(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
27. April 2006 (27.04.2006)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2006/042746 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
G01N 21/45 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/011218

(22) Internationales Anmeldedatum:
19. Oktober 2005 (19.10.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102004051098.9 19. Oktober 2004 (19.10.2004) DE
102005015030.6 31. März 2005 (31.03.2005) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **UNIVERSITÄT TÜBINGEN** [DE/DE]; Wilhelmstrasse 5, 72074 Tübingen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **FRANK, Rüdiger** [DE/DE]; Fliederstrasse 8, 72401 Haigerloch (DE). **MÖHRLE, Bernd** [DE/DE]; Quenstedtstrasse 12, 72076 Tübingen (DE). **GAUGLITZ, Günter** [DE/DE]; Panoramastrasse 54, 72070 Tübingen (DE).

(74) Anwalt: **PATENTANWÄLTE RUFF, WILHELM, BEIER, DAUSTER & PARTNER**; Kronenstrasse 30, 70174 Stuttgart (DE).

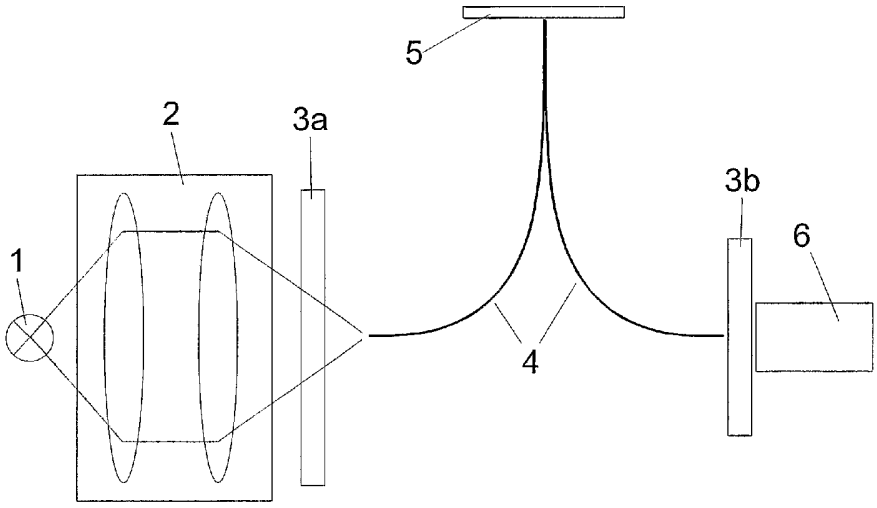
(81) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR EXAMINING PHYSICAL, CHEMICAL AND BIOCHEMICAL INTERACTIONS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR UNTERSUCHUNG PHYSIKALISCHER, CHEMISCHER UND BIOCHEMISCHER WECHSELWIRKUNGEN



(57) Abstract: The invention relates to a method for marker-free examination of physical, chemical and/or biochemical reactions, bonding and addition or other interactions in/or on a thin layer. According to said method the detection of a range consisting of several wavelengths, as carried out in a known manner, on the base of reflection measuring is reduced to the detection of one wavelength. The measurement of the intensity modification of a light fraction reflected on the thin layer taken place as a result of interactions in/or on the thin layer is carried out for one wavelength in order to evaluate the measurement results. Said wavelength preferably corresponds to a wavelength whose light intensity modification is maximum after a reaction or interaction carried out on the thin layer. The optimal measuring wavelength depends on the thin layer properties, in particular on the optical thickness thereof and the properties of a carrier to which said thin layer is applicable and on the angle of incidence and polarisation of incident light on the thin layer. A device for carrying out said method is also disclosed.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2006/042746 A1

TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Veröffentlicht:

— *mit internationalem Recherchenbericht*

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur markierungsfreien Unter-suchung physikalischer, chemischer und/oder biochemischer Reaktionen, Bindungs- und Anlagerungsvorgängen oder sonstiger Wechselwirkungen in oder an einer dünnen Schicht. Bei diesem Verfahren wird die bekannte auf Reflexionsmessungen basierende Detektion von einem Spektrum, bestehend aus mehreren Wellenlängen, erfindungsgemäss auf die Detektion nur einer einzigen Wellenlänge reduziert. Die Messung der Änderung der Intensität des an der dünnen Schicht reflektierten Lichtanteils als Folge von stattgefunde-nen Wechselwirkungen in oder an der dünnen Schicht erfolgt dann bei einer für die Auswertung der Meßergebnisse optimalen Wellenlänge. Diese ent-spricht vorzugsweise einer Wellenlänge, bei der die Änderung der Lichtinten-sität nach einer erfolgten Reaktion oder Wechselwirkung an oder in der dün-nen Schicht am grössten ist. Die für die Messung optimale Wellenlänge hängt zum einen von den Eigenschaften der dünnen Schicht, insbesondere ihrer optischen Dicke, sowie den Eigenschaften des Trägers, auf dem die dünne Schicht angeordnet sein kann, ab. Zum anderen hängt die optimale Wellen-länge vom Einfallswinkel und der Polarisierung des auf die dünne Schicht einfallenden Lichtes ab. Die vorliegende Erfindung betrifft ferner eine Vorrich-tung zur Durchführung des beschriebenen Verfahrens.

Beschreibung

Verfahren zur Untersuchung physikalischer, chemischer und biochemischer Wechselwirkungen

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur zeitaufgelösten markierungsfreien Untersuchung physikalischer, chemischer und/oder biochemischer Reaktionen, Bindungs- und Anlagerungsvorgängen oder sonstiger Wechselwirkungen in oder an einer dünnen Schicht. Die Erfindung bezieht sich weiter auf eine Vorrichtung zur zeitaufgelösten markierungsfreien Untersuchung physikalischer, chemischer und/oder biochemischer Reaktionen, Bindungs- und Anlagerungsvorgängen oder sonstiger Wechselwirkungen in oder an einer dünnen Schicht.

Dem in der vorliegenden Erfindung beschriebenen Verfahren liegt ein sogenannter Effekt der Optik dünner Schichten zugrunde. Vereinfacht läßt sich der verwendete Effekt durch die diesen Stand der Technik wiedergebende Abbildung 1 darstellen. In diesem Fall liegt als Schichtsystem ein Träger 1 (z. B. aus Glas, aus einem speziell beschichteten Glas oder aus Kunststoff), eine darauf aufgetragene dünne Schicht 2 (die „selektive" Schicht, an der der Effekt gemessen wird) und ein an diese Schicht angrenzendes optisches Medium 3 (z. B. eine Flüssigkeit oder ein Gas) vor. Der beobachtete Effekt ist eine von der Wellenlänge des Lichts und der Dicke der (selektiven) dünnen Schicht abhängige Intensität des reflektierten Lichts.

Ein Verfahren zum Nachweis physikalischer, chemischer und/oder biochemischer Reaktionen und Wechselwirkungen basierend auf dem gleichen Prinzip ist z. B. aus DE 198 30 727 bekannt. Bei diesem Verfahren werden mit RIfS (Reflektometrische Interferenzspektroskopie) markierungsfreie optische Bindungsvorgänge mit qualitativ gutem Ergebnis

beobachtet. Allerdings müssen hierzu spezielle optisch vergütete und damit teure Träger benutzt werden. Außerdem ist das Verfahren relativ aufwendig in der Handhabung und läßt eine Parallelisierung der Messung sowie eine Miniaturisierung des Meßaufbaus nur eingeschränkt zu.

Mit SPR (Surface Plasmon Resonance) werden im Prinzip die gleichen Vorgänge beobachtet, allerdings müssen die Träger aufgrund des physikalischen Funktionsprinzips mit einem Metallfilm beschichtet werden. In den allermeisten Fällen wird dabei Gold oder Silber verwendet (siehe Nylander et, al, Sens. Actuators B 3 (1982) 79-88; Liedberg et. al., Sens. Actuators B 4 (1983) 299-304; Homola et. al., Sens. Actuators B 54 (1999) 3-15; Melendez et. al., Sens. Actuators B 38/39 (1997) 375-379).

Bekannte integrierte optische Methoden wie das Mach-Zehnder- oder Young-Interferometer sind technisch sehr aufwendig und teuer, da die Träger mit Wellenleiterstrukturen versehen werden müssen (siehe J. Ingenhoff et al., Fresenius J. Anal. Chem., 346 (1993) 580; B. Drapp et. al., Sensors and Actuators B 38-39 (1997) 277; P.V. Lambeck et. al., Medical and Biological Engeneering and Computing, Vol. 34, Suppl. 1 (1996), 145-148; A. Brandenburg et. al., O.S. Wolfbeis, ed., Proc. SPIE 1510, (1991) 148-159).

Der Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zum Nachweis physikalischer, chemischer und/oder biochemischer Reaktionen, Bindungs- und Anlagerungsvorgängen oder sonstiger Wechselwirkungen in oder an dünnen Schichten bereitzustellen, bei dem die Meßergebnisse weitgehend unabhängig vom Trägermaterial sind, das eine Parallelisierung der Messung und eine Miniaturisierung des Meßaufbaus ermöglicht, und bei dem die Meßergebnisse wesentlich schneller und einfacher als bei bekannten Verfahren, praktisch on-line, ausgewertet werden können.

Diese Aufgabe wird durch das Verfahren mit den Merkmalen des Anspruches 1 sowie durch die Vorrichtung mit den Merkmalen des Anspruches 19 gelöst. Bevorzugte Ausführungsformen des Verfahrens sind in den abhängigen Ansprüchen 2 bis 18 dargestellt. Der Wortlaut sämtlicher Ansprüche wird hiermit durch Bezugnahme zum Inhalt dieser Beschreibung gemacht.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe dadurch gelöst, daß die bisher bekannte, auf Reflexionsmessungen basierende Detektion von einem Spektrum, bestehend aus mehreren Wellenlängen, auf die Detektion nur einer einzigen Wellenlänge reduziert wird.

Praktisch wird dies dadurch erreicht, daß die dünne Schicht mittels einer Lichtquelle mit Licht bestrahlt und der an der dünnen Schicht reflektierte Strahlungsanteil an einem Detektor gemessen wird. Dabei sind die Anordnung und die Beschaffenheit der Lichtquelle und gegebenenfalls des mindestens einen zwischen der Lichtquelle und dem Detektor positionierten Monochromators so gewählt, daß am Detektor monochromatisches Licht einer einzigen Wellenlänge (oder eines sehr schmalen Spektrums) ankommt. Dies kann z. B. dadurch erzielt werden, daß die verwendete Lichtquelle gleich monochromatisches Licht ausstrahlt, so daß auf die Verwendung von Monochromatoren verzichtet werden kann. Als monochromatische Lichtquelle können insbesondere Leuchtdioden (LED), Laserdioden oder Laser verwendet werden. Anstelle eines Monochromators kann auch jede spektral auflösende Vorrichtung, insbesondere ein Interferenzgitter oder eine Prisma verwendet werden.

Wenn eine polychromatische Lichtquelle benutzt wird, wird ihr, dem Strahlengang folgend, mindestens ein Monochromator nachgeordnet. Der Monochromator kann in diesen Fällen wiederum entweder vor (siehe auch 3a, Abb. 2) oder hinter (siehe auch 3b, Abb. 2) der dünnen Schicht angeordnet werden. Wichtig ist hierbei, daß erfindungsgemäß am Detektor das Licht einer einzigen Wellenlänge ankommt. Unter ei-

nem Detektor wird hier eine Vorrichtung verstanden, die Licht in eine meßbare Größe, z. B. in elektrischen Strom umwandelt.

Das auf die dünne Schicht einfallende Licht kann erfindungsgemäß über Einkoppelelemente geleitet werden. Zu diesen gehören bevorzugt Linsen, Linsensysteme, Spiegel oder vorzugsweise Lichtleiter, z. B. faseroptische Wellenleiter. Ebenso können statt Einsatz von Einkoppelelementen auch entsprechende Freistrahlaufbauten realisiert werden.

Unter dem Begriff „dünne Schicht" wird in der vorliegenden Erfindung eine Schicht verstanden, deren Dicke vorzugsweise zwischen 0,1 nm und 100 µm, insbesondere zwischen 10 nm und 2.000 nm, liegt. Die dünne Schicht besteht immer aus einer sensitiven (der selektiven) Schicht, deren Dicke und/oder Dichte sich nach einer erfolgten Reaktion, Bindung oder sonstigen Wechselwirkungen ändert, wobei es gilt, diese Dicken- und/oder Dichteänderung zu bestimmen. Die dünne Schicht kann außer der sensitiven zusätzlich weitere Schichten beinhalten, deren Dicke sich bevorzugt durch erfolgte Reaktion, Bindung oder sonstige Wechselwirkungen nicht ändert. Diese zusätzlichen Schichten können einer besseren Haftung der sensitiven Schicht auf einem Träger dienen oder zur Kopplung mit anderen Analysemethoden oder zur Änderung der optischen Eigenschaften des Schichtsystems verwendet werden.

Die zu untersuchende dünne Schicht kann in einer besonders bevorzugten Ausführungsvariante auf einem festen Träger angeordnet sein. Die Ausrichtung der dünnen Schicht auf dem Träger kann sowohl der einfallenden Strahlung zu- als auch abgewandt sein. Im zweiten Fall muß das Trägermaterial zumindest teilweise für das Licht der verwendeten Wellenlänge durchlässig sein.

Die dünne Schicht kann bei der Messung im Bezug zur einfallenden Lichtstrahlung in einem Winkel kleiner 90 ° positioniert sein. Vorzugsweise ist die dünne Schicht senkrecht (90 °) zur einfallenden Lichtstrah-

lung positioniert. Im Fall eines auf die dünne Schicht senkrecht einfallenden Lichtstrahls werden für eine Zu- und Ableitung des einfallenden bzw. des reflektierten Lichtes Lichtleiter benutzt.

In der Abb. 2 ist eine der bevorzugten Varianten des Meßaufbaus dargestellt, mit dem das erfindungsgemäße Verfahren durchgeführt werden kann. Es handelt sich in diesem Fall um eine Variante mit einer polychromatischen Lichtquelle 1, wobei das Licht über Einkoppelelemente 2 und eine faseroptische Lichtleitung (Lichtleiter 4) auf einen Träger 5 mit einer darauf aufgetragenen dünnen Schicht in einem rechten Winkel (90 °) zugeleitet wird und der ebenfalls im rechten Winkel (90 °) reflektierte Lichtanteil über die Lichtleiter 4 auf einen Detektor 6 abgeleitet wird. Damit am Detektor das Licht einer einzigen Wellenlänge ankommt, wird entweder zwischen der Lichtquelle und dem Träger oder zwischen dem Träger und dem Detektor ein Monochromator (3a bzw. 3b) positioniert.

In der Abb. 3 ist eine weitere bevorzugte Variante abgebildet, bei der (ausgehend von Abb. 2) ein Zweikanal-Meßplatz unter Zuhilfenahme zweier Photodioden 6 und einer angepaßten Wellenleiteranordnung 4 realisiert werden kann. Der zweite Kanal kann z. B. zur Messung von Referenzwerten benutzt werden, die bei der Auswertung zur Ermittlung einer Intensitätsänderung direkt herangezogen werden können.

Einen besonders wichtigen Aspekt des erfindungsgemäßen Verfahrens stellt die Auswahl oder Ermittlung der für die Auswertung der Meßergebnisse optimalen Wellenlänge dar. Diese entspricht vorzugsweise einer Wellenlänge, bei der die Änderung der Lichtintensität nach einer erfolgten Reaktion oder Wechselwirkung an oder in der dünnen Schicht groß, insbesondere maximal (optimal) ist.

Die optimale Wellenlänge hängt von den Eigenschaften der dünnen Schicht, insbesondere ihrer optischen Dicke, sowie von den Eigenschaf-

ten des Trägers und seiner eventuellen zusätzlichen Beschichtung ab. Durch die bekannte Optik an dünnen Schichten entstehen in jeder dünnen Schicht Vielfachreflexionen. Unabhängig vom Schichtsystem auf dem Träger inklusive der dünnen Schicht ergibt sich in der Reflexion für jede Wellenlänge eine periodische Reflexion in Abhängigkeit der optischen Dicke der dünnen Schicht.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsvariante wird die optimale Wellenlänge experimentell so bestimmt, daß sie sich im Bereich eines Wendepunktes des Dünnschichtspektrums befindet, wobei die Lichtintensität als Funktion der Wellenlänge aufgetragen wird. Dort liefert die Ableitung der Steigung der Intensität des reflektierten Lichtes nach der optischen Schichtdickenänderung der dünnen Schicht den größten Betrag und damit die größte Signaländerung. Zudem ist die Steigerung der Intensität in diesem Bereich aufgrund der überaus geringen Effekte, die zu messen sind, in sehr guter Nährung linear. Alternativ kann die Ermittlung der optimalen Wellenlänge auch anhand der Daten über die Eigenschaften der dünnen Schicht, wie z. B. die Schichtdicke und Brechungsindex, theoretisch berechnet werden (Abb. 4 und 5). Die Wahl der Methode für die Ermittlung der optimalen Wellenlänge hängt davon ab, ob die Eigenschaften des Schichtsystems bekannt sind oder nicht.

Alternativ kann auch ein optimales Schichtsystem zu einer vorgegebenen Wellenlänge theoretisch ermittelt und angepaßt werden. Wie in den Ausführungsbeispielen gezeigt wird, hat die Auswahl der dünnen Schicht bzw. des Schichtsystems, insbesondere seine Dicke und das Material, einen großen Einfluß auf die Signalhöhe. Weitere Faktoren, die den Signalhub des Nutzsignals beeinflussen können und bei der Optimierung des Signals berücksichtigt werden müssen, sind beispielsweise der Einfallswinkel und die Polarisation des eingehenden Lichtes.

Die vorherige Abschätzung eines optimalen Signals eines gegebenen bzw. des theoretisch zu berechnenden Schichtsystems kann die Aus-

wahl der zu verändernden Variablen erleichtern. Insofern ergänzen sich theoretische Simulationen mit den experimentellen Messungen. Durch eine gemeinsame Nutzung beider kann das Schichtsystem optimal ausgewählt und justiert werden.

Durch die Verwendung einer einzigen Wellenlänge wird erfindungsgemäß eine weitgehende optische Unabhängigkeit vom Trägermaterial erreicht. So können bei dem erfindungsgemäßen Verfahren statt bislang notwendigen speziell vergüteten Trägern wesentlich preiswertere und in der Herstellung einfachere Materialien wie Glas, Kunststoff (z.B. TOPAS, ein Cycloolefin-Copolymer, z. B. von Ticona), beschichtetes Glas oder sonstige Materialien verwendet werden (Abb. 8 bis 10).

Durch die Anpassung der optimalen Wellenlänge an das jeweilige Material und die darauf befindliche Oberflächenchemie wird der Effekt der Interferenz an dünnen Schichten durch das zusätzliche Schichtwachstum an die Trägeroberfläche maximal. Dadurch wird das Signal/Rausch-Verhältnis optimiert. In den später erläuterten Ausführungsbeispielen wird gezeigt, daß beim Vergleich des erfindungsgemäßen Verfahrens mit dem bekannten RifS-Verfahren auf einem für RIfS notwendigen Interferenzglas das Signal/Rausch-Verhältnis um einen Faktor 5 bis 10 verbessert ist (Abb. 6 und 7).

Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens gegenüber bekannten Verfahren liegt darin, daß damit ein parallelisierter und miniaturisierter Aufbau mit erheblich kleinerem technischem Aufwand verbunden ist als bei bekannten Verfahren (wie RIfS). Durch eine Beschränkung der Messung auf nur eine Wellenlänge fallen die bei den herkömmlichen Verfahren notwendigen Umschaltvorgänge zwischen den verschiedenen Wellenlängen weg. Die dadurch erreichte Verkürzung der Gesamtmeßzeit kann dazu genutzt werden, die einzelnen Meßzeiten zu verlängern. Aufgrund der überaus geringen Signaländerungen trägt eine längere Meßzeit wesentlich zu einer höheren Signalgüte bei. Auch der

technische Aufwand ist beim erfindungsgemäßen Verfahren um einiges geringer als bei den bekannten Methoden. Diese Faktoren machen eine Parallelisierung der Messung wesentlich einfacher als bei den bekannten Verfahren. Verringerte Meßzeit, einfache Handhabung und geringer technischer Aufwand ermöglichen auch eine einfachere technische Realisierung für eine miniaturisierte Ausführung des Prinzips.

Weitere Vorteile, Merkmale und Anwendungsmöglichkeiten der Erfindung werden nachstehend anhand der Ausführungsbeispiele mit Bezug auf die Zeichnungen beschrieben. In den Zeichnungen zeigen:

Abb. 1: Vereinfachtes Schichtmodell zur Veranschaulichung des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips. Auf dem Träger 1 befindet sich die dünne Schicht 2, die in diesem Beispiel direkt an eine Flüssigkeit 3 angrenzt. In der dünnen Schicht finden Vielfachreflexionen statt.

Abb. 2: Schematische Darstellung einer erfindungsgemäßen Ausführungsvariante mit einem Einkanal-Meßplatz. Die Vorrichtung umfaßt eine polychromatische Lichtquelle.1, die Licht im sichtbaren Bereich aussendet. Mittels einer Einkoppelvorrichtung 2 wird das Licht durch einen Monochromator 3a in einen Y-Wellenleiter 4 eingekoppelt. Der Monochromator 3a kann auch durch einen Monochromator 3b auf der anderen Seite des Y-Wellenleiters ersetzt werden. Das eingekoppelte Licht wird auf den Träger 5 mit einer darauf angeordneten zu messenden dünnen Schicht geleitet, wo es wieder in den Wellenleiter 4 zurückreflektiert wird und von einer Photodiode 6 detektiert wird. Der Monochromator kann bei Bedarf für die Auswahl des optimalen Spektralbereiches ausgewechselt werden.

Abb. 3: Schematische Darstellung einer erfindungsgemäßen Ausführungsvariante mit einem Zweikanal-Meßplatz. Dieser kann un-

ter Zuhilfenahme zweier Photodioden 6 und einer angepaßten Wellenleiteranordnung 4 realisiert werden Der zweite Kanal kann z. B. zur Referenzmessung benutzt werden.

Abb. 4: Reflexion in Abhängigkeit von der Schichtdicke. Als Modell wurde hier BK7-Glas (ein bekanntes Qualitätsglas von Schott, Deutschland) als Trägermaterial, eine (hypothetische) selektive Schicht mit Brechungsindex n=1,34 und Wasser als Deckschicht angenommen. Die Dicke der selektiven Schicht wird auf der x-Achse variiert, auf der y-Achse ist der Reflexionsgrad aufgetragen.

Abb. 5: Ableitung der Reflexion R in Abhängigkeit der Dicke d der selektiven Schicht. Für die jeweilige Schichtdicke der selektiven Schicht wird die Wellenlänge ausgesucht, die an dieser Stelle möglichst ein Extremum hat. Aufgrund der überaus geringen Schichtdickenänderungen, die maximal nur wenige nm beträgt, ist in sehr guter Nährung eine lineare Beziehung von Reflexion zu Dickenänderung gegeben.

Abb. 6: Vergleich des herkömmlichen RIfS-Verfahrens mit dem erfindungsgemäßen Verfahren anhand einer Messung mit beliebiger DNA auf einem sogenannten Interferenzglas (Borosilicatglas D263 von Schott, Deutschland, Dicke 1 mm, beschichtet mit 10 nm Ta_2O_5 und 330 nm SiO_2). Die beiden Messungen wurden mit dem gleichen Chip hintereinander gemacht. Die Skalierungen in der y-Achse (w. E. = willkürliche Einheiten) wurden angepaßt, damit die beiden Bindungskurven rein optisch verglichen werden können. Der Signalhub ist mit dem erfindungsgemäßen Verfahren um einen Faktor 5 besser.

Abb. 7: Gleiche Messung wie in Abb. 6, nur wurden hier die relativen Signaländerungen nicht angeglichen. Der Signalhub ist mit

dem erfindungsgemäßen Verfahren um einen Faktor 5 bis 10 besser.

Abb. 8: Erfindungsgemäße Messungen an einem Kunststoff-Träger aus TOPAS (d = ca. 1 mm) mit zwei verschiedenen DNA-Konzentrationen (FBMG1, Firma IBA Göttingen). Die ausgesuchte Wellenlänge war hier 650 nm.

Abb. 9: Bindungskurve von Anti-ACA auf Kunststoff (TOPAS s. o.) (ACA = 4-Chlor-6-(isopropylamino)-1,3,5-triazin-2-(6`-amino)capronsäure.

Abb. 10: Bindungskurve von Anti-ACA auf Kunststoff (TOPAS s. o.) mit niedriger Konzentration und gehemmte Bindung mit Atrazin (chemisches Pflanzenbehandlungsmittel).

Abb. 11: Bindungskurve von 10µg/ml Anti-ACA auf einem mit 180 nm Indium-Zinnoxid beschichteten BK7-Träger (d = ca. 1 mm) und eine gehemmte Bindung mit 1000 ppb Atrazin.

Abb. 12: Bindungskurve von 1µg/ml Anti-ACA auf einem D263-Substrat (d = ca. 1 mm) mit einer 10 nm dicken Ta_2O_5 und 330 nm dikken SiO_2-Schicht (s. o. Interferenzglas). Zusätzlich ist eine Meßkurve mit Ovalbumin (OVA) abgebildet, um einen eventuellen Anteil unspezifischer Bindung an die Sensoroberfläche abschätzen zu können.

Abb. 13: Bindungskurve von 1 µg/ml Anti-ACA auf einem D263-Substrat mit einer 45 nm dicken Ta_2O_5 und 20 nm dicken SiO_2-Schicht. Zusätzlich ist eine Meßkurve mit Ovalbumin (OVA) abgebildet, um einen eventuellen Anteil unspezifischer Bindung an die Sensoroberfläche abschätzen zu können.

Abb. 14: Bindungskurve von 1µg/ml Anti-ACA auf einem transparenten Kunststoffsubstrat (TOPAS s. o.). Zusätzlich ist eine Meßkurve mit Ovalbumin (OVA) abgebildet, um einen eventuellen Anteil unspezifischer Bindung an die Sensoroberfläche abschätzen zu können.

Abb. 15: Ableitung der Reflektivität in Abhängigkeit der Dicke der selektiven Schicht für ein D263-Substrat mit einer 10 nm dicken Ta_2O_5 und 330 nm dicken SiO_2-Schicht.

Abb. 16: Ableitung der Reflektivität in Abhängigkeit der Dicke der selektiven Schicht für ein D263-Substrat mit einer 45 nm dicken Ta_2O_5 und 20 nm dicken SiO_2-Schicht.

Abb. 17: Ableitung der Reflektivität in Abhängigkeit der Dicke der selektiven Schicht und des Einfallswinkels für ein transparentes Kunststoffsubstrat (TOPAS s. o.) bei einer Wellenlänge von 500 nm.

Abb. 18: Ableitung der Reflektivität in Abhängigkeit der Dicke der selektiven Schicht und des Einfallswinkels für ein D263-Substrat mit einer 10 nm dicken Ta_2O_5 und 330 nm dicken SiO_2-Schicht bei einer Wellenlänge von 500 nm.

Abb. 19: Ableitung der Reflektivität in Abhängigkeit der Dicke der selektiven Schicht und des Einfallswinkels für ein D263-Substrat mit einer 45 nm dicken Ta_2O_5 und 20 nm dicken SiO_2-Schicht bei einer Wellenlänge von 500nm.

Ausführungsbeispiele

Es wurden Messungen mit dem erfindungsgemäßen Verfahren im Vergleich mit der bekannten und etablierten RIfS-Methode mit sehr guter Übereinstimmung vorgenommen. Zur Überprüfung des erfindungsgemäßen Verfahrens wurden unterschiedliche Antigen-Antikörper- sowie DNA-DNA-Wechselwirkungen gemessen. Außerdem wurden verschiedene Träger aus Glas sowie verschiedene modifizierte Träger aus Kunststoff vermessen und verglichen.

Beispiel 1

Vergleichsmessungen von erfindungsgemäßen Verfahren mit dem RIfS-Verfahren am selben Träger aus Interferenzglas (Substrat aus D263-Glas, 10 nm Ta_2O_5 und 330 nm SiO_2). Der Träger wurde mit PEG (Polyethylenglykol) beschichtet und danach mit einer DNA als sensitive Schicht funktionalisiert. Die Messungen wurden mit einer hochkonzentrierten DNA-PBS-Lösung (PBS = phosphate buffered saline) durchgeführt, so daß eine diffusionslimitierte Bindungskinetik beobachtet werden kann (siehe Abb. 6 + 7).

Beispiel 2

Vergleich von zwei DNA-DNA-Messungen auf einem Kunststoff-Träger. Der Träger wurde mit Aminodextran beschichtet und danach mit DNA funktionalisiert. Die Messungen wurden mit unterschiedlich hohen DNA-Konzentrationen in einer PBS-Lösung durchgeführt. Man kann die daraus resultierende unterschiedliche Bindungskinetik erkennen: bei der niedrigeren DNA-Konzentration verläuft die Bindungskurve weniger steil (siehe Abb. 8).

Beispiel 3

Antigen-Antikörper-Messung auf einem Kunststoff-Träger (TOPAS). Der Träger wurde mit Aminodextran beschichtet und danach mit Atrazin funktionalisiert. Die Messung wurde mit einer hoch konzentrierten Anti-ACA-PBS-Lösung durchgeführt, so daß eine diffusionslimitierte Bindungskinetik beobachtet werden kann (siehe Abb. 9).

Beispiel 4

Antigen-Antikörper-Messung auf einem Kunststoff-Träger (TOPAS). Der Träger wurde mit Aminodextran beschichtet und danach mit Atrazin funktionalisiert. Die Messung wurde mit einer niedrig konzentrierten Anti-ACA-PBS-Lösung durchgeführt, so daß eine massentransportlimitierte Bindungskinetik beobachtet werden kann. Danach wurde eine mit Atrazin gehemmte Anti-ACA-PBS-Lösung vermessen, um sicherzugehen, daß die vorherigen Signaländerungen tatsächlich von der Antigen-Antikörper-Reaktion herrühren (siehe Abb. 10).

Beispiel 5

Antigen-Antikörper-Messung auf einem mit 180 nm Indium-Zinnoxid beschichteten BK7-Träger. Der Träger wurde mit Aminodextran beschichtet und danach mit Atrazin funktionalisiert. Die Messung wurde mit einer Anti-ACA-PBS-Lösung mit einer Anti-ACA-Konzentration von 10 µg/ml durchgeführt (siehe Abb. 11).

Beispiel 6

Es wird untersucht, inwiefern die Wahl des Trägermaterials bzw. dessen Beschichtung einen Einfluß auf die Signaldynamik, d. h. die Höhe der Reflektivitätsänderung bei einer optischen Schichtdickenänderung hat. Um diese ausschließlich von der Wahl des optischen Trägersystems abhängige Größe experimentell zu bestimmen, wird im Beispiel wieder das Antigen/Antikörper System Atrazin/Anti-ACA benutzt. Die Träger wurden mit Aminodextran beschichtet und danach mit Atrazin funktionalisiert. Es werden bei den Messungen aller hier untersuchten Trägersysteme die gleichen Meßprotokolle verwendet. Bei allen Messungen wurde eine Anti-ACA-PBS-Lösung mit einer Anti-ACA-Konzentration von 1µg/ml verwendet (siehe Abb. 12, 13 und 14). Bei dieser Konzentration wird eine massentransportlimitierte Bindungskinetik gewährleistet. Das bedeutet, daß alle Analytmoleküle, die im Fluß durch die Diffusionsgrenzschicht an die Sensoroberfläche gelangen, auch dort gebunden werden. Da bei allen Trägern neben den gleichen Antikörpern dieselbe Fluidik und das gleiche Flußprotokoll verwendet wurde, kann man durchaus annehmen, daß ziemlich genau jeweils die gleiche Anzahl von Antikörpern an die Sensoroberfläche anbindet und dadurch die gleiche Änderung der optischen Schichtdicke hervorruft. Der unterschiedliche Signalhub bei den einzelnen Trägern ist deshalb in sehr hohem Maße allein von den optischen Parametern des Trägersystems abhängig. Diese unterschiedliche Signaldynamik in Abhängigkeit des Trägersystems läßt sich theoretisch auch qualitativ durch unterschiedlich hohe Ableitungen der Reflexion nach der Dicke der selektiven Schicht bei unterschiedlichen Trägersystemen erklären (siehe Abb. 5, 15 und 16) mit einem einfachen Schichtmodell erklären. Zur Demonstration dieser unterschiedlichen Signaldynamik wurden folgende optische Trägersysteme vermessen:

1) Substrat aus D263-Glas, 10 nm Ta_2O_5 und 330 nm SiO_2,

2) Substrat aus D263-Glas, 45 nm Ta_2O_5 und 20 nm SiO_2,

3) unbeschichteter transparenter TOPAS-Kunststoffträger (die optischen Parameter dieses Substrats stimmen gut mit denen von BK7-Glas überein).

Nur durch die Wahl eines anderen optischen Trägersystems ergibt die gleiche Änderung der optischen Schichtdicke einen bis zu einem Faktor sieben unterschiedlich hohes Signal.

Beispiel 7

Neben einer angepaßten optischen Vergütung für eine Maximierung der Signaldynamik kann eine optimierte geometrische Anordnung in Kombination mit einer dafür angepaßten optischen Vergütung eine weitere Maximierung der Signaldynamik ergeben.

Eine größere Reflektivität an der Grenzfläche Biopolymer/Umgebungsmedium, dadurch ein insgesamt höherer Anteil der reflektierten Strahlung höherer Ordnung und damit eine größere Signaldynamik kann durch einen schrägen Einfallswinkel erreicht werden. Im Zusammenhang mit dem jeweiligen verwendeten optischen Trägersystem existiert dann auch ein optimaler Einstrahlwinkel für maximale Signaldynamik.

Es werden Simulationen von folgenden optischen Trägersystemen präsentiert:

1) Substrat aus D263-Glas, 10 nm Ta_2O_5 und 330 nm SiO_2,
2) Substrat aus D263-Glas, 45 nm Ta_2O_5 und 20 nm SiO_2,
3) unbeschichteter transparenter Kunststoffträger (TOPAS).

In den Abbildungen 17, 18 und 19 sind die Signaldynamiken in Abhängigkeit des Einfallswinkels und der Dicke des selektiven Biopolymers für eine Wellenlänge von 500 nm aufgetragen.

Die maximalen Signalhübe sind relativ ähnlich, die Unterschiede betragen hier zwischen den verschiedenen Trägersystemen nur ungefähr einen Faktor 2. Die Tatsache, daß die größten Signalhübe erst bei einer Polymerschichtdicke von ein paar hundert Nanometern erwartet werden würden, könnte man experimentell durch eine größere SiO_2-Schichtdicke als additive Größe zum Biopolymer kompensieren. Zu sehen ist bei allen Graphen, daß der optimale Einfallswinkel jeweils kurz vor dem Grenzwinkel zur Totalreflexion liegt. Gelingt es, diese Größen für einen geeigneten Träger experimentell optimal einzustellen, könnte der Signalhub theoretisch um ungefähr anderthalb Größenordnungen verbessert werden. Weiterhin kann bei schrägem Lichteinfall die Verwendung nur einer Polarisationsrichtung des Lichts eine zusätzliche Erhöhung der Signaldynamik bewirken.

Beispiel 8

Für den Einsatz von portablen und miniaturisierten Sensoreinheiten wurde ein 8 x 8 mm^2 großer, kommerziell erhältlicher Sensor mit drei integrierten Lichtquellen in der Mitte und zwei Photodioden an der Seite verwendet. Es sind hier also schon simultane Messungen an zwei Punkten möglich. In diesem Beispiel wurde allerdings nur ein Meßpunkt detektiert. Ebenso wurde bisher auch nur eine Diode, die sogenannte Monitor-Diode, ausgelesen. Für die Messung wurde Licht einer grünen LED (light emitting diode) benutzt. Das Licht fällt schräg auf den Träger und wird dann unter dem gleichen Winkel reflektiert und von den Photodioden detektiert.

Als biologisches System wurde eine Antigen-Antikörper-Wechselwirkung auf einem Kunststoffsubstrat (TOPAS) detektiert. Dieses wurde mit Aminodextran beschichtet und danach mit Atrazin funktionalisiert. Es wurden Messungen mit einer Anti-ACA-PBS-Lösung mit einer Anti-ACA-Konzentration von 5 µg/ml durchgeführt. Um zu überprüfen, ob die detektierte Reflektivitätsänderung tatsächlich von der Anbindung der Antikörper in der Lösung an die Sensoroberfläche herrührt, wurde am gleichen Chip unter gleichen Bedingungen eine reine PBS-Lösung detektiert. Hier konnte im Vergleich zur Antikörpermessung keine signifikante Reflektivitätsänderung beobachtet werden (siehe Abb. 21).

Die Messungen zeigen die prinzipielle Eignung der Methode sowohl für den Gebrauch von Leuchtdioden als auch für eine mögliche Miniaturisierung.

Der schematische Aufbau des Sensors für Beispiel 8 gemäß Abb. 20 zeigt eine LED 3 sowie PIN-Dioden 2 (pin = positive intrinsic negative) und Monitor-Dioden 4, die auf bzw. in ein Silizium-Substrat 5 angebracht wurden. Über diesem Silizium-Substrat befindet sich eine Glas-Keramik 1 mit oben gezeigter Struktur. Die keramischen Abschnitte haben eine Filtereigenschaft und sollen die PIN-Dioden 2 vor ungewollter Strahlung abschirmen. Über diese Glas-Keramik 1 wird nun der Träger 6 mit der selektiven Schicht aufgebracht. Für die erfindungsgemäße Methode interessante Strahlen 7 werden an der mit der selektiven Schicht beschichteten Trägerseite zur PIN-Diode 2 reflektiert und dort detektiert.

Auch ohne weitere Ausführungen wird davon ausgegangen, daß ein Fachmann die obige Beschreibung im weitesten Umfang nutzen kann. Die bevorzugten Ausführungsformen und Beispiele für das erfindungsgemäße Verfahren sind deswegen lediglich als beschreibende, keineswegs als in irgendeiner Weise limitierende Offenbarung aufzufassen.

Patentansprüche

1. Verfahren zur markierungsfreien Untersuchung physikalischer, chemischer und/oder biochemischer Reaktionen, Bindungs- und/oder Anlagerungsvorgängen oder sonstiger Wechselwirkungen an oder in mindestens einer dünnen Schicht, mit
   - Beleuchtung mindestens eines punktförmigen oder flächenhaften Bereichs der mindestens einer dünnen Schicht mit Licht von mindestens einer Lichtquelle (1),
   - Leitung des an den hintereinander liegenden Begrenzungsflächen der mindestens einer dünnen Schicht reflektierten Strahlenanteils an mindestens einen Detektor (6),
   - Detektion des an den hintereinander liegenden Begrenzungsflächen der mindestens einer dünnen Schicht reflektierten Strahlenanteils mit mindestens einem Detektor (6),
   - Messung der durch die physikalischen, chemischen und/ oder biochemischen Reaktionen, Bindungs- und/oder Anlagerungsvorgängen oder sonstigen Wechselwirkungen verursachten Änderung der detektierten Lichtintensität,
   - Ableitung von Parametern aus der Änderung der detektierten Lichtintensität, die die zu untersuchenden Reaktionen und Wechselwirkungen an und/oder in der mindestens einer dünnen Schicht kennzeichnen,

   dadurch gekennzeichnet, daß das auf den mindestens einen Detektor einfallende Licht monochromatisch ist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß für die Entstehung einer maximalen Änderung der detektierten Lichtintensität die Wellenlänge des auf den mindestens einen Detektor einfallenden monochromatischen Lichtes experimentell und/oder theoretisch ermittelt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß für die Ermittlung der Wellenlänge des auf den mindestens einen Detektor einfallenden monochromatischen Lichtes die Eigenschaften der mindestens einer dünnen Schicht und/ oder die Eigenschaften des auf mindestens einen punktförmigen oder flächenhaften Bereich der mindestens einer dünnen Schicht einfallenden Lichts festgelegt werden.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die für die Entstehung einer maximalen Änderung der detektierten Lichtintensität festzulegenden Eigenschaften der mindestens einer dünnen Schicht ihre Dicke und/oder ihr Brechungsindex sind.

5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß die für die Entstehung einer maximalen Änderung der detektierten Lichtintensität festzulegenden Eigenschaften des Lichtes der Einfallswinkel und/oder die Polarität sind.

6. Verfahren nach mindestens einem der vorgehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die mindestens eine Lichtquelle monochromatisch ist, insbesondere eine Leuchtdiode (LED), Laserdiode oder Laser ist.

7. Verfahren nach mindestens einem der vorgehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Monochromatisierung des am Detektor ankommenden Lichtes mittels mindestens eines zwischen der mindestens einer polychromatischen Lichtquelle und der mindestens einer dünnen Schicht angeordneten Monochromators (3a) und/oder mittels mindestens einer zwischen der mindestens einer polychromatischen Lichtquelle und der mindestens einer dünnen Schicht angeordneten spektral auflösenden Vorrichtung und/oder mittels mindestens eines zwischen der mindestens einer dünnen Schicht und dem mindestens einem Detektor angeordneten Monochromators (3b) und/oder mindestens einem zwischen einer mindestens einer dünnen Schicht und dem

mindestens einem Detektor angeordneten spektral auflösenden Vorrichtung erfolgt.

8. Verfahren nach mindestens einem der vorgehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Intensitäten der von mindestens zwei unterschiedlichen Bereichen reflektierten Lichtstrahlen zum direkten Vergleich der gemessenen Parameter herangezogen werden.

9. Verfahren nach mindestens einem der vorgehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der mindestens eine Detektor eine Photodiode ist.

10. Verfahren nach mindestens einem der vorgehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der mindestens eine Detektor ein CCD-Element ist.

11. Verfahren nach mindestens einem der vorgehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der mindestens einer dünnen Schicht Einkoppel- und/oder Auskoppelelemente, die der Lichtleitung, Lichtlenkung und/oder Strahlformung dienen, vor- bzw. nachgeordnet sind.

12. Verfahren nach mindestens einem der vorgehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Einkoppel- und/oder Auskoppelelemente Spiegel, Linsen oder Lichtleiter (4) sind.

13. Verfahren nach mindestens einem der vorgehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die mindestens eine dünne Schicht in einem Winkel zwischen 0 und 90 Grad zur einfallenden Lichtstrahlung positioniert ist.

14. Verfahren nach mindestens einem der vorgehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die mindestens eine dünne Schicht auf, in oder an mindestens einem Träger angeordnet ist.

15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die mindestens auf oder an dem mindestens einen Träger angeordnete dünne Schicht der einfallenden Lichtstrahlung zugewandt oder abgewandt ist.

16. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger im wesentlichen aus einem transparenten Material besteht.

17. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß das Trägermaterial im wesentlichen Glas, Kunststoff oder Metall ist.

18. Verfahren nach mindestens einem der vorgehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß damit an mehreren punktförmigen oder flächenhaften Bereichen der mindestens einer dünnen Schicht physikalische, chemische und/oder biochemische Reaktionen, Bindungs- und/oder Anlagerungsvorgänge oder sonstige Wechselwirkungen gleichzeitig untersucht werden.

19. Vorrichtung zur markierungsfreien Untersuchung physikalischer, chemischer und/oder biochemischer Reaktionen, Bindungs- und/ oder Anlagerungsvorgängen oder sonstiger Wechselwirkungen an oder in mindestens einer dünnen Schicht nach einem Verfahren mindestens eines vorgehenden Anspruchs, umfassend
    - mindestens eine Lichtquelle (1),
    - gegebenenfalls mindestens einen zwischen der mindestens einer Lichtquelle und der mindestens einer dünnen Schicht angeordneten Monochromator (3a) und/oder mindestens eine spektral auflösende Vorrichtung,
    - mindestens einen Detektor (6),
    - gegebenenfalls mindestens einen zwischen der mindestens einer dünnen Schicht und dem mindestens einem Detektor angeordneten Monochromator (3b) und/oder mindestens eine spektral auflösenden Vorrichtung,

    dadurch gekennzeichnet, daß

- die Eigenschaften und die Anordnung der mindestens einer Lichtquelle und/oder der zusätzlich zwischen der mindestens einer Lichtquelle und der mindestens einer dünnen Schicht und/oder zwischen der mindestens einer dünnen Schicht und dem mindestens einem Detektor angeordneten Monochromator und/oder der spektral auflösenden Vorrichtungen derart sind, daß auf den mindestens einen Detektor monochromatisches Licht fällt.

- - - - - - - - - - -

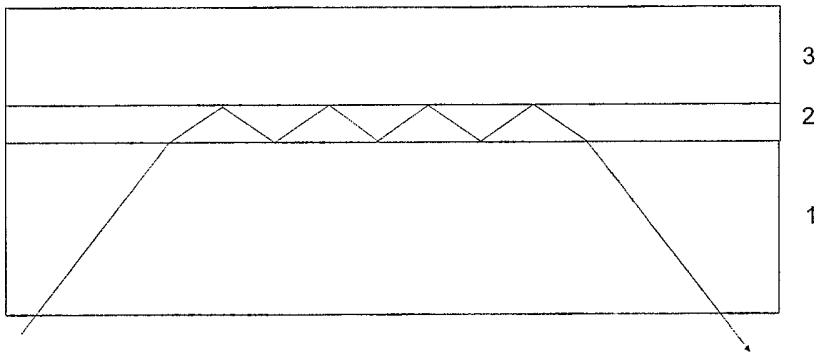


Abb. 1

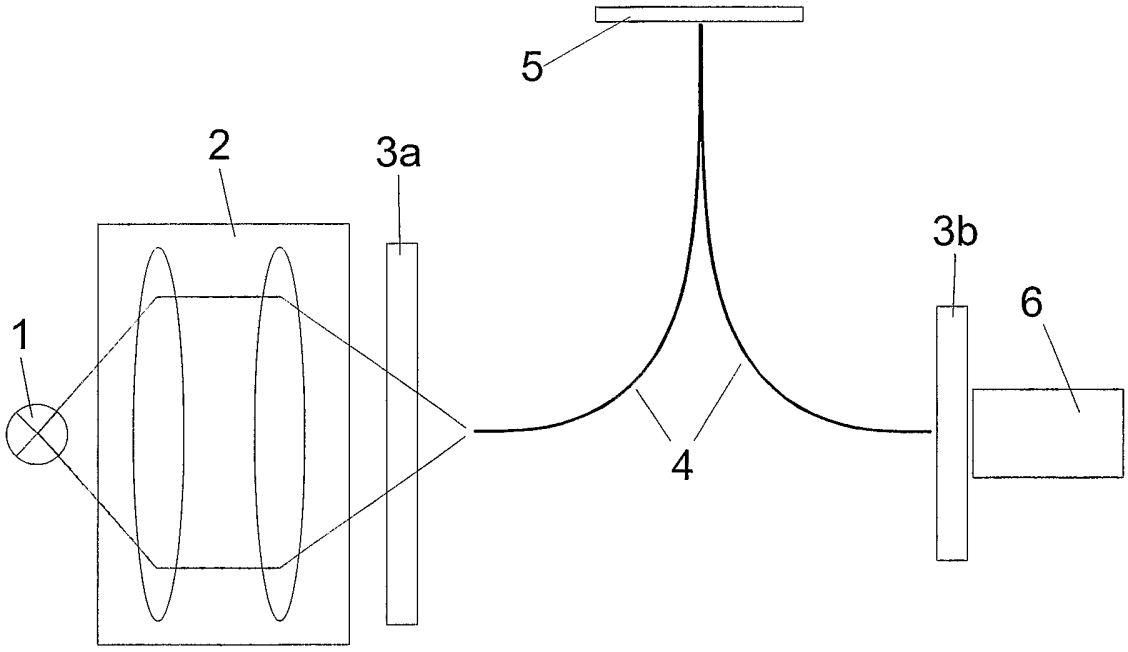


Abb. 2

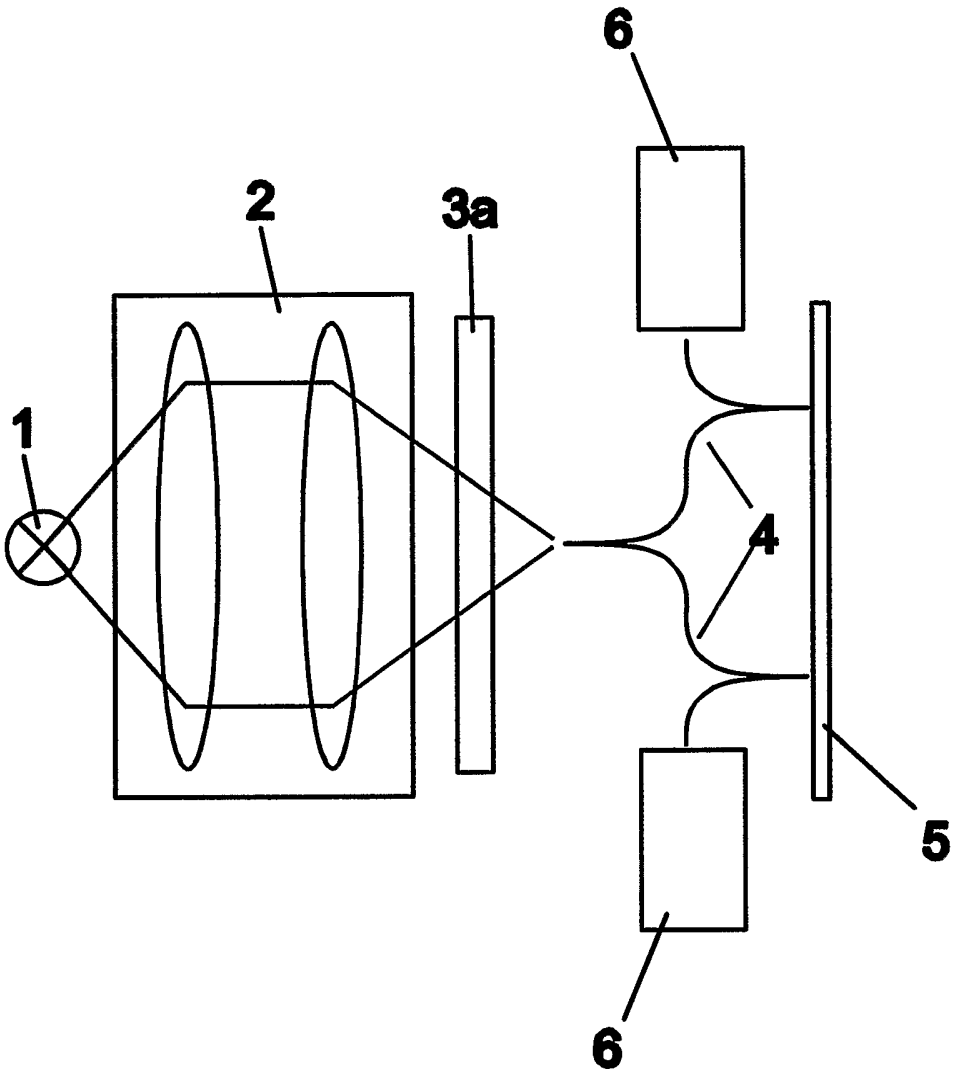


Abb. 3

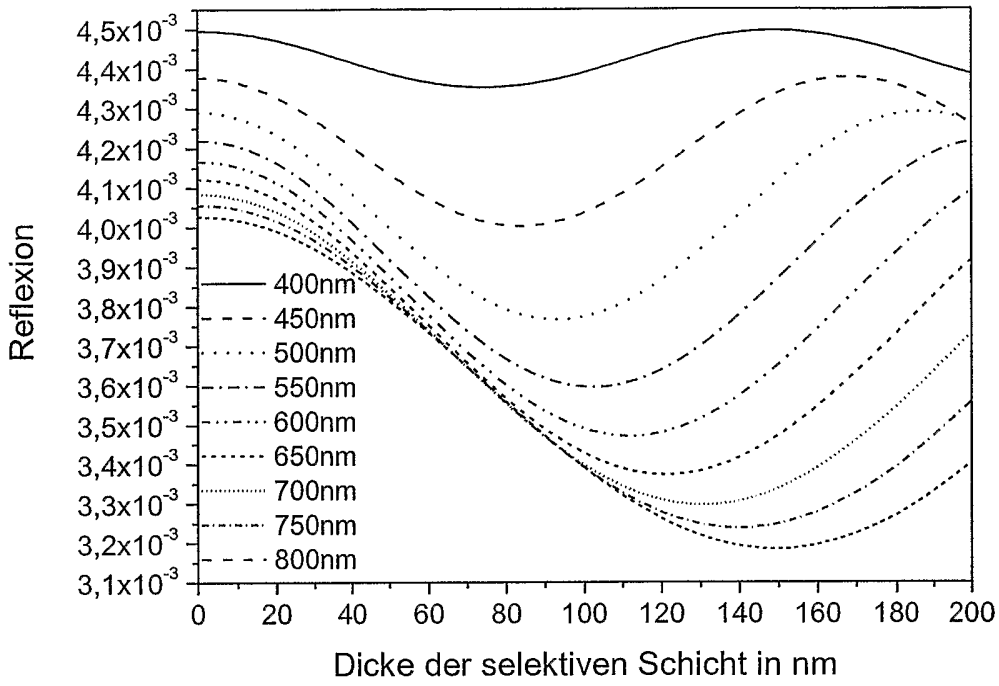

Reflexion
4,5x10-3
4,4x10-3
4,3x10-3
4,2x10-3
4,1x10-3
4,0x10-3
3,9x10-3
3,8x10-3
3,7x10-3
3,6x10-3
3,5x10-3
3,4x10-3
3,3x10-3
3,2x10-3
3,1x10-3
400nm
450nm
500nm
550nm
600nm
650nm
700nm
750nm
800nm
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
Dicke der selektiven Schicht in nm

Abb. 4

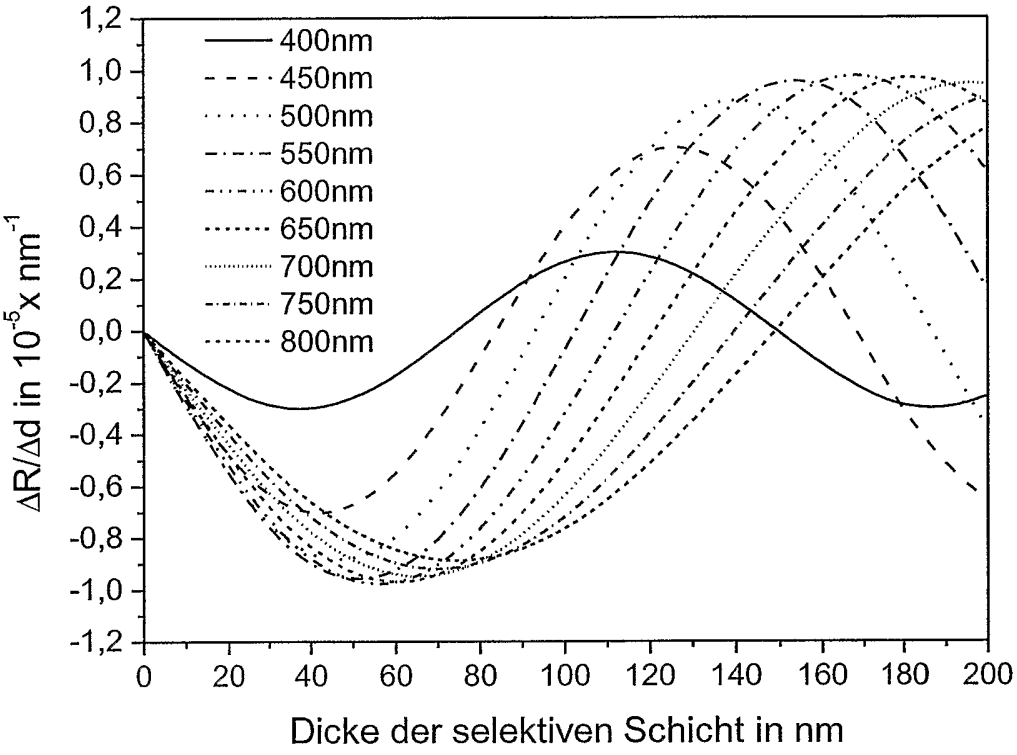

400nm
450nm
500nm
550nm
600nm
650nm
700nm
750nm
800nm
ΔR/Δd in 10-5x nm-1
Dicke der selektiven Schicht in nm
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
-0,2
-0,4
-0,6
-0,8
-1,0
-1,2
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200

Abb. 5

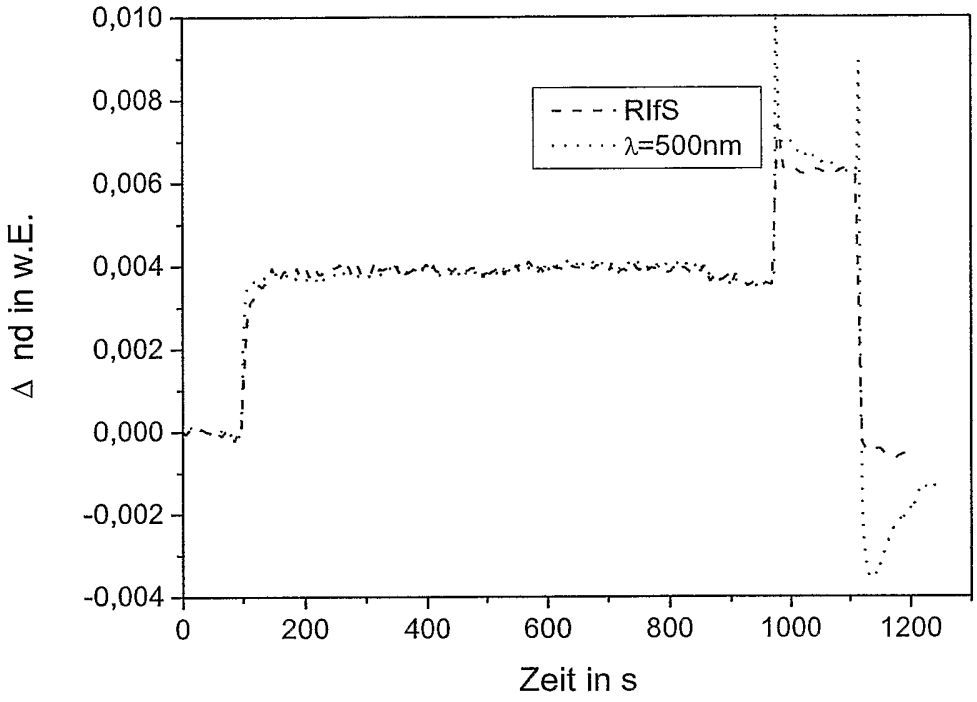

0,010
0,008
0,006
0,004
0,002
0,000
-0,002
-0,004
Δ nd in w.E.
0
200
400
600
800
1000
1200
Zeit in s
RIfS
λ=500nm

Abb. 6

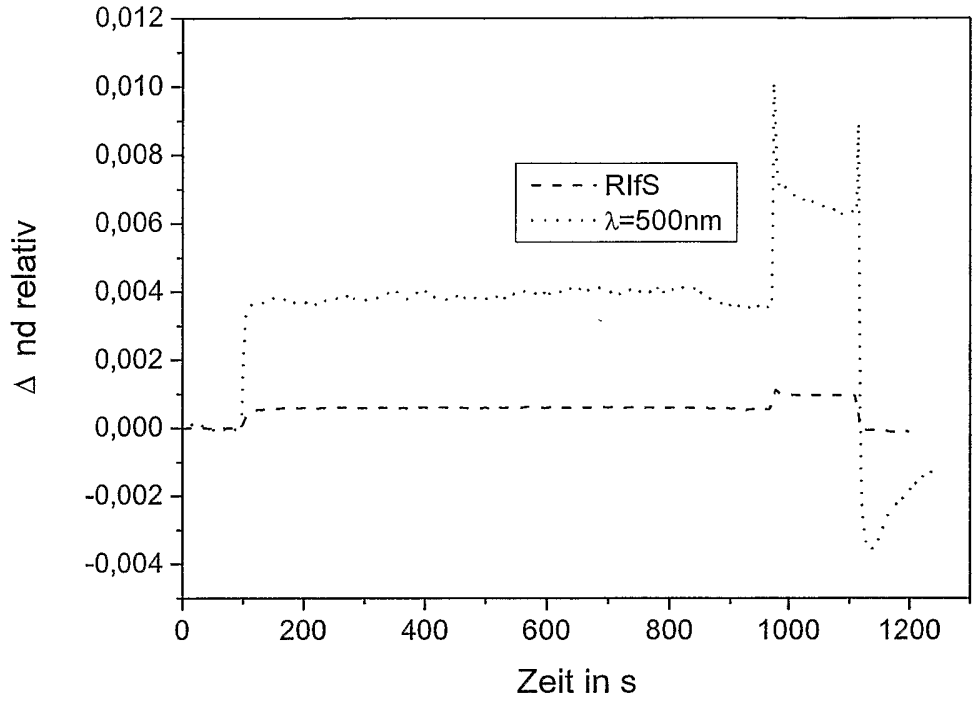

0,012
0,010
0,008
0,006
0,004
0,002
0,000
-0,002
-0,004
Δ nd relativ
RIfS
λ=500nm
0
200
400
600
800
1000
1200
Zeit in s

Abb. 7

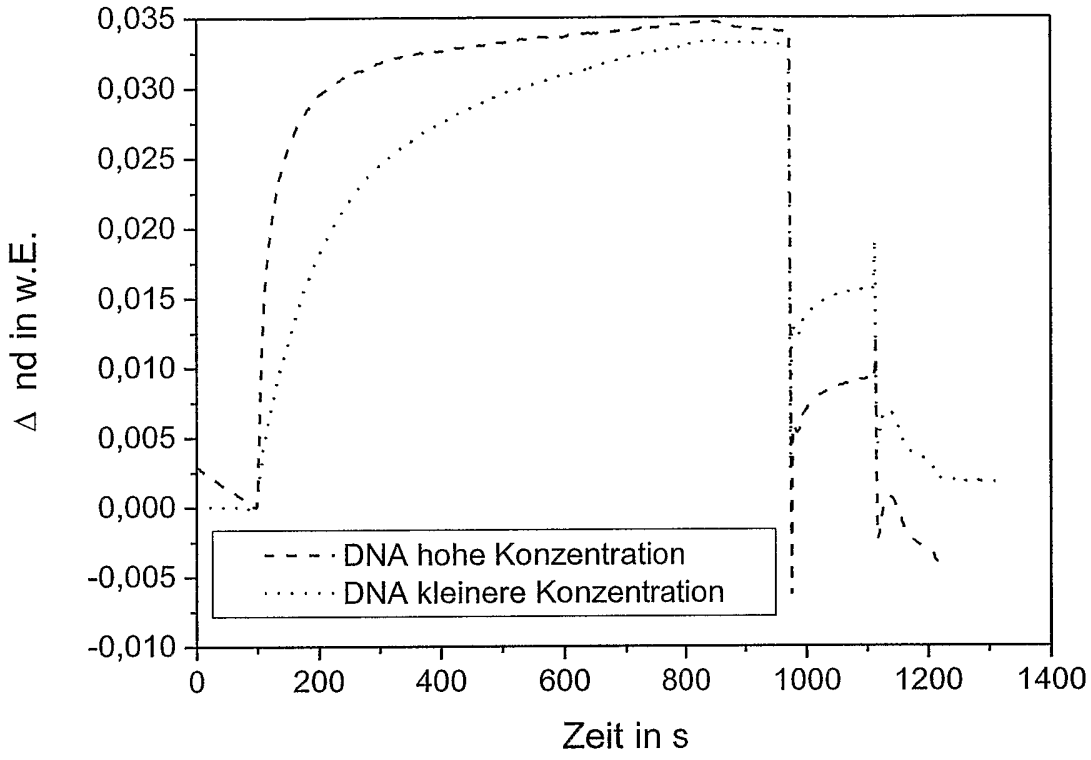

0,035
0,030
0,025
0,020
0,015
0,010
0,005
0,000
-0,005
-0,010
Δ nd in w.E.
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
Zeit in s
DNA hohe Konzentration
DNA kleinere Konzentration

Abb. 8

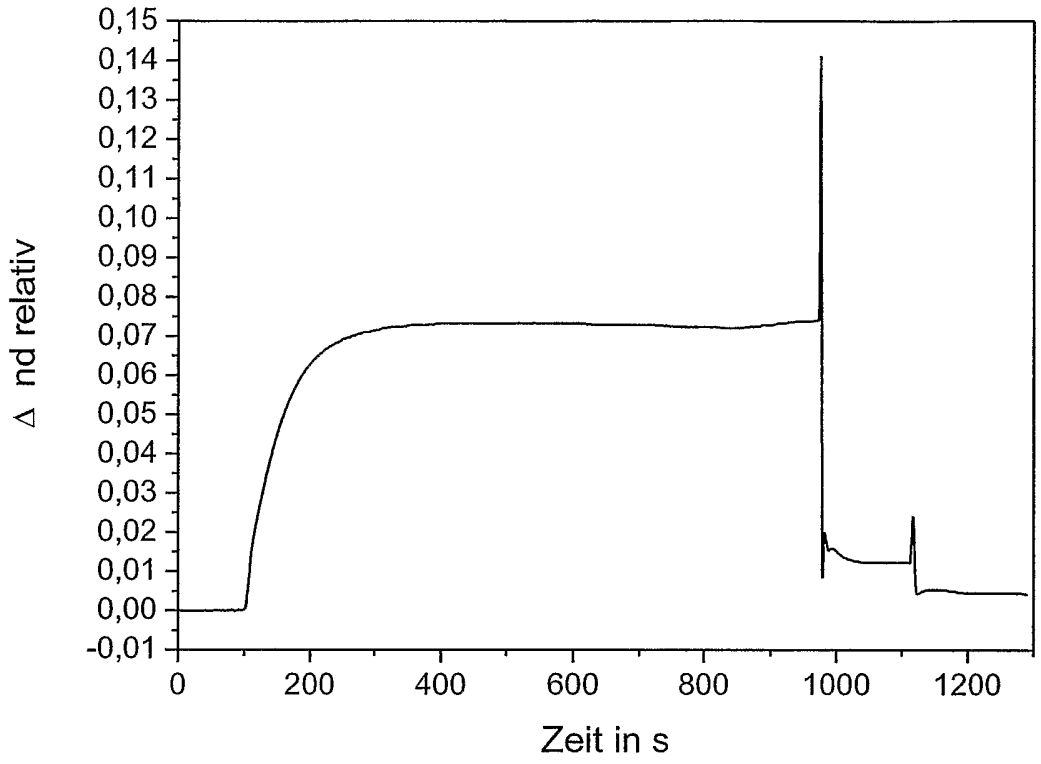

0,15
0,14
0,13
0,12
0,11
0,10
0,09
0,08
0,07
0,06
0,05
0,04
0,03
0,02
0,01
0,00
-0,01
Δ nd relativ
0
200
400
600
800
1000
1200
Zeit in s

Abb. 9

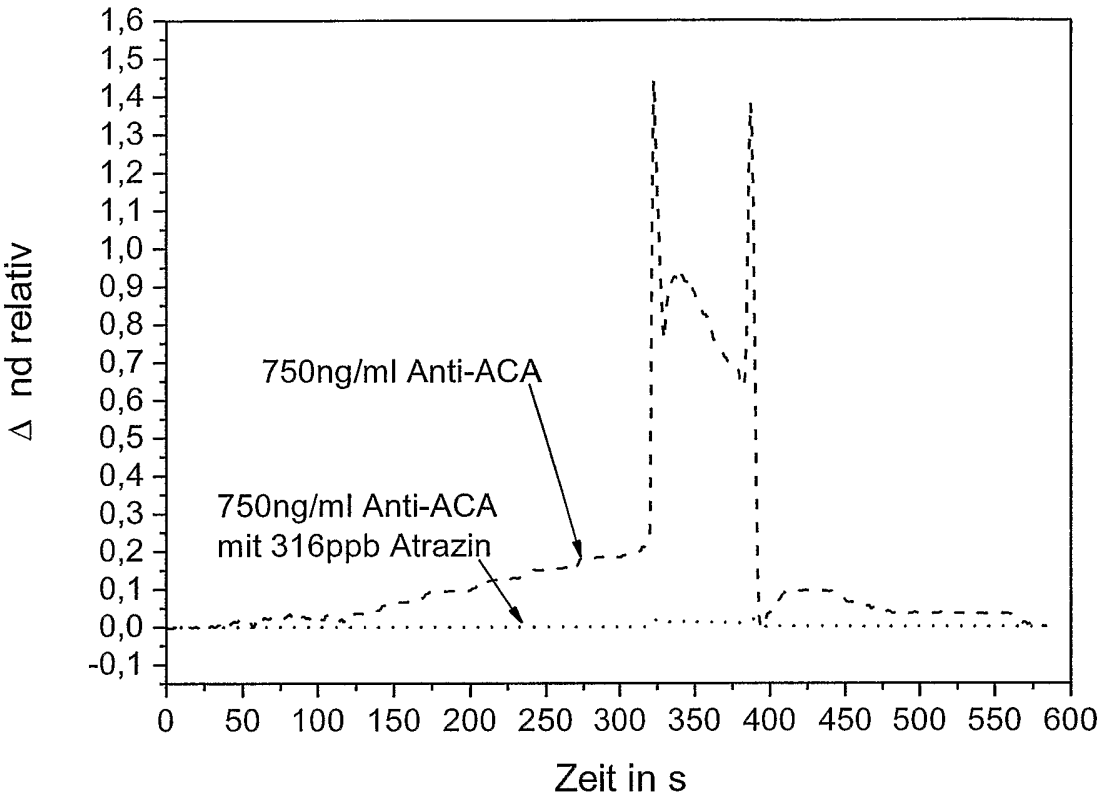

Δ nd relativ
1,6
1,5
1,4
1,3
1,2
1,1
1,0
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
-0,1
750ng/ml Anti-ACA
750ng/ml Anti-ACA
mit 316ppb Atrazin
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450
500
550
600
Zeit in s

Abb. 10

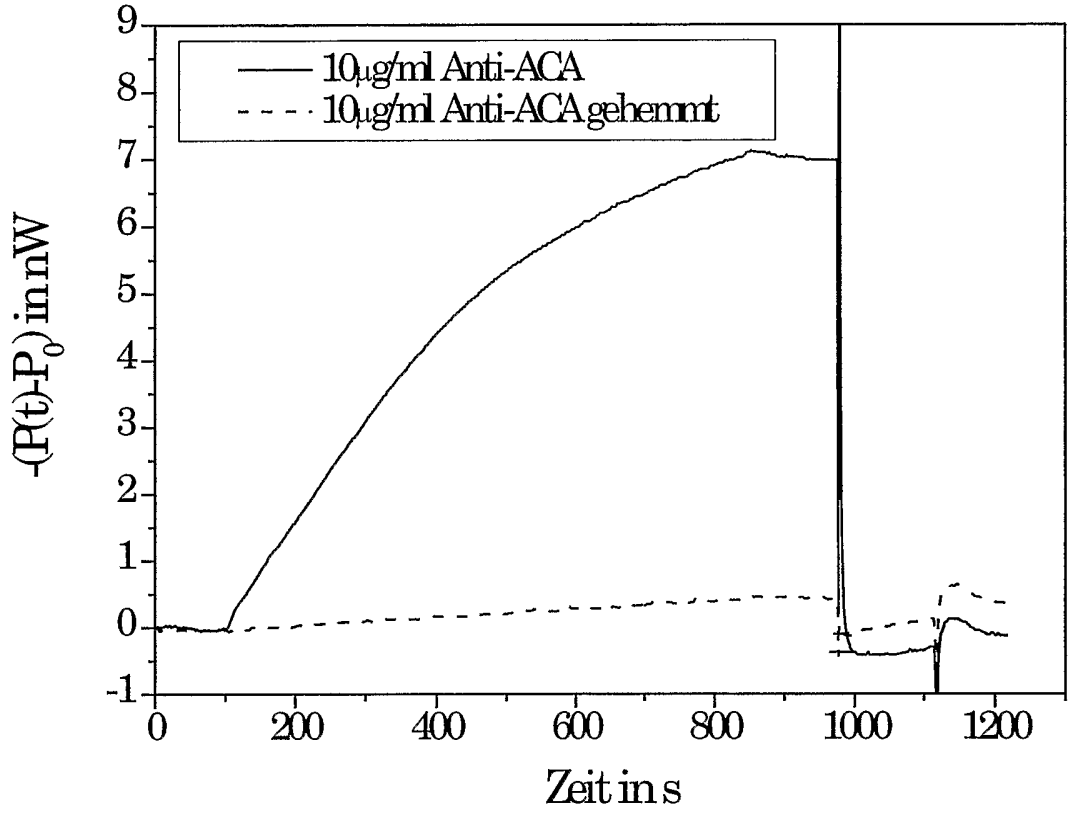

10µg/ml Anti-ACA
10µg/ml Anti-ACA gehemmt
-(P(t)-P0) in nW
Zeit in s
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
-1
0
200
400
600
800
1000
1200

Abb. 11

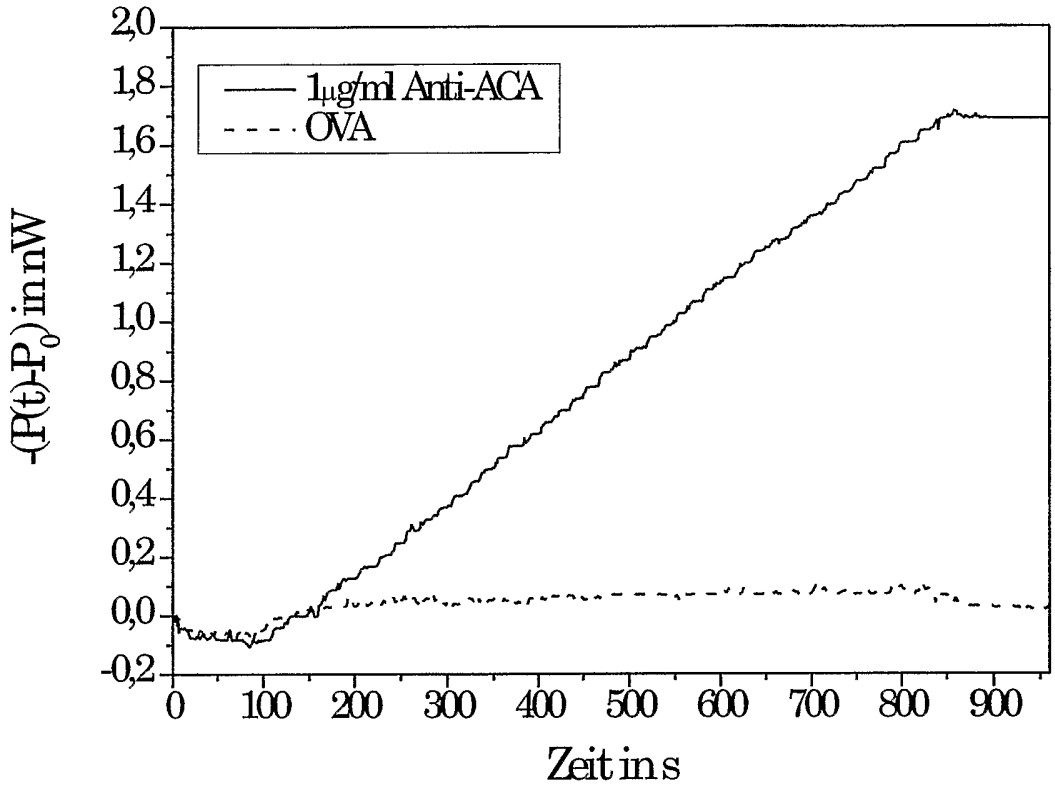

2,0
1,8
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
-0,2
-(P(t)-P0) in nW
1µg/ml Anti-ACA
OVA
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
Zeit in s

Abb. 12

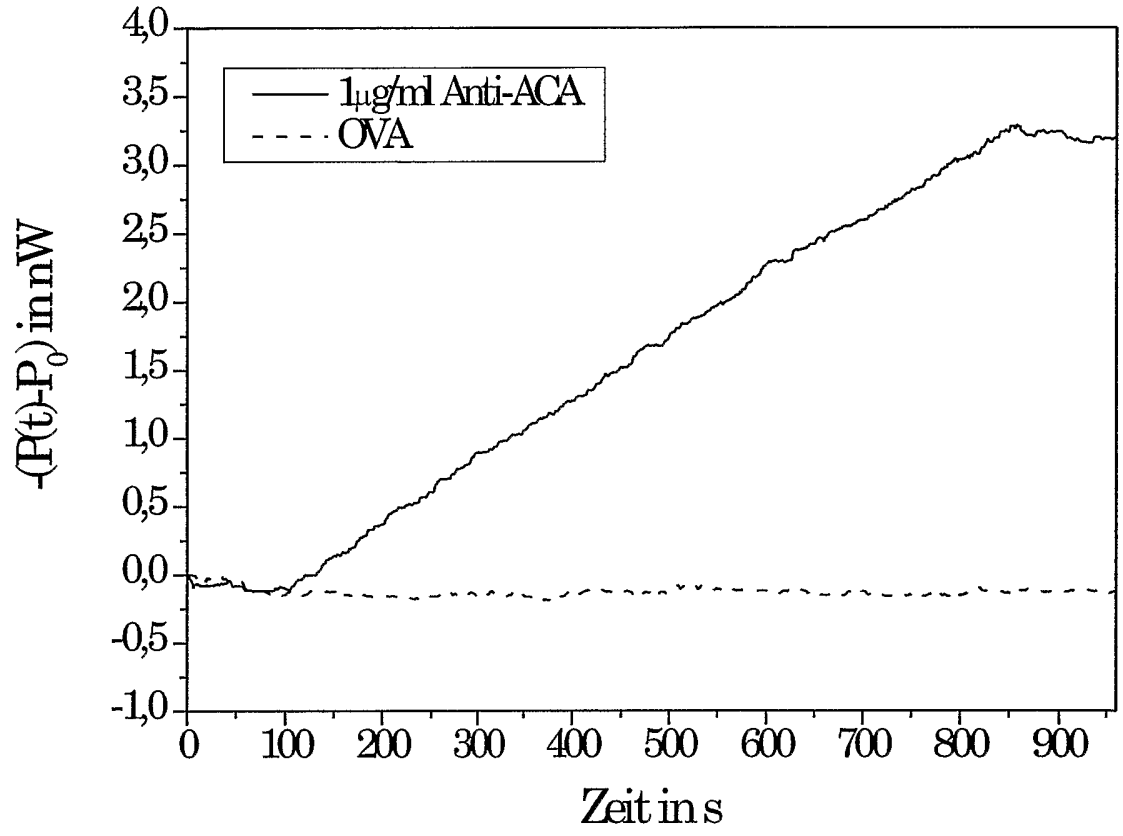

4,0
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
-0,5
-1,0
-(R(t)-P0) in nW
1µg/ml Anti-ACA
OVA
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
Zeit in s

Abb. 13

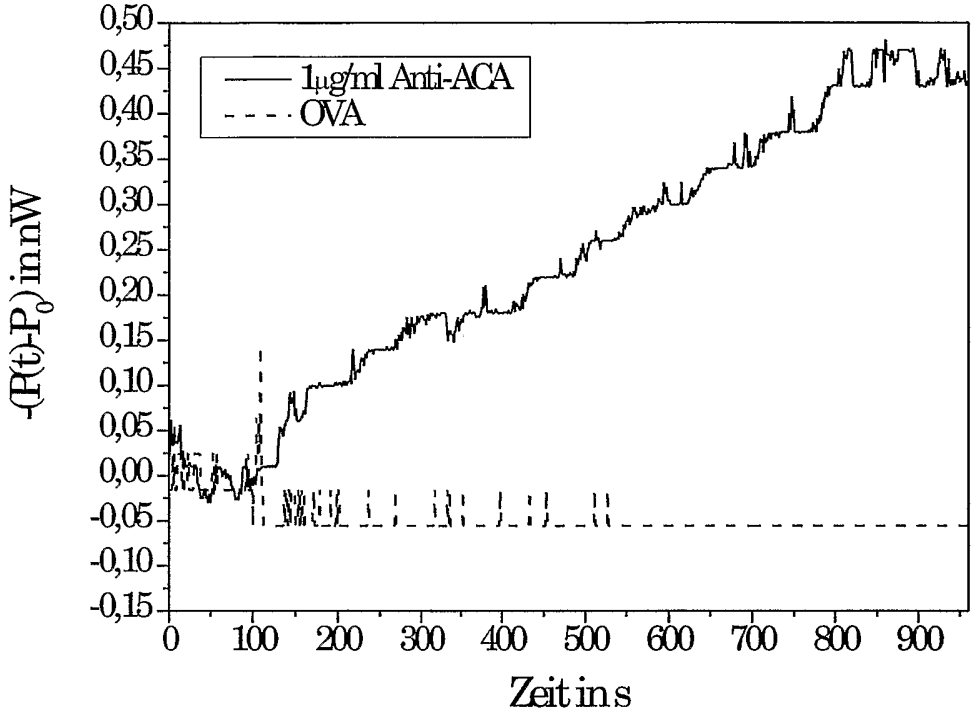

0,50
0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
-0,05
-0,10
-0,15
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1µg/ml Anti-ACA
OVA
-(P(t)-P0) in nW
Zeit in s

Abb. 14

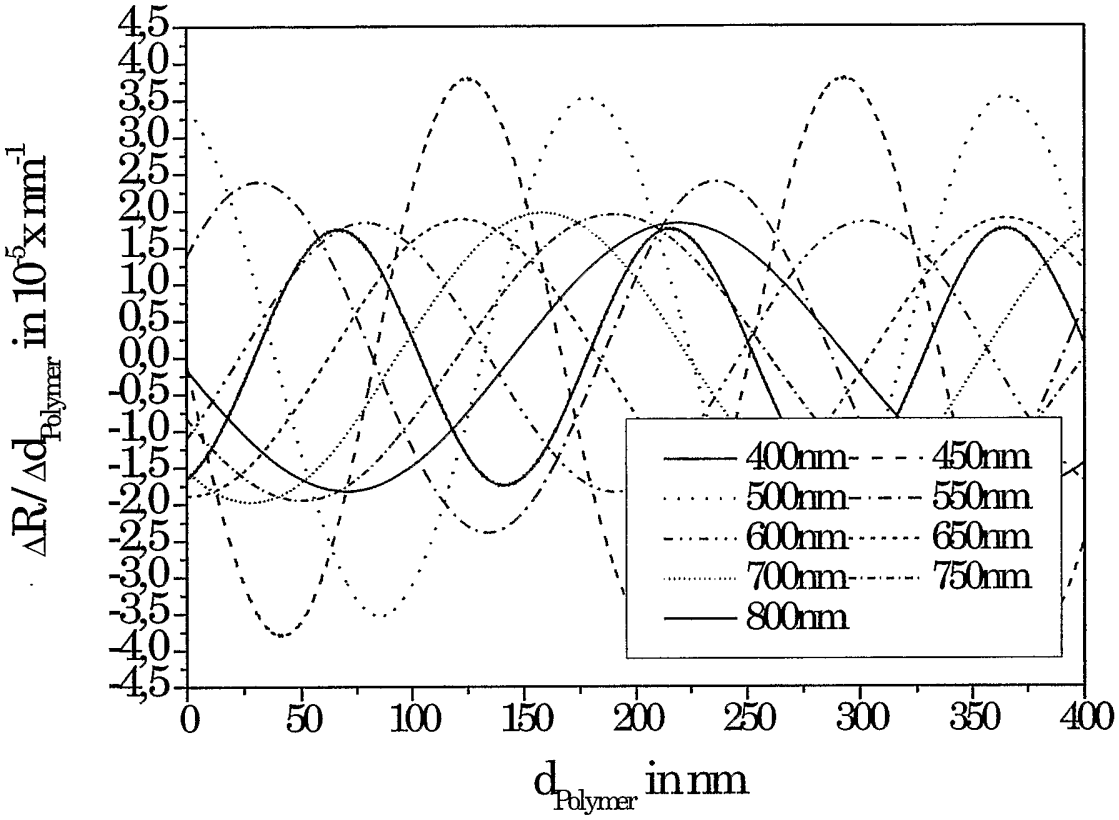

4,5
4,0
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
-0,5
-1,0
-1,5
-2,0
-2,5
-3,0
-3,5
-4,0
-4,5
0
50
100
150
200
250
300
350
400
ΔR/Δd Polymer in 10-5 x nm-1
d Polymer in nm
400nm
450nm
500nm
550nm
600nm
650nm
700nm
750nm
800nm

Abb. 15

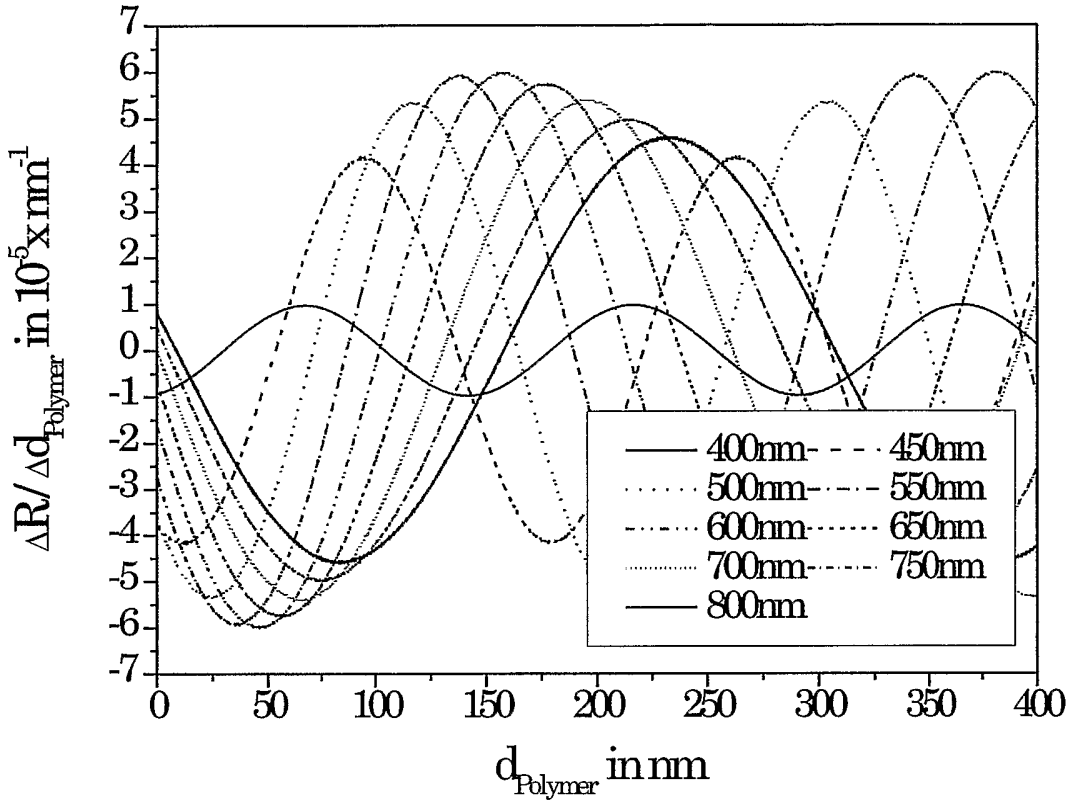

7
6
5
4
3
2
1
0
-1
-2
-3
-4
-5
-6
-7
0
50
100
150
200
250
300
350
400
ΔR/Δd Polymer in 10^-5 x nm^-1
d Polymer in nm
400nm
450nm
500nm
550nm
600nm
650nm
700nm
750nm
800nm

Abb. 16

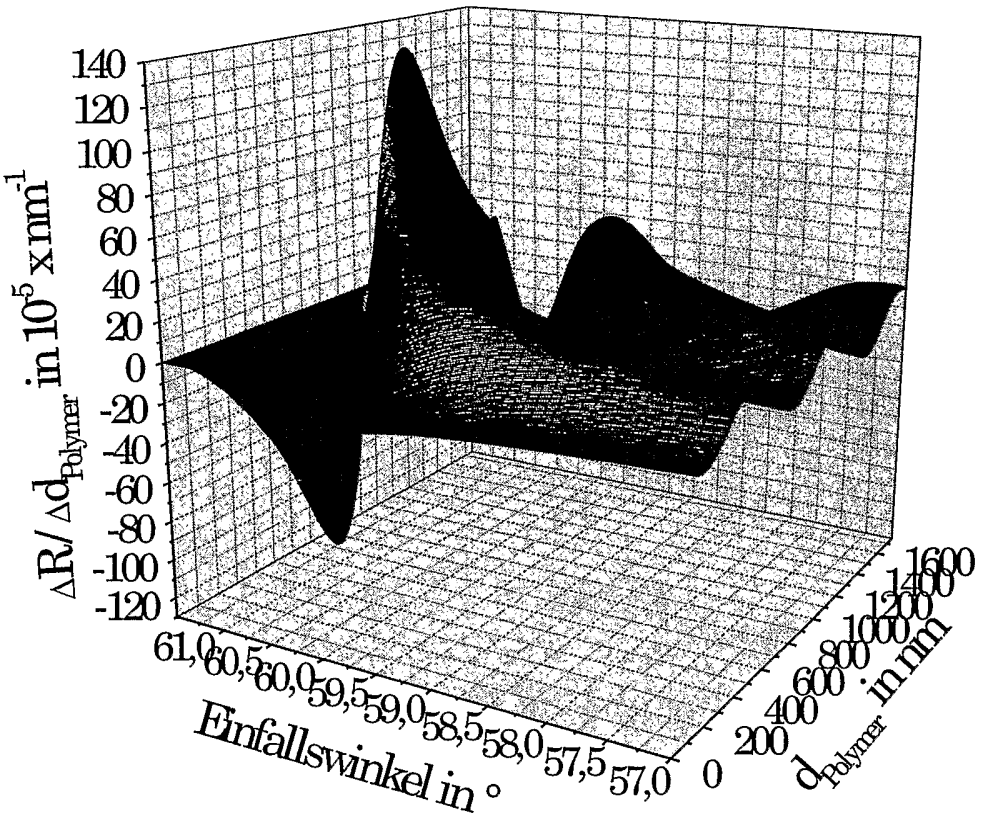

140
120
100
80
60
40
20
0
-20
-40
-60
-80
-100
-120
ΔR/Δd Polymer in 10-5 x nm-1
61,0
60,5
60,0
59,5
59,0
58,5
58,0
57,5
57,0
Einfallswinkel in °
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
d Polymer in nm

Abb. 17

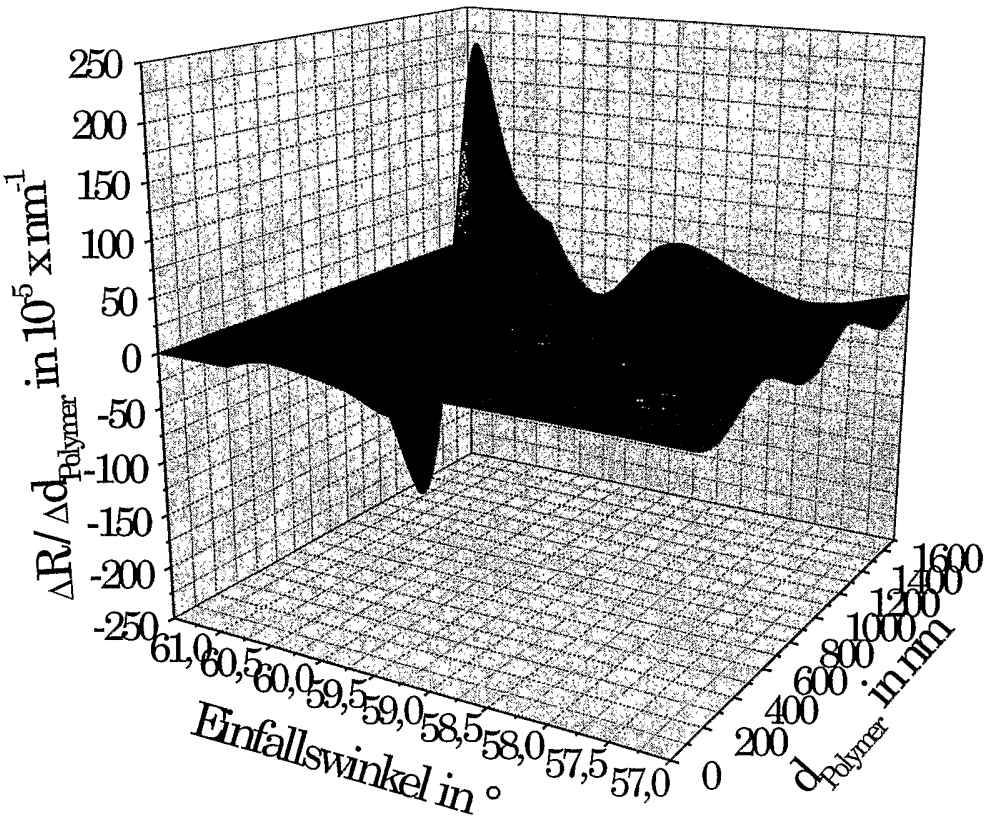

250
200
150
100
50
0
-50
-100
-150
-200
-250
ΔR/Δd Polymer in 10-5 x mm-1
61,0
60,5
60,0
59,5
59,0
58,5
58,0
57,5
57,0
Einfallswinkel in °
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
d Polymer in nm

Abb. 18

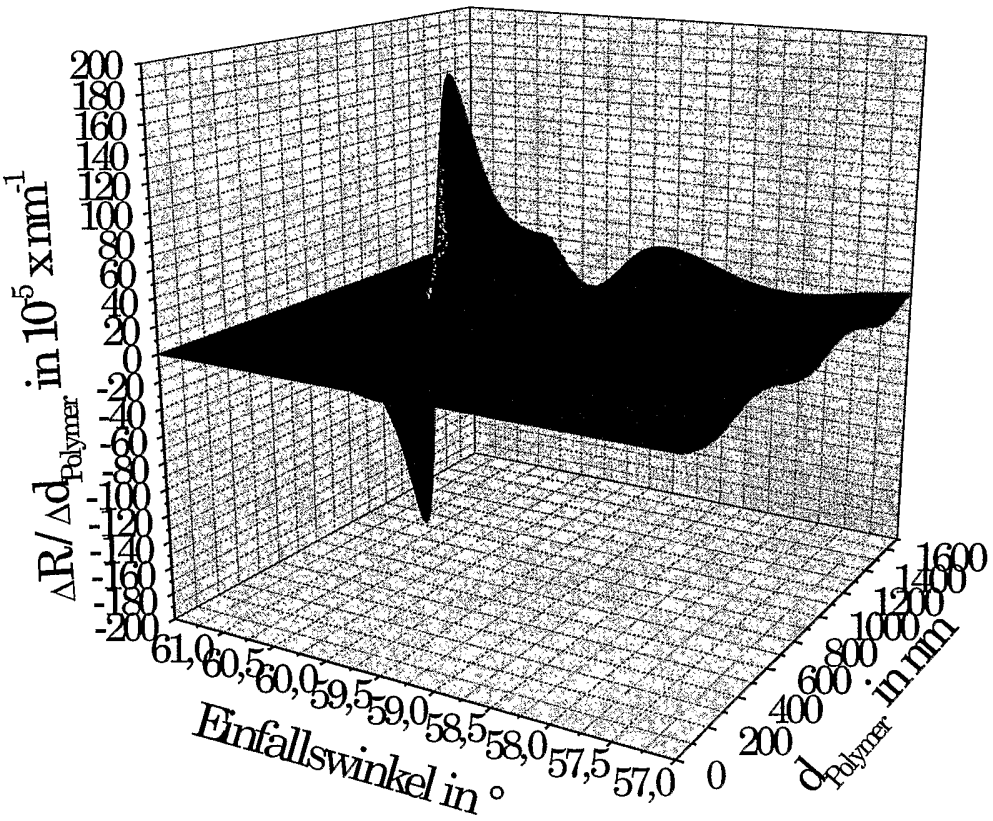

ΔR/Δd Polymer in 10^-5 x nm^-1
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
-40
-60
-80
-100
-120
-140
-160
-180
-200
61,0
60,5
60,0
59,5
59,0
58,5
58,0
57,5
57,0
Einfallswinkel in °
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
d Polymer in nm

Abb. 19

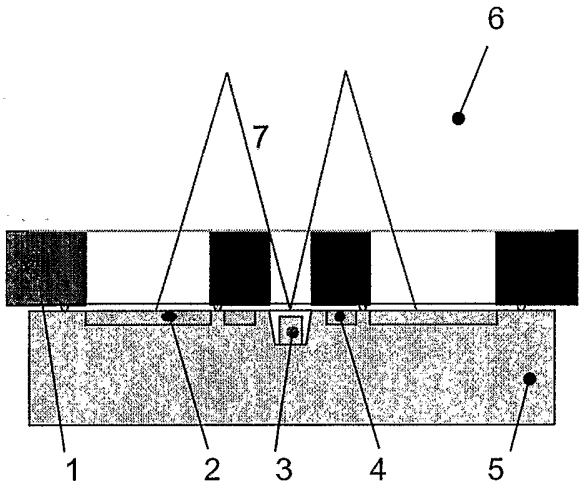


Abb. 20

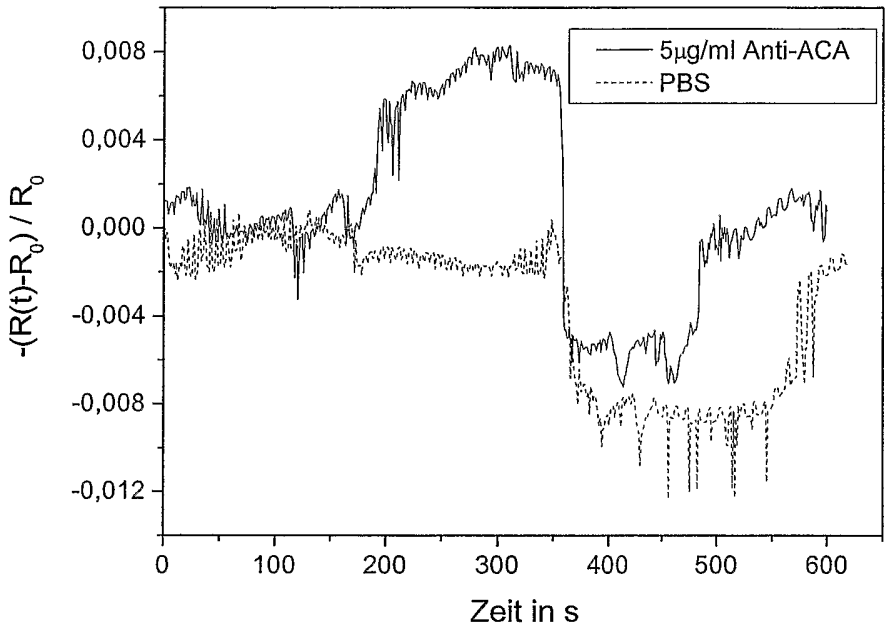

5µg/ml Anti-ACA
PBS
0,008
0,004
0,000
-0,004
-0,008
-0,012
-(R(t)-R0) / R0
0
100
200
300
400
500
600
Zeit in s

Abb. 21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/011218

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G01N21/45

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N G01B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, INSPEC, COMPENDEX, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 198 30 727 A1 (GAUGLITZ, GUENTER, PROF. DR., 72070 TUEBINGEN, DE; BRECHT, ANDREAS, DR) 14 January 1999 (1999-01-14) cited in the application	1,6-9, 11-19
Y	the whole document	5
X	DE 42 00 088 A1 (NAHM, WERNER, 2421 NEUGLASAU, DE; BIOCHEM WISSENSCHAFTLICHE GERAETE GM) 15 July 1993 (1993-07-15) the whole document	1,6,7, 11-17,19
X	DE 38 32 185 A1 (MITSCHKE, FEDOR, DIPL.-PHYS. DR., 3000 HANNOVER, DE) 29 March 1990 (1990-03-29)	1-4, 11-17,19
Y	the whole document	5
X	US 2004/070764 A1 (FUJIMURA TORU ET AL) 15 April 2004 (2004-04-15)	1,6, 10-17,19
Y		5

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
13 January 2006	20/01/2006

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Hoogen, R

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

nformation on patent family members

International Application No
PCT/EP2005/011218

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19830727 A1	14-01-1999	NONE	
DE 4200088 A1	15-07-1993	NONE	
DE 3832185 A1	29-03-1990	NONE	
US 2004070764 A1	15-04-2004	JP 2004132799 A	30-04-2004

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2005/011218

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
G01N21/45

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
G01N G01B

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, WPI Data, INSPEC, COMPENDEX, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 198 30 727 A1 (GAUGLITZ, GUENTER, PROF. DR., 72070 TUEBINGEN, DE; BRECHT, ANDREAS, DR) 14. Januar 1999 (1999-01-14) in der Anmeldung erwähnt	1,6-9, 11-19
Y	das ganze Dokument	5
X	DE 42 00 088 A1 (NAHM, WERNER, 2421 NEUGLASAU, DE; BIOCHEM WISSENSCHAFTLICHE GERAETE GM) 15. Juli 1993 (1993-07-15) das ganze Dokument	1,6,7, 11-17,19
X	DE 38 32 185 A1 (MITSCHKE, FEDOR, DIPL.-PHYS. DR., 3000 HANNOVER, DE) 29. März 1990 (1990-03-29)	1-4, 11-17,19
Y	das ganze Dokument	5
X	US 2004/070764 A1 (FUJIMURA TORU ET AL) 15. April 2004 (2004-04-15)	1,6, 10-17,19
Y		5

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
13. Januar 2006	20/01/2006

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Hoogen, R

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffen [redacted]en, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
[redacted]T/EP2005/011218

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19830727 A1	14-01-1999	KEINE	
DE 4200088 A1	15-07-1993	KEINE	
DE 3832185 A1	29-03-1990	KEINE	
US 2004070764 A1	15-04-2004	JP 2004132799 A	30-04-2004