



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2009 00854**

(22) Data de depozit: **23.10.2009**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.09.2014** BOPI nr. **9/2014**

(41) Data publicării cererii:
29.04.2011 BOPI nr. **4/2011**

(73) Titular:
• **UNIVERSITATEA "ȘTEFAN CEL MARE"**
DIN SUCEAVA, STR.UNIVERSITĂȚII NR.13,
SUCEAVA, SV, RO

(72) Inventatori:
• **GUTT SONIA, STR.VICTORIEI**
NR.185 BIS, SAT SFÂNTU ILIE, SV, RO;

• **GUTT GHEORGHE, STR.VICTORIEI**
NR.185 BIS, SAT SFÂNTU ILIE, SV, RO;
• **GUTT ANDREI, STR.VICTORIEI**
NR.185 BIS, SAT SFÂNTU ILIE, SV, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:
US 2007/0065954 A1; US 5807261

(54) **BIOSENZOR MINIATURAL**



RO 126239 B1

1 Inventția se referă la un biosenzor miniatural, bazat pe efectul de rezonanță plas-
3 monică de suprafață (SPR), destinat analizei cantitative specifice, *in situ*, a unei specii biolo-
gice sau chimice dintr-un mediu lichid sau dintr-un țesut viu.

5 În vederea determinării concentrației unor specii chimice sau biologice din soluții, sunt
folosite metode volumetrice, gravimetrice, spectrometrice, cromatografice, refractometrice,
7 polarimetrice, electrochimice, precum și metode bazate pe măsurarea efectului de rezonanță
plasmonică de suprafață. Aplicațiile efectului rezonanței plasmonice sunt extrem de mari,
acestea acoperă practic domeniul medical de investigare și cercetare anticorp-antigen, dar
9 și problemele de poluare ale mediului, precum și de analitică alimentară.

11 În vederea determinării prezenței unor compuși chimici, a unor antigeni în țesuturile
vii, precum și în vederea determinării naturii tumorilor, se procedează, de regulă, la analiza
sângelui, sau în cazul operării tumorilor, la analiză de țesut prelevat din tumoare. În ambele
13 cazuri, metodele folosite presupun un caracter invaziv destul de pronunțat, pericole de
infecții, logistică scumpă și timpi de așteptare și de vindecare mari.

15 La rezonanța plasmonică de suprafață (SPR-Surface Plasmon Resonance), o radiație
monocromatică polarizată, de tip laser, este trimisă perpendicular pe o față a unei prisme
17 echilaterale din sticlă, cade pe o suprafață subțire din aur sau argint, depusă pe o față
adiacentă a aceleiași prisme, de unde este reflectată total, cu un unghi egal cu unghiul de
19 incidență. Fotonii radiației laser, ce intră în prismă pe una dintre fețele opuse feței cu
depunerea metalică, interferează cu electronii liberi ai aurului sau ai argintului și formează
21 un nor de electroni liberi, denumit "structură plasmonică de suprafață". Dacă între electronii
liberi din structura plasmonică și fotonii sursei monocromatice de iradiere, se ajunge la
23 rezonanță, din radiația reflectată de stratul de aur sau de argint, se extrage energia
consumată la rezonanță, în spectrul de reflexie apărând o cădere energetică ce se manifestă
25 printr-o abatere a unghiului de reflexie a radiației ce iese prin cealaltă față a prisme de sticlă,
față de valoarea teoretică a unghiului de reflexie dată de legile lui Snellius. Această abatere
27 se manifestă sub forma unui unghi de refracție a cărui valoare depinde de intensitatea
rezonanței plasmonice de suprafață. Rezonanța plasmonică se manifestă și pe partea
29 exterioară a stratului metalic de aur sau de argint, printr-un așa numit "câmp evanescent",
a cărui intensitate reacționează extrem de sensibil cu orice modificare de masă ce are loc
31 pe această față exterioară. Acest fenomen stă la baza detecției oricărei modificări de masă,
ce are loc pe această suprafață. Limita de detecție a modificărilor masice măsurabile se situ-
33 ează la nivelul de 10^{-15} grame (femtograme), acest principiu stând la baza celei mai sensibile
metode de bilanț de masă, cunoscută la ora actuală. Pentru aplicații concrete, pe suprafața
35 senzorului, este imobilizat un receptor specific, care urmează a interacționa cu un potențial
ligand, urmărit a se determina. Dacă interacțiunea intervine, crește proporțional gradul de
37 încărcare masică a stratului de metal și tot proporțional crește nivelul rezonanței plasmonice
de suprafață, unghiul de refracție corespunzător acestui nivel fiind măsurat manual fie cu un
39 goniometru optic, fie automat, prin intermediul unui detector Diode-Array, plasat pe fața
prisme unde iese radiația reflectată și refractată. Trebuie specificat faptul că valoarea
41 rezonanței plasmonice este influențată negativ de variațiile de temperatură, fapt care duce,
dată fiind sensibilitatea extremă a metodei fie la necesitatea unor termostatări avansate a
43 mediului din zona analizată, fie la corecții ale valorilor măsurate, în funcție de temperatura
de lucru.

45 Din cererea de brevet de invenție **US 2007/0065954**, se cunoaște un sistem SPR,
utilizat pentru determinarea prezenței sau a concentrației antigenelor asociate cu tumorile,
47 la pacienții cu cancer. Sistemul SPR cuprinde un senzor de suprafață, având un anticorp
specific, fixat pe un substrat din aur.

RO 126239 B1

Din brevetul **US 5807261**, se cunoaște un senzor pentru analizarea non-distructivă, *in vivo*, a țesuturilor corpului, a cărui construcție este bazată pe folosirea de fibre optice, fiind redată și mai multe variante constructive corespunzătoare. 1
3

Problema tehnică, pe care o rezolvă invenția, constă în creșterea preciziei măsurătorilor de plasmorezonanță, ca metodă de investigare a unor specii biologice sau chimice dintr-un mediu lichid sau dintr-un țesut viu. 5

Soluția la această problemă constă într-un biosenzor miniatural, având o configurație specifică ce permite măsurarea defazajului între două frecvențe ale radiației electromagnetice, care permite transformarea unei mărimi non-electrice (temperatura în cazul de față) într-o mărime electrică (frecvența în cazul de față), cu obținerea unei rezoluții de măsurare de până la 10^{-6} , astfel încât o variație de 1°C a temperaturii în zona de măsurare provoacă o variație de frecvență măsurabilă de până la 10^6 Hz. 7
9
11

Astfel, în vederea analizei cantitative, specifice, a unei specii biologice sau chimice dintr-un mediu lichid sau dintr-un țesut viu, cu eliminarea automată a influenței variațiilor de temperatură asupra valorilor măsurate, prezenta invenție se referă la un biosenzor miniatural, format dintr-o sursă de radiație **S**, ce conține două diode **1** și **2**, laser, un chopper **3**, optic care comută alternativ cele două fascicule f_1 și f_2 , de radiație monocromatică, de frecvențe diferite, spre un optocuplor **4**, la care este conectată o fibră **5**, optică, cu scindare, prevăzută, la un capăt, cu o depunere **6**, subțire, de aur, având grosimea de 30...50 nm și lungimea de circa 10 mm, peste care este realizată o depunere **7**, subțire, biologic activă, ce leagă specific specia urmărită, în sensul că un anumit anticorp prezent pe depunerea de aur, anticorp care constituie partea biologic activă, leagă antigenul corespunzător specific acestuia, din mediul cercetat, iar la celălalt capăt, cu o unitate **8**, electronică, ce măsoară defazajul între valorile lungimilor de undă ale radiației incidente și valorile lungimilor de undă ale radiației reflectate, și efectuează, ulterior, raportul celor două valori ale defazajului, în vederea eliminării erorii de măsurare, cauzată de influența temperaturii. 13
15
17
19
21
23
25

Prin aplicarea invenției, se obțin următoarele avantaje: 27

- un sistem de măsurare a variațiilor extrem de mici de masă, bazat pe fenomenul de rezonanță plasmonică de suprafață, este adus la dimensiuni micrometrice, care permit măsurări *in situ*, în locuri greu accesibile, inclusiv, în țesuturi vii, cu un efort invaziv minimal; 29

- prin înlocuirea prisme optice de la sistemul clasic, bazat pe fenomenul rezonanței plasmonice de suprafață, cu o fibră optică, scade prețul de cost al acestor aparate; 31

- înlocuirea măsurării unghiului de refracție, ca expresie a modificării masice a speciei urmărite, cu măsurarea defazării între valoarea lungimii de undă a radiației incidente și valoarea lungimii de undă a radiației reflectate, conduce la o creștere importantă a preciziei de măsurare; 33
35

- eroarea de măsurare, cauzată de influența temperaturii, este eliminată prin exprimarea valorii mărimii măsurate ca raport dintre cele două valori ale lungimilor de undă a radiației reflectate și cele două valori ale lungimilor de undă ale radiației incidente. 37
39

În figură, este redată o vedere de ansamblu a biosenzorului miniatural, conform invenției. 41

În prezenta invenție, este folosit un sistem de generare a rezonanței plasmonice de suprafață prin folosirea unei fibre optice cu diametrul de circa 600 μm . La o extremitate, fibra este cuplată la o sursă de radiație monocromatică ce asigură iradierea monocromatică alternativă a zonei de lucru, cu două frecvențe fixe, diferite ca valoare, cuprinse în domeniul vizibil, una dintre frecvențe fiind situată în domeniul spectral albastru și cealaltă în domeniul spectral roșu. La cealaltă extremitate, fibra optică are depeș un film subțire de aur, cu 43
45
47

RO 126239 B1

1 grosimea de circa 30...50 nm, pe o lungime de circa 10 mm, filmul fiind depus atât pe partea
2 frontală, cât și pe partea cilindrică a fibrei. Pentru măsurători, suprafața aurită se acoperă cu
3 un strat subțire de ligand specific speciei care urmează a se determina (de exemplu, la folo-
4 sirea senzorului într-un sistem de detectare imunologic, pe stratul de aur se va fixa anticorpul
5 care va lega în timpul procesului de analiză antigenul specific). Dat fiind faptul că, la fibrele
6 optice al căror diametru este cu circa trei ordine de mărime mai mare decât ordinul de
7 mărime al frecvenței radiației electromagnetice transportată, transmisia luminii se face prin
8 reflexii repetate pe pereții fibrei, precum și a faptului că, în zona aurită a fibrei optice, sunt
9 provocate reflexii multiple, după întoarcerea completă a radiației reflectate de pe stratul de
10 aur, în fibra optică, se obține o defazare pronunțată a lungimii de undă a acesteia, față de
11 lungimea de undă a radiației incidente. Valoarea acestei defazări este o măsură a intensității
12 rezonanței plasmonice, respectiv, a masei (concentrației) speciei urmărite ce se găsește pe
13 partea exterioară a filmului de aur, în speță, a antigenului legat de anticorp.

14 Pezenta invenție elimină eroarea dată de influența temperaturii asupra valorii
15 măsurate, prin folosirea a două lungimi de undă diferite pentru iradiere și folosirea, ca
16 măsură a intensității rezonanței plasmonice de suprafață, a valorii raportului celor două valori
17 ale defazări lungimii de undă a radiației reflectate, față de cele două valori ale lungimilor de
18 undă ale radiației inițiale. Valorile defazărilor acestor două lungimi de undă, provocate de
19 aceeași modificare masică, sunt diferite, deoarece cele două radiații au frecvențe (energii)
20 diferite, în schimb, efectul influenței temperaturii asupra valorii măsurate este același, în
21 cazul ambelor frecvențe, și ca urmare, prin efectuarea raportului matematic al celor două
22 valori, această influență se simplifică, dând valoarea unu care, prin înmulțire cu valoarea
23 măsurătorii, nu afectează rezultatul acesteia.

24 Se dă, în continuare, un exemplu de realizare a invenției, în legătură cu figura, care
25 reprezintă schema de principiu a biosenzorului.

26 Biosenzorul conform invenției este format dintr-o sursă de radiație **S**, ce conține două
27 diode **1** și **2**, laser, un chopper **3**, optic, care comută alternativ cele două fascicule f_1 și f_2 , de
28 radiație monocromatică, de frecvențe diferite, spre un optocuplor **4**, la care este conectată o
29 fibră **5**, optică, cu scindare, prevăzută, la un capăt, cu o depunere **6**, subțire, de aur, pe o
30 lungime de circa 10 mm și având grosimea de circa 30...50 nm, peste care este realizată o
31 depunere **7**, subțire, biologic activă, ce leagă specific specia urmărită, iar la celălalt capăt,
32 cu o unitate **8**, electronică, ce măsoară defazajul între valorile lungimilor de undă ale radiației
33 incidente și valorile lungimilor de undă ale radiației reflectate, și efectuează ulterior raportul
34 celor două valori ale defazajului, în vederea eliminării erorii de măsurare, cauzată de
35 influența temperaturii.

RO 126239 B1

Revendicare

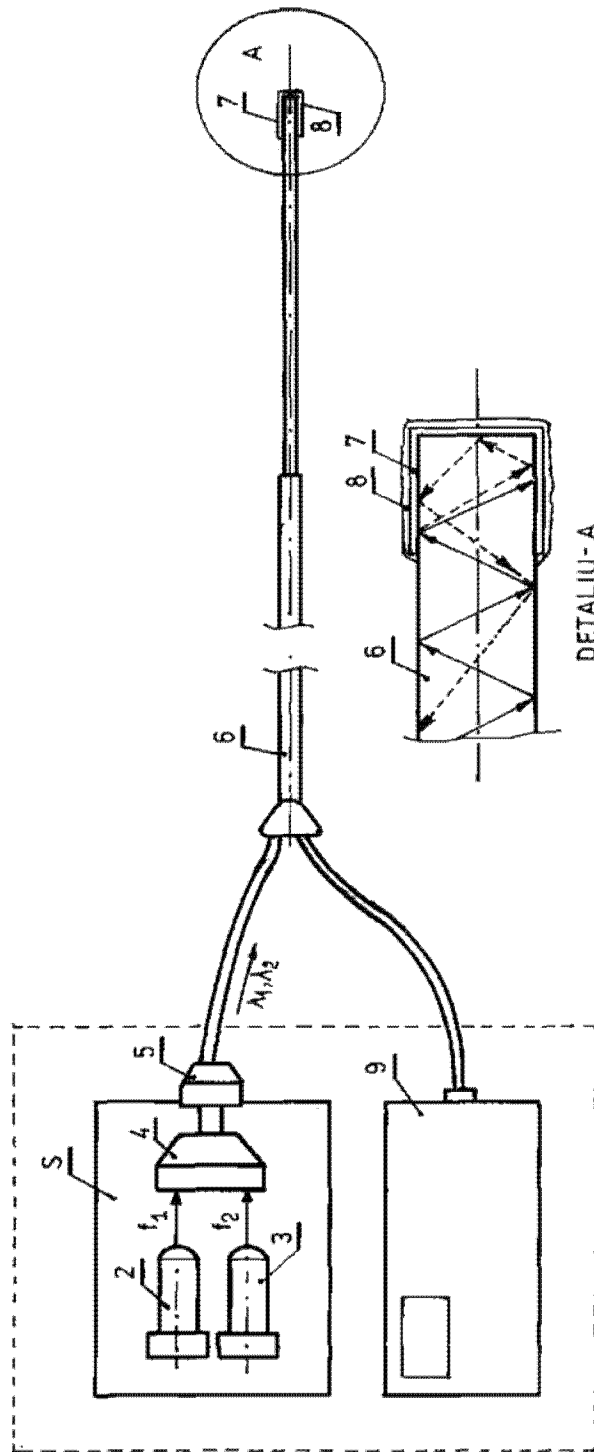
Biosenzor miniatural, pentru analiza cantitativă, specifică, a unei specii biologice sau chimice dintr-un mediu lichid sau dintr-un țesut viu, cu eliminarea automată a influenței variațiilor de temperatură asupra valorilor măsurate, **caracterizat prin aceea că este** constituit dintr-un ansamblu format dintr-o sursă de radiație (**S**), ce conține două diode (**1** și **2**) laser, un chopper (**3**) optic care comută alternativ cele două fascicule (**f₁** și **f₂**) de radiație monocromatică, de frecvențe diferite, spre un optocuplor (**4**) la care este conectată o fibră (**5**) optică cu scindare, prevăzută, la un capăt, cu o depunere (**6**) subțire de aur, având grosimea de 30...50 nm și lungimea de 10 mm, peste care este realizată o depunere (**7**) subțire, biologic activă, formată dintr-un anticorp ce leagă specific specia urmărită, formată din antigenul corespunzător din mediul cercetat, iar la celălalt capăt, cu o unitate (**8**) electronică ce măsoară defazajul între valorile lungimilor de undă ale radiației incidente și valorile lungimilor de undă ale radiației reflectate, și efectuează ulterior raportul celor două valori ale defazajului, în vederea eliminării erorii de măsurare, cauzată de influența temperaturii.

(51) Int.Cl.

G01N 21/55 (2006.01),

G01N 21/41 (2006.01),

G01N 21/62 (2006.01)



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 641/2014