

(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
2. September 2010 (02.09.2010)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2010/097369 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

G01N 21/55 (2006.01) G02B 21/00 (2006.01)
G01N 15/00 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2010/052229

(22) Internationales Anmeldedatum:
23. Februar 2010 (23.02.2010)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102009003548.6 27. Februar 2009 (27.02.2009) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): **Leibniz - Institut für Analytische Wissen-
schaften - ISAS - e.V.** [DE/DE]; Bunsen-Kirchhoffstraße
11, 44139 Dortmund (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **ZYBIN, Alexander**
[RU/DE]; Deutsch-Luxemburger Straße 56 E, 44225
Dortmund (DE).

(74) Anwalt: **WEISSE, Renate**; Bleibtreustraße 38, 10623
Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN,
KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA,
MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG,
NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC,
SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT,
LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI,
SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

— hinsichtlich der Identität des Erfinders (Regel 4.17 Ziffer
i)

— hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent
zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii)

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR HIGH-RESOLUTION REGISTRATION OF NANOPARTICLES ON TWO-DIMENSIONAL MEASUREMENT SURFACES

(54) Bezeichnung : VERFAHREN ZUR HOCHAUFGELOSTEN ERFASSUNG VON NANOPARTIKELN AUF ZWEIDIMENSIONALEN MESSFLÄCHEN

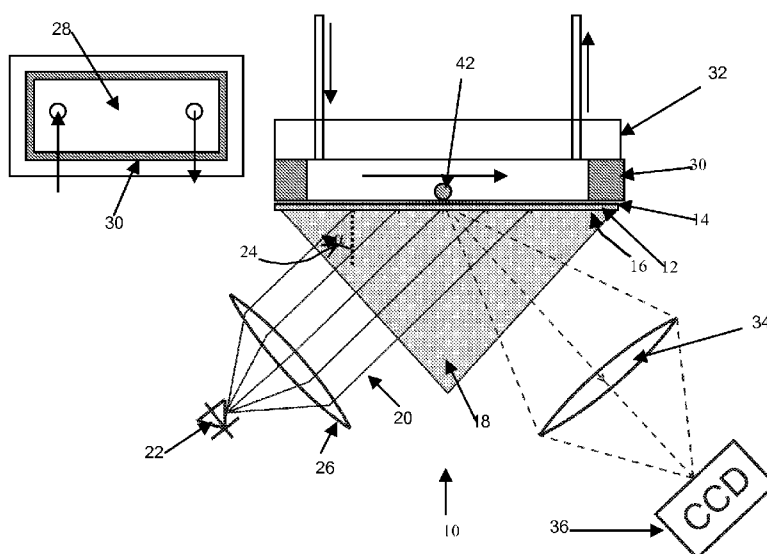


Fig. 1

(57) Abstract: The invention relates to a surface plasmon resonance spectrometer comprising a radiation source that emits substantially monochromatic radiation, a sensor surface, an optical arrangement for lighting the sensor surface by the radiation emitted from the radiation source such that surface plasmons can be created in the sensor surface, a detector having a plurality of image elements and observation optics for depicting the radiation reflected by the sensor surface on the detector, characterized in that the resolution capability of the observation optics and of the detector is larger than the resolution that can be obtained by the deflection-limited radiation source.

(57) Zusammenfassung: Ein Oberflächenplasmonenresonanzspektrometer enthaltend eine Strahlungsquelle, welche im wesentlichen monochromatische Strahlung emittiert, eine Sensorfläche, eine optische Anordnung zur Beleuchtung der Sensorfläche mit der von der Strahlungsquelle emittierten Strahlung, derart, dass in der Sensorfläche Oberflächenplasmonen erzeugbar sind, einen Detektor mit einer Vielzahl von Bildelementen,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



-
- | | | |
|---|------------------------|---|
| — hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17 Ziffer iii) | Veröffentlicht: | — mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3) |
| — Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) | | |

und eine Beobachtungsoptik zur Abbildung der von der Sensorfläche reflektierten Strahlung auf den Detektor, ist dadurch gekennzeichnet, dass das Auflösungsvermögen der Beobachtungsoptik und des Detektors größer ist als die mit der Strahlungsquelle erreichbare, beugungsbegrenzte Auflösung.

5 Patentanmeldung

10 Verfahren zur hochaufgelösten Erfassung von Nanopartikeln auf zweidimensionalen
Messflächen

15 **Technisches Gebiet**

Die Erfindung betrifft ein Oberflächenplasmonenresonanzspektrometer enthaltend

- 20 (a) eine Strahlungsquelle, welche im Wesentlichen monochromatische Strahlung emittiert,
- (c) eine Sensorfläche,
- 25 (b) eine optische Anordnung zur Beleuchtung der Sensorfläche mit der von der Strahlungsquelle emittierten Strahlung, derart, dass in der Sensorfläche Oberflächenplasmonen erzeugbar sind,
- (d) einen Detektor mit einer Vielzahl von Bildelementen, und
- 30 (e) eine Beobachtungsoptik zur Abbildung der von der Sensorfläche reflektierten Strahlung auf den Detektor.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur optischen Erfassung von einzelnen Nanopartikeln auf zweidimensionalen Messflächen.

Die Auflösung optischer Anordnungen, d.h. die Fähigkeit beispielsweise bei der optischen Mikroskopie kleine Objekte zu beobachten, ist durch die Beugung begrenzt. Die kleinsten Partikel, die mit einem Lichtmikroskop aufgelöst werden können, haben einen Durchmesser im Bereich von 0,2 μm entsprechend 200 nm. Die hierfür erforderlichen Anordnungen sind teuer.

Für die Erfassung von Partikeln mittels Elektronenmikroskopie ist ein Vakuum erforderlich. Auch das ist teuer und begrenzt die Möglichkeiten der detektierbaren Partikel.

Ein markierungsfreies Verfahren, welches es ermöglicht selektiv Viren oder Partikel von Interesse mit einem Durchmesser im Nanometerbereich (Nanopartikel) in Wasser- bzw. Puffer- Lösung *in-vivo* zu beobachten, ist nicht bekannt.

Bei der Lichtmikroskopie wird die Änderung der Lichtintensität an bestimmten Stellen der Abbildung analysiert. Bei der Betrachtung mit dem Auge erfolgt dies an der Netzhaut. Die Detektion mit einem Detektor erfolgt beispielsweise mit einem Charge Coupled Device (CCD). Da diese Änderungen durch die Differenz der optischen Eigenschaften des Objektes, wie Transmission, Brechungsindex oder Farbe und der Umgebung bedingt sind, kann man die Eigenschaften des Objektes dadurch charakterisieren.

Stand der Technik

Die Veröffentlichung „Imaging of Cell/Substrate Contacts of Living Cells with Surface Plasmon Resonance Microscopy“ von K.-F. Giebel et al., Biophysical J. Bd. 76, 1999 S. 509-516 offenbart ein Oberflächen Plasmonen Mikroskop.

Die Veröffentlichung „Differential Surface Plasmon Resonance Imaging for High-Throughput Bioanalyses“ von Boecker et al., Anal.Chem. 2007. Bd.79, S. 702-709 offenbart ein Oberflächen Plasmonen Mikroskop.

- 5 DE 10 2004 033 869 B3 offenbart ein Verfahren zur Bestimmung von Oberflächenplasmonenresonanzen an zweidimensionalen Messflächen.

DE 40 24 476 C1 beschreibt eine Kretschmann-Anordnung, welche zur Bestimmung von Analyten in einer fluiden Probe verwendet wird.

10

DE 10 2005 054 495 A1 offenbart die Verwendung verteilter Mess- und Referenzspots in Oberflächenplasmonenresonanz-Biosensoren, die auf orts aufgelösten Messungen basieren. Die Referenzspots ermöglichen die Korrektur von Temperaturschwankungen. Die herkömmliche SPR-Mikroskopie arbeitet mit einer im Voraus bestimmten Fläche, von der aus ein integriertes Messsignal erfasst wird. Dabei muss eine erforderliche Schichtdicke der an der Fläche gebundenen Moleküle erreicht werden, damit ein erforderliches Signal-Rauschverhältnis erreicht wird. Einzelne Teilchen können mit der Methode nicht erfasst werden.

15

- 20 In der Veröffentlichung „Optical and electronic design for a high-performance surface plasmon resonance imager“ von Timothy M. Chinowsky, Tony Mctutis, Elain Fu und Paul Yager in Proc.SPIE Vol. 5261, Editor Brian M. Cullum March 2004, S.173-182 ist ebenfalls ein herkömmliches SPR-Verfahren beschrieben, welches CCD-Detektoren verwendet.

25

Die Veröffentlichungen „Resolving subdiffraction-limit distances“ von Björn M. Reinhard, Hongyun Wang, Guoxin Rong und Lynell Skewis in SPIE Newsroom. DOI: 10.1117/2.1200902.1452 und „Resolving Sub-Diffraction Limit Encounters in Nanoparticle Tracking Using Live Cell Plasmon Coupling Microscopy“ der gleichen Autoren in Nano Letters 2008, Vol.8, No.10, S. 3386-3393 offenbaren Verfahren zur lokalisierten Plasmonenresonanz in metallischen Nanoteilchen.

30

Offenbarung der Erfindung

Es ist Aufgabe der Erfindung, eine Anordnung und ein Verfahren der eingangs genannten Art zur optischen Erfassung von einzelnen Nanopartikeln zu schaffen, insbesondere von Viren mit höherer Auflösung. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, dass das Auflösungsvermögen der Beobachtungsoptik und des Detektors größer ist als die mit der Strahlungsquelle unter klassischen Bedingungen erreichbare, beugungsbegrenzte Auflösung. Es hat sich überraschenderweise herausgestellt, dass die Beobachtung von Nanopartikeln auch mit Wellenlängen möglich ist, welche wesentlich größer als der Partikeldurchmesser sind. Beispielsweise ist die Beobachtung von Partikeln mit einem Durchmesser von 40 nm auch bei einer Wellenlänge oberhalb von 600 nm möglich. Zur Vermeidung einer Situation, bei der das Signal im Rauschen verschwindet, wird vorzugsweise ein Referenzsignal gebildet, mit dem das Signal normalisiert wird. Das Referenzsignal kann durch Mittelwertbildung der Signale erzeugt werden, die an der gleichen Stelle der Sensorfläche vor der Anlagerung eines Partikels an die Sensorfläche erfasst werden.

Die Erfassung der Plasmonenresonanz kann mit einer sogenannten Kretschmann-Anordnung erfolgen. Eine lokale Änderung der Reflektivität wird durch die Zusammenwirkung der Nanopartikel mit dem evaneszenten Feld hervorgerufen. Bei dieser Anordnung können Partikel detektiert werden, die kleiner als 40 nm sind. Zudem können Flächen mit mehreren Quadratmillimetern gleichzeitig erfasst werden. Wichtig ist es bei der Anordnung, dass die Partikel sich sehr nahe mit einem Abstand unterhalb von 200 nm an der Sensorfläche befinden oder diese berühren. Die Anordnung eignet sich für die Verwendung in der virologischen Forschung und bei der Erfassung von Viren an öffentlichen Flächen. Auch für die hochempfindliche, klinische Diagnostik kann das Verfahren eingesetzt werden.

Erfindungsgemäß wird die Änderung der Reflektivität der Sensorfläche beobachtet, welche durch ein Partikel hervorgerufen wird. Diese Änderung ist in einer bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung stufenartig und lokalisiert in wenigen μm . Die Änderung wird an einer im Voraus unbekannten Stelle und zu einem unbekannten Zeitpunkt

gemessen. Die Stelle und der Zeitpunkt werden im Laufe der Messung für jedes Partikel individuell gefunden.

Bei der herkömmlichen SPR-Imaging-Methode wird das Signal an im Voraus definierten relativ großen ($>100 \times 100 \mu\text{m}^2$) Orten gemessen. An diesen Orten wurden bei bekannten Verfahren Rezeptoren aufgetragen und eine Bindung erwartet. Das Signal steigt dabei kontinuierlich, proportional zu der Schichtdicke der schon gebundenen Partikel oder Moleküle. Als Sensor wird eine Fläche benutzt, welche eine möglichst starke Reflektivitätsänderung durch Änderung des Brechungsindexes gewährleistet.

Eine solche Fläche mit starker Reflektivitätsänderung kann mittels einer Goldfläche in Kretschmann-Anordnung verwirklicht werden. Bei einer Kretschmann-Anordnung ist die Reflektivität bei einem Einfallswinkel nahe dem Resonanzwinkel sehr stark von dem Brechungsindex des Mediums abhängig, dass mit der Goldschicht in Kontakt ist.

Wenn sich ein Partikel an die Fläche anlagert, ändert sich die Reflektivität in der Umgebung des Partikels. Diese Änderung zeigt sich als Änderung der Helligkeit an der entsprechenden Stelle der Abbildung. Die Änderung, die von einem einzelnen Nanopartikel hervorgerufen wird, soll gering sein und kann, nach allgemeinen Vorstellungen, nicht beobachtet werden. Der Gegenstand der Erfindung ist, dass diese Änderung bei modernen Techniken auch für dielektrischen Partikeln kleiner 40 nm detektierbar ist. Anders als bei der herkömmlichen SPR-Imaging-Methode kann die Stelle, an der das Signal zu messen ist, nicht im Voraus definiert werden und soll im Laufe der Messung gefunden werden.

Die Selektivität der Detektierung ist, wie auch bei der herkömmlichen SPR-Imaging-Methode, durch Selektivität der Bindung von Partikeln an an der Sensorfläche angelagerten Rezeptoren gewährleistet.

Da die Reflektivitätsänderungen durch die Größe und den Brechungsindex des Partikels bedingt sind, können sie zur Charakterisierung des Partikels benutzt werden.

Alternativ kann die Fläche mit starker Reflektivitätsänderung durch periodische Strukturen verwirklicht werden, die Plasmonenanregung zulassen. Auch entspiegelte Glass- oder Kristall-Flächen sind geeignet. Die Entspiegelung wird durch die Partikel gebrochen und die Reflektivität in der Umgebung steigt. In einer weiteren, alternativen Ausgestaltung der Erfindung wird die Fläche mit starker Reflektivitätsänderung von einer Fläche mit metallischen Nanopartikeln verwirklicht, die bei ausgewählten Wellenlängen die Anregung von lokalisierter Plasmonenresonanz zulassen. Diese metallischen Nanopartikel dienen als Sensorpartikel. Nahe der Resonanz ist die Streuung an einem Partikel abhängig vom Brechungsindex. Wenn sich ein anderer, nicht metallischen Partikel an einen Sensorpartikel anlagert, ändert sich die Reflektivität der Sensorfläche an dieser Stelle. Schließlich kann die Fläche mit starker Reflektivitätsänderung durch eine optische Mehrschichtstruktur verwirklicht werden, in der auch eine Oberflächenplasmonresonanz angeregt werden kann.

Ausgestaltungen der Erfindung sind Gegenstand der Unteransprüche. Ein Ausführungsbeispiel ist nachstehend unter Bezugnahme auf die beigegeführten Zeichnungen näher erläutert.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Fig.1 ist eine schematische Darstellung einer Kretschmann-Anordnung zur Erfassung von Nanopartikeln und Viren.

Fig.2 zeigt den Verlauf eines Reflexionssignals in der Nähe der Resonanzwellenlänge mit und ohne Partikel.

Fig.3 zeigt den Zeitverlauf eines Signals über einen Zeitraum, in dem sich ein Teilchen anlagert.

Fig.4 zeigt die Abhängigkeit des Signals vom Partikeldurchmesser.

Fig.5 zeigt das Bild einer beobachteten Fläche nach verschiedenen Beobachtungszeiträumen für Polystyrolteilchen mit einem Durchmesser von 0,08 μm .

5 Fig.6 ist eine schematische Darstellung einer Anordnung mit regelmäßigen Strukturen in Form von Goldschicht-Inseln zur Erfassung von Nanopartikeln und Viren.

Beschreibung des Ausführungsbeispiels

10

Figur 1 zeigt eine Kretschmann-Anordnung in abbildender Konfiguration, die allgemein mit 10 bezeichnet ist. Eine solche Anordnung 10 ist bereits bekannt. Die Funktionsweise des Oberflächenplasmonenspektrometers braucht hier daher nicht näher beschrieben werden. Eine Glasscheibe 12 ist mit einer 50 nm dicken Goldschicht 14 beschichtet. Mit
15 der der Goldschicht 14 abgewandten Seite 16 ist die Glasscheibe 12 an einem Prisma 18 befestigt. Zur Befestigung und Verbesserung des optischen Kontaktes wird Immersionsöl verwendet.

20

Die Goldschicht 14 wird mit Strahlung 20 aus einer Superlumineszenzdiode 22 beleuchtet. Ein Beispiel für eine geeignete Diode 22 ist eine QSDM-680-9 von Qphotonix, die bei einer Wellenlänge von 670 nm im sichtbaren Bereich abstrahlt. Die Beleuchtung erfolgt durch das Prisma 18 bei festem Einfallswinkel 24. Anders als ein Laser als Strahlungsquelle hat eine Superlumineszenzdiode keine Unregelmäßigkeiten im Strahlungsprofil (Specles). Der Einfallswinkel 24 ist so gewählt, dass die Wellenlänge
25 der Diode auf der linken Seite des Resonanzminimums, also bei kleinerem Winkel, erscheint.

30

Zur Erzeugung eines parallelen Strahlungsbündels wird eine Linse 26 eingesetzt. Es versteht sich, dass hier auch ein gekrümmter Spiegel vorgesehen kann.

An der Goldschicht ist ein Probenraum für Flüssigkeiten in Form einer Flusszelle 28 angebracht. Die Flusszelle 28 wird von einer 1 mm dicken, S-förmigen PDMS-Dichtung gebildet. Der rückwärtige Teil der Flusszelle 28 (nicht dargestellt) besteht aus Plexiglas.

Ferner sind ein Einlass und ein Auslass in Form von Schläuchen an der Flusszelle 28 vorgesehen. Das Zellvolumen der Flusszelle 28 ist etwa 300 μL .

Die Glasoberfläche der Scheibe 12 bildet eine Sensoroberfläche. Die Sensoroberfläche wird mittels eines Standard Minolta Photoobjektivs 30 auf einen Charge Coupled Device Detektor (CCD) 32 abgebildet. Die Apertur des Objektivs 30 ist 1/1.7. Der CCD-Detektor war ein Cappa-100 CCD mit einer Pixelgröße von 6,45x6,45 μm . Die Sättigungskapazität des Detektors liegt bei 40000 Elektronen pro Pixel. Der Detektor 32 hat eine Fläche von $\sim 1000 \times 1000$ Pixel. Bei einer 7-fachen Vergrößerung entspricht ein Pixel einer Sensorfläche von etwa $\sim 1 \mu\text{m}$. In horizontaler Ebene (p-Ebene) ist das Bild aufgrund der Steigung der Sensoroberfläche relativ zur optischen Achse komprimiert. Hier entspricht ein Pixel einer Sensoroberfläche von etwa $\sim 1,4 \mu\text{m}$. Die Steigung verursacht zusätzlich eine signifikante Begrenzung des Bereiches an der Sensorfläche, das scharf abgebildet werden kann.

Zur Beobachtung von Partikeln werden die Bilder mit einer Rate von bis zu 100 Bildern/Sekunde möglich. Die Bilder werden gespeichert und ausgewertet.

In einem gut arbeitenden Ausführungsbeispiel wird mit einer Ausleserate von 40 Bildern/Sekunde ausgelesen. Jeweils 10 Bilder werden gemittelt. Der Mittelwert der Intensität wird hierzu für jedes Pixel gebildet und zur Weiterverarbeitung gespeichert.

Die Intensitätsverteilung des ursprünglichen Bildes ist sehr inhomogen. Dies liegt an der hohen Empfindlichkeit der Sensorfläche gegenüber kleinen Unregelmäßigkeiten auf der Oberfläche. Es sind gewöhnlich viele Punkte zu sehen, die eine Abweichung von einem mittleren Wert von bis zu 70% haben. Die lokale Inhomogenität von $\pm 10\%$ innerhalb eines 20 μm Fleckens auf der Sensorfläche ist typisch für das übrige Bild. Diese Intensitätsverteilung ist zeitlich relativ stabil. Zur Verringerung der Inhomogenität wird eine Normalisierung angewendet. Ein Referenzbild wird erzeugt, indem die Bilder über den Zeitraum 34 (Fig.3) gemittelt werden, in dem keine Partikelsuspension kommt. Die Intensität in jedem Pixel in den darauffolgenden Bildern 36 wurde auf diesen Mittelwert im Referenzbild für jedes Pixel normalisiert. Dadurch wird eine lokale Inhomogenität erreicht, die $\pm 1\%$ nicht überschreitet.

Die Bindung eines Partikels 38 (Fig.1) an der Sensorfläche 12 bewirkt eine stufenförmige Intensitätsänderung 40 (Fig.3) auf den zugehörigen Pixeln. Diese Stufe 40 wird über alle Pixel integriert, die durch die Bindung des Partikels berührt werden. Dies bildet das
5 Signal, welches in Figur 4 dargestellt ist. Der Wert für die Stufe 40 kennzeichnet den gebundenen Partikel 38.

Das Schrotrauschen ist der im Wesentlichen begrenzende Faktor für die minimale, erfassbare Intensitätsstufe. Zur Minimierung des Schrotrauschens wird vorzugsweise das
10 maximale Produkt aus der Pixelkapazität C und der Auslesefrequenz F verwendet. Bei einer Pixelkapazität von 40 000 Photoelektronen können lediglich ~20 000 auflaufen. Andernfalls erfolgt eine Sättigung einiger Pixel wegen der signifikanten Inhomogenitäten des Bildes.

Im vorliegenden Ausführungsbeispiel wird mit einem Mittelwert über 40 Bilder/Sekunde über 10 Pixel integriert. Damit werden 2×10^6 Elektronen in der zum gebundenen Partikel zugehörigen Fläche akkumuliert. Dies entspricht einem Schrotrauschen von 7×10^{-4} . Mit dem vorliegenden Verfahren können Schritte in der Größenordnung von 10^{-3} erfasst werden. Dies bedeutet, dass das Schrotrauschen der begrenzende Faktor ist.
20

Die Bilder in Figur 5 wurden mit der CCD-Kamera 32 aufgenommen. Auf nacheinander folgenden Aufnahmen kann man die Bindung von Partikeln direkt beobachten. Die Partikel wurden in der 140. Sekunde injiziert.

Um das Signal eines Partikels zu quantifizieren, wurde der zeitliche Verlauf der Intensität im Bereich der Abbildung des Partikels gemessen, wie in der Figur 3 dargestellt. Die Abhängigkeit des Signals von der Partikelgröße ist in Figur 4 zu sehen.
25

5

Patentansprüche

1. Oberflächenplasmonenresonanzspektrometer enthaltend

10

(a) eine Strahlungsquelle, welche im Wesentlichen monochromatische Strahlung emittiert,

(b) eine Sensorfläche,

15

(c) eine optische Anordnung zur Beleuchtung der Sensorfläche mit der von der Strahlungsquelle emittierten Strahlung, derart, dass in der Sensorfläche Oberflächenplasmonen erzeugbar sind,

(d) einen Detektor mit einer Vielzahl von Bildelementen, und

20

(e) eine Beobachtungsoptik zur Abbildung der von der Sensorfläche reflektierten Strahlung auf den Detektor,

dadurch gekennzeichnet, dass

25

(f) das Auflösungsvermögen der Beobachtungsoptik und des Detektors größer ist als die mit der Strahlungsquelle unter klassischen Bedingungen erreichbare, beugungsbegrenzte Auflösung.

30

2. Oberflächenplasmonenresonanzspektrometer nach Anspruch 1, **gekennzeichnet durch** eine Sensorfläche in Kretschmann-Anordnung.

3. Oberflächenplasmonenresonanzspektrometer nach einem der vorgehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Strahlungsquelle eine Superlumineszenzdiode ist.
- 5 4. Oberflächenplasmonenresonanzspektrometer nach einem der vorgehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Sensorfläche eine Goldbeschichtung aufweist.
- 10 5. Oberflächenplasmonenresonanzspektrometer nach einem der vorgehenden Ansprüche, **gekennzeichnet durch** Mittel zur Herstellung des Kontakts von zu beobachtenden Partikeln mit der Sensorfläche.
- 15 6. Oberflächenplasmonenresonanzspektrometer nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Sensorfläche eine Fläche mit starker Reflektivitätsänderung ist, welche durch periodische Strukturen erzeugbar ist, die eine Plasmonenanregung zulassen.
- 20 7. Oberflächenplasmonenresonanzspektrometer nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Sensorfläche eine entspiegelte Glass- oder Kristall-Fläche mit starker Reflektivitätsänderung bei Anlagerung von Partikeln ist.
- 25 8. Oberflächenplasmonenresonanzspektrometer nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Sensorfläche eine Fläche mit metallischen Nanopartikeln mit starker Reflektivitätsänderung bei Anlagerung von Partikeln ist, die bei der Wellenlänge der Strahlungsquelle die Anregung von lokalisierter Plasmonenresonanz zulassen.
- 30 9. Oberflächenplasmonenresonanzspektrometer nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Sensorfläche eine optische Mehrschichtstruktur ist, in der auch eine Oberflächenplasmonenresonanz angeregt werden kann.
10. Oberflächenplasmonenresonanzspektrometer nach einem der vorgehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Detektor ein Charge Coupled

Device zur Aufnahme einer Vielzahl von zeitlich aufeinanderfolgenden Intensitätssignalen für jedes Pixel ist und Auswertemittel vorgesehen sind, mit denen zeitliche Mittelwerte zur Verringerung von Schrotrauschen erzeugbar sind.

- 5 11. Oberflächenplasmonenresonanzspektrometer nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** durch Partikel oder Moleküle eine stufenartige lokale Änderung der Reflektivität an beliebiger, im Voraus unbekannter Stelle der Sensorfläche zu beliebigem, unbekannten Zeitpunkt erzeugbar ist.
- 10 12. Verwendung eines Oberflächenplasmonenresonanzspektrometers nach einem der vorgehenden Ansprüche in der virologischen Forschung, bei der Erfassung von Viren an öffentlichen Flächen oder bei hochempfindlicher, klinischer Diagnostik.
- 15 13. Verfahren zur optischen Erfassung von einzelnen Nanopartikeln auf zweidimensionalen Messflächen mittels Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie, mit den Schritten
- 20 (a) Beleuchten einer Sensorfläche mit Strahlung aus einer monochromatischen Strahlungsquelle derart, dass in der Sensorfläche Oberflächenplasmonen erzeugbar sind,
- (b) Einbringen von zu beobachtenden Partikeln auf die Sensorfläche oder in den unmittelbaren Nahbereich der Sensorfläche, und
- 25 (c) Detektieren der von der Sensorfläche reflektierten Strahlung mit einem Detektor mit einer Vielzahl von Bildelementen,
- dadurch gekennzeichnet, dass**
- 30 (d) die Partikel mit einem Auflösungsvermögen beobachtet werden, welches größer ist als die mit der Strahlungsquelle erreichbare, beugungsbegrenzte Auflösung.

ALLE BEZÜGE ZUR FIGUR 6 WERDEN ALS UNGÜLTIG BETRACHTET

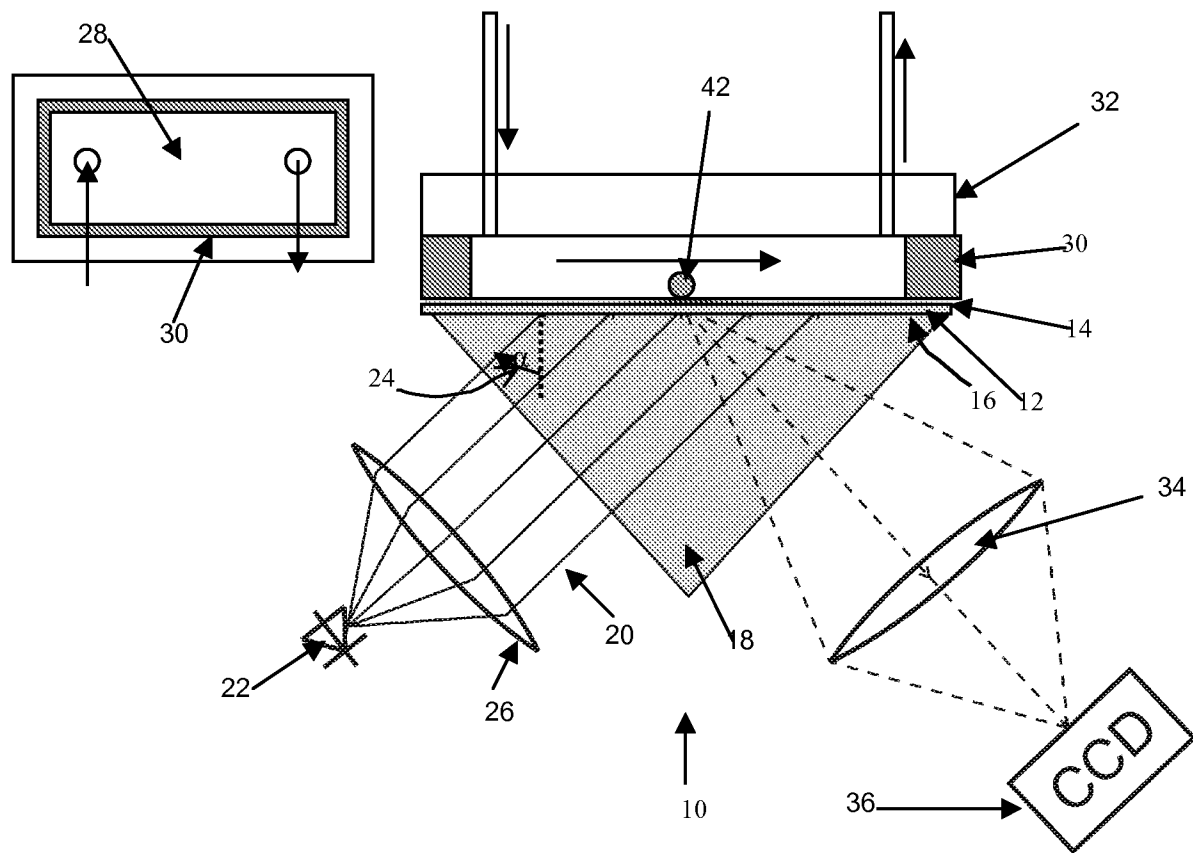
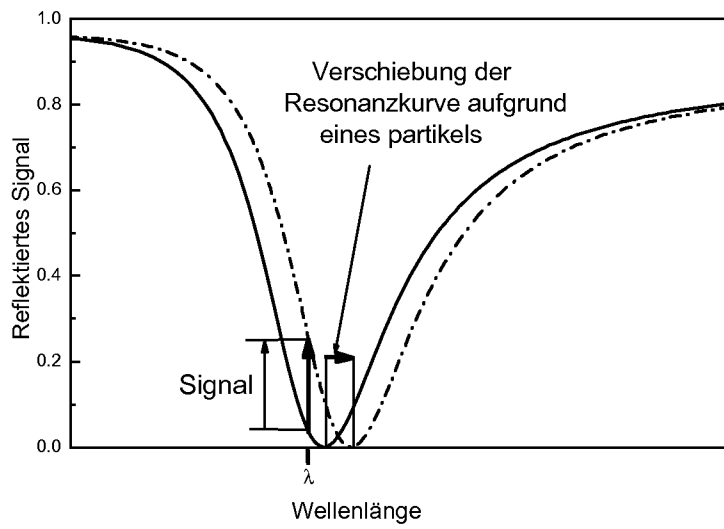
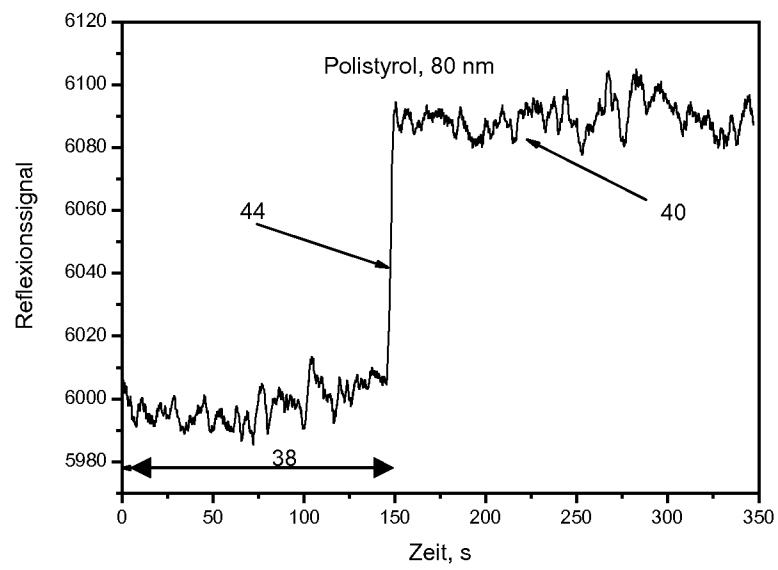


Fig. 1

**Fig. 2**

**Fig. 3**

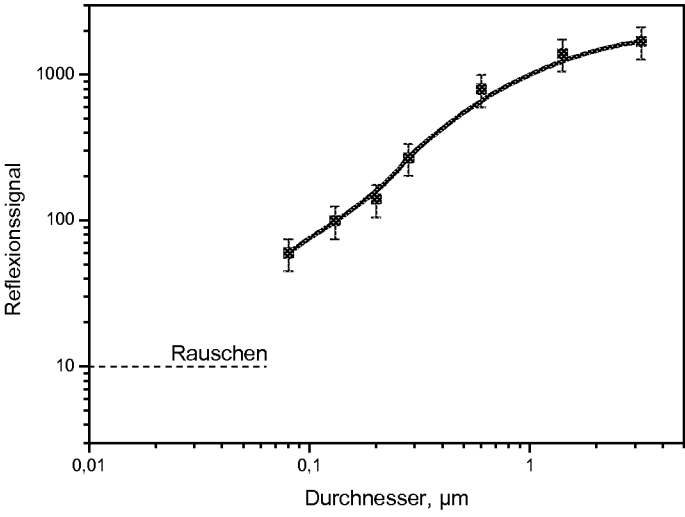


Fig. 4

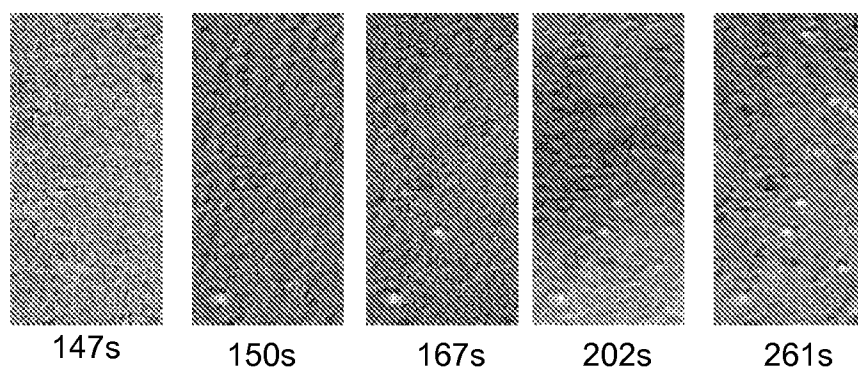


Fig. 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/052229

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N21/55 G01N15/00 G02B21/00
ADD.

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 G02B

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, INSPEC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/35081 A1 (PENN STATE RES FOUND [US]; NATAN MICHAEL J [US])	1-11, 13
Y	17 May 2001 (2001-05-17) abstract page 27, line 9 - line 18 page 28, line 5 - line 21 page 30 page 31, line 24 - page 32, line 19 figure 14 ----- -/--	12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family 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

3 May 2010

Date of mailing of the international search report

21/05/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

D'Alessandro, Davide

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/052229

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GIEBEL K-F ET AL: "IMAGING OF CELL/SUBSTRATE CONTACTS OF LIVING CELLS WITH SURFACE PLASMON RESONANCE MICROSCOPY" BIOPHYSICAL JOURNAL, BIOPHYSICAL SOCIETY, US, vol. 76, no. 1, PART 01, 1 January 1999 (1999-01-01), pages 509-516, XP001193358 ISSN: 0006-3495 cited in the application abstract page 509, right-hand column, last paragraph - page 510, left-hand column figure 1 page 512, left-hand column	1,2,5, 10,11,13
Y	US 7 233 396 B1 (HALL JOHN [US] ET AL) 19 June 2007 (2007-06-19) abstract figure 3 column 10, line 3 - line 35	12
X,P	ZYBIN ET AL.: "Real-time Detection of Single Immobilized Nanoparticles by Surface Plasmon Resonance Imaging" PLASMONICS, vol. 5, 10 December 2009 (2009-12-10), pages 31-35, XP002580721 DOI: 10.1007/s11468-009-9111-5 abstract page 32 figures 1,2	1-13
A	GARINI Y ET AL: "From micro to nano: recent advances in high-resolution microscopy" CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, LONDON, GB LNKD- DOI:10.1016/J.COPBIO.2005.01.003, vol. 16, no. 1, 1 February 2005 (2005-02-01), pages 3-12, XP004756190 ISSN: 0958-1669 page 3 - page 4 page 10	1-13
A	WO 98/57148 A1 (CARR ROBERT [GB]) 17 December 1998 (1998-12-17) abstract page 3, line 23 - line 35 page 7, line 13 - line 21 figure 1	1-13

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/052229

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>SMOLYANINOV I I ET AL: "Novel nanophotonics geometries for sensing applications" PROCEEDINGS OF THE SPIE - THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR OPTICAL ENGINEERING SPIE-INT. SOC. OPT. ENG USA LNKD- DOI:10.1117/12.559593, vol. 5554, no. 1, 2004, pages 187-196, XP040191003 ISSN: 0277-786X page 193, paragraph 4 - page 196 -----</p>	12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2010/052229

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 0135081	A1	17-05-2001	AU	3081301 A	06-06-2001
			CA	2391009 A1	17-05-2001
			EP	1236034 A1	04-09-2002
			JP	2003514224 T	15-04-2003
US 7233396	B1	19-06-2007	CA	2649421 A1	25-10-2007
			CN	101449135 A	03-06-2009
			EP	2010877 A2	07-01-2009
			JP	2009533696 T	17-09-2009
			US	2008002202 A1	03-01-2008
			WO	2007121406 A2	25-10-2007
WO 9857148	A1	17-12-1998	AU	7668598 A	30-12-1998
			EP	1044361 A1	18-10-2000
			GB	2326229 A	16-12-1998
			US	6280960 B1	28-08-2001

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2010/052229

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

INV. G01N21/55 G01N15/00 G02B21/00
ADD.

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

G01N G02B

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, INSPEC

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 01/35081 A1 (PENN STATE RES FOUND [US]; NATAN MICHAEL J [US]) 17. Mai 2001 (2001-05-17)	1-11,13
Y	Zusammenfassung Seite 27, Zeile 9 - Zeile 18 Seite 28, Zeile 5 - Zeile 21 Seite 30 Seite 31, Zeile 24 - Seite 32, Zeile 19 Abbildung 14 ----- -/-	12



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

3. Mai 2010

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

21/05/2010

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

D'Alessandro, Davide

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>GIEBEL K-F ET AL: "IMAGING OF CELL/SUBSTRATE CONTACTS OF LIVING CELLS WITH SURFACE PLASMON RESONANCE MICROSCOPY" BIOPHYSICAL JOURNAL, BIOPHYSICAL SOCIETY, US, Bd. 76, Nr. 1, PART 01, 1. Januar 1999 (1999-01-01), Seiten 509-516, XP001193358 ISSN: 0006-3495 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 509, rechte Spalte, letzter Absatz - Seite 510, linke Spalte Abbildung 1 Seite 512, linke Spalte</p>	1,2,5, 10,11,13
Y	<p>US 7 233 396 B1 (HALL JOHN [US] ET AL) 19. Juni 2007 (2007-06-19) Zusammenfassung Abbildung 3 Spalte 10, Zeile 3 - Zeile 35</p>	12
X,P	<p>ZYBIN ET AL.: "Real-time Detection of Single Immobilized Nanoparticles by Surface Plasmon Resonance Imaging" PLASMONICS, Bd. 5, 10. Dezember 2009 (2009-12-10), Seiten 31-35, XP002580721 DOI: 10.1007/s11468-009-9111-5 Zusammenfassung Seite 32 Abbildungen 1,2</p>	1-13
A	<p>GARINI Y ET AL: "From micro to nano: recent advances in high-resolution microscopy" CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, LONDON, GB LNKD- DOI:10.1016/J.COPBIO.2005.01.003, Bd. 16, Nr. 1, 1. Februar 2005 (2005-02-01), Seiten 3-12, XP004756190 ISSN: 0958-1669 Seite 3 - Seite 4 Seite 10</p>	1-13
A	<p>WO 98/57148 A1 (CARR ROBERT [GB]) 17. Dezember 1998 (1998-12-17) Zusammenfassung Seite 3, Zeile 23 - Zeile 35 Seite 7, Zeile 13 - Zeile 21 Abbildung 1</p>	1-13

-/--

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>SMOLYANINOV I I ET AL: "Novel nanophotonics geometries for sensing applications" PROCEEDINGS OF THE SPIE - THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR OPTICAL ENGINEERING SPIE-INT. SOC. OPT. ENG USA LNKD- DOI:10.1117/12.559593, Bd. 5554, Nr. 1, 2004, Seiten 187-196, XP040191003 ISSN: 0277-786X Seite 193, Absatz 4 - Seite 196 -----</p>	12

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2010/052229

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 0135081	A1	17-05-2001	AU	3081301 A	06-06-2001
			CA	2391009 A1	17-05-2001
			EP	1236034 A1	04-09-2002
			JP	2003514224 T	15-04-2003
<hr/>					
US 7233396	B1	19-06-2007	CA	2649421 A1	25-10-2007
			CN	101449135 A	03-06-2009
			EP	2010877 A2	07-01-2009
			JP	2009533696 T	17-09-2009
			US	2008002202 A1	03-01-2008
			WO	2007121406 A2	25-10-2007
<hr/>					
WO 9857148	A1	17-12-1998	AU	7668598 A	30-12-1998
			EP	1044361 A1	18-10-2000
			GB	2326229 A	16-12-1998
			US	6280960 B1	28-08-2001