



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2009 00854

(22) Data de depozit: 23.10.2009

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

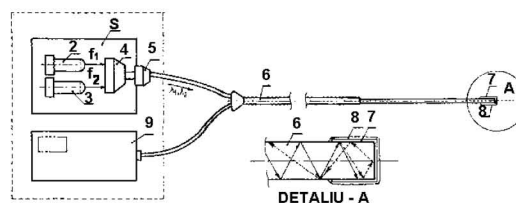
(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA "ȘTEFAN CEL MARE"
DIN SUCEAVA, STR.UNIVERSITĂȚII NR.13,
SUCEAVA, SV, RO

(72) Inventatori:
• GUTT SONIA, STR.VICTORIEI NR.185
BIS, SAT SF.ILIE, SUCEAVA, SV, RO;
• GUTT GHEORGHE, STR.VICTORIEI
NR.185 BIS, SAT SF.ILIE, SUCEAVA, SV,
RO;
• GUTT ANDREI, STR.VICTORIEI NR.185
BIS, SAT SF.ILIE, SUCEAVA, SV, RO

(54) BIOSENZOR MINIATURAL

(57) Rezumat:

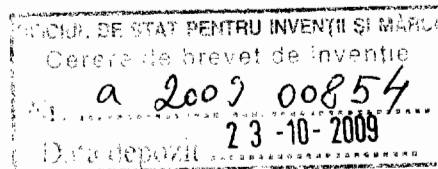
Prezenta invenție se referă la un biosenzor miniatural, destinat analizei cantitative specifice a unei specii biologice sau chimice, dintr-un mediu lichid sau dintr-un țesut viu, alcătuit dintr-un ansamblu format dintr-o sursă de radiație (S) ce conține două diode laser (1 și 2), un chopper optic (3), ce comută alternativ cele două fascicule (f1 și f2) de radiație monocromatică, având frecvențe diferite, spre un optocuplor (4) la care este conectată o fibră optică, cu scindare (5), prevăzută, la un capăt, cu o depunere subțire de aur (6), având grosimea de circa 30...50 nm și lungimea de circa 10 mm, peste care este realizată o depunere biologic activă (7) subțire, ce leagă specific specia analizată, iar la celălalt capăt, cu o parte electronică (8) ce măsoară defazajul între valorile lungimilor de undă ale radiațiilor incidentă și reflectată, și efectuează raportul celor două valori, pentru eliminarea automată a erorii date de variațiile de temperatură.



Revendicări: 1
Figuri: 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).





BIOSENZOR MINIATURAL

Invenția se referă la un biosenzor bazat pe efectul de rezonanță plasmonică de suprafață (SPR), destinat analizei cantitative specifice in situ a unei specii biologice sau chimice dintr-un mediu lichid sau dintr-un țesut viu

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

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 sîngelui sau în cazul operării tumorilor la analiză de țesut prelevat din tumoare. În ambele cazuri metodele folosite presupun un caracter invaziv destul de pronunțat, pericole de infecții, logistică scumpă și timpi de așteptare și de vindecare mari.

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 echilaterale din sticlă, cade pe o suprafață subțire de aur sau argint depusă pe o față adiacentă a aceleiași prisme de unde este reflectată total cu un unghi egal cu unghiul de incidență. Fotonii radiației laser ce intră în prismă pe una din fețele opuse feței cu depunerea metalică interferă cu electronii liberi ai aurului sau argintului și formează 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 rezonanță, din radiația reflectată de stratul de aur sau argint se extrage energia consumată la rezonanță, în spectrul de reflexie apărînd o cădere energetică ce se manifestă 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 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 exterioară a stratului metalic de aur sau argint printr-un așa numit "cîmp evanescent" a cărui intensitate reacționează extrem de sensibil cu orice modificare de masă ce are loc 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 situează la nivelul de 10^{-15} grame (femtograme), acest principiu stînd la baza celei mai sensibile metode de bilanț de masă cunoscute la ora actuală. Pentru aplicații concrete pe suprafața 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 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 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 rezonanței plasmonice este influențată negativ de variații de temperatură fapt care duce, dată fiind sensibilitatea extremă a metodei, fie la necesitatea unor termostatări avansate a mediului din zona analizată fie la corecții ale valorilor măsurate în funcție de temperatura de lucru.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în folosirea unei fibre optice speciale de dimensiuni extrem de mici în extremitatea căreia sînt materializate condițiile pentru obținerea rezonanței plasmonice de suprafață, în vederea analizei unui mediu lichid sau a unui țesut viu eliminîndu-se totodată automat influența variațiilor de temperatură asupra valorilor măsurate.

În acest scop este folosit un sistem de generare a rezonanței plasmonice de suprafață prin folosirea unei fibre optice cu diametrul de cca 600 nm. 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 din frecvențe fiind situată în domeniul spectral albastru și cealaltă în domeniul roșu. La cealaltă extremitate fibra optică are depus un film subțire de aur, cu grosimea de cca 30-50 nm, pe o lungime de cca 10 mm, filmul fiind depus atît pe partea frontală cît și pe partea cilindrică a fibrei. Pentru măsurători, suprafața aurită se acoperă cu un strat subțire de ligand specific speciei care urmează a se determina (de ex. la folosirea senzoriului într-un sistem de detectare imunologic pe stratul de aur se va fixa anticorpul care va lega în timpul procesului de analiză antigenul specific). Principiul care stă la baza soluției din propunere se bazează pe faptul că la fibrele optice, al căror diametru este de același ordin de mărime cu ordinul de mărime al frecvenței radiației electromagnetice transportate, transmisia luminii se face prin reflexii repetate pe pereții fibrei, iar în zona aurită sînt provocat reflexii succesive, fiecare reflexie fiind sub un alt unghi față de cea precedentă. În felul acesta, după întoarcerea completă a radiației, în fibra optică se obține o defazare pronunțată a lungimii de undă a acesteia față de lungimea de undă a radiației incidente, defazare a cărei valoare este o măsură a intensității rezonanței plasmonice, respectiv a masei (concentrației) speciei urmărite ce se găsește pe partea exterioară a filmului de aur, în speță a antigenului legat de anticorp.

Propunerea de invenție elimină eroarea dată de influența temperaturii asupra valorii măsurate prin folosirea a două lungimi de undă diferite pentru iradiere și folosirea ca măsură a intensității rezonanței plasmonice de suprafață a valorii raportului celor două valori ale defazării lungimii de undă a radiației reflectate față de cele două valori ale lungimilor de undă ale radiației inițiale. Valorile defazărilor acestor două lungimi de undă, provocate de aceeași modificare masică, sînt diferite deoarece cele două radiații au frecvențe (energii) diferite, în schimb efectul influenței temperaturii asupra valorii măsurate este același în cazul ambelor frecvențe și ca urmare prin efectuarea raportului

matematic a celor două valori această influență se simplifică dând valoarea unu care prin înmulțire cu valoarea măsurătorii nu afectează rezultatul acesteia.

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- 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
- 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
- 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 duce la o creștere importantă a preciziei de măsurare.
- 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

Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției în legătură cu figura 1 care reprezintă schema de principiu a biosenzorului.

Biosenzorul conform invenției este 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 din aur pe o lungime de cca 10 mm și avînd grosimea de cca 30-50 nm, peste care este realizată o depunere **7** subțire biologic activă ce leagă specific specia urmărită, iar la celălalt capăt cu o parte **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.



REVENDICARE

Invenția Biosenzor miniatural, caracterizat prin aceea că 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, este folosit 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 din aur având grosimea de cca 30-50 nm și lungimea de cca 10 mm, peste care este realizată o depunere **(7)** subțire, biologic activă, ce leagă specific specia urmărită, iar la celălalt capăt cu o parte **(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.



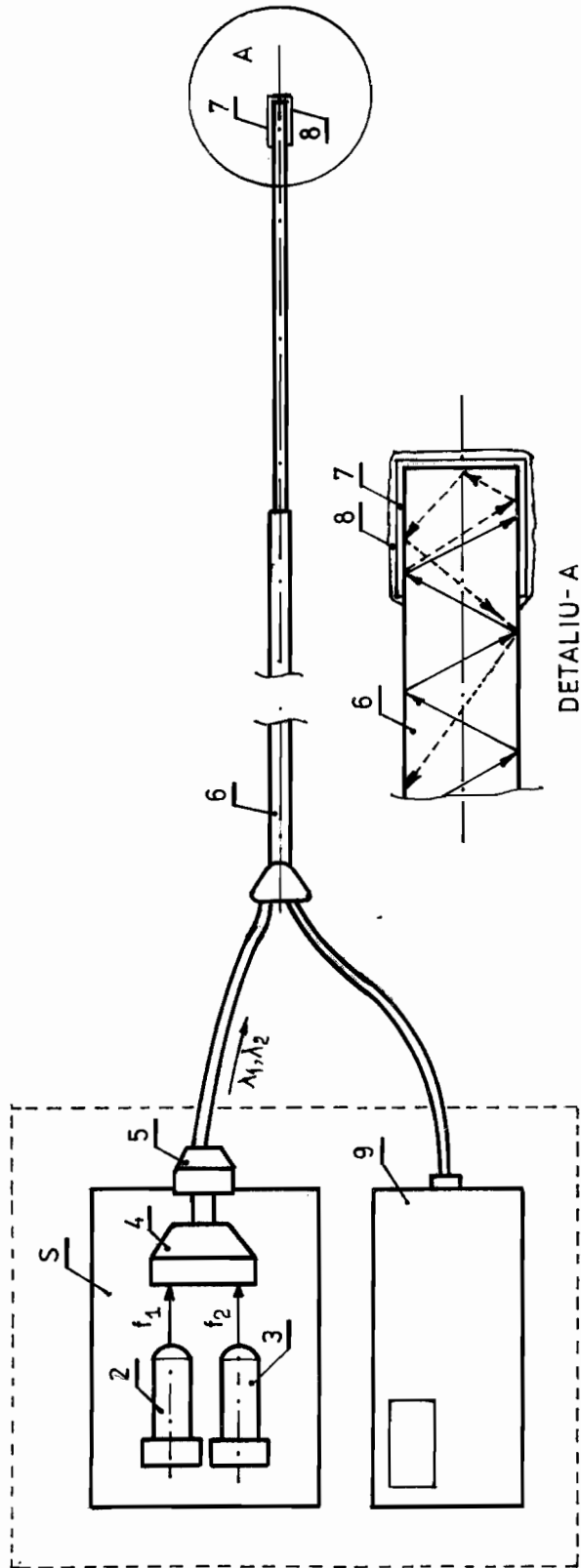


FIG. 1

