



(11) **RO 127854 B1**

(51) **Int.Cl.**

G01N 27/06 (2006.01).
G01N 27/02 (2006.01).
G01N 21/55 (2006.01).
G01N 33/487 (2006.01).
C12Q 1/00 (2006.01)

(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 00136**

(22) Data de depozit: **16.02.2011**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29.08.2014** BOPI nr. **8/2014**

(41) Data publicării cererii:
28.09.2012 BOPI nr. **9/2012**

(73) Titular:
• **CENTRUL INTERNAȚIONAL DE
BIODINAMICĂ,
INTRAREA PORTOCALELOR NR.1 B,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **GHEORGHIU EUGEN, BD. UNIRII NR.12,
BL.7 C, SC.A, AP.18, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**US 2009/0045063 A1; RO 120790 B1;
DE 10054351 A1; RO 117877 B1;
US 2002/0076690 A1; US 5641640**

(54) **METODĂ DE DETERMINARE A CONCENTRAȚIEI UNOR
ANALIȚI PRIN APLICAREA CONTROLATĂ A UNUI STIMUL
PERIODIC**



1 Invenția se referă la o metodă de detecție și de determinare a concentrației unor
2 analiti de interes într-un fluid (de exemplu, lichid), fiind destinată unor aplicații în controlul
3 calității mediului, industria alimentară, farmaceutică, biotehnologie sau medicină.

4 Sunt cunoscute metode analitice optice (de exemplu, Rezonanța Plasmonilor de
5 Suprafață -SPR) sau electrice (bazate pe măsurători de impedanță) de detecție a prezenței
6 sau determinare a concentrației unor compuși într-o soluție de interes care se bazează pe
7 principiile de recunoaștere specifică de tipul ligand - receptor. Deși răspund parțial cerințelor
8 de sensibilitate, aceste metode se bucură de un interes deosebit, pentru faptul că se
9 pretează la automatizare și permit detecția specifică a analitelor dintr-o gamă diversă de
10 domenii aplicative, de la industria alimentară la medicină.

11 În categoria analitelor țintă, se înscriu compuși cu dimensiuni, compoziție și structură
12 diferite, de la molecule cu masă moleculară mică, până la celule patogene. Fiecare tip de
13 analit impune abordări diferite.

14 Astfel, brevetul **US 7718355** prezintă o metodă de detecție, în timp real, a micro-
15 organismelor patogene, utilizând un biosenzor SPR, modificat în flux, care constă din

16 a. o etapă volumică (în șarjă) de reacție imună, realizată între microorganismul
17 patogen și un anticorp specific, urmată de

18 b. separarea selectivă a microorganismelor patogene, legate de anticorp;

19 c. legarea în flux de suprafața senzorului SPR a microorganismelor patogene.

20 O altă metodă de detecție a microorganismelor patogene, folosind determinări de
21 impedanță, prin utilizarea de anticorpi, este prezentată în brevetul **US 2002/0076690 A1**.
22 Brevetul respectiv descrie o metodă de detecție a prezenței patogenilor atașați de particule
23 acoperite cu anticorpi, prin măsurători de impedanță, care constă în injecția probei
24 (susceptibilă să conțină patogeni) într-un sistem cu (micro)fluidică. Circulând în imediata
25 vecinătate a unor electrozi interdigitați, pe suprafața cărora au fost imobilizați anticorpi,
26 patogenii se pot lega de anticorpii respectivi, caz în care se modifică impedanța electrozilor,
27 modificare utilizată pentru detectarea prezenței patogenilor. Pentru a amplifica semnalul,
28 după introducerea probei, se injectează o suspensie cu particule acoperite cu aceiași
29 anticorpi, care se vor lega de patogenii captați specific pe senzor, determinând o modificare
30 suplimentară a impedanței măsurate între electrozi alăturați.

31 Pentru analiza compușilor de masă moleculară mică, amintim:

32 - brevetul **US 5641640**, care prezintă o metodă de determinare a prezenței analitului
33 într-o probă lichidă prin SPR, respectiv, prin analiza modificărilor datorate variației indicelui
34 de refracție de la nivelul unei suprafețe optice, solide, în contact cu proba. Schimbarea este
35 cauzată de legarea specifică a analitului. Variația indicelui de refracție este dependentă atât
36 de cantitatea de analit legat la suprafața senzorului, cât și de lungimea de undă. Conform
37 invenției, metoda constă în determinarea variației cu lungimea de undă a indicelui de
38 refracție rezultat, datorită legării sau dezlegării compusului la nivelul suprafeței senzorului.
39 Această variație este reprezentativă pentru cantitatea de analit din probă.

40 - brevetul **US 7678256**, care prezintă o metodă de determinare a prezenței a cel puțin
41 unei specii de analit, folosind măsurători de impedanță în microcanale. Determinarea de
42 analiti în probe lichide se bazează pe concentrarea analitului în zona de măsură, folosind
43 dielectroforeza și detectarea analitului prin măsurători de impedanță.

44 Dezavantajul major al soluțiilor prezentate constă în sensibilitatea limitată a acestor
45 abordări, care se bazează exclusiv pe diferența semnalelor (SPR sau de impedanță) dintre
46 nivelul corespunzător analitului legat de senzor și cel premurgător injecției probei, semnal
47 inerent mic. Sensibilitatea scăzută face necesară apelarea la o etapă preliminară de concen-
48 trare, care de regulă este costisitoare (presupune reactivi și echipamente specializate) și
49 este de durată; în cazul microorganismelor patogene, etapa de cultivare depășește de cele
50 mai multe ori 24 h.

Problema tehnică, pe care o rezolvă invenția, constă în creșterea sensibilității și obținerea unei limite de detecție corespunzătoare unor concentrații mici ale analiților țintă, fără să fie nevoie de etape suplimentare de preconcentrare/cultivare microbiologică, prin acționarea periodică asupra unor compuși aflați în compartimentul de măsură, prevăzut cu senzori pentru analize optice (de exemplu, SPR) sau/și electrochimice (de exemplu, impedanță).	1
Invenția descrie o metodă de detecție și de determinare a concentrației unor analiți într-un fluid (de exemplu, mediu lichid), respectiv, a unor compuși, de exemplu, celule, proteine, antibiotice, catene ADN, pentru care există parteneri afini (anticorpi, aptameri etc.).	7
Metoda are la bază analiza amplitudinii, sau/și fazei cu care variază un parametru electric, de exemplu, partea reală sau imaginară (sau o funcție din acestea) a impedanței la o anumită frecvență și/sau un parametru optic (de exemplu, unghiul pentru care apare minimul reflectivității, pentru analize SPR), la aplicarea unei acționări periodice, respectiv, la aplicarea unor câmpuri.	9
Prezența unui analit țintă influențează oscilația rezultată în urma aplicării câmpului, analiza parametrilor caracteristici oscilației permițând determinarea concentrației analitului țintă. Compuși cu relevanță pentru metoda analitică prezentată pot fi:	11
- analiți țintă (de care pot fi legate particule cu rol fie în acțiunea câmpului, fie în creșterea diferenței de semnal corespunzătoare celor două niveluri extreme ale oscilației), în cazul celulelor (microorganismelor) patogene;	13
- particule indicatoare, legate de suprafața senzorului în zone complementare celor în care s-a legat în prealabil analitul țintă (de exemplu, pentru determinarea concentrației analiților cu masă moleculară redusă);	15
- particule indicatoare, legate de catena complementară, în cazul în care analitul țintă îl reprezintă o anume catenă de ADN.	17
Semnalele utile se obțin prin monitorizarea modificărilor proprietăților, de exemplu, electrice, sau/și optice, aferente variațiilor datorate modificărilor unor parametri (de exemplu, electrice, optici, de poziție, de deformare, sau/și de legare specifică), cauzate de aplicarea unui câmp asupra compușilor din compartimentul analitic. Măsurătorile se fac prin intermediul unor senzori (de exemplu, electrozi modificați), care trebuie să fie compatibili cu metodele analitice respective. Astfel, pentru măsurătorile de impedanță (electrice), este necesară cel puțin o pereche de electrozi a căror configurație (formă, dimensiune, poziționare) să permită obținerea unui semnal cât mai sensibil. Electrozii corespunzători măsurătorii de impedanță pot fi distincți sau unul dintre aceștia poate fi comun cu suprafața cu proprietăți plasmonice, utilizată pentru analize SPR.	19
Cunoașterea parametrilor câmpului care se aplică, permite amplificarea selectivă a semnalului util (aferent deplasării, sau/și deformării analiților țintă, de exemplu, celulele) cu multe ordine de mărime. De remarcat că astfel pot fi evidențiate semnale relativ mici, chiar sub nivelul de zgomot, corespunzătoare variației proprietăților electrice și optice, aferente pozițiilor extreme, determinate de aplicarea câmpului.	21
Metoda conform invenției constă în prepararea (funcționalizarea) senzorului sau a elementelor de recunoaștere specifică, prepararea probei pentru a fi introdusă (în stare lichidă) în compartimentul analitic, injectarea în compartimentul analitic a probei sau/și, după caz, a suspensiei concentrate care conține particule indicatoare, alegerea parametrilor optimi ai câmpului și aplicarea câmpului care să conducă la modificări periodice ale unor parametri (de exemplu, electrice, optici, de poziție, de deformare sau/și de legare specifică) ai constituenților din compartimentul analitic, monitorizarea efectului câmpului asupra constituenților din compartimentul analitic, prin intermediul unor parametri, de exemplu, electrice (impedanță) și/sau optici (SPR), cu determinarea parametrilor utili, detecția analitului și determinarea concentrației de analit în baza curbelor de calibrare aferente aceluiași analize aplicate unor probe cu concentrații cunoscute de analiți. Constituenții din compartimentul analitic pot fi analiți țintă sau structuri alcătuite din analiți și compuși legați afin de aceștia.	23
	25
	27
	29
	31
	33
	35
	37
	39
	41
	43
	45
	47
	49
	51

- 1 Avantajele principale al metodei constau în:
- 3 - sensibilitate crescută, ceea ce permite determinarea unor concentrații minime foarte
mici ale analitului țintă, fără să fie nevoie de etape suplimentare de preconcentrare/cultivare
microbiologică;
- 5 - timp scurt de analiză, rezultatul se obține în una-două ore;
- 7 - modulele de aplicare a câmpului și de analiză pot fi aceleași pentru întreaga plajă de
analizi, de la celule la compuși cu masă moleculară mică sau catene ADN;
- 9 - sistemele implicate în realizarea determinărilor (pregătire a probei, microfluidică,
aplicarea câmpului și analiză) nu sunt costisitoare și nu presupun personal specializat.
- 11 Se prezintă, în continuare, trei posibile exemple de aplicare a acestei metode (care
nu limitează domeniul de aplicare al acesteia) și în legătură cu fig. 1...3, care reprezintă:
- 13 - fig. 1, schema de detecție și de determinare a concentrației unor microorganisme
(celule) patogene;
- 15 - fig. 2, schema de detecție și de determinare a concentrației unor analizi cu masă
moleculară mică (de exemplu, toxine);
- 17 - fig. 3, schema de detecție și de determinare a concentrației unor catene ADN prin
monitorizarea reacției de hibridare.
- 19 Metoda se bazează pe monitorizarea variațiilor datorate modificărilor unor parametri
(de exemplu, electrici, optici, de poziție, de deformare, sau/și de legare specifică), cauzate
de aplicarea unui câmp (electric, magnetic, mecanic, optic etc.) asupra compușilor din
- 21 compartimentul analitic. Aceste variații pot corespunde unor parametri optici (de exemplu,
corespunzători Rezonanței Plasmonilor de Suprafață, SPR), sau/și electrici (de exemplu,
corespunzători impedanței la o frecvență specifică).
- 23 Monitorizarea semnalelor (de exemplu, optice și electrice) cauzate de aplicarea
câmpului se realizează la nivelul unui compartiment (platformă) analitic, unic, în care este
integrat un sistem de microfluidică care, de exemplu, cuprinde o cuvă prevăzută cu un
- 25 senzor, de exemplu, SPR, și cel puțin o pereche de senzori (electrozi) pentru analize
electrice, electrochimice (de exemplu, de impedanță).
- 27 Modulul de aplicare a câmpului poate fi același, indiferent de tipul analitului care se
dorește să fie determinat. Tipul câmpului aplicat (de exemplu, magnetic, electric, optic,
mecanic), precum și parametrii acestuia: frecvența, profilul evoluției intensității, pozițiile
- 29 limită, sunt întotdeauna cunoscute și controlate.
- 31 În vederea detecției și determinării concentrației unor analizi, metoda prevede
parcursul următoarelor etape, în ordine cronologică:
- 33 1. Se prepară (funcționalizează) senzorul sau elementele de recunoaștere specifică,
respectiv:
- 35 a. se imobilizează elemente de recunoaștere afină pe suprafața unor particule
indicatoare;
- 37 b. se prepară (funcționalizează) suprafața senzorilor din compartimentul analitic,
realizându-se, după caz:
- 39 i. imobilizarea unor compuși care conțin elemente afine care, în funcție de
tipul de analit țintă, pot avea legate particule indicatoare (la capătul opus
senzorului);
- 41 ii. pasivarea acestora (pentru împiedicarea oricărei adsorbții), în cazul în care
recunoașterea specifică a analitului se face prin incubarea probei cu particule
indicatoare, în etapa de preparare a probei.
- 43 2. Se prepară proba pentru a fi introdusă, în stare lichidă, în compartimentul analitic,
după caz, direct sau după incubare cu particule indicatoare.
- 45 47

3. Se injectează, în compartimentul analitic, proba sau/și, după caz, o suspensie concentrată care conține particule indicatoare.	1
4. Se stabilesc condițiile de acționare, respectiv: tipul câmpului care va fi aplicat (de exemplu, magnetic, electric, optic, mecanic etc.), precum și parametrii acestuia, de exemplu, frecvența, profilul evoluției intensității, pozițiile limită, și se aplică câmpul care să conducă la modificări măsurabile, de regulă, periodice, ale unor parametri (de exemplu, electrici, optici, de poziție, de deformare) sau/și, după caz, la eficientizarea legării afine, cauzată de aplicarea acțiunii asupra constituenților din compartimentul analitic: analiți sau structuri alcătuite din analiți și compuși legați afin de aceștia, sau compuși cu rol indicator, legați afin de senzor.	3 5 7 9
5. Se monitorizează semnalele (de exemplu, optice și electrice) cauzate de aplicarea câmpului asupra constituenților din compartimentul analitic prin intermediul unor parametri ce pot fi electrici (impedanța) și/sau optici (SPR), determinându-se parametrii utili (de exemplu, amplitudine și defazaj față variația câmpului).	11 13
6. Se determină concentrația de analit, utilizând curbe de calibrare, determinate, în prealabil, din analiza unor probe cu concentrații cunoscute de analiți. Detecția, respectiv, semnalarea prezenței analitului, indică faptul că analitul se găsește în probă la o concentrație cel puțin egală cu concentrația minimă (ce corespunde limitei de detecție a metodei).	15 17
În cele ce urmează, se prezintă trei posibile exemple de aplicare ale acestei metode, care nu sunt limitative, după cum urmează:	19
A. Pentru detecția și determinarea concentrației unor analiți cu masa moleculară mare, de tipul: agregate, particule sau microorganisme, așa cum este reprezentat în fig. 1, se parcurg următoarele etape:	21 23
1. se funcționalizează (prepară) particule indicatoare (de exemplu, particule superparamagnetice), imobilizându-se, pe suprafața acestora, compuși afini (de exemplu, anticorpi sau aptameri), specifici analitului țintă (care se dorește să fie detectat);	25
2. se prepară proba susceptibilă să conțină analiți țintă, prin aducere în stare lichidă și se incubează, împreună cu o suspensie cu concentrație optimă de particule indicatoare, care au imobilizate, pe suprafața lor, compuși care se pot lega specific de analitul țintă;	27 29
3. se extrage, din compartimentul de incubare, se concentrează și se injectează, în compartimentul analitic, suspensia în care se află clustere de analiți și particulele indicatoare, precum și (după caz) o cantitate reziduală de particule indicatoare, nelegate de analiți; se poate considera o etapă de separare care să elimine din volumul care va fi analizat cantitatea de particule indicatoare, nelegate de analiți;	31 33
4. se stabilesc condițiile de acționare, respectiv: câmpul aplicat (de exemplu, magnetic, electric, optic, mecanic etc.), precum și parametrii acestuia, de exemplu, frecvența, profilul evoluției intensității, pozițiile limită și se aplică câmpul (cu ajutorul modului cu acest rol) care conduce la modificări măsurabile ale unor parametri (de exemplu, electrici, optici, de poziție, de deformare), cauzate de aplicarea câmpului asupra constituenților din compartimentul analitic: analiți sau conglomerate analiți - compuși legați afin de acestea. Într-un exemplu de aplicare, câmpul poate fi aplicat direct sau indirect, de exemplu, prin intermediul unor câmpuri magnetice a căror configurație se modifică periodic, caz în care analitul țintă este legat specific cu un set de particule magnetice (indicatoare) care determină deplasarea sau/și deformarea respectivă a clusterelor și, după caz, a particulelor indicatoare, nelegate de analiți;	35 37 39 41 43 45
5. se monitorizează semnalele (de exemplu, optice, electrice, de poziție) cauzate de aplicarea câmpului asupra constituenților din compartimentul analitic prin intermediul parametrilor electrici (impedanța) și/sau optici (SPR), determinându-se parametrii utili precum amplitudinea și defazajul față de variația câmpului;	47 49

6. se detectează prezența sau se determină concentrația de analiți, utilizând curbe de calibrare.

În cele ce urmează, prezentăm un exemplu concret de realizare, respectiv, de determinare a concentrației unui analit cu masa moleculară mare, *Escherichia Coli*. Au fost parcurse următoarele etape:

- se prepară o suspensie de particule indicatoare, PI, la suprafața cărora se imobilizează elementele de recunoaștere afină, astfel:

- se prepară o suspensie de PI super paramagnetice Masterbeads (Adembeads, Franța) cu diametrul de 500 nm, în apă deionizată (A.D.) cu concentrația de 10^9 particule/mL;

- suspensia de PI se spală cu soluție tampon acid 2-(N-morfolino) etansulfonic (MES) 50 mM, pH 5,4;

- se prepară un amestec de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)/N-hidroxisuccinimida (NHS) 4:1 în MES;

- se înlocuiește soluția de MES cu cea de EDC/NHS;

- suspensia de PI se agită 10 min, la 37°C și 1500 rpm, etapă de activare a grupărilor carboxilice;

- suspensia de PI se spală cu A. D. și apoi cu soluție tampon PBS, pH 7,4;

- se înlocuiește soluția de PBS cu soluția de PBS în care se găsește proteina de imobilizat (1 mg/mL,) respectiv, anticorpul Anti-*Escherichia Coli*;

- suspensia de PI se agită 2 h la 37°C, 1500 rpm, etapa de imobilizare a proteinei suspensia de PI se spală de 2 ori cu PBS, pH 7,4;

- se înlocuiește soluția de PBS cu soluția de etanolamină, pH 8,5, etapa de blocare a situsurilor active de care nu s-a legat Anti-*Escherichia Coli*;

- suspensia de PI se spală de 2 ori cu PBS, pH 7,4.

Incubarea probei cu PI imobilizată cu elemente de recunoaștere specifică

- Suspensia de PI imobilizată se ultrasonează 10 min;

- la un volum de 100 μ L de probă, se adaugă 1 μ L de suspensie de PI imobilizată.

Raportul de PI : celule (*Escherichia Coli*) este de 1:100, fiind optimizat pentru o concentrație de 10^5 celule/mL;

- proba cu PI se agită 1 h la 7°C, 1500 rpm;

- suspensia se spală cu soluție tampon de măsură PBS și se injectează imediat.

Alegerea configurației de aplicare a câmpului

- Se aplică un câmp magnetic, cu ajutorul a doi magneți permanenți, unul fix, poziționat dedesubtul senzorului, iar celălalt se deplasează în plan vertical, pe o distanță de 22 mm, cu frecvență de 0,3 Hz.

Injectarea probei

- Cu magnetul fix dedesubtul senzorului, iar cu cel mobil aflat la distanța maximă, se injectează suspensia 5 min, la 25 μ L/min și apoi se așteaptă 5 min, pentru stabilizarea semnalului.

Aplicarea câmpului periodic

- Se oscilează poziția magnetului mobil la frecvență de 0,3 Hz, deplasarea făcându-se pe o distanță de 22 mm.

Măsura - În circuitul electric care cuprinde electrozii, se aplică, cu ajutorul unui generator de curent, un semnal electric alternativ, cu frecvența de 500 kHz;

- se înregistrează semnalul electric (tensiunea) cules de la electrozii de măsură și se determină evoluția, în urma aplicării câmpului periodic, a valorii absolute a impedanței, $|Z|$, la frecvența de 500 kHz;

- semnalul electric se prelucrează astfel: se calculează spectrul de putere pentru fiecare interval de 4200 de achiziții (intervalul este ales pentru o rezoluție în frecvență ~ 0,01Hz) și se determină amplitudinea semnalului periodic cu frecvența de 0,3 Hz, care depinde de concentrația celulelor din probă. 1
3

Pentru referință, respectiv, pentru cazul concentrației zero, semnalul provine exclusiv din aplicarea câmpului periodic asupra PI (nelegate de celule) se obține amplitudinea $A_R = 8,8 \pm 3,5$ mV. Prin reprezentarea variației relative a amplitudinilor oscilațiilor la frecvența de oscilație a câmpului față de amplitudinea referinței, în funcție de concentrațiile cunoscute ale celulelor (*Escherichia Coli*), se determină curba de calibrare. Prin raportarea semnalului măsurat pe probă la curba de calibrare, se determină concentrația de *Escherichia Coli* din probă. 5
7
9
11

Astfel, un semnal cu amplitudinea $A_c = 123,6 \pm 23,4$ mV, respectiv, amplitudinea relativă definită prin: $A_c/A_R - 1 \approx 13$ corespunde concentrației de 10^5 celule/mL. 13

Alegerea tipului și a dimensiunii particulelor indicatoare se face astfel încât: incubarea să conducă la legarea unui număr cât mai mare de analiți, să nu se lege între ele, semnalul aferent oscilației particulelor nelegate de celule să fie cât mai mic (neglijabil) și oscilația fiecărui cluster să conducă la un semnal cât mai mare. 15
17

Pentru particulele indicatoare paramagnetice, etapele de separare și concentrare de după incubare, cât și cea de aplicare câmpului, se realizează cu ajutorul unor magneți. 19

Ca alternativă, există posibilitatea separării particulelor indicatoare de analiți, de exemplu, microorganismele legate afin de suprafața de măsură, pentru ca aplicarea câmpului periodic să se realizeze exclusiv asupra analiților țintă. 21

Metoda prezintă, pentru acest exemplu de aplicare, avantajul că același set de senzori poate fi utilizat pentru detecția oricărui tip de analit, de exemplu, microorganisme, specificitatea nefiind dată de tipul suprafeței senzorului (care este pasivată, pentru a împiedica orice adsorbție), ci de legarea afină a particulelor indicatoare de analiți țintă (în faza de incubare). 23
25
27

B. Pentru detecția și determinarea concentrației unor analiți cu masă moleculară mică (de exemplu, toxine, antibiotice etc.), metoda presupune exclusiv utilizarea de particule indicatoare. 29

Pentru că, de regulă (pentru analiții cu masă moleculară mică), semnalul datorat legării directe de suprafața senzorului este extrem de mic, pentru obținerea unui semnal semnificativ, metoda propune utilizarea particulelor indicatoare. Aceste particule trebuie să permită, de exemplu, prin intermediul unor ancore, imobilizarea, pe suprafața lor, a unor structuri afine similare celor conținute de analitul țintă și prin care acesta se leagă de partenerul afin, imobilizat pe suprafața senzorului. Proprietățile (modificate prin aplicarea câmpului), dimensiunea și forma particulelor indicatoare, precum și tipul și numărul ancorelor, trebuie să fie alese, astfel încât să nu rămână situsuri active ascunse, iar oscilația să corespundă unei variații a semnalului util (de exemplu, electric, optic) cât mai mare. În cazul în care asupra particulelor indicatoare se aplică câmpuri magnetice, particulele indicatoare trebuie să aibă proprietăți (super) paramagnetice. 31
33
35
37
39
41

Metoda pentru detecția și determinarea concentrației unor analiți cu masă moleculară mică este ilustrată în fig. 2 și implică o secvență de etape precum: 43

1. Se prepară:

a. suprafața senzorilor astfel încât să se imobilizeze compușii ce corespund unui partener afin (specific) la analitul țintă; 45

b. suprafața particulelor indicatoare astfel încât să se imobilizeze linkeri (ancore) care să aibă la celălalt capăt structuri afine i. e. specifice, similare celor conținute de analitul țintă și care determină legarea analitului țintă de partenerul afin, imobilizat pe suprafața senzorului. 47
49

1 Legarea de zonele active de pe suprafața senzorului prin intermediul unor linkeri are
rolul de a permite particulelor indicatoare să se deplaseze, de exemplu, să oscileze fără
3 afectarea legăturii afine; în cazul în care semnalul util nu este datorat deplasării periodice a
particulelor indicatoare, ci este determinat de modificarea, în urma aplicării câmpului, a unor
5 proprietăți (de exemplu, electrice, optice etc.) ale particulelor indicatoare sau a unor compuși
de care acestea sunt legate afin, lungimea linkerilor trebuie aleasă, astfel încât să permită
7 o legare afină cât mai eficientă.

2. Se prepară proba susceptibilă să conțină analitul țintă, care este adusă în stare
9 lichidă.

3. Se injectează în compartimentul analitic, succesiv:

11 - proba, ceea ce va conduce la legarea specifică în funcție de concentrația analitului
țintă din probă, inactivându-se astfel un procent din zonele de legare prezente pe suprafața
13 senzorului;

- se injectează, în locul probei, suspensia de particule indicatoare, funcționalizate;
15 concentrația acestora trebuie să fie suficient de mare, astfel încât să conducă la inactivarea
tuturor zonelor aflate pe suprafața senzorului, pe care sunt imobilizați compuși parteneri
17 specifici de legare cu analiții țintă, inclusiv în cazul în care proba nu conține analiți țintă.

4. Se stabilesc condițiile de aplicare a câmpului, respectiv: tipul câmpului aplicat (de
19 exemplu, magnetic), precum și parametrii acestuia, de exemplu, frecvența, profilul evoluției
intensității, pozițiile limită, și se aplică câmpul (cu ajutorul modulului cu acest rol), care
21 conduce la modificări măsurabile, variații periodice, ale unor parametri (de exemplu, electrice,
optice, de poziție etc.), cauzate de aplicarea acțiunii asupra constituentilor, determinate de
23 exercitarea acțiunii câmpului asupra particulelor indicatoare, cât și/sau la eficientizarea
legării lor afine (specifice) de suprafața senzorului; pentru acest exemplu de utilizare a
25 metodei, este posibil ca legarea particulelor indicatoare să conducă direct la obținerea unui
semnal util pentru determinarea concentrației analitului țintă, fără să fie nevoie de aplicarea
27 câmpului, sau intensitatea câmpului periodic să fie foarte mică.

5. Se monitorizează semnalele (de exemplu, optice, electrice) cauzate de aplicarea
29 câmpului asupra particulelor indicatoare din compartimentul analitic prin intermediul para-
metrilor, de exemplu, electrice (impedanța) și/sau optici (SPR), determinându-se parametri
31 utili, de exemplu, amplitudine și defazaj față de variația câmpului sau, după caz, aferente
legării directe a particulelor indicatoare de zonele de pe senzor pe care sunt imobilizați
33 compuși parteneri specifici, rămase active după injectarea probei.

6. Se detectează prezența sau se extrage concentrația de analiți, utilizând curbe de
35 calibrare. Amplitudinea oscilației este dependentă de numărul de particule indicatoare, legate
de zonele de pe senzor pe care sunt imobilizați compuși parteneri specifici, rămase active
37 după injectarea probei. Curba de calibrare va arata un semnal datorat oscilațiilor determinate
de acțiunea câmpului asupra particulelor indicatoare, cu atât mai mic cu cât concentrația
39 analitului țintă din probă este mai mare. În cazul în care nu este nevoie de aplicarea unui
câmp (intensitatea acestuia se alege zero), curba de calibrare se determină utilizând
41 semnalele aferente legării directe a particulelor indicatoare de zonele de pe senzor pe care
sunt imobilizați compuși parteneri specifici, rămase active după injectarea probei.

43 Metoda prezintă, pentru acest exemplu de aplicare, cel puțin două avantaje majore
față de metodele actuale de detecție:

45 a. este robustă, independentă de efectul legării nespecifice a unor alți compuși din
probă, diferiți de analitul țintă (semnalul util provine exclusiv de la particulele indicatoare). În
47 acest scop, curbele de calibrare vor fi realizate, utilizând aceleași soluții (matrice complexe)
similare probelor reale;

b. poate fi utilizată cu succes chiar și în cazul analiților cu masă moleculară mică (e. g. toxine), pentru care semnalul datorat legării specifice directe analit-senzor este prea mic pentru a fi sesizat.	1 3
C. Pentru detecția și determinarea concentrației unor catene ADN, ilustrată în fig. 3, metoda presupune monitorizarea reacției de hibridare și implică următoarele etape:	5
1. Se funcționalizează (prepară) senzorii astfel încât, pe suprafața acestora, să se imobilizeze catene complementare structurii ADN țintă și care să aibă legate de capătul liber particule indicatoare.	7
2. Se prepară proba susceptibilă să conțină catenele ADN țintă, astfel încât să fie adusă în stare lichidă.	9
3. Se injectează proba în compartimentul analitic.	11
4. Se stabilesc condițiile de aplicare câmpului, respectiv: tipul câmpului aplicat (de exemplu, magnetic), precum și parametrii acestuia, de exemplu, frecvența, profilul evoluției intensității, pozițiile limită, și se aplică câmpul (cu ajutorul modulului cu acest rol, de exemplu, utilizând câmpuri magnetice) care să conducă la deplasarea periodică a particulelor indicatoare, legate de senzor prin intermediul catenelor complementare structurii ADN țintă.	13 15
5. Se monitorizează procesul de hibridare (ce se derulează în compartimentul analitic) prin analiza deplasărilor sau a oscilațiilor particulelor indicatoare, relevate de metode electrice (impedanța) și/sau optice (SPR), determinându-se, pentru fiecare metodă, parametrii relevanți ai semnalelor respective (de exemplu, amplitudine și defazaj față de variația câmpului). Hibridarea presupune legarea specifică a unei catene ADN țintă de cea complementară, imobilizată la un capăt pe suprafața senzorului și care are la celălalt capăt o particulă indicatoare care poate oscila. Diferențele de rigiditate (elasticitate) între structura ADN-ului bicatenar și monocatenar vor conduce la modificarea amplitudinii și fazei oscilației particulei indicatoare. Evoluția procesului de hibridare este relevantă de evoluția atât a amplitudinii oscilației (scăzătoare), cât și a defazajului.	17 19 21 23 25
6. Se detectează prezența sau se extrage concentrația de catene ADN țintă, prin utilizarea curbelor de calibrare, care pot fi realizate atât pe baza parametrilor ce descriu dinamica procesului, cât și folosind parametrii oscilației particulelor indicatoare, aferente atingerii unui nivel staționar, „final”.	27 29
Metoda prezintă, pentru acest exemplu de aplicare, avantajul că alegerea parametrilor câmpului permite poziționarea particulelor indicatoare corespunzătoare alungirii maxime (aferente dimensiunii catenei ADN), pe o durată optimă, cu relevanță atât pentru măsură, dar are și un efect important la creșterea randamentului reacției de hibridare, fără a fi nevoie de introducerea unor structuri suport, care sunt de regulă nelipsite la metodele senzoristice, actuale, pentru evaluarea hibridării ADN.	31 33 35 37

Revendicări

1. Metodă de detecție și de determinare a concentrației unor analiți, prin aplicarea controlată a unui stimul periodic, **caracterizată prin aceea că** aceasta constă în parcurgerea următoarelor etape, în ordine cronologică:

- se prepară senzorul sau elementele de recunoaștere specifică, respectiv:
 - a. se imobilizează elemente de recunoaștere afină pe suprafața unor particule indicatoare;

- b. se prepară suprafața senzorilor din compartimentul analitic, realizându-se, după caz:

- imobilizarea unor compuși care conțin elemente afine care, în funcție de tipul de analit țintă, pot avea legate particule indicatoare la capătul opus senzorului;

- pasivarea acestora, pentru împiedicarea oricărei adsorbții, în cazul în care recunoașterea specifică a analitului se face prin incubarea probei cu particule indicatoare, în etapa de preparare a probei;

- se prepară proba pentru a fi introdusă în stare lichidă în compartimentul analitic, după caz, direct sau după incubare cu particule indicatoare;

- se injectează în compartimentul analitic proba sau/și, după caz, o suspensie concentrată care conține particule indicatoare;

- se stabilesc condițiile de acționare, respectiv: alegerea câmpului de aplicat, de exemplu, magnetic, electric, optic, mecanic etc., și parametrii câmpului, de exemplu, frecvența, profilul evoluției intensității, pozițiile limită, și se aplică câmpul care să conducă la modificări măsurabile, de regulă, periodice, ale unor parametri, electrici, optici, de poziție, de deformare și, după caz, la eficientizarea legării afine;

- se monitorizează semnalele, de exemplu, optice și electrice, cauzate de aplicarea câmpului asupra constituenților din compartimentul analitic, determinându-se parametri utili;

- se detectează prezența și se determină concentrația de analit, utilizând curbe de calibrare determinate în prealabil din analiza unor probe cu concentrații cunoscute de analiți.

2. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată printr-aceea că**, în scopul detecției și determinării concentrației unor analiți cu masă moleculară mare, de tipul: agregate, particule sau microorganisme, se parcurg următoarele etape:

- se prepară particule indicatoare, imobilizându-se, pe suprafața acestora, compuși afini, specifici analitului țintă;

- se prepară proba susceptibilă să conțină analitul țintă, prin aducere în stare lichidă și se incubează împreună cu o suspensie cu o concentrație optimă de particule indicatoare, funcționalizate;

- se extrage din compartimentul de incubare, se concentrează într-un volum redus și se injectează, în compartimentul analitic, suspensia în care se află clustere de analiți și particulele indicatoare, precum și, după caz, o cantitate reziduală de particule indicatoare, nelegate de analit; se poate considera o etapă de separare care să elimine din volumul care va fi analizat cantitatea de particule indicatoare, nelegate de analit;

- se stabilesc parametrii câmpului și se aplică câmpul care conduce la modificări măsurabile, de regulă, periodice, ale unor parametri, electrici, optici, de poziție, de deformare a analiților, sau a unor conglomerate analit-compuși legați specific de acestea;

- se monitorizează semnalele cauzate de aplicarea câmpului asupra constituenților din compartimentul analitic, determinându-se parametri utili, care pot fi, după caz, amplitudinea sau/și defazajul față de variația câmpului;

- se detectează prezența și se determină concentrația de analiți, utilizând curbe de calibrare.

3. Metodă conform revendicării 1, caracterizată prin aceea că , în scopul detecției și determinării concentrației unor analiți cu masă moleculară mică, se parcurg următoarele etape:	1
- Se prepară:	3
a. suprafața senzorilor astfel încât să se imobilizeze compușii ce corespund unui partener specific la analitul țintă;	5
b. suprafața particulelor indicatoare astfel încât să se imobilizeze linkeri (ancore) care să aibă la celălalt capăt structuri afine i.e. specifice, similare celor conținute de analitul țintă și care determină legarea analitului țintă de partenerul afin imobilizat pe suprafața senzorului, legarea de zonele active de pe suprafața senzorului prin intermediul unor linkeri având rolul de a permite particulelor indicatoare să se deplaseze, de exemplu, să oscileze fără afectarea legăturii afine, iar în cazul în care semnalul util nu este datorat oscilației particulelor indicatoare, ci este determinat de modificarea, în urma aplicării câmpului, a unor proprietăți electrice, optice etc., ale particulelor indicatoare, sau a unor compuși de care acestea sunt legate afin, lungimea linkerilor trebuie aleasă astfel încât să permită o legare afină cât mai eficientă.	7
- Se prepară proba susceptibilă să conțină analitul țintă, care este adusă în stare lichidă.	9
- Se injectează în compartimentul analitic, succesiv:	11
- proba, ceea ce va conduce la legarea specifică în funcție de concentrația analitului țintă din probă, inactivându-se astfel un procent din zonele de legare prezente pe suprafața senzorului;	13
- suspensia de particule indicatoare funcționalizate, în locul probei;	15
- se stabilesc parametrii câmpului și se aplică câmpul care să conducă la variații periodice ale unor parametri, de poziție, electrici, optici etc., determinate de exercitarea acțiunii câmpului asupra particulelor indicatoare sau/și asupra analitului, cât și la eficientizarea legării lor specifice, afine de suprafața senzorului;	17
- se monitorizează semnalele cauzate de aplicarea câmpului asupra particulelor indicatoare, determinându-se parametrii utili. de exemplu, amplitudine și defazaj față de variația câmpului sau, după caz, aferenți legării directe a particulelor indicatoare de suprafața activă a senzorului;	19
- se detectează prezența și se determină concentrația de analit, utilizând curbe de calibrare.	21
4. Metodă conform revendicării 1, caracterizată prin aceea că , în scopul detecției și determinării concentrației unor catene ADN, se parcurg următoarele etape:	23
- se prepară senzorii astfel încât, pe suprafața acestora, să se imobilizeze catene complementare structurii ADN țintă și care să aibă legate de capătul liber particule indicatoare;	25
- se prepară proba de analizat, care conține catenele ADN țintă, prin aducere în stare lichidă;	27
- se injectează proba în compartimentul analitic;	29
- se stabilesc condițiile de acționare, adică parametrii câmpului atât pentru creșterea sensibilității măsurătorilor, dar și pentru creșterea randamentului reacției de hibridare;	31
- se realizează acționarea, adică se aplică câmpul care să conducă la deplasarea, posibil periodică, a particulelor indicatoare legate de senzor prin intermediul catenelor complementare structurii ADN țintă;	33
- se monitorizează procesul de hibridare prin analiza deplasărilor sau oscilațiilor particulelor indicatoare, determinându-se parametrii relevanți ai semnalelor respective;	35
- se detectează prezența, sau/și se determină concentrația de catene ADN țintă, prin utilizarea curbelor de calibrare, care pot fi realizate atât pe baza parametrilor ce descriu dinamica procesului, cât și folosind parametrii deplasării, posibil oscilatorii ai particulelor indicatoare, aferente atingerii unui nivel staționar, final.	37

(51) Int.Cl.

G01N 27/06 (2006.01),
 G01N 27/02 (2006.01),
 G01N 21/55 (2006.01),
 G01N 33/487 (2006.01),
 C12Q 1/00 (2006.01)

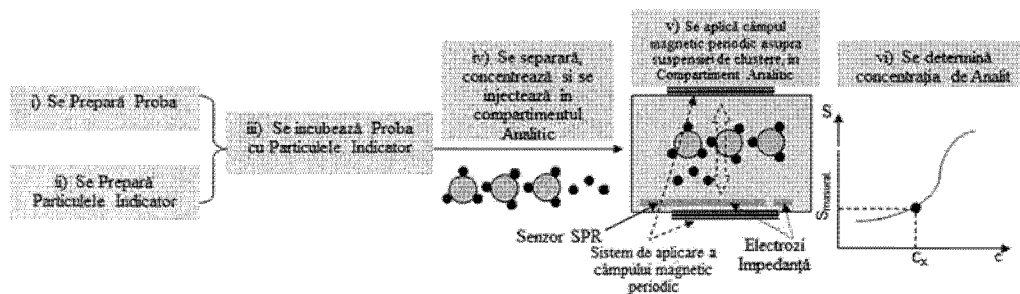


Fig. 1

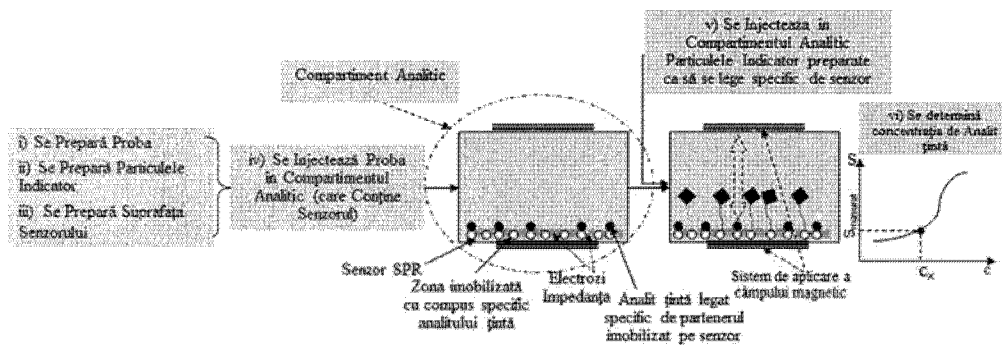


Fig. 2

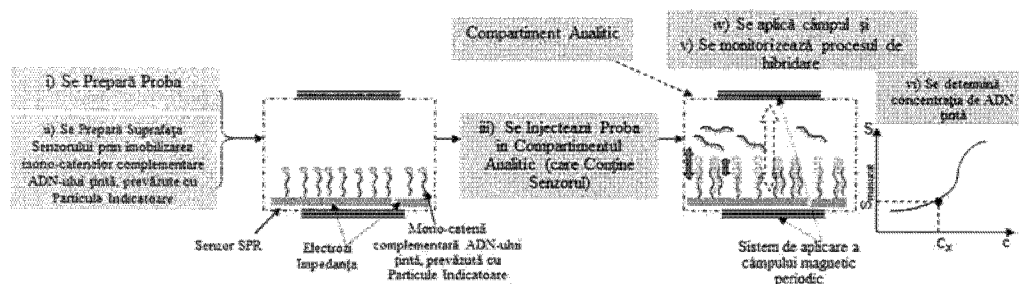


Fig. 3



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
 Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
 sub comanda nr. 580/2014