nach ein paar Stunden Benutzung im Mikroskop relativ rasch und muss regelmäßig ausgetauscht werden. Die Beleuchtung mit hochenergetischen Elektronen führt zu Kontamination und elektrostatischer Aufladung, welche die angestrebte Phasenschiebung der PP negativ beeinflusst [20, 23, 24]. Die Verwendung alternativer Materialien zur Dünnfilm-Herstellung [30–32, 70] sowie einer Heizung, die die PP während des Einsatzes bei erhöhten Temperaturen hält und Kontamination entgegenwirkt [20], hat sich zur Verlängerung der möglichen Anwendungsdauer als hilfreich erwiesen.

Ein weiteres Problem, das der Einsatz von strukturierten Dünnfilm-PP wie der Zernike-PP mit sich bringt, ist die oben erwähnte *Cut-on*-Frequenz. Sie limitiert die maximale Größe der Objekte, die mit Phasenkontrast abgebildet werden können. Darüber hinaus sorgt die abrupte Kante des Zernike-PP-Loches und der damit verbundene abrupte Anstieg des Phasenschiebungsprofils in der BFP für die Entstehung von *Fringing*-Artefakten. „*Fringing*“ tritt in Form von Intensitätsoszillationen auf, die sich ringförmig, vom Rand der abgebildeten Objekte ausgehend, ausbreiten [16]. Die entstehenden *Fringing*-Artefakte erscheinen besonders stark bei kleinen *Cut-on*-Frequenzen. Sie beeinflussen die direkte Interpretierbarkeit des Bildes und lassen sich nur bedingt mit rechnergestützter Bildbearbeitung reduzieren [18].

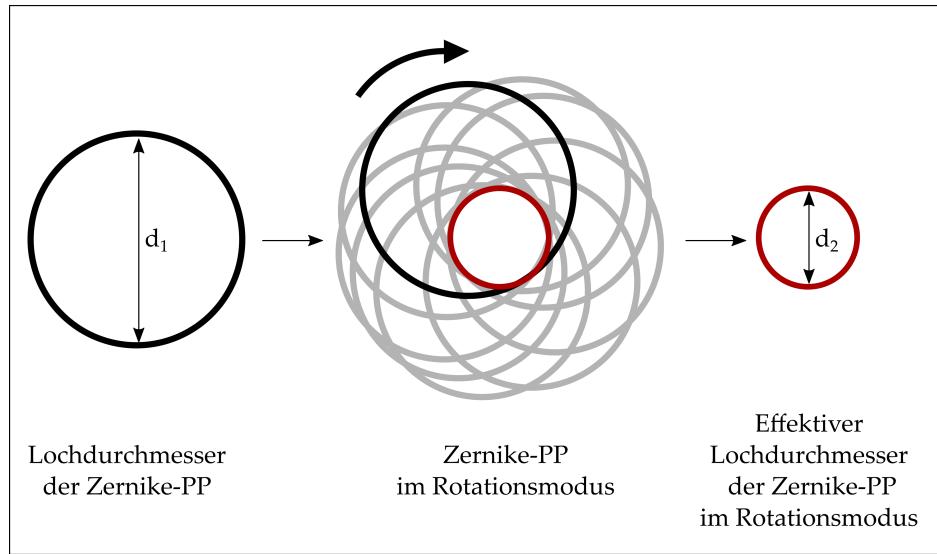


Abbildung 2.11: Rotierende Zernike-PP zur Reduzierung von Bildartefakten [60]. Die Zernike-PP wird mit einem Durchmesser d_1 hergestellt. Mittels eines Piezo-Positionierungssystems wird die Zernike-PP in eine schnelle Rotationsbewegung versetzt. Die rotierende Zernike-PP erhält durch die Rotationsbewegung einen effektiven Lochdurchmesser von d_2 .

Interessante experimentelle Ansätze ermöglichen eine Reduzierung der Artefakte durch die in Abbildung 2.11 dargestellte gleichmäßige Rotation einer Zernike-PP mit großem Lochdurchmesser d_1 (großer Cut-on-Frequenz) um den NS [60]. In einer zeitgemittelten Aufnahme entsteht durch die Rotationsbewegung ein kleinerer effektiver Lochdurchmesser d_2 . Die mit dieser Methode aufgenommen TEM-Abbildungen weisen deutlich schwächere Artefakte auf und profitieren von der Phasenschiebung kleiner Raumfrequenzen durch die Verkleinerung des effektiven Lochdurchmessers. Alternativ kann zur Realisierung dieser Methode auch die Beleuchtung rotiert werden, während die Zernike-PP an einer festen Position verbleibt.

Im Rahmen dieser Arbeit wird noch eine weitere Möglichkeit zur Reduktion von Artefakten bei TEM-Abbildungen mit Zernike-PP untersucht (siehe Kapitel 7). Dabei wird die in Abbildung 2.12a dargestellte konventionelle Zernike-PP mit einem Dickengradienten an der Lochkante versehen (siehe Abbildung 2.12b). Durch den graduellen Anstieg der Filmdicke entsteht im Idealfall ein glattes Phasenschiebungsprofil ohne abrupte Kante, was zu einer reduzierten Intensität der entstehenden Artefakte führt.

Bei unstrukturierten filmbasierten PP, sogenannten HFPP oder Volta-PP [21, 67], ist die bisher als problematisch angesehene elektrostatische Aufladung ein nützlicher Effekt. Dabei wird ein durchgängiger aC-Film ohne eine strukturierte Öffnung in die BFP eingebracht, wo sich durch die Beleuchtung des aC-Films mit dem intensiven NS ein geladener Bereich („Fleck“) ausbildet, welcher eine Phasenschiebung der ungestreuten NS-Elektronen verur-

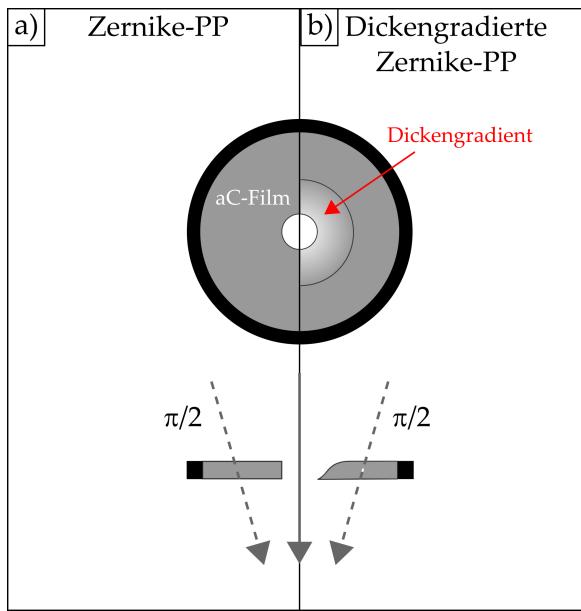


Abbildung 2.12: Konventionelle und dickengradierte Zernike-PP. Schematische Darstellung a) einer konventionellen und b) einer dickengraduierten Zernike-PP mit einem Dickengradienten in der BFP der Objektivlinse.

sacht. Der geladene Fleck kann entweder durch die Deposition von C-haltiger Kontamination verursacht werden, was durch die Dickenänderung zu einer positiven Phasenschiebung φ_{PP} führt [50]. Eine negative Aufladung und Phasenschiebung entsteht, wenn Kontamination unterbunden wird und eine lokale Absenkung der Austrittsarbeit von Elektronen im aC-Film durch elektronenstimulierte Desorption von H_2O -Molekülen auf der Filmoberfläche induziert wird [49]. Das Profil der vom geladenen Fleck erzeugten Phasenschiebung ähnelt dem Intensitätsprofil des NS, erstreckt sich aber insbesondere im Fall negativer Ladung bis zu höheren Raumfrequenzen [80]. Durch den langsamen Anstieg der Phasenschiebung werden die im Zusammenhang mit Zernike-PP beschriebenen ringförmigen Artefakte weitestgehend verhindert, was als eine positive Eigenschaft der HFPP zu werten ist. Des Weiteren ist die maximale Objektgröße, die mit Phasenkontrast abgebildet wird, nicht an eine bestimmte *Cut-on*-Frequenz gebunden. Auf der anderen Seite verursacht der langsam ansteigende Gradient des Phasenprofils der HFPP einen hellen Saum um das abgebildete Objekt [67, 80]. Dieser Saum wird in Anlehnung an den Halo-Effekt aus der Lichtmikroskopie [44] als Halo bezeichnet.

Im Vergleich zur Zernike-PP, bei der die Phasenschiebung durch die Filmdicke festgelegt ist, ist die exakte Phasenschiebung bei der HFPP schwerer zu kontrollieren. Sie hängt von experimentellen Parametern wie dem NS-Durchmesser, der Bestrahlungszeit und der Oberflächenchemie des HFPP-Films ab. Eine grobe Justage der Phasenschiebung kann jedoch durch eine Heizvorrichtung über die Temperatur des HFPP-Films erfolgen, worüber Ein-

fluss auf die Oberflächenchemie des Films genommen werden kann.

HFPP sind mittlerweile kommerziell erhältlich und wurden in zahlreichen Veröffentlichungen erfolgreich für die Einzelpartikel-Rekonstruktion [12, 22], die tomografische Rekonstruktion von Proteinen [56, 62] und ganzen Zellen [4, 64] sowie in der Festkörperphysik [58] eingesetzt. Für einen detaillierteren Einblick in die bisherigen Erkenntnisse über HFPP kann ein Übersichtsartikel [69] herangezogen werden.

Trotz alledem gibt es noch einige verbleibende Probleme im Zusammenhang mit der Verwendung einer HFPP, die besonders im Zusammenhang mit der ausgeprägten Strahlungsempfindlichkeit biologischer Objekte entstehen. Kryo-TEM ist vorteilhaft für biologische Objekte, da die Bewegung von Atomen reduziert ist. Die Justage des Mikroskops wird meist in einem für die eigentliche Untersuchung uninteressantem Probenbereich durchgeführt. Dies geht in der Regel mit einer Verschiebung des beleuchtenden Elektronenstrahls einher, wobei eine Verkippung des Einfallswinkels bestmöglich vermieden werden soll. Für diese Methode ist eine besonders sorgsame Justage der Elektronenoptik nötig, damit der NS seine Position auf dem geladenen Fleck der HFPP beibehält [38]. Darüber hinaus muss der HFPP-Halter hinreichend stabil sein, damit es nicht zu einem Wegdriften der HFPP bzw. des geladenen Flecks kommt. Da die Phasenschiebung der HFPP nur indirekt durch die Temperatur, bei der die HFPP betrieben wird, beeinflusst werden kann und zwischen verschiedenen HFPP-Filmen variieren kann, besteht immer noch Bedarf an einer PP mit *in-situ* einstellbarer Phasenschiebung mit besserer Eignung für quantitative Anwendungen. Eine potentielle PP-Variante, die diese Eigenschaften mit sich bringt, ist die elektrostatische PP, die im Folgenden beschrieben wird.

Elektrostatische Phasenplatten

Bei elektrostatischen PP wird ein stark lokalisiertes abstimmbares elektrostatisches Feld verwendet, um die Phase zwischen gestreuten und ungestreuten Anteilen der Elektronenwelle zu schieben. Um die ursprünglich von Boersch vorgeschlagene Ringelektrode zu realisieren, wurden etliche Ansätze verfolgt [3, 7, 9, 52, 91, 93]. Die Variante von Schultheiss [91] besteht aus drei Stegen, die zu einer ringförmigen Elektrodenstruktur aus *Au* führen. Zur Isolation und Abschirmung kommen isolierende Materialien (Si_3N_4 , Al_2O_3) und eine äußere *Au*-Schicht zum Einsatz. In einem der Stege verläuft eine Zuleitung, um eine Spannung an die Ringelektrode legen zu können. Die beiden anderen Stege dienen der Stabilisation. Anlegen einer Spannung U_{PP} verursacht ein konstantes elektrostatisches Feld im Inneren der Ringelektrode, das den NS-Elektronen eine spannungsabhängige Phasenschiebung aufprägt [73]. Da durch den endlich großen Durchmesser der Ringelektrode ebenfalls ein kleiner Anteil der schwach gestreuten Elektronen propagieren, lässt sich anhand des inneren Ringdurchmessers über Gleichung 2.23 eine *Cut-on*-Frequenz u_{C1} berechnen. Der

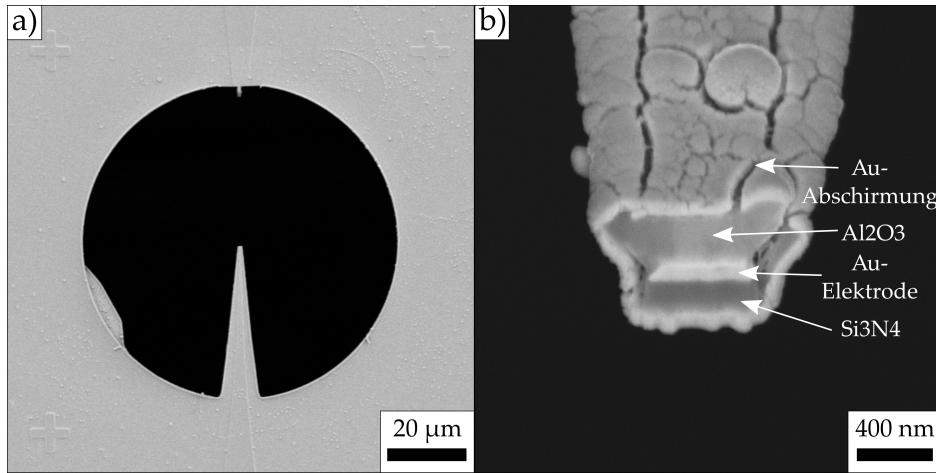


Abbildung 2.13: REM-Aufnahme mit SE einer Zach-PP. a) Die Zach-PP besteht aus einem freitragenden Steg, der die Elektrode beinhaltet und sich in einer Apertur mit dem Durchmesser von 90 µm befindet. a) Die vergrößerte Aufnahme der Zach-PP-Spitze zeigt den fünfschichtigen Aufbau des Steges und die freiliegende Elektrode.

äußere Durchmesser der Ringelektrode definiert die zweite Cut-on-Frequenz u_{C2} . Die Elektronen, die zu Raumfrequenzen zwischen den beiden Cut-on-Frequenzen gestreut werden, treffen auf die Elektrodenstruktur und werden blockiert. Für die Phasenschiebung einer Boersch-PP ergibt sich demnach:

$$\varphi_{PP,Boersch} = \begin{cases} \varphi_{PP}(U_{PP}), & u < u_{C1} \\ 0, & u \geq u_{C2}. \end{cases} \quad (2.45)$$

In der Praxis hat sich die aufwendige Elektrodenstruktur der Boersch-PP insbesondere aufgrund ihrer großen Abmessungen und den drei stabilisierenden Stegen nicht bewährt. Die Blockade von Elektronen in der BFP behindert den Bildentstehungsprozess und führt in der Regel zu starken Artefakten in der TEM-Abbildung.

Die bis heute vielversprechendste elektrostatische PP ist die Zach-PP [90], welche im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz gekommen ist und in den REM-Aufnahmen in Abbildung 2.13 dargestellt ist. Sie besteht aus einer Apertur mit nur einem freistehenden Steg, welcher sich bis zum Zentrum der Apertur erstreckt (siehe Abbildung 2.13a). Der Steg besteht aus einem fünfschichtigen Aufbau und beinhaltet eine offene Au-Elektrode. Durch die isolierenden Si₃N₄- und Al₂O₃-Schichten und die aufgebrachte Au-Abschirmung erinnert der Steg an ein Koaxialkabel mit offenem Ende. Wird eine Spannung an die Elektrode angelegt, baut sich ein stark lokalisiertes elektrostatisches Potenzial an der Spitze des Steges auf. Aufgrund des asymmetrischen Aufbaus ist das entstehende Potenzial inhomogen, was im Vergleich zum homogenen Potenzial in der Ringelektrode der Boersch-PP als Nachteil angesehen werden kann. Dafür kommt es durch den einzelnen schmalen Zach-PP-Steg nur zu

einer vergleichsweise geringen Blockade von Elektronen, was gegenüber der großflächigen Elektrodenstruktur der Boersch-PP ein signifikanter Vorteil ist. Durch Positionierung der Zach-PP-Spitze in der Nähe des NS in der BFP wird den ungestreuten Elektronen eine Phasenschiebung aufgeprägt, während gestreute Elektronen unbeeinflusst bleiben. Der Wert der induzierten Phasenschiebung kann über die angelegte Spannung und den Abstand zwischen PP-Spitze und NS kontrolliert werden. Das Vermögen einer Zach-PP den Phasenkontrast verschiedener Proben effektiv zu steigern wurde bereits durch Veröffentlichungen belegt [35, 48]. Als allgemeine Nachteile der elektrostatischen Zach-PP kann neben der bereits genannten inhomogenen Phasenschiebungsverteilung und der Blockade einzelner Raumfrequenzbereiche durch den PP-Steg, der aufwendige Herstellungsprozess und eine gelegentlich vorkommende Aufladung der PP-Struktur genannt werden.

Eine mögliche Realisierung einer elektrostatischen PP, mit der blockierende Strukturen der Elektrode in der BFP gänzlich vermieden werden können, ist die anamorphotische PP [89]. Sie basiert auf einer schlitzförmigen Blende mit integrierter Elektrode, welche in einer stark langgezogenen BFP eine Phasenschiebung zwischen ungestreuten und gestreuten Elektronen generiert. Um jedoch eine derart langgezogene BFP zu erhalten, bedarf es einer speziellen Elektronenoptik, die bisher nicht realisiert werden konnte. Eine große Anzahl weiterer PP-Konzepte wurde neben den hier vorgestellten PP-Typen hinaus in der Literatur vorgeschlagen und können einem Übersichtsartikel von Glaeser entnommen werden [40].

2.5 Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie

In der Kryo-TEM werden meist biologische Proben bei tiefen Temperaturen von unter 150 °C in einem Transmissionselektronenmikroskop untersucht. Das Transmissionselektronenmikroskop muss dabei über eine mit flüssigem N_2 gekühlte Probenbühne verfügen sowie über eine spezielle Schleuse, durch die die Probe entsprechend gekühlt eingeschleust werden kann. Auch bei der Abbildung biologischer Proben gibt es einige Punkte zu beachten, die hauptsächlich mit ihrer hohen Strahlungsempfindlichkeit zusammenhängen. So führt eine zu lange Belichtung schnell zur Beschädigung der Probe. Der Elektronenstrahl wird daher bei Nichtverwendung ausgeblendet und alle Arten der Kalibrierung des Mikroskops werden in einem für die Untersuchung uninteressanten Bereich der Probe durchgeführt. Die Beleuchtungsintensität wird möglichst gering gehalten und häufig kommt ein Direktelektronendetektor als Kamerasystem zum Einsatz, welcher eine 10 bis 100 mal höhere Sensitivität als herkömmliche szintillatorbasierte CCD-Kamerasysteme aufweist. Für die im Rahmen der Arbeit aufgenommenen Kryo-TEM-Abbildungen wurden jeweils 20 Einzelbilder mit einer Belichtungszeit von 0,2 s aufgenommen, deren Intensitäten dann zu einem

Gesamtbild mit 4 s Belichtungszeit aufsummiert wurden. Die Beleuchtungsintensität wurde auf $9 \text{ e}^-/\text{px/s}$ eingestellt, was in einer Gesamtelektronendosis von $8 - 12 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$ für die Kryo-TEM-Abbildungen resultiert.

Ein entscheidender Vorteil bei der Kryo-TEM biologischer Proben gegenüber der herkömmlichen TEM bei Raumtemperatur entsteht aus der Art der Probenpräparation. Da Proben aus dem Bereich der Lebenswissenschaften generell einen hohen Anteil an H_2O aufweisen, müssen sie entsprechend präpariert werden, damit sie in das Vakuum des Transmissionselektronenmikroskops eingeschleust werden können. Bei Raumtemperatur zu untersuchenden Proben wird in einem aufwendigen Verfahren das H_2O entzogen und durch einen Kunststoff ersetzt. Des Weiteren erfolgt häufig eine Kontrastierung mit einem Kontrastmittel wie beispielsweise $C_4H_6O_6U$. Während dieses Verfahrens kommt es häufig zu strukturellen Veränderungen der biologischen Probe, die mit einem Verlust von Informationen und einer erschwerten Interpretierbarkeit der aufgenommenen TEM-Abbildungen einhergeht. Abbildung 2.14a zeigt eine TEM-Aufnahme einer auf diese Weise präparierten Probe aus Humane-Immundefizienz-Virus(HIV)-artigen Partikeln. Die Partikel lassen sich mit deutlichem Kontrast erkennen, aber eine innere Struktur ist kaum ersichtlich. Bei der Kryo-Probenpräparation wird das enthaltene Wasser der Probe durch Eintauchen in eine kryogene Flüssigkeit schockartig in vitrifiziertes Eis umgewandelt. Bei diesem auch Vitrifizierung genannten Vorgang entsteht ein glasartiges Eis und die Kristallisation bleibt durch das schlagartige Herunterkühlen aus. Durch die ausbleibende Kristallisation kommt es auch nicht zur Ausdehnung des Eises, sodass der strukturelle Aufbau der biologischen Probe unversehrt bleibt. Abbildung 2.14b zeigt eine TEM-Aufnahme einer mit Abbildung 2.14a vergleichbaren Probe, die durch Kryo-Probenpräparation hergestellt wurde. Es lässt sich deutlich die innere Struktur der virusartigen Partikel erkennen.

2.5.1 Kryo-Probenpräparation

Verschiedene Arten von Kryo-Probenpräparation werden für biologische Proben eingesetzt. Beispielsweise können Schnittpräparate von vitrifiziertem biologischem Gewebe mit einem FIB oder einem Mikrotom erstellt werden. Proben aus einzelnen Partikeln werden häufig aus einer Suspension hergestellt. Dazu wird beispielsweise ein TEM-Netz mit einem löchrigen aC-Film als Trägermaterial in die Partikelsuspension eingetaucht, sodass sich ein Tropfen am TEM-Netz bildet. Wie in Abbildung 2.15 dargestellt, wird überschüssige Flüssigkeit mit einem Filterpapier aufgesogen, sodass nur ein einheitlich dünner Film der Partikelsuspension auf dem TEM-Netz übrig bleibt. Die Vitrifizierung erfolgt durch Eintauchen in flüssiges Ethan bei -183°C , welches wiederum durch flüssigen N_2 (-196°C) möglichst weit unter den Siedepunkt von -89°C gekühlt wird. Somit wird die Probe vitrifiziert,

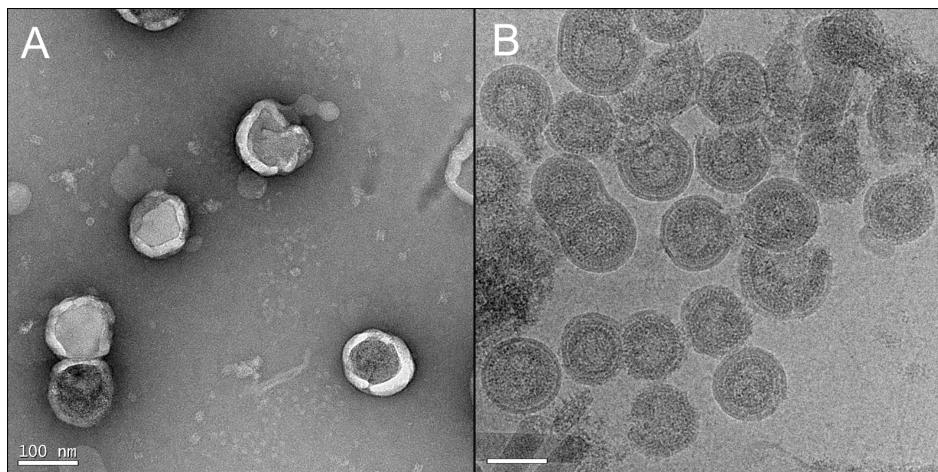


Abbildung 2.14: Gegenüberstellung zweier Methoden zur Probenpräparation biologischer Objekte anhand von TEM-Aufnahmen von HIV-artigen Partikeln [28]. Die TEM-Aufnahmen zeigen die Partikel nach Probenpräparation durch a) Negativkontrastierung mit $C_4H_6O_6U$ und b) Kryo-Fixierung.

bevor es durch die eingebrachte Wärme zu übermäßigem Verdampfen des Ethans kommt. Das direkte Eintauchen in flüssiges N_2 ist insofern nachteilig, als das es sich bereits sehr Nahe an seinem Siedepunkt befindet und die Wärme der eingebrachten Probe zu einem schlagartigen Verdampfen des flüssigen N_2 führt. Um die Probe entsteht eine isolierende gasförmige Schicht aus N_2 , sodass die Herabkühlung zu langsam erfolgt und das Wasser der Probe teilweise kristallisiert.

2.5.2 Kryo-Elektronentomografie

Bei der Kryo-Elektronentomografie werden mit einem verkippabaren Probenhalter TEM-Aufnahmen einer Kryo-Probe bei verschiedenen Kippwinkeln erstellt. Typischerweise wird die Probe in 1 – 2°-Schritten in einem Kippwinkelbereich von -60° bis $+60^\circ$ verkippt, wobei für jeden Schritt eine TEM-Aufnahme erfolgt. Auf der Probe befinden sich meist Markierungspartikel aus Au, mit deren Hilfe die einzelnen Bilder einer Kippserie ausgerichtet werden können. Mittels spezieller Software kann aus der Kippserie ein Tomogramm rekonstruiert werden, welches die Betrachtung einzelner Schnitte durch die Probe ermöglicht. Aus den Schnitten können die Abgrenzungen der Strukturen segmentiert werden, wodurch ein dreidimensionales Abbild der Probe entsteht.

Da für die Kippserien zur Rekonstruktion eines Tomogramms etwa 60 TEM-Abbildungen der strahlungsempfindlichen Probe nötig sind, muss die Beleuchtungsintensität entsprechend niedrig gewählt werden. Die in Abschnitt 6.2 gezeigten Tomogramme wurden bei

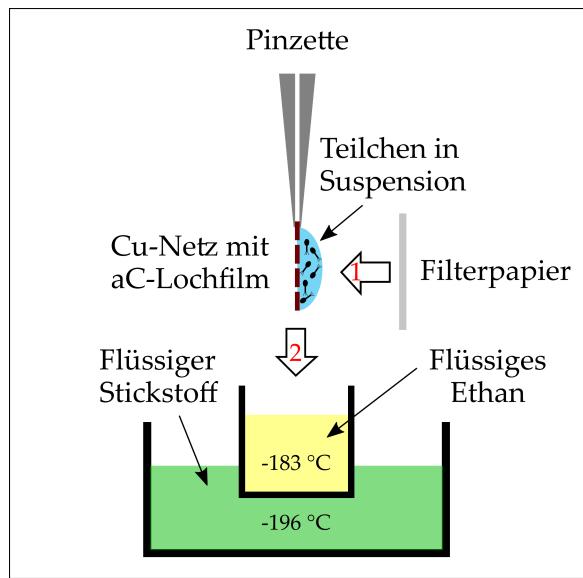


Abbildung 2.15: Schematische Darstellung der Kryo-Probenpräparation. Die zu untersuchenden Partikel liegen in Suspension vor. Ein Cu-Netz mit einem aC-Lochfilm wird in die Suspension getaucht und nimmt einen Tropfen davon auf. Mit einem Filterpapier wird ein Teil der Flüssigkeit aufgenommen, sodass ein möglichst dünner Film der Partikelsuspension entsteht (Schritt 1). Durch Eintauchen der Probe in flüssiges Ethan bei $-183\text{ }^{\circ}\text{C}$ wird diese vitrifiziert, also in einen amorphen, glasartigen Zustand versetzt (Schritt 2).

einer Beleuchtungsintensität von weniger als $1\text{ e}^-/\text{px/s}$ aufgenommen, was einer Gesamtelektronendosis von etwa $80\text{ e}^-/\text{\AA}^2$ für die komplette Kippserie entspricht.

3

Kapitel 3

Techniken zur Herstellung von Phasenplatten

Die technische Realisierung von PP für die TEM, deren kleinste Abmessungen nur wenige hundert Nanometer betragen, erfordert eine Vielzahl moderner Mikrostrukturierungsmethoden. Dieses Kapitel dient der Erläuterung der während des Herstellungsprozesses verwendeten Techniken, wie der Elektronenstrahllithografie (ESL), der Strukturierung mit einem fokussierten Ionenstrahl (FIB), der Dünnschichttechnologie sowie verschiedener Ätzverfahren. Des Weiteren wird die Rasterelektronenmikroskopie (REM) vorgestellt, die sowohl während der Herstellung als auch zur Analyse der gefertigten PP verwendet wird. Die zur Herstellung verwendeten Geräte, Chemikalien und Materialien sind in den entsprechenden Verzeichnissen auf S. 185 und 187 aufgelistet.

3.1 Fotolithografie

Zur Herstellung von Rohlingen für elektrostatische PP kommt die Methode der Fotolithografie, eine weit verbreitete Technik zu Herstellung von Mikrostrukturen, zum Einsatz. Dabei wird ein lichtsensitiver Lack auf ein Substrat aufgetragen und an den durch eine Fotomaske definierten Stellen mit ultravioletter (UV) Strahlung belichtet. Während die belichteten Lackstellen bei Positivlacken depolymerisiert werden, werden sie bei Negativlacken polymerisiert. In einem Entwicklerbad werden dadurch entweder die belichteten Stellen gelöst und die unbelichteten Stellen bleiben zurück (positive Lithografie) oder nur die belichtete Stellen bleiben zurück (negative Lithografie). Mit der so erhaltenen Lackmaske können dann weitere Materialbeschichtungen oder Ätzprozesse durchgeführt werden. Die für die beschriebenen Prozesse notwendigen Geräte und Techniken werden im Folgenden kurz vorgestellt.

3.1.1 Rotationsbeschichtung

Die Rotationsbeschichtung ist eine Methode zur gleichmäßigen Auftragung von dünnen Lackschichten auf ein Substrat mit einer Lackschleuder (engl. *spin coater*). Die Funktionsweise ist in Abbildung 3.1 veranschaulicht. Ein gereinigtes Substrat, z.B. ein Wafer, wird auf dem Probenteller der Lackschleuder mittels Ansaugen fixiert. Der Fotolack wird mit einer Pipette auf das Substrat aufgebracht (siehe Abbildung 3.1a) und großflächig verteilt bis alle Stellen bedeckt sind. Im Anschluss wird der Motor der Lackschleuder gestartet und der Probenteller mit dem darauf liegenden Substrat wird mit einigen hunderten bis tausenden Umdrehungen pro Minute um die eigene Achse rotiert. Wie in Abbildung 3.1b schematisch dargestellt, verteilt sich der Lack gleichmäßig auf der Substratoberfläche und Überschüsse werden zur Seite hin weggeschleudert. Das Ergebnis ist eine homogen verteilte einige Mikrometer dünne Lackschicht auf dem Substrat (siehe Abbildung 3.1c). Die angestrebte Dicke der finalen Lackschicht ist wesentlich von der eingestellten Umdrehungszahl abhängig und kann dadurch beeinflusst werden.

3.1.2 Maskenschreiber

Um die Lackschicht gezielt zu belichten, werden Fotomasken eingesetzt, die in Abhängigkeit von der gewünschten Struktur mit Hilfe eines Maskenschreibers produziert werden müssen (siehe Abbildung 3.2a). Die Maskenherstellung beruht selbst auch auf der Methode der

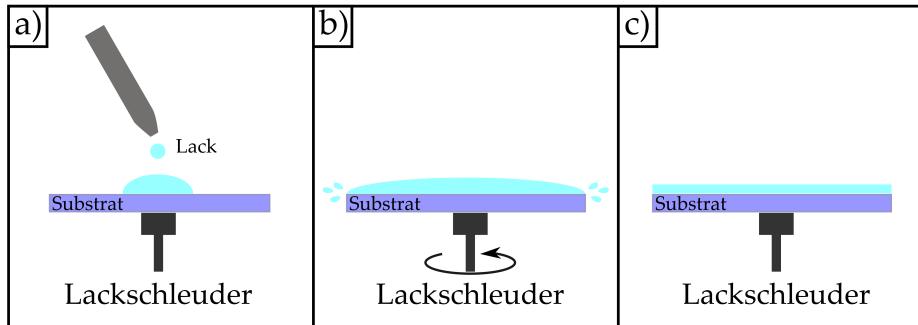


Abbildung 3.1: Rotationsbeschichtung mit einer Lackschleuder. a) Das Substrat wird auf dem Probenteller durch Ansaugen fixiert und mit Lack betropft. b) Der Probenteller wird in Rotation versetzt und der Lack wird gleichmäßig auf dem Chip verteilt. c) Das Resultat ist eine homogene dünne Lackschicht auf dem Substrat.

Fotolithografie. Bei den käuflich erhältlichen Maskenrohlingen handelt es sich um UV-durchlässiges Glas, dessen eine Seite mit UV-undurchlässigem Cr bedampft ist. Auf der Cr-bedampften Seite wird im Rotationsbeschichtungsverfahren eine Schicht Fotolack aufgetragen. Das Layout der zu erstellenden Maske kann mit frei erhältlicher Software erstellt und für die Software des Maskenschreibers konvertiert werden. Der verwendete Maskenschreiber HIMT DWL 66 verfügt im Wesentlichen über eine schwingungsisolierte Probenbühne, ein Laserinterferometer und einen Schreiblaser. In einer von dem Interferometer kontrollierten Bewegung wird die Probenbühne samt dem Maskenrohling unter dem Schreiblaser zeilenweise hin- und hergefahren. Durch gezieltes an- und ausschalten des Schreiblasers wird der Fotolack an den Stellen der vordefinierten Maskenstruktur belichtet. Der Schreiblaser führt während der Belichtung ebenfalls Bewegungen aus, wodurch das Erstellen von feinen Strukturen mit einer Genauigkeit von $1 - 2 \mu\text{m}$ ermöglicht wird. Die beschriebene Maske wird im Anschluss in ein Entwicklerbad gegeben, wo sich die belichteten Stellen des Fotolacks lösen. Die Cr-Schicht wird an den offenliegenden Stellen in einem Bad aus Chromätze entfernt (siehe Abschnitt 3.5.3), sodass das UV-durchlässige Glas frei liegt. Nach dem Lösen des verbliebenen Lacks in einem Entferner kann die so hergestellte Maske in den Maskenausrichter transferiert werden.

3.1.3 Maskenausrichter

In einem Maskenausrichter wird ein mit Fotolack beschichtetes Substrat und die im Maskenschreiber gefertigte Fotomaske übereinander positioniert, sodass der Fotolack gezielt mit UV-Strahlung belichtet werden kann (siehe Abbildung 3.2b). Als Lichtquelle dient eine Quecksilberhochdrucklampe, deren Emissionsspektrum eine scharfe Linie mit hoher Intensität im UV-Bereich aufweist, nämlich bei einer Wellenlänge von $\lambda = 356 \text{ nm}$. Die Foto-

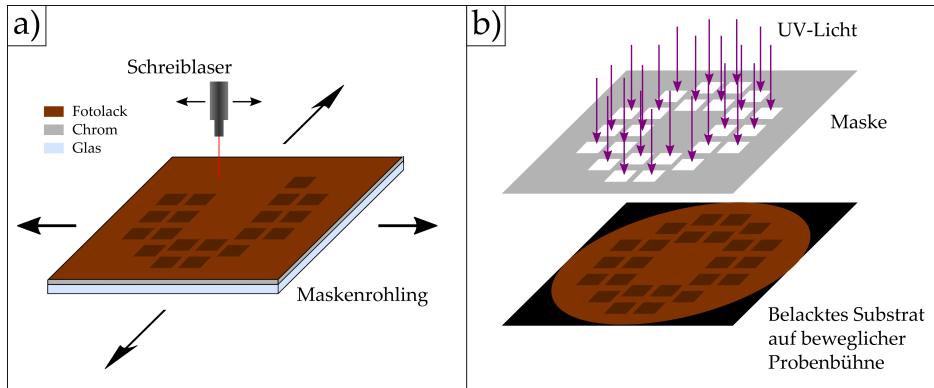


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung von Maskenschreiber und Maskenausrichter nach [41]. a) Der belackte Maskenrohling befindet sich auf einer beweglichen Probenbühne und wird softwaregesteuert unter dem Schreiblaser bewegt, welcher die gewünschte Struktur belichtet. b) Ein belacktes Substrat wie etwa ein Wafer befindet sich auf einer beweglichen Probenbühne und wird unter der Fotomaske positioniert. Der Fotolack wird an den UV-durchlässigen Stellen der Fotomaske mit UV-Strahlung belichtet.

maske ist an den vorher definierten Stellen für das UV-Licht transparent, während sie die übrigen Bereiche durch eine UV-undurchlässige Cr-Schicht vor der Belichtung schützt. Der Maskenausrichter verfügt über integrierte Lichtmikroskope an Ober- und Unterseite der beweglichen Probenbühne, die zur Justage des Substrates unter der Maske verwendet werden können. Das untere Lichtmikroskop wird hauptsächlich bei beidseitiger Belichtung des Substrates verwendet, um die lithografierten Strukturen auf beiden Seiten in Deckung zu bringen. Ist das Substrat an der richtigen Stelle, wird es in leichten Kontakt mit der Maske gebracht und die Lichtquelle eingeschaltet.

3.2 Rasterelektronenmikroskopie

Die REM ist eine in den Materialwissenschaften vielfach eingesetzte Methode, mit der sich Objektoberflächen mit hoher Tiefenschärfe abbilden lassen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die REM als wichtiges Werkzeug für die ESL und die Strukturierung mittels FIB sowie zur Erfolgskontrolle einzelner Herstellungsschritte eingesetzt. Im Anschluss an den Herstellungsprozess wurden die einzelnen Bestandteile der fertiggestellten PP mittels REM vermessen und nochmals visuell auf Fehlerhaftigkeit untersucht. In der evakuierten Elektronensäule eines Rasterelektronenmikroskops werden Elektronen in einer Elektronenquelle erzeugt, auf eine Primärenergie von 1 – 30 keV beschleunigt und durch ein Linsensystem auf die Probenoberfläche fokussiert. Der fein gebündelte Elektronenstrahl

wird, gesteuert von magnetischen Ablenkspulen, in einer rasterförmigen Bewegung zeilenweise über die Probenoberfläche geführt und erzeugt dort verschiedene Wechselwirkungsprodukte. Für rastermikroskopische Abbildungen spielen hauptsächlich aus der Probe emittierte Rückstreu- und Sekundärelektronen (SE) eine Rolle. Diese werden von einem Detektor erfasst, welcher die gemessene Elektronenintensität synchron zum Abrastern der Probenoberfläche in einen Grauwert umwandelt, sodass pixelweise ein Abbild auf dem Bildschirm erzeugt werden kann. In der Regel stehen unterschiedliche Detektoren zur Verfügung, um bestimmte Eigenschaften der Probe abzubilden. Das Auflösungsvermögen moderner Rasterelektronenmikroskope liegt abhängig von der verwendeten Primärenergie in der Größenordnung von 1 nm.

Für die Analyse der hergestellten PP-Strukturen wurden überwiegend REM-Aufnahmen mit SE benutzt. Die Eindringtiefen der Primärelektronen in die Probe liegen typischerweise in einem Bereich von 100 nm bis zu einigen Mikrometern und sind abhängig von der Primärenergie und dem Probenmaterial. Durch inelastische Streuung der Primärelektronen an den Valenz- und Leitungsbandelektronen der Probe entstehen SE mit Energien unter 50 eV. Ein Großteil der niederenergetischen SE wird vom Probenmaterial absorbiert, während nur SE aus den obersten Schichten der Probe aus deren Oberfläche austreten und vom Detektor erfasst werden können. Daher eignen sich REM-Aufnahmen mit SE besonders gut, um die oberflächlichen Elektrodenstrukturen elektrostatischer PP abzubilden. Im Rahmen der Arbeit wurden Rasterelektronenmikroskope der Hersteller Zeiss (Zeiss Gemini 1540, Zeiss XBeam 1540, Zeiss Supra 55VP) und FEI (FEI Strata 400, FEI Helios G4 FX) verwendet, welche standardmäßig mit einem Everhard-Thornley- und einem *In-Lens*-Detektor ausgestattet sind [82]. Letzterer wird bei FEI-Mikroskopen als *Through-Lens*-Detektor bezeichnet. Während sich der Everhard-Thornley-Detektor seitlich neben dem Polschuh der Objektivlinse befindet, ist der *In-Lens*-Detektor ins Innere des Polschuhs integriert. Dadurch detektiert der *In-Lens*-Detektor insbesondere in kleine Raumwinkel nach oben emittierte SE aus einem kleinen Bereich der Probe, wodurch Abbildungen mit besonders hoher räumlicher Auflösung erstellt werden können.

Die beispielhaften REM-Aufnahmen in Abbildung 3.3 verdeutlichen den Einfluss des lokalen Probenmaterials und der Oberflächentopografie auf die SE-Kontrastentstehung. SE-REM-Abbildungen zeigen hauptsächlich Topografiekontrast. Bei weniger ausgeprägter Topografie, ist auch Materialkontrast zu beobachten. Abbildung 3.3a zeigt einen lithografierten LEM-Schriftzug aus *Au* mit einer Schichtdicke von etwas 100 nm auf einem *Si₃N₄*-Hintergrund mit deutlichem Materialkontrast. Die SE-Emission steigt aufgrund von austretenden RückstreuElektronen mit der Ordnungszahl *Z* des lokalen Probenmaterials, sodass der *Au*-Schriftzug (*Z* = 79) hell auf dem dunklen *Si₃N₄*-Hintergrund erscheint (*Z_{eff}* = 10). Durch zusätzlichen Topografiekontrast wird die räumliche Struktur der einzelnen Buchstaben des Schriftzuges sowie eine geringe Rauigkeit im Hintergrund wiedergegeben. Abbildung 3.3b zeigt ein weiteres Beispiel, bei dem der Materialkontrast dominiert. Die beiden

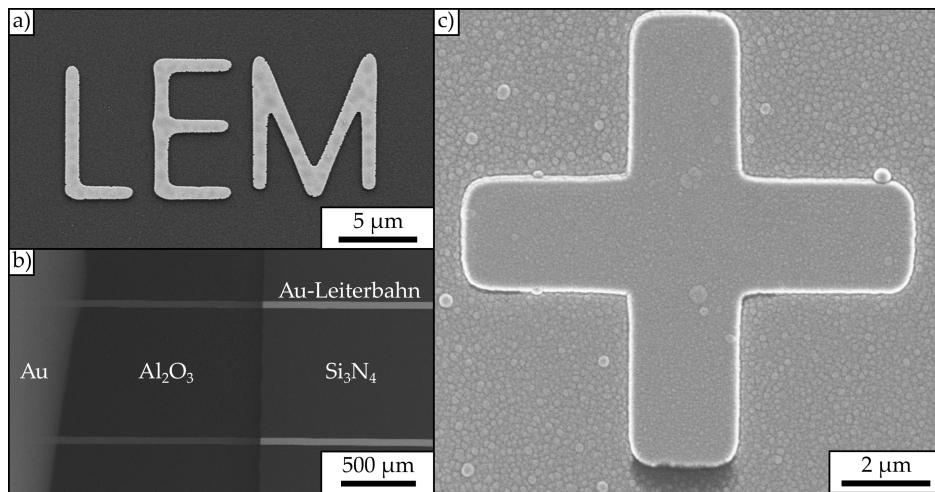


Abbildung 3.3: REM-Aufnahmen mit SE zur Verdeutlichung von Material- und Topografiekontrast. a) Durch Materialkontrast erscheint der lithografierte LEM-Schriftzug aus Au hell auf dem dunklen Si₃N₄ im Hintergrund. b) Helle Au-Leiterbahnen auf dunklem Si₃N₄ sind bei geeigneter Primärelektronenenergie von 10 keV auch unter einer aufgedampften Al₂O₃-Schicht sichtbar. c) Ein Au-Markerkreuz, das mit einer Al₂O₃- und einer Au-Schicht bedampft wurde, zeigt deutlichen Topografiekontrast. Die Kanten des Kreuzes erscheinen hell, wobei es an der unteren Kante eine Abschattung beim Aufdampfprozess gab und die Al₂O₃-Schicht im Hintergrund dunkel durchscheint.

hellen Au-Leiterbahnen auf dem Si₃N₄-Hintergrund sind teilweise mit einer Al₂O₃-Schicht ($Z_{\text{eff}} = 10$) bedeckt. Die Primärelektronenenergie ist mit 10 keV so hoch gewählt, dass beim Austritt von RückstreuElektronen aus den tieferliegenden Au-Leiterbahnen SE generiert werden, wodurch sich die Au-Leiterbahnen unter der Al₂O₃-Schicht erkennen lassen. Im Gegensatz dazu treten die Leiterbahnen unter der gleich hellen Au-Schicht im linken Randbereich der Abbildung nur sehr schwach hervor. Durch die geringe Oberflächenrauigkeit der Probe (nur wenige zehn Nanometer bei den hergestellten PP), kommt der Topografiekontrast bei den gewählten Vergrößerungen kaum zum Tragen.

Abbildung 3.3c zeigt eine stark vergrößerte REM-Aufnahme eines Au-Markerkreuzes, wie es zur Positionierung bei der ESL verwendet wird. Das Kreuz wurde mit einer Al₂O₃-Schicht und einer weiteren Au-Schicht bedampft. Zur Kontrastentstehung trägt hauptsächlich Topografiekontrast bei. So erscheinen die Kanten des begrabenen Kreuzes hell und auch die Oberflächendetails auf dem Kreuz und im Hintergrund sind deutlich zu erkennen. Am unteren Rand des Kreuzes kam es zu einer Abschattung beim Aufdampfprozess, wodurch die Al₂O₃-Schicht im Hintergrund durch Materialkontrast dunkel durchscheint.

Energiedispersive Röntgenspektroskopie

In der Regel sind Rasterelektronenmikroskope auch mit Detektoren zur energiedispersiven Röntgenspektroskopie (EDXS) ausgestattet. Neben frei werdenden SE und RückstreuElektronen können auch Röntgenquanten als Wechselwirkungsprodukt der Primärelektronen mit dem Probenmaterial entstehen. Dabei werden kernnahe Hüllenelektronen aus den Atomen des Probenmaterials durch die eintreffenden Primärelektronen energetisch angeregt oder herausgeschlagen. Ein weiteres Hüllenelektron fällt dann aus einem energetisch höher gelegenen Zustand auf den energetisch tiefer liegenden freigewordenen Zustand zurück, wobei es bei bestimmten Übergängen zur Emission eines Photons mit diskreter Energie kommt. Die emittierten Photonen können mit einem EDXS-Detektor detektiert und deren Energie bestimmt werden. Der energetische Abstand der Elektronenzustände in der Atomhülle und damit die Energie des freiwerdenden Photons ist elementspezifisch und kann daher zur chemischen Analyse der lokalen Materialzusammensetzung der Probe herangezogen werden.

Niederenergie-Rastertransmissionselektronenmikroskopie

Meist sind aktuelle Rasterelektronenmikroskope, z.B. das Zeiss XBeam 1540, FEI Strata 400 und FEI Helios G4 FX, mit einem Halbleiterdetektor für die Rastertransmissionselektronenmikroskopie (STEM) ausgestattet. Dieser ermöglicht bei elektronentransparenten Proben wie etwa Dünnfilmen die Analyse der während des Rasterprozesses transmittierten Elektronen. Der STEM-Detektor ist in mehrere ringförmige Segmente unterteilt, die verschieden stark gestreute Elektronen detektieren. Das zentral gelegene innere Segment detektiert ungestreute und in kleine Raumwinkel gestreute Elektronen und wird als BF-Detektor (*annular*) bezeichnet. In größere Raumwinkel gestreute Elektronen werden von den konzentrisch zum BF-Segment angeordneten Dunkelfeldringen (DF-Detektoren) detektiert. In sehr große Raumwinkel gestreute Elektronen treffen auf einen breiten außengelegenen Detektorring, der sich im sogenannten Weitwinkeldunkelfeld (HAADF) befindet. Durch die niedrigen Primärelektronenenergien von 30 keV und darunter wird die STEM in einem Rasterelektronenmikroskop auch als Niederenergie(*low-kV*)-STEM bezeichnet. Im Gegensatz dazu kommen bei der STEM in einem Transmissionselektronenmikroskop Primärelektronenenergien zwischen 80 keV und 300 keV zum Einsatz. Die Niederenergie-STEM besitzt jedoch einen Vorteil bei der Untersuchung strahlempfindlicher Proben. Bei der Herstellung von Dünnfilm-PP kann die Niederenergie-STEM zur Dickenbestimmung der PP verwendet werden. So steht für kleine Filmdicken (abhängig vom Material und der Elektronenenergie) die Intensität in HAADF-STEM-Aufnahmen in einem linearen Zusammenhang mit der Filmdicke [98].

3.3 Elektronenstrahlolithografie

Die ESL kommt zur Herstellung der Leiterbahnen und Elektroden elektrostatischer PP zum Einsatz. Dazu sind die verwendeten Rasterelektronenmikroskope Zeiss XBeam 1540 und Zeiss Supra 55VP mit einer Raith Elphy Plus Lithografieeinheit ausgerüstet. Letztere erlaubt die gezielte Belichtung vordefinierter Strukturen mit einer Auflösung von einigen zehn Nanometern. Wie in Abbildung 3.4 dargestellt, wird dazu zuerst ein Substrat (z.B. ein Wafer) mit einem elektronenstrahlsensitiven Lack (z.B. PMMA 950K) beschichtet. Zur gleichmäßigen Verteilung des Lackes auf dem Substrat wird eine Lackschleuder verwendet (siehe Abbildung 3.4a), deren Umdrehungsfrequenz zusammen mit der Anwendungsdauer die Dicke der Lackschicht bestimmt. Die Aushärtung des Lackes erfolgt auf einer Heizplatte. Die in der Elphy Plus Software erstellte Struktur wird von der Lithografieeinheit gesteuert mit dem Elektronenstrahl in den Lack geschrieben (siehe Abbildung 3.4b). Dabei ist vorher die zur Belichtung geeignete Elektronendosis einzustellen. Bei Verwendung von PMMA 950K, einem Positivlack, werden die belichteten Lackstellen depolymerisiert und lassen sich in einem Entwickler (IPA 4:1 MIBK) lösen. Das Ergebnis ist eine Lackmaske auf dem Substrat, die die Bereiche der gewünschten Struktur freilässt. In einem nächsten Schritt wird das Material aus dem die Struktur bestehen soll (z.B. Au) in einem Aufdampfprozess aufgebracht (siehe Abbildung 3.4c). Durch Eintauchen in einen speziellen Entferner Remover 300-70 oder Aceton wird die Lackmaske samt der aufgedampften Materialschicht gelöst (siehe Abbildung 3.4d), sodass nur noch die gewünschte Struktur auf dem Substrat verbleibt (siehe Abbildung 3.4e). Bei diesem sogenannten *Lift-off*-Prozess ist darauf zu achten, dass die aufgebrachte Lackschicht dicker als die aufgedampfte Materialschicht ist, damit der Entferner die Lackschicht erreichen kann. Nach dem gleichen Prinzip kann die Lackmaske auch als Schutz des Substrates während eines Ätzprozesses dienen, bei dem nur die freiliegenden Stellen der lithografierten Struktur geätzt werden sollen. Dies wird beispielsweise bei der Strukturierung der Blende von elektrostatischen PP durchgeführt.

3.4 Mikrostrukturierung mit einem fokussierten Ionenstrahl

Ein FIB-System, auch Ionenfeinstrahl anlage genannt, liegt meist in Kombination mit einem Rasterelektronenmikroskop vor. Am LEM stehen das FEI Strata 400 (siehe Abbildung 3.5a), FEI Helios G4 FX und Zeiss XBeam 1540 zur Verfügung. Diese Geräte sind neben einer Elektronenquelle mit einer Ga^+ -Ionenquelle ausgestattet. Die erzeugten Ga^+ -Ionen werden durch eine Beschleunigungsspannung auf Energien von bis zu 30 keV beschleunigt

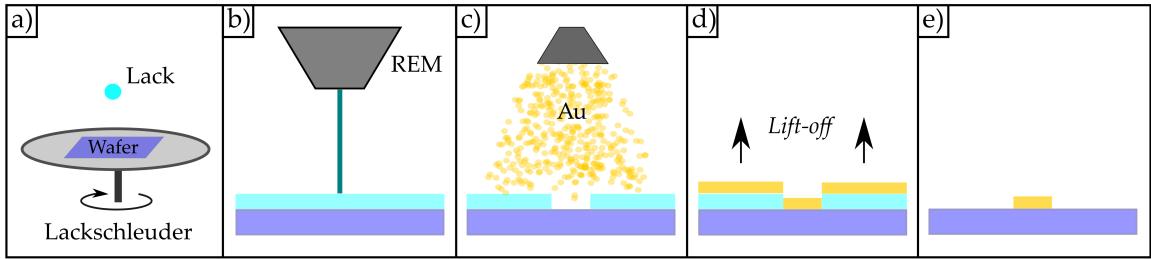


Abbildung 3.4: Lift-off-Verfahren zur Herstellung von leitfähigen Mikrostrukturen nach Hettler [45]. a) Der Lack wird mit einer Lackschleuder auf den Wafer aufgebracht. b) Die gewünschte Mikrostruktur wird mit dem Elektronenstrahl in den Lack geschrieben. c) Die belichteten Lackbereiche werden im Entwickler gelöst und das gewünschte Material (z.B. Au) wird aufgedampft. d) Mit einem Entferner kann die verbleibende Lackschicht zusammen mit dem darauf abgeschiedenen Material entfernt werden. e) Die angestrebte leitfähige Mikrostruktur bleibt erhalten.

und durch eine Ionenoptik zu einem fokussierten Strahl gebündelt, welcher zur mikroskopisch feinen Materialbearbeitung herangezogen werden kann [39]. Wie Abbildung 3.5b zu entnehmen ist, verläuft der Ga^+ -Ionenstrahl in einem Winkel von 54° (bei den FEI-Geräten) bzw. 52° (beim Zeiss-Gerät) zum vertikal angeordneten Elektronenstrahl. Zur Mikrostrukturierung mit dem FIB wird der Kippwinkel der Objektbühne so eingestellt, dass der FIB senkrecht auf die Probe trifft. Gleichzeitig wird die Höhe der Objektbühne justiert, damit sich der Schnittpunkt des Elektronen- und Ionenstrahls auf Probenebene befindet. Dies ermöglicht die zeitgleiche Aufnahme von REM-Abbildungen während der FIB-Bearbeitung. Der Beschuss der Probe mit den im Vergleich zu Elektronen deutlich schwereren Ga^+ -Ionen führt zur allmählichen Materialabtragung, wodurch genau definierte Mikrostrukturen in die Probe gefräst werden können. Zudem entstehen bei diesem Prozess SE, die detektiert und ebenfalls zur Abbildung der Probenoberfläche verwendet werden können. Bei der Verwendung des FIB zur Abbildung ist jedoch besonders auf kurze Expositionszeiten zu achten, um Strahlenschädigungen der Probe zu vermeiden.

Die FIB-Technologie wird zur Mikrostrukturierung in der Herstellung von PP eingesetzt. Des Weiteren hat sie sich in der TEM-Probenpräparation etabliert, wo sie zum Herausfräsen einer TEM-Lamelle aus der zu untersuchenden Probenstelle verwendet wird. Mit dieser nur wenige zehn Nanometer dicken TEM-Lamelle lässt sich eine Querschnittsaufnahme im Transmissionselektronenmikroskop erstellen, die sich gut zur Dickenbestimmung und Beurteilung der Qualität einzelner Materialschichten eignet.

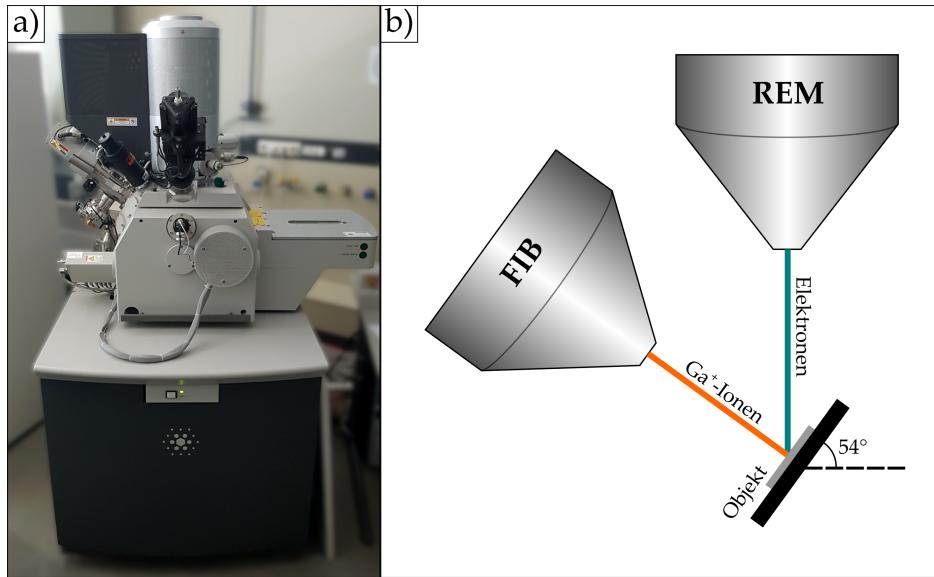


Abbildung 3.5: Aufbau eines Rasterelektronenmikroskops mit integrierter FIB-Anlage. a) Fotografie des FEI Strata 400. b) Anordnung des Elektronen- und Ionenstrahls in einem Rasterelektronenmikroskop mit integrierter FIB-Anlage.

3.5 Dünnschichttechnologie

In der Mikrostrukturierung bezeichnet man eine ganzflächig auf ein Substrat aufgebrachte Materialschicht, deren Dicke im Bereich von nur wenigen Atomlagen bis zu einigen Mikrometern liegt, als Dünnschicht. Abhängig vom erforderlichen Material, werden zur Abscheidung solcher Schichten Verfahren der physikalischen (PVD) und chemischen Gasphasenabscheidung (CVD) eingesetzt. Im Folgenden werden die beiden Beschichtungsverfahren anhand der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte vorgestellt.

3.5.1 Physikalische Gasphasenabscheidung

Bei der PVD kommen verschiedene Techniken zum Einsatz, um das als Festkörper vorliegende abzuscheidende Material in die Gasphase zu überführen. Für die Abscheidung der zur Herstellung von Phasenplatten nötigen Dünnschichten werden überwiegend die Methoden der Elektronenstrahlverdampfung sowie der thermischen Kohlenstoffstabverdampfung genutzt, deren Funktionsweise in Abbildung 3.6 schematisch dargestellt ist.

Bei der Elektronenstrahlverdampfung (siehe Abbildung 3.6a) befindet sich das aufzubringende Material in einem Graphittiegel am Boden eines evakuierten Rezipienten und wird durch den Beschuss mit einem magnetisch abgelenkten Elektronenstrahl erhitzt und in einen gasförmigen Zustand versetzt. Das Vorhalten eines Vakuums ist dabei nötig, um

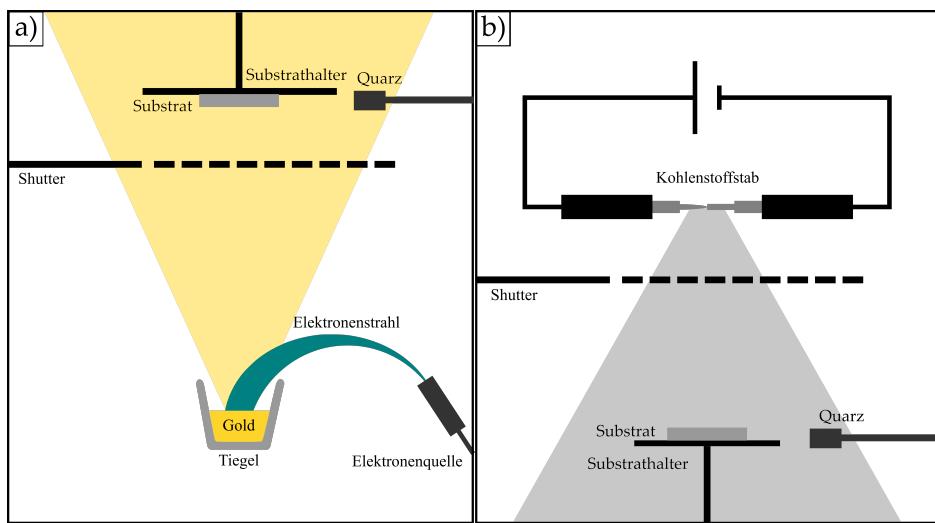


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der Elektronenstrahl- und Kohlenstoffstabverdampfung. a) Bei der Elektronenstrahlverdampfung wird das zu verdampfende Material in einen Tiegel gefüllt und durch Elektronenbeschuss in die Gasphase überführt. Das gasförmige Material kondensiert auf der Substratoberfläche. b) Bei der Kohlenstoffstabverdampfung werden zwei präparierte Kohlenstoffstäbe durch kurze Strompulse erhitzt, sodass der Kohlenstoff in den gasförmigen Zustand übergeht und auf dem Substrat als amorphe Schicht kondensiert. Bei beiden Verfahren werden Schwingquarze zur Bestimmung der Schichtdicke eingesetzt.

Stoßprozesse und Verunreinigungen der Dünnschicht mit Restgasmolekülen zu vermeiden und einen reproduzierbaren Aufdampfprozess zu gewährleisten. Das verdampfte Material erfüllt den Rezipienten und kondensiert auf dem Substrat, welches sich am oberen Ende der Kammer auf einem Substrathalter befindet. Der Aufdampfprozess wird durch einen Shutter kontrolliert. Auf Höhe des Substrathalters befindet sich ein Schwingquarz, der ebenfalls mit dem Material bedampft wird. Durch eine Änderung der Eigenfrequenz des Schwingquarzes während der Beschichtung, können mit Kenntnis der Materialdichte die Schichtdicke und die Aufdampfrate ermittelt werden. Letztere ist abhängig von der Schmelztemperatur und anderen Materialeigenschaften sowie dem Strom an der Elektronenquelle und der Elektronenenergie.

Im Rahmen der Arbeit stand ein Lesker PVD75 Elektronenstrahlverdampfer zur Verfügung, welcher bis zu vier mit unterschiedlichen Materialien gefüllte Tiegel aufnehmen kann und somit die Abscheidung von verschiedenen Dünnschichten in einem einzigen Prozess ermöglicht. Durch die hohen Temperaturen, die der Lesker PVD75 erzeugen kann, lassen sich eine Vielzahl von Materialien verdampfen. Für die Herstellung von Phasenplatten werden insbesondere leitfähige Schichten aus Cr , Au und C und isolierende Oxidschichten aus Al_2O_3 und SiO_2 benötigt. Das sich während der Abscheidung ohnehin erwärmende Substrat kann je nach Material mittels Heizlampe zur Steigerung der Schichtqualität zusätzlich geheizt werden. Temperaturempfindliche Substrate erfordern wiederum zum Schutz eine

Temperierung durch die integrierte Wasserkühlung. Bei Substraten mit strukturierter Oberfläche erleichtert eine regelbare, motorisierte Rotation des Substrathalters eine gleichmäßige Bedampfung.

Ein weiteres Verfahren der PVD, welches für die Erstellung dünner *C*-Schichten verwendet wird, ist die auf dem Prinzip der Widerstandsheizung beruhende Kohlenstoffstabverdampfung (siehe Abbildung 3.6b). Dabei werden zwei in elektrischem Kontakt stehende, speziell präparierte Kohlenstoffstäbe durch kurze elektrische Strompulse erhitzt, sodass der *C* in den gasförmigen Zustand übergeht und auf dem Substrat als amorphe Schicht kondensiert. Um einen möglichst großen Widerstand für den die beiden Kohlenstoffstäbe durchfließenden Strom und damit eine ausreichend hohe Temperaturrentwicklung zur Verdampfung des *C* zu erreichen, wird einer der beiden Kohlenstoffstäbe angespitzt und damit die Kontaktfläche minimiert. Gleichzeitig werden die Kohlenstoffstäbe durch einen Federmechanismus aufeinander gepresst, sodass der elektrische Kontakt auch trotz des Materialabtrags an den Stabspitzen während der Abscheidung gesichert bleibt. Auch bei der Kohlenstoffstabverdampfung werden teilweise Schwingquarze zur Bestimmung der Schichtdicke eingesetzt. Bei einfacheren Geräten kann das Schichtdickenmesssystem auch fehlen, sodass die Schichtdicke anhand der Farbe des *C*-Films und der Zahl der angewandten Strompulse abgeschätzt werden muss. Die erhaltenen Schichtqualitäten bei der Kohlenstoffstabverdampfung sind schlechter als bei der Elektronenstrahlverdampfung und der Aufdampfprozess ist schwerer kontrollierbar. Im Rahmen der Arbeit standen ein Cressington 108, ein Denton Desktop Turbo und ein Bal-Tec MED 020 Kohlenstoffbeschichter zur Verfügung. Mit dem Bal-Tec MED 020 können Kohlenstoffstäbe nicht nur thermisch sondern auch mittels Elektronenstrahl verdampft werden.

3.5.2 Chemische Gasphasenabscheidung

Bei der CVD liegen die Komponenten des abzuscheidenden Materials als gasförmige Verbindungen vor und werden erst durch eine chemische Reaktion als Feststoff auf einer geheizten Substratoberfläche abgeschieden. Die Temperatur des Substrats muss dabei im Bereich der Reaktionstemperatur liegen. Durch Absenkung des Druckes in der Reaktionskammer mittels Vakuumpumpe wird die Reaktion an der Substratoberfläche gefördert und etwaige mögliche Reaktionen in der Gasphase, die zur Bildung von festen Partikeln führen, unterdrückt. Im Unterschied zur PVD ermöglicht die CVD eine konforme Schichtabscheidung auf komplex strukturierten dreidimensionalen Oberflächen ohne Abschattungseffekte. Allerdings ist eine Schichtabscheidung mit CVD nicht für jedes Material möglich, denn es müssen sowohl flüchtige Verbindungen der Schichtkomponenten existieren, als auch eine chemische Reaktion, die zur Bildung der Dünnschicht führt. Des Weiteren können die nötigen Reaktionstemperaturen im Bereich von 1000°C die oftmals temperaturemp-

findlichen Substrate schädigen und unbrauchbar machen. Durch die Methode der plasmaunterstützten chemischen Gasphasenabscheidung PECVD, dargestellt in Abbildung 3.7a, können niedrigere, substratschonendere Reaktionstemperaturen von nur wenigen 100°C erreicht werden. Dabei wird die Reaktionsenergie nicht thermisch zugeführt, sondern durch die Zündung eines Plasmas im Reaktionsgasgemisch, welches durch Anlegen eines hochfrequenten elektrischen Wechselfeldes zwischen dem Substrathalter und einer über dem Substrat positionierten Elektrode erzeugt wird. Im Rahmen der Arbeit wurde PECVD zur testweisen Abscheidung von Si_3N_4 auf einem Si -Wafer mit einer Oxford Plasmalab 80 Anlage verwendet, wobei die Reaktionsgase SiH_4 und N_2 zum Einsatz kommen.

3.5.3 Ätzverfahren

Ätzverfahren ermöglichen die Herstellung von Mikrostrukturen durch gezieltes Abtragen von zuvor aufgebrachten Schichten auf der Oberfläche eines Substrats, wie etwa einem Wafer. Um die beim Ätzprozess abzutragenden Bereiche zu definieren, werden die übrigen Bereiche mit einer nichtreaktiven Ätzmaske abgedeckt. Es kommen sowohl nasschemische als auch physikalische, trockene Ätzverfahren zum Einsatz. Nasschemischen Verfahren, bei denen die maskierte Oberfläche in eine ätzende Lösung getaucht wird, zeichnen sich durch eine hohe Selektivität des Ätzprozesses aus. Als nachteilig kann jedoch die hohe Isotropie des chemischen Ätzens angesehen werden, die zu einem Unterätzen der Ätzmaske führt und kein hohes Aspektverhältnis zwischen Tiefe und Breite der zu ätzenden Struktur zulässt. Bei kleinen Strukturen bieten sich daher anisotrope physikalische Ätzverfahren an, bei denen in Sputterprozessen Ionen auf die Oberfläche beschleunigt werden, die zu einer Zerstäubung des abzutragenden Materials führen. Positive Aspekte der beiden Ätzverfahren, nämlich die Selektivität einer nasschemischen Ätzreaktion und die Anisotropie des Sputterätzens, werden im sogenannten reaktiven Ionenätzen (RIE) vereint.

Nasschemische Ätzverfahren

In der Herstellung elektrostatischer PP werden nasschemische Ätzverfahren hauptsächlich zum Ätzen von Au - und Cr -Schichten verwendet, die sich meist auf einem Si_3N_4 beschichteten Si -Substrat befinden. Königswasser, ein Gemisch aus konzentrierter HCl und konzentrierter HNO_3 (Mischungsverhältnis 3:1), wird zur Entfernung einer beispielsweise fehlerhaften Au -Schicht benutzt. Wird stark verdünntes Königswasser eingesetzt, bleibt auch eine lithografierte Ätzmaske aus PMMA 950K stabil und kann zum Schutz zu erhaltenen Bereichen eingesetzt werden. Ebenso kann Chromätze, die durch Lösung von festem $(NH_4)_2[Ce(NO_3)_6]$ in $HClO_4$ und H_2O (Mischungsverhältnis 10,9 Gewichts-% : 4,25

Gewichts-% : 84,85 Gewichts-%) hergestellt wird, zur Entfernung von *Cr*-Schichten verwendet werden. Bei der Herstellung von freistehenden Si_3N_4 -Membranen wird das zugrundeliegende *Si*-Substrat mit einer alkalischen *KOH*-Lösung geätzt. Die Ätzgeschwindigkeit hängt bei diesem Prozess von der Kristallorientierung ab und ist für {111}-Oberflächen etwa hundertmal langsamer als für die anderen Kristallorientierungen [92]. Dieses Ätzverfahren ist also im Vergleich zu anderen nasschemischen Prozessen nicht vollständig isotrop. Die Ätzgeschwindigkeit von Si_3N_4 in *KOH*-Lösung ist sehr viel geringer als von *Si*, sodass die Si_3N_4 -Schicht als freistehende Membran erhalten bleibt. Aus gleichem Grund lassen sich in selbigem Ätzverfahren auch strukturierte Si_3N_4 - oder SiO_2 - Schichten als Ätzmasken verwenden.

Reaktives Ionenätzen

Der Aufbau einer Ätzanlage für das reaktive Ionenätzen (RIE), wie in Abbildung 3.7b dargestellt, entspricht dem einer PECVD-Anlage. In einem evakuierten Rezipienten befinden sich zwei gegenüberliegende Elektroden. Auf der unteren Elektrode, dem Substrathalter, wird die zu ätzende Probe positioniert. Die Reaktionsgase fließen unter konstantem Gasfluss in den Rezipienten. Durch Anlegen einer hochfrequenten Wechselspannung an die Elektroden werden Gasmoleküle im Reaktionsgasgemisch ionisiert und ein Plasma erzeugt. Freiwerdende Elektronen treffen auf die geerdete Gehäusewand, die obere geerdete Elektrode oder die untere isolierte Elektrode. Letztere baut durch die eintreffenden Elektronen eine negative Ladung auf. Die entstehenden positiv geladenen Gasionen werden zum Substrathalter beschleunigt und sorgen für einen Materialabtrag auf der Probe. Der Materialabtrag erfolgt einerseits durch das Übertragen kinetischer Energie auf die Probenatome, wie es bei einfachen Sputterprozessen der Fall ist, und andererseits durch chemische Reaktionen. Das senkrechte Auftreffen der Gasionen auf die Probenoberfläche sorgt für die hohe Anisotropie des RIE-Prozesses. Bei der Herstellung von elektrostatischen PP wird RIE zum Ätzen von Si_3N_4 -Schichten mit den Reaktionsgasen CHF_3 und O_2 verwendet [74]. Für den RIE-Prozess wurde eine Sentech Si 220 RIE-Anlage benutzt. Eine auf die Probe aufgebrachte lithografierte Ätzmaske aus PMMA 950K kann zur gezielten Abtragung einzelner Substratbereiche verwendet werden.

3.6 Abflottieren von Dünnfilmen

Die Methode des Abflottierens ist ein wichtiger Herstellungsschritt in der Fabrikation von Dünnfilm-PP. Mit ihr lassen sich abgeschiedene Dünnfilme in einem Wasserbad von einem

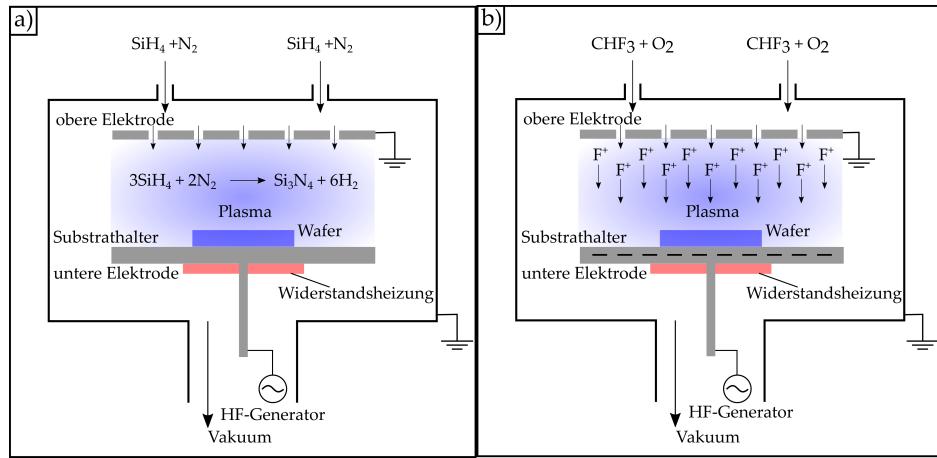


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der PECVD und RIE. a) Das Reaktionsgasgemisch aus SiH_4 und N_2 strömt in den evakuierten Rezipienten, wo es durch ein hohes elektrisches Wechselfeld zur Plasmazündung angeregt wird. Bei der PECVD katalysiert das Plasma die chemische Reaktion, die zur Abscheidung der Dünnsschicht auf dem temperierten Substrat führt. b) Bei der RIE strömt ein Reaktionsgasgemisch aus CHF_3 und O_2 in die Kammer. Durch Plasmazündung entstehen reaktive Ionen, die auf die Probenoberfläche beschleunigt werden und dort zu einer Ätzreaktion führen.

geeigneten Substrat lösen, um sie anschließend für den Einbau in ein Transmissionselektronenmikroskop auf spezielle TEM-Netze oder -Blenden zu transferieren [87]. Im Rahmen der Arbeit wurden für Dünnfilm-PP und als Testproben überwiegend Dünnfilme aus amorphem Kohlenstoff (aC) benutzt, die mittels PVD auf Glimmer-Substrate aufgedampft wurden. Das zum Abflottieren des Dünnfilmes verwendete Wasserbad befindet sich in dem in Abbildung 3.8a gezeigten Büchnertrichter, an dessen Boden sich ein Glasfilter befindet. Das Gefäß verfügt zudem über einen Wasserauslass mit Ventil und kann im Idealfall an dieser Stelle über einen Schlauch mit einem Becherglas verbunden werden, sodass über die Höhe des Becherglases der Wasserstand im Trichter eingestellt werden kann. Der Glasfilter sorgt zusätzlich für einen gleichmäßig langsamem Abfluss des Wassers aus der Schwimmschale. Zum erfolgreichen Abflottieren eines Dünnfilmes sollten die folgenden Schritte abgearbeitet werden:

- Die Glimmer-Substrate werden vor der Beschichtung mit einer scharfen Klinge frisch gespalten und sind daher besonders rein und eben, sodass die Dünnfilme ohne größere Verunreinigungen und mit guter Haftung aufgebracht werden können. In Kontakt mit Wasser lösen sich die aC-Filme allerdings von den Glimmer-Substraten. Um Rissbildung im Film während des Abflottier-Prozesses zu vermeiden, können die beschichteten Glimmer-Substrate vorher auf einem befeuchteten Tuch „eingeweicht“ werden.
- Um Verunreinigungen des abflottierten Films zu vermeiden, sollte die komplette Glas-

apparatur und die eventuell verwendeten Hilfswerkzeuge zuvor mit Ethanol oder im Ultraschallbad gereinigt werden. Zudem empfiehlt sich das Tragen von Einweghandschuhen. Die Schwimmschale sollte wenn möglich mit destilliertem Wasser, anstelle von demineralisiertem oder der Leitung entnommenem Wasser, befüllt werden.

- Die Glasfiltermembran muss mit einem Filtertuch gleichen Durchmessers vor Filmrückständen geschützt werden. Da Filtermaterialien aus Zellstoff zur Fusselabgabe neigen und den Dünnfilm verunreinigen könnten, eignen sich Kunststofftücher aus Polyester- oder Polyamid-Gewebe (Basan GmbH, D-Kelsterbach), wie sie im Reinraumbetrieb zur Reinigung genutzt werden, besser für diesen Zweck. Den Tüchern werden Ausschnitte mit dem Durchmesser der Filtermembran entnommen. Die frischen Schnittkanten der Filtertücher werden durch Anschmelzen auf einer heißen Heizplatte versiegelt, wodurch eine Freisetzung von Fasern im Wasserbad effektiv vermieden werden kann.
- Ein weiteres Filtertuch mit kleinerem Durchmesser wird wie zuvor beschrieben angefertigt und in der Mitte der Schwimmschale positioniert. Wie in Abbildung 3.8a zu sehen ist, werden darauf die TEM-Netze oder -Blenden in der gewünschten Anzahl abgelegt.
- Der Wasserstand im Trichter wird behutsam angehoben und die beschichteten Glimmer-Substrate eingetaucht, wobei sich die Dünnfilme vom Substrat lösen und auf der Wasseroberfläche schwimmen. Dieser Prozessschritt ist in Abbildung 3.8b schematisch dargestellt.
- Durch Öffnen des Ventils oder durch Absenken des angekoppelten Becherglases kann der Wasserstand im Trichter so weit gesenkt werden, dass sich die Dünnfilme auf den TEM-Netzen oder -Blenden absetzen. Da der Dünnfilm frei auf der Wasseroberfläche schwimmt, kann dieser in diesem Schritt wenn nötig mit der Spitze einer gereinigten Pinzette in einen passenden Bereich über die Netze geschoben werden. Anschließend müssen die abflottierten Filme einige Tage trocknen.

Abbildung 3.8c zeigt sechs zur Weiterverarbeitung fertige, mit aC-Film beschichtete TEM-Netze nach dem Abflottier-Prozess. Die TEM-Netze sind in verschiedenen Materialien wie z.B. *Au*, *Cu* und *Ni* erhältlich, während TEM-Blenden vorwiegend aus *Pt* hergestellt werden. Ihr Durchmesser ist mit 3,05 mm für Blendenhalter in gängigen Transmissionselektronenmikroskopen standardisiert. Für die Dünnfilm-PP in dieser Arbeit wurden aufgrund ihrer guten Leitfähigkeit *Au*- und *Cu*-Netze verwendet. Des Weiteren sind die Netze mit verschiedenen Maschenweiten im Bereich von wenigen zehn bis zu einigen hundert Mikrometern erhältlich. Die Maschen sollten zum einen klein genug gewählt werden, dass sie gleichmäßig vom Film bedeckt werden ohne Risse zu bilden, zum anderen groß genug, dass

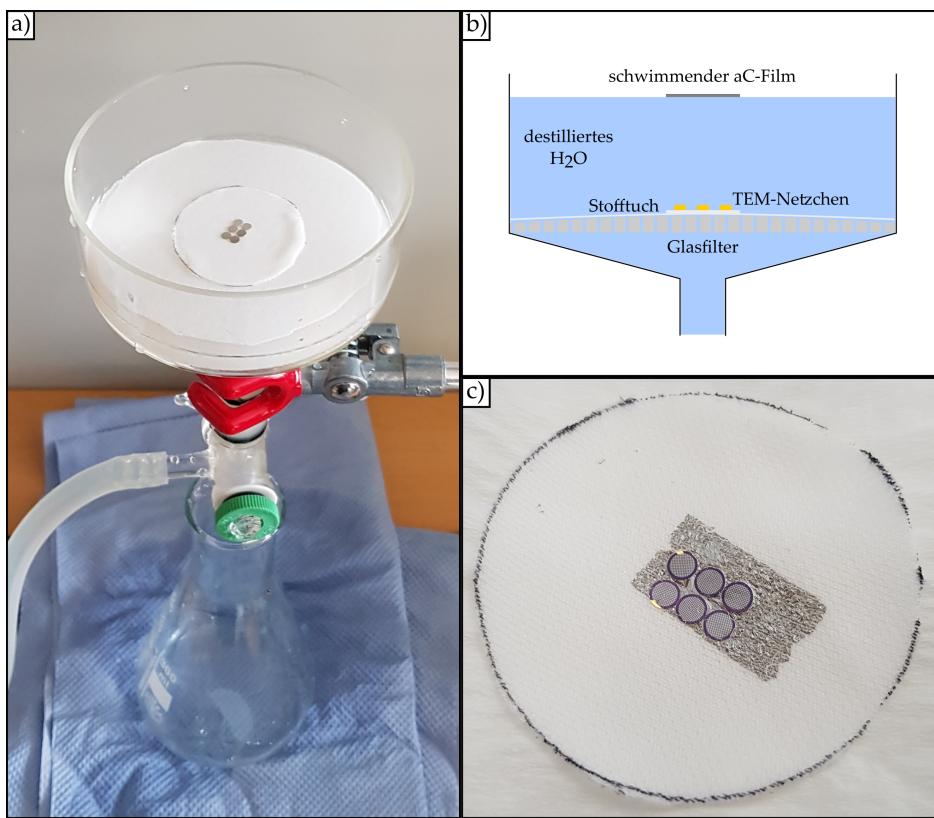


Abbildung 3.8: Aufbau zum Abflottieren von Dünnfilmen. a) Fotografie des Wasserbads in einem Büchnertrichter. b) Schematische Darstellung des Wasserbads. Der aC-Film wurde abflottiert und schwimmt auf der Wasseroberfläche. Durch kontrolliertes Absenken des Wasserspiegels kann der aC-Film auf den TEM-Netzen positioniert werden. c) Zur Weiterverarbeitung fertige, mit aC-Film beschichtete TEM-Netze nach dem Abflottier-Prozess.

das Beugungsbild nicht durch Stege der Netze eingeschränkt wird. Letzteres ist abhängig vom Informationslimit des verwendeten Transmissionselektronenmikroskops.

3.7 Weitere Techniken

Neben den bereits beschriebenen Methoden und Geräten gibt es einige weitere Techniken und Hilfsmittel, die während des PP-Herstellungsprozesses zum Einsatz kommen. So fand die Fabrikation von elektrostatischen PP größtenteils in einem Reinraum statt. Im Vergleich zu herkömmlichen Laborräumen, wird die Raumluftpartikelkonzentration in einem Reinraum durch spezielle Luftfilteranlagen stark abgesenkt. Dies ermöglicht ein sauberes Arbeiten und verhindert das Absetzen von Schmutzpartikeln auf den PP-Chips, die die Funktionsfähigkeit der PP beeinträchtigen könnten. Schmutzpartikel wie z.B. kleine Fussel

können die lithografischen Prozesse stören und zu Defekten in den aufgedampften Leiterbahnen und Kurzschlüssen in der Isolierung führen. Die Arbeit in einem Reinraum erfolgt zusätzlich in einer Schutzkleidung mit Kopfhaube und Laborhandschuhen, um einen Partikeleintrag von außen zu minimieren.

Neben der REM (siehe Abschnitt 3.2) wird hochauflösende Lichtmikroskopie für eine zügige Qualitätskontrolle einzelner Zwischenschritte im Herstellungsprozess eingesetzt. Das Zeiss Axio eignet sich mit seiner Auflösung im Bereich weniger hundert Nanometer beispielsweise gut, um die Vollständigkeit eines *Lift-off*-Prozesses und die Qualität einer lithografierten Struktur zu beurteilen. Eine einfache Stereolupe (Zeiss Stemi) eignet sich gut für die Kontrolle eines abfliptierten Dünnfilmes für filmbasierte PP und für die Kontaktierung von elektrostatischen PP.

4

Kapitel 4

Herstellung und Implementierung von Phasenplatten

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss der drei unterschiedlichen PP-Typen HFPP, Zernike-PP und Zach-PP auf die Kontrastentstehung in der Phasenkontrast-TEM untersucht. Die erfolgreiche Herstellung der PP stellt dabei einen grundlegenden Arbeitsschritt dar. Dieses Kapitel dient der Beschreibung dieser Herstellungsschritte und der anschließenden Implementierung der erstellten PP in die zur Verfügung stehenden Transmissionselektronenmikroskope. Jeder der drei PP-Typen stellt unterschiedliche Anforderungen an die verwendeten PP-Halter und -Halterplättchen, die im Folgenden dargestellt werden. In Abschnitt 4.1 wird die Herstellung und Charakterisierung einer HFPP sowie die anschließende Implementierung in das JEOL JEM-3200 beschrieben. Die Herstellung und Charakterisierung von Zach-PP, die in Abschnitt 4.2 dargestellt wird, wurde nach einem bewährten Standardverfahren durchgeführt, welches stellenweise optimiert und erweitert wurde. Des Weiteren beinhaltet dieser Abschnitt eine Beschreibung der Implementierung einer Zach-PP in das Philips CM200 und das JEOL JEM-3200. Während für die Implementierung in das JEOL JEM-3200 ein bereits vorhandener PP-Halter für den Einsatz von Zach-PP angepasst wurde, wurde für die Implementierung der PP in das Philips CM200 ein neuer piezogetriebener PP-Halter konstruiert. Zum Ende des Kapitels erfolgt in Abschnitt 4.3 eine Beschreibung der Herstellung und Charakterisierung von konventionellen und dickengraduierten Zernike-PP sowie deren Einbau in das Philips CM200.

4.1 Lochfreie Dünnfilmphasenplatten (HFPP)

Die Herstellung von HFPP ist, wie in Abschnitt 4.1.1 beschrieben, vergleichsweise einfach, da es dazu keiner Mikrostrukturierung bedarf. Die meisten Elektronenmikroskopielabore verfügen über die Möglichkeit einen nur wenige Nanometer dünnen aC-Film anzufertigen, der für den Einsatz als HFPP geeignet ist, und diesen auf ein TEM-Netz zu übertragen. Für eine korrekte Funktion der HFPP muss der verwendete PP-Halter beheizbar sein. Einige Elektronenmikroskophersteller wie z.B. Thermo Fisher oder JEOL bieten fertige HFPP-Systeme für ihre aktuellen Transmissionselektronenmikroskope an, die einen beheizbaren HFPP-Halter sowie eine Steuerungssoftware beinhalten. Wie in Abschnitt 4.1.2 genauer beschrieben, verfügt auch das in dieser Arbeit verwendete JEOL JEM-3200 der Wadsworth Center 3D-EM Facility über ein vorinstalliertes HFPP-System, welches für die Implementierung von HFPP verwendet wird. Ein nachträglicher Einbau eines HFPP-Halters in ein älteres Transmissionselektronenmikroskop ist in der Regel auch realisierbar. Am LEM wurde beispielsweise ein für die Anwendung von Zach- und Zernike-PP konstruierter PP-Halter für das Philips CM200 im Rahmen der Masterarbeit von Rebecca Pretzsch für die Anwendung von HFPP optimiert [81].

4.1.1 Herstellung und Charakterisierung

Für diese Arbeit verwendete HFPP wurden an der Wadsworth Center 3D-EM Facility von Chyongere Hsieh und Michael Marko hergestellt [71]. Die dafür verwendeten aC-Dünnfilme wurden mittels Kohlenstoffstabverdampfung (siehe Abschnitt 3.5.1) entweder mit einem Denton Desktop Turbo oder einem Bal-Tec MED 020 Kohlenstoffbeschichter und handelsüblichen Kohlenstoffstäben (Ladd Reasearch, Williston, VT, USA) hergestellt. Als Substrat dienten dabei frische gespaltene Glimmer-Plättchen. Beide Bedampfungsanlagen wurden mit einem ölfreien Vakuumpumpensystem betrieben, um Kontamination der angefertigten aC-Dünnfilme zu vermeiden. Bei Verwendung des Denton Desktop Turbo Kohlenstoffbeschichters wurde der aC thermisch verdampft und die resultierende Schichtdicke durch einen Farbvergleich mit standardisierten Vergleichsfotografien abgeschätzt. Bei Verwendung des Bal-Tec MED 020 Kohlenstoffbeschichters wurde die aC-Schicht mittels Elektronenstrahlverdampfung hergestellt und die Dicke mit einem Schwingquarz-Schichtdickenmesssystem bestimmt. Bei beiden Verfahren wurde eine Filmdicke von etwa 12 nm angestrebt. Eine weitere Charakterisierung der Schichtdicke wurde nicht vorgenommen, da sie für die Anwendung als HFPP zweitrangig ist. Die Schicht sollte so dünn wie möglich gehalten werden, um möglichst wenig Streuung der transmittierten Elektronen im Schichtmaterial zu verursachen, aber stabil genug sein, um beim Transfer auf ein TEM-Netz nicht zu reißen.

Die fertigen aC-Filme wurden auf der Oberfläche eines destillierten Wasserbades abflottiert (siehe Abschnitt 3.6) und auf TEM-Netze mit einem Durchmesser von 2 mm und einem Gitter aus 5x5 Aperturen mit einem Lochdurchmesser von 100 μm (Daiwa Techno Systems, Tokyo, Japan) transferiert. Die Verwendung von herkömmlichen TEM-Netzen mit einem Durchmesser von 3 mm ist allerdings ebenso möglich [81]. Im Experiment werden die 25 einzelnen Aperturen mit dem aufgebrachten aC-Film der Einfachheit halber als 25 einzelne HFPP angesehen. Bei der Größe der Aperturdurchmesser wurde ein Kompromiss eingegangen, damit einerseits möglichst wenig Bildinformation durch die Aperturränder abgeschnitten wird und andererseits ein Einreißen der Filme aufgrund zu großer Aperturdurchmesser vermieden wird. Bei Betrieb im normalen OL Modus liegt das Informationslimit für das JEOL JEM-3200 bei $7,14 \text{ nm}^{-1}$ ($0,14 \text{ nm}$). Gemäß Gleichung 2.23 und der Brennweite der Objektivlinse $f_{\text{OL}} = 5 \text{ mm}$ entspricht das in der BFP einem Beugungsbild mit einem Durchmesser von $140,6 \mu\text{m}$. Raumfrequenzen oberhalb von $5,08 \text{ nm}^{-1}$ bzw. Bildinformationen unterhalb von $0,2 \text{ nm}$ werden also von der HFPP-Apertur abgeschnitten. Für die Abbildung der meisten biologischen Strukturen stellt dies allerdings kein Problem dar, da deren kleinste Abmessungen meist Größenordnungen von mehreren Nanometern aufweisen. Bei Einbau der HFPP mit $100 \mu\text{m}$ Apertur in die vergrößerte Brennebene (Brennweite $f_{\text{OL}} = 15,8 \text{ mm}$) des JEOL JEM-3200 und Betrieb des Mikroskops im SA-MAG-Modus, werden Raumfrequenzen über $1,6 \text{ nm}^{-1}$ bzw. Bildinformationen unter $0,62 \text{ nm}$ abgeschnitten, was abhängig von der Größe der abzubildenden Strukturen zu berücksichtigen ist.

4.1.2 Implementierung einer HFPP in das JEOL JEM-3200FSC/PP

Die hergestellten HFPP wurden in die beiden PP-Halter des werksseitig vorinstallierten PP-Systems des JEOL JEM-3200 eingebaut. Das PP-System ist für den Einsatz von Dünnfilm-PP optimiert. Ein PP-Halter befindet sich in der BFP der normalen Objektivlinse und ist in Abbildung 4.1a dargestellt. Abbildung 4.1b zeigt den zweiten PP-Halter, der sich in der SAED-Ebene befindet. Wie in Abschnitt 2.1 erläutert, wird die PP im PP-Halter auf Ebene der BFP der Objektivlinse im normalen OL-Modus betrieben. Durch Versetzen des Mikroskops in den SA-MAG-Modus wird die SAED-Ebene in eine vergrößerte BFP umfunktioniert, sodass die PP im dort befindlichen PP-Halter eingesetzt werden kann. Beide Halter verfügen über ein differentiell gepumptes Schleusensystem, sodass die PP ohne zeitaufwendiges Belüften der Mikroskopsäule getauscht werden können. Abbildung 4.1c zeigt den ausgeschleusten PP-Halter in der SAED-Ebene. An die Spitze des PP-Halters wird ein Halterplättchen angeschraubt, in dem sich die zu implementierende PP befindet. Die verwendeten HFPP wurden mit einem geeigneten Klemmring im Halterplättchen befestigt.

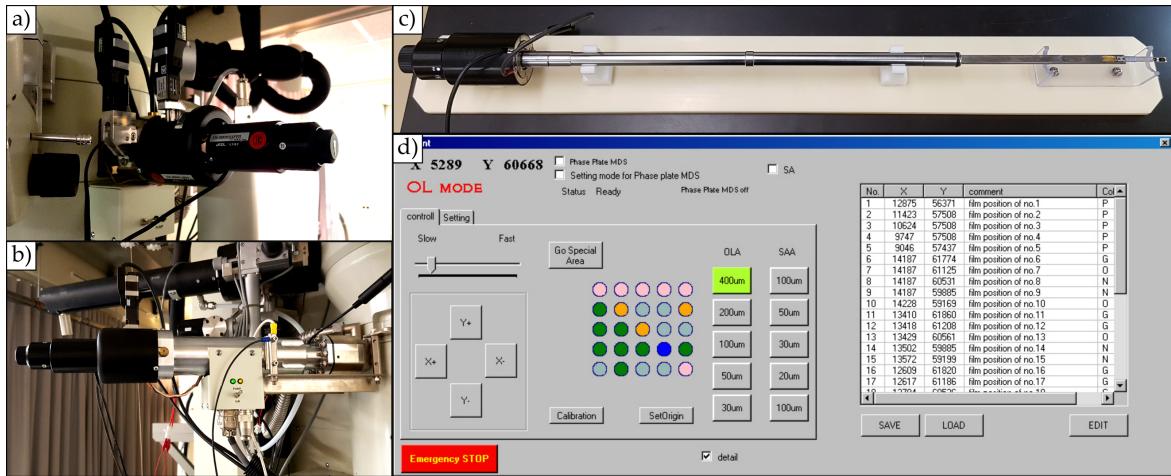


Abbildung 4.1: Werksseitig vorinstalliertes HFPP-System zur Implementierung einer HFPP in das JEOL JEM-3200. a) PP-Halter in der BFP der Objektivlinse für die Verwendung der HFPP im normalen OL-Modus. b) PP-Halter in der SAED-Ebene, die für die Verwendung der HFPP im SA-MAG-Modus in eine vergrößerte BFP umfunktioniert wird. Beide PP-Halter verfügen über ein differentiell gepumptes Schleusensystem und eine Heizung, die eine Temperatur von 500 °C erreichen kann. Grob- und Feintriebe ermöglichen eine genaue Positionierung der PP in der BFP. c) Ausgeschleuster PP-Halter für die SAED-Ebene, an dessen Spitze ein PP-Halterplättchen angeschraubt wird. d) Benutzeroberfläche der Software zur Steuerung des Positionierungssystems der PP-Halter [71]. Die Positionen der 25 einzelnen HFPP-Aperturen können gespeichert und deren Qualität farblich gekennzeichnet werden.

Beide PP-Halter können auf Temperaturen von bis zu 500 °C geheizt werden. Für eine optimale Funktionsweise wurden die HFPP dauerhaft auf einer Temperatur von etwa 260 °C gehalten. Zudem verfügen die PP-Halter über ein softwaregesteuertes Positionierungssystem mit einem Grob- und einem piezobasierten Feintrieb. Die Piezo-Aktoren des Feintriebs nutzen dabei den Piezo-Effekt, durch den sich piezoelektrische Materialien bei Anlegung einer elektrischen Spannung ausdehnen oder zusammenziehen, um eine besonders genaue und stabile Feinpositionierung der PP in der BFP zu ermöglichen. Die in Abbildung 4.1d gezeigte Benutzeroberfläche der Steuerungssoftware des Positionierungssystems ermöglicht es, die eingestellte Position zu speichern und zu einem späteren Zeitpunkt erneut anzufahren. So lassen sich die einzelnen Positionen der 25 HFPP-Aperturen abspeichern und die Qualität bzw. die Funktion der jeweiligen HFPP durch farbliche Kennzeichnung bewerten. Gut funktionierende HFPP wurden beispielsweise grün markiert, während HFPP-Aperturen mit gerissenem aC-Film rosa markiert wurden. Wird darüberhinaus ein Blendscheibchen mit herkömmlichen Objektivlinsenaperturen im PP-Halterplättchen befestigt, lassen sich die Positionen dieser Aperturen ebenso in der Software abspeichern.

4.2 Elektrostatische Zach-Phasenplatten

Von den drei verwendeten PP-Typen ist der Herstellungsprozess der Zach-PP der komplexeste. Er beruht in seinen Grundzügen auf der Arbeit von Schultheiss et al. [90], in deren Rahmen einzelne Prototypen einer Zach-PP hergestellt wurden. In den Arbeiten von Hettler et al. [45, 46] wurde der Herstellungsprozess optimiert und zu einem standardisierten Verfahren weiterentwickelt. Unter Einhaltung dieses Standardverfahrens können, wie in Abschnitt 4.2.2 beschrieben, mehrere Zach-PP auf einem Chip hergestellt und die Ausschussquote trotz der kleinen Abmessungen der herzustellenden Strukturen gering gehalten werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Standardverfahren für die Zach-PP abermals erweitert und optimiert. Beispielsweise wurden *Si*-Chips mit freistehenden Si_3N_4 -Membranen, die das Ausgangsmaterial einer Zach-PP darstellen, in verschiedenen Ausführungen und Abmessungen selbst hergestellt (siehe Abschnitt 4.2.1). Zudem wurden neue Designs entwickelt, um eine Zach-PP auf einem platzsparenden 3 mm Chip zu realisieren (siehe Abschnitt 4.2.3). Nach erfolgter Herstellung werden die Zach-PP mittels Lichtmikroskopie und REM untersucht und charakterisiert (siehe Abschnitt 4.2.4). Dabei geht es zum einen darum optisch einzuschätzen, ob der Herstellungsprozess erfolgreich war, alle Leiterbahnen durchgängig sind und die Zach-PP-Struktur unbeschädigt ist. Zum anderen wird der Zach-PP-Steg und die Elektrode vermessen. Nach einer positiven Einschätzung kann die Zach-PP in ein Transmissionselektronenmikroskop eingebaut und getestet werden. Die Zach-PP wurden in das Philips CM200 (siehe Abschnitt 4.2.5) und für Untersuchungen an biologischen Kryo-Proben in das JEOL JEM-3200 (siehe Abschnitt 4.2.6) implementiert.

4.2.1 Herstellung von freitragenden Siliziumnitrid-Membranen

Ausgangspunkt der Herstellung von Zach-PP sind freitragende Si_3N_4 -Membranen, die in einem Ätzprozess aus mit Si_3N_4 beschichteten *Si*-Chips herausgearbeitet werden. Im Folgenden werden die Chips auch als PP-Rohlinge bezeichnet. Sie lassen sich käuflich erwerben (Silson Ltd., Northhampton, England) und werden als rechteckige Chips ausgeliefert, die sich nochmals in sechs Einzelchips mit je zwei Si_3N_4 -Membranen brechen lassen. Die beiden Membranen befinden sich in einem Abstand von 1 mm zueinander entfernt an einem Ende des jeweiligen Einzelchips. Auf den Einzelchips wird dann die Zach-PP-Struktur aufgebaut und je eine Zach-PP-Elektrode in einem Winkel von 90° zueinander hergestellt. Insgesamt können damit aus einem PP-Rohling bis zu zwölf Zach-PP hergestellt werden. Wenn mehrere PP-Rohlinge gleichzeitig im Herstellungsverfahren bearbeitet werden, vervielfacht sich die Anzahl entsprechend.

Um unabhängig von den Wartezeiten eines Herstellers zu sein und eigene Chip-Designs

für eine optimierte Zach-PP-Herstellung zu entwerfen, wurde die Herstellung von freitragenden Si_3N_4 -Membranen mit den am LEM zur Verfügung stehenden Mitteln selbst durchgeführt. Die einzelnen PP-Rohlinge werden dabei aus einem 4-Zoll Si -Wafer hergestellt, der beidseitig mit einer spannungsarmen Si_3N_4 -Schicht mit einer Dicke von 120 nm versehen ist (MicroChemicals GmbH, D-Ulm). Während eine der beiden Si_3N_4 -Schichten am Ende des Herstellungsprozesses die freitragenden Si_3N_4 -Membranen bildet, dient der Si -Wafer im Wesentlichen als stabilisierende Trägerschicht für die PP-Rohlinge. Ziel des Herstellungsverfahrens ist es, die Si_3N_4 -Schicht auf der Rückseite und das Si des Wafers innerhalb eines genau definierten Fensters zu entfernen, um anschließend eine freitragende Membran mit den gewünschten Abmessungen aus der Si_3N_4 -Schicht der Vorderseite zu erhalten. Die dazu verwendeten Methoden der Fotolithografie und die angewandten Ätzverfahren sind in Abschnitt 3.1 und 3.5.3 genauer beschrieben.

Für die Fotolithografie wird zunächst eine Fotomaske benötigt, durch welche die Stellen definiert werden, an denen später das rückseitige Si_3N_4 und der Si -Wafer entfernt werden sollen. Maskenrohlinge sind käuflich erwerbar und bestehen im Wesentlichen aus einem Quarzglas, auf welches eine lichtundurchlässige Cr -Schicht und eine lichtsensitive Lackschicht aufgebracht wurde. Die Fotomaske wird mit dem Maskenschreiber HIMT DWL 66 hergestellt (siehe Abschnitt 3.1.2). Das Layout der Maske wird mit dem Layoutprogramm KLayout erstellt und als .gdsii-Datei in die Software des Maskenschreibers importiert. Abbildung 4.2a zeigt den Aufbau des Layouts, welches sich über den gesamten Durchmesser des Si -Wafers erstreckt. Das Layout sieht zum einen PP-Rohlinge mit rechteckigen Einzelchips vor, die jeweils zwei Si_3N_4 -Membranen aufweisen und dem Design der käuflich erworbenen PP-Rohlinge nachempfunden sind. Dadurch muss das etablierte Standardverfahren für die Zach-PP-Herstellung (siehe Abschnitt 4.2.2) bei Verwendung der selbst hergestellten PP-Rohlinge nicht abgeändert werden. Zum anderen ermöglicht das Maskenlayout die Herstellung von PP-Rohlingen mit sechs etwa 3 mm großen Scheibchen, die jeweils drei freitragende Membranen beinhalten. Auf die Verwendung der 3 mm Chips für die Zach-PP-Herstellung wird in Abschnitt 4.2.3 genauer eingegangen. Um Zach-PP mit unterschiedlich großen Aperturdurchmessern herstellen zu können, werden durch die Fotomaske unterschiedlich große Membranen in den Rohlingen definiert. Das Layout der Maske ist ausgelegt für PP-Rohlinge mit rechteckigen Einzelchips und Membranabmessungen von $160 \times 160 \mu\text{m}$ (grün markiert in Abbildung 4.2a), $250 \times 250 \mu\text{m}$ (violett markiert in Abbildung 4.2a) und $500 \times 500 \mu\text{m}$ (blau markiert in Abbildung 4.2a) sowie PP-Rohlinge mit 3 mm Chips und Membranabmessungen von $160 \times 160 \mu\text{m}$ (türkis markiert in Abbildung 4.2a) und $250 \times 250 \mu\text{m}$ (rot markiert in Abbildung 4.2a).

Nachdem das Maskenlayout mit dem Maskenschreiber auf einen Maskenrohling übertragen wurde, muss zunächst der Lack des Maskenrohlings entwickelt werden, um die belichteten Lackstellen zu lösen. Dazu wird der belichtete Maskenrohling in eine mit MF-319 Developer befüllte Kristallisierschale aus Glas gelegt und für 45 s darin belassen. Danach wird der

Maskenrohling in eine weitere mit destilliertem H_2O gefüllte Kristallisierschale gelegt, um die Entwicklung zu stoppen. Nach dem Trockenblasen mit der N_2 -Pistole wird im Lichtmikroskop Zeiss Axio überprüft, ob die Entwicklung vollständig ist und die Cr -Schicht in allen vom Maskenschreiber definierten Bereichen hervortritt. Sind noch einzelne Lackreste auf der freigelegten Cr -Schicht zu sehen, muss der Wafer erneut für wenige Sekunden in das Entwicklerbad.

Im nächsten Schritt wird die offenliegende Cr -Schicht in einem Bad mit Cr -Ätze (siehe Abschnitt 3.5.3) entfernt. Der Ätzvorgang dauert etwa 45 s. Die Ätzreaktion ist anfangs nicht zu erkennen, bis sich die offenliegenden Cr -Bereiche schließlich schwarz färben und dann durchsichtig werden. Nach erneutem Abstoppen der Reaktion in H_2O und anschließendem Trocknen wird der Vorgang im Zeiss Axio kontrolliert. Ist die Cr -Schicht vollständig entfernt, wird anschließend die verbleibende Lackschicht von der Maske gelöst. Dies erfolgt in einem Bad aus Remover 300-70 bei einer Temperatur von 70 °C und dauert etwa eine Stunde. Nach einem Spülen der Maske in Isopropanol (IPA) und destilliertem H_2O wird die Maske mit N_2 getrocknet und kann fortan für die Fotolithografie verwendet werden. Abbildung 4.2b zeigt eine Fotografie der fertigen Maske, die im Weiteren für die Herstellung der PP-Rohlinge verwendet wird. Zu sehen ist die stark reflektierende, lichtundurchlässige Cr -Schicht, in der an den durch das Layout in Abbildung 4.2a definierten Stellen das lichtdurchlässige Quarzglas frei liegt.

Der Herstellungsprozess von PP-Rohlingen ist in Abbildung 4.3 schematisch dargestellt. Zunächst wird der als Ausgangsmaterial dienende und beidseitig mit Si_3N_4 beschichtete Si -Wafer (MicroChemicals GmbH, D-Ulm; siehe Abbildung 4.3a) mit Aceton und destilliertem H_2O gereinigt. Etwaige Wasserreste werden durch zehnminütiges Heizen auf der Heizplatte bei 120 °C entfernt. Anschließend wird der Wafer mit einer Lackschleuder im Rotationsbeschichtungsverfahren (siehe Abschnitt 3.1.1) mit einem TI 35ES Fotolack versehen. Die Lackschleuder wird dabei bei einer Umdrehungsfrequenz von 2000 Hz für 40 s betrieben, um eine ausreichend dicke homogene Lackschicht zu erhalten (siehe Abbildung 4.3b). Durch zweiminütiges Ausheizen bei 120 °C auf der Heizplatte werden verbliebene Lösungsmittelreste entfernt (siehe Abbildung 4.3c). Der belackte Wafer wird nun in den Süss MA6 (siehe Abschnitt 3.1.3) transferiert, mit der zuvor hergestellten Fotomaske aus Abbildung 4.2b in Deckung gebracht und an den lichtdurchlässigen Stellen der Maske mit UV-Licht bestrahlt (siehe Abbildung 4.3d). Die UV-Lichtquelle wird dabei für 60 s bei einer Leistung von 5 mW betrieben, um die nötige Bestrahlung von 300 mJ/cm² zu erreichen. Nach einer mindestens zwanzigminütigen Prozesspause wird der belichtete Wafer, wie bereits in Zusammenhang mit der Herstellung der Fotomaske beschrieben, für 30 – 40 s in ein Entwicklerbad gegeben, um die belichteten Stellen des Lackes zu lösen und das sich darunter befindende Si_3N_4 freizulegen (siehe Abbildung 4.3e). Der dafür verwendete Entwickler ist AZ 726 MiF. Anschließend kann die freiliegende Si_3N_4 -Schicht in der Sentech Si 220 mittels RIE entfernt werden (siehe 3.5.3). Der RIE-Prozess wird mit den Prozessgasen CHF_3

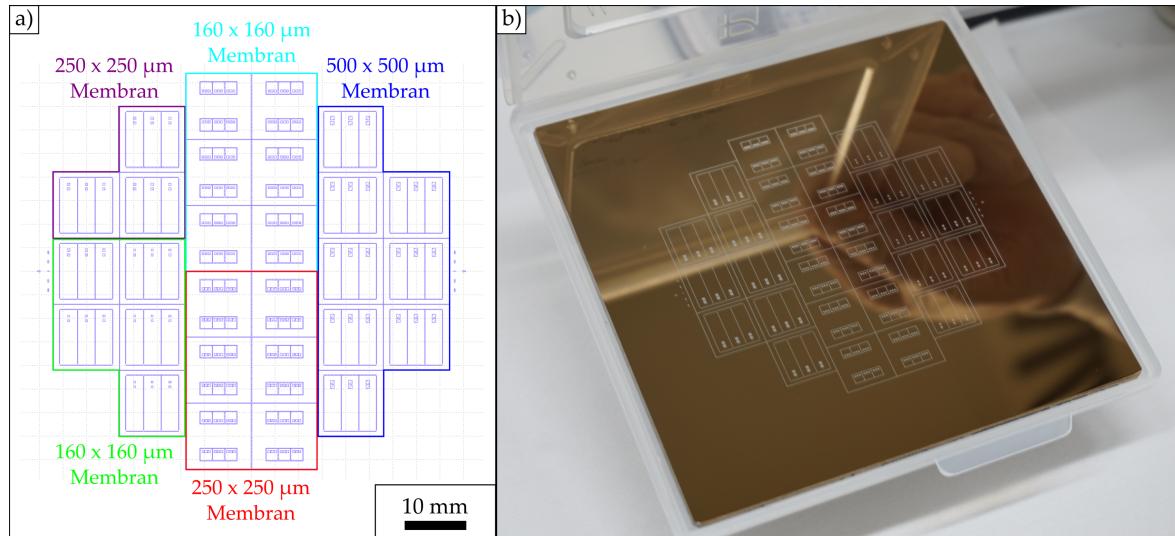


Abbildung 4.2: Maskenlayout und fertiggestellte Fotomaske für die Herstellung von PP-Rohlingen. a) Das Maskenlayout definiert die Stellen, die während der Fotolithografie belichtet werden sollen. Das Layout sieht PP-Rohlinge aus drei Einzelchips mit je zwei Membranen in den Größen $160 \times 160 \mu\text{m}$ (grün), $250 \times 250 \mu\text{m}$ (violett) und $500 \times 500 \mu\text{m}$ (blau) vor sowie PP-Rohlinge aus sechs Scheibchen mit je drei Membranen in den Größen $160 \times 160 \mu\text{m}$ (türkis) und $250 \times 250 \mu\text{m}$ (rot). b) Fotografie der fertiggestellten Fotomaske. An den vom Layout in a) vorgegebenen Stellen wurde die lichtundurchlässige Cr-Schicht vom Maskenrohling entfernt und das transparente Quarzglas liegt frei.

und O_2 bei einer Flussrate von 50 sccm für das CHF_3 und 5 sccm für das O_2 bei einem Gasdruck von 6 Pa und einer Reaktorleistung von 140 W durchgeführt. Die Si_3N_4 -Schicht mit ihrer Dicke von 120 nm ist nach 200 s vollständig weggeätzt und das darunter befindliche Si liegt frei (siehe Abbildung 4.3f). Die verbliebene Lackschicht kann unter Verwendung von Aceton als Lösungsmittel entfernt werden (siehe Abbildung 4.3g).

Die Entfernung der nunmehr freigelegten Si -Schicht erfolgt durch ein nasschemisches Ätzverfahren (siehe Abschnitt 3.5.3) in einem Bad aus 40-prozentiger KOH -Lösung (Mischungsverhältnis $KOH:H_2O = 2:3$), welches durch eine Heizplatte auf einer Temperatur von 80 °C gehalten wird. Innerhalb eines Zeitraums von drei bis vier Stunden ist die Si -Schicht mit ihrer Dicke von $t_{Si} = 200 \mu\text{m}$ vollständig durchgeätzt. Dabei ist zu beachten, dass der Ätzprozess anisotrop abläuft. Wie bereits in Abschnitt 3.5.3 erwähnt, unterscheidet sich die Ätzrate von einkristallinem Si in KOH für unterschiedliche kristallografische Richtungen. In absteigender Reihenfolge ist die Ätzrate in $\langle 100 \rangle$ -Richtung am größten, gefolgt von der $\langle 110 \rangle$ - und der $\langle 111 \rangle$ -Richtung. Wie in Abbildung 4.3h verdeutlicht, bildet sich ein stumpf pyramidales Fenster, das am Ende des Ätzprozesses die Si_3N_4 -Schicht erreicht, die nicht reaktiv mit KOH ist und als freistehende Membran verbleibt.

Bereits bei der Planung des Maskenlayouts muss die Anisotropie der Ätzreaktion von Si in KOH berücksichtigt werden, denn um eine Si_3N_4 -Membran der genau definierten Sei-

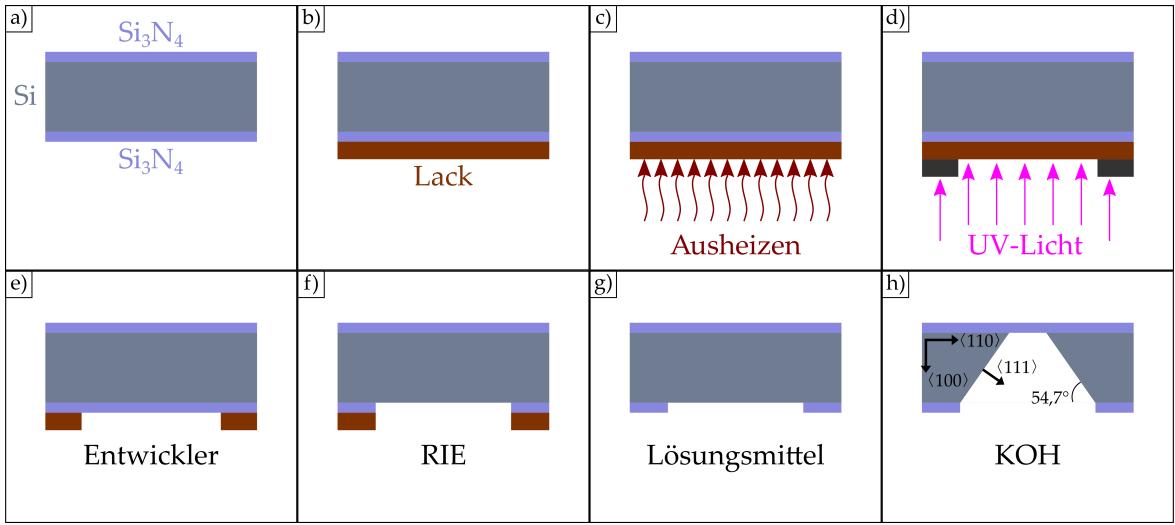


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung des fotolithografischen Herstellungsprozesses von freitragenden Si_3N_4 -Membranen für PP-Rohlinge nach [41]. a) Dem Prozess liegt ein beidseitig mit Si_3N_4 beschichteter Si -Wafer zugrunde. b) Im Rotationsbeschichtungsverfahren wird der Wafer mit einem Fotolack belackt. c) Die Lackschicht wird ausgeheizt, um etwaige Lösungsmittelrückstände zu entfernen. d) Im Maskenausrichter wird eine Fotomaske über dem belackten Wafer positioniert. An lichtdurchlässigen Stellen in der Maske wird die Lackschicht mit UV-Licht bestrahlt, während sie an den lichtundurchlässigen Stellen der Maske geschützt bleibt. e) In einem Entwicklerbad werden die belichteten Lackstellen entfernt und das Si_3N_4 wird freigelegt, während die unbelichteten Stellen des Lackes erhalten bleiben. f) In einem RIE-Prozess wird die freiliegende Si_3N_4 -Schicht weggeätzt. g) Die verbleibende Lackschicht wird mit einem Lösungsmittel entfernt. h) Die Si -Schicht wird durch KOH in einem nasschemischen anisotropen Ätzprozess entfernt, sodass nur noch die gewünschte Si_3N_4 -Membran übrig bleibt.

tenlänge D_{Mem} zu erhalten, muss die Seitenlänge des belichteten Bereiches D_{bel} entsprechend größer gewählt werden. Berücksichtigt man den Winkel von $54,7^\circ$ [36], unter dem sich das pyramidale Fenster bei $\langle 100 \rangle$ -orientierten Wafern ausbildet, kann D_{bel} mit Kenntnis der Dicke der Si -Schicht $t_{Si} = 200 \mu m$ über D_{Mem} berechnet werden [41]:

$$D_{bel} = D_{Mem} + \frac{2 t_{Si}}{\tan(54,7)}. \quad (4.1)$$

Nach dem KOH-Ätzen können noch K -Reste in den pyramidal geätzten Fenstern verbleiben. Diese können entweder mit destilliertem H_2O weitestgehend abgespült werden oder mit einer Lösung aus H_2O , H_2O_2 und HCl im Mischungsverhältnis 5:1:1 gelöst werden. Abbildung 4.4 zeigt einige Beispiele der hergestellten PP-Rohlinge, die jeweils mit einem Großbuchstaben gekennzeichnet sind. In Abbildung 4.4a ist die Vorderseite eines PP-Rohlings mit sechs 3 mm Chips mit je drei $250 \times 250 \mu m$ großen Membranen (A) sowie dreier PP-Rohlinge mit je drei Einzelchips, die jeweils über zwei $500 \times 500 \mu m$ (B), $250 \times 250 \mu m$

(C) und $160 \times 160 \mu\text{m}$ (D) große Membranen verfügen, fotografisch dargestellt. In der sonst glatten Si_3N_4 -Oberfläche treten die Membranen aufgrund ihrer Lichtdurchlässigkeit hervor. Abbildung 4.4b zeigt die Rückseite der PP-Rohlinge. Während des Herstellungsprozesses werden auch die Umrandungen der Einzelchips belichtet und geätzt, sodass an diesen Stellen Gräben entstehen, die in Abbildung 4.4b linienartig hervortreten. Diese Gräben dienen nach der Zach-PP-Herstellung als Sollbruchstelle, um die Einzelchips unbeschadet aus den Rohlingen brechen zu können. Mit dem Lichtmikroskop Zeiss Axio kann der Erfolg der Herstellung der PP-Rohlinge grob überprüft werden. So zeigt beispielsweise die lichtmikroskopische Aufnahme in Abbildung 4.4c die Vorderseite eines 3 mm Chips mit drei intakten $160 \times 160 \mu\text{m}$ großen Membranen. Beschädigte oder eingebrochene Membranen können so schnell identifiziert und für die Zach-PP-Herstellung verworfen werden. Die lichtmikroskopische Aufnahme der Rückseite des 3 mm Chips in Abbildung 4.4d ermöglicht einen ersten Eindruck der pyramidalen Struktur der in das Si geätzten Fenster, allerdings ist die Tiefenschärfe des Lichtmikroskops nicht ausreichend, um sie vollständig scharf abzubilden. Für eine genauere Betrachtung der geätzten Strukturen können REM-Aufnahmen erstellt werden. Abbildung 4.5a zeigt 10 keV SE-REM-Aufnahmen der Vorderseite dreier 3 mm Chips mit $160 \times 160 \mu\text{m}$ großen Si_3N_4 -Membranen aus einem entsprechenden PP-Rohling. Die dünnen Si_3N_4 -Membranen zeigen dunklen Kontrast gegenüber der umgebenden Si_3N_4 -Schicht. Die REM-Aufnahme der Rückseite in Abbildung 4.5b zeigt die für den anisotropen Ätzprozess typische stumpf pyramidale Form des in das Si geätzten Fensters. Aufgrund der hohen Tiefenschärfe des Rasterelektronenmikroskops kann die komplette Pyramidenstruktur scharf abgebildet werden. Des Weiteren werden die geätzten Gräben deutlich, die beim Herausbrechen der Chips als Sollbruchstelle dienen und für die runde Form der 3 mm Chips sorgen. Die Abbildungen 4.5c-e zeigen stärker vergrößerte REM-Aufnahmen der drei unterschiedlichen Membrangrößen, die unter Verwendung der in Abbildung 4.2b dargestellten Fotomaske für den Lithografieprozess hergestellt werden können. Abbildung 4.5c zeigt eine $160 \times 160 \mu\text{m}$ große, Abbildung 4.5d eine $250 \times 250 \mu\text{m}$ große und Abbildung 4.5e eine $500 \times 500 \mu\text{m}$ große Membran. Die Seitenlängen D_{bel} und D_{Mem} aus Gleichung 4.1 sind in Abbildung 4.5c eingezeichnet. Da die Differenz $D_{\text{bel}} - D_{\text{Mem}}$ nur von der Schichtdicke des Si $t_{\text{Si}} = 200 \mu\text{m}$ abhängt, bleibt die Breite des durch den anisotropen Ätzprozess hervorgerufenen Randes im Si -Fenster bei zunehmender Membrangröße gleich.

4.2.2 Herstellung einer Standard-Zach-PP

Die Herstellung einer Standard-Zach-PP ist ein komplexer mehrschrittiger Prozess und folgt dem von Hettler et al. etablierten Standardverfahren [45, 46, 51], welches in kleineren Teilen erneut abgeändert und angepasst wurde. In diesem Abschnitt soll die prinzipielle

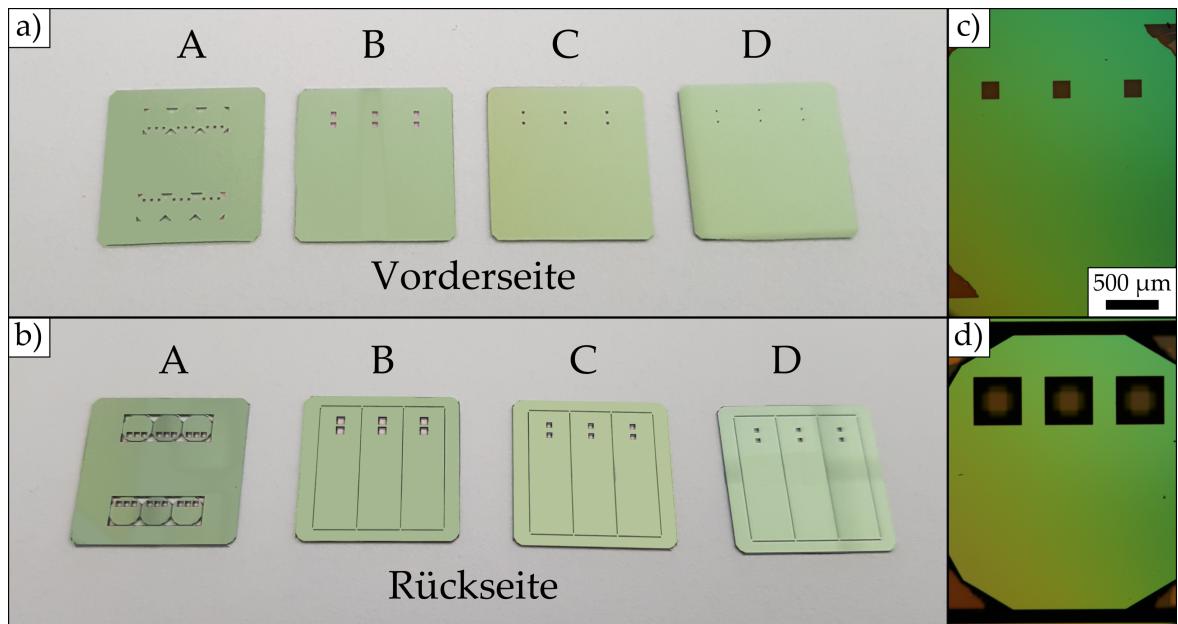


Abbildung 4.4: Fotografische und lichtmikroskopische Abbildungen der hergestellten PP-Rohlinge. a) Die Vorderseite von fünf verschiedenen PP-Rohlingen zeigt eine glatte Si_3N_4 -Oberfläche und die dünnen freitragenden Membranen sind aufgrund ihrer Lichtdurchlässigkeit zu erkennen. b) Die Rückseite der PP-Rohlinge zeigt neben den in das Si geätzten Fenstern auch Linien, die die Einzelchips abgrenzen. Diese Linien wurden im Herstellungsprozess auf gleiche Weise geätzt und dienen als Sollbruchstelle beim Herausbrechen der Einzelchips. Die mit Großbuchstaben gekennzeichneten PP-Rohlinge beinhalten A) sechs 3 mm Chips mit je drei $250 \times 250 \mu m$ großen Membranen und drei Einzelchips mit je zwei B) $500 \times 500 \mu m$, C) $250 \times 250 \mu m$ und D) $160 \times 160 \mu m$ großen Membranen. c) Eine lichtmikroskopische Aufnahme der Vorderseite eines 3 mm Chips mit drei $160 \times 160 \mu m$ großen Membranen kann zur schnellen Qualitätskontrolle herangezogen werden, um Risse in den freitragenden Membranen auszuschließen. d) Die lichtmikroskopische Aufnahme des 3 mm Chips in c) zeigt die pyramidale Struktur der geätzten Fenster. Aufgrund fehlender Tiefenschärfe kann diese allerdings nicht vollständig scharf abgebildet werden.

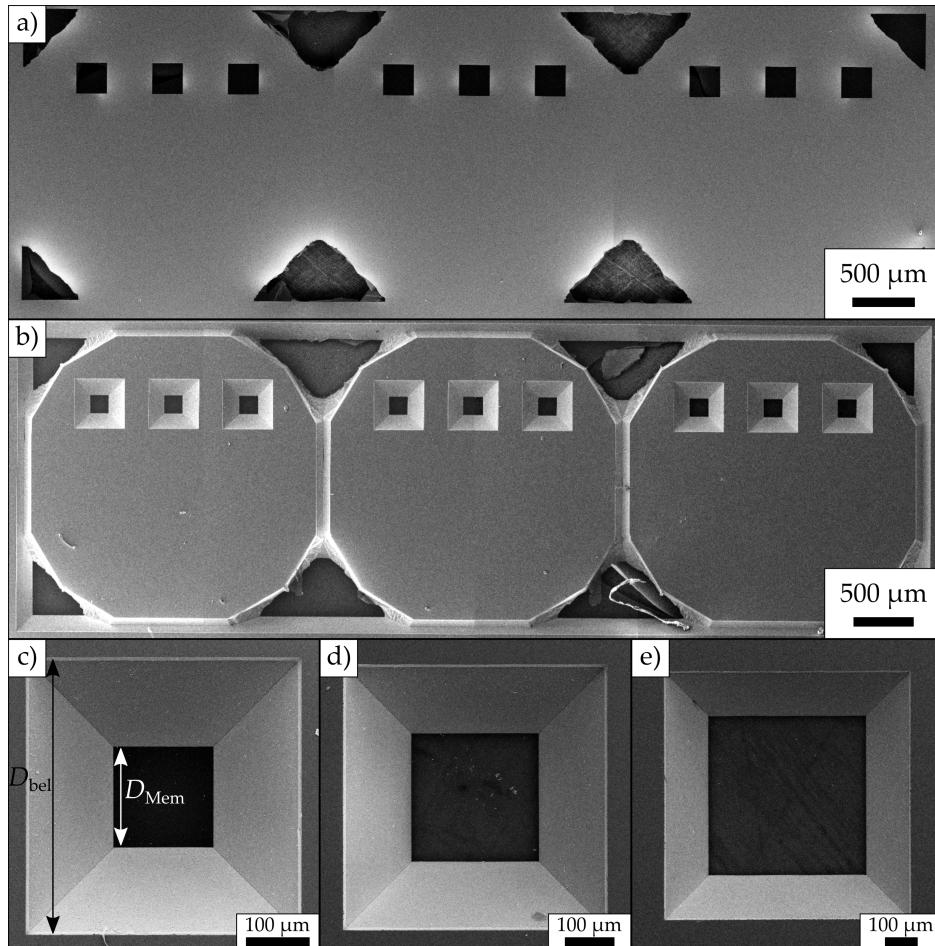


Abbildung 4.5: SE-REM-Aufnahmen der hergestellten 3 mm Chips und Si_3N_4 -Membranen mit verschiedenen Abmessungen. Die Aufnahmen wurden bei einer Elektronenenergie von 10 keV erstellt. a) Die Vorderseite dreier noch aneinanderhängender 3 mm Chips mit $160 \times 160 \mu\text{m}$ großen Si_3N_4 -Membranen. Die Membranen zeigen dunklen Kontrast und sind frei von Einrissen. b) Die Rückseiten der 3 mm Chips zeigen die typische pyramidale Struktur der mit KOH nasschemisch in das Si geätzten Fenster sowie die als Sollbruchstelle dienenden Gräben. c-e) Vergrößerte Rückansicht dreier Membranen mit den Abmessungen c) $160 \times 160 \mu\text{m}$, d) $250 \times 250 \mu\text{m}$ und e) $500 \times 500 \mu\text{m}$. Die Differenz der Seitenlängen D_{bel} und D_{Mem} (eingezzeichnet in c)) ist nur von der Schichtdicke t_{Si} abhängig und bleibt bei zunehmender D_{Mem} gleich.

Abfolge des Herstellungsprozesses dargestellt werden. Ideale Voraussetzungen und Abmessungen für die Funktion einer Zach-PP wurden in den genannten Arbeiten von Hettler et al. [45, 46, 51] ebenfalls ausführlich untersucht und sind im Folgenden kurz zusammengefasst. Dabei gilt es einen Kompromiss zwischen optimaler Funktion, mechanischer Stabilität des Zach-PP-Steges und Machbarkeit mit den zur Verfügung stehenden Mikrostrukturierungstechniken zu finden.

Die prinzipiell anpassbaren Größenparameter der Zach-PP (siehe 2.13) sind der Aperturdurchmesser, die Breite und Höhe der Elektrode sowie die Breite und Höhe des gesamten Steges. Die letzten beiden sind im Wesentlichen von den Dicken der einzelnen Schichten abhängig, die bei der Herstellung des Schichtsystems der Zach-PP abgeschieden werden. Der optimale Aperturdurchmesser sollte im Bereich des Informationslimits des Mikroskops liegen, in das die Zach-PP implementiert wird. So wird vermieden, dass Bildinformation durch die Zach-PP-Blende in der BFP abgeschnitten wird. In der Regel wurden Aperturdurchmesser von $90 - 100 \mu\text{m}$ gewählt. Wie in Abschnitt 4.1.1 beschrieben, liegt ein Aperturdurchmesser von $100 \mu\text{m}$ etwas unter dem Informationslimit des JEOL JEM-3200 im Betrieb im SA-MAG-Modus (Zach-PP in der vergrößerten BFP). Sehr kleine Bildinformationen bei hohen Raumfrequenzen werden von der Zach-PP-Blende abgeschnitten. Da die Zach-PP am JEOL JEM-3200 hauptsächlich zur Untersuchung von biologischen Proben bei geringen Vergrößerungen von etwa 20 kx verwendet wird, ist dieser Informationsverlust hinnehmbar. Testweise wurden auch Zach-PP mit größerem Aperturdurchmesser von $450 \mu\text{m}$ und $250 \mu\text{m}$ hergestellt, welche in den späteren Experimenten aber nicht verwendet wurden. Ein Nachteil, der bei der Strukturierung von Zach-PP mit größeren Aperturdurchmessern entsteht, ist einerseits die Abnahme der Stabilität des freistehenden Steges und andererseits, dass größere Si_3N_4 -Membranen für die Herstellung verwendet werden müssen, die sehr viel schneller einreißen und die PP unbrauchbar machen. Um ein Einbrechen der Stege zu vermeiden, hat sich eine Stegbreite von $2,5 \mu\text{m}$ bei einer Elektrodenbreite von $1,5 \mu\text{m}$ für die Zach-PP mit dem $450 \mu\text{m}$ Aperturdurchmesser als ausreichend erwiesen, während für die Zach-PP mit $250 \mu\text{m}$ Durchmesser ein Steg mit der Breite von $1,5 \mu\text{m}$ bei einer Elektrodenbreite von 500 nm stabil genug war.

In der Regel sollte die Stegbreite so klein wie möglich gewählt werden, um eine Blockade von Raumfrequenzen in der BFP zu minimieren. Zudem kann mittels Simulationen des durch die Zach-PP hervorgerufenen elektrostatischen Potenzials gezeigt werden, dass die Abmessungen der Elektrode im Zusammenhang mit der erreichbaren *Cut-on*-Frequenz der PP stehen [46]. Optimal ist demnach eine möglichst schmale, aber vergleichsweise hohe Elektrode. Die Höhe der Elektrode ist wiederum limitiert durch die Dicke der Isolatorschicht, die während der Herstellung auf der Elektrode abgeschieden werden kann. So liegt die maximal erreichbare Elektrodenhöhe in einem Bereich von $80 - 120 \text{ nm}$ [45]. Darüber hinaus spielt die freie Elektrodenfläche eine Rolle für die Phasenschiebung φ_{PP} die mit der PP erreicht werden kann. Eine schmale Elektrode benötigt eine höhere Spannung U_{PP} , um

eine bestimmte φ_{PP} zu erreichen, als eine breite Elektrode. Gleichzeitig sollte die benötigte U_{PP} nicht zu groß sein, um die dünnen Isolatorschichten nicht zu durchbrechen. Unter Be- trachtung dieser Kriterien hat sich eine Elektrodenbreite von etwa 300 nm bei einer Steg- breite von 1 μm für eine Zach-PP mit einem Aperturdurchmesser von 100 μm als optimal erwiesen [45].

Der Herstellungsprozess einer Zach-PP erfolgt größtenteils in einer Reinraumumgebung (siehe Abschnitt 3.7), um Verunreinigungen der PP-Chips weitestgehend zu vermeiden.

Die schematische Abfolge der einzelnen Herstellungsschritte ist anhand von mit dem Zeiss Axio erstellten lichtmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 4.6 veranschaulicht. Das Ausgangsmaterial sind PP-Rohlinge mit freitragenden Si_3N_4 -Membranen 4.6a, die entweider gekauft oder, wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben, selbst hergestellt werden. Die PP-Rohlinge lassen sich in drei bis sechs Einzelchips mit jeweils zwei Membranen unterteilen. Im Folgenden wird die Herstellung der Zach-PP-Struktur auf einen Einzelchip beschrieben. Nach der Beschichtung des Einzelchips mit PMMA 950K, einem elektronenstrahlsensitiven Lack, wird mittels ESL (siehe Abschnitt 3.3) die Struktur der Elektroden auf die beiden Membranen (siehe Abbildung 4.6b) sowie der Heizung (siehe Abbildung 4.6c) am unteren Ende des Chips lithografiert. Falls der zur Implementierung der Zach-PP verwende- te PP-Halter wie z.B. am JEOL JEM-3200 selbst beheizbar ist, kann die Strukturierung der Heizung ausgelassen werden. Der eigentlich freistehende Steg des Zach-PP-Designs, der eigentlich in der Mitte der PP-Blende endet, wird aus Stabilitätsgründen als durchgehender Steg produziert. In einem späteren Herstellungsschritt wird dann der Steg auf der nicht mit Leiterbahnen versehenen Seite entfernt. Im nächsten Schritt wird die lithografierte Struktur in einem PVD-Prozess im Lesker PVD75 (siehe Abschnitt 3.5.1) mit anschließendem *Lift-off*- Verfahren (siehe Abschnitt 3.3) mit einer etwa 100 nm dicken Cr/Au -Schicht versehen (sie- he Abbildung 4.6d,e). Die nur 3,5 nm dicke Cr -Schicht gewährleistet eine bessere Haftung der Au -Schicht. Die Leiterbahn auf dem Einzelchip ist deutlich breiter als die Elektrode im Steg, welche erst im Zentrum der Membran ihre minimale Breite erreicht. Neben besserer mechanischer Stabilität des Steges wird dadurch auch der elektrische Widerstand der Leiterbahnen reduziert. Wie in Abbildung 4.6d zu sehen ist, werden neben der Elektrode auch Markerkreuze auf und um die Membran erstellt, welche im nächsten Schritt eine genaue Positionierung der Blendenstruktur um die Elektrode in der Mitte ermöglichen. Die Blende wird nach erneuter Belackung des Einzelchips mit ESL um die Elektrode lithografiert. Dabei werden vom Elektronenstrahl nur die Ränder der Blende definiert (siehe Abbildung 4.6f), wodurch beim nachfolgenden RIE-Prozess (siehe Abschnitt 3.5.3) der Membran im Blendenbereich (siehe Abbildung 4.6g) sauberere Kanten erhalten und Einrisse in die Membran vermieden werden [45]. Der RIE-Prozess entscheidet oftmals über den Erfolg des gesamten Herstellungsprozesses. Die lithografierte Struktur der 100 μm Blende sieht nur einen 800 nm breiten Verbleib der mit der Elektrode beschichteten Membran in der Mitte vor. Reißt der Steg bei diesem Prozess, kommt es durch die hohen Temperaturen, die im abschließenden

PVD-Prozess entstehen, zum unvermeidbaren Verbiegen der beiden Stegteile und zur Unbrauchbarkeit der PP [45].

Durch den abschließenden PVD-Prozess wird die Vorderseite der Elektrode mit einer isolierenden Al_2O_3 -Schicht bedampft. Da sich an der Rückseite der Elektrode noch das isolierende Si_3N_4 der Membran befindet, ist die Elektrode im Anschluss vollständig von elektrisch isolierendem Material umgeben. Die PVD von Al_2O_3 sollte immer unter Verwendung einer Heizlampe bei etwa 200 °C erfolgen, um eine höhere Schichtglätte zu erreichen. Die Abschirmung der Zach-PP erfolgt durch beidseitiges bedampfen mit einer leitfähigen Cr/Au -Schicht (siehe Abbildung 4.6h). Um dabei die Seiten des Steges ebenfalls mit Cr/Au zu bedecken, erfolgt die Bedampfung der Vorderseite unter Verwendung des Drehhalters der Lesker PVD75 bei einem schießen Winkel. Zum Abschluss des Herstellungsprozesses kann die Zach-PP noch mit einer etwa 5 nm dicken aC-Schicht bedeckt werden, um Kontamination und Aufladung bei späterer Beleuchtung mit dem Elektronenstrahl im Mikroskop etwas zu vermindern [40]. Dies kann entweder direkt in der Lesker PVD75 oder unter Verwendung eines Cressington 108 erfolgen.

Abbildung 4.6i zeigt den Einzelchip mit fertiggestellter Zach-PP-Struktur. Neben den Leiterbahnen, den Kontaktpads und der Heizung (goldfarben) auf dem Si_3N_4 -Substrat (grün) sowie den beiden Aperturen (schwarz), ist das Schichtsystem aus Al_2O_3 (lila) und Cr/Au (goldfarben, etwas dunkler aufgrund der zusätzlichen aC-Schicht) zu erkennen. Während des Aufdampfens wurden die Kontaktpads und die Heizung mit Alufolie abgedeckt. Beim Aufdampfen der Cr/Au -Schicht wurde die Alufolie etwas weiter in Richtung der Aperturen angesetzt, um einen Kurzschluss zwischen Leiterbahnen und Abschirmung zu vermeiden.

Bevor der fertige Zach-PP-Chip in ein Mikroskop eingebaut und verwendet werden kann, muss der Zach-PP-Steg mit einem FIB durchtrennt und auf der nicht mit einer Leiterbahn versehenen Seite entfernt werden. Dazu wird entweder die FIB-Anlage des FEI Strata 400 oder des FEI Helios G4 FX benutzt. Abbildung 4.7a zeigt eine mit der Kamera der Probenkammer erstellte Aufnahme der Probenbühne des FEI Helios G4 FX, auf der sich ein mit vier Zach-PP-Doppelchips beklebter Probenteller befindet. So wie im Herstellungsverfahren meist mehrere Zach-PP-Chips hergestellt werden, erfolgt auch das Durchtrennen der Stege möglichst in einem Durchgang. Abbildung 4.7b zeigt eine SE-REM-Aufnahme einer Zach-PP-Aperture vor dem Durchtrennen des Steges, erstellt bei einer Primärelektronenenergie von 5 keV. Die Probenbühne ist bereits um 52° verkippt, damit die Probenoberfläche senkrecht zum FIB steht. Auf der unteren Seite befindet sich der Teil des Steges, der entfernt werden soll. Zunächst wird der Steg in der Mitte bei einem mittleren Ionenstrom von 90 pA durchtrennt. Die nun offengelegte Spitze des Zach-PP-Steges, inmitten dessen sich die Zach-PP-Elektrode befindet, wird bei einem schwachen Ionenstrom von 26 pA glatt poliert. Der nicht benötigte Teil des Steges wird anschließend am Aperturrand abgetrennt. Wie auch schon beim Durchtrennen der Stegmitte erfolgt, wird der FIB zunächst durch Scharf-

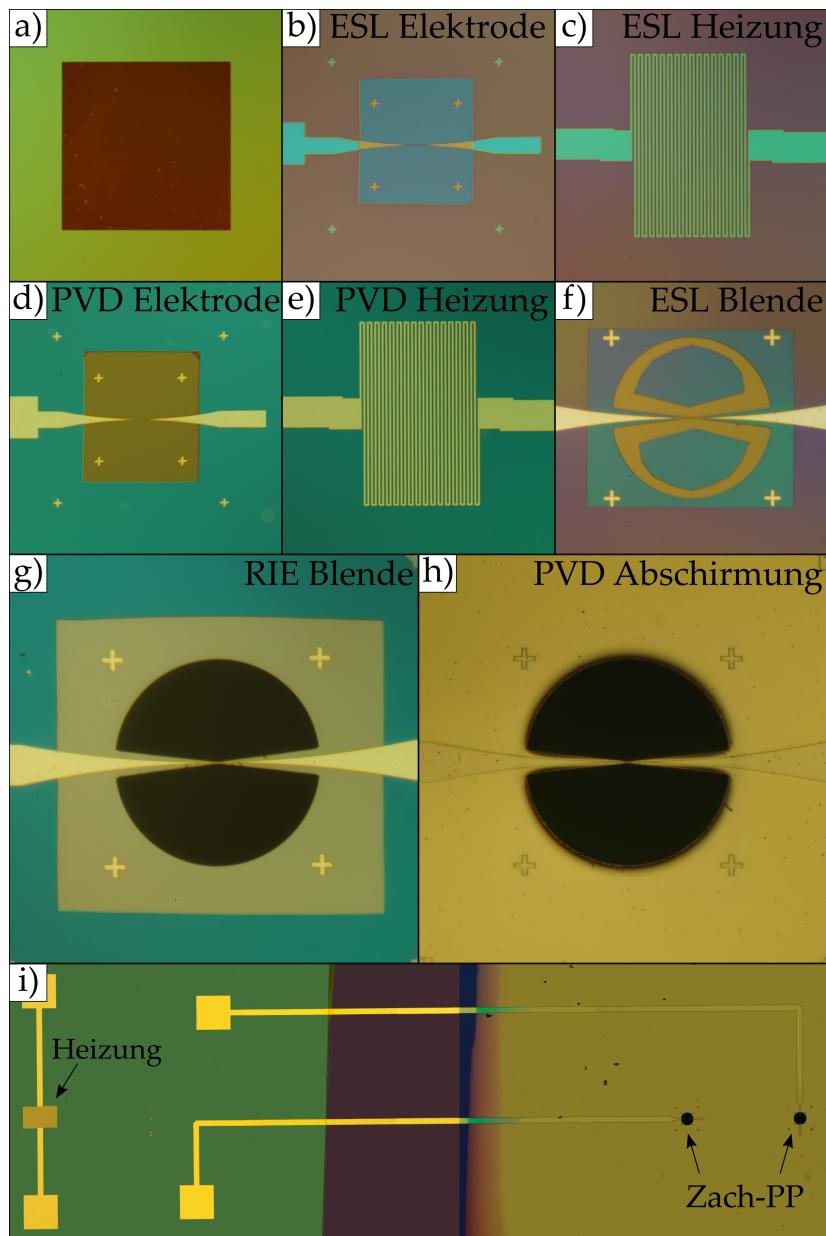


Abbildung 4.6: Lichtmikroskopische Aufnahmen der einzelnen Herstellungsschritte einer Zach-PP. a) Ausgangsmaterial ist ein PP-Rohling mit freitragender Si_3N_4 -Membran. b,c) Nach Belackung des Rohlings wird b) die Elektrode samt Zuleitung und Kontaktpad sowie c) die Heizung mittels ESL strukturiert. d,e) In einem PVD- mit anschließendem Lift-off-Prozess wird d) die strukturierte Elektrode und e) die Heizung mit einer Cr/Au-Schicht versehen. f) Mittels ESL wird die Umrandung der Blende um den Steg in den erneut belackten Rohling lithografiert. g) Die Blende wird in einem RIE-Prozess aus der Membran geätzt. h) In drei weiteren PVD-Prozessen wird die Abschirmung aus einer Al_2O_3 - (Vorderseite) und einer Cr/Au-Schicht (Vorder- und Rückseite) hergestellt. i) Zusammengefügte und bearbeitete Lichtmikroskopie-Aufnahme eines Einzelchips mit fertiggestellter Zach-PP-Struktur. Vor der Implementierung muss der Zach-PP-Steg noch getrennt und die Elektrode freigelegt werden.

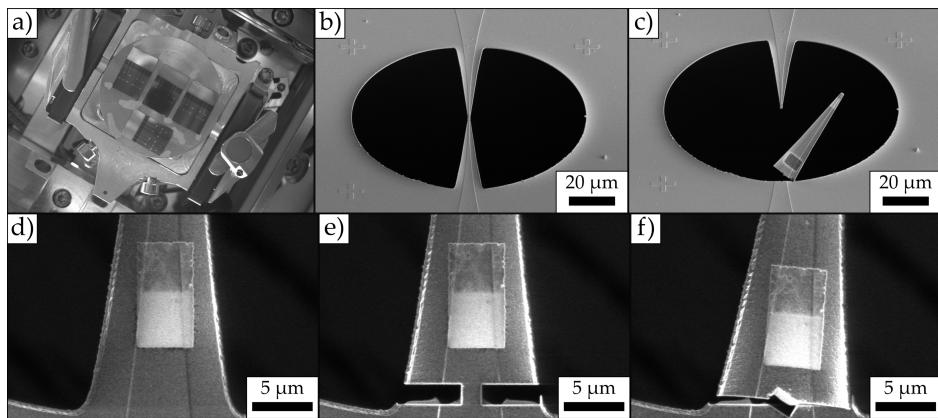


Abbildung 4.7: Durchtrennen des Zach-PP-Steges mit einem FIB. a) Fotografie eines mit vier Zach-PP-Doppelchips beklebten Probentellers auf der Probenbühne des FEI Helios G4 FX, erstellt mit der Videokamera in der Probenkammer. b,c)SE-REM-Aufnahmen bei einer Elektronenenergie von 5 keV zeigen eine Zach-PP-Blende b) vor und c) nach dem Durchtrennen des Steges in der Stegmitte und am Aperturrand. Nach dem Durchtrennen richtet sich der abgetrennte Steg auf. Auf dem abgetrennten Steg sind Oberflächenschädigungen an den zwei Stellen zu erkennen, an denen der FIB fokussiert wurde. d-f) FIB-induzierte SE-Abbildungen bei einer Ionenenergie von 30 keV zeigen das Vorgehen beim Durchtrennen eines Zach-PP-Steges am Aperturrand. d) Fokussieren des FIB auf dem abzutrennenden Teil des Steges. e) Durchtrennen des Steges an den Seiten. f) Durchtrennen des verbliebenen Steges in der Mitte.

stellen einer FIB-induzierten SE-Aufnahme eines kleinen Bereichs auf dem nicht benötigten Teil des Steges fokussiert. Die damit einhergehende Strahlenschädigung der Oberfläche ist in Abbildung 4.7d deutlich zu erkennen. Aufgrund dieser starken Wechselwirkung des FIB mit der Probenoberfläche sollte die PP auch möglichst nur im Bereich des abzutrennenden Steges beleuchtet werden. Wie in Abbildung 4.7e,f zu erkennen, erfolgt das Abtrennen des Steges in zwei Schritten. Zunächst wird der Steg bei einem hohen Ionenstrom von 260 pA an beiden Seiten eingeschnitten, sodass der Steg nur noch an einem kleinen Stück in der Mitte hängt. Anschließend wird das Stück mit einer diagonal verlaufenden rechteckigen FIB-Routine durchtrennt. Diese Vorgehensweise führt dazu, dass sich der abgetrennte Teil des Steges am Aperturrand aufstellt, wie es in Abbildung 4.7c zu sehen ist. Beim Herausholen der Zach-PP aus der Probenkammer fällt der aufgestellte Steg in der Regel durch die Apertur.

4.2.3 Herstellung einer Zach-PP auf einem 3 mm Chip

Wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben, können drei freitragende Si_3N_4 -Membranen auch auf einem runden Chip mit einem Durchmesser von nur 3 mm hergestellt werden (siehe Abbildung 4.5). Die Herstellung einer Zach-PP auf einem derartigen 3 mm Chip hat den Vorteil,

dass sie sehr platzsparend in die meisten herkömmlichen Blendenhalterplättchen eingebaut werden können, da es sich dabei um einen Standarddurchmesser für viele Arten von TEM-Netzen und Blendenscheibchen handelt. Dadurch können prinzipiell auch einfache Blendenhalter für die Implementierung einer Zach-PP in ein Transmissionselektronenmikroskop verwendet werden, wobei diese allerdings mit einer Vakuumdurchführung für die Spannungsversorgung der Zach-PP-Elektroden ausgestattet werden müssen. Es können allerdings auch PP-Halter verwendet werden, die eigentlich nur für den Einsatz von Dünnfilm-PP ausgelegt sind. Aufgrund des geringen Platzes ist die Strukturierung und anschließende Kontaktierung der *Au*-Heizung auf dem kleinen Chip nicht möglich. Der verwendetet PP-Halter sollte also selbst heizbar sein. In Kontext mit der Implementierung von Zernike-PP in das Philips CM200 in Abschnitt 4.3.3 wird auch ein nachrüstbares und mit einem Heizwiderstand ausgestattetes PP-Halterplättchen vorgestellt.

Abbildung 4.8 zeigt anhand zweier lichtmikroskopischer Aufnahmen zwei mögliche Designs zur Anordnung dreier Zach-PP auf einem 3 mm Chip. Die Herstellung der Zach-PP-Elektrode und -Blende entspricht der einer Standard-Zach-PP (siehe Abschnitt 4.2.2), jedoch müssen die Zuleitungen aufgrund der geringen Chip-Größe anders verlaufen. Auf den Aufnahmen hat die Strukturierung der Zach-PP-Elektrode bereits stattgefunden, die Blende wurde aber noch nicht strukturiert. Abbildung 4.8a zeigt ein mögliches Zach-PP-Design, bei dem drei parallel verlaufende Zach-PP-Elektroden auf den drei Membranen strukturiert wurden. Bei dem Design in Abbildung 4.8b können die beiden äußeren Elektroden senkrecht zur mittleren Elektrode verlaufen. Alle drei Leiterbahnen münden in nur einem Kontaktpad. Obwohl die Strukturierung dreier separater Kontaktpads möglich wäre, würde sich die Kontaktierung mit drei Drähten bei dieser Größenordnung schwierig erweisen. Da das nur wenige Hundert Nanometer dünne Schichtsystem der Zach-PP-Spitze relativ anfällig für Kurzschlüsse ist, bedeutet dies aber auch, dass der 3 mm Chip bereits bei einer einzigen fehlerhaften PP unbrauchbar wird.

Die fertige Zach-PP könnte prinzipiell auch mit einem üblichen Klemmring in einem Halterplättchen fixiert werden, was einen schnelleren Austausch des Chips ermöglicht. Dies bedarf aber eines vorherigen Tests, ob der Chip dabei nicht zerbricht und der elektrische Kontakt der Abschirmschicht der Zach-PP zum Halterplättchen ausreichend ist. Andernfalls empfiehlt sich die übliche Befestigung mit einem leitfähigen Klebstoff (siehe Abschnitt 4.2.5).

4.2.4 Charakterisierung

Bei der Charakterisierung einer Zach-PP geht es darum zu überprüfen, ob zum einen das Schichtsystem der Elektrode die gewünschten Abmessungen hat und zum anderen der Herstellungsprozess fehlerfrei abgelaufen ist. Während einige mögliche Probleme, die bei der

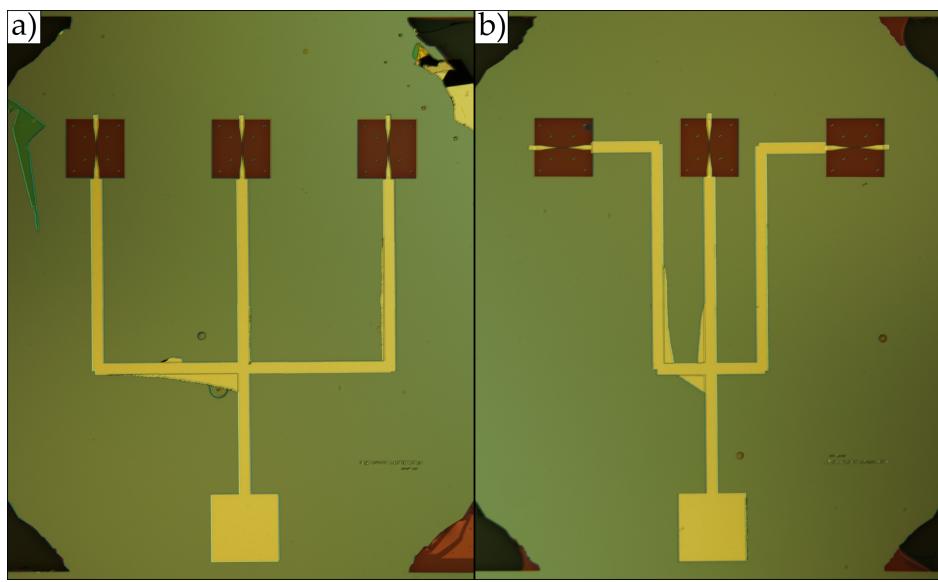


Abbildung 4.8: Lichtmikroskopische Abbildung zweier Designs zur Realisierung einer Zach-PP auf einem 3 mm Chip. Die beiden Abbildungen stammen aus dem Herstellungsprozess nach der PVD-Bedämpfung der strukturierten Elektrode mit Cr/Au und vor der Strukturierung der Blende. a) Die Zach-PP-Elektroden verlaufen parallel auf allen drei Membranen. b) Die Zach-PP-Elektroden auf den beiden äußeren Membranen verlaufen senkrecht zur Elektrode auf der mittleren Membran. Bei beiden Designs laufen die Leiterbahnen aus Platzgründen in nur einem Kontaktpad zusammen.

Herstellung auftreten können, bereits auf den erstellten Lichtmikroskopie-Aufnahmen der einzelnen Zwischenschritte (siehe Abbildung 4.6) erkennbar sind, reicht die Vergrößerung oftmals nicht aus, um den Herstellungserfolg abschließend zu bewerten. Aus diesem Grund werden die fertigen PP-Chips vor dem Einbau in ein Transmissionselektronenmikroskop mit REM untersucht.

Abbildung 4.9a zeigt eine aus einzelnen SE-REM-Aufnahmen zusammengesetzte Übersichtsaufnahme der Zach-PP-Struktur auf einem fertiggestellten Einzelchip, nachdem der Steg bereits durchtrennt wurde. Eine solche Aufnahme wird in erster Linie dazu verwendet nach Fehlstellen in den Zuleitungen zu suchen, die zu einer mangelnden Kontaktierung der Elektrode führen würden. Des Weiteren wird überprüft, ob die freiliegende Al_2O_3 -Schicht breit genug ist, um einen Kurzschluss zwischen Abschirmung und Zuleitungen zu vermeiden. Abbildung 4.9b zeigt eine stärker vergrößerte Aufnahme der Heizung, welche aus 2 μm breiten gewundenen Leiterbahnen besteht. Die Abstände zwischen den Leiterbahnen betragen ebenfalls nur 2 μm , was beim Lift-off-Prozess dazu führen kann, dass sich der dazwischen befindliche Au-Film nicht sauber ablöst und einzelne Windungen überbrückt. Das Prinzip einer derartigen Heizung beruht auf einer bei Stromfluss durch den Leitungswiderstand verursachten Wärmeabgabe. Die fehlerfrei hergestellte Heizungsstruktur hat einen Widerstand von etwa 1 $k\Omega$. Bei überbrückten Leiterbahnen reduziert sich der Widerstand

und damit die maximal erreichbare Temperatur entsprechend. Die Heizung wurde darauf optimiert, den PP-Chip auf eine Temperatur von bis zu 90 °C zu heizen, ohne durch die dazu benötigten verhältnismäßig hohen Spannungen von 10 – 20 V die Funktionalität der Zach-PP zu beeinflussen [46].

Abbildung 4.9c zeigt eine SE-REM-Aufnahme einer Standard-Zach-PP-Spitze mit einer Stegbreite von 1 µm und einer Elektrodenbreite von 300 nm. Die Au-Elektrode zeigt hellen Kontrast gegenüber der sie umschließenden Isolatorschicht. Die Al_2O_3 -Schicht über der Elektrode erscheint etwas heller als die darunter liegende Si_3N_4 -Schicht. Die Oberfläche der Au-Abschirmung ist aufgrund der darauf abgeschiedenen aC-Schicht etwas dunkler als an der Schnittkante. In selteneren Fällen kann es beim Erstellen des Schichtsystems vorkommen, dass die Al_2O_3 -Schicht an den Kanten der Elektrode unzureichend ist, sich Elektrode und Abschirmung berühren und einen Kurzschluss bilden. Dieses Problem kann mit einer solchen REM-Aufnahme ebenfalls entdeckt werden. Abbildung 4.9d zeigt eine PP-Spitze mit einer Stegbreite von 2,5 µm und einer Elektrodenbreite von 1 µm, wie sie für eine Zach-PP mit einem Aperturdurchmesser von 450 µm strukturiert wird (siehe 4.2.2).

4.2.5 Implementierung einer Zach-PP in das Philips CM200 FEG/ST

Am Philips CM200 war zunächst nur die Implementierung von Dünnfilm-PP über einen angepassten Objektivblendenstreifen möglich [33]. Im Rahmen der Arbeit wurde ein piezogesteuerter Kleindiek MM3A-EM Mikromanipulator als PP-Halter verwendet. Um diesen in das Transmissionselektronenmikroskop einzubauen, waren einige Anpassungen nötig, die im Folgenden dargestellt werden. Zunächst wurde ein optimiertes Halterplättchen aus Ti entworfen und von der Werkstatt des Physikalischen Instituts am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) hergestellt. Eine technische Zeichnung der Grundform des Halterplättchens kann Abbildung A.5a im Anhang A.1 entnommen werden. Eine auf einer Seite verschmälerte Version des Halterplättchens, welches bei gleichzeitigem Einbau des Objektivblendenstreifens verwendet werden kann, ist in Abbildung A.5b dargestellt. Wie in Abbildung 4.10a gezeigt, wird der Zach-PP-Chip mit zwei Zach-PP mit dem Silberleitkleber E-Solder 3021 in die Vertiefung des Halterplättchens geklebt. Dabei wird der Silberleitkleber nur in den abgerundeten Ecken der Vertiefung aufgetragen, um ein vollständiges Unterlaufen des Chips zu vermeiden. Zur Kontaktierung der Zach-PP werden lackisierte Cu -Drähte mit dem selben Silberleitkleber auf die Kontaktspuren der Heizung und der beiden Elektroden geklebt. Dabei ist darauf zu achten, dass die Klebestellen nicht ineinander verlaufen. Die Lackisierung der Cu -Drähte wird zuvor mit Schmiegelpapier oder durch Berührung mit einer heißen Lötkolbenspitze entfernt. Ebenfalls vor dem Aufkleben, werden die Cu -Drähte auf der gegenüberliegenden Seite mit einer Steckverbindung verlötet.

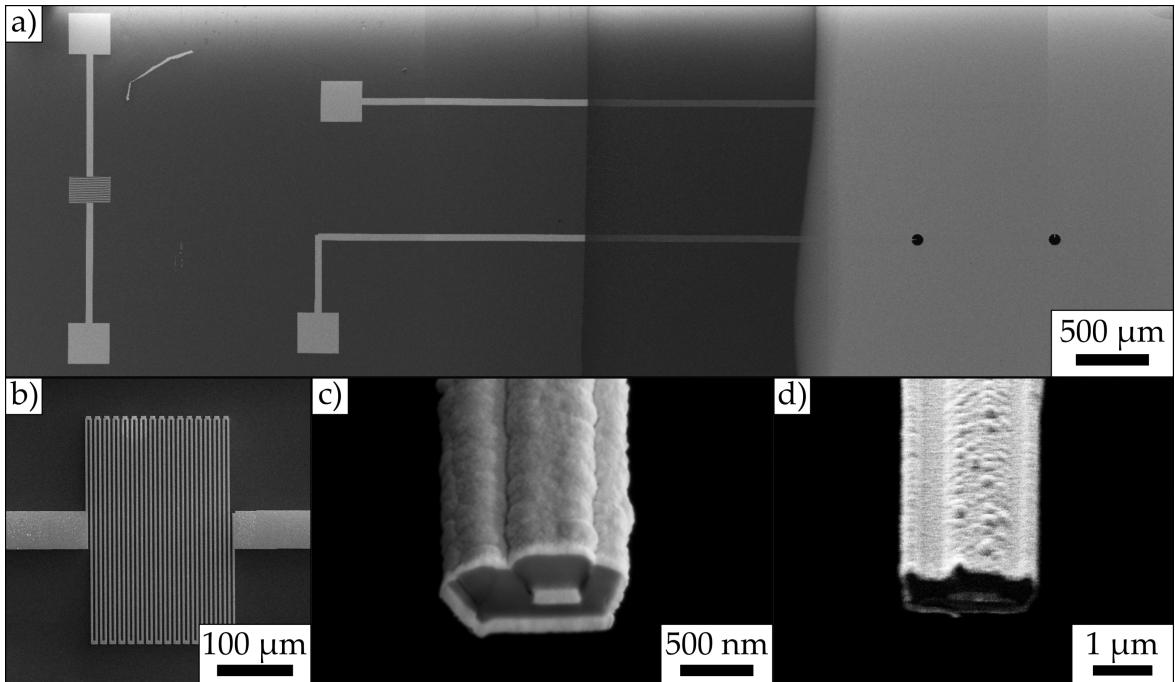


Abbildung 4.9: Charakterisierung einer Zach-PP anhand von SE-REM-Aufnahmen. a) Übersichtsaufnahme einer fertiggestellten Zach-PP nach dem Durchtrennen des Steges, bestehend aus zusammengefügten SE-REM-Aufnahmen. b) Heizungsstruktur mit fehlerfrei strukturierten Leiterbahnen mit einer Breite von $2\text{ }\mu\text{m}$. c) Zach-PP-Spitze mit einer Stegbreite von $1\text{ }\mu\text{m}$ und einer Elektrodenbreite von 300 nm . Die Elektrode mit hellem Kontrast befindet sich in der Mitte und ist umgeben von der dunklen Isolatorschicht. Das Al_2O_3 über der Elektrode erscheint etwas heller als das Si_3N_4 darunter. Der Isolator ist umgeben von der hellen Au-Abschirmung. Aufgrund der aC-Schicht auf der Abschirmung erscheint diese auf der Oberfläche dunkler als an der Schnittkante. d) Zach-PP-Spitze mit einer Stegbreite von $2,5\text{ }\mu\text{m}$ bei einer Elektrodenbreite von $1\text{ }\mu\text{m}$. Die verwendeten Primärelektronenenergien betragen a) 10 keV , b) 15 keV , c) 5 keV und d) 3 keV .

Mit einem nicht leitfähigen Klebstoff werden die Drähte auf dem Halterplättchen fixiert, um ein Ablösen der Kontaktstellen zu vermeiden. Andere Kontaktiermöglichkeiten wie Löten und Drahtboden waren in Tests mit einer Zerstörung der empfindlichen PP-Struktur verbunden [45]. In zwei runde Vertiefungen können zwei weitere Dünnfilm-PP mit einem Ti -Klemmring fixiert werden (siehe Abbildung 4.10a). Auf der Abbildung 4.10b der Rückseite des Halterplättchens ist darüberhinaus zu erkennen, dass auf Höhe der beiden Zach-PP-Aperturen ein Fenster in das Plättchen eingefräst wurde.

Um den Kleindiek MM3A-EM Mikromanipulator als PP-Halter in das Philips CM200 zu implementieren, muss dieser zunächst mit einer Haltevorrichtung ausgestattet werden. Zunächst wurde ein Flanschrohr von der Werkstatt hergestellt, welches den Original-Flansch des Philips CM200 auf einen Kleinflansch NW40KF adaptiert. Ein passender Flanschdeckel wurde mit drei Bohrungen versehen, an welchen der Mikromanipulator und zwei Steck-

verbindungen vakuumdicht befestigt wurden (siehe Abbildung 4.10c). Die Steckverbindungen wurden auf der späteren Vakuumseite mit starren Kabeln ausgestattet, an die die Cu-Drähte der Zach-PP geschlossen werden. Zur Spannungsversorgung der beiden Zach-PP-Elektroden und der Heizung kommen je ein Keithley SM 2400 zum Einsatz, welche über Verteilerboxen an die Steckverbindungen des Flanschdeckels geschlossen werden. Darüber hinaus führt ein Kabel vom Kleindiek MM3A-EM zur Piezosteuerungseinheit. Zur Temperaturmessung am Halterplättchen kann noch ein Glasthermistor verwendet werden, dessen Widerstand ebenfalls über eine der Steckverbindungen ausgelesen werden kann.

Abbildung 4.10d zeigt den fertig zusammengebauten PP-Halter. Der Flanschdeckel wird über eine mit *Pb*-Blech ausgekleidete Strahlenabschirmung aus Messing auf dem Flanschrohr befestigt. Die Kabel zum Flanschdeckel werden an den Seiten zwischen den überlappenden *Pb*-Blechen herausgeführt. Das PP-Halterplättchen wird mit einem *Al*-Stab verschraubt, der in die Spitze des Kleindiek MM3A-EM gesteckt wird. Abbildung 4.10e zeigt den in das Philips CM200 eingebauten PP-Halter. Im eingebauten Zustand befindet sich das PP-Halterplättchen genau im Spalt der Polschuhe der Objektivlinse (siehe Abbildung 4.10f). Das Plättchen sollte möglichst nahe am unteren Polschuh positioniert werden, damit sich der Probenhalter problemlos einschleusen lässt. Der Kleindiek MM3A-EM kann mit einer Genauigkeit von etwa 5 nm zu den Seiten und nach oben bzw. unten bewegt sowie mit einer Genauigkeit von etwa 0,5 nm ausgefahren und eingezogen werden. Wird die PP gerade nicht benutzt, kann das PP-Halterplättchen in der Mikroskopsäule zur Seite in eine Nichtbenutzungsposition geschwenkt werden (sieh Abbildung 4.10g). Um dies zu realisieren, wurde zuvor ein entsprechendes Fenster in den Antikontaminator, der den Polschuhspalt umgibt, eingearbeitet.

Ein gleichzeitiger Einbau des PP-Halters und des Standard-Objektivblendenstreifens in das Philips CM200 ist nicht möglich, da das PP-Halterplättchen bei der Justage der PP am Blendenstreifen hängen bleibt. Aus diesem Grund wurde zum einen ein einseitig verschmälertes PP-Halterplättchen (siehe Abbildung A.5b) hergestellt und zum anderen ein platzsparender Blendenstreifen (siehe Abbildung 4.11) eigens entworfen (hergestellt von Günther Frey GmbH & Co. KG, D-Berlin). Dieser hat sechs Blendenlöcher mit den üblichsten Größen ($2 \times 10 \mu\text{m}$, $20 \mu\text{m}$, $30 \mu\text{m}$, $90 \mu\text{m}$ und $150 \mu\text{m}$) und ist besonders an der Spitze möglichst schmal gestaltet.

Für die korrekte Funktionsweise der PP muss der Halter samt Halterplättchen gut geerdet sein. Die metallischen Teile des PP-Halters liegen zwar auf dem selben Potenzial wie das geerdete Mikroskopgehäuse, jedoch ist die Spitze des Kleindiek MM3A-EM und damit das Halterplättchen davon isoliert. Sie kann über eine Erdungsbuchse an der Piezosteuerung geerdet werden. Diese wird zusammen mit dem Minuspol der Spannungsquellen über Kabelverbindungen mit dem Mikroskopgehäuse verbunden, um ein einheitliches Erdpotenzial sicherzustellen. Wird die Erdung des Halterplättchens nicht sichergestellt, kommt es durch die Beleuchtung mit dem Elektronenstrahl zur Aufladung und damit einhergehend

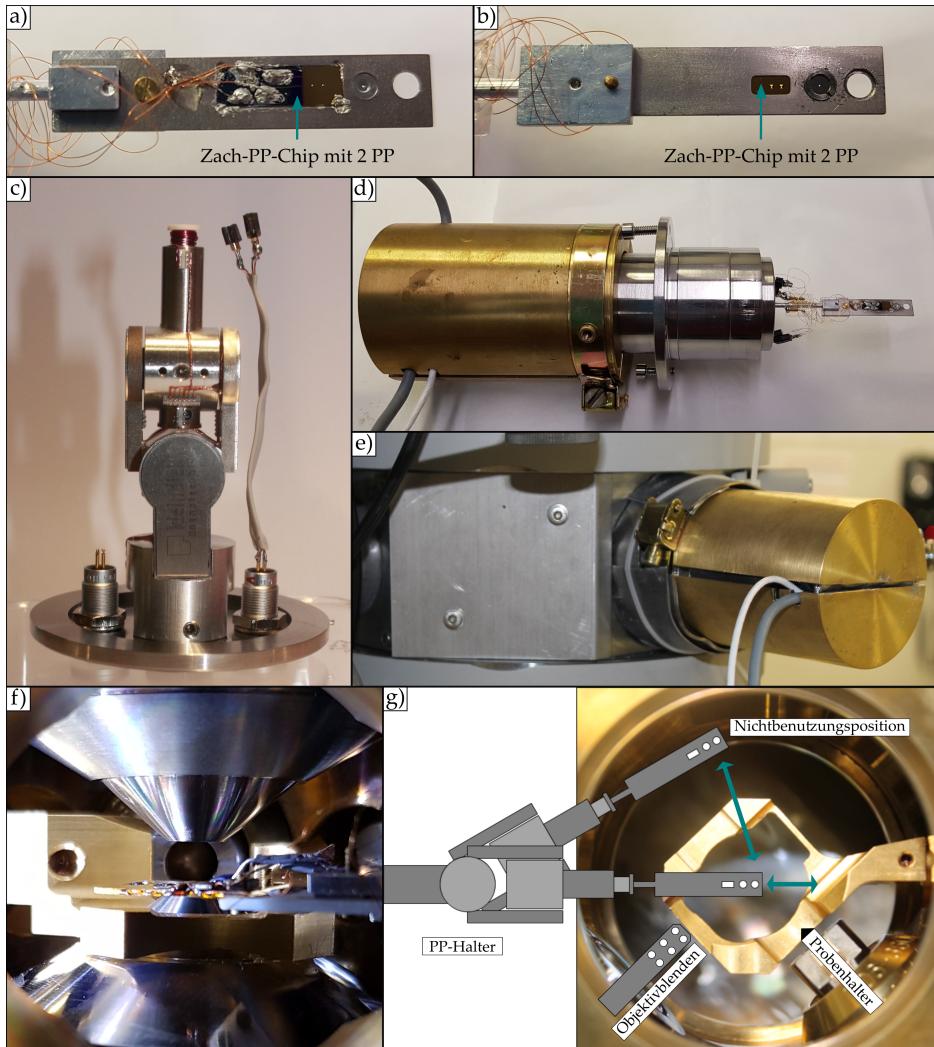


Abbildung 4.10: Implementierung einer Zach-PP in das Philips CM200 unter Verwendung eines Kleindiek MM3A-EM Mikromanipulators als PP-Halter. a) Vorder- und b) Rückseite eines PP-Halterplättchens mit eingeklebter und kontaktierter Zach-PP, einem mittels Klemmring befestigtem Blendenscheibchen sowie einer freien Vertiefung für eine weitere Dünnfilm-PP. c) Der Kleindiek MM3A-EM Mikromanipulator wurde über eine Vakuumdurchführung auf einem angepassten Flanschdeckel befestigt. In zwei weiteren Bohrungen befinden sich zwei vakuumfeste Steckverbindungen für jeweils vier Leitungen. d) Der mit dem Kleindiek MM3A-EM ausgestattete Flanschdeckel wird auf ein maßgefertigtes Flanschrohr gesetzt und von einer mit Pb-Blech ausgekleideten Strahlenabschirmung aus Messing zusammengehalten. e) In das Philips CM200 implementierter PP-Halter. f) Innenansicht des Philips CM200 zeigt das PP-Halterplättchen im Polschuhspalt der Objektivlinse. g) Schematische Darstellung des PP-Halters im Inneren des Philips CM200 in Strahlrichtung. Das PP-Halterplättchen kann in eine Nichtbenutzungsposition zur Seite ausgeschwenkt werden.

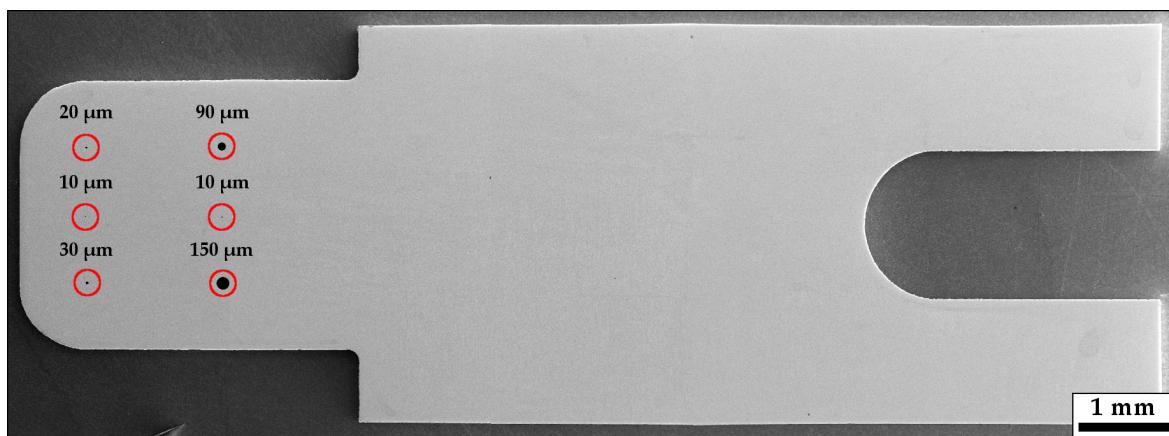


Abbildung 4.11: Für den Einsatz des PP-Halters am Philips CM200 angepasster Objektivblendenstreifen.

der starker Drift der PP im Mikroskop. Des Weiteren hat dies auch zu vorübergehenden Funktionsstörungen der Piezosteuerung geführt.

Wie anhand der REM-Aufnahme in Abbildung 4.12a zu sehen ist, wird die Klebestelle des Minuspols der Heizung auch bis auf das geerdete Halterplättchen gezogen. Im Gegensatz dazu muss darauf geachtet werden, dass sich die anderen Klebestellen nicht berühren und auch keinen Kontakt zur Abschirmung oder dem Halterplättchen haben. Die Au-Abschirmung selbst steht über den zur Fixierung verwendeten Silberleitkleber mit dem geerdeten Halterplättchen in Kontakt.

Bevor die kontaktierte Zach-PP in das Mikroskop eingebaut wird, kann durch Anlegung einer Spannung an die Zach-PP-Elektrode bei gleichzeitiger Auslesung des Stromflusses kurz getestet werden, ob die Zach-PP potenziell funktionsfähig ist. Die mit einem offenen Mikrokoaxialkabel vergleichbare Elektrode verhält sich prinzipiell wie ein Kondensator [45]. Bei einer angelegten Spannung U_{PP} im Bereich von 1-2 V lässt sich ein kleiner Leckstrom von nur wenigen Nanoampere am Keithley SM 2400 ablesen. Fliest kein Strom oder gar ein deutlich größerer, deutet das auf eine mangelnde Kontaktstelle oder einen Kurzschluss hin. Unter Umständen kann sich das beobachtete Strom- und Spannungsverhalten unter den Vakuumbedingungen im Mikroskop nochmals ändern, sodass für eine abschließende Beurteilung der Funktionalität ein Einbau ins Mikroskop trotzdem sinnvoll sein kann.

4.2.6 Implementierung einer Zach-PP in das JEOL JEM-3200FSC/PP

Das JEOL JEM-3200 verfügt bereits über ein werksseitig vorinstalliertes HFPP-Positionierungssystem. Um eine Zach-PP in das System zu implementieren, ist eine Modifikation der PP-Halter unabdingbar. Im Rahmen der Arbeit wurde nur der PP-Halter für die vergrößerte BFP in SAED-Ebene modifiziert (siehe Abbildung 4.1b,c). Da der HFPP-Halter

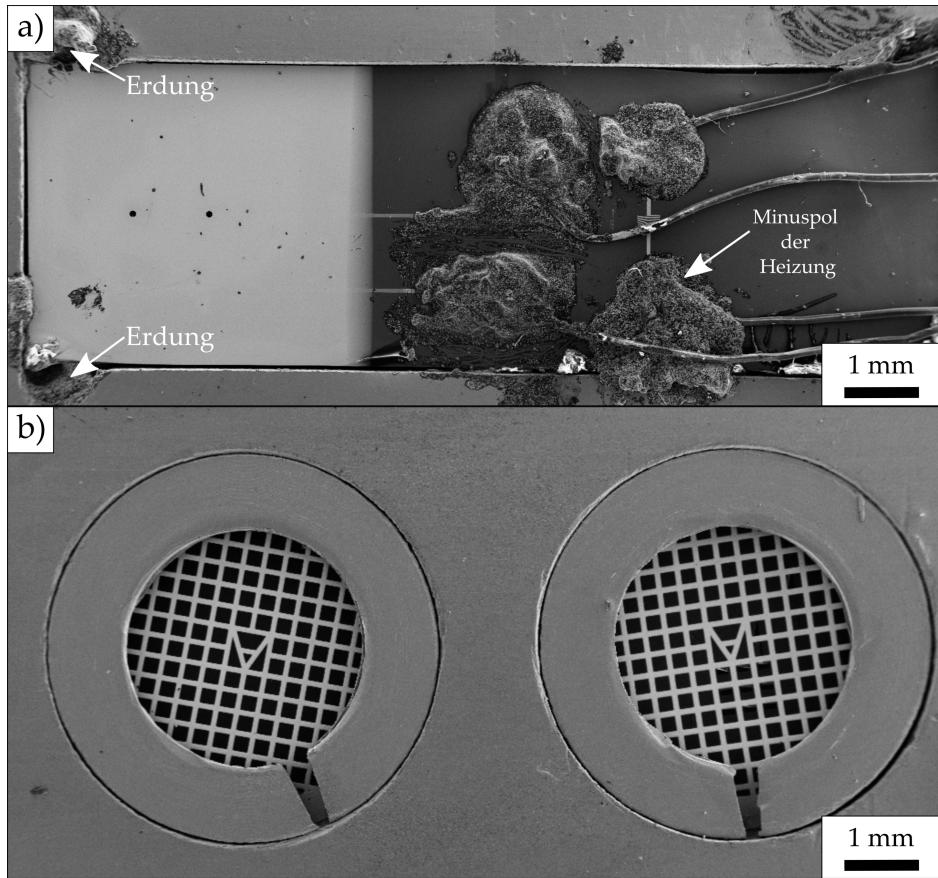


Abbildung 4.12: Implementierung von PP in ein PP-Halterplättchen. a) Übersichtsaufnahme eines eingeklebten und kontaktierten Zach-PP-Chips mit zwei PP in einem Halterplättchen, bestehend aus zusammengefügten SE-REM-Aufnahmen, aufgenommen bei einer Elektronenenergie von 10 keV. b) Zwei mit Ti-Klemmringen im Halterplättchen befestigte Dünnfilm-PP.

mit einer Heizung in der Nähe der eingebauten HFPP ausgestattet sein muss, verfügt der Halter bereits über eine Vakuumdurchführung, welche die Spannungsversorgung eines Heizwiderstandes an der Spitze ermöglicht. Darüber hinaus befindet sich ein Thermoelement für die Temperaturmessung an der Spitze des PP-Halters, welches ebenfalls über die Vakuumdurchführung kontaktiert ist. Nach vorheriger Bestimmung einer Spannungs-Temperatur-Kurve, kann auf das Thermoelement verzichtet und dessen Leitungen für die Kontaktierung einer Zach-PP verwendet werden. Dazu wurde das über Mikroschweißpunkte mit den Leitungen verbundene Thermoelement durch die Werkstatt des Wadsworth Centers gelöst und durch zwei kunststoffummantelte Leitungsverlängerungen ersetzt. Diese können dann zur Kontaktierung der Zach-PP verwendet werden. Zwei Kontakte reichen für eine Standard-Zach-PP aus, da die auf dem Zach-PP-Chip befindliche Heizung bei einem bereits heizbaren PP-Halter nicht gebraucht wird.

Als weiterer Schritt muss das PP-Halterplättchen angepasst werden, um überhaupt eine

Zach-PP aufnehmen zu können. Abbildung 4.13a zeigt das Original-Halterplättchen, in welches ein HFPP-Netz mit einem Durchmesser von 2 mm sowie ein Blendenscheibchen mit einem Durchmesser von 3 mm eingebaut ist. An der gegenüberliegenden Seite des Halterplättchens befinden sich zwei Bohrungen zur Befestigung am PP-Halter. Ebenfalls in Abbildung 4.13a zu sehen ist ein dem Original nachempfundenes Halterplättchen, das mit einer Vertiefung versehen wurde, um eine Zach-PP einkleben zu können. Das Halterplättchen wurde in der Werkstatt des Instituts für Angewandte Physik am KIT aus *Ti* hergestellt. Die genauen Abmessungen des PP-Halterplättchens können der technischen Zeichnung in Abbildung A.4b im Anhang A.1 entnommen werden. Für den prinzipiellen Einsatz einer Zach-PP in der normalen BFP des JEOL JEM-3200 wurde ein vergleichbares Halterplättchen mit angepassten Abmessungen hergestellt (siehe Abbildung A.4a im Anhang A.1). Darüber hinaus wurden weitere Halterplättchen für die jeweiligen PP-Halter in der normalen und vergrößerten BFP hergestellt, die den gleichzeitigen Einbau einer Zach-PP und HFPP (siehe Abbildung A.1), den gleichzeitigen Einbau einer HFPP und eines Blendenscheibchens (siehe A.2) sowie den alleinigen Einbau eines Blendenscheibchens oder eines HFPP-Netzes mit einem Durchmesser von 3 mm ermöglichen. Wie bereits in Abschnitt 4.2.5 beschrieben, wird die Zach-PP mit Silberleitkleber 8331 in das Halterplättchen eingeklebt. Nach der Verschraubung mit dem PP-Halter erfolgt die Kontaktierung mit den kunststoffummantelten Leitungsverlängerungen, ebenfalls unter Verwendung von Silberleitkleber 8331 (siehe Abbildung 4.13b).

Zur Spannungsversorgung der Zach-PP wird die in Abbildung 4.13c gezeigte selbst entwickelte Spannungsquelle verwendet. Prinzipiell wird eine einfache 9 V Blockbatterie als ausreichend stabile Spannungsquelle genommen und über ein Potentiometer geregelt. Eine Segmentanzeige mit integriertem Spannungsmessgerät wird parallel geschaltet und zeigt den aktuellen Spannungswert an. Über eine einfache Polwechselschaltung kann anhand eines dreipoligen Kippschalters zwischen positiver und negativer Spannung sowie Spannungsfreiheit gewechselt werden. Wird die Zach-PP über einen längeren Zeitraum nicht betrieben, sollte der Schalter auf Spannungsfreiheit gestellt werden, um die Batterie nicht unnötig zu entladen. Ist die Batterie verbraucht, kann sie über einen einfachen Batterieclip ausgetauscht werden. Ein weiterer dreipoliger Kippschalter ermöglicht den Wechsel zwischen den beiden Zach-PP-Elektroden. In der mittleren Position des Schalters sind beide Zach-PP-Elektroden über das Gehäuse der Spannungsquelle geerdet. Ein weiterer Kippschalter dient der Ein- und Ausschaltung der Segmentanzeige, die über ein externes Netzteil betrieben wird. Das Netzteil wird an eine Anschlussbuchse an der Rückseite des Gehäuses angeschlossen. An der Rückseite des Gehäuses befinden sich außerdem zwei Kabeldurchführungen, durch die ein vierpoliges Kabel geführt wird. Eine Seite des Kabels ist über eine Steckverbindung mit dem PP-Halter verbunden. Im Gehäuse werden die beiden Leitungen, die zu den Zach-PP-Elektroden führen, aus der Isolierung des Kabels geführt und mit der oben beschriebenen Batterieschaltung verbunden. Die beiden anderen Leitun-



Abbildung 4.13: Implementierung einer Zach-PP in den PP-Halter für die vergrößerte BFP des JEOL JEM-3200. a) Original-PP-Halterplättchen mit einer HFPP und einem Blendscheibchen sowie angepasstes PP-Halterplättchen mit eingeklebtem Zach-PP-Chip. b) Mit dem PP-Halter verschraubtes Zach-PP-Halterplättchen mit eingeklebter und kontaktierter Zach-PP. c) Selbstgebaute Spannungsquelle mit einer 9 V Blockbatterie, deren Spannung über ein Potentiometer geregelt wird. Eine Segmentanzeige mit integriertem Spannungsmessgerät zeigt den aktuellen Spannungswert an. Drei Kippschalter ermöglichen den Wechsel zwischen positiver und negativer Spannung, den Wechsel zwischen den beiden Zach-PP-Elektroden eines Standard-Zach-PP Chips, sowie das Ein- und Ausschalten der Segmentanzeige.

gen, die an den Heizwiderstand geschlossen sind, werden wieder aus dem Gehäuse geführt und über eine weitere Steckverbindung mit einer separaten Spannungsquelle verbunden. Während der Experimente stellte sich heraus, dass der PP-Halter im eingeschleusten Zustand nicht mit dem Erdpotenzial verbunden ist. Dies hat sich durch starke Drift der PP im Transmissionselektronenmikroskop geäußert, wenn die PP mit dem Elektronenstrahl beleuchtet wird und sich auflädt. Es wurde ein Kabel an dem PP-Halter montiert und mit dem Gehäuse des Mikroskops verbunden, welches auf Erdpotenzial liegt. Dadurch kann gewährleistet werden, dass auch das PP-Halterplättchen und die über Silberleitkleber damit verbundene Abschirmung der Zach-PP geerdet ist. Zudem wird auch das metallische Gehäuse der Zach-PP-Spannungsquelle (siehe Abbildung 4.13c) zum einen mit dem Erdpotenzial und zum anderen mit dem Minuspol der 9 V Batterie verbunden. Wenn die Zach-PP nicht betrieben wird, sollte sie immer durch Kurzschließen mit dem Erdpotenzial ver-

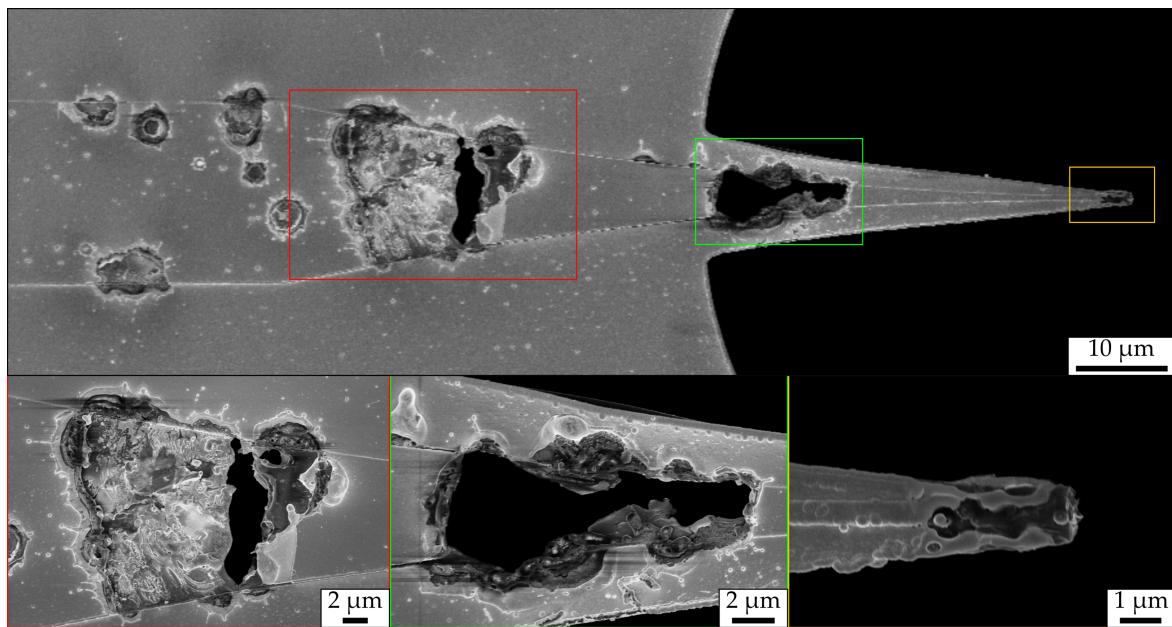


Abbildung 4.14: REM-Aufnahme einer durch eine Spannungsspitze zerstörten Zach-PP nach dem Ausbau aus dem JEOL JEM-3200. Die Aufnahme wurde bei einer Elektronenenergie von 3 keV erstellt. Auf der Elektrode haben sich einige blasenförmige Abplatzungen der Isolation und Abschirmung gebildet. In den vergrößerten Bereichen im roten und grünen Rahmen ist die Elektrode vollständig abgeplatzt und es haben sich Löcher gebildet. Das Schichtsystem der Zach-PP-Spitze in der vergrößerten Abbildung im gelben Rahmen sieht in den ersten 5 – 6 μm miteinander verschmolzen aus.

bunden werden. Dies ist wie oben beschrieben über den Auswahl-Schalter der Spannungsquelle möglich. Die PP-Elektrode ist sehr empfindlich gegenüber Spannungsspitzen und kann, wenn sie nicht geerdet ist, sehr schnell zerstört werden. Abbildung 4.14 zeigt eine 3 keV REM-Aufnahme einer Zach-PP, die im nicht kurzgeschlossenen Zustand einer Spannungsspitze durch elektrostatische Entladung ausgesetzt war. Im Bereich der Elektrode gibt es blasenförmige Abplatzungen der Isolator-Schicht und Au-Abschirmung. Im roten und grünen Rahmen ist die Elektrode vollständig abgeplatzt und es sind Löcher in der gesamten Schichtstruktur entstanden. Die vergrößerte Ansicht im gelben Rahmen zeigt die Zach-PP-Spitze, die in den vorderen 5 – 6 μm abgeschmolzen ist. Diese PP war nicht mehr zu verwenden und musste ausgetauscht werden.

4.3 Konventionelle und dickengradierte Zernike-Phasenplatten

Eine Zernike-PP nutzt das MIP eines strukturierten Dünnfilmes zur Phasenschiebung der gestreuten Elektronen in der BFP der Objektivlinse. Die Dünnfilm-Herstellung für Zernike-

PP gleicht im Wesentlichen derjenigen von HFPP (siehe Abschnitt 4.1.1), jedoch mit anschließender Mikrostrukturierung des Dünnfilms mit einem FIB. Im Rahmen der Arbeit wurden ausschließlich aC-Dünnfilme verwendet. Im Gegensatz zur HFPP, deren aC-Film möglichst dünn gehalten wird und keine übergeordnete Rolle für die resultierende Phasenschiebung spielt, ist die aC-Filmdicke einer Zernike-PP von entscheidender Bedeutung. Eine genaue Schichtdickenbestimmung ermöglicht es dadurch bereits im Vorhinein eine Aussage über die bestimmungsgemäße Funktion der Zernike-PP zu treffen. Für die Untersuchung von dickengradierten Zernike-PP ist zudem die Bestimmung des Dickenprofils der Lochränder von Bedeutung. Nach erfolgreicher Herstellung und Charakterisierung wurden die Zernike-PP in das Philips CM200 eingebaut.

4.3.1 Herstellung

Das Aufdampfen der aC-Filme erfolgt auf frisch gespaltenen Glimmer-Substraten mit PVD (siehe 3.5.1) im Lesker PVD75 Elektronenstrahlverdampfer. Im gleichen Vorgang werden auch noch monokristalline *Si*-Substrate bedampft, die zur Schichtdickenbestimmung verwendet werden. Letztere werden als scheibenförmige Wafer beschafft, mit einem Diamantritzgerät angeritzt und in rechteckige Stücke gebrochen. Glimmer- und *Si*-Substrate werden mit Pressluft gereinigt, bevor sie auf dem Substrathalter des Lesker PVD75 befestigt werden und mit der Abscheidung begonnen wird.

Das Verdampfen von *C* erfordert sehr hohe Temperaturen und kann schnell zu technischen Problemen am Lesker PVD75 führen, wenn dabei das Kühlssystem für den Verdampfertiegel überhitzt. Dieses dient dazu, die elektronischen Komponenten der Anlage vor zu hohen Temperaturen zu schützen. Gleichzeitig entzieht es aber auch dem *C*-Tiegel einen Teil der durch den Elektronenstrahl verursachten thermischen Energie. Es hat sich als hilfreich erwiesen, dass der zu verdampfende *C* möglichst wenig thermischen Kontakt zum gekühlten Tiegel aufweist und die übertragene Energie größtenteils im zu verdampfenden Material verbleibt. Durch die Werkstatt des Instituts für Angewandte Physik (AP) wurde dazu ein Loch in den gepressten *C*-Block im Verdampfertiegel gebohrt, in welchem ein pyramidal angespitzter *C*-Kegel so positioniert wird, dass er den *C*-Block im Tiegel nur an drei Kanten berührt. Der in die Gasphase überführte *C* entstammt dann nahezu vollständig dem *C*-Kegel, der sich sehr leicht austauschen lässt.

Um eine Schicht aus möglichst reinem *C* unter stabilen Bedingungen aufzudampfen, empfiehlt es sich den Verdampfungsprozess mit einer Aufwärmphase des *C*-Kegels zu starten, um eventuell vorhandene Verunreinigungen abzudampfen. Dabei ist die Temperatur einerseits möglichst langsam zu steigern, da ein zu starkes Abdampfen zu einer kurzfristigen Verschlechterung des Vakuums führen kann, was zu einer automatischen Abschaltung bei Übersteigung der festgesetzten Grenzwerte führt. Auf der anderen Seite führt ein zu lang-

sames Steigern der Temperatur zur stetigen Erwärmung der elektronischen Komponenten, was insbesondere zu Störungen im schwingquarzbasierten Schichtdickenmesssystem führen kann. Um beiden Faktoren gerecht zu werden, sollte die Aufwärmphase über etwa eine Stunde durchgeführt werden.

Der eigentliche Aufdampfprozess des aC-Films erfolgt dann bei einem Druck von $2,0 - 4,0 \times 10^{-5}$ mbar im Rezipienten und mit einer Aufdampfrate im Bereich von $0,2 - 0,4 \text{ \AA/s}$. Der Aufdampfprozess läuft bis die gewünschte Schichtdicke erreicht ist und wird dann durch Schließen eines Shutters beendet. Da die Zernike-PP nach dem Einbau in das Philips CM200, welches mit einer Beschleunigungsspannung von 200 kV betrieben wird, den gestreuten Elektronen in der BFP eine Phasenschiebung von $\pi/2$ aufprägen soll, wurde entsprechend der Gleichung 2.9 und unter Annahme eines MIP von 9,0 V für aC eine Schichtdicke von 26 nm angestrebt. Für die im Rahmen der Arbeit verwendeten PP wurde die komplette Schicht in einem einzigen Prozess hergestellt. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit zuerst 16 nm aC aufzudampfen und erst nach dem Abflottieren auf TEM-Netze und der Strukturierung der Zernike-PP-Löcher die restlichen 10 nm aufzubringen, um eventuell dabei entstandene Verunreinigungen mit einer leitfähigen aC-Schicht zu umgeben [20].

Die fertigen aC-Filme werden nun in einer mit destilliertem Wasser befüllten Abschwimmsschale von den Glimmer-Substraten abflottiert und auf sehr gut leitfähige TEM-Netze aus *Au* transferiert. Der Prozess des Abflottierens ist in Abschnitt 3.6 detailliert beschrieben. Wie bei der Herstellung von HFPP (siehe 4.1.1) ist die Maschenweite der TEM-Netze so zu wählen, dass möglichst wenig Bildinformation durch Stege abgeschattet wird. Unter Beachtung des Informationslimits von $7,1 \text{ nm}^{-1}$ für das Philips CM200, zusammen mit einer Brennweite der Objektivlinse von $f_{OL} = 1,7 \text{ mm}$, ergibt sich mit Gleichung 2.23 ein Durchmesser von etwa $60 \mu\text{m}$ für das Beugungsbild in der BFP. Dementsprechend wurden TEM-Netze mit einer ausreichend großen Maschenweite von $125 \mu\text{m}$ gewählt (Plano GmbH, D-Wetzlar; Art.-Nr. G2150C). Eine REM-Übersichtsaufnahme des abflottierten und auf ein TEM-Netz übertragenen aC-Filmes ist in Abbildung 4.15a zu sehen.

Die Strukturierung der Zernike-PP-Löcher erfolgt mit dem Ga^+ -FIB im FEI Helios G4 FX (siehe Abschnitt 3.4) bei einer Ionenenergie von 30 keV und einem Strahlstrom von 7 pA. Für die Experimente im Rahmen dieser Arbeit wurden konventionelle Zernike-PP-Löcher mit Radien von 375, 500 und 750 nm erstellt. Zur Strukturierung wurden kreisförmige Standard-FIB-Routinen verwendet, die genau im Bildzentrum positioniert wurden. Um glatte Lochkanten zu erhalten und ein Einreißen des aC-Filmes zu verhindern, wurde der Radius der FIB-Routine in drei Durchgängen erhöht, bis der Zielradius erreicht wurde. Die verwendeten Lochradien sind der Tabelle 4.1 zu entnehmen. Es wurden immer vier Zernike-PP-Löcher mit gleichen Abmessungen in eine Masche des befilmten TEM-Netzes strukturiert. In der REM-Aufnahme in 4.15b ist eine vergrößerte Abbildung der rot markierten Masche des TEM-Netzes in Abbildung 4.15a zu sehen, in der die vier strukturierten Zernike-PP-Löcher mit nummerierten weißen Pfeilen gekennzeichnet sind.

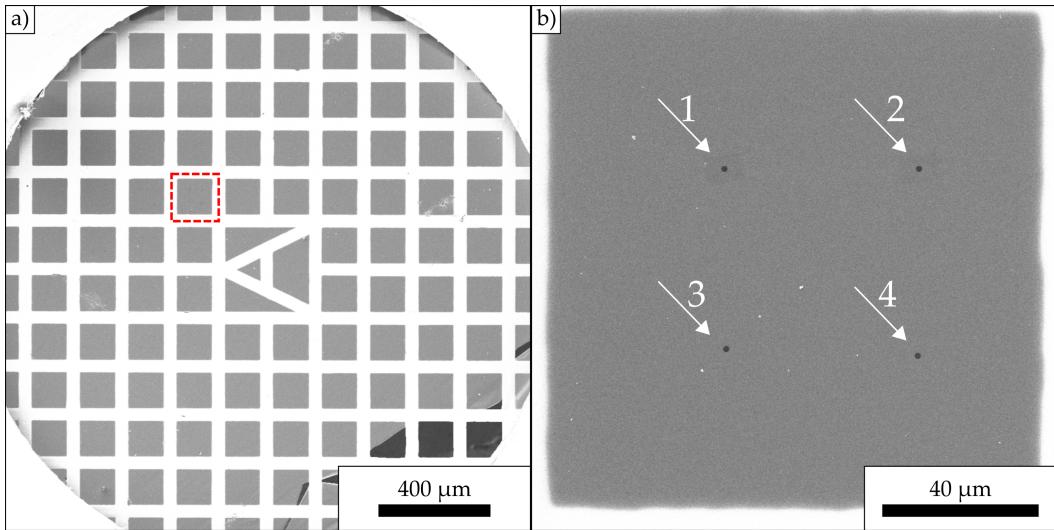


Abbildung 4.15: REM-Aufnahme eines auf TEM-Goldnetze abflottierten aC-Filmes mit mikrostrukturierten Zernike-PP-Löchern. a) Die REM-Übersichtsaufnahme zeigt den gleichmäßig aufliegenden aC-Film auf dem TEM-Goldnetz. Im unteren rechten Bereich ist der aC-Film fehlerhaft. b) REM-Aufnahme der in a) rot markierten Masche. Die nummerierten Pfeile zeigen vier mikrostrukturierte Zernike-PP-Löcher im aC-Film.

Tabelle 4.1: Strukturierung von konventionellen Zernike-PP-Löchern. Die Strukturierung der Löcher mit den Zielradien der ersten Spalte erfolgt in drei Durchgängen, bei denen der Radius einer kreisförmigen, zentrierten Standard-FIB-Routine schrittweise erhöht wird.

Zielradius	1. Lochradius	2. Lochradius	3. Lochradius
375 nm	100 nm	250 nm	375 nm
500 nm	100 nm	250 nm	500 nm
750 nm	100 nm	375 nm	750 nm

Für die Strukturierung der Zernike-PP mit dickengradierter Rand wurde eine benutzerdefinierte FIB-Routine verwendet. Diese kann in Form einer *streamfile*, eine Textdatei mit der Dateiendung .str, in die herstellereigene Betriebssoftware des FEI Helios G4 FX eingebunden werden. Die Datei beinhaltet einen dreizeiligen Dateikopf, durch den das FIB-Schreibfeld in ein Raster aus x- und y-Koordinaten eingeteilt, die Anzahl der Durchläufe festgelegt und die Anzahl der vom FIB zu belichtenden Punkte angegeben wird. Der Hauptteil der Datei beinhaltet zeilenweise die Information über die Verweildauer (Beleuchtungszeit) des FIB sowie die x- und y-Koordinate des zu beleuchtenden Punktes, aufgeteilt in drei Spalten. Abbildung 4.16a zeigt die zweidimensionale Belichtungszeitverteilung, entnommen aus dem verwendeten *streamfile*. Die Beleuchtungsverteilung erstreckt sich über einen Durchmesser von 720 Pixeln, die den einzelnen von dem FIB abzufahrenden Punkten

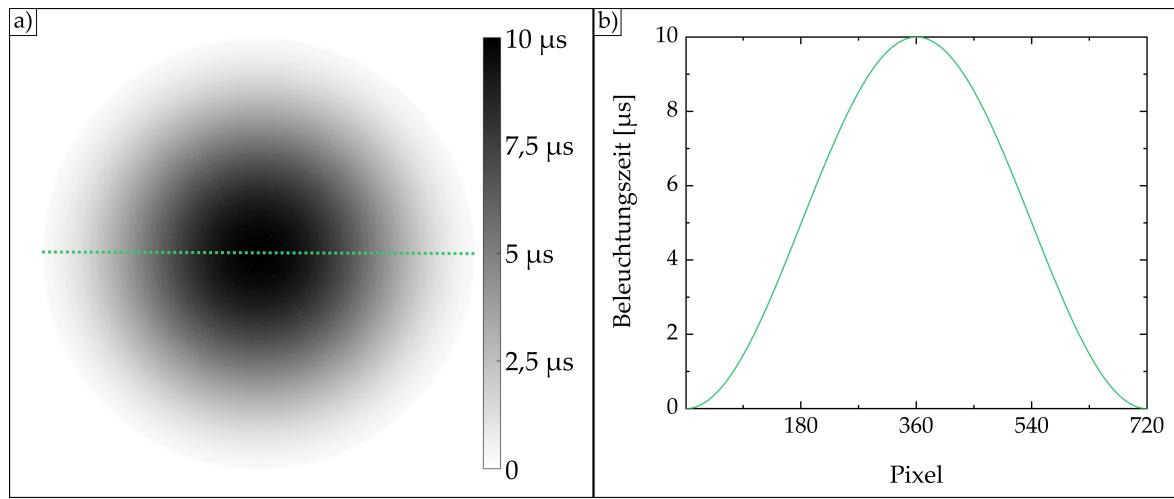


Abbildung 4.16: Benutzerdefinierte FIB-Routine für die Strukturierung von Zernike-PP mit dickengradiertem Rand. a) FIB-Beleuchtungszeitverteilung, entnommen aus dem zur Strukturierung verwendeten benutzerdefinierten streamfile. Der FIB wird mit zunehmender Beleuchtungszeit entlang konzentrischer Kreisbahnen von außen nach innen geführt. Der Radius der so strukturierten Zernike-PP-Löcher wird über die Vergrößerung am Mikroskop eingestellt. Die FIB-Routine wird mehrmals hintereinander durchgeführt. b) Profil der Beleuchtungszeitverteilung entlang der grün gestrichelten Linie in a) zeigt einen kosinusförmigen Verlauf.

entsprechen. Die FIB-Routine beginnt mit der Beleuchtung des Mittelpunktes. Danach wird der FIB auf konzentrischen Kreisen im Uhrzeigersinn um den Mittelpunkt geführt. Dabei wird mit dem äußersten Kreis und einer Verweildauer von $0,2\text{ }\mu\text{s}$ (hellgrau) begonnen und mit dem nächstinneren Kreis bei steigender Verweildauer fortgefahrene. Die Verweildauer im Zentrum beträgt $10\text{ }\mu\text{s}$ (schwarz). Abbildung 4.16b zeigt ein Linienprofil entlang der grün gestrichelten Linie in Abbildung 4.16a und lässt einen kosinusförmigen Verlauf der Beleuchtungszeitverteilung erkennen. Ein kosinusförmiger Verlauf wurde gewählt, um im späteren Dickengradienten einen möglichst schnellen Dickenanstieg zu erreichen, aber dabei glatte Übergänge zwischen Zernike-PP-Loch, dem Bereich des Dickengradienten und dem unstrukturierten Film mit seiner vollen Dicke zu gewährleisten.

Während der Strukturierung der dickengradienten Zernike-PP-Löcher wird die benutzerdefinierte FIB-Routine mehrmals hintereinander und je nach angestrebtem Lochradius bei zwei unterschiedlichen Mikroskopvergrößerungen durchgeführt. Im Gegensatz zu Standard-FIB-Routinen, deren Größen direkt eingestellt werden können, müssen die Abmessungen von benutzerdefinierten FIB-Routinen (importierte *streamfiles*) in der Betriebssoftware des FEI Helios G4 FX anhand der Mikroskopvergrößerung eingestellt werden. Bei der Beschreibung der Abmessungen einer dickengradienten Zernike-PP wird in dieser Arbeit ein innerer Lochradius R_{innen} und ein äußerer Lochradius $R_{\text{außen}}$ angegeben ($R_{\text{innen}}/R_{\text{außen}}$). Dabei beschreibt R_{innen} den Radius des Loches, während $R_{\text{außen}}$ den inneren Radius R_{innen}

zuzüglich der Breite des Dickengradienten angibt. In Tabelle 4.2 ist die schrittweise Vorgehensweise bei der Strukturierung aufgezeigt. Zur Strukturierung einer dickengraduierten Zernike-PP mit den Radien 375/500 nm wird die benutzerdefinierte FIB-Routine bei 29 kx Vergrößerung importiert und um den Koordinatenursprung im Zentrum des Bildes positioniert. Der Radius der benutzerdefinierten FIB-Routine ist bei dieser Mikroskopvergrößerung auf $R_{\text{außen}} = 500$ nm kalibriert. Danach wird die FIB-Routine 18 mal durchgeführt, um ein Loch mit gewünschtem $R_{\text{innen}} = 375$ nm zu erhalten.

Für die Herstellung von dickengraduierten Zernike-PP-Löchern mit größeren Radien hat sich ein zweistufiger Prozess bei der Strukturierung als vorteilhaft erwiesen. Für eine dickengraduierte Zernike-PP mit den Radien 0,5/1,5 μm wird die benutzerdefinierte FIB-Routine bei einer Mikroskopvergrößerung von 10 kx importiert, um den Koordinatenursprung zentriert und hat dabei den Radius $R_{\text{außen}} = 1,5 \mu\text{m}$. Nach 40 Durchgängen ist der aC-Film im Zentrum der FIB-Routine gerade durchgefräst. Um ein Einreißen des Filmes zu vermeiden und glatte Lochkanten zu erhalten, wird die FIB-Routine für weitere 20 Durchgänge bei einer Mikroskopvergrößerung von 25 kx durchgeführt. Durch die vorherige Zentrierung um den Koordinatenursprung ändert sich der Mittelpunkt der FIB-Routine nicht. Das Ergebnis ist das angestrebte Loch mit $R_{\text{innen}} = 0,5 \mu\text{m}$. Ein etwas größeres Loch mit $R_{\text{innen}} = 0,6 \mu\text{m}$ wird mit 20 Durchgängen bei einer Vergrößerung von 19 kx erreicht. Für den zweiten Herstellungsschritt wurden bewusst etwa halb so große Vergrößerungen benutzt wie beim ersten Herstellungsschritt, um einen über seine gesamte Breite stufenlosen Dickengradienten zu erhalten. Testweise wurden auch Zernike-PP-Löcher mit den Radien 0,5/1,5 μm bei einer niedrigeren Ga^+ -Ionenenergie von 5 keV und einem Strahlstrom von 21 pA mit der gleichen Vorgehensweise wie in Tabelle 4.2 strukturiert sowie auch unter Verwendung eines He^+ -FIB. Mit letzterem wurde zuerst ein Loch mit $R_{\text{innen}} = 0,5 \mu\text{m}$ mit einer Standard-FIB-Routine gefräst, um anschließend einen Dickengradienten mit $R_{\text{innen}} = 1,5 \mu\text{m}$ mit der benutzerdefinierten FIB-Routine zu strukturieren. Aufgrund der geringeren Masse der He^+ -Ionen gegenüber den Ga^+ -Ionen konnte allerdings in annehmbarer Zeit kein ausreichender Materialabtrag zur Strukturierung eines Dickengradienten erzielt werden.

Nach der FIB-Strukturierung der konventionellen und dickengraduierten Zernike-PP-Löcher ist die Herstellung abgeschlossen. Nach dem Einbau in ein Transmissionselektronenmikroskop kann jedes der vier Löcher in einer der Maschen als Zernike-PP für die Zernike-PP-TEM verwendet werden.

4.3.2 Charakterisierung

Abgesehen von HFPP ist bei Dünnfilm-PP, die das MIP des Filmmaterials zur Erzeugung einer Phasenschiebung auf die transmittierten Elektronen ausnutzen, die Filmdicke für die Funktionsweise von entscheidender Bedeutung. Bereits kleine Abweichungen bei der auf-

Tabelle 4.2: Strukturierung von dickengraduierten Zernike-PP-Löchern. Die Strukturierung der Löcher mit den inneren und äußeren Radien in der ersten Spalte (dazwischen befindet sich der Dickengradient) erfolgt in zwei Schritten, bei denen die benutzerdefinierte FIB-Routine (streamfile) bei einer definierten Mikroskopvergrößerung für eine bestimmte Anzahl von Durchgängen ausgeführt wird. Es ist dabei darauf zu achten, dass sich das Zentrum der FIB-Routine nicht verschiebt.

$R_{\text{innen}}/R_{\text{außen}}$	1. Durchgänge/Vergr.	2. Durchgänge/Vergr.
375/500 nm	18/29 kx	—
0,5/1,5 μm	40/10 kx	20/25 kx
0,6/1,5 μm	40/10 kx	20/19 kx

gedämpften Schichtdicke führen zur Änderung des gewünschten Phasenschiebungswertes und damit zu einer nicht optimalen Funktion der Dünnfilm-PP. Gemäß Gleichung 2.9 verhält sich dabei die Zunahme der induzierten Phasenschiebung direkt proportional zur Zunahme der Filmdicke. Darüberhinaus ist die genaue Kenntnis des Dickenprofils von dickengraduierten Zernike-PP nötig, um dessen Einfluss auf die Kontrastentstehung in PP-TEM-Aufnahmen interpretieren zu können. Bei der Bestimmung des Dickenprofils gilt es zudem eine mögliche Ga^+ -Ionenkontamination durch die FIB-Strukturierung zu berücksichtigen, welche einen ungewünschten Einfluss auf das Phasenschiebungsprofil der Dickengradienten haben könnte. In diesem Unterkapitel wird die Analyse der drei obenannten Punkte beschrieben.

Schichtdickenbestimmung des aC-Films

Wie in Abschnitt 3.5.1 und 4.3.1 beschrieben, werden in der Dünnschichttechnologie auf Schwingquarzen basierende Schichtdickenmesssysteme eingesetzt, um die Filmdicke während des Aufdampfprozesses zu kontrollieren. Die Genauigkeit dieser Systeme ist zum einen von der genauen Kenntnis der Dichte des aufgedämpften Materials abhängig, welche insbesondere bei aC stark variieren kann. Zum anderen ist der Hitzeübertrag auf den Quarz gerade bei der Verdampfung von aC relativ hoch, was ebenso zu einer geringeren Messgenauigkeit führen kann. Aus diesem Grund empfiehlt es sich die genaue Filmdicke anhand einer Querschnittsprobe im Transmissionselektronenmikroskop zu überprüfen.

Die Präparation der Querschnittsprobe erfolgt aus den bedampften *Si*-Substraten, die zusammen mit den Glimmer-Substraten in den Rezipienten des Lesker PVD75 eingebaut wurden. Nach erfolgter Herstellung der aC-Schicht werden die Glimmer-Substrate entnommen und die beschichteten *Si*-Substrate mit einer metallischen Schutzschicht aus *Au* oder *Pt* versehen. Anschließend wird die Querschnittsprobe in Form einer TEM-Lamelle (siehe Abschnitt 3.4) mit dem FIB der FEI Strata 400 präpariert und in das Philips CM200 transferiert. Abbildung 4.17a zeigt eine TEM-Aufnahme der Querschnittsprobe und veranschaulicht

den vertikalen Aufbau des Schichtsystems. Ganz unten befindet sich das monokristalline *Si*-Substrat, dessen periodisches Punktmuster im Bild zu erkennen ist, gefolgt von der aC-Schicht und der *Au*-Schutzschicht. Die kristalline Struktur des *Si* wird zur Ausrichtung der Probe genutzt. Im Beugungsmodus des Mikroskops kann das *Si*-Substrat anhand seines Beugungsmusters in Zonenachse orientiert werden, sodass sich die TEM-Lamelle in einem perfekten rechten Winkel zum Elektronenstrahl befindet und Parallaxenfehler bei der Schichtdickenbestimmung vermieden werden. Des Weiteren dienen die Abstände der durch die *Si*-Kristallstruktur hervorgerufenen Reflexe in der schnellen Fourier-Transformation (FFT) der TEM-Aufnahme zur Maßstabskalibrierung. Die homogene amorphe Struktur der aC-Schicht ist in der TEM-Aufnahme ebenfalls klar zu erkennen und verursacht die charakteristischen Thon-Ringe in der FFT, die zur Fokussierung der Aufnahme verwendet werden können. Die *Au*-Schutzschicht erscheint annäherungsweise schwarz aufgrund der starken Streuung von Elektronen in ihr.

Zur Bestimmung der Schichtdicke des aC wird das in Abbildung 4.17b gezeigte Intensitätslinienprofil herangezogen, welches der TEM-Aufnahme in Abbildung 4.17a senkrecht zu den Schichten von unten nach oben entnommen wurde. Der sanfte Anstieg des Intensitätslinienprofils am Übergang zwischen dem *Si*-Substrat und dem aC-Film wurde einer Oberflächenrauigkeit des *Si* zugewiesen und bei der Dickenbestimmung nicht berücksichtigt. Nach Messung an mehreren Stellen ergibt sich eine mittlere Schichtdicke von $(27 \pm 0,5)$ nm. Die tatsächliche Schichtdicke weicht also von dem Idealwert 26 nm um etwa 1 nm bzw. 4 % ab. Die gemessene Abweichung von der idealen Filmdicke verursacht eine Zunahme der Phasenschiebung von $0,06 \pi$ und ist damit in einem tolerierbaren Rahmen.

Bestimmung des Dickenprofils der dickengradierten Zernike-PP

Um das Dickenprofil von dickengradierten Zernike-PP genau zu bestimmen, wurden Niederenergie-STEM-Aufnahmen (siehe Abschnitt 3.2) bei einer Elektronenenergie von 30 keV mit dem FEI Helios G4 FX erstellt. Die Abbildungen 4.18a-c zeigen BF-STEM-Aufnahmen der dickengradierten Zernike-PP mit den Radien 375/500 nm (siehe 4.18a), 0,5/1,5 μm (siehe 4.18b) und 0,6/1,5 μm (siehe 4.18c). Die Aufnahmen zeigen glatte PP-Lochränder, den FIB-strukturierten Dickengradienten und den homogenen unstrukturierten aC-Film mit nur wenigen Verunreinigungen. Rote Pfeile markieren R_{innen} und $R_{\text{außen}}$ sowie den Dickengradienten, wie der Beschriftung in Abbildung 4.18b zu entnehmen ist. Obwohl sich das genaue Dickenprofil prinzipiell auch aus den 30 keV BF-STEM-Aufnahmen bestimmen lässt, sind die dabei erhaltenen Ergebnisse aufgrund des schwachen Signals des nur 27 nm dicken aC-Films und des kleinen Durchmessers des BF-STEM-Detektorsegments mit einem relativ großen Fehler behaftet. Es empfiehlt sich daher die Bestimmung des Dickenprofils anhand

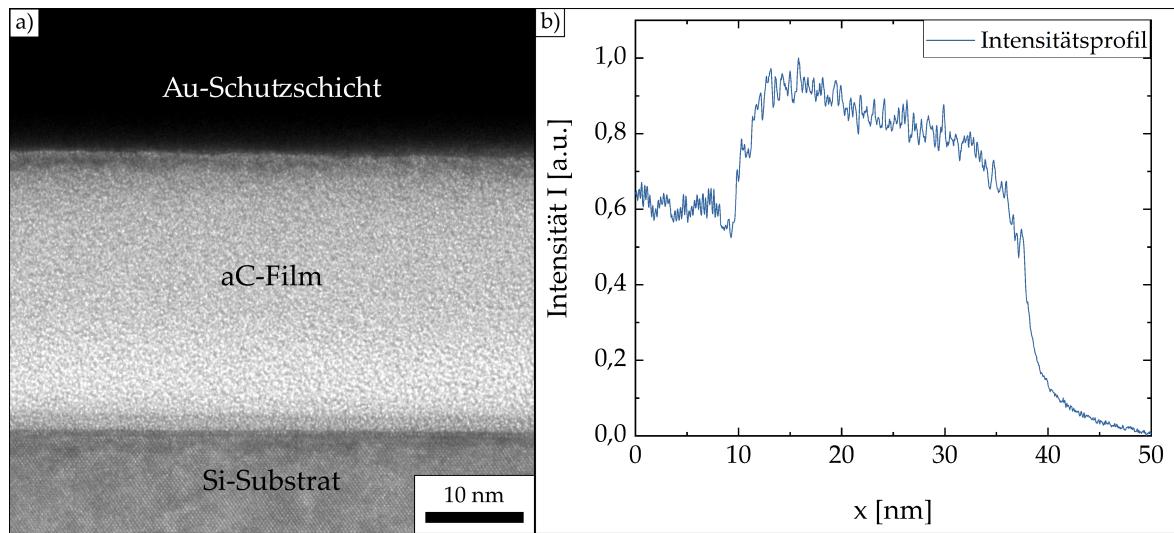


Abbildung 4.17: Schichtdickenbestimmung des aC-Films für die Zernike-PP. a) Die TEM-Aufnahme einer Querschnittsprobe zeigt das Si-Substrat, den aC-Film und die Au-Schutzschicht. b) Intensitätslinienprofil senkrecht zu den Schichten in a). Die Dicke des aC-Films beträgt $(27 \pm 0,5)$ nm.

von HAADF-STEM-Aufnahmen durchzuführen.

Die Abbildungen 4.18d-f zeigen die simultan aufgenommenen 30 keV HAADF-STEM-Aufnahmen zu den jeweils darüber angeordneten BF-STEM-Aufnahmen in den Abbildungen 4.18a-c. Für kleine aC-Filmdicken wie den vorliegenden 27 nm steigt die Bildintensität in HAADF-STEM-Aufnahmen linear mit der Filmdicke [98], was die Ermittlung von Dickenprofilen anhand von Intensitätslinienprofilen ermöglicht. Dazu wird von den Intensitätslinienprofilen die mittlere Vakuumintensität in den PP-Löchern subtrahiert und die mittlere Intensität des unstrukturierten aC-Filmes anhand der gemessenen aC-Filmdicke von 27 nm kalibriert.

Die Abbildungen 4.18g-i zeigen die ermittelten Dickenprofile entlang der gestrichelten Linien in den jeweils darüber liegenden HAADF-STEM-Aufnahmen (siehe Abbildungen 4.18d-f). Das grüne Dickenprofil in Abbildung 4.18g entstammt der dickengradienten Zernike-PP mit den Radien 375/500 nm und zeigt eine abrupte Stufe von etwa 11 nm an der Kante des Zernike-PP-Lochs mit $R_{\text{innen}} = 375$ nm, gefolgt von einer Dickenzunahme von etwa 16 nm, die sich über eine Breite von 125 nm erstreckt. Der resultierende Dickengradient beträgt 0,128. Die abrupte Stufe im blauen Dickenprofil in Abbildung 4.18h, welches der dickengradienten Zernike-PP mit den Radien 0,5/1,5 μm entstammt, ist mit nur etwa 4 nm deutlich geringer. Die darauffolgende Dickenzunahme verläuft mit etwa 23 nm über eine Breite von 1 μm und dem daraus resultierenden Dickengradienten von 0,023 näherungsweise linear. Den Dickenprofilen ist demnach zu entnehmen, dass der Dickengradient der Zernike-PP in Abbildung 4.18h (0,5/1,5 μm) um etwa eine Größenordnung kleiner ist als der Dicken-

gradient der Zernike-PP in Abbildung 4.18g (375/500 nm). Darüber hinaus zeigt das blaue Dickenprofil in Abbildung 4.18h einen leichten Knick am Übergang zwischen der 4 nm Stufe und dem näherungsweise linearen Dickengradienten. Das gelbe Dickenprofil in Abbildung 4.18i von der dickengradierten Zernike-PP mit den Radien 0,6/1,5 μm , also mit einem geringfügig größeren R_{innen} und einem schmäleren graduierten Bereich, verläuft vergleichsweise ähnlich zum blauen Profil. Es lässt sich allerdings keine abrupte Dickenänderung an der Lochkante erkennen, wie es im blauen Dickenprofil der Fall ist. Dadurch ergibt sich eine glatte Dickenprofil mit einer Dickenzunahme von 27 nm über eine Breite von 0,9 μm (Dickengradient von 0,03).

Untersuchung der Ga^+ -Ionenimplantation durch die FIB-Strukturierung

Die Verwendung eines FIB aus Ga^+ -Ionen für die Strukturierung von dickengradierten Zernike-PP kann unter Umständen nachteilig für die gewünschte Phasenschiebung der PP sein, wenn es während des Strukturierungsprozesses zur Ga^+ -Ionenimplantation kommt. Durch die Implantation von Ga mit $Z=31$ in den C -Film mit $Z=6$ kommt es zu einer Änderung des MIP im Dünnfilm, was wiederum einen Einfluss auf die Phasenschiebung der transmittierten Elektronen im Elektronenmikroskop hat. Weniger gravierend ist der Effekt von Ionenimplantation bei konventionellen Zernike-PP, da das Material im mit dem FIB strukturierten Bereich vollständig abgetragen wird. Lediglich an den Lochrändern oder durch eine kurzzeitige, großflächige FIB-Beleuchtung, um eine SE-Aufnahme zu erstellen, kann es zu einer geringfügigen Ionenimplantation kommen.

Die Eindringtiefe der Ionen ist sowohl abhängig von der Energie des FIB, als auch von der Dichte des zu strukturierenden Materials. Ein deutlicher Effekt der Ga^+ -Ionenimplantation lässt sich erkennen, wenn die Zernike-PP gemäß der in 4.2 beschriebenen Vorgehensweise mit der benutzerdefinierten FIB-Routine (siehe Abbildung 4.16) durch 40 Durchgänge bei einer Vergrößerung von 10 kx und 20 Durchgänge bei einer Vergrößerung von 19 kx mit einer Ionenenergie von 5 keV und einem Ionenstrom von 21 pA strukturiert wird. Der R_{innen} von 0,75 μm wird dabei etwas größer als die 0,6 μm , die bei gleicher Vorgehensweise aber einer Ionenenergie von 30 keV und einem Ionenstrom von 7 pA erzielt werden. Zudem kommt es an der Kante des Zernike-PP-Loches zu einem leichten Ausfransen und Aufrollen des aC-Films. Um die Ga^+ -Ionenimplantation bei der mit einer Ionenenergie von 5 keV hergestellten dickengradierten Zernike-PP nachzuweisen, wurde STEM-EDXS durchgeführt. Die dadurch erhaltene Elementverteilung in Abbildung 4.19a zeigt neben C (türkis) einen signifikanten Ga -Anteil im Bereich des Dickengradienten und der ausgefransten Lochkante. Ebenso zeigt das gemittelte EDXS-Spektrum in Abbildung 4.19b, neben Maxima an der $\text{C}-\text{K}_\alpha$ - und der $\text{O}-\text{K}_\alpha$ -Linie, ein signifikantes Maximum an der $\text{Ga}-\text{L}_\alpha$ -Linie. Demgegenüber

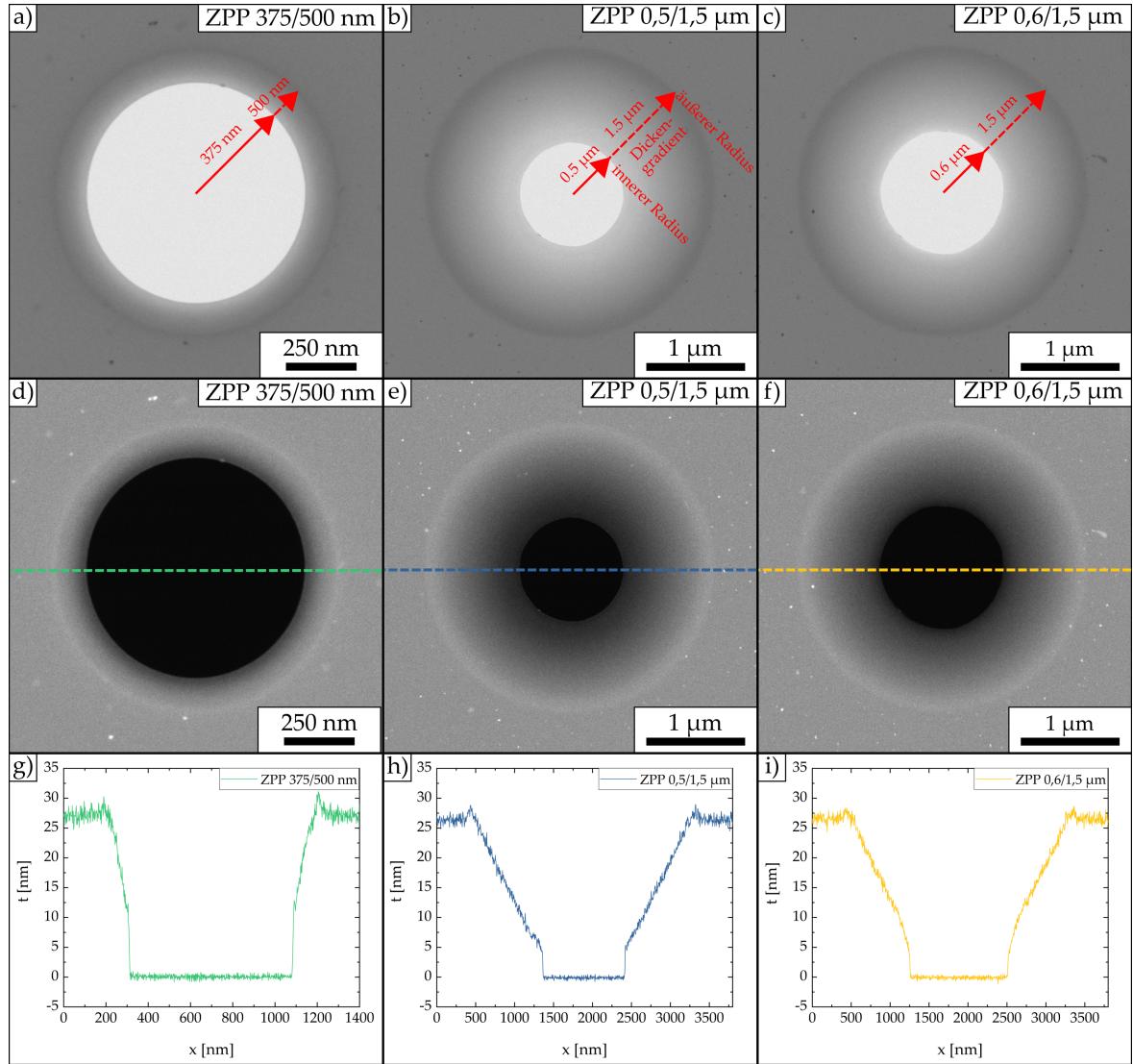


Abbildung 4.18: 30 keV STEM-Aufnahmen und Dickenprofile der Zernike-PP mit dickengradientem Rand. a-c) BF-STEM-Aufnahme einer dickengradienten Zernike-PP mit a) R_{innen} von 375 nm und $R_{\text{außen}}$ von 500 nm (375/500 nm), b) R_{innen} von 0,5 μm und $R_{\text{außen}}$ von 1,5 μm (0,5/1,5 μm) sowie c) R_{innen} von 0,6 μm und $R_{\text{außen}}$ von 1,5 μm (0,6/1,5 μm). d-f) HAADF-STEM-Abbildungen der gleichen dickengradienten Zernike-PP wie in den darüber liegenden Aufnahmen d) (375/500 nm), e) (0,5/1,5 μm) und f) (0,6/1,5 μm). Dickenprofile g) entlang der grün gestrichelten Linie in d), h) entlang der blau gestrichelten Linie in e) und i) entlang der gelb gestrichelten Linie in f).

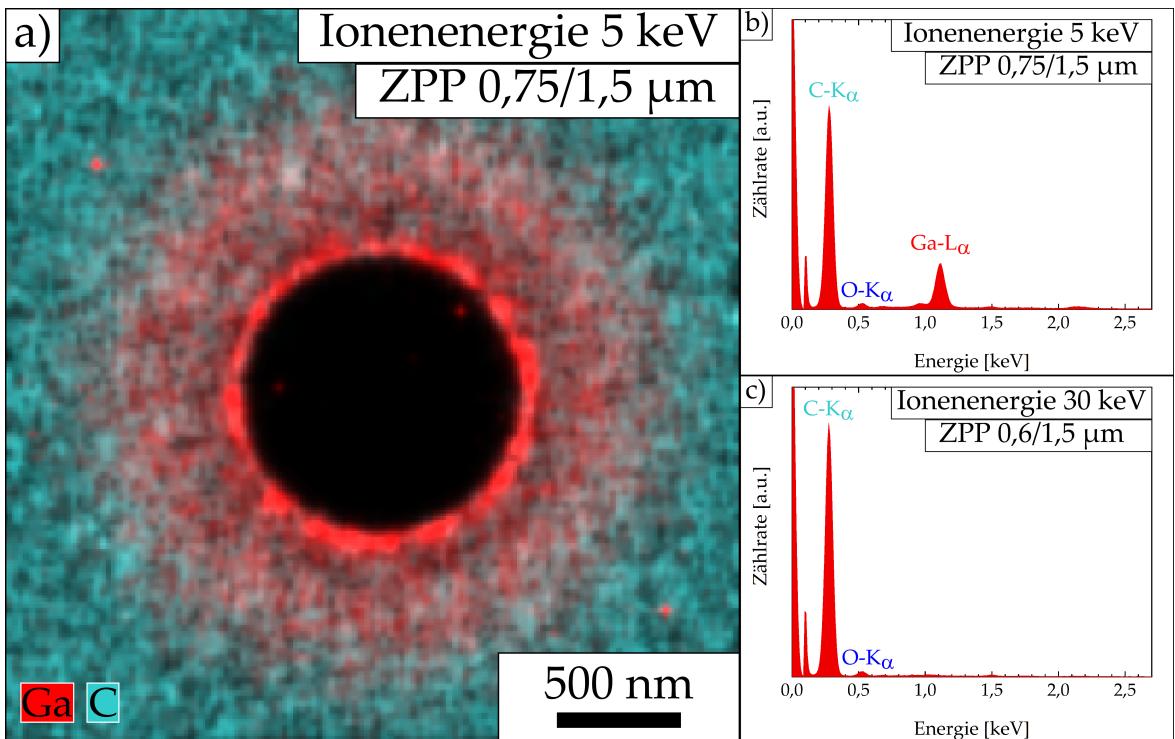


Abbildung 4.19: EDXS-Untersuchung der Ga^+ -Ionenimplantation in dickengradierte Zernike-PP. a) Mit STEM-EDXS ermittelte Elementverteilung zu einer dickengradierten Zernike-PP mit den Radien $0,75/1,7 \mu\text{m}$, die mit einem Ga^+ -FIB bei einer Ionenergie von 5 keV strukturiert wurde. Die Elementverteilung zeigt neben C (türkis) einen deutlichen Anteil an Ga (rot) in den mit dem Ga^+ -FIB bearbeiteten Bereichen. b) Gemitteltes EDXS-Spektrum zu a) zeigt neben einem stark ausgeprägten Maximum an der C-K_α -Linie und einem schwachen Maximum an der O-K_α -Linie ein signifikantes Maximum an der Ga-L_α -Linie. c) Ein gemitteltes EDXS-Spektrum zu der dickengradierten Zernike-PP mit den Radien $0,6/1,5 \mu\text{m}$ in Abbildung 4.18f, welche mit einem Ga^+ -FIB bei einer Ionenergie von 30 keV strukturiert wurde, zeigt bei sonst ähnlichem Spektrum zu b) kein Maximum an der Ga-L_α -Linie.

zeigen die gemittelten EDXS-Spektren der bei einer Ionenergie von 30 keV hergestellten PP (siehe Abbildungen 4.18d-f) kein erkennbares Maximum an der Ga-L_α -Linie. Beispielsweise ist das gemittelte EDXS-Spektrum der dickengradierten Zernike-PP mit den Radien $0,6/1,5 \mu\text{m}$ aus Abbildung 4.18f in Abbildung 4.19c dargestellt.

Eine genaue Quantifizierung des Ga-Anteils wurde für diese qualitative Analyse nicht durchgeführt. Die EDXS-Spektren deuten jedoch darauf hin, dass bei Verwendung einer Ionenergie von 30 keV für die FIB-Strukturierung des Dickengradienten und einer aC-Filmdicke von etwa 27 nm mit keiner gravierenden Ga^+ -Ionenimplantation zu rechnen ist, welche die Phasenschiebung der PP in größerem Maße beeinflussen könnte.

4.3.3 Implementierung einer Zernike-PP in das Philips CM200 FEG/ST

Die Implementierung der fertiggestellten Zernike-PP-Netze in das Philips CM200 erfolgt wie in Abschnitt 4.2.5 für Zach-PP beschrieben unter Verwendung des als PP-Halter verwendeten Kleindiek MM3A-EM. Obwohl eine Zernike-PP prinzipiell auch bei Raumtemperatur eingesetzt werden kann, hat sich der Betrieb bei erhöhten Temperaturen als nützlich erwiesen, um störenden Aufladungseffekten durch entstehende Kontamination bei der Beleuchtung mit dem Elektronenstrahl entgegenzuwirken und die mögliche Einsatzzeit der PP deutlich zu verlängern [20]. Aus diesem Grund werden die Zernike-PP-Netze in ein beheizbares PP-Halterplättchen montiert, welches ursprünglich für den Einsatz von HFPP konstruiert [81] und von der Werkstatt des Instituts für Angewandte Physik hergestellt wurde. Eine genaue technische Zeichnung befindet sich im Anhang A.1 in Abbildung A.6. Das Halterplättchen ist in Abbildung 4.20 dargestellt und ermöglicht das Heizen des Zernike-PP-Netzes auf eine Temperatur von bis zu 200 °C. Durch die Verwendung eines Teflon-Zwischenstücks erfolgt eine thermische Trennung des vorderen *Ti*-Teils, in dem sich das Zernike-PP-Netz befindet, vom *Al*-Stab des PP-Halters. Im Vergleich zur Wärmeleitfähigkeit von Titan mit $\lambda_w = 22 \text{ W}/(\text{m}\cdot\text{K})$ ist die von Teflon mit $\lambda_w = 0,24 \text{ W}/(\text{m}\cdot\text{K})$ um zwei Größenordnungen kleiner. Zudem wurde das *Ti*-Teil poliert und mit *Au* bedampft, um eine möglichst reflektive Oberfläche mit geringstmöglicher Wärmeabstrahlung zu erhalten. Dadurch bleibt die Temperatur am Kleindiek MM3A-EM unter 40 °C und damit deutlich unter der vom Hersteller angegebenen maximal verträglichen Temperatur von 80 °C, wenn das vordere *Ti*-Teil auf 200 °C geheizt wird [81].

Abbildung 4.20a zeigt die Vorderseite des beheizbaren PP-Halterplättchens. In den beiden mit Vertiefungen am Rand versehen Löchern befindet sich oben ein HFPP-Netz und unten ein Zernike-PP-Netz, die beide mit *Ti*-Klemmringen fixiert sind. In einer weiteren rechteckigen Vertiefung in der Mitte des *Ti*-Teils befindet sich ein *Pt1000*-Widerstand (Vari-ohm Eurosensor, D-Heidelberg), welcher mit einem nicht-leitfähigen G1-Epoxykleber mit einer Temperaturbeständigkeit von bis zu 400°C möglichst nahe an den PP-Netzen befestigt ist und als Heizung verwendet wird. Die Kontaktierung des *Pt1000*-Widerstands erfolgt über Crimp-Verbindungen mit den feinen *Cu*-Drähten des PP-Halters, die über die Kabeldurchführungen mit einer Spannungsquelle verbunden sind. An den Kontaktstellen wird der isolierende Lack von den Kupferdrähten mit Schmiegelpapier entfernt. Andere Verbindungen wie Lötungen oder Klebekontakte mit Silberleitkleber erwiesen sich aufgrund deren Temperaturempfindlichkeit als nicht zweckmäßig. Am linken Rand des 0,6 mm dicken *Ti*-Teils ist ein NTC-Glasthermistor (Negativer Temperatur Koeffizient; Miniature Axial Glass Thermistor Series, MEAS, Schaffhausen, Schweiz) mit einem Durchmesser von 0,4 mm ohne Randüberstand mit G1-Epoxykleber befestigt und über weitere Crimp-Verbindungen über die Kabeldurchführung des PP-Halters mit einem herkömmlichen Widerstandsmessgerät verbunden. Durch einfaches Auslesen des temperaturabhängigen Wi-

derstands und anschließendem Abgleich mit einer Tabelle kann so die Temperatur auf Ebene des Zernike-PP-Netzes während des Experimentes ausgelesen werden. Ein weiterer Glasthermistor befindet sich am *Al*-Stab des PP-Halters, um sicherstellen zu können, dass der Kleindiek MM3A-EM keine zu hohen Temperaturen erfährt.

Abbildung 4.20b zeigt die seitliche Rückansicht des Halterplättchens. Die Verbindung des vorderen *Ti*-Teils und des Teflon-Zwischenstücks ist über eine Schraubverbindung mit zwei Messingschrauben realisiert. Die Erdung des *Ti*-Teils ist über eine abisolierte *Cu*-Leitung realisiert, die unter eine Mutter an eine der beiden Schrauben geklemmt wird, und dient dazu, einer Aufladung im Elektronenstrahl entgegenzuwirken.

Im Rahmen der Experimente hat sich zur weitgehenden Vermeidung von Kontamination als ausreichend erwiesen, die Zernike-PP-Netze dauerhaft auf einer Temperatur von etwa 150 °C zu halten. Die *Pt1000*-Heizung wird dazu bei einer Spannung von 23 V und einem Stromfluss von 12,655 mA betrieben. Typische gemessene Widerstände bzw. Temperaturen an den beiden Glästhermistoren sind 304 Ω bzw. 148,5 °C auf Höhe der PP-Netze und 7,28 kΩ bzw. 33,5 °C am *Al*-Stab des PP-Halters. Schwächere Aufladungseffekte während des Betriebes der Zernike-PP im Transmissionselektronenmikroskop verschwanden üblicherweise nach weiterem Heizen über Nacht.

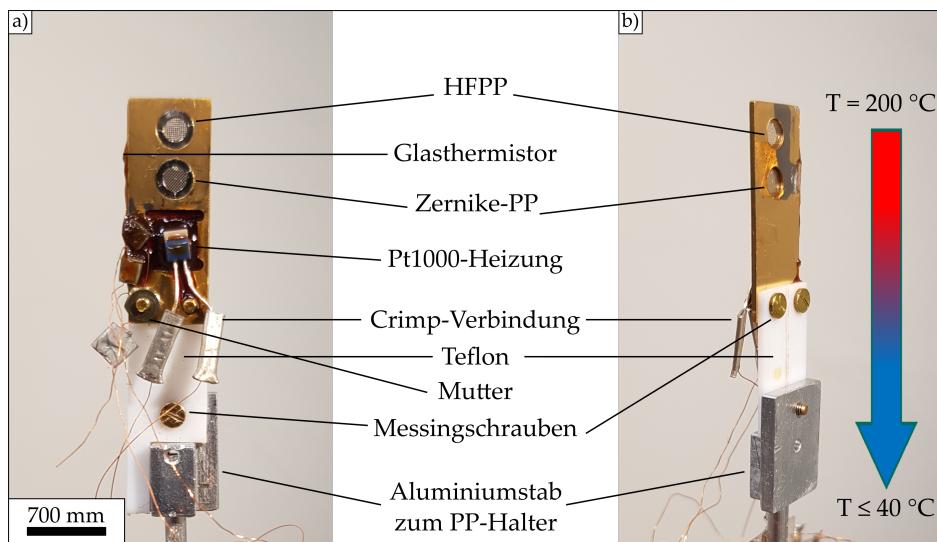


Abbildung 4.20: Fotografie eines beheizbaren PP-Halterplättchens. a) Vorderansicht des Halterplättchens. Zur thermischen Trennung ist der vordere Ti-Teil des Plättchens über ein Teflon-Zwischenstück (weiß) mit dem Al-Stab des PP-Halters verbunden. In zwei Löchern mit Vertiefungen an den Rändern befinden sich ein HFPP- und ein Zernike-PP-Netz, die jeweils mit einem Ti-Klemmring fixiert sind. Ein Pt1000-Widerstand, der als Heizung verwendet wird, ist mit Epoxykleber auf das Halterplättchen geklebt und mittels Crimp-Verbindungen an Cu-Drähte zur Spannungsversorgung geschlossen. Ein seitlich angeklebter Gläsernemistor dient der Temperaturmessung. b) Rückansicht des Halterplättchens. Das Ti-Teil ist mit Messingschrauben am Teflon-Teil befestigt. Um Aufladungen des PP-Halterplättchens durch den Elektronenstrahl entgegenzuwirken, wird zur Erdung des Ti-Teils ein abisolierter Cu-Draht unter einer Messingmutter eingeklemmt. Zur Verminderung von Wärmeabstrahlung wurde das Ti-Teil poliert und mit Au beschichtet.

5

Kapitel 5

Anwendung von Phasenplatten und Analysemethoden

Die Anwendung und Justage der verschiedenen eingesetzten PP wird in Abschnitt 5.1 dieses Kapitels beschrieben. Dem folgt eine Beschreibung der verwendeten Analysemethoden in Abschnitt 5.2. Abschnitt 5.2 ist untergliedert in eine Beschreibung der Methode zur Bestimmung von Abbildungsparametern wie dem Defokus und der Phasenschiebung in Abschnitt 5.2.1 und der Beschreibung der im Rahmen der Arbeit durchgeföhrten Bildsimulationen in Abschnitt 5.2.2. Teile dieses Kapitels wurden bereits in einer Fachzeitschrift veröffentlicht [78]. Die dort verwendeten Abbildungen und Tabellen wurden übersetzt und mit Genehmigung wiederholt publiziert. Die entsprechenden Passagen, Bilder und Tabellen sind an den relevanten Stellen markiert.

5.1 Anwendung von Phasenplatten

Ist die entsprechende PP innerhalb des PP-Halters positioniert und in das Transmissions-elektronenmikroskop eingebaut, muss zunächst die Justage der PP erfolgen. Dies dient dazu, die Ebene, in der sich die PP befindet, mit der BFP in Deckung zu bringen. Da der Platz in der Lücke zwischen den Polschuhen der Objektivlinse in den meisten Fällen sehr gering ist und ein Kontakt des PP-Halters mit dem empfindlichen Polschuh unbedingt vermieden werden sollte, kann der PP-Halter nicht nach oben oder unten bewegt werden. Deswegen wird die BFP meist durch eine geeignete Einstellung der Beleuchtung über das Kondensorlinsensystem mit der PP-Ebene in Deckung gebracht. Je nach PP-Typ ist außerdem eine genaue Ausrichtung der PP gegenüber des NS nötig, um die gewünschten Phasenschiebungsbedingungen der PP optimal zu erreichen. Für die drei verwendeten PP-Typen werden dazu unterschiedliche Vorgehensweisen angewandt, die nachfolgend beschrieben werden.

Anwendung einer HFPP

In Verbindung mit der HFPP wird oft von einem *on-plane*-Zustand gesprochen, wenn sich der HFPP-Film in der BFP befindet, während ein *off-plane*-Zustand vorliegt, wenn sich der HFPP-Film über oder unterhalb der BFP befindet. Zur Justage wird eine kleine Struktur wie z.B. ein Partikel auf dem HFPP-Film im *off-plane*-Zustand im normalen Abbildungsmodus abgebildet. Ähnlich wie bei der Fokussierung einer STEM-Sonde, wird der Fokus der Kondensorlinse geändert, bis das Partikel „unendlich groß“ erscheint. Während dieses Vorgangs wird jede Änderung der Form des Partikels über den Kondensorlinsenstigmator korrigiert. Durch diese Art der Anpassung bildet sich der durch den intensiven NS verursachte geladene Fleck auf dem HFPP-Film so klein und rund wie möglich, was zu optimalen Abbildungsbedingungen führt. Der geladene Fleck, der für die Phasenschiebung der NS-Elektronen verantwortlich ist, bildet sich innerhalb von 15 – 30 s bei einem Strahlstrom von etwa 1 nA, was einen typischen Wert für die Kryo-TEM bei geringer Elektronendosis darstellt. Die so erreichten Bedingungen ermöglichen eine stabile TEM-Abbildung mit Phasenkontrast für eine Anwendungsdauer von ein paar Stunden [71]. Die HFPP wird über den gesamten Nutzungszeitraum auf einer Temperatur von 270 °C gehalten, um die Entstehung von Kontamination, die zu einer positiven und stark variierenden Phasenschiebung führt, weitestgehend zu vermeiden (siehe Abschnitt 2.4.2). Eine Temperatur von 260 – 270 °C hat sich für die Experimente am JEOL JEM-3200 als ideal erwiesen, um stabile Phasenschiebungen im Bereich von $-0,5\pi$ bis $-0,7\pi$ zu erhalten.

Anwendung einer Zach-PP

Für die Anwendung einer Zach-PP wird der *on-plane*-Zustand für das JEOL JEM-3200 in der vergrößerten und für das Philips CM200 in der normalen BFP eingestellt. Beim JEOL JEM-3200 muss dazu die Objektivminilinse über einen Kippschalter in den SA-MAG-Modus versetzt werden. Im Beugungsmodus wird dann zunächst die Spitze des Zach-PP-Steges scharf gestellt und dann die Kondensorlinse so justiert, dass der Durchmesser des NS minimal erscheint. Anschließend wird die PP-Spitze durch den piezobetriebenen PP-Halter im gewünschten Abstand zum NS positioniert. Der PP-Steg sollte dabei wenn möglich nicht mit dem NS beleuchtet werden, um eine ungewünschte Aufladung zu vermeiden.

Anwendung einer Zernike-PP

Wie bei der Zach-PP erfolgt die Einstellung des *on-plane*-Zustands im Beugungsmodus und unter Verwendung des Kondensorlinsensystems. Zunächst wird das gewünschte Zernike-PP-Loch im Dünnfilm auf dem PP-Netz ausgewählt und grob um den NS positioniert. Nachfolgend wird die Kante des Zernike-PP-Lochs fokussiert und schließlich das Kondensorlinsensystem so angepasst, dass der NS so klein und rund wie möglich erscheint. Der piezobetriebene PP-Halter wird dann zur genauen Zentrierung des Loches um den NS verwendet. Die Positionierung der dickengraduierten Zernike-PP ist deutlich schwieriger als für die konventionelle Zernike-PP, da der aC-Film an der Lochkante sehr dünn und nur schwer im Beugungsmodus zu erkennen ist. Für die Feinzentrierung der dickengraduierten Zernike-PP kann das Diffraktogramm von *live-view*-Abbildungen im normalen Abbildungsmodus verwendet werden.

5.2 Analysemethoden

5.2.1 Bestimmung von Abbildungsparametern

PP-TEM-Abbildungen mit einem moderaten Defokus können verwendet werden, um die Phasenschiebung und den Defokus quantitativ aus der Position von Thon-Ringen im zugehörigen Diffraktogramm zu bestimmen [68]. Zur Analyse der Abbildungsparameter aus den experimentellen PP-TEM-Abbildungen wurde ein von Hettler et al. [47] geschriebenes Matlab-Programm (The Mathworks, Natick, MA, USA) verwendet. Wie anhand des Beispiels in Abbildung 5.1 für das Diffraktogramm einer defokussierten HFPP-TEM-Aufnahme einer Testprobe, bestehend aus einem in vitrifiziertes Eis eingebetteten aC-Film (siehe Abbildung 5.1a), dargestellt, binarisiert das Programm zunächst das Diffraktogramm (siehe

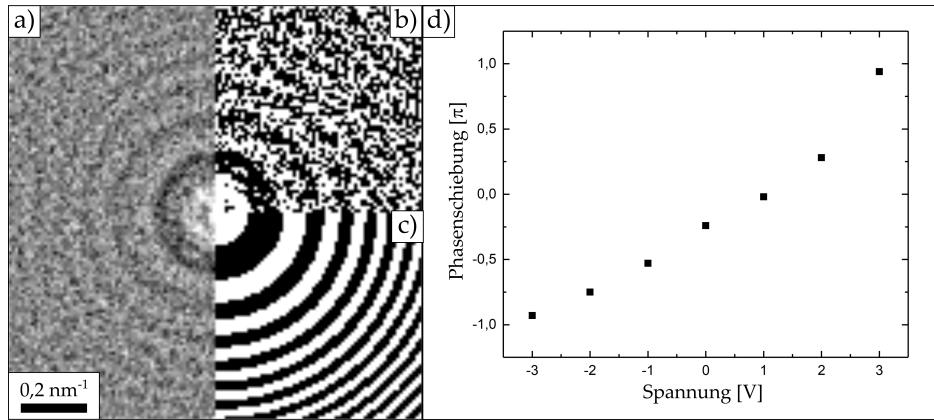


Abbildung 5.1: Bestimmung von Abbildungsparametern anhand des Diffraktogramms einer defokussierten HFPP-TEM-Abbildung eines in vitrifiziertem Eis eingebetteten ac-Films und Phasenschiebungen einer Zach-PP-Spannungsserie. a) Diffraktogramm einer defokussierten HFPP-Abbildung. b) Das Diffraktogramm in a) wird in ein Binärbild umgewandelt. c) Das simulierte Diffraktogramm, welches zum Binärbild in b) passt, wird aus einer Datenbank ermittelt. Beste Übereinstimmung ergibt ein Defokuswert von $\Delta f = -7,81 \mu\text{m}$ und eine Phasenschiebung von $\varphi_{\text{PP}} = -0,71 \pi$. d) Abhängigkeit der induzierten Phasenschiebung φ_{PP} von der angelegten Spannung U_{PP} , ermittelt aus einer Zach-PP-Spannungsserie.

Abbildung 5.1b) und simulierte dann eine Datenbank von Diffraktogrammen mit verschiedenen Defokus-, Astigmatismus- und Phasenschiebungswerten (siehe Abbildung 5.1c). Die simulierten Diffraktogramme werden mit dem experimentellen Diffraktogramm der aufgenommenen PP-TEM-Abbildung in einem angepassten Mustererkennungsprozess [6] abgeglichen. Das Programm ermittelt dann die am besten passenden Werte für den Defokus, den Astigmatismus und die Phasenschiebung der aufgenommenen TEM-Abbildung. Für das gezeigte Diffraktogramm, welches bei den experimentellen Gegebenheiten der HFPP in Kapitel 6 erstellt wurde, ergibt sich ein Defokuswert von $\Delta f = -7,81 \mu\text{m}$ und eine Phasenschiebung von $\varphi_{\text{PP}} = -0,71 \pi$. Passend zu den experimentellen Bedingungen für die TEM mit Zach-PP in Kapitel 6, wurden die Phasenschiebungen für eine Spannungsserie ermittelt und werden im Diagramm in Abbildung 5.1d dargestellt.

5.2.2 Simulation von TEM-Aufnahmen mit PP

Für ein vertieftes Verständnis der Kontrastentstehung in experimentell erstellten TEM-Abbildungen unter Verwendung von Zach-PP, HFPP und Zernike-PP, bietet sich der Einsatz von Bildsimulationen an. Dazu wurde das in Matlab geschriebene Programm PPSim verwendet, das im Rahmen der Doktorarbeiten von Dries und Hettler [33, 45] entwickelt wurde. Für die Fragestellungen dieser Arbeit wurde PPSim angepasst. Es bietet die Möglichkeit,

TEM-Abbildungen zu simulieren und dabei eine Vielzahl von Mikroskopparametern in die Berechnung zu inkludieren. Weiterhin gibt es die Möglichkeit, mehrere verschiedene PP-Typen in die Simulation einzubinden. Die aktuelle Version samt einer Kurzanleitung wurde mittlerweile veröffentlicht und kann frei verwendet werden [78].

Zur Bildsimulation wird eine Objektwellenfunktion benötigt, die beispielsweise mit dem Programm STEMsim [85] berechnet oder per Hand modelliert werden kann. Die Fouriertransformierte der Objektwellenfunktion wird dann mit der CTF $H(u)$ aus Gleichung 2.17 multipliziert, welche die Aperturfunktion $A(u)$ (siehe Gleichung 2.22), die Aberrationsfunktion $B(u)$ und die Dämpfungsfunktion der räumlichen partiellen Kohärenz $E_s(u)$ (siehe Gleichung 2.25) beinhaltet. Wird bei der Bildsimulation eine PP berücksichtigt, wird das Profil der Phasenschiebung $\varphi_{\text{PP}}(u)$ in der Wellenaberrationsfunktion $\chi_{\text{PP}}(u)$ gemäß Gleichung 2.38 ergänzt. Die Bildintensität ergibt sich nach inverser Fourier-Transformation aus dem Betragsquadrat der Bildwellenfunktion $I = |g(u)|^2$.

Um die zeitliche partielle Kohärenz bei der Bildsimulation zu berücksichtigen, wird die *weighted focal series*-Methode angewandt [10]. Dabei wird eine Serie von Bildern bei verschiedenen Defokuswerten in einem Bereich um den eingegebenen Mittelwert Δf simuliert und nach Gewichtung mit einer Gauß-Funktion inkohärent aufsummiert. Die Bildintensität kann in diesem Fall wie folgt berechnet werden:

$$I = \mathcal{F}^{-1} \left\{ \frac{1}{A} \sum_{i=1}^{2 \cdot n_{\text{WFS}} + 1} \exp \left(-\frac{\left((i - n_{\text{WFS}} - 1) \cdot \frac{\Delta_{\text{WFS}} \cdot \delta}{n_{\text{WFS}}} \right)^2}{2 \delta^2} \right) \cdot \text{abs}(H(\Delta f_{\text{WFS}}) \cdot \mathcal{F}\{f(r)\}) \right\}, \quad (5.1)$$

mit dem Normierungsfaktor der Gauß-Funktion:

$$A = \sum_{i=1}^{2 \cdot n_{\text{WFS}} + 1} \exp \left(-\frac{\left((i - n_{\text{WFS}} - 1) \cdot \frac{\Delta_{\text{WFS}} \delta}{n_{\text{WFS}}} \right)^2}{2 \delta^2} \right). \quad (5.2)$$

Die Gleichungen beinhalten den *focal spread* δ des Mikroskops, welcher die Breite der Gauß-Funktion definiert, die Anzahl der zur Berücksichtigung der temporären partiellen Kohärenz aufsummierten Bilder $2 \cdot n_{\text{WFS}} + 1$ und die Anzahl der Standardabweichungen des Defokus (*focal spread* δ) Δ_{WFS} , die berücksichtigt werden sollen. Zudem steht \mathcal{F} für die Fourier-Transformation, $\Delta f_{\text{WFS}} = \Delta f + (i - n_{\text{WFS}} - 1) \cdot \frac{\Delta_{\text{WFS}} \delta}{n_{\text{WFS}}}$ für den Defokuswert mit dem mittleren Defokus Δf und $f(r)$ für die Objektwellenfunktion.

Für diese Arbeit wurden TEM-Abbildungen von drei verschiedenen Probentypen mit zwei

unterschiedlichen Transmissionselektronenmikroskopen simuliert, die zur Kontrastanalyse der entsprechenden experimentellen TEM-Aufnahmen in Kapitel 6 und 7 herangezogen werden. TEM-Abbildungen von T4-Bakteriophagen wurden mit den elektronenoptischen Parametern des JEOL JEM-3200 simuliert, wobei die Implementierung einer HFPP in der normalen BFP der Objektivlinse (OL-Modus) und einer Zach-PP in der vergrößerten BFP (SA-MAG-Modus) berücksichtigt wurde. Weiterhin wurden TEM-Abbildungen eines löchrigen aC-Films und eines Kohlenstoff-Nanoröhren-(CNT)-Bündels mit dem Philips CM-200 simuliert. Die zur Bildsimulation verwendeten Mikroskopparameter können dem Anhang A.2 entnommen werden. Die Modellierung der verwendeten Objektwellenfunktionen und der Verteilungen der PP-Phasenschiebung werden in den folgenden Unterabschnitten beschrieben.

Modellierung der Objektwellenfunktion einer T4-Probe

Um die in Abschnitt 6.1 vorgestellten experimentellen TEM-Bilder einer T4-Probe mit adäquaten Bildsimulationen vergleichen zu können, muss zunächst der ungefähre Aufbau der Objektwellenfunktion $f(x,y,z) = A(x,y,z) \cdot \exp(-\varphi(x,y,z))$ nach der Transmission durch die Probe möglichst realistisch beschrieben werden. Die T4 werden dabei als reine Phasenobjekte mit $A(x,y,z) = 1$ beschrieben. Die Phase der abgeschätzten Objektwellenfunktion zweier senkrecht zueinander angeordneten T4, die in 150 nm dikes vitrifiziertes Eis eingebettet sind und bei einer Elektronenenergie von 300 keV abgebildet werden, ist in Abbildung 5.2a gezeigt. Die komplexe Struktur des T4-Kopfes wird durch einen Zylinder mit einem Durchmesser von 85 nm approximiert und die 4 nm Periodizität der schraubenförmigen Proteinstruktur des Schwanzes wird durch äquidistant angeordnete Quader mit einer Dicke von 21 nm in eine Richtung parallel zum Elektronenstrahl vereinfacht modelliert. Für die Bildsimulation wurde das MIP des T4-Kopfes mit $V_{MIP} \approx 6$ V angesetzt, was vergleichbar zu anderen DNA-basierten biomolekularen Komplexen wie etwa Nukleosomen-Grundpartikeln ist [94]. Über die geschätzten Abmessungen und das angenommene MIP kann schließlich die Phasenschiebung der Elektronen anhand von Gleichung 2.7 berechnet werden. Die Phasenschiebung des Objekts ergibt schließlich die Phase der Objektwellenfunktion und resultiert in $0,0125 \pi / \text{nm}$, was einer maximalen Phasenschiebung von etwa $1,06 \pi$ im Zentrum des Kopfes und etwa $0,26 \pi$ in den Quadern des Schwanzes entspricht. Des Weiteren wird angenommen, dass die T4 in einer 150 nm dicken Schicht von vitrifiziertem Eis mit einem MIP von $V_{MIP} \approx 3,5$ V [43] eingebettet sind. Im Bereich der T4 ist die Dicke des vitrifizierten Eises um die lokale Dicke der T4 reduziert, um eine einheitliche Probendicke von 150 nm zu erhalten. Daraus resultiert eine Phasenschiebung von etwa $1,06 \pi$ (schwarz in Abbildung 5.2a) für das reine vitrifizierte Eis und eine aufsummierte Phasenschiebung von etwa $1,54 \pi$ (weiß) im Zentrum des T4-Kopfes. An

dieser Stelle sei erwähnt, dass die Annahme der T4-Köpfe als WPO strenggenommen nur eine sehr grobe Näherung darstellt, da die Phase der Objektwellenfunktion für den T4-Kopf erheblich größer als die Phase des umgebenden Eises ist. Um experimentelles Rauschen zu simulieren, wurde ein zufälliges Signal mit einer maximalen Phasenschiebung von $0,04\pi$ und einer maximalen Amplitude von 0,02 auf die Amplitude und Phase der Objektwellenfunktion addiert. Die modellierte Wellenfunktion ist zusammen mit der PPSim-Software als Matlab-Datei frei erhältlich [78].

Inhomogene Verteilung der Phasenschiebung einer Zach-PP

Abbildung 5.2b zeigt die auf Graustufen skalierte inhomogene Verteilung der Phasenschiebung einer Zach-PP, wie sie zur Simulation von TEM-Abbildungen mit Zach-PP verwendet wird [78]. Die Verteilung der Phasenschiebung basiert auf der Berechnung des elektrostatischen Potenzials über die Finite-Elemente-Methode [46], wobei von den Abmessungen einer Standard-Zach-PP, die in Abschnitt 4.2.2 angegeben sind, ausgegangen wurde. Eine starke Phasenschiebung wird durch den hellen Bereich nahe der PP-Spitze repräsentiert. Das Zentrum des NS (weißer Punkt in Abbildung 5.2) befindet sich in einer Entfernung von 850 nm vom Ende des PP-Steges. Das elektrostatische Potenzial ist so festgelegt, dass eine Phasenschiebung von $-0,5\pi$ im Zentrum des NS erreicht wird, was mit den experimentellen Bedingungen der TEM-Aufnahme in Abbildung 6.5e übereinstimmt. Für die Bildsimulation mit anderer Phasenschiebung oder Entfernung des Steges zum NS wird die Verteilung der Phasenschiebung so angepasst, dass an der Stelle des NS die gewünschte experimentell gemessene Phasenschiebung vorliegt.

Abbildung 5.2c zeigt die Profile der Phasenschiebung durch den NS in eine Richtung parallel (rote Kurve) und senkrecht (blaue Kurve) zum PP-Steg, welche sich substanziell unterscheiden. Ein blaugrüner Balken veranschaulicht den Durchmesser des NS, der durch eine volle Breite bei der Hälfte des Maximums (FWHM) von 300 nm ($0,0048\text{ nm}^{-1}$) charakterisiert ist. Dieser entspricht dem NS-Durchmesser in der vergrößerten BFP des JEOL JEM-3200, wo die Zach-PP implementiert ist. Reale Abstände in der BFP wurden mittels Gleichung 2.23 in Raumfrequenzen umgerechnet, wobei für das JEOL JEM-3200 die Brennweite $f_{\text{OL}} = 15,8\text{ mm}$ im SA-MAG-Modus und $f_{\text{OL}} = 5\text{ mm}$ im OL-Modus berücksichtigt wurde. Die Raumfrequenzen der relevanten Bildmerkmale wie etwa dem T4-Kopf-Durchmesser ($0,012\text{ nm}^{-1}$) und der Periodizität im T4-Schwanz ($0,25\text{ nm}^{-1}$) sind durch gelbe und grüne gepunktete Linien markiert. Es sei angemerkt, dass die Zuweisung einer bestimmten Raumfrequenz für ein ausgedehntes Objekt wie dem T4-Kopf nicht vollkommen exakt ist. Dennoch zeigt sich diese Annahme als angemessen für die Diskussion des Phasenkontrasts eines T4-Kopfes.

Das Profil der Phasenschiebung in eine Richtung senkrecht zum Steg der Zach-PP zeigt ei-

ne symmetrische Form und ähnelt einer Gauß-Funktion mit $-0,5\pi$ Phasenschiebung an der Position des NS. Die FWHM des Gauß-Profil beträgt $2,86\text{ }\mu\text{m}$ an dieser Stelle, was einer Raumfrequenz von $0,046\text{ nm}^{-1}$ entspricht. Die FWHM des Phasenschiebungsprofils verkleinert sich mit abnehmender Entfernung von der Spitze des PP-Steges. Die im Experiment gewählten Abstände von $600 - 1000\text{ nm}$ zwischen NS und der Spitze des Steges haben sich als ein guter Kompromiss zwischen der gewünschten relativen Phasenschiebung von etwa $-0,5\pi$, der limitierten Positionierungsgenauigkeit des PP-Halters, der Prävention von Bildstörungen durch elektrostatische Aufladung des PP-Steges sowie der Blockierung von NS-Elektronen durch die Struktur der Zach-PP erwiesen.

Das Profil der Phasenschiebung in eine Richtung parallel zum Steg der Zach-PP (rote Linie in Abbildung 5.2c) verläuft asymmetrisch. Die negative Phasenschiebung mit einem Maximalwert von $-1,56\pi$ nimmt mit zunehmender Entfernung vom Steg der Zach-PP ab und folgt dabei einem Potenzgesetz mit einem Exponenten von etwa $-1,4$. Der Steg der Zach-PP ist nicht elektronentransparent und blockiert die Elektronen in einem Raumfrequenzbereich oberhalb von $0,027\text{ nm}^{-1}$, unter der Annahme einer Entfernung von 850 nm zwischen der Stegspitze und dem NS. Die einseitige Blockierung von Elektronen führt zu *single-sideband*(SSB)-Kontrast für die vom Steg abgedeckten Raumfrequenzen.

Um den starken Gradienten der Phasenschiebung einer Zach-PP über den Durchmesser des NS bei der Bildsimulation zu berücksichtigen, werden mit PPSim optional mehrere simulierte Bilder mit räumlich verschobener Phasenschiebungsverteilung generiert, was unterschiedlichen Abständen zwischen NS und PP-Spitze gleichkommt. Diese Bilder werden mit einer Gauß-Funktion gewichtet und inkohärent aufsummiert, wobei die Verschiebung der Phasenschiebungsverteilung und die Breite der Gauß-Funktion durch den in PPSim eingebrachten Durchmesser des NS definiert wird.

Verteilung der Phasenschiebung einer HFPP

Experimentelle TEM-Aufnahmen mit einer HFPP wurden in der normalen BFP des JEOL JEM-3200 im OL-Modus aufgenommen. Um vergleichbare Bildsimulationen zu erstellen, wurde die Verteilung für eine negative Phasenschiebung des geladenen Flecks [49] der HFPP als Lorentz-Funktion angenähert:

$$\varphi_{\text{HFPP},-}(u) = \frac{\varphi_{\text{PP}}(0)}{\left(\left(\frac{u}{0,5\sigma_{\text{HFPP}}}\right)^2 + 1\right)}. \quad (5.3)$$

Dabei steht σ_{HFPP} für die FWHM und $\varphi_{\text{PP}}(0)$ für die angenommene Phasenschiebung bei $u = 0$. Für die durchgeführten Bildsimulationen wurde die FWHM mit $0,015\text{ nm}^{-1}$ etwas

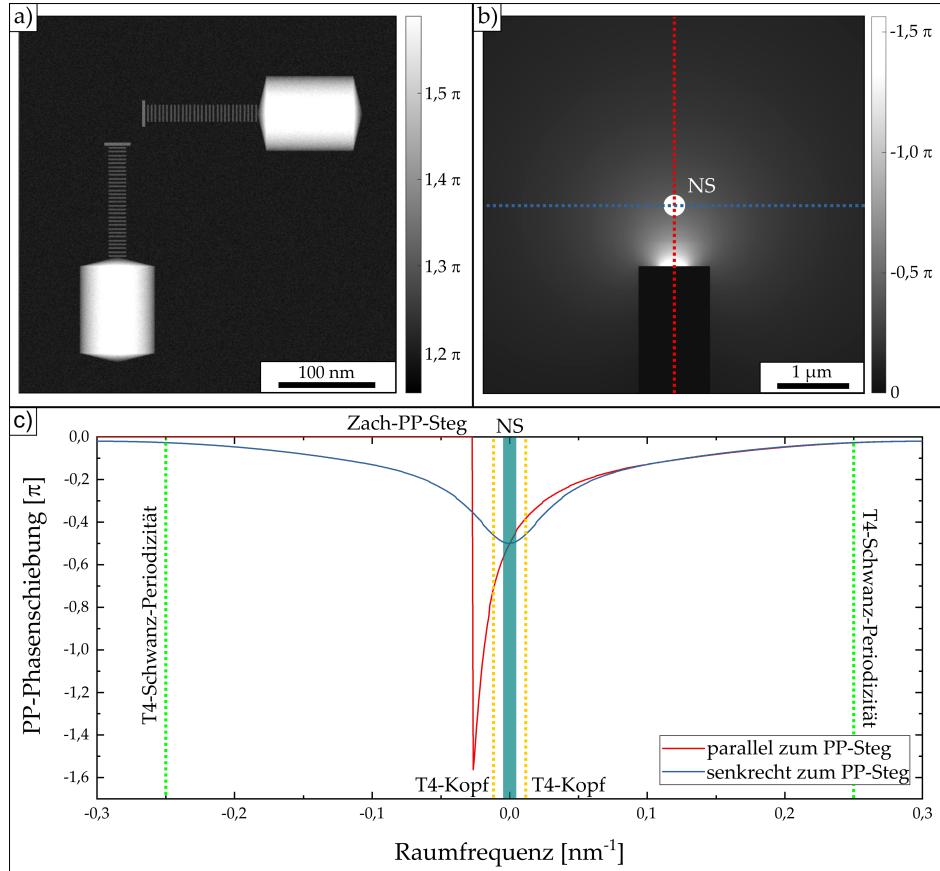


Abbildung 5.2: Modellierte Objektwellenfunktion zweier senkrecht zueinander angeordneter T4 und Verteilung der Phasenschiebung einer Zach-PP [78]. a) Phase der modellierten Objektwellenfunktion zweier senkrecht zueinander orientierter, in vitrifiziertem Eis eingebetteter T4 für eine Beschleunigungsspannung von 300 kV. Die Phase entspricht der Objektwelle direkt beim Austritt aus der Probe, bevor diese einer zusätzlichen Phasenschiebung durch eine PP ausgesetzt wurde. b) Inhomogene Verteilung der Phasenschiebung einer Zach-PP mit $\varphi_{\text{PP}} = -0,5 \pi$ an der Stelle des durch einen weißen Punkt markierten NS. c) Profil der Phasenschiebung einer Zach-PP durch den NS in eine Richtung parallel (rote Linie) und senkrecht (blaue Linie) zum PP-Steg. Der NS (blaugrüner Balken) sowie die Raumfrequenzen des T4-Kopfes (gelb gepunktete Linie) und die Periodizität des T4-Schwanzes (grün gepunktete Linie) sind im Diagramm markiert.

breiter als der abgeschätzte NS-Durchmesser von 100 nm gewählt [67], um die erwartungsgemäß etwas breiter aufgebaute Ladungsverteilung [50] und ihre größere Reichweite zu berücksichtigen. Das Profil wird durch eine experimentell bestimmte Phasenschiebung von $\varphi_{\text{PP}}(0) = -0,7 \pi$ skaliert. Im direkten Vergleich ist das gaußförmige Phasenschiebungsprofil der Zach-PP in eine Richtung senkrecht zum PP-Steg (blaue Linie in Abbildung 5.2c) an der Stelle des NS wesentlich breiter als das Profil der HFPP.

Soll in der Simulation von einer positiven Phasenschiebung ausgegangen werden, wird diese der Deposition von Kontamination zugeschrieben [50] und durch ein gaußsches Dicken- und Phasenprofil beschrieben:

$$t_{\text{HFPP},+}(u) = \frac{\varphi_{\text{PP}}(0)}{V_{\text{MIP}} C_{\text{E}}} \exp\left(-\frac{u^2}{\sigma_{\text{HFPP}}^2}\right) + t_0 \quad (5.4)$$

$$\varphi_{\text{HFPP},+}(u) = V_{\text{MIP}} C_{\text{E}} t_{\text{HFPP},+}(u) \quad (5.5)$$

mit der Filmdicke der HFPP ohne Kontamination $t_0 = 10 \text{ nm}$ und einer Wechselwirkungskonstante C_{E} , die aus Gleichung 2.8 entnommen werden kann. Der Phasenschiebungswert $\varphi_{\text{PP}}(0)$ kann, wie in Abschnitt 5.2.1 beschrieben, aus einem experimentellen Bild bestimmt werden. Für die FWHM σ_{HFPP} der gaußförmigen Phasenschiebungsverteilung kann im Falle von positiver Phasenschiebung, die dem Aufbau von Kontamination zugeschrieben wird, vom NS-Durchmesser ausgegangen werden. Optional kann die Dämpfung der Elektronenwelle beim Durchlaufen des dünnen HFPP-Filmes berücksichtigt werden. Es ergibt sich unter Verwendung der mittleren freien Weglänge für inelastische Streuung (engl. *mean free path*) λ_{MFP} eine Dämpfung von $\exp(-\frac{t_{\text{HFPP},+}(u)}{\lambda_{\text{MFP}}})$. Bei einer HFPP mit negativer Phasenschiebung ist die Dämpfung durch $\exp(-\frac{t_0}{\lambda_{\text{MFP}}})$ gegeben, was bei den durchgeführten Simulationen berücksichtigt wurde. In PPSim ist die mittlere freie Weglänge λ_{MFP} nur für aC und für Beschleunigungsspannungen von 80, 200 und 300 kV (50 nm, 100 nm und 130 nm) vordefiniert. Sollen andere Beschleunigungsspannungen angenommen werden, ist eine Abänderung im Programmcode notwendig [78].

Modellierung der Objektwellenfunktion einer aC-Film/Vakuum-Grenzfläche und eines CNT-Bündels

Bei der Modellierung der Objektwellenfunktion einer aC/Vakuum-Grenzfläche wird ein Amplitudenanteil berücksichtigt, sodass die Objektwellenfunktion als $f(x,y,z) = A(x,y,z) \cdot \exp(i\varphi(x,y,z))$ mit der dickenabhängigen Phase $\varphi(x,y,z)$ und Amplitude $A(x,y,z)$ beschrieben werden kann. Um die Phase des aC-Filmes zu bestimmen, wurde analog zur Bestimmung der Dickenprofile der graduierten Zernike-PP in Abbildung 4.18 vorgegangen (siehe Abschnitt 4.3.2). Dazu wurde zunächst das Dickenprofil der im Experiment verwendeten

aC-Film-Testprobe bestimmt (siehe Abschnitt A.3). Basierend auf dem Dickenprofil in Abbildung A.7, wird eine Hälfte der Objektwellenfunktion als 10 nm dicker aC-Film definiert, während bei der anderen Hälfte von einem Vakuumbereich ausgegangen wird. Die Phasenschiebung des 10 nm dicken aC-Filmes kann unter Anwendung von Gleichung 2.9 mit einem MIP von 9 V [100] berechnet werden, woraus sich eine Phasenschiebung von $0,21\pi$ ($0,021\pi/\text{nm}$) ergibt. An der aC-Film/Vakuum Grenzfläche wird in der Objektwellenfunktion ein glatter Phasenübergang definiert, so wie er im Dickenprofil in Abbildung A.3c gemessen wurde. Der Übergang erstreckt sich stufenlos über etwa 2 nm für die Simulationen mit einer Zernike-PP mit einem inneren Radius von $0,5\mu\text{m}$. Für die Simulationen mit einer Zernike-PP mit einem inneren Radius von 375 nm wurde ein Dickenprofil mit einer Breite von 4 nm angenommen. Dadurch wird eine abrupte Phasenkante in der Objektwellenfunktion vermieden, was zu einer guten Übereinstimmung der simulierten Bilder mit den experimentellen Zernike-PP-TEM-Abbildungen führt. Ein zusätzlicher schmaler Vakumbereich und ein gradueller Abfall der aC-Filmdicke wird auf der linken Seite des aC-Films definiert, um Simulationsartefakte aufgrund von aperiodischen Randbedingungen zu vermeiden. Die auf diese Weise modellierte Phase der aC-Film-Objektwellenfunktion ist in Abbildung 5.3a dargestellt. Zusätzlich wird eine leicht gedämpfte Amplitude $A = 0,99$ angenommen, um die in den experimentellen Abbildungen des aC-Films beobachtbare Absenkung der Intensität zu modellieren.

Die Phase der modellierten Objektwellenfunktion eines CNT-Bündels ist in Abbildung 5.3b dargestellt. Diese wird in stark vereinfachter Form modelliert, indem das CNT-Bündel als homogener Zylinder mit Radius r (in diesem Fall $r = 7,5\text{ nm}$) und einem MIP von 6 V [80, 96] angenähert wird. Die projizierte Phase $\varphi(x)$ des Zylinders wird über $\varphi(x) = 2\rho\sqrt{r^2 - x^2}$ berechnet, wobei gemäß Gleichung 2.9 eine Phasenschiebung pro Längeneinheit von $\rho = 0,014\pi/\text{nm}$ angenommen wird.

Ein experimentelles Rauschen wird simuliert, indem ein zufälliges Signal mit einer maximalen Phasenschiebung von $0,04\pi$ und einer maximalen Amplitude von 0,02 auf die aC- und CNT-Bereiche der Objektwellenfunktion addiert wird. Ein weiteres Rauschen wird auf die simulierte Bildintensität addiert, um das Rauschen der Kamera nachzuahmen.

Verteilung der Phasenschiebung von konventionellen und dickengraduierten Zernike-PP

Die raumfrequenzabhängige Phasenschiebungsverteilung der konventionellen Zernike-PP $\varphi(u)$ wird unter Verwendung von Gleichung 2.43 und ihrer vom Lochdurchmesser abhängigen Cut-on-Frequenz u_C definiert als $0,5\pi$ für $u \geq u_C$ und 0 für $u < u_C$. Für die dickengraduierte Zernike-PP wurde die experimentelle Phasenschiebungsverteilung ermittelt, die in Abbildung 5.3c für einen inneren Lochradius von 375 nm und einen äußeren Lochradius

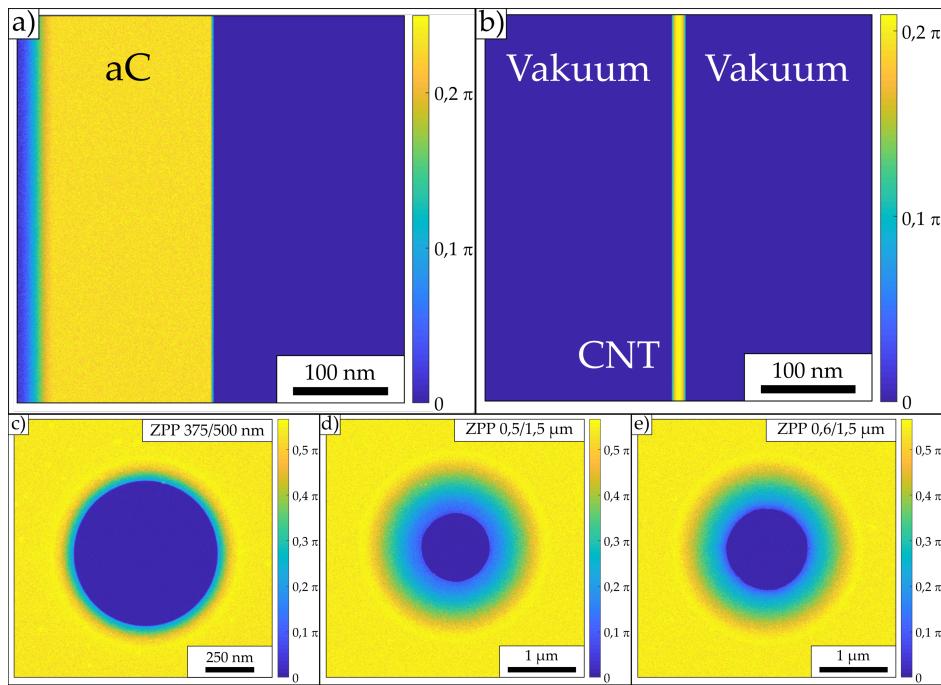


Abbildung 5.3: Modellierte Objektwellenfunktion einer aC-Film/Vakuum-Grenzfläche und eines CNT-Bündels sowie Phasenschiebungsverteilungen von dickengradienten Zernike-PP für drei verschiedene Lochradien. a) Farbkodierte Phasenverteilung der modellierten Objektwellenfunktion von a) einer aC-Film/Vakuum-Grenzfläche und b) einem CNT-Bündel in Vakuum. c-f) Experimentell bestimmte Phasenschiebungsverteilungen von dickengradienten Zernike-PP mit den Lochradien c) 375/500 nm, d) 0,5/1,5 μm und e) 0,6/1,5 μm .

von 500 nm (375/500 nm) gezeigt ist. Entsprechende Phasenschiebungen sind in Abbildung 5.3d für die 0,5/1,5 μm Zernike-PP und in Abbildung 5.3e für die 0,6/1,5 μm Zernike-PP dargestellt. Dafür wurden die HAADF-STEM-Aufnahmen in Abbildung 4.18d-f in Dickenverteilungen umgewandelt (siehe Abschnitt 4.3.2) und die zugehörigen Phasenschiebungs-werte mittels Gleichung 2.9 und einem MIP von 9 V [100] berechnet. Eine Dämpfung der Amplitude durch zusätzliche Streuprozesse im aC-Film der Zernike-PP wird wie für die HFPP-Filme ausführlich beschrieben bei der Simulation berücksichtigt.

6

Kapitel 6

Experimentelle und simulierte Abbildung lebenswissenschaftlicher Kryo-Proben mit Zach-PP und HFPP

In diesem Kapitel werden vergleichende Kryo-TEM-Experimente mit der elektrostatischen Zach-PP und HFPP präsentiert, die im Hinblick auf Kontrastentstehung und Untersuchung von Bildartefakten analysiert werden. Zu diesem Zweck wurden Phasenkontrast-TEM-Abbildungen mit Zach-PP und HFPP von in vitrifiziertem Eis eingebetteten T4-Proben aufgenommen und die Kontraststeigerung durch PP im Experiment und mittels Simulationen untersucht (siehe Abschnitt 6.1). Darauf hinaus wurde zum ersten mal eine Zach-PP für die Kryo-Elektronentomografie zur Rekonstruktion der dreidimensionalen Probenstruktur eingesetzt und ihre kontrastverstärkenden Eigenschaften mit denen einer HFPP verglichen (siehe Abschnitt 6.2). Teile dieses Kapitels wurden bereits in einer Fachzeitschrift veröffentlicht [78]. Die dort verwendeten Abbildungen und Tabellen wurden übersetzt und mit Genehmigung wiederholt publiziert. Die entsprechenden Passagen, Bilder und Tabellen sind an den relevanten Stellen markiert.

6.1 Experimentelle und simulierte TEM-Abbildung von T4

6.1.1 Probencharakterisierung und grundlegende Betrachtungen

T4 sind aus mehreren Bestandteilen mit unterschiedlichen Größenordnungen aufgebaut und eignen sich deswegen hervorragend als Test-Objekte für die Untersuchung des Phasenkontrasts von lebenswissenschaftlichen Proben in der TEM. Sie bestehen aus zwei Hauptteilen, einem Kopf und einem Schwanz, und weisen eine Gesamtlänge von etwa 250 nm auf. Der Kopf bildet einen langgestreckten Ikosaeder mit einem Durchmesser von etwa 85 nm und einer Länge von 115 nm [105]. Die 3 nm dicke Proteinhülle des Kopfes wird als Kapsid bezeichnet und umkapselt die nach einem komplexen Packungsschema gleichmäßig angeordnete gebündelte Desoxyribonukleinsäure (DNA), welche das Genom der T4 darstellt. Der etwa 100 nm lange Schwanz besteht aus einer kontraktilen Schwanzhülle mit einem Durchmesser von etwa 21 nm [61]. An einem Ende des Schwanzes befindet sich eine hexagonale Grundplatte mit sechs langen Schwanzfasern. Die schraubenförmige Proteinstruktur der kontraktilen Schwanzhülle erscheint in TEM-Aufnahmen mit einer Periodizität von 4 nm. Während des Infektionszyklus der T4 setzt sich die T4 auf der Zellmembran eines Bakteriums ab, zieht seine kontraktile Schwanzhülle zurück und nutzt eine kanülenartige Röhre innerhalb der Schwanzhülle, um in die bakterielle Membran einzudringen, DNA zu injizieren und so letztlich das Bakterium zu infizieren.

In TEM-Proben können T4 in verschiedenen Stadien ihres Infektionszyklus gefunden werden. Obwohl T4 sehr strahlungsempfindlich sind, können TEM-Abbildungen mit einer Exposition von bis zu etwa $140 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$ ohne erkennbare Strahlenschädigung der Probe aufgenommen werden. Für die im Rahmen der Arbeit durchgeführten Experimente am JEOL JEM-3200 wurde eine Elektronendosis von $8 - 12 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$ pro TEM-Abbildung verwendet. Dies ermöglicht die Aufnahme von Bildserien mit bis zu 17 TEM-Aufnahmen bei nur geringfügigem Verlust von Bildqualität. Dahingegen muss die Elektronendosis für die Aufnahme von tomografischen Kippserien mit bis zu 70 Einzelaufnahmen wesentlich geringer gewählt werden.

6.1.2 Vergleich experimenteller CTEM-Aufnahmen und Phasenkontrast-TEM-Aufnahmen

Abbildung 6.2 zeigt einen Vergleich von Abbildungen einer in vitrifiziertem Eis eingebetteten T4-Probe, die mit CTEM, HFPP-TEM und Zach-PP-TEM bei $\Delta f \approx 0$ aufgenommen wurden. Der schwache T4-Kontrast in der CTEM-Abbildung (siehe Abbildung 6.2a) zeigt keinerlei strukturelle Details und nur die vereinzelten stark streuenden Au-Nanopartikel, die

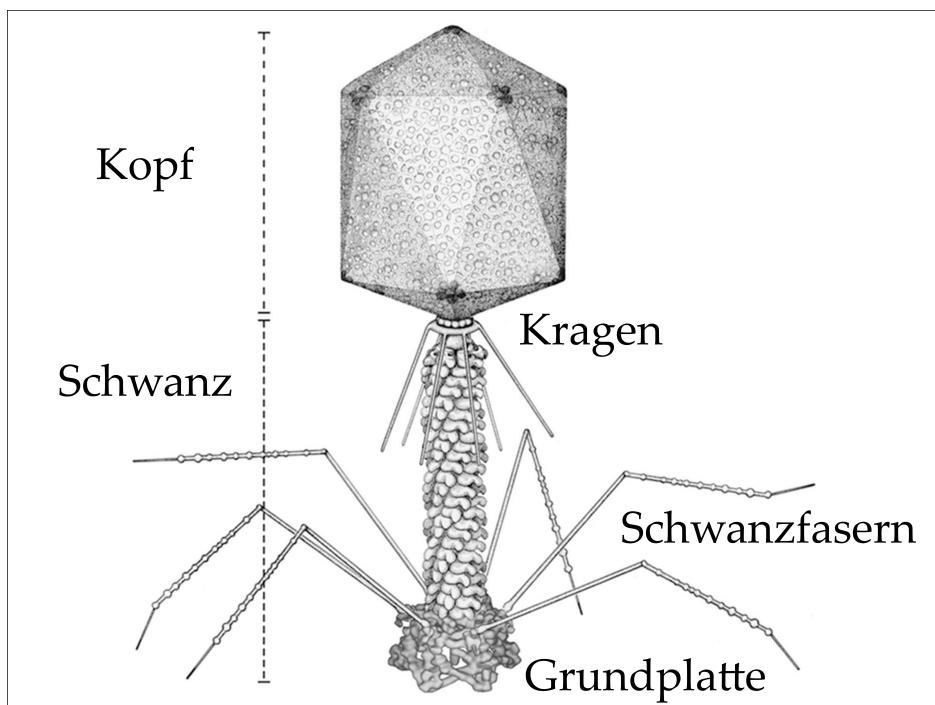


Abbildung 6.1: Schematische Darstellung der Bakteriophage T4 [55, 106]. Die T4 besteht aus einem Kopf mit einem Kragen und einem Schwanz mit einer komplexen Grundplatte. An der Grundplatte setzen sechs lange Schwanzfasern an. Der Schwanz verfügt über eine kontraktile Schwanzhülle, die aus einer schraubenförmigen Proteinstruktur besteht.

als Markierungspartikel für die Kryo-Elektronentomografie verwendet werden, sind sichtbar. Abbildung 6.2b zeigt eine HFPP-TEM-Abbildung der selben Probenstelle und wurde mit einer Phasenschiebung von $-0,7\pi$ aufgenommen. Die T4 zeigen starken Kontrast und die Struktur ihrer Schwänze mit der Grundplatte, den langen Schwanzfasern und dem Kragen ist deutlich erkennbar. Die meisten T4-Köpfe sind mit DNA gefüllt und weisen einen gleichmäßigen dunklen Kontrast auf (ein schwarzer Pfeil markiert ein repräsentatives Beispiel in Abbildung 6.2b). Der Kontrast des Kapsids des Kopfes unterscheidet sich nicht vom Kontrast der gepackten DNA innerhalb des T4-Kopfes. Abgesehen davon haben drei T4 einen leeren Kopf mit hellerem Kontrast (ein weißer Pfeil markiert ein repräsentatives Beispiel), was darauf hindeutet, dass sie bereits den Infektionszyklus durchlaufen und die DNA in ihrem Kopf verloren haben. Für die leeren T4-Köpfe ist die Proteinhülle des Kapsids deutlich sichtbar und erscheint als eine Linie mit dunklem Kontrast, die den Kopf umrandet. Außerdem ist ein heller Halo um die T4-Köpfe sichtbar. Der signifikant verbesserte Kontrast in der HFPP-Abbildung im Vergleich zur CTEM-Abbildung ist zudem durch einen deutlich verbesserten Kontrasttransfer im Diffraktogramm der Abbildung 6.2b belegt. Abbildung 6.2c-f zeigt eine Spannungsserie von Zach-PP-TEM-Abbildungen der gleichen T4-Probe. Der Abstand zwischen dem Zach-PP-Steg war etwa 600 nm, was nach Gleichung

2.23 einer Raumfrequenz von $0,019 \text{ nm}^{-1}$ entspricht. Im Zentrum des abgebildeten Probenbereichs befinden sich drei T4 (markiert mit einem weißen Pfeil in Abbildung 6.2e) mit kontrahierten Schwanzhüllen, die die DNA in ihren Köpfen teilweise ausgestoßen haben. In der unteren linken Ecke befindet sich eine vollständige T4 mit gefülltem Kopf (markiert mit einem schwarzen Pfeil in Abbildung 6.2e) sowie zwei weitere fragmentierte T4 auf der linken Seite. Abbildung 6.2c zeigt eine Zach-PP-TEM-Abbildung ohne angelegte Spannung. Der T4-Kontrast erscheint trotzdem verbessert im Vergleich zu den T4 in der CTEM-Abbildung (siehe Abbildung 6.2a). Es kann außerdem eine kleine negative Phasenschiebung von -0.24π gemessen werden, die von einer elektrostatischen Aufladung der isolierenden Abschirmung im Zach-PP-Steg herrührt. Der Zach-PP-Steg ist bei genauem Hinsehen im Diffraktogramm in Abbildung 6.2c zu erkennen und der verbesserte Bildkontrast ist das Ergebnis eines leicht inhomogenen Kontrasttransfers der mittleren Raumfrequenzen. Des Weiteren blockiert der Zach-PP-Steg Elektronen in der BFP und verursacht SSB-Kontrast für kleine Bildstrukturen in Richtung des Stegs der Zach-PP. Abbildung 6.2d zeigt eine Zach-PP-TEM-Abbildung des selben Probenbereichs mit einer angelegten Spannung von 1 V, was in einer Gesamtphasenschiebung von 0π resultiert. Die positive Spannung kompensiert die negative Aufladung des isolierenden Materials im Steg der Zach-PP. In dieser Abbildung zeigen die T4 minimalen Kontrast und die Schwänze sowie die langen Schwanzfasern können kaum vom Hintergrund unterschieden werden. Der schwache Kontrasttransfer ist auch im zugehörigen Diffraktogramm beobachtbar. Ein geringer verbleibender Kontrast kann durch die Anwesenheit des PP-Steges und einem verbleibenden elektrostatischen Potenzial nahe des Steges erklärt werden. Die Anwendung einer Spannung von -1 V (siehe Abbildung 6.2e) generiert eine Phasenschiebung von $-0,5\pi$, was zu einem optimalen Kontrast innerhalb der Zach-PP-Spannungsserie führt. Der Bildkontrast ist vergleichbar mit dem Kontrast der HFPP-Aufnahme in Abbildung 6.2b (siehe die mit einem weißen Pfeil markierte T4). Es lässt sich feststellen, dass der Kontrast des Kapsids um den teilweise entleerten T4-Kopf, der Schwänze und der langen Schwanzfasern signifikant verbessert ist. Eine genaue Betrachtung des Inneren der teilweise entleerten T4-Köpfe offenbart verbleibende DNA-Stränge innerhalb der Kapside. Im Vergleich zum gleichmäßigen Kontrast der gefüllten T4-Köpfe in der HFPP-Aufnahme in Abbildung 6.2b zeigen die gefüllten T4-Köpfe in Abbildung 6.2e eine leicht variierende Intensität, die von der Orientierung der T4 zum Zach-PP-Steg abhängt. Die Anwendung einer Spannung von 2 V generiert eine positive Phasenschiebung von $0,25\pi$ (siehe Abbildung 6.2f). Daraus resultiert eine Kontrastinversion gegenüber Abbildung 6.2e, die zu hellem Kontrast für die T4-Schwänze, die Schwanzfasern und die Kapside der entleerten Köpfe führt. Der Kontrast des gefüllten T4-Kopfes und der Au-Nanopartikel ist in gleicher Weise invertiert. Die Diffraktogramme der Abbildungen 6.2e,f zeigen abgesehen von den vom Zach-PP-Steg abgedeckten Bereichen einen starken Kontrasttransfer. Des Weiteren weisen alle Zach-PP-Aufnahmen (siehe Abbildungen 6.2c-f) eine schwach oszillierende Intensität in den Bereichen des amorphen Ei-

ses auf, welche sich von den abgebildeten Objekten in eine Richtung entlang des Zach-PP-Steges erstreckt (die Orientierung des Zach-PP-Steges ist im REM-Bild in Abbildung 6.2c rechts unten zu sehen). Die Intensitätsoszillationen sind in Abbildung 6.2e, die bei optimaler Phasenschiebung aufgenommen wurde, nahezu unsichtbar.

Zur weiteren Untersuchung der Kontrastverstärkung und auftretender Artefakte in TEM-Abbildungen mit HFPP und Zach-PP wurden Bildsimulationen unter vergleichbaren elektronenoptischen Bedingungen und unter Berücksichtigung der jeweiligen PP durchgeführt. Eine genaue Beschreibung des Simulationsprogramms sowie der verwendeten Objektwellenfunktion und Phasenschiebungsprofile erfolgt in Abschnitt 5.2.2. Der Vergleich zwischen experimentellen und simulierten Abbildungen wird durch Intensitätslinienprofile gestützt.

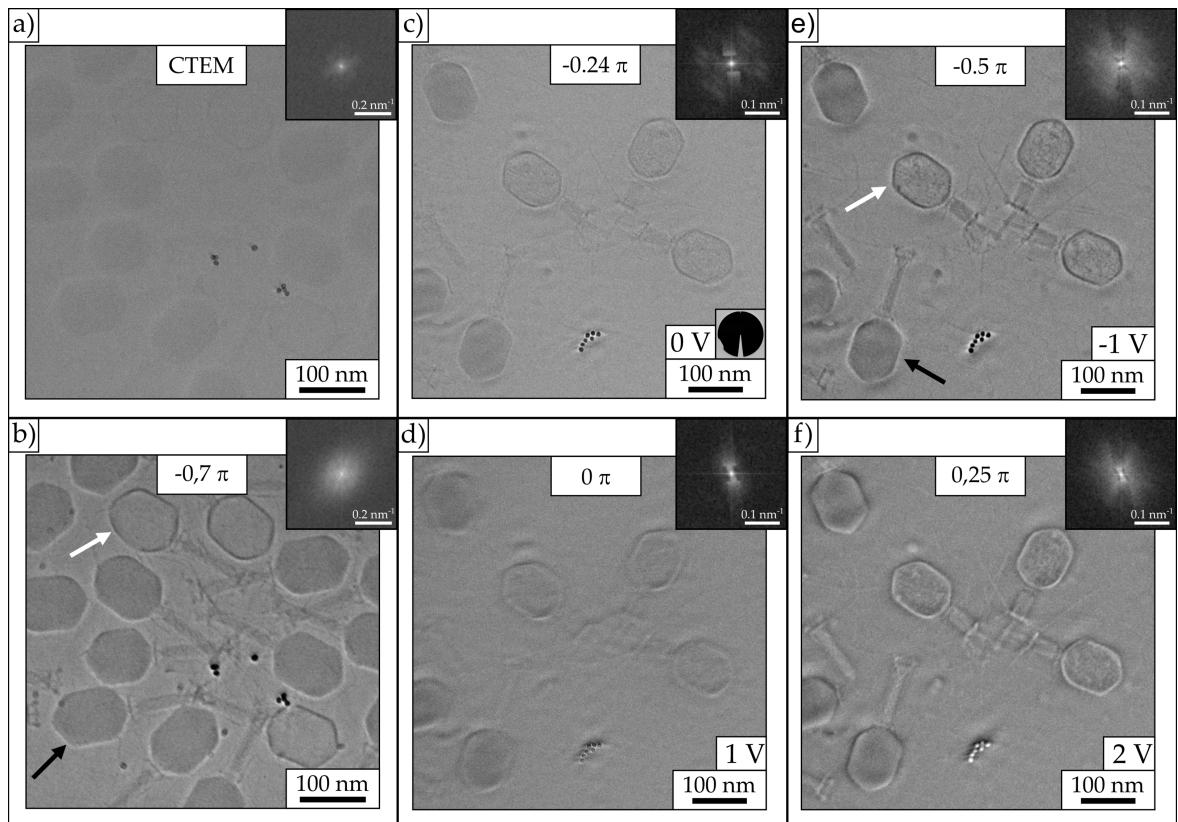


Abbildung 6.2: 300 keV CTEM- und PP-TEM-Abbildungen einer in Eis eingebetteten T4-Probe, aufgenommen mit einer HFPP oder einer Zach-PP bei $\Delta f \approx 0$, mit zugehörigen Diffraktogrammen [78]. a) CTEM-Abbildung ohne PP aufgenommen mit einer Elektronendosis von etwa $16 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$ und b) HFPP-TEM-Aufnahme bei einer Phasenschiebung von $-0,7\pi$ und einer Elektronendosis von etwa $12 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$. c-f) Zach-PP-TEM-Spannungsserie mit c) 0 V ($\varphi_{\text{PP}} = -0,24\pi$), d) 1 V ($\varphi_{\text{PP}} = 0\pi$), e) -1 V ($\varphi_{\text{PP}} = -0,5\pi$) und f) 2 V ($\varphi_{\text{PP}} = 0,25\pi$), aufgenommen bei einer Elektronendosis von etwa $8 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$. Die Orientierung der Zach-PP in c-f) ist in c) markiert. Eine repräsentative T4 mit einem mit DNA befülltem Kopf ist mit einem schwarzen Pfeil und eine T4 mit teilweise entleertem Kopf ist mit einem weißen Pfeil in b) und e) markiert.

6.1.3 Kontrastanalyse von experimentellen und simulierten TEM-Abbildungen mit HFPP

Durch HFPP verursachte Kontrastverstärkung und auftretende Artefakte wurden anhand von Intensitätslinienprofilen der DNA-gefüllten T4-Köpfe und der 4nm Periodizität im Schwanz untersucht. Abbildung 6.3 zeigt eine vergrößerte Ansicht einer T4 in einer CTEM (siehe Abbildung 6.3a) und einer HFPP-TEM-Aufnahme (-0,7 π , siehe Abbildung 6.3b), die beide bei $\Delta f \approx 0$ und bei einer Elektronendosis von etwa $12 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$ aufgenommen wurden. Intensitätslinienprofile des T4-Kopfes werden in Abbildung 6.3c verglichen. Die schwarze Linie gehört zu der CTEM-Aufnahme in Abbildung 6.3a (die Richtung des Profils ist mit einem schwarzen Pfeil markiert). Der Kontrast ist sehr schwach, was daran zu erkennen ist, dass das Intensitätsprofil keine Stufe am Übergang zwischen Eis und dem T4-Kopf zeigt. Der stark verbesserte Kontrast des T4-Kopfes in der HFPP-TEM-Aufnahme in Abbildung 6.3b ist charakterisiert durch einen ausgeprägten Intensitätsunterschied zwischen dem Kopf und dem umgebenden Eis entlang des rosa Linienprofils (die Richtung des Profils ist mit einem rosa Pfeil in Abbildung 6.3b markiert). Der helle Halo um den T4-Kopf spiegelt sich in den Maxima an den Abgrenzungen des Kopfes im Linienprofil wieder. Die Ursache des Halos ist der glatte Gradient des Profils der Phasenschiebung, das durch den geladenen Fleck der HFPP generiert wird [67, 80]. Ein leichter Intensitätsunterschied zwischen dem rechten und linken Halo-Maximum entstammt einem schwachen Drift des PP-Halters während der Bildaufnahme [80]. Die geringere Hintergrundintensität des rosa Linienprofils (siehe Abbildung 6.3c) vom T4-Kopf aus der HFPP-Aufnahme im Vergleich zum Profil der CTEM-Aufnahme resultiert aus der Streuung von Elektronen im HFPP-Film, die die Gesamtintensität leicht reduziert. Die Tatsache, dass die Zach-PP keinen Dünnfilm verwendet, ist ein Vorteil gegenüber der HFPP.

Während der T4-Kopf mit seinem Durchmesser von 85 nm ein relativ großes ausgedehntes Objekt und möglicherweise kein ideales WPO ist, ermöglicht die 4 nm Periodizität im Schwanz die Untersuchung der Kontrastverstärkung kleiner Strukturen durch eine HFPP. Ein Vergleich von Intensitätslinienprofilen entlang des Schwanzes wird in Abbildung 6.3d für die CTEM-Abbildung (blaue Linie, die Richtung des Profils ist mit einem blauen Pfeil in Abbildung 6.3a markiert) und die HFPP-Abbildung gezeigt (rote Linie, die Richtung des Profils ist mit einem roten Pfeil in Abbildung 6.3b markiert). Während die Maxima und Minima der 4 nm Periodizität des Schwanzes nur sehr schwer im verrauschten Linienprofil aus der CTEM-Abbildung zu erkennen sind, treten sie deutlich im Linienprofil aus der HFPP-Abbildung hervor.

Die Abbildungen 6.3e,f veranschaulichen Simulationsergebnisse einer HFPP-Abbildung bei $\Delta f = 0$ mit einer maximalen Phasenschiebung von $-0,7 \pi$ entsprechend der experimentellen Abbildung, die auf der in Abbildung 5.2a gezeigten Objektwellenfunktion basieren. Die Abbildung zeigt starken Kontrast für den T4-Kopf und die 4 nm Periodizität im Schwanz.

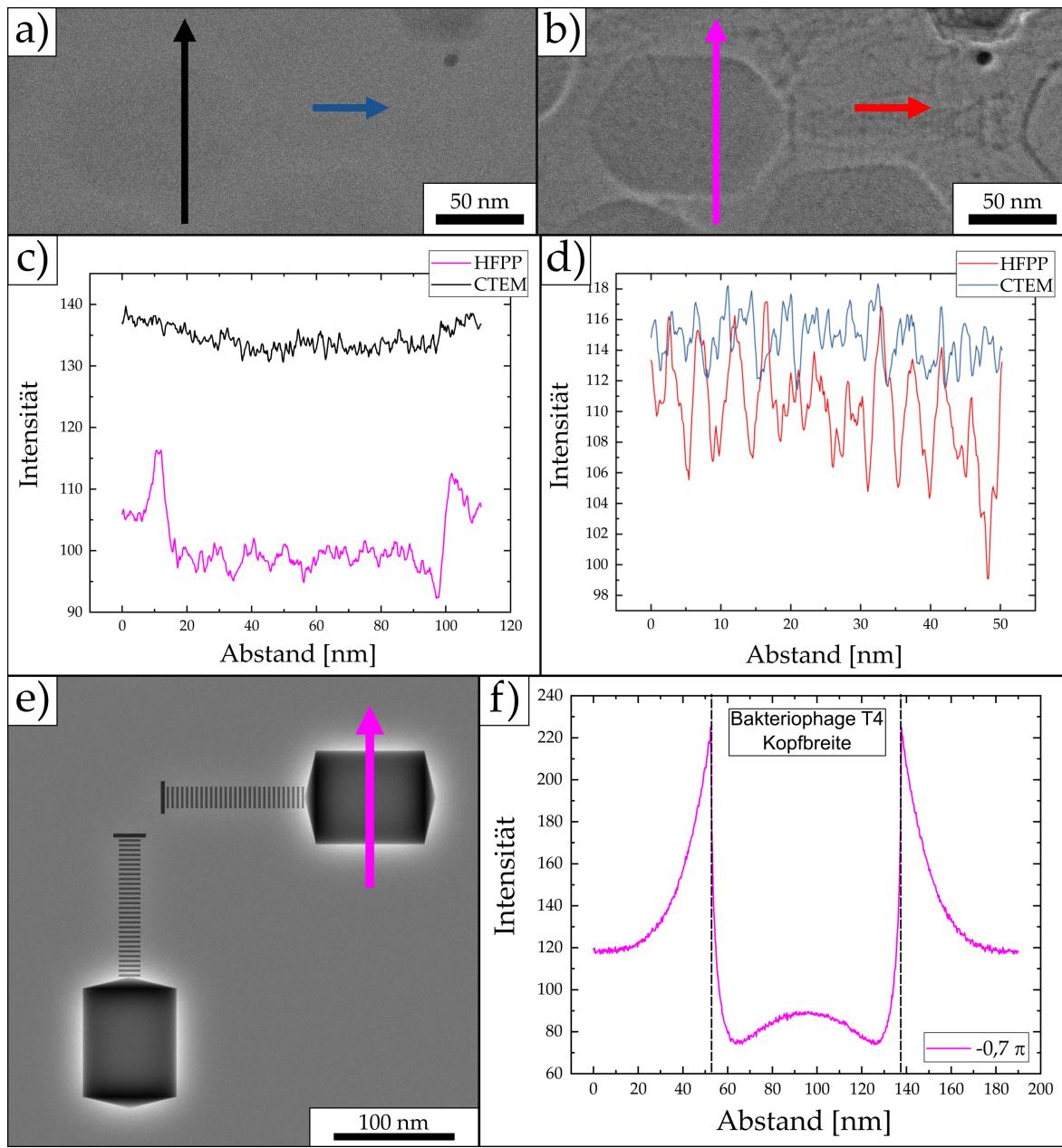


Abbildung 6.3: Kontrastverstärkung des Kopfes und Schwanzes einer T4 mittels HFPP-TEM [78]. a) CTEM-Aufnahme ohne PP und b) HFPP-Aufnahme einer T4 mit einer Phasenschiebung von $-0,7\pi$ ($\Delta f \approx 0$). c) Liniendiagramme des T4-Kopfes entlang des schwarzen Pfeiles in der CTEM-Aufnahme in a) und entlang des rosa Pfeiles in der HFPP-Abbildung in b.). d) Liniendiagramme des T4-Schwanzes entlang des blauen Pfeiles in der CTEM-Aufnahme in a) und entlang des roten Pfeiles in der CTEM-Aufnahme in b.). e) Simulierte HFPP-Abbildung mit einer Phasenschiebung von $-0,7\pi$. f) Simuliertes Intensitätsliniendiagramm eines T4-Kopfes entlang des rosa Pfeiles in e.). Die Grenzen des Kopfes sind mit einer gestrichelten Linie in f) markiert.

Die T4-Köpfe sind umgeben von einem hellen Halo, wie er auch im experimentellen Bild in Abbildung 6.3b beobachtbar ist. Aufgrund des symmetrischen Phasenschiebungsprofils der HFPP ist der Kontrast nicht abhängig von der Orientierung der T4. Das Intensitätslinienprofil über den T4-Kopf entlang des rosa Pfeiles in Abbildung 6.3e zeigt die gleichen Merkmale wie die experimentellen Daten in Abbildung 6.3c, mit Intensitätsmaxima an den Abgrenzungen des Kopfes, die zu einem hellen Halo führen.

Die im Kontext mit Abbildung 6.3 gemachten Beobachtungen zeigen, dass die Anwendung einer HFPP eine Kontrastverbesserung von kleinen und großen Strukturen ermöglicht. Das Profil der Phasenschiebung erstreckt sich über den kompletten Durchmesser des Nullstrahls und erzeugt sogar für vergleichsweise kleine Raumfrequenzen eine relative Phasenschiebung. Die maximale Objektgröße, die mit Phasenkontrast abgebildet werden kann, ist für die HFPP nicht durch eine scharfe *Cut-on*-Frequenz limitiert.

6.1.4 Kontrastanalyse von experimentellen und simulierten TEM-Abbildungen mit Zach-PP

Die Kontrastformation mit der Zach-PP resultiert aus einer Kombination des graduellen Phasenschiebungsprofils und der Blockade von Elektronen durch den Steg der Zach-PP, was zu einem richtungsabhängigen Kontrast des abgebildeten Objekts führt. Die Kontrastanalyse der Zach-PP-TEM-Abbildungen wird daher in zwei Teilen durchgeführt. Dabei wird zwischen einer parallelen (siehe Abbildung 6.4) und einer senkrechten (siehe Abbildung 6.5) Orientierung der T4 zum Steg der Zach-PP unterschieden, mit der Intention eine Richtungsabhängigkeit des generierten Phasenkontrasts zu untersuchen. Abbildung 6.4 zeigt experimentelle (siehe Abbildung 6.4a,c) und simulierte (siehe Abbildung 6.4b,d) Zach-PP-Abbildungen von einer T4 mit einem DNA-gefüllten Kopf bei $\Delta f = 0$ und mit dem Zach-PP-Steg in paralleler Orientierung zur T4 (siehe eingefügtes REM-Bild in Abbildung 6.4a,b). Der Abstand zwischen dem Zach-PP-Steg und dem NS beträgt etwa 600 nm, was einer Raumfrequenz von $0,019 \text{ nm}^{-1}$ entspricht. Eine Spannung von -1 V an der Zach-PP führt zu einer Phasenschiebung von $-0,5 \pi$ in der Aufnahme in Abbildung 6.4a. Abbildung 6.4c wurde mit einer Spannung von 2 V an der Zach-PP aufgenommen, was in einer Phasenschiebung von $0,25 \pi$ resultiert. Um ein detaillierteres Verständnis der Phasenkontrastformation zu erhalten, sind entsprechende simulierte Bilder, die auf der Objektwellenfunktion in Abbildung 5.2a basieren, in Abbildung 6.4b,d dargestellt. Die Verteilung der Phasenschiebung der Zach-PP wurde analog zu Abbildung 5.2b,c verwendet, wobei gemäß den experimentellen Bedingungen eine Phasenschiebung von $-0,5 \pi$ und $0,25 \pi$ für die NS-Elektronen angenommen wurde. Die experimentellen und simulierten Abbildungen stimmen gut überein. Abbildung 6.4e zeigt Intensitätslinienprofile über den T4-Kopf, die den

experimentellen Abbildungen entnommen wurden (siehe den braunen und blauen Pfeil in Abbildung 6.4a,c). Die entsprechenden Profile der simulierten Bilder werden in Abbildung 6.4f gezeigt. In beiden Diagrammen sind die Abgrenzungen des T4-Kopfes mit schwarzen Linien markiert. Die braunen Intensitätsprofile (Phasenschiebung $-0,5\pi$) weisen zwei scharfe Maxima an den äußereren Abgrenzungen des Kopfes auf, die sich in den Bereich des amorphen Eises erstrecken und als helle Halos in den Abbildungen 6.4a,b auftreten. Demgegenüber ist das blaue Profil (Phasenschiebung $0,25\pi$) invertiert und zeigt zwei scharfe Minima an den Abgrenzungen (siehe dunkle Halos in den Abbildungen 6.4c,d).

Die Bilder und Intensitätsprofile, die mit der Zach-PP in paralleler Orientierung zur T4 erstellt wurden (siehe Abbildung 6.4), ähneln im Wesentlichen den HFPP-Bildern in Abbildung 6.3. So treten Halos an den äußereren Abgrenzungen des T4-Kopfes sowohl in Zach-PP- als auch in HFPP-Abbildungen auf. Der Halo in den Zach-PP-Abbildungen kann dem gaußförmigen Phasenschiebungsprofil der Zach-PP in eine Richtung senkrecht zum Zach-PP-Steg (siehe Abbildung 5.2c, blaue Linie) zugeschrieben werden, das dem Phasenschiebungsprofil der HFPP ähnelt. Im Gegensatz zur HFPP, kann mit der Zach-PP durch Inversion des Vorzeichens ihrer Phasenschiebung eine Intensitätsinversion der Extrema an den Abgrenzungen des Kopfes induziert werden. Weiterhin ähnelt die Kontrastverstärkung im T4-Kopf in den Zach-PP-Bildern auf den ersten Blick der Kontrastverstärkung im HFPP-Bild. Allerdings ist das gaußförmige Phasenschiebungsprofil der Zach-PP vergleichsweise breit gegenüber dem Phasenschiebungsprofil der HFPP mit einer FWHM von $0,015\text{ nm}^{-1}$. Infolgedessen wird in Zach-PP-Abbildungen nicht nur die Phase der NS-Elektronen geschoben, sondern auch die Phase der gestreuten Elektronen in einem bestimmten Raumfrequenzband um den NS. Dies reduziert den Phasenkontrast von großen Strukturen aufgrund der graduellen Abnahme der relativen Phasenschiebung zwischen den ungestreuten und gestreuten Elektronen. Eine spezifische *Cut-on*-Frequenz, die die maximale Objektgröße für die Abbildung mit Phasenkontrast festlegt, kann nicht präzise definiert werden. Im Falle der Zach-PP handelt es sich vielmehr um einen weichen *Cut-on*-Frequenzbereich. Unter Be trachtung eines Phasenschiebungsprofils wie es in 5.2c dargestellt ist, kann der weiche *Cut-on*-Frequenzbereich als ein Raumfrequenzband mit relativen Phasenschiebungen zwischen $0,2\pi$ und $0,4\pi$ in Bezug auf die NS-Elektronen definiert werden [46]. Bei einem Abstand von 600 nm zwischen PP-Steg und dem NS und einer Phasenschiebung von $-0,5\pi$ für die NS-Elektronen, erstreckt sich der weiche *Cut-on*-Frequenzbereich senkrecht zum PP-Steg über Raumfrequenzen zwischen $0,104$ und $0,026\text{ nm}^{-1}$. Dies bedeutet, dass die Abbildung mit Phasenkontrast für periodische oder partikelförmige Objekte mit einer maximalen Periodizität oder Partikelgröße von $38,5\text{ nm}$ möglich ist. Für kleinere Periodizitäten verstärkt sich der Phasenkontrast entsprechend. Demzufolge scheint der T4-Kopf zu groß für die Abbildung mit Phasenkontrast zu sein, sodass der Kontrast des Kopfes von Effekten des Phasenschiebungsprofils parallel zum Zach-PP Steg hervorgerufen werden dürfte, wie es im Kontext mit den Abbildungen 6.5 und 6.6 detailliert diskutiert wird. Tatsächlich kann

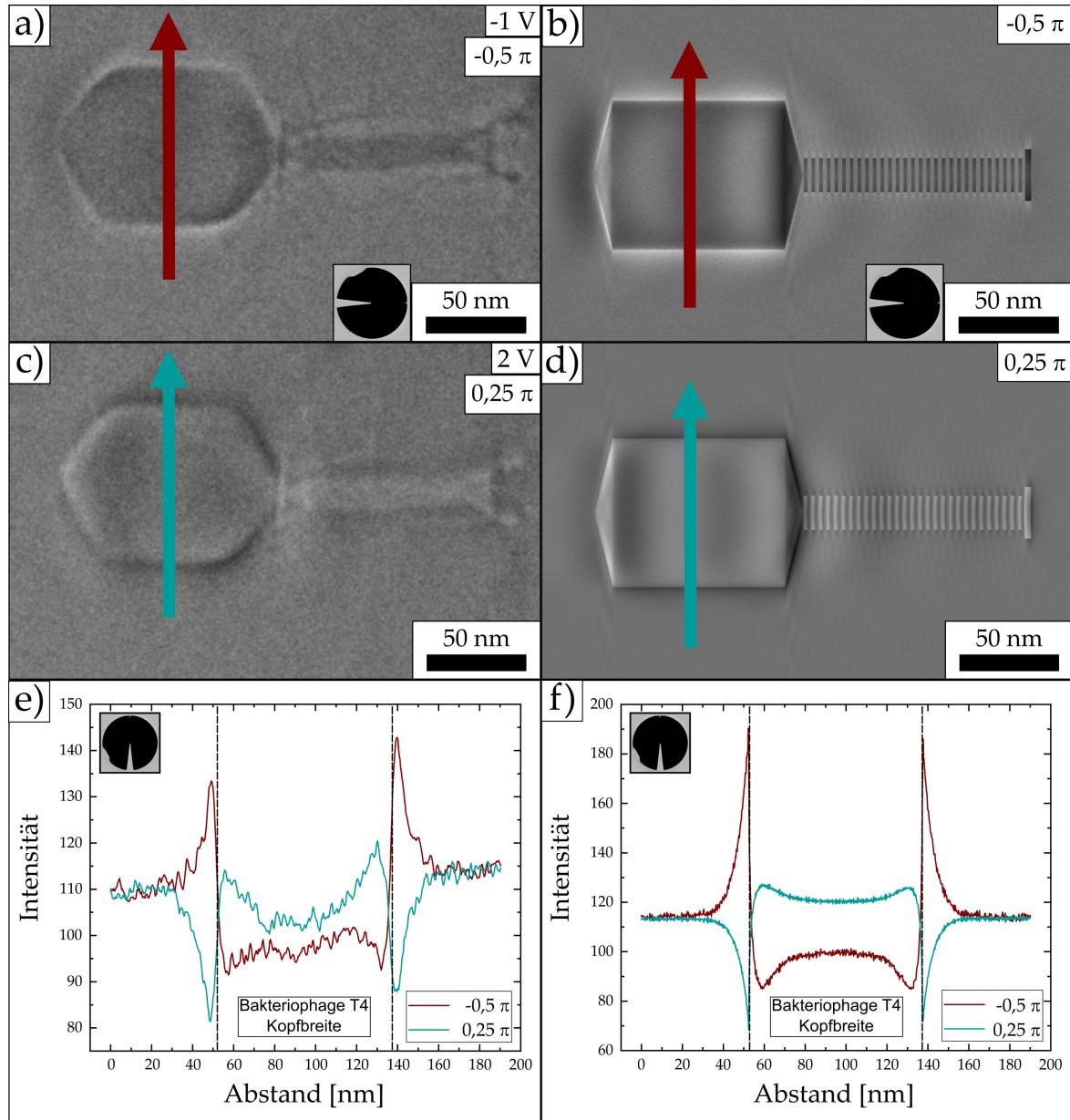


Abbildung 6.4: Kontrastverstärkung durch eine Zach-PP, analysiert durch Intensitätslinienprofile über einen T4-Kopf in experimentellen und simulierten Zach-PP-TEM-Abbildungen für zwei verschiedene Spannungen und mit dem **Zach-PP-Steg in paralleler Orientierung** zur T4 [78]. a) Experimentelle und b) simulierte Zach-PP-TEM-Abbildung mit einer negativen Phasenschiebung von $-0,5\pi$ (-1 V). c) Experimentelle und d) simulierte Zach-PP-TEM-Abbildung mit einer positiven Phasenschiebung von $0,25\pi$ (2 V). Die Orientierung der Zach-PP ist in a) und b) gezeigt. e,f) Linienprofile über den T4-Kopf aus e) der experimentellen Zach-PP-Abbildung in a) und c) werden mit den Linienprofilen über den T4-Kopf aus f) der simulierten Zach-PP-Abbildung in b) und d) verglichen, für Phasenschiebungen von $-0,5\pi$ (braune Linie) und $0,25\pi$ (blaue Linie). Die Elektronendosis betrug etwa $8\text{ e}^-/\text{\AA}^2$.

ein Effekt der Zach-PP bereits in den Abbildungen 6.4a-d an den Intensitätsoszillationen im Kopf in eine Richtung senkrecht zu den braunen und blauen Pfeilen erkannt werden. Abschließend sei erwähnt, dass durch den Zach-PP-Steg selbst hervorgerufene Artefakte für die hier beschriebene Orientierung vernachlässigbar sind, da keine Raumfrequenzen durch den Steg blockiert werden und SSB-Kontrast nicht auftritt.

Die 4 nm Periodizität in den T4-Schwänzen ist deutlich sichtbar in den Simulationen (siehe Abbildungen 6.4b,d) und tritt mit dunklem Kontrast für negative Phasenschiebung ($-0,5\pi$) und hellem Kontrast für positive Phasenschiebung ($0,25\pi$) auf. Für die Raumfrequenzen des Schwanzes, wie sie durch die grünen gepunkteten Linien in Abbildung 5.2c eingezeichnet sind, ist ein starker Phasenkontrast zu erwarten. In den experimentellen Bildern (siehe Abbildungen 6.4a,c) ist die 4 nm Periodizität hingegen nicht erkennbar, was durch eine leicht verkippte Orientierung des Schwanzes gegenüber des einfallenden Elektronenstrahls erklärt werden kann.

Im Folgenden wird auf den Phasenkontrast und Artefakte eingegangen, die im Zusammenhang mit der Präsenz des Zach-PP-Steges in der BFP stehen. Zu diesem Zweck werden in Abbildung 6.5 experimentelle und simulierte Bilder einer Zach-PP-Spannungsserie bei $\Delta f = 0$ gezeigt. Der Zach-PP-Steg ist für alle Bilder in Abbildung 6.5 senkrecht zur T4 orientiert (siehe eingefügtes REM-Bild in Abbildung 6.5a,b). In den Simulationen wird nur die T4 im rechten Teil des Bildes betrachtet (siehe Abbildung 6.5b,d,f,h). Abbildung 6.5a repräsentiert eine Aufnahme ohne angelegte Spannung an der Zach-PP. Wie in Zusammenhang mit Abbildung 6.2c beschrieben, kann eine kleine negative Phasenschiebung von $-0,24\pi$ gemessen werden, die aus einer unvermeidbaren Aufladung des isolierenden Materials im Zach-PP-Steg resultiert. In Abbildung 6.5a können Intensitätsvariationen mit dunklem Kontrast (schwarze Pfeile) und hellem Kontrast (weiße Pfeile) in einem Bereich etwas außerhalb der T4-Köpfe beobachtet werden, die durch das simulierte Bild in Abbildung 6.5b gut reproduziert werden. Abbildung 6.5c wurde bei einer Spannung von 1 V an der Zach-PP aufgenommen, was in einer Phasenschiebung von 0π resultiert. Wie bereits erwähnt, wird die negative Aufladung des isolierenden Materials in der Zach-PP durch die positive Spannung kompensiert. Durch die Gesamtphasenschiebung von 0π ist das Bild in Abbildung 6.5 besonders interessant für die Analyse von möglichen Artefakten, die durch den Zach-PP-Steg selbst hervorgerufen werden. Auch in diesem Fall stimmt das simulierte Bild in Abbildung 6.5d gut mit dem experimentell erstellten Bild überein.

Genaue Kontrastdetails lassen sich deutlicher in Intensitätslinienprofilen über die T4-Köpfe visualisieren (rote Pfeile in Abbildung 6.5a,b und blaue Pfeile in 6.5c,d). Abbildung 6.6a beinhaltet experimentelle Intensitätslinienprofile aus den experimentellen Bildern in 6.5a,c für eine Phasenschiebung von $-0,24\pi$ (rote Linie) und 0π (blaue Linie). Die simulierten Profile in Abbildung 6.6b aus den simulierten Bildern in Abbildung 6.5b,d stimmen gut mit den experimentellen Profilen überein. Ausgeprägte Intensitätsextrema in den Linienprofilen sind durch nummerierte grau gepunktete Linien markiert. Die Intensitätsmerkmale in

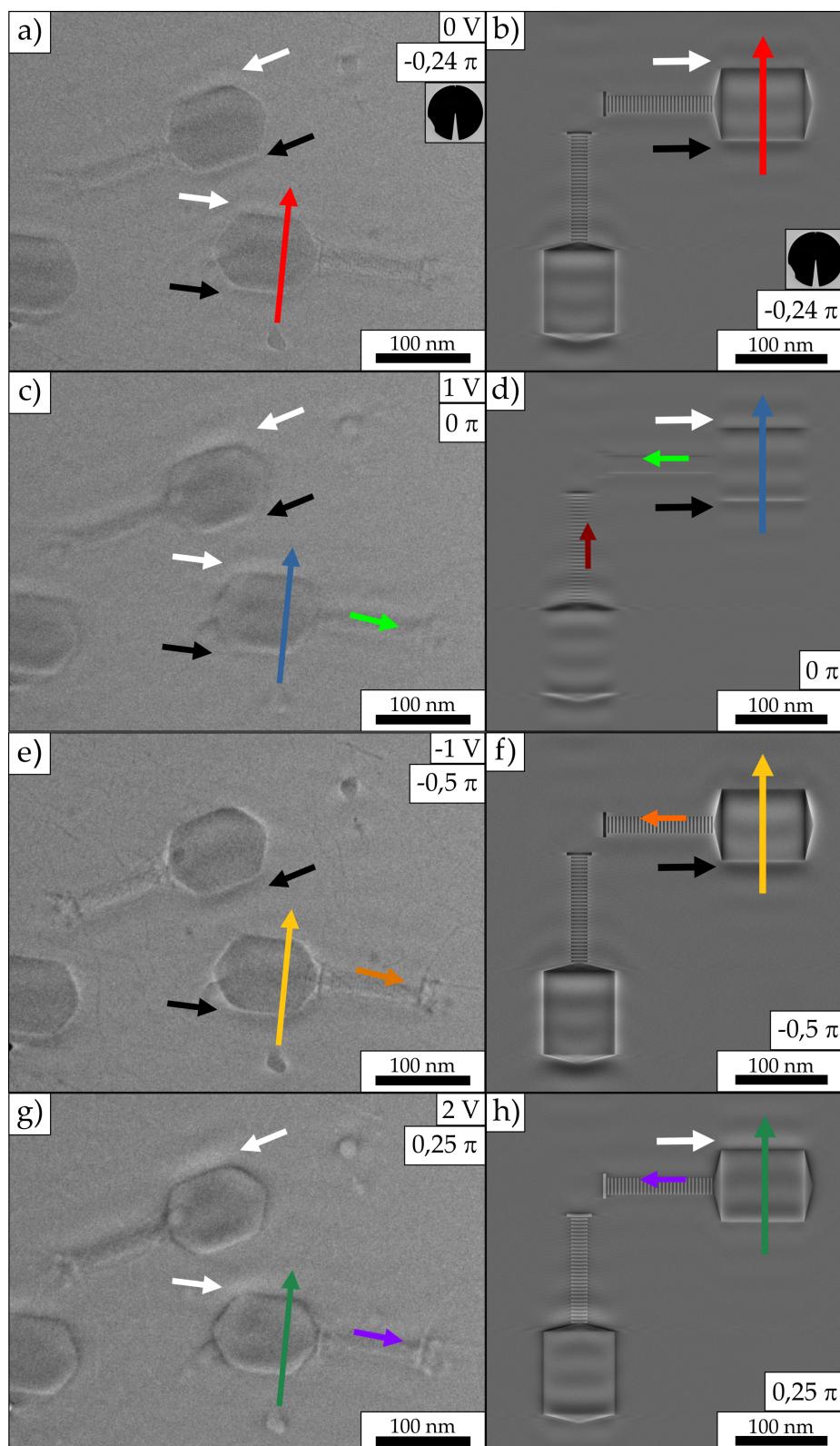


Abbildung 6.5: Experimentelle und simulierte Zach-PP-TEM-Abbildungen von in Eis eingebetteten T4 für verschiedene Spannungen und dem Zach-PP-Steg in senkrechter Orientierung zur T4, wie es in a,b) markiert ist [78]. a,b) Experimentelle und simulierte Zach-PP-TEM-Abbildungen für eine Spannung von 0 V ($-0,24 \pi$), c,d) 1 V (0π), e,f) -1 V ($-0,5 \pi$) und g,h) 2 V ($0,25 \pi$). Die Elektronendosis betrug etwa $8 e^-/\text{\AA}^2$.

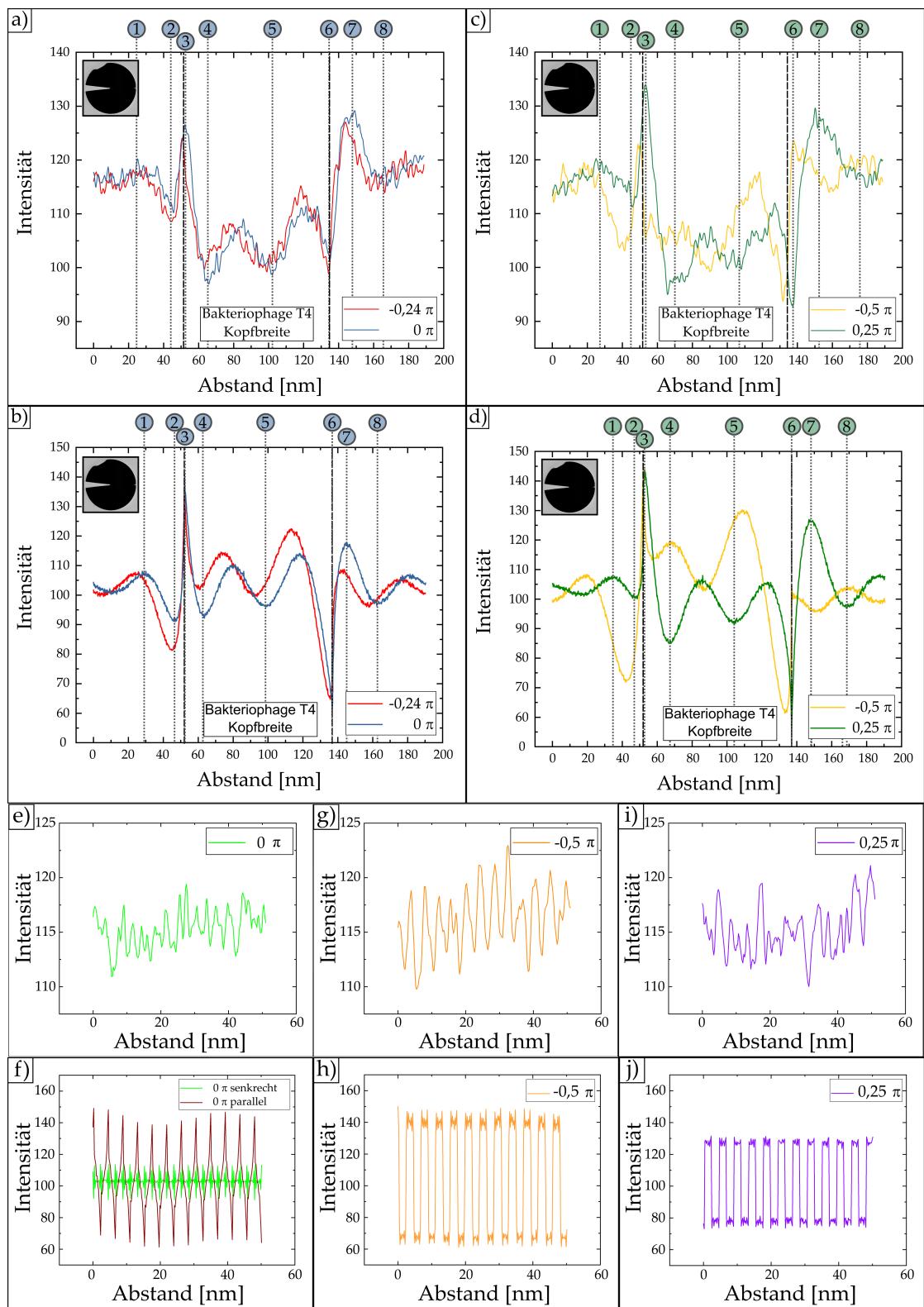


Abbildung 6.6

Abbildung 6.6: Kontrastverstärkung in Zach-PP-TEM-Aufnahmen eines T4-Kopfes und T4-Schwanzes mit dem Zach-PP-Steg in senkrechter Orientierung zu der T4, visualisiert durch Intensitätslinienprofile, die den experimentellen und simulierten Bildern in Abbildung 6.5 entnommen wurden [78]. a) Linienprofile über den T4-Kopf aus den experimentellen Zach-PP-Abbildungen (siehe rote und blaue Pfeile in Abbildung 6.5a,c) und b) Linienprofile aus den simulierten Zach-PP-Abbildungen (siehe rote und blaue Pfeile in Abbildung 6.5b,d) mit einer Phasenschiebung von $0,24\pi$ (rote Linien) und 0π (blaue Linien). c) Linienprofile über den T4-Kopf aus den experimentellen Zach-PP-Abbildungen (siehe gelbe und grüne Pfeile in Abbildung 6.5e,g) und d) Linienprofile aus den simulierten Zach-PP-Abbildungen (siehe gelbe und grüne Pfeile in Abbildung 6.5f,h) mit einer Phasenschiebung von $-0,5\pi$ (gelbe Linien) und $0,25\pi$ (grüne Linien). Die Orientierung der Zach-PP ist in a-d) angegeben. e,f) Intensitätslinienprofile des T4-Schwanzes mit einer Phasenschiebung von 0π von den experimentellen und simulierten Bildern in Abbildung 6.5c,d (grüne Pfeile). g,h) Intensitätslinienprofile des T4-Schwanzes mit einer Phasenschiebung von $-0,5\pi$ von den experimentellen und simulierten Bildern in Abbildung 6.5e,f (orangene Pfeile) und i,j) Intensitätslinienprofile des T4-Schwanzes mit einer Phasenschiebung von $0,25\pi$ von den experimentellen und simulierten Bildern in Abbildung 6.5g,h (lila Pfeile). Das braune Linienprofil in f) gehört zum braunen Pfeil in Abbildung 6.5d, mit dem Zach-PP-Steg in paralleler Orientierung zum T4-Schwanz.

den blauen Profilen (0π Phasenschiebung) in den Abbildungen 6.6a,b offenbaren Artefakte, die durch die Präsenz des Zach-PP-Steges entstehen. Markierung 2 in Abbildung 6.6a,b spiegelt den dunklen Kontrast in der Nähe der unteren Abgrenzung des T4-Kopfes (siehe schwarze Pfeile in Abbildung 6.5a-d) wieder, auf welchen ein scharfes Maximum folgt (Markierung 3). Der Kontrast ist invertiert auf der gegenüberliegenden Seite des T4-Kopfes, wo ein scharfes Minimum (Markierung 6) an der oberen Abgrenzung des Kopfes von einem breiten Intensitätsmaximum (Markierung 7) gefolgt ist (weiße Pfeile in Abbildung 6.5a-d). Es ist anzumerken, dass die Kontrastinversion der Extrema an den Kopf-Abgrenzungen bei den Bildern in Abbildung 6.4a,c mit dem Zach-PP-Steg in paralleler Orientierung zu der T4 nicht auftritt. Die Kontrastinversion der Extrema kann SSB-Kontrast zugeordnet werden, da das Raumfrequenzspektrum der Kopfabgrenzungen durch den Zach-PP-Steg unterbrochen wird. Innerhalb der Köpfe können Intensitätsoszillationen mit einer Periodizität von etwa 38 nm (Markierung 4 und 5 in Abbildung 6.6a,b) beobachtet werden, die sich auch in das angrenzende Eis, mit abnehmender Intensität (Markierung 1 und 8) und in Richtung des PP-Steges, ausbreiten. Diese Periodizität korreliert mit dem Abstand zwischen der Spitze des PP-Steges und dem NS in der BFP (etwa $850\text{ nm}/0,027\text{ nm}^{-1}$, passend zu einer Periodizität von etwa 37 nm). Die leichte Verschiebung der Oszillationen in den roten und blauen Profilen wird durch die Phasenschiebungsdifferenz von $0,24\pi$ zwischen den beiden Abbildungen hervorgerufen. Darüber hinaus zeigen die Simulationen, dass sich die scharfen Extrema exakt an den Abgrenzungen des Kopfes befinden (siehe die schwarz gestrichelten Linien in Abbildung 6.6a,b).

Experimentelle und simulierte Bilder für eine Phasenschiebung von $-0,5\pi$ (-1 V an der Zach-

PP) werden in den Abbildungen 6.5e,f gezeigt und für eine Phasenschiebung von $0,25\pi$ (2 V an der Zach-PP) in den Abbildungen 6.5g,h. Intensitätslinienprofile über den T4-Kopf aus den experimentellen Bildern (siehe gelbe und grüne Pfeile in Abbildung 6.5e,g) werden in Abbildung 6.6c gezeigt, für eine Phasenschiebung von $-0,5\pi$ (gelbe Linie) und für eine Phasenschiebung von $0,25\pi$ (grüne Linie). Die simulierten Linienprofile in Abbildung 6.6d von den Bildern in Abbildung 6.5f,h reproduzieren die experimentellen Daten gut. Die Merkmale in diesen Profilen stimmen generell mit den Merkmalen der Linienprofile in Abbildung 6.5a,b überein. Scharfe Intensitätsextrema treten an den gegenüberliegenden Abgrenzungen des Kopfes auf (Markierung 3 und 6). Die oszillierende Intensität mit einer Periodizität von 38 nm innerhalb des Kopfes und im umgebenden Eis tritt ebenfalls, obgleich nur mit geringer Intensität, in Abbildung 6.5e auf, die unter optimalen Bedingungen für die Phasenschiebung ($-0,5\pi$) aufgenommen wurde. Die Extrema der 38 nm Periodizität verschieben sich aufgrund des Vorzeichenwechsels der Phasenschiebung in entgegengesetzte Richtungen. Für die große Differenz der Phasenschiebungen von $0,75\pi$ resultiert das nahezu in einer Inversion der gelben und grünen Profile. Die große Differenz der Phasenschiebungen in Kombination mit den scharfen Kontrastmerkmalen an den Abgrenzungen des Kopfes, beeinflusst die Intensität der Extrema. Beispielsweise verschwindet das Intensitätsminimum bei Markierung 2 in den grünen Profilen beinahe vollständig, während das Maximum bei Markierung 7 intensiver wird (siehe die weißen Pfeile in Abbildung 6.5g,h). Der entgegengesetzte Effekt kann für die gelben Profile beobachtet werden, welche ein ausgeprägtes Minimum bei Markierung 2 und ein schwaches Maximum bei Markierung 7 aufweisen (siehe die schwarzen Pfeile in Abbildung 6.5e,f).

Es ist anzumerken, dass für Boersch-PP-TEM-Abbildungen numerische Methoden für die Rekonstruktion von Amplitudeninformationen, die teilweise von der die Elektrode führenden PP-Struktur blockiert werden, existieren [65, 66] und auch für Zach-PP-TEM-Abbildungen von WPO anwendbar sind. Mit dieser Technik könnten Artefakte durch den Zach-PP-Steg reduziert werden und SSB-Kontrast zu *full-sideband*-Kontrast wiederhergestellt werden.

Die Intensität innerhalb des T4-Kopfes ist hauptsächlich durch die 38 nm Periodizität bestimmt, da Objekte mit einer Größe von 85 nm ($0,012 \text{ nm}^{-1}$) erwartungsgemäß keine signifikante Phasenschiebung erfahren. Nach Abbildung 5.2c tritt für strukturelle Merkmale mit dieser Raumfrequenz (gelbe gepunktete Linie) nur eine kleine Phasenänderung in Relation zu den NS-Elektronen auf. Dessen ungeachtet konnte in dieser Arbeit der Raumfrequenzbereich, der mit Phasenkontrast abgebildet werden kann, um einen Faktor von etwa 3 in Richtung kleinere Raumfrequenzen ausgeweitet werden, da die Zach-PP in einer vergrößerten BFP positioniert wurde. Für einen Abstand von 850 nm zwischen PP-Steg und NS sowie für eine Phasenschiebung von $-0,5\pi$ für die NS-Elektronen, deckt der weiche *Cut-on*-Frequenzbereich des Phasenschiebungsprofils parallel zum PP-Steg Raumfrequenzen zwischen $0,129$ und $0,025 \text{ nm}^{-1}$ ab, was einer Objektgröße von 7,8 bis 40 nm entspricht.

Es verbleibt die Betrachtung des Kontrastes der 4 nm Periodizität im Schwanz der T4 unter Berücksichtigung der Intensitätslinienprofile in Abbildung 6.6e-j. Die 4 nm Periodizität des Schwanzes ist nicht nachteilig vom gegebenen *Cut-on*-Frequenzbereich betroffen. Die Periodizität des Schwanzes ist in den experimentellen Profilen in Abbildung 6.6e fast nicht zu erkennen, wie es für eine Phasenschiebung von 0π zu erwarten ist (grüner Pfeil in Abbildung 6.5c). Abbildung 6.6f beinhaltet Linienprofile aus dem simulierten Bild in Abbildung 6.5d mit dem T4-Schwanz in einer Orientierung senkrecht (grüner Pfeil) und parallel (brauner Pfeil) zum Zach-PP-Steg. Die braune Linie in Abbildung 6.6f zeigt einen ausgeprägten Kontrast des Schwanzes, obwohl keine Phasenschiebung vorliegt. Dies kann SSB-Kontrast zugeordnet werden, da die Raumfrequenz der 4 nm Periodizität im Schwanz durch den PP-Steg blockiert wird. Dahingegen ist für das grüne Profil kein Phasenkontrast im Schwanz erkennbar, was sich mit den experimentellen Daten deckt. Die experimentellen und simulierten Profile in Abbildung 6.6g,h, die aus Abbildung 6.5e,f (orangene Pfeile) extrahiert wurden, zeigen wie zu erwarten für eine Phasenschiebung von $-0,5\pi$ einen ausgeprägten Kontrast für den Schwanz. Zudem fällt der Kontrast des Schwanzes für die positive Phasenschiebung mit dem etwas geringeren Betrag von $0,25\pi$ (siehe Abbildung 6.6i,j) erwartungsgemäß etwas schwächer aus. Die experimentellen Profile zeigen generell einen schwächeren Kontrast im Vergleich zu den Simulationen, was einem geringen Signal-Rausch-Verhältnis und einer eventuell ungünstigen Ausrichtung der 4 nm Schwanzstrukturen gegenüber des einfallenden Elektronenstrahls zugeschrieben werden kann. Der Kontrast von kleinskaligen Periodizitäten profitiert von SSB-Kontrast, wenn die entsprechenden strukturellen Merkmale parallel zum Zach-PP-Steg orientiert sind. Es ist außerdem zu bemerken, dass das simulierte Intensitätslinienprofil des Schwanzes im Falle von SSB-Kontrast (braune Linie in Abbildung 6.6f) scharfe Maxima zeigt, während echter Phasenkontrast zu einem rechteckigen Muster führt, wie es durch die modellierte Objektwellenfunktion gegeben ist. Diese Beobachtungen demonstrieren eine ausgeprägte Kontrastverstärkung von kleinen Strukturen wie etwa der 4 nm Periodizität im T4-Schwanz, wenn die Phasenschiebung der Zach-PP auf den optimalen Wert eingestellt wird.

6.2 Kryo-Elektronentomografie von Bakteriophagen T4 mit Zach-PP und HFPP

Der Vorteil der Kontraststeigerung von PP in elektronentomografischen Rekonstruktionen einer T4-Probe wird in Abbildung 6.7 und 6.8 demonstriert. Tomografische Kippserien wurden bei $\Delta f \approx 0$ mit einer HFPP (Phasenschiebung $-0,7\pi$) und einer Zach-PP (Phasenschiebung $-0,5\pi$) aufgenommen. Beide tomografischen Kippserien über einen Winkel von 120° wurden mit Energiefilterung (Schlitzbreite 20 eV) und einer Gesamtelektronendosis von et-

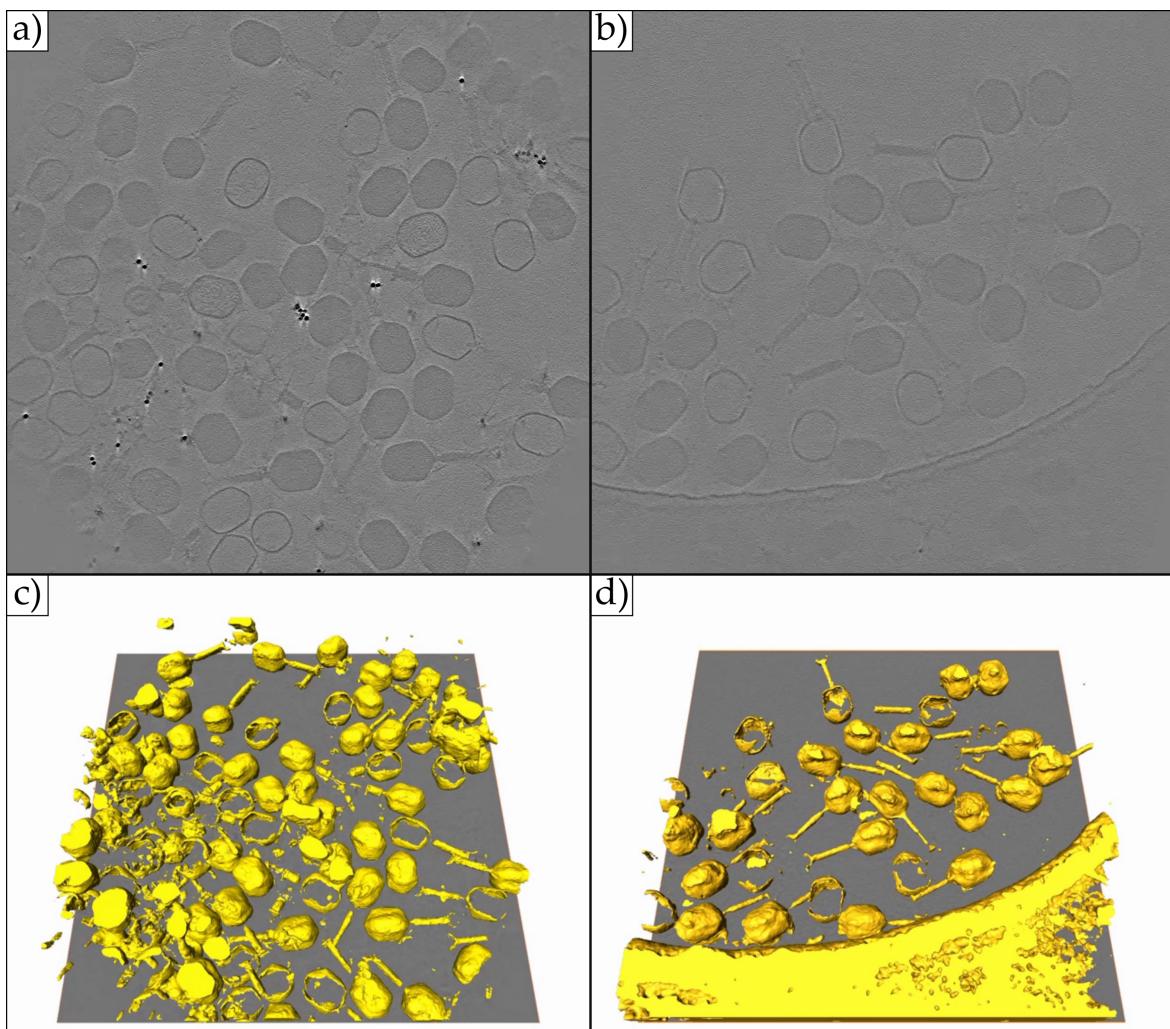


Abbildung 6.7: Einzelne Schnitte eines Elektronentomogramms und dreidimensionale Segmentierung einer T4-Probe, aufgenommen mit einer a,c) HFPP und b,d) einer Zach-PP bei $\Delta f \approx 0$ und mit Energiefilter (totale Elektronendosis von etwa $80 e^-/\text{\AA}^2$) [78].

wa $80 e^-/\text{\AA}^2$ aufgenommen. Die Rekonstruktion der Tomogramme wurde mit der IMOD-Software [59] durchgeführt. Für die dreidimensionale Segmentierung wurde das Plug-in „Trainable Weka Segmentation“ für das Programm „Fiji“ [88] verwendet. Die „Avizo“-Software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) wurde für die Visualisierung der Segmentierung und das Erstellen von Videos benutzt, die in der zugehörigen Veröffentlichung eingesehen werden können [78].

Einzelne Schnitte der Tomogramme sind in 6.7a für die HFPP und in 6.7b für die Zach-PP zu sehen. Die Schnitte zeigen für beide PP-Typen deutlichen Kontrast für die in Eis eingebetteten T4. Wie in den zuvor gezeigten einzelnen TEM-Aufnahmen treten T4 mit DNA-gefüllten sowie teilweise entleerten Köpfen auf. In den zugehörigen dreidimensionalen Segmentierungen in Abbildung 6.7c für die HFPP und 6.7d für die Zach-PP treten die DNA-gefüllten

Köpfe als gleichmäßig ausgefüllte Objekte auf, während die Kapside der teilweise entleerten Köpfe nur unvollständig segmentiert werden. Die DNA-gefüllten Köpfe weisen teilweise seitlich eine Ausstülpung auf, die als „*missing wedge*“-Artefakt aufgrund des relativ geringen Kippwinkels von 120° identifiziert werden kann [75].

Die Aufsummierungen von drei Scheiben mit 2 nm Dicke aus einer tomografischen Rekonstruktion einer T4-Probe sind in Abbildung 6.8a (HFPP) und 6.8b (Zach-PP) dargestellt. Die Bearbeitung des Bildes erfolgte mit einem anisotropen Diffusionsfilter [97], um Rauschen ohne den Verlust von signifikanten Bilddetails zu verringern. Beide tomografischen Scheiben zeigen eine T4 mit starkem Kontrast und guter Erkennbarkeit der 4 nm Periodizität im Schwanz. Das HFPP-Tomogramm enthält einen kleinen Teil eines entleerten T4-Kopfes (weißer Pfeil in Abbildung 6.8a) mit starkem Kontrast für das T4-Kapsid. Die DNA-gefüllten T4-Köpfe (ein Beispiel ist mit einem schwarzen Pfeil in Abbildung 6.8a markiert) zeigen gleichmäßigen dunklen Kontrast in ihrem Zentrum und sind vom typischen Halo durch das Phasenprofil der HFPP umgeben. Der entleerte T4-Kopf (weißer Pfeil in Abbildung 6.8b) im Zach-PP-Tomogramm zeigt ebenso starken Kontrast für das Kapsid. Die schwache oszillierende Intensität innerhalb des Kopfes und in den angrenzenden Bereichen des amorphen Eises, die zuvor in den einzelnen Zach-PP-Aufnahmen beobachtet wurden (siehe Abbildung 6.2 und 6.5), sind nicht beobachtbar, da sie durch die tomografische Rekonstruktion unterdrückt werden. Die Minima und Maxima an den Abgrenzungen der Köpfe sind hingegen etwas verstärkt.

Insgesamt sind die tomografischen Kippserien, die mit einer Zach-PP aufgenommen wurden, von ähnlicher Qualität wie die HFPP-Tomogramme. Ein wichtiger Vorteil der Zach-PP bei der Aufnahme von tomografischen Kippserien ist die anpassbare Phasenschiebung. Der Phasenkontrast hängt von der Phasenschiebung ab, die die Objekte in der Probe auf die durchlaufende Elektronenwelle induzieren. Mit zunehmendem Kippwinkel ändert sich die Verteilung der Phasenschiebung durch die Probe aufgrund der geänderten Geometrie und der zunehmenden Pfadlänge der Elektronen durch die Probe. Von daher ist die Anpassbarkeit der Phasenschiebung von Vorteil. Während der Aufnahme der Kippserie wurde die von der Zach-PP induzierte Phasenschiebung durch Überprüfung der Thon-Ringe im Diffraktogramm eines defokussierten *live-view*-Bildes nachjustiert. Ein Nachjustieren ist nicht möglich für die HFPP, was in jedem Fall zu einer Änderung des Phasenkontrasts während der Aufnahme der Kippserie und zu Abweichungen von den optimalen Bedingungen für die Phasenkontrast-Abbildung führt, insbesondere während der Verkippung.

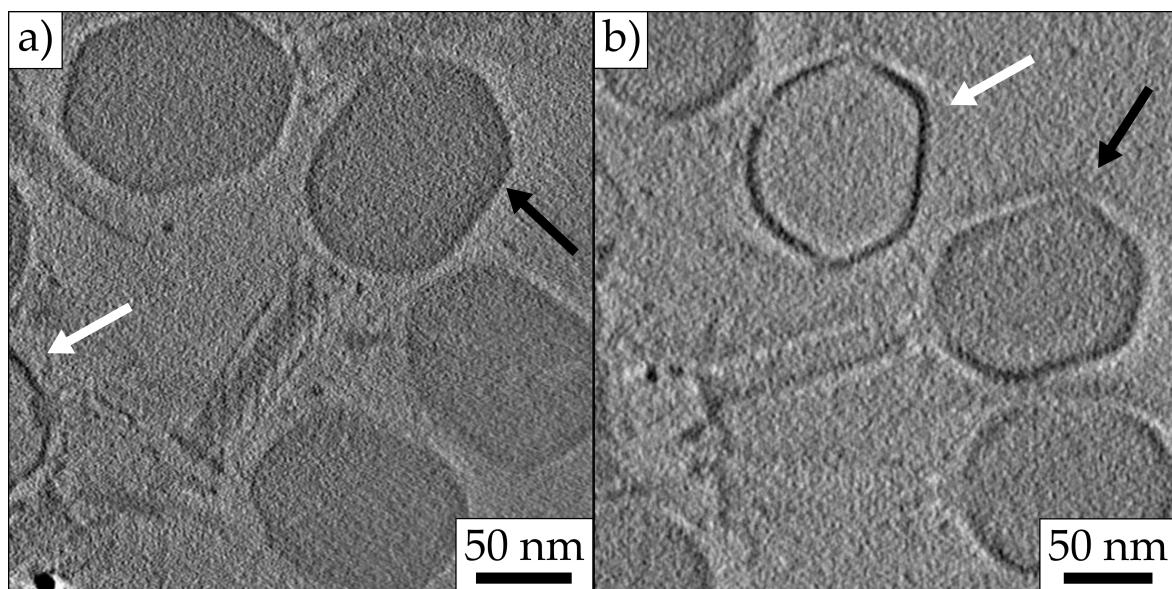


Abbildung 6.8: Einzelne Schnitte eines Elektronentomogramms einer T4, aufgenommen mit einer HFPP und einer Zach-PP bei $\Delta f \approx 0$ und mit Energiefilter (totale Elektronendosis von etwa $80 e^-/\text{\AA}^2$) [78]. Drei aufsummierte 2 nm dicke Scheiben einer elektronentomografischen Rekonstruktion, ermittelt aus einer tomografischen Kippserie unter Verwendung von a) HFPP-TEM und b) Zach-PP-TEM.

7

Kapitel 7

Experimentelle und simulierte Abbildung materialwissenschaftlicher Proben mit Zernike-PP mit gradiertem Lochrand

In diesem Kapitel werden TEM-Experimente mit Zernike-PP vorgestellt, bei denen ein Dickengradient an der Lochkante strukturiert wurde. Ein Vergleich mit konventionellen Zernike-PP wird hergestellt, um den Einfluss des Dickengradienten und des damit einhergehenden glatten Phasenschiebungaprofils auf die Entstehung von Fringing zu untersuchen. Das Kapitel ist in drei Abschnitte unterteilt. In Abschnitt 7.1 wird die Auswirkung von dickengraduierten Zernike-PP auf Fringing an einer Grenzfläche zwischen aC und Vakuum untersucht. Abschnitt 7.2 konzentriert sich auf die Abbildung von CNT-Bündeln als ein Beispiel für nanoskalige Objekte und die Analyse des Effekts von konventionellen und dickengraduierten Zernike-PP auf TEM-Abbildungen mit Phasenkontrast.

7.1 Kontrastanalyse von Fringing in TEM-Abbildungen mit dickengradierten Zernike-PP von einer aC/Vakuum-Grenzfläche

Zur Analyse von *Fringing* wird ein einfaches Testobjekt in Form eines herkömmlichen löchrigen aC-Films auf einem TEM-Netz verwendet. Bei geeigneter Vergrößerung wird ein Loch im aC-Film ausgewählt, um die Entstehung und Ausbreitung der Intensitätsoszillationen (*Fringing*) an der Grenzfläche zwischen dem aC-Film und Vakuum zu untersuchen. Abbildung 7.1 zeigt einen Vergleich von Phasenkontrast-TEM-Aufnahmen, die bei $\Delta f \approx 0$ aufgenommen wurden, unter Verwendung einer konventionellen Zernike-PP mit einem Lochradius von 375 nm in Abbildung 7.1a und einer dickengradierten Zernike-PP mit einem inneren Lochradius von 375 nm und einem äußeren Lochradius von 500 nm (375/500 nm, dazwischen befindet sich der Dickengradient) in Abbildung 7.1b. Starke Intensitätsoszillationen, die von der Kante des aC-Films ausgehen, sind in Abbildung 7.1a zu beobachten. Abbildung 7.1c zeigt Intensitätslinienprofile entlang des roten Pfeils in Abbildung 7.1a, die an der gleichen Stelle aus Aufnahmen bei drei verschiedenen Defokuswerten entnommen wurden. Um das experimentelle Rauschen in den Linienprofilen zu reduzieren, wurden diese typischerweise über eine Breite von 24 nm gemittelt. Weiterhin wurden alle in diesem Kapitel gezeigten Linienprofile auf die mittlere Vakuumintensität in den Abbildungen normiert. Die genaue Position der Grenzfläche ist mit einer schwarzen Linie markiert. Das rote Profil aus der Aufnahme bei $\Delta f \approx 0$ verdeutlicht eine asymmetrische Ausbreitung des *Fringing*, ausgehend von der Grenzfläche, in die aC- und Vakumbereiche. Das Profil zeigt deutlich sieben Maxima im Vakumbereich und fünf Minima im aC-Film, deren Intensitäten mit zunehmender Entfernung von der Filmkante abnehmen. Die Abstände zwischen einzelnen Maxima oder Minima beträgt etwa 11,5 nm, was einer Raumfrequenz von $0,087 \text{ nm}^{-1}$ entspricht. Errechnet man die *Cut-on*-Frequenz der verwendeten Zernike-PP mit Gleichung 2.23 aus ihrem 350 nm Lochradius, ergibt sich diese zu $0,088 \text{ nm}^{-1}$. Aus der nahezu vollständigen Übereinstimmung der *Cut-on*-Frequenz und der Raumfrequenz der Periodizität des beobachteten *Fringing* lässt sich schließen, dass die auftretenden Intensitätsoszillationen durch die abrupte Kante des Zernike-PP-Loches in der BFP und dem damit einhergehenden Sprung im Zernike-PP-Phasenschiebungsprofil verursacht werden. Die gelben und blauen Intensitätsprofile, die bei Defokuswerten von $\Delta f = -200 \text{ nm}$ (gelb) und $\Delta f = -500 \text{ nm}$ (blau) erstellt wurden, zeigen kaum Unterschiede zum roten Profil ($\Delta f = 0 \text{ nm}$). Dies deutet darauf hin, dass die typischen Fresnel-Säume an den Objekträndern in defokussierten TEM-Aufnahmen von den Intensitätsoszillationen durch die Zernike-PP überlagert werden. Zumaldest für kleine Defokuswerte unterhalb von -500 nm heben sich die Fresnel-Säume nicht von den Zernike-PP-*Fringes* ab. Zur Bestätigung dieser Beobachtung, können die Bildsimulationen im Anhang A.4 herangezogen werden.

Intensitätsoszillationen können ebenso in der Phasenkontrast-TEM-Aufnahme ($\Delta f \approx 0$) in Abbildung 7.1b beobachtet werden, welche mit einer dickengraduierten Zernike-PP aufgenommen wurde. Es fällt jedoch auf, dass die Intensitätsoszillationen mit zunehmendem Abstand von der Grenzfläche schneller abfallen als in Abbildung 7.1a. Dieser Effekt kann dem Dickengradienten der graduierten Zernike-PP zugeschrieben werden und ist auch anhand des roten Intensitätsprofiles in Abbildung 7.1d ($\Delta f \approx 0$) belegt, das entlang des roten Pfeiles in Abbildung 7.1 entnommen wurde. Das Profil zeigt nur vier Intensitätsmaxima im Vakuumbereich und drei Intensitätsminima im aC-Film. Die Intensitätsprofile für die Defokuswerte $\Delta f = -200$ nm (gelb) und $\Delta f = -500$ nm (blau) unterscheiden sich nicht nennenswert vom roten Profil.

Auf der modellierten Objektwellenfunktion der aC/Vakuum-Grenzfläche (siehe Abbildung 5.3a) basierende Bildsimulationen sind in Abbildung 7.1e,f dargestellt ($\Delta f \approx 0$). Für die Modellierung der Objektwellenfunktion wurde die Dicke des aC-Films der Testprobe anhand der Intensitäten einer HAADF-STEM-Aufnahme ermittelt (siehe Abschnitt A.3). In vergleichbarer Weise wurden die Dickenprofile der Zernike-PP mit dickengraduiertem Rand in Abschnitt 4.3.2 bestimmt, die dann in Abschnitt 5.2.2 in experimentelle Phasenschiebungsverteilungen für die Bildsimulation umgerechnet wurden. Das simulierte Bild für eine konventionelle Zernike-PP mit einem Lochradius von 375 nm in Abbildung 7.1e zeigt starkes *Fringing*, während ein schnellerer Abfall der Intensitätsoszillationen in dem simulierten Bild mit einer dickengraduierten Zernike-PP mit einem Lochradius von 375/500 nm in Abbildung 7.1f zu sehen ist. Intensitätslinienprofile entlang des roten Pfeils in Abbildung 7.1e,f sind in Abbildung 7.1g,h dargestellt (rote Kurve für $\Delta f \approx 0$ nm, gelbe und blaue Kurve für $\Delta f \approx -200$ nm und $\Delta f \approx -500$ nm) und stimmen gut mit den experimentellen Intensitätsprofilen in Abbildung 7.1c,d überein. Diskrepanzen zwischen den normierten experimentellen und simulierten Intensitäten in den Linienprofilen können Abweichungen bei der Berechnung der Streuung in den aC-Filmen der Zernike-PP zugeschrieben werden. Eine Reduzierung der Intensitätsoszillationen durch eine Zernike-PP mit einem Lochradius von 375/500 nm ist erkennbar, führt aber nicht zum vollständigen Verschwinden des *Fringing*, da der Dickenanstieg mit einem Gradienten von 0,128 immer noch sehr ausgeprägt ist. Der Dickengradient errechnet sich aus dem Quotienten des Dickenanstiegs und der Breite des Dickengradienten, über die sich der Dickenanstieg erstreckt (siehe Abschnitt 4.3.2). Des Weiteren ist immer noch eine abrupte Stufe von etwa 11 nm beim inneren Radius des Zernike-PP-Loches im Dickenprofil (siehe Abbildung 4.18g) zu sehen, die zur Entstehung von *Fringing* beiträgt.

In Abbildung 7.2 wird der gleiche Ansatz wie in Abbildung 7.1 angewandt, um die Entstehung von *Fringing* durch eine konventionelle und zwei dickengraduierte Zernike-PP mit etwas größeren Lochradien und kleineren Dickengradienten, die sich über einen wesentlich breiteren Bereich erstrecken, zu analysieren. Abbildung 7.2a-c zeigt Phasenkontrast-TEM-Abbildungen bei $\Delta f \approx 0$ nm mit einer konventionellen Zernike-PP mit einem Lochradius

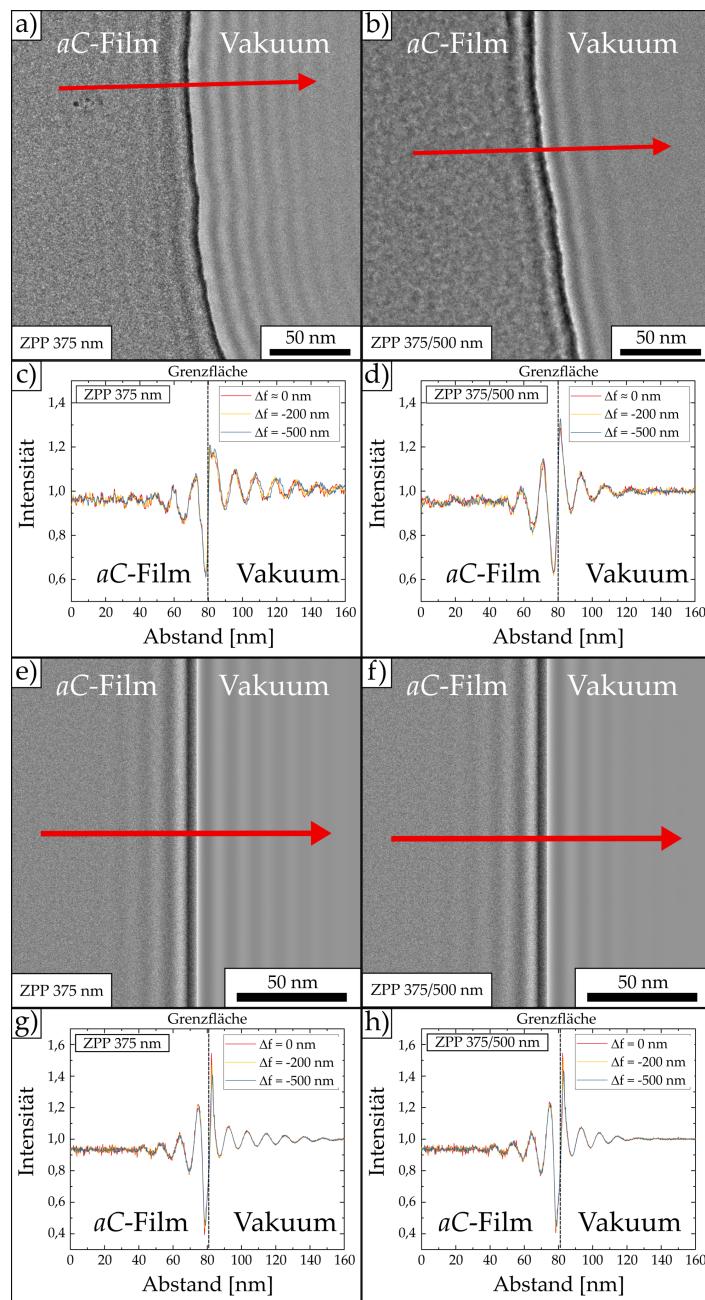


Abbildung 7.1: Experimentelle und simulierte Zernike-PP-TEM-Abbildung einer aC-Film/Vakuum-Grenzfläche und zugehörige Intensitätslinienprofile. a,b) Experimentelle Zernike-PP-TEM-Abbildungen bei $\Delta f \approx 0 \text{ nm}$ mit a) einer konventionellen Zernike-PP mit einem Lochradius von 375 nm und b) einer dickengradienten Zernike-PP mit einem Lochradius von 375/500 nm. c,d) Intensitätslinienprofile entlang des roten Pfeiles in den zugehörigen experimentellen TEM-Abbildungen a,b). e,f) Simulierte Zernike-PP-TEM-Abbildungen bei $\Delta f = 0 \text{ nm}$ mit e) einer konventionellen Zernike-PP mit einem Lochradius von 375 nm und f) einer dickengradienten Zernike-PP mit einem Lochradius von 375/500 nm. g,h) Intensitätslinienprofile entlang des roten Pfeiles in den zugehörigen simulierten TEM-Abbildungen e,f). Die gelben und blauen Intensitätslinienprofile in c,d) und g,h) stammen aus dem gleichen Probenbereich in PP-TEM-Abbildungen bei $\Delta f = -200 \text{ nm}$ und $\Delta f = -500 \text{ nm}$. Die Intensitätsprofile sind auf die mittlere Vakuumintensität normiert.

von $0,5\text{ }\mu\text{m}$ (siehe Abbildung 7.2a), einer dickengraduierten Zernike-PP mit einem Lochradius von $0,5/1,5\text{ }\mu\text{m}$ (siehe Abbildung 7.2b) und einer dickengraduierten Zernike-PP mit einem Lochradius von $0,6/1,5\text{ }\mu\text{m}$ (siehe Abbildung 7.2c). Abbildung 7.2a zeigt starke Intensitätsoszillationen, die von der aC/Vakuum-Grenzfläche ausgehen. Durch das rote Intensitätsprofil in Abbildung 7.2d, ermittelt entlang des roten Pfeiles in Abbildung 7.2a, kann eine Periodizität der Intensitätsoszillationen von etwa 8 nm ermittelt werden, was einer Raumfrequenz von $0,125\text{ nm}^{-1}$ entspricht und erwartungsgemäß mit der *Cut-on*-Frequenz von $0,117\text{ nm}^{-1}$ der konventionellen Zernike-PP mit einem Lochradius von $0,5\text{ }\mu\text{m}$ korreliert. Die relative Intensität der Intensitätsoszillationen in Abbildung 7.2a,d entspricht derjenigen in Abbildung 7.1a,c und die gleiche Anzahl von Intensitätsmaxima und -minima hebt sich von der Hintergrundintensität ab. Allerdings verkleinern sich die Abstände zwischen den sichtbaren Intensitätsoszillationen bei einer Vergößerung des Lochradius der Zernike-PP von 375 nm auf 500 nm , sodass sich auch die Breite der Bereiche neben der aC/Vakuum-Grenzfläche verkleinert, in denen überhaupt Intensitätsoszillationen zu erkennen sind.

Die Zernike-PP-TEM-Aufnahme in Abbildung 7.2b, die bei $\Delta f \approx 0\text{ nm}$ und mit einer dickengraduierten Zernike-PP mit einem Lochradius von $0,5/1,5\text{ }\mu\text{m}$ aufgenommen wurde, sowie das zugehörige Intensitätslinienprofil in Abbildung 7.2e zeigen eine effiziente Reduktion der Intensitätsoszillationen. Diese wird durch den $1\text{ }\mu\text{m}$ breiten Dickengradienten am Lochrand der Zernike-PP verursacht. Die Intensität des ersten Maximums im Vakumbereich und des ersten Minimums im aC-Film zeigen die gleiche Intensität wie in der konventionellen Zernike-PP-TEM-Aufnahme (siehe Abbildung 7.2a,d), allerdings sind die weiteren Oszillationen stark abgeschwächt. Die Reduzierung der Intensitätsoszillationen ist sogar noch ausgeprägter in der Zernike-PP-TEM-Aufnahme in Abbildung 7.2c und dem zugehörigen Intensitätsprofil in Abbildung 7.2f, welche mit einer dickengraduierten Zernike-PP mit einem Lochradius von $0,6/1,5\text{ }\mu\text{m}$ erstellt wurden. Durch den etwas größeren inneren Lochradius von $0,6\text{ }\mu\text{m}$ ($0,14\text{ nm}^{-1}$) reduzieren sich die Abstände zwischen den Intensitätsoszillationen erwartungsgemäß auf etwa $6,5\text{ nm}$ ($0,15\text{ nm}^{-1}$). Ein weiterer Grund für die etwas bessere Reduktion von Intensitätsoszillationen kann anhand der Dickenprofile in Abbildung 4.18h,i ausfindig gemacht werden. Während das blaue Dickenprofil der Zernike-PP mit einem Lochradius von $0,5/1,5\text{ }\mu\text{m}$ (siehe Abbildung 4.18h) einen leichten Knick am inneren Lochradius aufweist, ist dieser im gelben Dickenprofil der Zernike-PP mit einem Lochradius von $0,6/1,5\text{ }\mu\text{m}$ (siehe Abbildung 4.18i) deutlich schwächer ausgeprägt, was zu einem glatteren Dickengradienten führt. Die gelben und blauen Profile in den Abbildungen 7.2d-f entstammen TEM-Aufnahmen, die zusätzlich zur fokussierten Aufnahme bei einem Defokus von $\Delta f = -200\text{ nm}$ (gelb) und $\Delta f = -500\text{ nm}$ (blau) erstellt wurden. Auch in diesem Fall stimmen die Intensitätsprofile der defokussierten TEM-Aufnahmen im Wesentlichen mit dem Intensitätsprofil (rot) der fokussierten TEM-Aufnahme überein.

Die simulierten Zernike-PP-TEM-Abbildungen und Intensitätslinienprofile stimmen gut mit den experimentellen Daten überein und zeigen stark reduziertes *Fringing* bei der Anwen-

dung der dickengradienten Zernike-PP. Starke Intensitätsoszillationen entstehen für die simulierte Zernike-PP-TEM-Abbildung und die Intensitätsprofile in Abbildung 7.2g,j, die mit einer konventionellen Zernike-PP mit einem Lochradius von $0,5 \mu\text{m}$ erstellt wurden. Die simulierte Zernike-PP-TEM-Abbildung und die Intensitätsprofile mit der dickengradienten Zernike-PP mit dem Lochradius von $0,5/1,5 \mu\text{m}$ in den Abbildungen 7.2h,k zeigen stark abgeschwächtes *Fringing*. Das gilt auch für die Zernike-PP-TEM-Aufnahmen und die Intensitätslinienprofile mit der dickengradienten Zernike-PP mit dem Lochradius von $0,6/1,5 \mu\text{m}$, bei denen ebenfalls die Abstände zwischen den Intensitätsoszillationen aufgrund des etwas größeren inneren Lochradius von $0,6 \mu\text{m}$ entsprechend der experimentellen Beobachtungen leicht abnehmen. Die gemachten Beobachtungen demonstrieren, dass ein sich über eine Breite von $1 \mu\text{m}$ erstreckender Dickengradient die auftretenden Intensitätsoszillationen in Zernike-PP-TEM-Aufnahmen effizient reduziert. Abgesehen von den asymmetrischen Intensitätsoszillationen direkt an der Kante des aC-Films, sind keine Artefakte mehr wahrnehmbar.

Basierend auf diesen Beobachtungen sollte der Dickengradient möglichst flach verlaufen, um den Anstieg des Phasenprofils der Zernike-PP so klein wie möglich zu halten. Es sei jedoch angemerkt, dass zwar ein breiter Dickengradient für die Reduzierung von Artefakten vorzuziehen ist, allerdings ist dabei die Phasenschiebung im Bereich des Gradienten reduziert und führt für Raumfrequenzen in diesem Bereich zu abgeschwächtem Phasenkontrast. Aus diesem Grund kann einer dickengradienten Zernike-PP keine starre *Cut-on*-Frequenz wie bei der konventionellen Zernike-PP zugeordnet werden, sondern vielmehr ein weicher *Cut-on*-Frequenzbereich, vergleichbar mit einer elektrostatischen Zach-PP [46]. Für dickengradienten Zernike-PP mit einem Lochradius von $375/500 \text{ nm}$ liegt der *Cut-on*-Frequenzbereich zwischen $0,088$ und $0,117 \text{ nm}^{-1}$ und für die dickengradienten Zernike-PP mit einem Lochradius von $0,5/1,5 \mu\text{m}$ zwischen $0,117$ und $0,3518 \text{ nm}^{-1}$.

7.2 Kontrastanalyse von Fringing in TEM-Abbildungen mit dickengradienten Zernike-PP von einem CNT-Bündel

In diesem Abschnitt wird eine Anwendung von dickengradienten Zernike-PP für die Phasenkontrast-TEM vorgestellt. Als Testobjekte werden Bündel von einwandigen CNT als ein Beispiel für nanoskalige Objekte verwendet. Die CNT-Bündel (Tōyō Tanso, Osaka, Japan) wurden durch Laserablation hergestellt. Die CNT wachsen dabei ab einer Temperatur von 200°C auf einem *C-Ni*-Katalysator, wenn in der Nähe Graphit durch einen fokussierten Laserstrahl verdampft wird. Die CTEM-Aufnahme ohne PP in Abbildung 7.3a zeigt CNT-Bündel, die auf einem aC-Lochfilm (Plano GmbH, D-Wetzlar; Art.-Nr. S147-2) verstreut

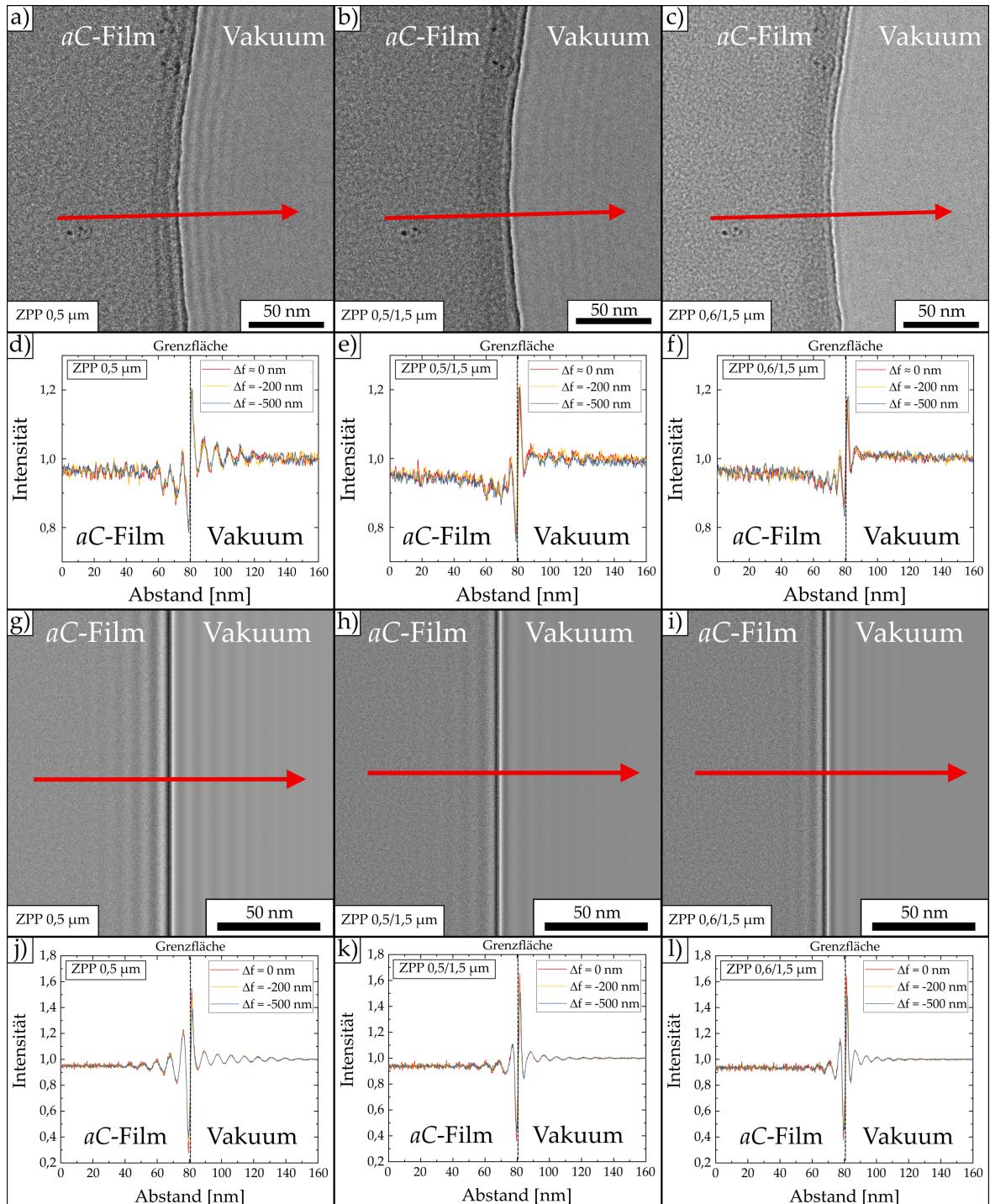


Abbildung 7.2

Abbildung 7.2: Experimentelle und simulierte Zernike-PP-TEM-Abbildung einer aC-Film/Vakuum-Grenzfläche und zugehörige Intensitätslinienprofile. a-c) Experimentelle Zernike-PP-TEM-Abbildungen bei $\Delta f \approx 0 \text{ nm}$ mit a) einer konventionellen Zernike-PP mit einem Lochradius von $0,5 \mu\text{m}$, b) einer dickengraduierten Zernike-PP mit einem Lochradius von $0,5/1,5 \mu\text{m}$ und c) einer dickengraduierten Zernike-PP mit einem Lochradius von $0,6/1,5 \mu\text{m}$. d-f) Intensitätslinienprofile entlang des roten Pfeiles in den zugehörigen experimentellen TEM-Abbildungen a-c). g-i) Simulierte Zernike-PP-TEM-Abbildungen bei $\Delta f = 0 \text{ nm}$ mit g) einer konventionellen Zernike-PP mit einem Lochradius von $0,5 \mu\text{m}$, h) einer dickengraduierten Zernike-PP mit einem Lochradius von $0,5/1,5 \mu\text{m}$ und i) einer dickengraduierten Zernike-PP mit einem Lochradius von $0,6/1,5 \mu\text{m}$. j-l) Intensitätslinienprofile entlang des roten Pfeiles in den zugehörigen simulierten TEM-Abbildungen g-i). Die gelben und blauen Intensitätslinienprofile in d-f) und j-l) stammen aus dem gleichen Probenbereich in PP-TEM-Abbildungen bei $\Delta f = -200 \text{ nm}$ und $\Delta f = -500 \text{ nm}$. Die Intensitätsprofile sind auf die mittlere Vakuumintensität normiert.

wurden. Die CNT ragen dabei unter einem schrägen Winkel in den Vakuumbereich eines Loches. Aus diesem Grund befinden sich die CNT-Bündel auf unterschiedlichen Höhen, was zu einer Änderung des Defokus für die CNT-Bündel in verschiedenen Bereichen der Aufnahme führt. Um gleiche Bedingungen für den Defokus in allen TEM-Aufnahmen zu gewährleisten, wurde zur Einstellung des Defokus das amorphe Material im linken Teil von Abbildung 7.3a und die Thon-Ringe im zugehörigen *live*-Diffraktogramm verwendet. Durch diese Verfahrensweise erscheint das obere CNT-Bündel näherungsweise fokussiert (markiert durch einen schwarzen Pfeil), während ein anderes CNT-Bündel defokussiert ist (markiert durch einen weißen Pfeil). Das obere CNT-Bündel ($\Delta f \approx 0 \text{ nm}$) wird im grünen Rahmen vergrößert dargestellt. Der rote Pfeil in Abbildung 7.3a markiert die Richtung des Intensitätslinienprofils in Abbildung 7.3c, in welchem nur die Konturen des CNT-Bündels zu erkennen sind, während die einzelnen CNT innerhalb des Bündels nicht aufgelöst werden. Intensitätslinienprofile wurden zur Rauschreduzierung über eine Breite von 12 nm gemittelt. Die Einstellung eines Defokus von $\Delta f = -400 \text{ nm}$ (siehe CTEM-Aufnahme in Abbildung 7.3b und Intensitätsprofil in Abbildung 7.3d entlang des blauen Pfeiles in Abbildung 7.3b) führt zu Phasenkontrast und einer klaren Auflösung der einzelnen CNT innerhalb des Bündels. Die einzelnen CNT treten als äquidistante Extrema mit einem Abstand von etwa $1,6 \text{ nm}$ im Intensitätsprofil auf (türkise Striche in Abbildung 7.3d), was gut mit den bereits veröffentlichten Werten für den Durchmesser von CNT [95] übereinstimmt. Durch die Defokussierung entstehen helle Fresnel-Säume an den Rändern des CNT-Bündels (markiert durch schwarze Pfeile in Abbildung 7.3d). Es sei außerdem erwähnt, dass das CNT-Bündel mit einem amorphen Material bedeckt ist, welches aC zugeordnet werden kann und im Intensitätsprofil in Abbildung 7.3d durch graue Balken markiert ist.

Die experimentellen Phasenkontrast-TEM-Aufnahmen in Abbildung 7.4 wurden wie in 7.3a bei $\Delta f \approx 0$ aufgenommen, allerdings unter Verwendung einer konventionellen Zernike-PP mit einem Lochradius von 375 nm in Abbildung 7.4a und einer dickengraduierten Zernike-

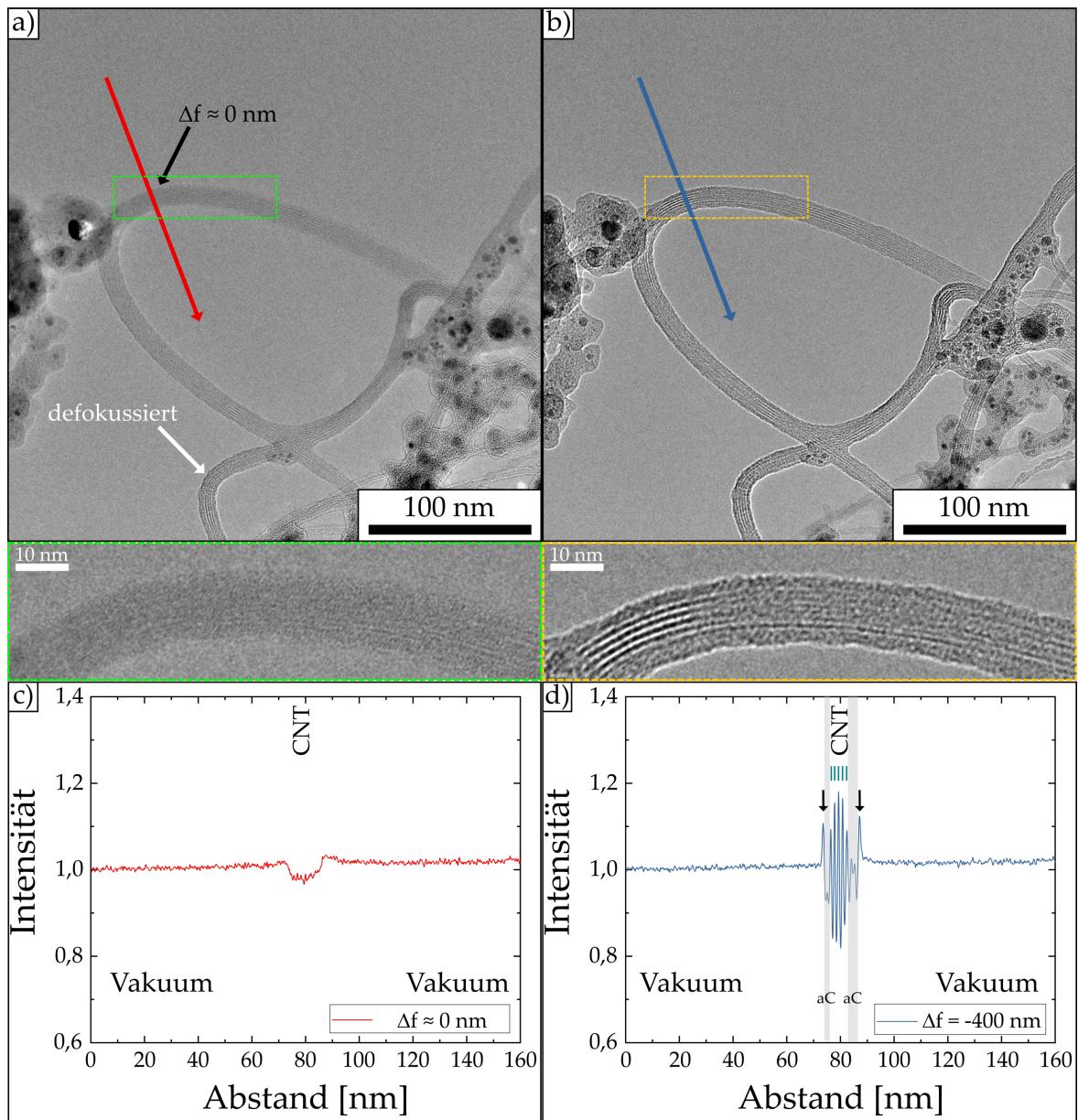


Abbildung 7.3: CTEM-Aufnahme von einem CNT-Bündel ohne PP und Intensitätslinienprofile. a) CTEM-Aufnahme ohne PP und im Fokus für das mit dem schwarzen Pfeil markierte CNT-Bündel. Die CNT-Bündel befinden sich auf unterschiedlichen Höhen und sind dadurch teilweise defokussiert, wie beispielhaft mit einem weißen Pfeil markiert. b) CTEM-Aufnahme ohne PP und für einen Defokus von $\Delta f = -400 \text{ nm}$. Ein grüner Rahmen in a) und ein gelber Rahmen in b) markiert den Bereich, der unter a) bzw. b) in vergrößerter Ansicht dargestellt wird. c,d) Intensitätslinienprofil über das CNT-Bündel in a) (roter Pfeil) und d) über das CNT-Bündel in b) (blauer Pfeil). Die schwarzen Pfeile in d) markieren Fresnel-Säume und die äquidistanten (etwa 1,6 nm) türkisen Striche markieren einzelne CNT innerhalb des Bündels. Die Intensitätsprofile sind auf die mittlere Vakuumintensität im jeweiligen Bild normiert.

PP mit einem Lochradius von 375/500 nm in Abbildung 7.4b. Intensitätslinienprofile entlang des roten und blauen Pfeils sind in Abbildung 7.4c,d gezeigt. Das CNT-Bündel erscheint mit deutlich erhöhtem Kontrast in beiden Abbildungen, im Vergleich zur fokussierten Aufnahme ohne PP in Abbildung 7.3a. Der Kontrast innerhalb des CNT-Bündels erscheint homogen in der ganzen Abbildung und fokussierte bzw. defokussierte Bereiche können im Gegensatz zur CTEM-Aufnahme in Abbildung 7.3a nicht mit dem Auge unterschieden werden. Durch die Zernike-PP verursachte Intensitätsoszillationen breiten sich in Abbildung 7.4a,b von den CNT-Bündel/Vakuum-Grenzflächen ausgehend mit einer Periodizität entsprechend der *Cut-on*-Frequenz der Zernike-PP aus. Die Intensitätsoszillationen fallen in Abbildung 7.4b mit größer werdenden Abständen vom CNT-Bündel etwas schneller ab. Die vergrößerten Ansichten der CNT-Bündel im grünen Rahmen in Abbildung 7.4a und im gelben Rahmen in Abbildung 7.4b weisen eine gute Sichtbarkeit der äquidistanten Intensitätsoszillationen auf, die durch die einzelnen CNT verursacht werden. Die vergrößerten Ansichten zeigen auch, dass das CNT-Bündel in Abbildung 7.4b einen etwas größeren Durchmesser (1 – 2 nm) hat, was einem Aufwachsen von Kontamination während der Bildaufnahme zugeordnet werden kann. Das *Fringing* führt auch zu diffusen hellen und dunklen Kontrasten innerhalb der CNT-Bündel (siehe Abbildung 7.4a,b und die rosa Pfeile in den Intensitätsprofilen in Abbildung 7.4c,d), die in Abbildung 7.3a,b, die ohne Zernike-PP aufgenommen wurden, nicht zu sehen sind.

Die Abbildungen 7.4e,f zeigen entsprechende Bildsimulationen und die Abbildungen 7.4g,h die zugehörigen Intensitätslinienprofile. Die Bildsimulationen basieren auf der vereinfachten Objektwellenfunktion in Abbildung 5.3b, welche die individuellen CNT innerhalb der Bündel und die aC-Kontamination nicht berücksichtigt. Trotzdem sind Eigenschaften wie z.B. der breite helle *Fringe* im Zentrum des CNT-Bündels sowie die dunklen *Fringes* an den CNT-Abgrenzungen gut zu erkennen. Die Simulationen in Abbildung 7.4g,h zeigen auch einen etwas schnelleren Abfall der Intensitätsoszillationen in größeren Entfernung vom CNT-Bündel als die experimentellen Bilder. Die Dämpfung der Intensitätsoszillationen ist bei Verwendung der dickengradierten Zernike-PP mit dem Lochradius von 375/500 nm nur geringfügig ausgeprägt.

Eine stärker ausgeprägte Reduzierung von *Fringing* innerhalb und außerhalb der CNT-Bündel kann beobachtet werden, wenn dickengradierte Zernike-PP mit größerem Lochradius und einem ausgedehnten Dickengradienten, der sich über 1 μm erstreckt, angewandt werden (siehe Abbildung 7.5). Abbildung 7.5a zeigt eine Zernike-PP-Aufnahme eines CNT-Bündels bei $\Delta f \approx 0 \text{ nm}$, die mit einer konventionellen Zernike-PP mit einem Lochradius von 0,5 μm aufgenommen wurde und ausgeprägtes *Fringing* zeigt. Das *Fringing* ist stark abgeschwächt in den Abbildungen, die mit dickengradierten Zernike-PP mit den Lochradien 0,5/1,5 μm und 0,6/1,5 μm (siehe Abbildung 7.5b,e) aufgenommen wurden. Die vergrößerten Bildbereiche zeigen im Detail den Kontrast innerhalb des CNT-Bündels. Zusätzlich zu den Intensitätsoszillationen, die durch die einzelnen CNT verursacht werden, ist ein

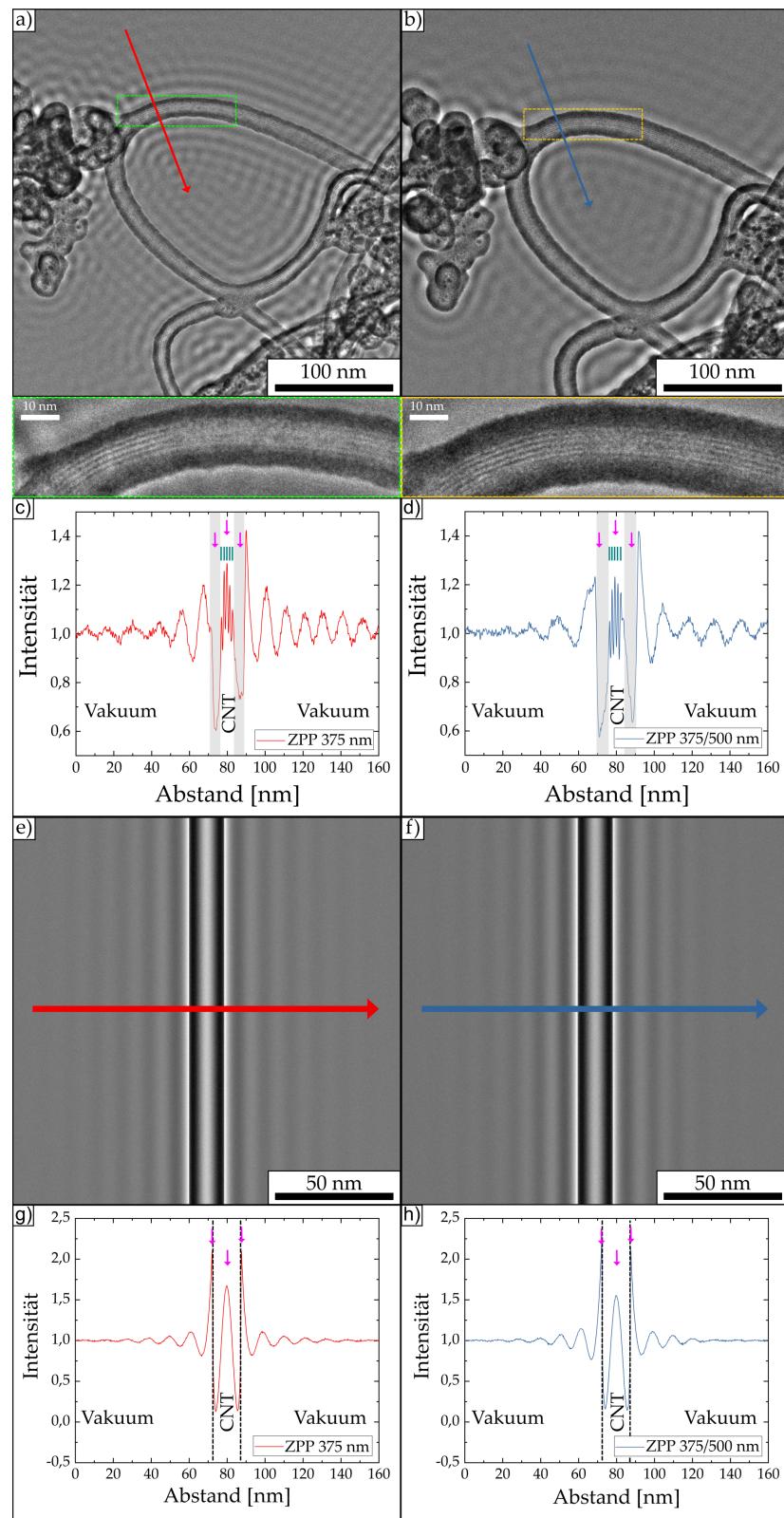


Abbildung 7.4: Experimentelle und simulierte Zernike-PP-TEM-Abbildung eines CNT-Bündels mit konventioneller und dickengradierter Zernike-PP mit schmalem Dickengradienten. a,b) Experimentelle Zernike-PP-TEM-Abbildung mit a) einer konventionellen Zernike-PP mit einem Lochradius von 375 nm und b) einer dickengraduierten Zernike-PP mit einem Lochradius von 375/500 nm ($\Delta f \approx 0 \text{ nm}$). Das grüne und gelbe Rechteck markiert den Bereich des CNT-Bündels, der in vergrößerter Ansicht unter a,b) dargestellt ist. c,d) Experimentelle Intensitätsprofile c) über das CNT-Bündel in a) (roter Pfeil) und d) über das CNT-Bündel in b) (blauer Pfeil). e,f) Simulierte Zernike-PP-TEM-Abbildungen mit e) einer konventionellen Zernike-PP mit einem Lochradius von 375 nm und f) einer dickengraduierten Zernike-PP mit einem Lochradius von 375/500 nm ($\Delta f = 0 \text{ nm}$). g,h) Simulierte Intensitätsprofile g) über ein CNT-Bündel in e) (roter Pfeil) und h) über das CNT-Bündel in f) (blauer Pfeil). Die rosa Pfeile und die äquidistanten (etwa 1,6 nm) türkisen Balken markieren Artefakte durch die Zernike-PP und einzelne CNT innerhalb des Bündels. Die Intensitätsprofile sind auf die mittlere Vakuumintensität im jeweiligen Bild normiert.

Effekt von *Fringing* innerhalb des CNT-Bündels in der Aufnahme und dem zugehörigen Intensitätsprofil mit der konventionellen 0,5 μm Zernike-PP (siehe Abbildung 7.5a,c) zu erkennen. Es können drei diffuse dunkle und zwei helle *Fringes* innerhalb des CNT-Bündels beobachtet werden (siehe die rosa Pfeile in Abbildung 7.5c). Die Periodizität zwischen den *Fringes* beträgt wie bei den Abbildungen der aC/Vakuum Grenzfläche (siehe Abbildung 7.2) etwa 8 nm und stimmt daher mit der *Cut-on*-Frequenz der Zernike-PP überein. Die vergrößerten Bildbereiche aus Abbildung 7.5b,e und die zugehörigen Intensitätsprofile in Abbildung 7.5d,f zeigen eine deutliche Reduktion des *Fringing*, das innerhalb des CNT-Bündels beinahe vollständig verschwindet. Besonders die Zernike-PP mit dem Lochradius von 0,6/1,5 μm ermöglicht eine Phasenkontrast-Abbildung, bei der fast kein *Fringing* auftritt.

Die Beobachtungen an den CNT-Bündeln stimmen mit den Ergebnissen an der aC/Vakuum-Grenzfläche überein. Die Intensitätsoszillationen innerhalb und außerhalb des CNT-Bündels korrelieren mit den *Cut-on*-Frequenzen der verwendeten Zernike-PP. Auch für das CNT-Bündel zeigt sich die Verwendung einer dickengraduierten Zernike-PP mit einem inneren Lochradius von 0,5 – 0,6 μm und einem äußeren Lochradius von 1,5 μm , was in einem Dickengradienten von 0,023 – 0,03 resultiert, als sehr gut geeignet für die Reduktion der Intensitätsoszillationen und zwar sowohl in der näheren Umgebung des abgebildeten Objekts als auch innerhalb des Objekts selbst. Einzig ein heller *Fringe* an der Grenzfläche zwischen CNT-Bündel und Vakuum wird nicht wesentlich vom glatten Dickengradienten der Zernike-PP beeinflusst. Hinsichtlich der CNT-Probe, wird die 1,6 nm Periodizität der einzelnen CNT ($0,625 \text{ nm}^{-1}$) nicht vom weichen *Cut-on*-Frequenzbereich beeinflusst. Allerdings nimmt der Phasenkontrast von größeren Bildstrukturen mit kleineren Raumfrequenzen innerhalb des weichen *Cut-on*-Frequenzbereichs, wie beispielsweise vom ausgedehnten CNT-Bündel, aufgrund der reduzierten relativen Phasenschiebung ab.

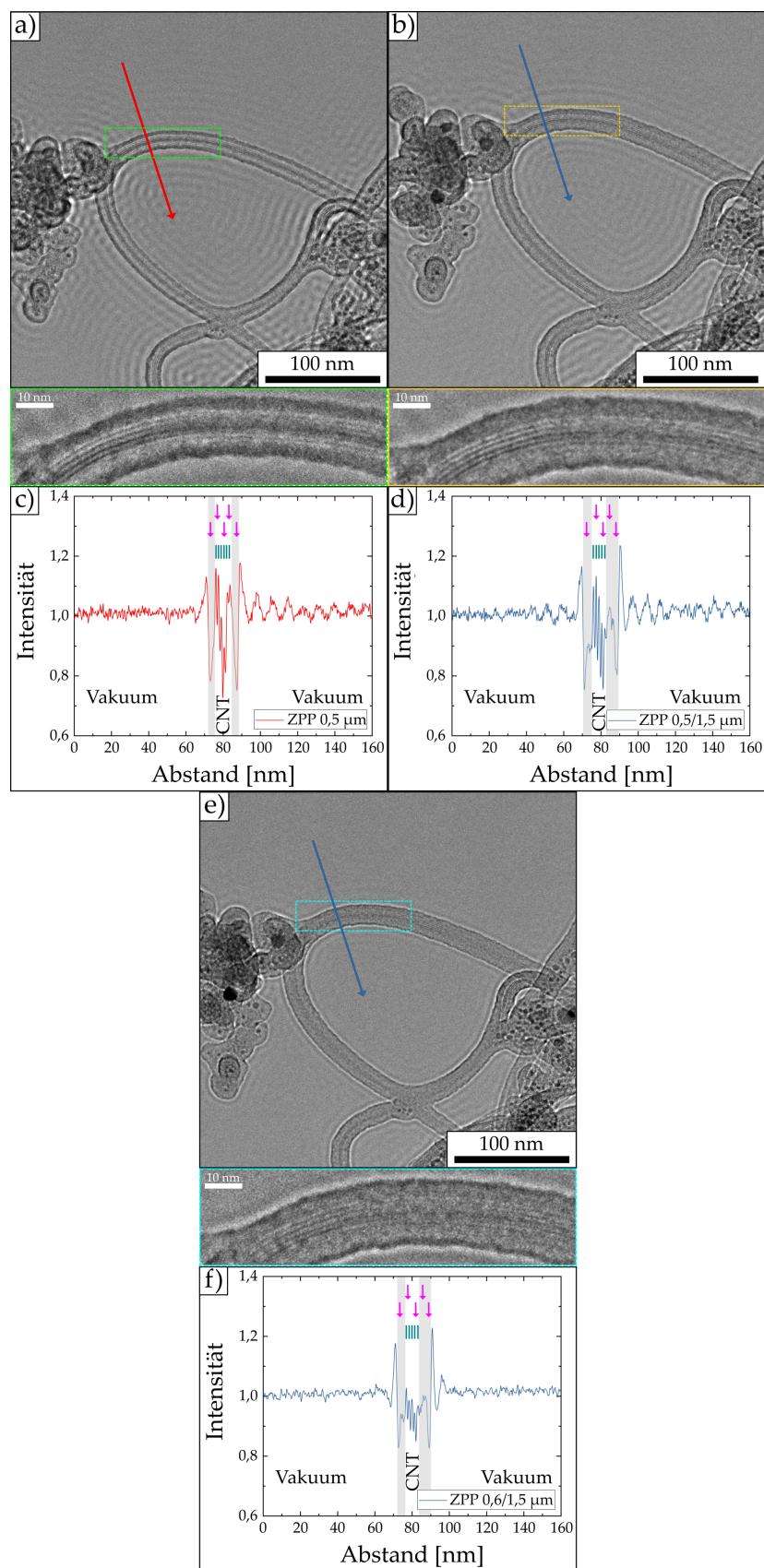


Abbildung 7.5: Experimentelle und simulierte Zernike-PP-TEM-Abbildung eines CNT-Bündels mit konventioneller und dickengradierter Zernike-PP mit breitem Dickengradienten. a,b,e) Experimentelle Zernike-PP-TEM-Abbildung mit a) einer konventionellen Zernike-PP mit einem Lochradius von $0,5\mu\text{m}$, b) einer dickengraduierten Zernike-PP mit einem Lochradius von $0,5/1,5\mu\text{m}$ und e) einer dickengraduierten Zernike-PP mit einem Lochradius von $0,6/1,5\mu\text{m}$ ($\Delta f \approx 0\text{ nm}$). Das grüne, gelbe und blaue Rechteck markiert den Bereich des CNT-Bündels, der in vergrößerter Ansicht unter a,b,e) dargestellt ist. c,d,f) Experimentelle Intensitätsprofile c) über das CNT-Bündel in a) (roter Pfeil) und d,f) über die CNT-Bündel in b,e) (blauer Pfeil). Die rosa Pfeile und die äquidistanten (etwa $1,6\text{ nm}$) türkisen Balken markieren Artefakte durch die Zernike-PP und einzelne CNT innerhalb des Bündels. Die Intensitätsprofile sind auf die mittlere Vakuumintensität im jeweiligen Bild normiert.

8 Kapitel 8

Zusammenfassung

Die Entwicklung von Phasenplatten (PP) für den Einsatz in der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ist in den letzten Jahren rapide fortgeschritten und hat dabei zu einem großen Erkenntniszuwachs in vielen Bereichen der Lebenswissenschaften geführt, deren Untersuchungsobjekte meist nur schwachen Kontrast in konventionellen TEM-Aufnahmen zeigen. Die PP erzeugen eine relative Phasenschiebung zwischen gestreuten und ungestreuten Elektronen in der hinteren Brennebene der Objektivlinse, wodurch ein starker Phasenkontrast für solche Objekte entsteht und zwar ohne die Notwendigkeit einer starken Defokussierung, die zum ungewünschten Verlust von Bildqualität führt. Die erste experimentell realisierte PP war eine Zernike-PP [13]. Sie besteht aus einem Dünnpfilm, der die Phase der gestreuten Elektronen durch sein inneres elektrostatisches Potenzial schiebt, während die ungestreuten Elektronen im Nullstrahl durch ein mikrostrukturiertes Loch laufen und unbeeinflusst bleiben. Obwohl die Zernike-PP einfach herzustellen und anzuwenden ist, stören *Fringing*-Artefakte, die durch die abrupte Kante am Loch des Filmes verursacht werden, die experimentell erzielbaren Ergebnisse. Deutlich bessere Ergebnisse werden mit der lochfreien PP (HFPP) erzielt [21, 67]. Sie besteht aus einem nur wenige Nanometer dicken durchgängigen Film und generiert eine Phasenschiebung für die ungestreuten Nullstrahl-Elektronen durch einen aufgeladenen Bereich am Ort des Nullstrahls, der sich durch die Beleuchtung mit dem intensiven Elektronenstrahl aufbaut. Obwohl mit der HFPP beeindruckende Ergebnisse erzielt werden konnten, bringt sie immer noch einige Nachteile mit sich. So ist die generierte Phasenschiebung nur indirekt über die Temperatur beeinflussbar und variiert in Abhängigkeit des Nullstrahl-Durchmessers und der Oberflächenchemie des Dünnpfilmes. Mit der elektrostatischen Zach-PP [90], der bisher vielversprechendsten experimentell umgesetzten elektrostatischen PP, kann dieses Problem umgangen werden. Sie generiert eine Phasenschiebung durch ein spannungsabhängiges elektrostatisches Potenzial an der Spitze einer feinen Elektrode, die in der Nähe des Nullstrahls positioniert

wird. Die Struktur der Zach-PP wurde in vorangegangenen Arbeiten weitestgehend optimiert, sodass Artefakte, die im Zusammenhang mit der Blockierung von Elektronen durch die Elektrode entstehen, minimiert wurden. Die vorliegende Arbeit befasst sich damit, die Kontrastentstehung durch die Anwendung von drei unterschiedlichen PP-Typen genauer zu verstehen und mit Möglichkeiten der Reduktion von Bildartefakten.

Die Herstellung von HFPP erscheint weitestgehend trivial, da sie nur aus einem abflotierten Dünnfilm besteht. Im Gegensatz dazu ist der Herstellungsprozess einer Zach-PP ein komplexer Prozess. Unter Einhaltung eines Standardverfahrens können jedoch mehrere Zach-PP mit geringer Ausschussquote parallel hergestellt werden. Das Standardverfahren wurde in dieser Arbeit um einzelne Punkte erweitert. Unter anderem wurde ein Zach-PP-Design entwickelt, das die Herstellung von drei Zach-PP auf einem einzigen runden Chip mit nur 3 mm Durchmesser ermöglicht. Der so designte Chip kann prinzipiell in herkömmliche Blendenhalter implementiert werden, sofern diese über eine vakuumdichte Kabeldurchführung für die Spannungsversorgung verfügen.

Die Implementierung von Standard-Zach-PP in ein Transmissionselektronenmikroskop erfordert einen geeigneten PP-Halter, welchen man derzeit noch nicht serienmäßig erwerben kann. Ein PP-Halter für die Implementierung einer Zach-PP und aller Arten von Dünnfilm-PP wurde basierend auf einem piezobetriebenen Mikromanipulator hergestellt. Zur Implementierung in ein herkömmliches Philips CM200 Transmissionselektronenmikroskop mussten umfangreiche Anpassungen vorgenommen werden. Für Kryo-TEM-Experimente mit Zach-PP wurde ein werksseitig vorinstalliertes HFPP-Positionierungssystem an einem JEOL JEM-3200 für den Einsatz einer Zach-PP modifiziert.

Die Kontraststeigerung einer HFPP und einer Zach-PP in der Phasenkontrast-Kryo-TEM wurde anhand von experimentellen und simulierten Abbildungen von in Eis eingebetteten T4-Bakteriophagen (T4) untersucht. Generell konnte gute Übereinstimmung zwischen Experiment und Simulation für realistische Phasenschiebungsprofile der verwendeten PP und unter Berücksichtigung des ausgedehnten Nullstrahls mit gaußförmigem Intensitätsprofil erzielt werden.

- Die Phasenschiebungsverteilung einer **HFPP** wird durch eine Lorentzfunktion, deren Maximum mit dem Nullstrahl zusammenfällt, sehr gut beschrieben. Die Halbwertsbreite der Lorentzfunktion ergibt sich aus dem Nullstrahldurchmesser im Beugungsbild. Das in Bezug auf den Nullstrahl symmetrische Phasenschiebungsprofil mit einem weichen *Cut-on*-Frequenzbereich verursacht keine richtungsabhängigen Artefakte. Durch den graduellen Abfall der Phasenschiebung um den Nullstrahl tritt ein diffuser Halo um die abgebildeten Objekte auf. *Fringing*-Artefakte werden jedoch vermieden, die beim Einsatz der Zernike-PP durch den abrupten Anstieg der Phasenschiebung zwischen Loch und Dünnfilm zu Intensitätsoszillationen um die abgebil-

deten Objekte führen. Das Raumfrequenzspektrum von T4 enthält große und kleine Raumfrequenzen für den T4-Schwanz und den T4-Kopf, die durch die HFPP mit gut ausgeprägtem Phasenkontrast abgebildet werden. Allerdings wird der Betrag der Phasenschiebung der HFPP vor allem durch die Temperatur kontrolliert, auf die die HFPP geheizt wird und die nur mit begrenzter Genauigkeit kontrolliert werden kann.

- Im Gegensatz zur HFPP ermöglicht die **Zach-PP** eine kontrollierte Einstellung der Phasenschiebung nach Betrag und Vorzeichen durch die angelegte Spannung. Dies ermöglicht es, den Kontrast von Objekten zu optimieren, die nicht immer ideale schwache Phasenobjekte sind. Das Design der Zach-PP vermeidet Streuung in der PP und verhindert damit Dämpfung der Elektronenintensität und Kohärenzverlust, im Gegensatz zur Streuung von Elektronen im dünnen HFPP-Film. Jedoch ist das Phasenschiebungsprofil der Zach-PP in Relation zum Nullstrahl asymmetrisch und führt zu Artefakten, die von der Orientierung der abgebildeten Objekte in Bezug auf die Ausrichtung des Zach-PP-Steges abhängen. Insbesondere führt die Blockade von Raumfrequenzen zu einem asymmetrischen „*single-sideband*“ Kontrast. *Fringing*-Artefakte treten jedoch nicht auf, da auch die Zach-PP wie die HFPP durch einen weichen *Cut-on*-Frequenzbereich charakterisiert ist. Durch den Einbau einer Zach-PP in ein Transmissionselektronenmikroskop, in dem die Zach-PP in ein vergrößertes Beugungsbild implementiert wurde, konnte der *Cut-on*-Frequenzbereich zu kleineren Raumfrequenzen hin verschoben werden und größere Objekte bis zu einer Größe von bis zu ca. 40 nm mit ausgeprägtem Phasenkontrast abgebildet werden. Eine problematische ungewollte Aufladung des Zach-PP-Steges konnte in den Experimenten durch konsequentes Heizen während des Betriebs vermieden werden.

Eine elektrostatische Zach-PP wurde erstmals für die Kryo-Elektronentomografie verwendet und mit Ergebnissen von der Tomografie mit HFPP verglichen.

- Die Qualität der rekonstruierten Tomogramme ist für beide PP ähnlich, da orientierungsabhängige Artefakte in Zach-PP-Abbildungen während des Rekonstruktionsprozesses weitestgehend unterdrückt werden. Die anpassbare Phasenschiebung der Zach-PP ist vorteilhaft, da die Phasenschiebung während der Aufnahme einer Kippwinkelserie konstant gehalten werden kann, trotz der Änderung der projizierten Probindicke.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, *Fringing*-Artefakte beim Einsatz von konventionellen Zernike-PP zu reduzieren, die durch den abrupten Anstieg der Phasenschiebung zwischen Loch und Dünnfilm zustande kommen. Dazu wurden Zernike-PP mit einer graduierten Dickenzunahme des Dünnfilms am Lochrand mit Hilfe einer benutzerdefinierten Routine für die Strukturierung mit einem fokussierten Ionenstrahl hergestellt. Experimentelle und simulierte Abbildungen mit unterschiedlich breiten dickengraduierten Bereichen wurden mit

Abbildungen mit einer konventionellen Zernike-PP verglichen. Die Phasenschiebungsprofile am Lochrand wurden experimentell mittels quantitativer Dickenprofile aus Dunkelfeld-Rastertransmissionselektronenmikroskopie Abbildungen ermittelt.

- Zur Untersuchung der Ausprägung von *Fringing*-Intensitätsoszillationen in Abbildungen wurde die Grenzfläche zwischen einem amorphem Kohlenstofffilm (aC) und Vakuum untersucht. Experimentelle und simulierte Bilder der aC/Vakuum-Grenzfläche stimmen generell gut überein. TEM-Aufnahmen mit konventioneller Zernike-PP zeigen starke Intensitätsoszillationen, die sich von der Grenzfläche in den Vakuumbereich und den aC-Film ausbreiten. TEM-Abbildungen mit dickengradierten Zernike-PP zeigen eine deutliche Reduktion der Intensitätsoszillationen. Für PP mit einem Lochradius von $0,6\text{ }\mu\text{m}$ und einem sich daran anschließenden $0,9\text{ }\mu\text{m}$ breiten Dickengradienten wird *Fringing* nahezu vollständig unterdrückt. Allerdings resultiert aus dem Dickenprofil auch eine Abschwächung der Phasenschiebung im entsprechenden Raumfrequenzbereich.
- Als Beispiel für nanostrukturierte Objekte wurden Bündel aus Kohlenstoff-Nanoröhren (CNT-Bündel) mit dickengradierten Zernike-PP untersucht. Auch bei diesen Objekten bestätigt sich die Reduktion von *Fringing* durch die Anwendung der dickengraduierten Zernike-PP sowohl in den Vakuumbereichen um die CNT-Bündel als auch in den Bündeln selbst. Trotz des Dickengradienten, der die fest vorgegebene *Cut-on*-Frequenz der konventionellen Zernike-PP in einen *Cut-on*-Frequenzbereich umwandelt, lässt sich die Periodizität der einzelnen CNT innerhalb des Bündels gut sichtbar mit Phasenkontrast abbilden.

A

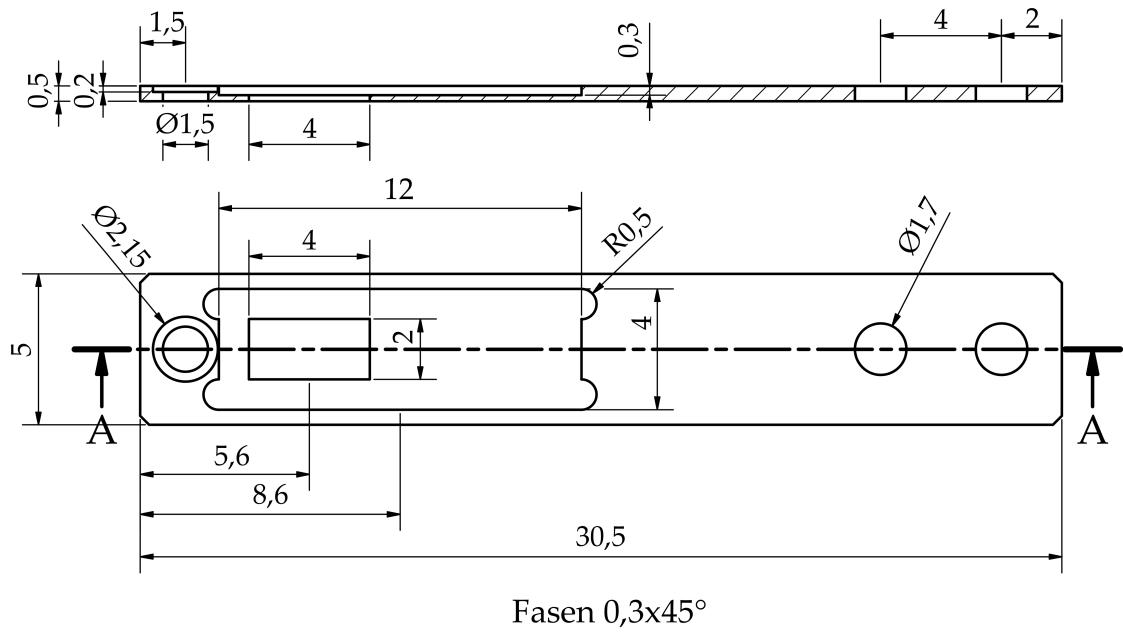
Anhang A

Anhang

A.1 Technische Zeichnungen von Halterplättchen für PP

a)

A-A (6 : 1)



b)

A-A (5 : 1)

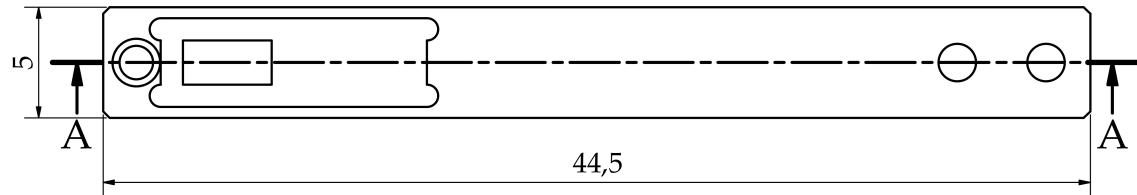


Abbildung A.1: Technische Zeichnungen der Halterplättchen für die PP-Halter des JEOL JEM-3200 zur Aufnahme einer Dünnsfilm-PP (Durchmesser 2 mm) und einer Zach-PP. a) Kurzes Halterplättchen (Länge 30,5 mm) für den PP-Halter in der normalen BFP und b) langes Halterplättchen (Länge 44,5 mm) für den PP-Halter in der vergrößerten BFP. Die Halterplättchen wurden aus Ti gefertigt. Die Maßangaben sind in Millimeter.

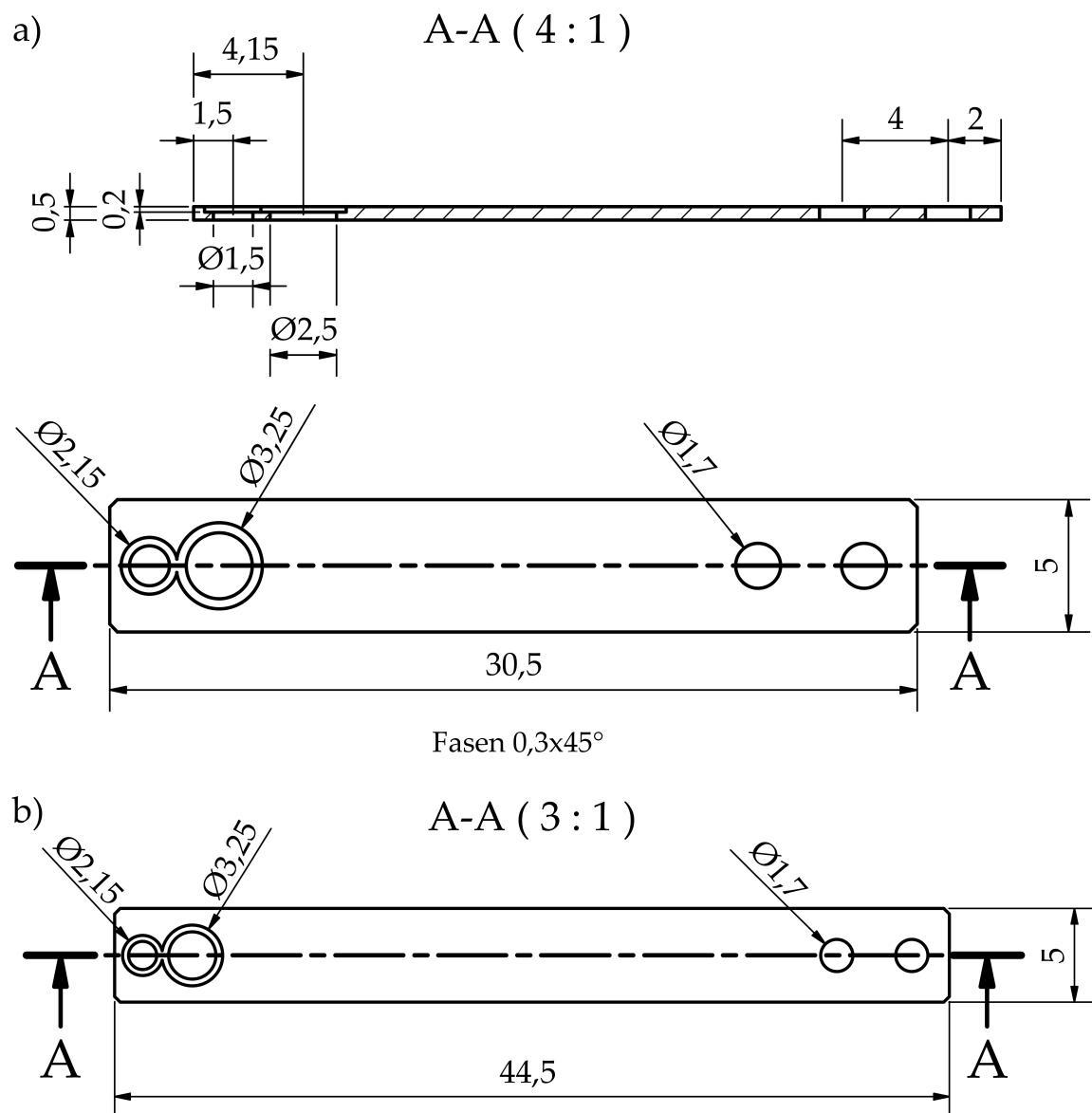


Abbildung A.2: Technische Zeichnungen der Halterplättchen für die PP-Halter des JEOL JEM-3200 zur Aufnahme einer Dünnschicht-PP (Durchmesser 2 mm) und einer Blende (Durchmesser 2 mm). a) Kurzes Halterplättchen (Länge 30,5 mm) für den PP-Halter in der normalen BFP und b) langes Halterplättchen (Länge 44,5 mm) für den PP-Halter in der vergrößerten BFP. Die Halterplättchen wurden aus Ti gefertigt. Die Maßangaben sind in Millimeter.

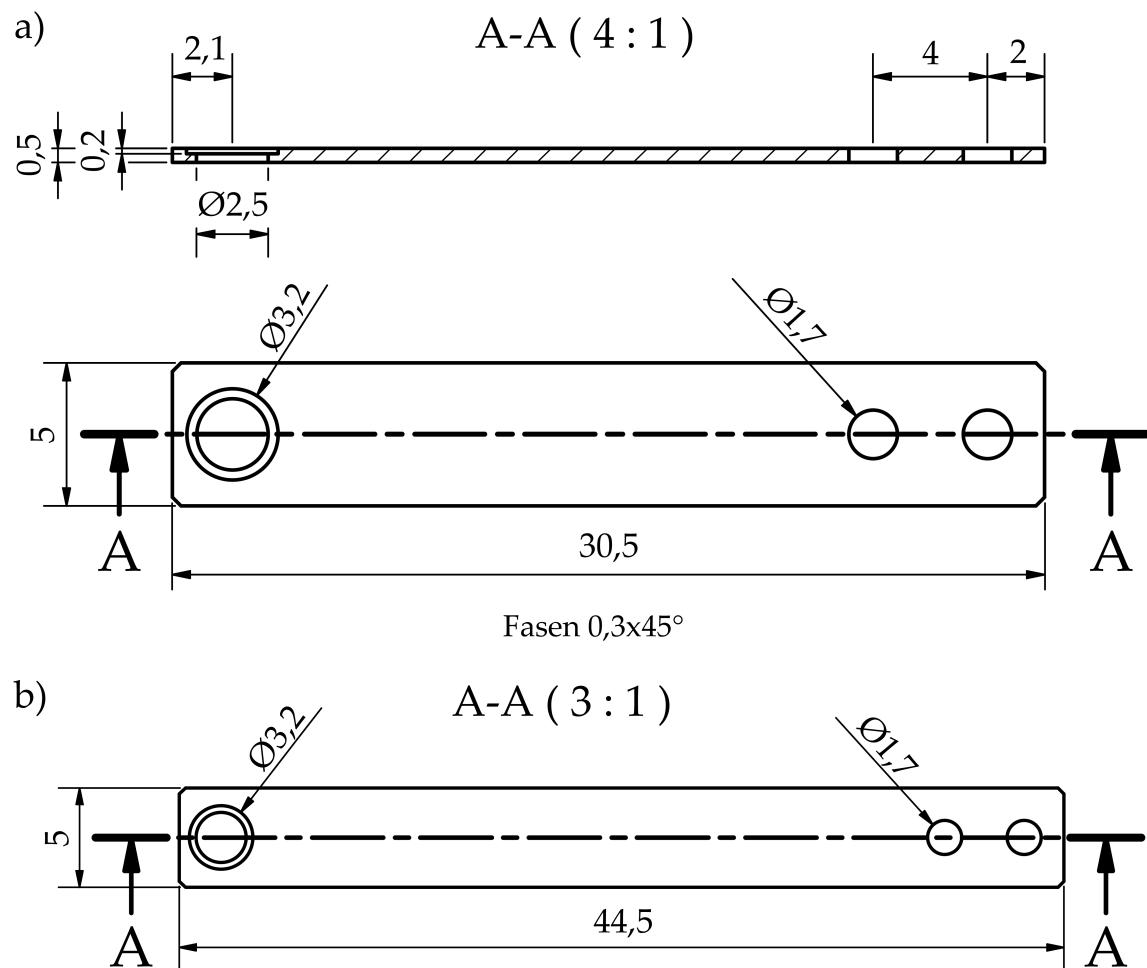


Abbildung A.3: Technische Zeichnungen der Halterplättchen für die PP-Halter des JEOL JEM-3200 zur Aufnahme einer Dünnfilm-PP (Durchmesser 3,05 mm) oder einer Blende (Durchmesser 3 mm). a) Kurzes Halterplättchen (Länge 30,5 mm) für den PP-Halter in der normalen BFP und b) langes Halterplättchen (Länge 44,5 mm) für den PP-Halter in der vergrößerten BFP. Die Halterplättchen wurden aus Ti gefertigt. Die Maßangaben sind in Millimeter.

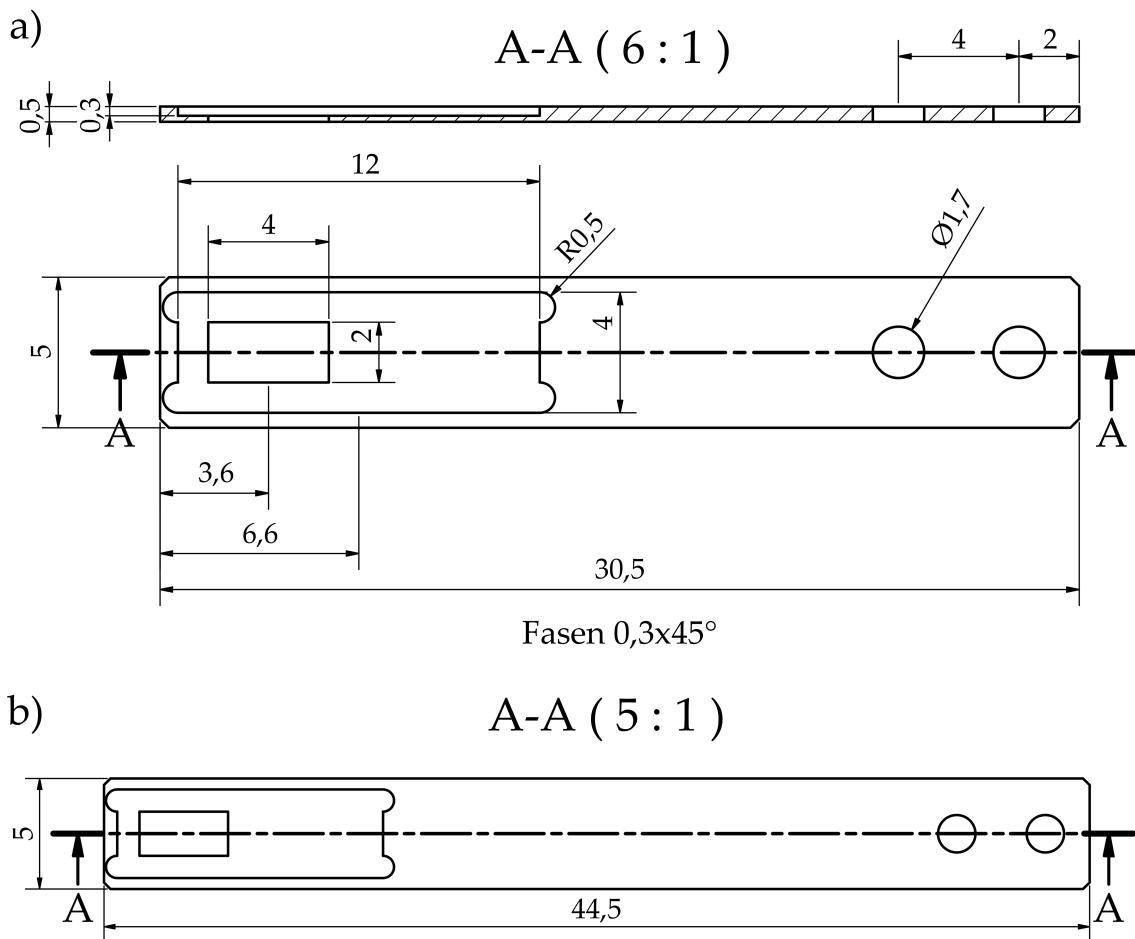


Abbildung A.4: Technische Zeichnungen der Halterplättchen für die PP-Halter des JEOL JEM-3200 zur Aufnahme einer Zach-PP. a) Kurzes Halterplättchen (Länge 30,5 mm) für den PP-Halter in der normalen BFP und b) langes Halterplättchen (Länge 44,5 mm) für den PP-Halter in der vergrößerten BFP. Die Halterplättchen wurden aus Ti gefertigt. Die Maßangaben sind in Millimeter.

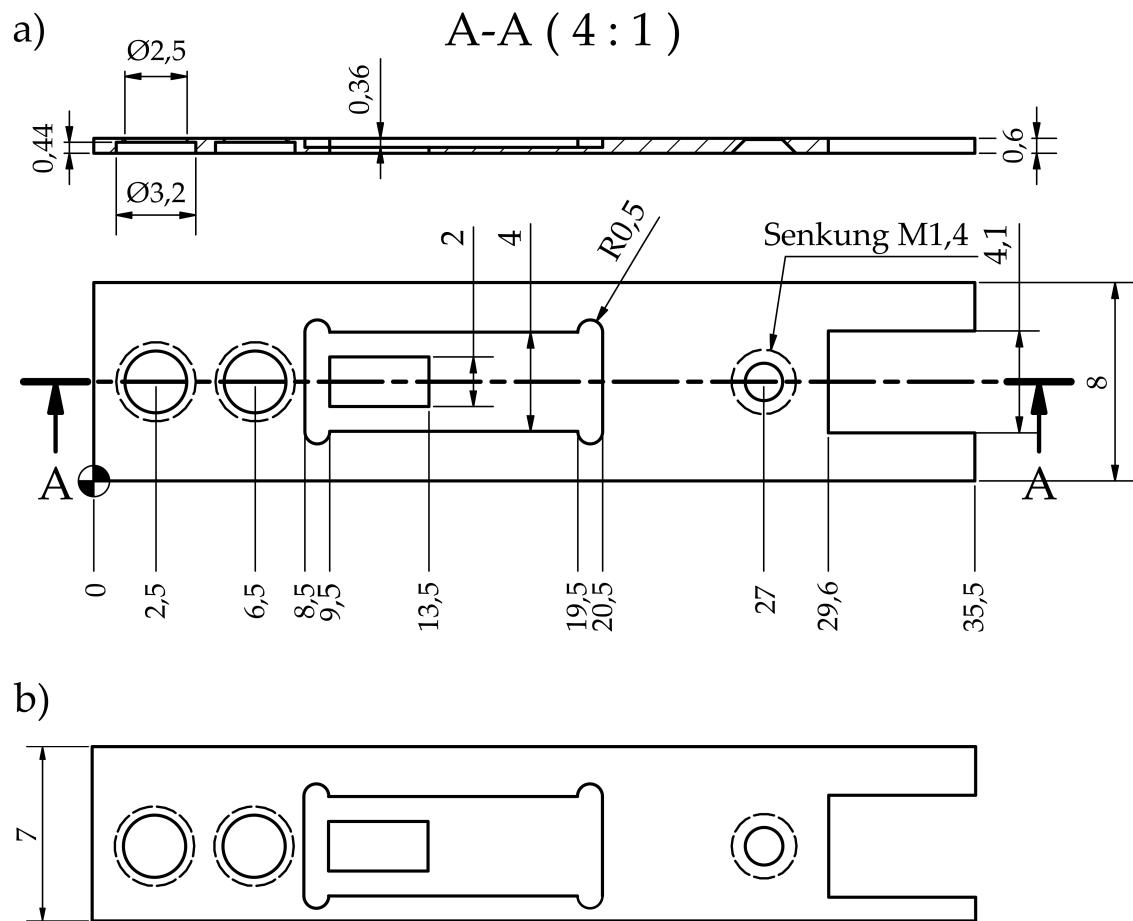


Abbildung A.5: Technische Zeichnung eines Halterplättchens für den PP-Halter des Philips CM200 zur Aufnahme zweier Dünnfilm-PP (Durchmesser 3,05 mm) und einer Zach-PP. a) Halterplättchen in der Grundform und b) Halterplättchen mit einseitig verschmälertem Rand für den abwechselnden Einsatz mit einer Objektivblende. Das Halterplättchen wurde aus Ti gefertigt. Die Maßangaben sind in Millimeter.

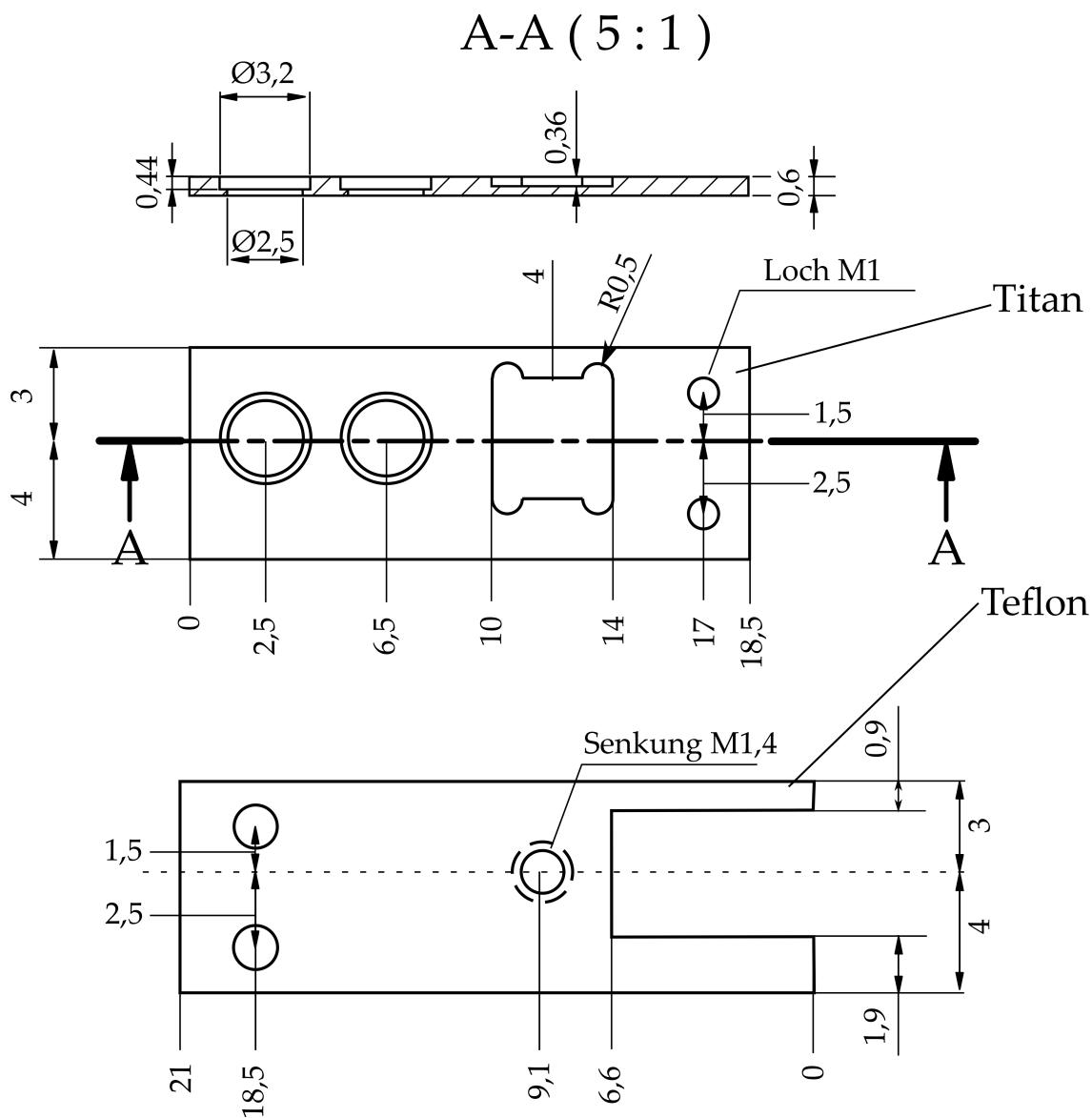


Abbildung A.6: Technische Zeichnung eines thermisch getrennten Halterplättchens für den PP-Halter des Philips CM200 zur Aufnahme zweier Dünnfilm-PP (Durchmesser 3,05 mm) und eines Pt1000-Widerstandes [81]. Die vordere Komponente des Halterplättchens wurde aus Ti gefertigt und die hintere Komponente aus Teflon. Die beiden Komponenten werden mit zwei Schrauben verbunden. Die Maßangaben sind in Millimeter.

A.2 Parameter für die Bildsimulation mit PPSim

Die nachfolgende Tabelle enthält die Mikroskopparameter, die zur Bildsimulation mit dem Matlab-Programm „PPSim“ [78] verwendet wurden:

Tabelle A.1: Mikroskopparameter für die Bildsimulation mit PPSim für das JEOL JEM-3200 und das Philips CM200 [78].

Parameter	JEOL JEM-3200 (HFPP/Zach-PP)	Philips CM200 Zernike-PP (konventionell/gradiert)
Beschleunigungsspannung U	300 kV	200 kV
Semikonvergenzwinkel β_0	0,4 mrad	0,2 mrad
Grenzfrequenz u_G (Aperturradius)	3 nm^{-1}	6 nm^{-1}
Focal spread δ	8 nm	6,5 nm
Brennweite f_{OL}	5 mm/15,8 mm	1,7 mm
Konstante der sphärischen Aberration C_S	5 mm/5,2 mm	1,2 mm
Defokuswert Δf	0 nm	0 nm
Phasenschiebung φ_{PP}	$-0,7\pi/-0,5;-0,24;0;0,25\pi$	$0,567\pi$
Cut-on-Frequenz u_C / Lochradius R	—	375;500 nm/—
FWHM HFPP σ_{HFPP}	150 nm	—
MIP V_{MIP}	nicht benötigt	9 V für aC
NS-Durchmesser	100 nm/300 nm	50 nm
Größe der Wellenfunktion (Pixel · Pixelgröße)	$2048 \cdot 0,207 \text{ nm} = 424 \text{ nm}$	$2048 \cdot 0,2 \text{ nm} = 410 \text{ nm}$

A.3 Bestimmung des Dickenprofils einer aC/Vakuum-Grenzfläche

Das Dickenprofil einer aC-Film/Vakuum-Grenzfläche wurde mittels Niederenergie-STEM bestimmt. Im Gegensatz zur Bestimmung der Dickenprofile der gradierten Zernike-PP (siehe Abschnitt 4.3.2), war in diesem Fall kein Referenzwert für die Dicke verfügbar. Deswegen wurde die lokale Dicke der aC-Testprobe über einen Vergleich der HAADF-STEM-Intensität eines experimentellen Bildes mit simulierten Intensitäten, die mit Monte-Carlo-Simulationen (NISTMonte Softwarepaket [84]) erstellt wurden, verglichen. Eine detaillierte Beschreibung der Prozedur kann [98] entnommen werden. Eine 30 keV BF-STEM-Aufnahme des aC-Filmes ist in Abbildung A.7a gezeigt und eine HAADF-STEM-Aufnahme in A.7b. Für die Materialdichte des aC wird ein Wert von $\rho = 1,75 \text{ g/cm}^3$ angenommen, was gut mit einem MIP von 9 V übereinstimmt [100]. Der Vergleich zwischen experimentellen und simulierten HAADF-STEM-Intensitäten ergibt eine mittlere Dicke von etwa 10 nm für den aC-Film. Ein Dickenprofil entlang des roten Pfeiles in Abbildung A.7b ist in Abbildung A.7c dargestellt. Das Dickenprofil offenbart einen glatten Dickenanstieg über eine Breite von etwa 5 nm bis die maximale Filmdicke von 10 nm erreicht wird. Die Breite des Übergangsbereichs variiert zwischen 2 und 5 nm für unterschiedliche Stellen an der Kante des aC-Filmes. An manchen Stellen ist die Kante des aC-Films leicht aufgerollt, was zu größeren Dicken von etwa 22 nm führt (siehe heller Kontrast in Abbildung A.7b).

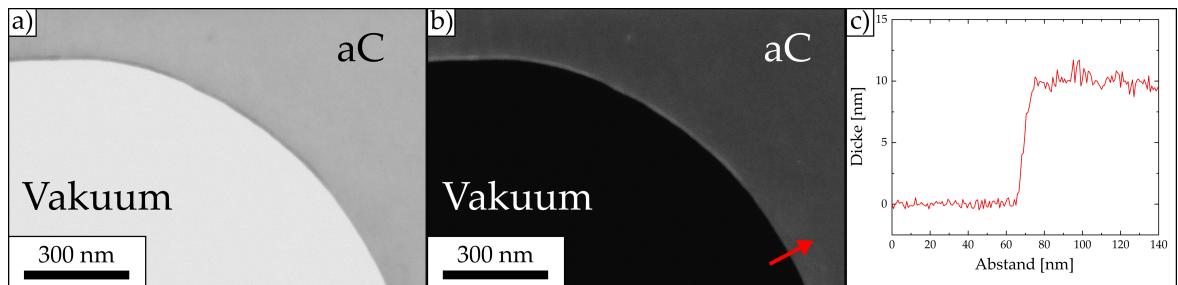


Abbildung A.7: 30 keV STEM-Abbildung und Dickenprofil eines aC-Lochfilmes. a) BF-Abbildung und b) HAADF-Abbildung eines aC-Lochfilmes an der Grenzfläche zwischen aC-Film und Vakuumbereich. c) Dickenprofil entlang des roten Pfeiles in b) zeigt eine gleichmäßige Dickenzunahme über einen Bereich von etwa 5 nm.

A.4 Simulation von CTEM-Aufnahmen einer aC/Vakuum-Grenzfläche

Um den Einfluss von Fresnel-Säumen an der aC/Vakuum-Grenzfläche in defokussierten CTEM-Abbildungen zu untersuchen, wurden Bildsimulationen bei einem Defokuswert von $\Delta f = 0 \text{ nm}$ (siehe Abbildung A.8a) und $\Delta f = -500 \text{ nm}$ (siehe Abbildung A.8b) erstellt, basierend auf der modellierten Objektwellenfunktion mit einem 2 nm breiten Übergangsbereich zwischen Vakuum und aC-Film (siehe Abbildung 5.3a). Es können keine Fresnel-Säume an der aC/Vakuum-Grenzfläche in der fokussierten Abbildung in A.8a beobachtet werden, was auch vom Intensitätslinienprofil in Abbildung A.8c entlang des roten Pfeiles in Abbildung A.8a belegt wird. Im Gegensatz dazu tritt ein heller und ein dunkler Fresnel-Saum bei $\Delta f = -500 \text{ nm}$ (siehe Abbildung A.8b) auf, was auch im zugehörigen Intensitätslinienprofil zu sehen ist (siehe Abbildung A.8d). Im Übergangsbereich zwischen aC-Film und Vakuum tritt eine sehr schwache Intensitätsoszillation auf. Es sei angemerkt, dass die Intensität der Fresnel-Säume bei betragsmäßig zunehmendem Defokuswert zunimmt. Allerdings sind die Intensitäten der Fresnel-Säume bei den hier betrachteten Defokuswerten von $\Delta f \leq -500 \text{ nm}$ vergleichsweise schwach im Vergleich zum ersten Maximum/Minimum der Artefakte im Vakuum-/aC-Bereich in der Zernike-PP-Aufnahme in Abbildung 7.1 und werden deshalb größtenteils überlagert.

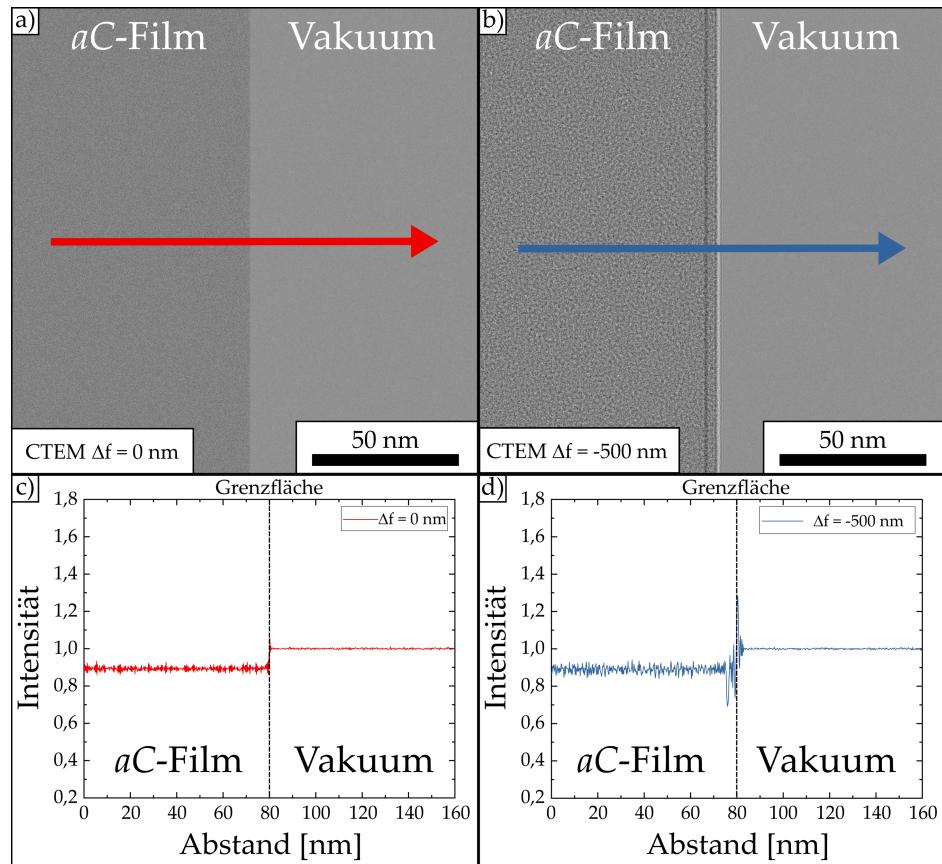


Abbildung A.8: Simulierte CTEM-Abbildungen einer aC/Vakuum-Grenzfläche und zugehörige Intensitätslinienprofile. a) Simulierte CTEM-Abbildung bei $\Delta f = 0 \text{ nm}$. b) Simulierte CTEM-Abbildung bei einem Defokus von $\Delta f = -500 \text{ nm}$. c,d) Intensitätslinienprofile c) entlang des roten Pfeiles in der zugehörigen simulierten CTEM-Abbildung in a) ($\Delta f = 0 \text{ nm}$) und d) entlang des blauen Pfeiles in der zugehörigen simulierten CTEM-Abbildung mit einem Defokus von $\Delta f = -500 \text{ nm}$ in b). Die Intensitätslinienprofile sind auf die mittlere Vakuumintensität in der entsprechenden Abbildung normiert.

Abbildungsverzeichnis

2.1	Aufbau eines Transmissionselektronenmikroskops.	7
2.2	Strahlengänge in einem Transmissionselektronenmikroskop für verschiedene Betriebsmodi.	8
2.3	Fotografien der verwendeten Transmissionselektronenmikroskope.	9
2.4	Schematische Darstellung der elektronenoptischen Konfiguration des JEOL JEM-3200 bei Betrieb im OL-Modus und SA-MAG-Modus.	11
2.5	Amplituden- und Phasendiagramm zur schematischen Darstellung von der Objektwelle eines WPO und Phasenkontrast.	15
2.6	Grafische Darstellung der PCTF $T(u)$ unter Berücksichtigung der Dämpfungsfunktion $E(u)$ für das JEOL JEM-3200 und das Philips CM200 bei verschiedenen Defokuswerten.	24
2.7	TEM-Aufnahme eines aC-Films am Philips CM200 und zugehöriges Diffraktogramm.	26
2.8	Grafische Darstellung der PCTF $T(u)$ (blau) unter Berücksichtigung der Dämpfungsfunktion $E(u)$ (rot) und einer zusätzlichen Phasenschiebung φ_{PP} für das JEOL JEM-3200 und das Philips CM200 bei verschiedenen Defokuswerten.	29
2.9	Zusammenfassung der gängigen PP-Konzepte.	31
2.10	REM-Aufnahmen mit SE von filmbasierten PP.	32
2.11	Rotierende Zernike-PP zur Reduzierung von Bildartefakten.	33
2.12	Konventionelle und dickengradierte Zernike-PP.	34
2.13	REM-Aufnahme mit SE von einer Zach-PP.	36
2.14	Gegenüberstellung zweier Methoden zur Probenpräparation biologischer Objekte anhand von TEM-Aufnahmen von HIV-artigen Partikeln.	39
2.15	Schematische Darstellung der Kryo-Probenpräparation.	40
3.1	Rotationsbeschichtung mit einer Lackschleuder.	43
3.2	Schematische Darstellung von Maskenschreiber und Maskenausrichter.	44
3.3	REM-Aufnahmen mit SE zur Verdeutlichung von Material- und Topografiekontrast.	46
3.4	<i>Lift-off</i> -Verfahren zur Herstellung von leitfähigen Mikrostrukturen.	49
3.5	Aufbau eines Rasterelektronenmikroskops mit integrierter FIB-Anlage.	50

3.6	Schematische Darstellung der Elektronenstrahl- und Kohlenstoffstabverdampfung.	51
3.7	Schematische Darstellung der PECVD und RIE.	55
3.8	Aufbau zum Abflottieren von Dünnfilmen.	57
4.1	Werksseitig vorinstalliertes HFPP-System zur Implementierung einer HFPP in das JEOL JEM-3200.	62
4.2	Maskenlayout und fertiggestellte Fotomaske für die Herstellung von PP-Rohlingen.	66
4.3	Schematische Darstellung des fotolithografischen Herstellungsprozesses von freitragenden Si_3N_4 -Membranen für PP-Rohlinge.	67
4.4	Fotografische und lichtmikroskopische Abbildungen der hergestellten PP-Rohlinge.	69
4.5	SE-REM-Aufnahmen der hergestellten 3 mm Chips und Si_3N_4 -Membranen mit verschiedenen Abmessungen.	70
4.6	Lichtmikroskopische Aufnahmen der einzelnen Herstellungsschritte einer Zach-PP.	74
4.7	Durchtrennen des Zach-PP-Steges mit einem FIB.	75
4.8	Lichtmikroskopische Abbildung zweier Designs zur Realisierung einer Zach-PP auf einem 3 mm Chip.	77
4.9	Charakterisierung einer Zach-PP anhand von SE-REM-Aufnahmen.	79
4.10	Implementierung einer Zach-PP in das Philips CM200 unter Verwendung eines Kleindiek MM3A-EM Mikromanipulators als PP-Halter.	81
4.11	Für den Einsatz des PP-Halters am Philips CM200 angepasster Objektivblendestreifen.	82
4.12	Implementierung von PP in ein PP-Halterplättchen.	83
4.13	Implementierung einer Zach-PP in den PP-Halter für die vergrößerte BFP des JEOL JEM-3200.	85
4.14	REM-Aufnahme einer durch eine Spannungsspitze zerstörten Zach-PP nach dem Ausbau aus dem JEOL JEM-3200.	86
4.15	REM-Aufnahme eines auf TEM-Goldnetze abflottierten aC-Filmes mit mikrostrukturierten Zernike-PP-Löchern.	89
4.16	Benutzerdefinierte FIB-Routine für die Strukturierung von Zernike-PP mit dickengradierter Rand.	90
4.17	Schichtdickenbestimmung des aC-Films für die Zernike-PP.	94
4.18	30 keV STEM-Aufnahmen und Dickenprofile der Zernike-PP mit dickengradierter Rand.	96
4.19	EDXS-Untersuchung der Ga^+ -Ionenimplantation in dickengradierte Zernike-PP.	97

4.20	Fotografie eines beheizbaren PP-Halterplättchens.	100
5.1	Bestimmung von Abbildungsparametern anhand des Diffraktogramms einer defokussierten HFPP-TEM-Abbildung eines in vitrifiziertem Eis eingebetteten aC-Films und Phasenschiebungen einer Zach-PP-Spannungsserie.	104
5.2	Modellierte Objektwellenfunktion zweier senkrecht zueinander angeordneter T4 und Verteilung der Phasenschiebung einer Zach-PP.	109
5.3	Modellierte Objektwellenfunktion einer aC-Film/Vakuum-Grenzfläche und eines CNT-Bündels sowie Phasenschiebungsverteilungen von dickengradierten Zernike-PP für drei verschiedene Lochradien.	112
6.1	Schematische Darstellung der Bakteriophage T4.	115
6.2	300 keV CTEM- und PP-TEM-Abbildungen einer in Eis eingebetteten T4-Probe, aufgenommen mit einer HFPP oder einer Zach-PP bei $\Delta f \approx 0$, mit zugehörigen Diffraktogrammen.	117
6.3	Kontrastverstärkung des Kopfes und Schwanzes einer T4 mittels HFPP-TEM. 119	
6.4	Kontrastverstärkung durch eine Zach-PP, analysiert durch Intensitätslinienprofile über einen T4-Kopf in experimentellen und simulierten Zach-PP-TEM-Abbildungen für zwei verschiedene Spannungen und mit dem Zach-PP-Steg in paralleler Orientierung zur T4.	122
6.5	Experimentelle und simulierte Zach-PP-TEM-Abbildungen von in Eis eingebetteten T4 für verschiedene Spannungen und dem Zach-PP-Steg in senkrechter Orientierung zur T4.	124
6.6	Kontrastverstärkung in Zach-PP-TEM-Aufnahmen eines T4-Kopfes und T4-Schwanzes mit dem Zach-PP-Steg in senkrechter Orientierung zu der T4, visualisiert durch Intensitätslinienprofile, die den experimentellen und simulierten Bildern in Abbildung 6.5 entnommenen wurden.	125
6.7	Einzelne Schnitte eines Elektronentomogramms und dreidimensionale Segmentierung einer T4-Probe, aufgenommen mit einer HFPP und einer Zach-PP bei $\Delta f \approx 0$ und mit Energiefilter.	129
6.8	Einzelne Schnitte eines Elektronentomogramms einer T4, aufgenommen mit einer HFPP und einer Zach-PP bei $\Delta f \approx 0$ und mit Energiefilter.	131
7.1	Experimentelle und simulierte Zernike-PP-TEM-Abbildung einer aC-Film/Vakuum-Grenzfläche und zugehörige Intensitätslinienprofile.	136
7.2	Experimentelle und simulierte Zernike-PP-TEM-Abbildung einer aC-Film/Vakuum-Grenzfläche und zugehörige Intensitätslinienprofile.	139
7.3	CTEM-Aufnahme von einem CNT-Bündel ohne PP und zugehörige Intensitätslinienprofile.	141

7.4 Experimentelle und simulierte Zernike-PP-TEM-Abbildung eines CNT-Bündels mit konventioneller und dickengradierter Zernike-PP mit schmalem Dickengradienten.	143
7.5 Experimentelle und simulierte Zernike-PP-TEM-Abbildung eines CNT-Bündels mit konventioneller und dickengradierter Zernike-PP mit breitem Dickengradienten.	145
A.1 Technische Zeichnungen der Halterplättchen für die PP-Halter des JEOL JEM-3200 zur Aufnahme einer Dünnfilm-PP und einer Zach-PP.	152
A.2 Technische Zeichnungen der Halterplättchen für die PP-Halter des JEOL JEM-3200 zur Aufnahme einer Dünnfilm-PP und einer Blende.	153
A.3 Technische Zeichnungen der Halterplättchen für die PP-Halter des JEOL JEM-3200 zur Aufnahme einer Dünnfilm-PP oder einer Blende.	154
A.4 Technische Zeichnungen der Halterplättchen für die PP-Halter des JEOL JEM-3200 zur Aufnahme einer Zach-PP.	155
A.5 Technische Zeichnung eines Halterplättchens für den PP-Halter des Philips CM200 zur Aufnahme zweier Dünnfilm-PP und einer Zach-PP.	156
A.6 Technische Zeichnung eines thermisch getrennten Halterplättchens für den PP-Halter des Philips CM200 zur Aufnahme zweier Dünnfilm-PP und eines Pt1000-Widerstandes.	157
A.7 30 keV STEM-Abbildung und Dickenprofil eines aC-Lochfilmes.	159
A.8 Simulierte CTEM-Abbildungen einer aC/Vakuum-Grenzfläche und zugehörige Intensitätslinienprofile.	161

Tabellenverzeichnis

2.1	Ausgewählte Parameter der im Rahmen der Arbeit verwendeten Transmissionselektronenmikroskope.	22
4.1	Strukturierung von konventionellen Zernike-PP-Löchern.	89
4.2	Strukturierung von dickengradierten Zernike-PP-Löchern.	92
A.1	Mikroskopparameter für die Bildsimulation mit PPSim für das JEOL JEM-3200 und das Philips CM200.	158

Literaturverzeichnis

- [1] E. Abbe. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Archiv für Mikroskopische Anatomie*, 9(1):413–468, 1873. ISSN 0176-7364. doi: 10.1007/BF02956173. 1
- [2] H. Alexander. *Physikalische Grundlagen der Elektronenmikroskopie*. Teubner Studienbücher Angewandte Physik. Vieweg+Teubner Verlag, Wiesbaden, 1997. ISBN 978-3-663-12296-8. 5
- [3] D. Alroyeau, W. Hsieh, E. Anderson, L. Hilken, G. Benner, X. Meng, F. Chen, und C. Kisielowski. Imaging of soft and hard materials using a Boersch phase plate in a transmission electron microscope. *Ultramicroscopy*, 110(5):563–570, 2010. ISSN 0304-3991. doi: 10.1016/j.ultramic.2009.11.016. 35
- [4] S. Asano, Y. Fukuda, F. Beck, A. Aufderheide, F. Förster, R. Danev, und W. Baumeister. Proteasomes. A molecular census of 26s proteasomes in intact neurons. *Science*, 347 (6220):439–442, 2015. doi: 10.1126/science.1261197. 3, 35
- [5] H. G. Badde und L. Beimer. Der Einfluß einer streuenden Phasenplatte auf das elektronenmikroskopische Bild. *Zeitschrift für Naturforschung A*, 25(5):760–765, 1970. ISSN 0932-0784. doi: 10.1515/zna-1970-0532. 28
- [6] J. Barthel und A. Thust. Aberration measurement in HRTEM: Implementation and diagnostic use of numerical procedures for the highly precise recognition of diffractogram patterns. *Ultramicroscopy*, 111(1):27–46, 2010. ISSN 0304-3991. doi: 10.1016/j.ultramic.2010.09.007. 104
- [7] B. Barton, D. Rhinow, A. Walter, R. Schröder, G. Benner, E. Majorovits, M. Matijevic, H. Niebel, H. Müller, M. Haider, M. Lacher, S. Schmitz, P. Holik, und W. Kühlbrandt. In-focus electron microscopy of frozen-hydrated biological samples with a Boersch phase plate. *Ultramicroscopy*, 111(12):1696–1705, 2011. ISSN 0304-3991. doi: 10.1016/j.ultramic.2011.09.007. 35
- [8] H. Boersch. Über die Kontraste von Atomen im Elektronenmikroskop. *Zeitschrift für Naturforschung*, 2a:615–633, 1947. 2, 23, 28

- [9] R. Cambie, K. H. Downing, D. Typke, R. M. Glaeser, und J. Jin. Design of a microfabricated, two-electrode phase-contrast element suitable for electron microscopy. *Ultramicroscopy*, 107(4-5):329–339, 2007. ISSN 0304-3991. doi: 10.1016/j.ultramic.2006.09.001. 35
- [10] W. Coene, A. Thust, M. op de Beeck, und D. van Dyck. Maximum-likelihood method for focus-variation image reconstruction in high resolution transmission electron microscopy. *Ultramicroscopy*, 64(1-4):109–135, 1996. ISSN 0304-3991. doi: 10.1016/0304-3991(96)00010-1. 25, 105
- [11] W. Dai, C. Fu, H. A. Khant, S. J. Luttko, M. F. Schmid, und W. Chiu. Zernike phase-contrast electron cryotomography applied to marine cyanobacteria infected with cyanophages. *Nature protocols*, 9(11):2630–2642, 2014. doi: 10.1038/nprot.2014.176. 2, 32
- [12] R. Danev und W. Baumeister. Cryo-EM single particle analysis with the Volta phase plate. *eLife*, 5, 2016. doi: 10.7554/eLife.13046. 35
- [13] R. Danev und K. Nagayama. Transmission electron microscopy with Zernike phase plate. *Ultramicroscopy*, 88(4):243–252, 2001. ISSN 0304-3991. doi: 10.1016/S0304-3991(01)00088-2. 2, 25, 147
- [14] R. Danev und K. Nagayama. Complex Observation in Electron Microscopy. II. Direct Visualization of Phases and Amplitudes of Exit Wave Functions. *Journal of the Physical Society of Japan*, 70(3):696–702, 2001. ISSN 0031-9015. doi: 10.1143/JPSJ.70.696. 27, 28, 31
- [15] R. Danev und K. Nagayama. Complex Observation in Electron Microscopy: IV. Reconstruction of Complex Object Wave from Conventional and Half Plane Phase Plate Image Pair. *Journal of the Physical Society of Japan*, 73(10):2718–2724, 2004. ISSN 0031-9015. doi: 10.1143/JPSJ.73.2718. 31
- [16] R. Danev und K. Nagayama. Applicability of thin film phase plates in biological electron microscopy. *Biophysics*, 2:35–43, 2006. ISSN 1349-2942. doi: 10.2142/biophysics.2.35. 32
- [17] R. Danev und K. Nagayama. Single particle analysis based on Zernike phase contrast transmission electron microscopy. *Journal of Structural Biology*, 161(2):211–218, 2008. ISSN 10478477. doi: 10.1016/j.jsb.2007.10.015. 2, 32
- [18] R. Danev und K. Nagayama. Optimizing the phase shift and the cut-on periodicity of phase plates for TEM. *Ultramicroscopy*, 111(8):1305–1315, 2011. ISSN 0304-3991. doi: 10.1016/j.ultramic.2011.04.004. 32

- [19] R. Danev, H. Okawara, N. Usuda, K. Kametani, und K. Nagayama. A Novel Phase-contrast Transmission Electron Microscopy Producing High-contrast Topographic Images of Weak objects. *Journal of biological physics*, 28(4):627–635, 2002. ISSN 0092-0606. doi: 10.1023/A:1021234621466. 2, 31
- [20] R. Danev, R. M. Glaeser, und K. Nagayama. Practical factors affecting the performance of a thin-film phase plate for transmission electron microscopy. *Ultramicroscopy*, 109 (4):312–325, 2009. ISSN 0304-3991. doi: 10.1016/j.ultramic.2008.12.006. 32, 88, 98
- [21] R. Danev, B. Buijsse, M. Khoshouei, J. M. Plitzko, und W. Baumeister. Volta potential phase plate for in-focus phase contrast transmission electron microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(44):15635–15640, 2014. doi: 10.1073/pnas.1418377111. 3, 33, 147
- [22] R. Danev, D. Tegunov, und W. Baumeister. Using the Volta phase plate with defocus for cryo-EM single particle analysis. *eLife*, 6, 2017. doi: 10.7554/eLife.23006. 35
- [23] K. Danov, R. Danev, und K. Nagayama. Electric charging of thin films measured using the contrast transfer function. *Ultramicroscopy*, 87(1-2):45–54, 2001. ISSN 0304-3991. doi: 10.1016/S0304-3991(00)00061-9. 32
- [24] K. Danov, R. Danev, und K. Nagayama. Reconstruction of the electric charge density in thin films from the contrast transfer function measurements. *Ultramicroscopy*, 90 (2-3):85–95, 2002. ISSN 0304-3991. doi: 10.1016/S0304-3991(01)00143-7. 32
- [25] C. Davisson und L. H. Germer. Diffraction of Electrons by a Crystal of Nickel. *Physical Review*, 30(6):705–740, 1927. ISSN 0031-899X. doi: 10.1103/PhysRev.30.705. 10
- [26] L. de Broglie. The reinterpretation of wave mechanics. *Foundations of Physics*, 1(1): 5–15, 1970. ISSN 0015-9018. doi: 10.1007/BF00708650. 1, 10
- [27] M. de Graef. *Introduction to conventional transmission electron microscopy*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K. and New York, N.Y., 2003. ISBN 0511615094. 5
- [28] T. Dokland. Back to the basics: The fundamentals of cryo-electron microscopy. *Microscopy and Microanalysis*, 15(S2):1538–1539, 2009. ISSN 1431-9276. doi: 10.1017/S1431927609099280. 39
- [29] P. A. Doyle und P. S. Turner. Relativistic Hartree–Fock X-ray and electron scattering factors. *Acta Crystallographica Section A*, 24(3):390–397, 1968. ISSN 0567-7394. doi: 10.1107/S0567739468000756. 12

- [30] M. Dries, S. Hettler, B. Gamm, E. Müller, W. Send, K. Müller, A. Rosenauer, und D. Gerthsen. A nanocrystalline Hilbert phase-plate for phase-contrast transmission electron microscopy. *Ultramicroscopy*, 139:29–37, 2014. ISSN 0304-3991. doi: 10.1016/j.ultramic.2014.01.002. 32
- [31] M. Dries, S. Hettler, T. Schulze, W. Send, E. Müller, R. Schneider, D. Gerthsen, Y. Luo, und K. Samwer. Thin-Film Phase Plates for Transmission Electron Microscopy Fabricated from Metallic Glasses. *Microscopy and Microanalysis*, 22(5):955–963, 2016. doi: 10.1017/S143192761601165X.
- [32] M. Dries, M. Obermair, S. Hettler, P. Hermann, K. Seemann, F. Seifried, S. Ulrich, R. Fischer, und D. Gerthsen. Oxide-free aC/Zr0.65Al0.075Cu0.275/aC phase plates for transmission electron microscopy. *Ultramicroscopy*, 189:39–45, 2018. ISSN 0304-3991. doi: 10.1016/j.ultramic.2018.03.003. 32
- [33] Dries, Manuel. *Experimentelle und theoretische Untersuchungen zum Hilbert-Phasenkontrast in der Transmissionselektronenmikroskopie*. Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, 2015. 78, 104
- [34] J. Frank. The envelope of electron microscope transfer functions for partially coherent illumination. *Optik*, 38, 1973. 19
- [35] N. Frindt, M. Oster, S. Hettler, B. Gamm, L. Dieterle, W. Kowalsky, D. Gerthsen, und R. R. Schröder. In-focus electrostatic Zach phase plate imaging for transmission electron microscopy with tunable phase contrast of frozen hydrated biological samples. *Microscopy and Microanalysis*, 20(1):175–183, 2014. doi: 10.1017/S1431927613013901. 37
- [36] J. Frühauf. *Shape and functional elements of the bulk silicon: A manual of wet etched silicon structures*. Springer, New York, 2004. ISBN 9783540268765. doi: 10.1007/b138230. 67
- [37] Y. Fukuda, Y. Fukazawa, R. Danev, R. Shigemoto, und K. Nagayama. Tuning of the Zernike phase-plate for visualization of detailed ultrastructure in complex biological specimens. *Journal of Structural Biology*, 168(3):476–484, 2009. ISSN 10478477. doi: 10.1016/j.jsb.2009.08.011. 32
- [38] Y. Fukuda, U. Laugks, V. Lučić, W. Baumeister, und R. Danev. Electron cryotomography of vitrified cells with a Volta phase plate. *Journal of Structural Biology*, 190(2): 143–154, 2015. ISSN 10478477. doi: 10.1016/j.jsb.2015.03.004. 35
- [39] L. A. Giannuzzi und F. A. Stevie. *Introduction to focused ion beams: Instrumentation, theory, techniques and practice*. Springer Science+Business Media Inc, Boston, MA, 2005. ISBN 978-0-387-23116-7. doi: 10.1007/b101190. 49

- [40] R. M. Glaeser. Invited review article: Methods for imaging weak-phase objects in electron microscopy. *The Review of scientific instruments*, 84(11):111101, 2013. doi: 10.1063/1.4830355. 2, 37, 73
- [41] Grünwald, Lukas. *Erzeugung nichtbeugender Elektronenstrahlen mit strukturierten Phasenmasken aus amorphem Kohlenstoff*. Masterarbeit, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, 2018. 44, 67
- [42] M. Haider, H. Rose, S. Uhlemann, E. Schwan, B. Kabius, und K. Urban. A spherical-aberration-corrected 200kv transmission electron microscope. *Ultramicroscopy*, 75(1): 53–60, 1998. ISSN 0304-3991. doi: 10.1016/S0304-3991(98)00048-5. 18
- [43] A. Harscher und H. Lichte. Inelastic Mean Free Path and Mean Inner Potential of Carbon Foil and Vitrified Ice measured with Electron Holography. *Electron Microscopy*, 1: 553–554, 1998. 106
- [44] J. Haus. *Optische Mikroskopie: Funktionsweise und Kontrastierverfahren*. Wiley-VCH, Weinheim, 2014. ISBN 978-3-527-41127-6. 34
- [45] S. Hettler. *Transmissionselektronenmikroskopie mit elektrostatischen Zach-Phasenplatten*. Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, 2015. 4, 25, 49, 63, 68, 71, 72, 73, 79, 82, 104
- [46] S. Hettler, B. Gamm, M. Dries, N. Frindt, R. R. Schröder, und D. Gerthsen. Improving fabrication and application of Zach phase plates for phase-contrast transmission electron microscopy. *Microscopy and Microanalysis*, 18(5):1010–1015, 2012. doi: 10.1017/S1431927612001560. 63, 68, 71, 78, 107, 121, 138
- [47] S. Hettler, J. Wagner, M. Dries, M. Oster, C. Wacker, R. R. Schröder, und D. Gerthsen. On the role of inelastic scattering in phase-plate transmission electron microscopy. *Ultramicroscopy*, 155:27–41, 2015. ISSN 0304-3991. doi: 10.1016/j.ultramic.2015.04.001. 103
- [48] S. Hettler, M. Dries, J. Zeelen, M. Oster, R. R. Schröder, und D. Gerthsen. High-resolution transmission electron microscopy with an electrostatic Zach phase plate. *New Journal of Physics*, 18(5):053005, 2016. ISSN 1367-2630. doi: 10.1088/1367-2630/18/5/053005. 37
- [49] S. Hettler, E. Kano, M. Dries, D. Gerthsen, L. Pfaffmann, M. Bruns, M. Beleggia, und M. Malac. Charging of carbon thin films in scanning and phase-plate transmission electron microscopy. *Ultramicroscopy*, 184(Pt A):252–266, 2018. ISSN 0304-3991. doi: 10.1016/j.ultramic.2017.09.009. 34, 108

- [50] S. Hettler, J. Onoda, R. Wolkow, J. Pitters, und M. Malac. Charging of electron beam irradiated amorphous carbon thin films at liquid nitrogen temperature. *Ultramicroscopy*, 196:161–166, 2018. ISSN 0304-3991. doi: 10.1016/j.ultramic.2018.10.010. 34, 110
- [51] Hettler, Simon. *Optimierung von Zach-Phasenplatten für die Transmissionselektronenmikroskopie*. Diplomarbeit, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, 2011. 68, 71
- [52] S.-H. Huang, W.-J. Wang, C.-S. Chang, Y.-K. Hwu, F.-G. Tseng, J.-J. Kai, und F.-R. Chen. The fabrication and application of Zernike electrostatic phase plate. *Journal of Electron Microscopy*, 55(6):273–280, 2007. ISSN 0022-0744. doi: 10.1093/jmicro/dfl037. 35
- [53] C. Jönsson. Elektroneninterferenzen an mehreren künstlich hergestellten Feinspalten. *Zeitschrift für Physik*, 161(4):454–474, 1961. ISSN 1434-601X. doi: 10.1007/BF01342460. 10
- [54] K. Kanaya, H. Kawakatsu, K. Itō, und H. Yotsumoto. Experiment on the Electron Phase Microscope. *Journal of Applied Physics*, 29(7):1046–1049, 1958. ISSN 0021-8979. doi: 10.1063/1.1723360. 28
- [55] J. D. Karam und J. W. Drake, editors. *Molecular biology of bacteriophage T4*. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1994. ISBN 1555810640. 115
- [56] M. Khoshouei, M. Radjainia, W. Baumeister, und R. Danev. Cryo-EM structure of haemoglobin at 3.2 Å determined with the Volta phase plate. *Nature Communications*, 8:16099 EP –, 2017. ISSN 2041-1723. doi: 10.1038/ncomms16099. 3, 35
- [57] M. Knoll und E. Ruska. Das Elektronenmikroskop. *Zeitschrift für Physik*, 78(5-6):318–339, 1932. doi: 10.1007/BF01342199. 2
- [58] A. Kotani, K. Harada, M. Malac, M. Salomons, M. Hayashida, und S. Mori. Observation of FeGe skyrmions by electron phase microscopy with hole-free phase plate. *AIP Advances*, 8(5):055216, 2018. ISSN 2158-3226. doi: 10.1063/1.5028398. 35
- [59] J. R. Kremer, D. N. Mastronarde, und J. R. McIntosh. Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *Journal of Structural Biology*, 116(1):71–76, 1996. ISSN 10478477. doi: 10.1006/jsbi.1996.0013. 129
- [60] P. Kurth, S. Pattai, D. Rudolph, J. Overbuschmann, J. Wamser, und S. Irsen. Artifact-Free, Long-Lasting Phase Plate. *Microscopy and Microanalysis*, 20(S3):220–221, 2014. doi: 10.1017/S1431927614002827. 33
- [61] P. G. Leiman, S. Kanamaru, V. V. Mesyazhinov, F. Arisaka, und M. G. Rossmann. Structure and morphogenesis of bacteriophage T4. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 60(11):2356–2370, 2003. ISSN 1420-682X. doi: 10.1007/s00018-003-3072-1. 114

- [62] Y.-L. Liang, M. Khoshouei, M. Radjainia, Y. Zhang, A. Glukhova, J. Tarrasch, D. M. Thal, S. G. B. Furness, G. Christopoulos, T. Coudrat, R. Danev, W. Baumeister, L. J. Miller, A. Christopoulos, B. K. Kobilka, D. Wootten, G. Skiniotis, und P. M. Sexton. Phase-plate cryo-EM structure of a class B GPCR-G-protein complex. *Nature*, 546(7656):118–123, 2017. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/nature22327. 3, 35
- [63] H. Lichte, D. Geiger, und M. Linck. Off-axis electron holography in an aberration-corrected transmission electron microscope. *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences*, 367(1903):3773–3793, 2009. ISSN 1364-503X. doi: 10.1098/rsta.2009.0126. 25
- [64] J. Mahamid, S. Pfeffer, M. Schaffer, E. Villa, R. Danev, L. K. Cuellar, F. Förster, A. A. Hyman, J. M. Plitzko, und W. Baumeister. Visualizing the molecular sociology at the HeLa cell nuclear periphery. *Science*, 351(6276):969–972, 2016. doi: 10.1126/science.aad8857. 3, 35
- [65] E. Majorovits und R. R. Schröder. PHASE PLATE FOR ELECTRON MICROSCOPY AND ELECTRON MICROSCOPIC IMAGING: Patentschrift, 2014. 127
- [66] E. Majorovits, B. Barton, K. Schultheiß, F. Pérez-Willard, D. Gerthsen, und R. Schröder. Optimizing phase contrast in transmission electron microscopy with an electrostatic (Boersch) phase plate. *Ultramicroscopy*, 107(2-3):213–226, 2007. ISSN 0304-3991. doi: 10.1016/j.ultramic.2006.07.006. 127
- [67] M. Malac, M. Beleggia, M. Kawasaki, P. Li, und R. F. Egerton. Convenient contrast enhancement by a hole-free phase plate. *Ultramicroscopy*, 118:77–89, 2012. ISSN 0304-3991. doi: 10.1016/j.ultramic.2012.02.004. 3, 33, 34, 110, 118, 147
- [68] M. Malac, S. Hettler, M. Hayashida, M. Kawasaki, Y. Konyuba, Y. Okura, H. Iijima, I. Ishikawa, und M. Beleggia. Computer simulations analysis for determining the polarity of charge generated by high energy electron irradiation of a thin film. *Micron*, 100:10–22, 2017. doi: 10.1016/j.micron.2017.03.015. 103
- [69] M. Malac, S. Hettler, M. Hayashida, E. Kano, R. F. Egerton, und M. Beleggia. Phase plates in the transmission electron microscope: operating principles and applications. *Microscopy*, 2020. doi: 10.1093/jmicro/dfaa070. 35
- [70] M. Marko, X. Meng, C. Hsieh, J. Roussie, und C. Striemer. Methods for testing Zernike phase plates and a report on silicon-based phase plates with reduced charging and improved ageing characteristics. *Journal of Structural Biology*, 184(2):237–244, 2013. ISSN 10478477. doi: 10.1016/j.jsb.2013.08.008. 32

- [71] M. Marko, C. Hsieh, E. Leith, D. Mastronarde, und S. Motoki. Practical Experience with Hole-Free Phase Plates for Cryo Electron Microscopy. *Microscopy and Microanalysis*, 22(6):1316–1328, 2016. doi: 10.1017/S143192761601196X. 60, 62, 102
- [72] L. Marks. Direct atomic imaging of solid surfaces. *Surface Science*, 139(1):281–298, 1984. ISSN 0039-6028. doi: 10.1016/0039-6028(84)90022-0. 23
- [73] T. Matsumoto und A. Tonomura. The phase constancy of electron waves traveling through Boersch's electrostatic phase plate. *Ultramicroscopy*, 63(1):5–10, 1996. ISSN 0304-3991. doi: 10.1016/0304-3991(96)00033-2. 14, 30, 35
- [74] T. C. Mele. Selective and anisotropic reactive ion etch of LPCVD silicon nitride with CHF₃ based gases. *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures*, 2(4):684, 1984. ISSN 0734211X. doi: 10.1116/1.582863. 54
- [75] P. A. Midgley und R. E. Dunin-Borkowski. Electron tomography and holography in materials science. *Nature materials*, 8(4):271–280, 2009. doi: 10.1038/nmat2406. 130
- [76] H. Minoda, T. Okabe, und H. Iijima. Contrast enhancement in the phase plate transmission electron microscopy using an objective lens with a long focal length. *Journal of Electron Microscopy*, 60(5):337–343, 2011. ISSN 0022-0744. doi: 10.1093/jmicro/dfr067. 10
- [77] G. Möllenstedt und H. Düker. Beobachtungen und Messungen an Biprisma-Interferenzen mit Elektronenwellen. *Zeitschrift für Physik*, 145(3):377–397, 1956. ISSN 1434-601X. doi: 10.1007/BF01326780. 10
- [78] M. Obermair, S. Hettler, C. Hsieh, M. Dries, M. Marko, und D. Gerthsen. Analyzing contrast in cryo-transmission electron microscopy: Comparison of electrostatic Zach phase plates and hole-free phase plates. *Ultramicroscopy*, 218:113086, 2020. ISSN 0304-3991. doi: 10.1016/j.ultramic.2020.113086. 101, 105, 107, 109, 110, 113, 117, 119, 122, 124, 126, 129, 131, 158
- [79] D. F. Parsons und H. M. Johnson. Possibility of a phase contrast electron microscope. *Applied optics*, 11(12):2840–2843, 1972. ISSN 1559-128X. doi: 10.1364/AO.11.002840. 28
- [80] R. Pretzsch, M. Dries, S. Hettler, M. Spiecker, M. Obermair, und D. Gerthsen. Investigation of hole-free phase plate performance in transmission electron microscopy under different operation conditions by experiments and simulations. *Advanced Structural and Chemical Imaging*, 5(1):20, 2019. doi: 10.1186/s40679-019-0067-z. 34, 111, 118
- [81] Pretzsch, Rebecca. *Physikalische Grundlagen der Funktion von lochfreien Dünnfilmphasenplatten für die Transmissionselektronenmikroskopie*. Masterarbeit, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, 2018. 20, 60, 61, 98, 157

- [82] L. Reimer. *Scanning Electron Microscopy: Physics of Image Formation and Microanalysis*, volume 45 of *Springer series in optical sciences*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, second completely revised and updated edition, 1998. ISBN 9783540389675. doi: 10.1007/978-3-540-38967-5. 45
- [83] L. Reimer und H. Kohl. *Transmission Electron Microscopy: Physics of Image Formation*, volume 36 of *Springer series in optical sciences*. Springer, New York, NY, 5. edition, 2008. ISBN 978-0-387-34758-5. 5, 15
- [84] N. W. M. Ritchie. A new Monte Carlo application for complex sample geometries. *Surface and Interface Analysis*, 37(11):1006–1011, 2005. ISSN 0142-2421. doi: 10.1002/sia.2093. 159
- [85] A. Rosenauer und M. Schowalter. STEMSIM—a New Software Tool for Simulation of STEM HAADF Z-Contrast Imaging. In A. G. Cullis und P. A. Midgley, editors, *Microscopy of Semiconducting Materials 2007*, volume 120 of *Springer Proceedings in Physics*, pages 170–172. Springer Netherlands, Dordrecht, 2008. ISBN 978-1-4020-8614-4. doi: 10.1007/978-1-4020-8615-1_36. 105
- [86] O. Scherzer. The theoretical resolution limit of the electron microscope. *Journal of Applied Physics*, 20(1):20–29, 1949. ISSN 0021-8979. doi: 10.1063/1.1698233. 2, 22
- [87] G. Schimmel und W. Vogell. *Methodensammlung der Elektronenmikroskopie: Methods of electron microscopy*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1970-1984. ISBN 3-8047-0593-6. 55
- [88] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, und A. Cardona. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, 9(7):676–682, 2012. doi: 10.1038/nmeth.2019. 129
- [89] R. R. Schröder, B. Barton, H. Rose, und G. Benner. Contrast Enhancement by Anamorphic Phase Plates in an Aberration Corrected TEM. *Microscopy and Microanalysis*, 13 (S03), 2007. ISSN 1431-9276. doi: 10.1017/S143192760708004X. 37
- [90] K. Schultheiß, J. Zach, B. Gamm, M. Dries, N. Frindt, R. R. Schröder, und D. Gerthsen. New electrostatic phase plate for phase-contrast transmission electron microscopy and its application for wave-function reconstruction. *Microscopy and Microanalysis*, 16(6):785–794, 2010. doi: 10.1017/S1431927610093803. 3, 36, 63, 147
- [91] K. Schultheiß, F. Pérez-Willard, B. Barton, D. Gerthsen, und R. R. Schröder. Fabrication of a Boersch phase plate for phase contrast imaging in a transmission electron

- microscope. *Review of Scientific Instruments*, 77(3):033701, 2006. ISSN 0034-6748. doi: 10.1063/1.2179411. 30, 35
- [92] H. Seidel, L. Csepregi, A. Heuberger, und H. Baumgärtel. Anisotropic Etching of Crystalline Silicon in Alkaline Solutions: I . Orientation Dependence and Behavior of Passivation Layers. *Journal of The Electrochemical Society*, 137(11):3612–3626, 1990. ISSN 0013-4651. doi: 10.1149/1.2086277. 54
- [93] J. Shiue, C.-S. Chang, S.-H. Huang, C.-H. Hsu, J.-S. Tsai, W.-H. Chang, Y.-M. Wu, Y.-C. Lin, P.-C. Kuo, Y.-S. Huang, Y. Hwu, J.-J. Kai, F.-G. Tseng, und F.-R. Chen. Phase TEM for biological imaging utilizing a Boersch electrostatic phase plate: theory and practice. *Journal of Electron Microscopy*, 58(3):137–145, 2009. ISSN 0022-0744. doi: 10.1093/jmicro/dfp006. 35
- [94] A. H. Tavabi, M. Beleggia, V. Migunov, A. Savenko, O. Öktem, R. E. Dunin-Borkowski, und G. Pozzi. Tunable Ampere phase plate for low dose imaging of biomolecular complexes. *Scientific reports*, 8(1):5592, 2018. doi: 10.1038/s41598-018-23100-3. 106
- [95] Thess, Lee, Nikolaev, Dai, Petit, Robert, Xu, Kim, Rinzler, Colbert, Scuseria, Tomanek, Fischer, und Smalley. Crystalline Ropes of Metallic Carbon Nanotubes. *Science*, 273 (5274):483–487, 1996. doi: 10.1126/science.273.5274.483. 140
- [96] A. Tonomura. *Electron Holography*, volume 70 of *Springer series in optical sciences*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, second, enlarged edition, 1999. ISBN 978-3-642-08421-8. doi: 10.1007/978-3-540-37204-2. 111
- [97] D. Tschumperlé und R. Deriche. Vector-valued image regularization with PDEs: a common framework for different applications. *IEEE transactions on pattern analysis and machine intelligence*, 27(4):506–517, 2005. ISSN 0162-8828. doi: 10.1109/TPAMI.2005.87. 130
- [98] T. Volkenandt, E. Müller, und D. Gerthsen. Sample thickness determination by scanning transmission electron microscopy at low electron energies. *Microscopy and Microanalysis*, 20(1):111–123, 2014. doi: 10.1017/S1431927613013913. 47, 94, 159
- [99] G. Wagner. P. R. Buseck, J. M. Cowley, L. Eyring. High-Resolution Transmission Electron Microscopy and Associated Techniques. Oxford University Press, Inc. 1992. Price £ 27.50. ISBN 0-19-507262-6 (pbk.) and ISBN 0-19-504275-1. *Crystal Research and Technology*, 28(5):628, 1993. ISSN 02321300. doi: 10.1002/crat.2170280510. 21
- [100] M. Wanner, D. Bach, D. Gerthsen, R. Werner, und B. Tesche. Electron holography of thin amorphous carbon films: Measurement of the mean inner potential and a

- thickness-independent phase shift. *Ultramicroscopy*, 106(4-5):341–345, 2006. ISSN 0304-3991. doi: 10.1016/j.ultramic.2005.10.004. 111, 112, 159
- [101] A. Weickenmeier und H. Kohl. Computation of absorptive form factors for high-energy electron diffraction. *Acta Crystallographica Section A Foundations of Crystallography*, 47(5):590–597, 1991. ISSN 0108-7673. doi: 10.1107/S0108767391004804. 12
- [102] A. Weickenmeier, W. Nüchter, und J. Mayer. Quantitative characterization of point spread function and detection quantum efficiency for a YAG scintillator slow scan CCD camera. *Optik*, 99:147–154, 1995. 25
- [103] D. Willasch. High resolution electron microscopy with profiled phase plates. *Optik*, (44):17–36, 1975. 14
- [104] D. B. Williams und C. B. Carter. *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science*. Springer, New York, 2. edition, 2009. 5, 8, 18, 20, 21
- [105] M. L. Yap und M. G. Rossmann. Structure and function of bacteriophage T4. *Future microbiology*, 9(12):1319–1327, 2014. doi: 10.2217/fmb.14.91. 114
- [106] M. L. Yap, T. Klose, F. Arisaka, J. A. Speir, D. Veesler, A. Fokine, und M. G. Rossmann. Role of bacteriophage T4 baseplate in regulating assembly and infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(10):2654–2659, 2016. doi: 10.1073/pnas.1601654113. 115
- [107] F. Zernike. Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects. *Physica*, 9(7):686–698, 1942. ISSN 00318914. doi: 10.1016/S0031-8914(42)80035-X. 1, 28

Liste der Veröffentlichungen

Publikationen in Fachzeitschriften

- S. Hettler, M. Dries, P. Hermann, M. Obermair, D. Gerthsen, und M. Malac. Carbon contamination in scanning transmission electron microscopy and its impact on phase-plate applications. *Micron*, 96:38–47, 2017. doi: 10.1016/j.micron.2017.02.002.
- M. Dries, M. Obermair, S. Hettler, P. Hermann, K. Seemann, F. Seifried, S. Ulrich, R. Fischer, und D. Gerthsen. Oxide-free aC/Zr_{0.65}Al_{0.075}Cu_{0.275}/aC phase plates for transmission electron microscopy. *Ultramicroscopy*, 189:39–45, 2018. doi: 10.1016/j.ultramic.2018.03.003.
- R. Pretzsch, M. Dries, S. Hettler, M. Spiecker, M. Obermair, und D. Gerthsen. Investigation of hole-free phase plate performance in transmission electron microscopy under different operation conditions by experiments and simulations. *Advanced Structural and Chemical Imaging*, 5(5):1–11, 2019. doi: 10.1186/s40679-019-0067-z.
- M. Obermair, S. Hettler, C. Hsieh, M. Dries, M. Marko, und D. Gerthsen. Analyzing contrast in cryo-transmission electron microscopy: Comparison of electrostatic Zach phase plates and hole-free phase plates. *Ultramicroscopy*, 218:113086, 2020. doi: 10.1016/j.ultramic.2020.113086.

Konferenzbeiträge

- S. Hettler, M. Obermair, M. Dries, M. Oster, R. R. Schröder, und D. Gerthsen. Electrostatic Zach phase plates for transmission electron microscopy: Status and future investigations. *43rd MSC Annual Meeting 2016*, Edmonton (AB), Kanada, 07. – 10. Juni 2016.

- M. Obermair, S. Hettler, M. Dries, und D. Gerthsen. Electrostatic Zach Phase Plates for Transmission Electron Microscopy: Status and Future Investigations. *Microscopy & Microanalysis 2017*, St. Louis (MO), USA, 06. – 10. August 2017. *Microscopy and Microanalysis*, 23(S1):828–829, 2017. doi: 10.1017/S1431927617004809.
- S. Hettler, P. Hermann, M. Dries, M. Obermair, D. Gerthsen, und M. Malac. Contamination and Charging of Amorphous Thin Films Suitable as Phase Plates for Phase-Contrast Transmission Electron Microscopy. *Microscopy & Microanalysis 2017*, St. Louis (MO), USA, 06. – 10. August 2017. *Microscopy and Microanalysis*, 23(S1):830–831, 2017. doi: 10.1017/S1431927617004810.
- M. Dries, M. Obermair, S. Hettler, P. Hermann, K. Seemann, F. Seifried, S. Ulrich, und D. Gerthsen. Thin-film phase plates for transmission electron microscopy fabricated from metallic glass alloys. *Microscopy Conference 2017*, Lausanne, Schweiz, 21. – 25. August 2017. *Proceedings*, IM7.003:761–762, 2017.
- S. Hettler, M. Dries, P. Hermann, P. Hermann, M. Obermair, D. Gerthsen, und M. Malac. Contamination and charging of amorphous thin films in a transmission electron microscope. *Microscopy Conference 2017*, Lausanne, Schweiz, 21. – 25. August 2017. *Proceedings*, IM7.P003:771–773, 2017.
- M. Obermair, S. Hettler, C. Hsieh, M. Marko, und D. Gerthsen. Maximizing contrast in cryo-transmission electron microscopy with physical phase plates. *Q-Sort Conference 2018*, Jülich, Deutschland, 27. – 30. Mai 2018.
- M. Obermair, S. Hettler, M. Marko, C. Hsieh, und D. Gerthsen. Phase plates for phase contrast enhancement in cryo-TEM: electrostatic Zach phase plate vs. hole free phase plate. *Holography Workshop 2018*, Berlin-Zeuthen, Deutschland, 26. – 28. Juni 2018.
- R. Pretzsch, M. Dries, S. Hettler, M. Obermair, und D. Gerthsen. Physical properties of hole-free phase plates for TEM. *Holography Workshop 2018*, Berlin-Zeuthen, Deutschland, 26. – 28. Juni 2018.
- M. Obermair, M. Marko, S. Hettler, C. Hsieh, und D. Gerthsen. Physical Phase Plates for Cryo-Electron Microscopy of Biological Specimens: Comparison of Hole-Free Phase Plates and Zach Electrostatic Phase Plates. *Microscopy & Microanalysis 2018*, Baltimore (MD), USA, 05. – 09. August 2018. *Microscopy and Microanalysis*, 24(S1):892–893, 2018. doi: 10.1017/S1431927618004956.
- Ausgezeichnet mit dem IMC19 People's Choice Award (Oral Presentation): M. Obermair, S. Hettler, M. Dries, C. Hsieh, M. Marko, und D. Gerthsen. Comparison

of Hole-Free Phase Plates and Electrostatic Zach Phase Plates for Cryo-Electron Microscopy of Biological Specimens. *19th International Microscopy Congress 2018*, Sydney, Australien, 09. – 14. September 2018. *Proceedings*, 249–250, 2018.

- R. Pretzsch, M. Dries, S. Hettler, M. Obermair, und D. Gerthsen. Investigation of parameters that influence the performance of a hole-free phase plate and its application on a carbon nanotube sample. *19th International Microscopy Congress 2018*, Sydney, Australien, 09. – 14. September 2018. *Proceedings*, 269–270, 2018.
- C. Kramberger, S. Löffler, T. Schachinger, P. Hartel, P. Lu, J. Barthel, R. Dunin-Borkowski, M. Obermair, D. Gerthsen, und P. Schattschneider. Pure Electron Vortex Beams from a Cylindrical Mode Converter. *19th International Microscopy Congress 2018*, Sydney, Australien, 09. – 14. September 2018. *Proceedings* 453, 2018.
- M. Obermair, S. Hettler, und D. Gerthsen. Gradual Zernike phase plates for phase contrast imaging with reduced fringing artifacts in transmission electron microscopy. *Microscopy Conference 2019*, Berlin, Deutschland, 01. – 05. September 2019. *Proceedings* IM2.P017:434–435, 2019.
- M. Obermair, S. Hettler, C. Hsieh, M. Dries, M. Marko, und D. Gerthsen. Cryo-transmission electron microscopy with Zach phase plates in experiment and simulation. *Microscopy Conference 2019*, Berlin, Deutschland, 01. – 05. September 2019. *Proceedings* IM2.P018:436–437, 2019.

Geräte

- Transmissionselektronenmikroskope

JEOL JEM-3200	Transmissionselektronenmikroskop JEOL JEM-3200FSC/PP FEG, 100, 200 und 300 kV, Ω -Energiefilter 4K K2 Summit direct detection camera (Gatan, Pleasanton, CA, USA) 4k CCD-Kamera (TVIPS, D-Gauting) JEOL, Akishima, Japan
Philips CM200	Transmissionselektronenmikroskop Philips CM200 FEG/ST FEG, 200 kV 4k CCD-Kamera (TVIPS, D-Gauting) Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma, USA

- Rasterelektronenmikroskope, FIB und Lichtmikroskope

Zeiss Gemini 1540	Rasterelektronenmikroskop Zeiss Gemini 1540 FEG, bis zu 30 kV, SE- und <i>In-Lens</i> - Detektor EDXS Noran System Six (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) Carl Zeiss GmbH, D-Oberkochen
Zeiss Supra 55VP	Rasterelektronenmikroskop Zeiss Supra 55VP FEG, bis zu 30 kV, SE- und <i>In-Lens</i> -Detektor ESL-Einheit Raith Elphy Plus (Raith GmbH, D-Dortmund) Carl Zeiss GmbH, D-Oberkochen
Zeiss XBeam 1540	Rasterelektronenmikroskop mit integrierter FIB Zeiss XBeam 1540 FEG und <i>Ga</i> -Quelle, bis zu 30 kV, SE- und <i>In-Lens</i> - Detektor ESL-Einheit Raith Elphy Plus (Raith GmbH, D-Dortmund) Carl Zeiss GmbH, D-Oberkochen
FEI Strata 400	Rasterelektronenmikroskop mit integrierter FIB FEI Strata 400 FEG und <i>Ga</i> -Quelle, bis zu 30 kV, SE- und <i>Through-Lens</i> -Detektor Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma, USA

FEI Helios G4 FX	Rasterelektronenmikroskop mit integrierter FIB FEI Helios G4 FX FEG und <i>Ga</i> -Quelle, bis zu 30 kV, SE- und <i>Through-Lens</i> -Detektor
	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma, USA
Zeiss Axio	Lichtmikroskop Zeiss Axio Imager.M1m
	Carl Zeiss GmbH, D-Oberkochen
Zeiss Stemi	Stereolupe Zeiss Stemi SV11
	Carl Zeiss GmbH, D-Oberkochen
<ul style="list-style-type: none">• Mikrofabrikation und Sonstiges	
Lesker PVD75	Elektronenstrahlverdampfer Lesker PVD75
	Kurt J. Lesker Company, Hastings, UK
Cressington 108	Kohlenstoffbeschichter Cressington 108carbon/A
	Cressington Scientific Instruments Ltd, Watford, UK
Denton Desktop Turbo	Kohlenstoffbeschichter Denton Desktop Turbo
	Denton Vacuum, Moorestown, NJ, USA
Bal-Tec MED 020	Kohlenstoffbeschichter Baltec MED 020
	Leica Mikrosysteme GmbH, D-Wetzlar
Oxford Plasmalab 80	PECVD-Anlage Oxford Plasmalab 80 Plus
	Oxford Instruments plc, Abington, UK
Sentech Si 220	RIE-Anlage Sentech Si 220
	Sentech Instruments GmbH, D-Berlin
Lackschleuder	Lackschleuder Polos Spin150i
	SPS-Europe B.V., Putten, Niederlande
HIMT DWL 66	Maskenschreiber HIMT DWL 66
	Heidelberg Instruments Mikrotechnik GmbH, D-Heidelberg
Süss MA6	Maskenausrichter Süss MA6
	Süss MicroTec SE, D-Garching
Plasmareiniger	Plasmareinigungsquelle Pico mit O_2
	Diener electronic GmbH & Co.KG, D-Ebhausen
Keithley SM 2400	Präzisionsspannungsquelle
	Keithley, Cleveland, OH, USA
Kleindiek MM3A-EM	Piezogetriebenes Mikropositionierungssystem Kleindiek MM3A-EM
	Kleindiek Nanotechnik GmbH, D-Reutlingen

Chemikalien und Materialien

aC

Amorpher Kohlenstoff (Amorphous Carbon)

Ag

Silber

Al

Aluminium

Al₂O₃

Aluminiumoxid

Au

Gold

AZ 726 MiF

AZ®726 metallionenfreier (MIF) Entwickler

Merck Performance Materials GmbH, D-Wiesbaden

C

Kohlenstoff

CHF₃

Fluorchlorkohlenwasserstoff

Cr

Chrom

Cu

Kupfer

E-Solder 3021

Leitfähiger 2-Komponentenklebstoff auf Epoxid- und
Ag-Basis

Epoxy Produkte GmbH, D-Absberg

LaB₆

Lanthanhexaborid

G1-Epoxykleber

Nicht-leitfähiger Klebstoff auf Epoxid-Basis
Gatan Inc., Pleasanton, CA, USA

Ga

Gallium

Glimmer

Mineralgruppe aus den Schichtsilikaten
Plano GmbH, D-Wetzlar; Art.-Nr. 54

H₂O

Wasser

H₂O₂

Wasserstoffperoxid

HCl

Salzsäure

HClO₄

Perchlorsäure

He

Helium

HNO₃

Salpetersäure

IPA	Isopropanol
<i>K</i>	Kalium
<i>KOH</i>	Kaliumhydroxid
MF-319 Developer	Organisches Lösungsmittel Rohm and Haas Electronic Materials LLC, Marlborough, MA, USA; Microposit™MF™-319 Developer
MIBK	$C_6H_{12}O$ - Isobutylmethylketon (Rotipuran® \geq 99%, p.a.) Carl Roth GmbH + Co. KG, D-Karlsruhe; Art.-Nr. 0338
N_2	Stickstoff
<i>Ni</i>	Nickel
$(NH_4)_2 [Ce(NO_3)_6]$	Ammoniumcernitrat
O_2	Sauerstoff
<i>Pb</i>	Blei
PMMA 950K	Polymethylmethacrylat gelöst in Ethyllactat
<i>Pt</i>	Platin
Remover 300-70	Organisches Lösungsmittel Allresist GmbH, D-Strausberg; Art.-Nr. AR 300-70
<i>Si</i>	Silizium
Si_3N_4	Siliziumnitrid
SiO_2	Siliziumdioxid
SiH_4	Silan
Silberleitkleber 8331	Leitfähiger 2-Komponentenklebstoff auf Epoxid- und <i>Ag</i> -Basis M.G. Chemicals, Ontario, Kanada
<i>Ti</i>	Titan
TI 35ES	Fotolack TI 35ES MicroChemicals GmbH, D-Ulm
$C_4H_6O_6U$	Uranylacetat Kontrastmittel zur Kontrastierung biologischer Proben
<i>W</i>	Wolfram

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertation am Laboratorium für Elektronenmikroskopie (LEM) des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) beigetragen und mir während der Anfertigung mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Zunächst möchte ich mich sehr herzlich bei Prof. Dagmar Gerthsen für die hervorragende Betreuung bedanken. Aus regelmäßigen gemeinsamen Besprechungen ergaben sich stets neue Anstöße für weiterführende Experimente oder neue Ansätze für die Auswertung der Ergebnisse. Zudem bedanke ich mich vielmals für die Ermöglichung, den Fortschritt meiner Arbeit auf zahlreichen nationalen und internationalen Konferenzen zu präsentieren.

Prof. Rasmus R. Schröder vom Bioquant der Universität Heidelberg danke ich vielmals für die Übernahme des Korreferats.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Simon Hettler und Dr. Manuel Dries, die mich bei der Einarbeitung in das Themengebiet der Elektronenmikroskopie und der Phasenplatten tatkräftig unterstützt haben. Auch nach ihrer Zeit am LEM hatten sie immer ein offenes Ohr für mich und konnten durch ihre große Erfahrung und Hilfsbereitschaft immer wieder zum Verständnis meiner experimentellen Ergebnisse beitragen. Ebenso ein großer Dank für die zahlreichen Diskussionen zur Bildsimulation.

Bei Michael Marko möchte ich mich für die freundschaftliche Aufnahme in seinem Elektronenmikroskopielabor am Wadsworth Center des New York State Department of Health in Albany (NY, USA) bedanken. Während meines Forschungsaufenthaltes brachte er mir viel über die Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie bei und ermöglichte mir die Untersuchung von Phasenkontrast durch Phasenplatten anhand lebenswissenschaftlicher Kryo-Proben. Auch über die Zeit am Labor hinaus, war er stets bemüht meinen Aufenthalt in Albany möglichst angenehm zu gestalten. Besonderer Dank gilt auch Chyongere Hsieh für die Einarbeitung an den Mikroskopen und die Probenpräparation. Des Weiteren möchte ich dem Karlsruhe House of Young Scientists (KHYS) für die Förderung des Auslandsaufenthaltes herzlich danken.

Winfried Send danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Implementierung des piezogetriebenen Phasenplattenhalters in das Philips CM200. Seine herausragende Kenntnis über den Aufbau des Transmissionselektronenmikroskops und sein bemerkenswertes handwerkliches Geschick trugen maßgeblich zum Gelingen des Projektes bei.

Danksagung

Bei Patrice Brenner und Dr. Aina Quintilla bedanke ich mich für die stets schnelle Hilfe bei Problemen mit den Geräten des Nanostructure Service Laboratory, die mir die Herstellung der verwendeten Phasenplatten erleichtert hat.

Milena Hugenschmidt danke ich herzlich für ihren freiwilligen Einsatz, mir bei der Dickenbestimmung von Kohlenstofffilmen zu helfen.

Bei den Kollegen aus meinem Büro, Nadja Firman und Volker Zibat, möchte ich mich für die zahlreichen guten Gespräche und das Studentenfutter bedanken. Von ihren langjährigen Erfahrungen in der Probenpräparation und der Rasterelektronenmikroskopie durfte ich viel lernen.

Bei Rita Sauter und Michaela Jürgens bedanke ich mich für all die bürokratischen Dinge, die sie mir im Laufe der Zeit am LEM abgenommen haben und das allzeit offene Ohr für alle Arten von Problemen.

Allen aktuellen und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen des LEM danke ich herzlich für die schöne Zeit und die Gemeinschaft, die durch zahlreiche Aktivitäten und die Kaffeerunde gepflegt wurde.

Abschließend möchte ich mich von Herzen bei meinen Eltern und Brüdern bedanken, die mich in den Jahren des Studiums und der Promotion stets unterstützt und motiviert haben. Ein ganz besonderer Dank geht schließlich an meine Frau Andrea für ihre Liebe und den Rückhalt, den sie mir immer wieder gibt.