



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 01004**

(22) Data de depozit: **22.10.2010**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.10.2013** BOPI nr. **10/2013**

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

(73) Titular:

• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
DEZVOLTARE PENTRU FIZICA
MATERIALELOR, STR.ATOMIȘTILOR
NR.105 BIS, MĂGURELE, IF, RO;**
• **INSTITUTUL DE VIRUSOLOGIE
"ȘTEFAN S.NICOLAU", ȘOS.MIHAEL BRĂVU
NR.285, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:

• **FRUNZĂ ȘTEFAN,**
*PRELUNGIREA GHENCEA NR.28, BL.C 5,
SC.A, AP.1, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;*
• **BEICA TRAIAN,**
*STR.CRINUL DE PĂDURE NR.3, BL.G 6,
SC.1,AP.23, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;*

• **ZGURA IRINA IONELA, STR.BÎRNOVA
NR.6, BL.M 111 C, SC.1, ET.1, AP.7,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **FRUNZĂ LIGIA,**
*PRELUNGIREA GHENCEA NR.28, BL.C 5,
SC.A, AP.1, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;*
• **NUȚĂ ALEXANDRINA, ALEEA PLEȘEȘTI
NR.3, BL.Z 12, SC.3, AP.32, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **SORESCU ANA-ALEXANDRA,**
*STR.DR.OBEDENARU NR.25, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;*
• **ZAHARIA CORNELIU NICOLAE,**
*BD.BASARABIA NR.84, BL.B 2, SC.A, AP.3,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;*
• **BUNEA IONICA, STR.AVRIG NR.35,
BL.441, SC.A, AP.14, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
US 7125592 B2; WO 2007/022275 A2

(54) **DISPOZITIV ȘI METODĂ PENTRU DETECTAREA
INTERACȚIUNILOR DE TIP ANTIGEN VIRAL-ANTICORP
SPECIFIC, PRIN DETERMINAREA UNGHIIULUI DE CONTACT**



1 Invenția se referă la un dispozitiv multistrat, în două variante, pe bază de nanosisteme
care să permită detectarea perturbațiilor rezultate în urma interacțiunilor specifice de tip ligand-
3 receptor (antigen-anticorp) și o metodă de determinare a prezenței unor proteine care sunt
anticorpi sau agenți patogeni pentru om sau animale, în vederea utilizării lor în diagnosticul
5 medical. Metoda de o înaltă sensibilitate este bazată pe determinarea unghiului de contact al
apei pe dispozitivul menționat și reprezintă o alternativă la unele tehnici curente de decelare a
7 agenților patogeni. Invenția face apel la cunoștințe moderne multidisciplinare de interactive
antigen-anticorp, straturi de dimensiune nanometrică, reacții chimice de funcționalizare,
9 proprietăți de udare apreciate prin valoarea unghiului de contact.

Se cunoaște faptul că, în țară, în laboratoarele de cercetare medicală și în laboratoarele
11 de analize clinice sunt utilizate curent tehnicile de analiză imunoenzimatică, radiometrică sau
prin imunofluorescență, care detectează antigene prin conjugarea cu un anticorp marcat enzi-
13 matic sau marcat cu cromogen, fluorogen sau radionuclid, cu examinare directă prin microscopie,
măsurători turbidimetrice, metode biochimice și serologice (din literatura extrem de vastă
15 pe aceste subiecte, ne referim numai la câteva lucrări: de exemplu cursuri și cărți [Cernescu
C., Ruta S., **Practica diagnosticului virusologic**, 1997, București, Concept Pbl., pp. 125-
17 173; Peretianu D., Saragea M. (sub red.), **Imunologia în teoria și practica medicinei**, 1998,
București, ALL, vol. II, pp. 1519-1620; Moraru I., **Imunologie**, 1984, București, Editura
19 Medicală, pp. 243-264; Zeana C.: **Imunologie clinică**, 1980, București, Editura Medicală,
pp. 353-398] sau articole originale [Stavri H. et al., **Serodiagnosis of environmental**
21 **mycobacterial infections**, *J. Microbiological Methods*, submitted; to appear 2011; Sarter
S., Zakhia N., **Chemiluminescent and bioluminescent assays as innovative prospects for**
23 **mycotoxin determination in food and feed**, *Luminescence* 19 (2004) 345-51; S. Bacilieri
et al., **Seroneutralization vs. Immunoenzymatic (ELISA) test: instruments for assessing**
25 **humoral immunity towards the mumps virus. Preliminary results**, *J. Preventive Med. Hyg.*
(2003) 44, 52-58; Zhou, S. et al., **An immunoassay method for quantitative detection of**
27 **proteins using single antibodies**, *ANAL. BIOCHEM.* 400 (2010) 213-218; Barton, A.C.;
Davis F.; Higson S.P.J., **Labelless immunosensor assay for prostate specific antigen with**
29 **picogram per milliliter limits of detection based upon an ac impedance protocol**, *ANAL.*
CHEM. 80 (2008) 6198-6205; Zhang W.D. et al., **Biotin-avidin Mediated Competitive**
31 **Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Determination of Ketamine**, *CHINESE J. ANAL.*
CHEM. 38(2010) 117-120]. Pentru obținerea rezultatului analizei în cadrul acestor metode, se
33 urmăresc protocoale complicate, se consumă timp îndelungat, tehnicile fiind laborioase.
Tehnicile mai noi, care utilizează sonde nucleotidice (de exemplu tehnica reacției de polimeri-
35 zare în lanț PCR-polimerase chain reaction, care are la bază o tehnologie *in vitro* ce imită
capacitatea naturală de replicare a ADN și care constă în generarea rapidă a unor copii multiple
37 a unei secvențe nucleotidice țintă, ADN sau ARN, dintr-o genă de interes sau un patogen
specific, produsul amplificat fiind apoi detectat prin diverse metode), au scăzut timpii de analiză
39 la câteva ore, dar dezavantajul acestor tehnici constă în necesitatea utilizării unor materiale de
unică folosință scumpe și a unor aparate de citire care au preț de cost ridicat; în plus testele
41 trebuie efectuate de personal înalt specializat. Există și numeroase patente internaționale
referitoare la interacțiunea antigen-anticorp, dintre care cităm numai câteva [E.E. Uzgiris,
43 **Electrophoretic method of detecting antigen-antibody reaction**, Patent US 3984533(1976);
E.E.Uzgiris et al., **Antigen-antibody reaction assay employing particle aggregation and**
45 **resistive pulse analysis**, Patent US 4191739 (1980); D. Shelman et al., **Detection of serum**
antibody and surface antigen by radial partition immunoassay, Patent US 4752542 (1988);
47 **Shah D. et al. Methods for the simultaneous detection of HCV antigenes and HCV**
antibodies, Patent US 6727092 B2 (2004); Bahl C. et al., **Hepatitis C antigen-antibody**
49 **combination assay for the early detection of infection**, Patent US 2003/0049608].

RO 126242 B1

Recent, pe plan internațional, a fost deschisă o direcție nouă de evidențiere a complexelor liganzi-receptori prin folosirea sensibilității orientării cristalelor lichide pe stratul de aliniere în prezența liganzilor [V.K. Gupta, J.J Skaife, T.B. Dubrovsky, N.L. Abbott, **Optical Amplification of Ligand-Receptor Binding Using Liquid Crystals**, *Science* **279**, 2077-2080 (1998); J.J Skaife, J.M. Brake, N.L. Abbott, **Influence of Molecular-Level Interactions on the Orientations of Liquid crystals Supported on Nanostructured Surfaces Presenting Specifically Bound Proteins**, *Langmuir* **17**, 5448-5457 (2001); Y.-Y. Luk et al., **Using liquid crystal to amplify protein-receptor interactions: design of surfaces with nanometer-scale topography that present histidine-tagged protein receptors**, *Langmuir* **19**, 1671-1680 (2003); L.A. Tercero Espinoza et al., **Orientalional Behavior of Thermotropic Liquid Crystals on Surfaces Presenting Electrostatically Bound Vesicular Stomatitis Virus**, *Langmuir* **20**, 2375-2385 (2004)]. Această direcție se bazează pe proprietatea de amplificare a semnalului optic apărut ca urmare a interacțiunii ligand-receptor specific. Tehnica de amplificare cu cristale lichide a fost patentată în diverse variante [Abbott N. L., Scaife J.J., **Quantitative characterization of obliquely-deposited substrates of gold by atomic force microscopy: influence of substrate topography on anchoring of liquid crystals**, Patent US 6288392 (2001); Abbott N. L., et al., **Detecting interactions at biomimetic interfaces with liquid crystals**, Patent US 0104612 (2007); Abbott N. L., R.R. Shah, **Detecting compounds with liquid crystals**, Patent US 0110614 (2007); J. T. Koberstein et al., **Methods for modifying surfaces**, Patent US 0134420 (2007); Abbott N.L., et al., **Using liquid crystals to detect affinity affinity microcontact printed biomolecules**, Patent EP 1668366B1 (2005); Abbott N. L., J.M. Bracke, **Detecting interactions at biomimetic interfaces with liquid crystals**, Patent US 7125592 (2006)] sau este încă în stadiul de cercetare, căutându-se sistemele și condițiile optime pentru realizarea unei metodologii standardizate. Dezavantajul acestor variante constă în aceea că necesită aparatură sofisticată și costisitoare în toate etapele de preparare, și uneori, prepararea substraturilor trebuie să fie cuplată cu măsurătoarea propriu-zisă pentru că prin ședere în atmosfera înconjurătoare, suprafața substratului se modifică din punct de vedere chimic și al proprietăților pentru care a fost creat.

Straturile subțiri de oxid de siliciu SiOx au fost mult investigate în ultimul timp întrucât au multiple aplicații pentru obținerea filmelor intermediare dielectrice la semiconductori, la bariera de gaz, la protecția unor componente optice, etc. Se cunosc mai multe metode de obținere apărute în brevete și în literatură (de exemplu [Nozaki S. et al., **Process for producing SiOx particle**, Patent WO 035663 (2006); D.E. Stevenson, L. Q. Zhou, **SiOx:Si sputtering targets and method of making and using such targets**, Patent WO 022275 (2007); Y. Imamura, R. Nonogaki, **Highly pure SiOx powder**, Patent US 7.585.480 B2; K. Yamamoto, **Polysilicon thin film with a particulate product of SiOx**, Patent US 5517037 (1996)]. Astfel de straturi cu oxid de siliciu pot fi mai departe funcționalizate și de aceea, într-una din variantele dispozitivului propus stratul subțire de SiOx reprezintă primul strat depus pe plăcuțele de sticlă.

Metode cunoscute pentru măsurarea unghiului de contact [Cipriano B.H., S.R. Raghavan, P.M. McGuiggan, **Surface tension and contact angle measurements of a hexadecyl imidazolium surfactant adsorbed on a clay surface**, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* **262**, 8-13 (2005); Shin J. Y., Abbott N. L., **Using Light to Control Dynamic Surface Tensions of Aqueous Solutions of Water Soluble Surfactants**, *Langmuir* **15**, 4404-4410 (1999)] sunt: metoda picăturii așezate, metoda dinamică Wilhelmy, aplicabilă solidelor poroase, necesită cunoașterea tensiunii superficiale a lichidului, metoda fibrei unice Wilhelmy și metoda unghiului de contact pe pulberi. Determinarea unghiului de contact

1 în legătură cu interacțiile între molecule este utilizată și de alte grupuri (de exemplu . [Wilner,
2 O.I.; et al., **Probing kinase activities by electrochemistry, contact-angle measurements,**
3 **and molecular-force interactions, Chem.-A Eur.J. 14 (2008) 7774-7781**]). Studiul literaturii
4 de specialitate a arătat că metoda picăturii așezate a fost îmbunătățită succesiv prin creșterea
5 numărului de puncte folosite în calcule [Adamson A.W., **Physical Chemistry of Surfaces, Fifth**
6 **Ed., New York, Wiley, 1990; A.I. Rusanov, V.A. Prokhorov, Interfacial Tensiometry, Studies**
7 **în Interface Science Series, D. Moebius and R. Hiller (Eds.), vol.3, Elsevier, Amsterdam,**
8 **1996; A.W. Neumann, J.K. Spelt (Eds.), Appl. Surf. Thermodyn., Surf. Sci. Ser., 63, Marcel**
9 **Dekker Inc., 1996**], prin tehnica de determinare a profilului picăturii [J. Juza, **The pendant**
10 **drop method of surface tension measurement: equation interpolating the shape factor**
11 **tables for several selected planes, Czech. J. Phys. 47, 351-360 (1997)**], în folosirea achiziției
12 imaginii profilului picăturii cu o cameră video care să permită un număr mare de citiri, în folosirea
13 unui program de calcul adecvat, special realizat, ceea ce a condus la creșterea preciziei metodei
14 la o valoare comparabilă cu cea dată de metodele standard de măsurare a tensiunii superficiale.

15 Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în detectarea prezenței unor agenți
16 patogeni în diferite probe biologice, în scop medical.

17 Metoda conform invenției cuprinde determinarea unghiului de contact din evaluarea
18 unghiurilor de avans și retragere, prin prelucrarea adecvată a imaginilor optice ale formei
19 picăturilor de apă pe un substrat nanostructurat, având o proteină cu grup funcțional care
20 interacționează specific cu proteina ce urmează a fi identificată, substratul făcând parte dintr-un
21 sistem multistrat, constituit într-un dispozitiv care asigură o variație predictibilă a unghiului de
22 contact în prezența agentului patogen față de cazul când acesta lipsește și permite detectarea
23 prezenței unui astfel de agent.

24 Unghiul de contact este unghiul la care interfața lichid/vapori întâlnește suprafața
25 solidului [P. G. de Gennes, **Wetting: Statics and Dynamics, Rev. Mod. Phys. 57, 827-882**
26 **(1985)**]. Unghiul de contact este specific pentru un sistem alcătuit din suprafața substratului și
27 picătură și este determinat de interacțiile la cele 3 interfețe: solid, lichid, vapori. În principiu,
28 unghiul de contact al unei picături de lichid pe o suprafață solidă este guvernat de echilibrul
29 unor tensiuni interfaciale: tensiunea superficială lichid-vapori, tensiunea superficială solid-vapori
30 și tensiunea superficială solid-lichid. Pentru descrierea teoretică a unghiului de contact, putem
31 scrie ecuația care satisface echilibrul tensiunilor superficiale (cunoscută ca ecuația Young)
32 [Adamson A.W., **Physical Chemistry of Surfaces, Fifth Ed., New York, Wiley, 1990**]. Doar
33 unghiurile de contact experimentale pe suprafețe solide omogene și netede pot să aibă
34 semnificație pentru determinarea tensiunilor superficiale ale solidelor în contextul ecuației lui
35 Young [D.Y. Kwok, A.W. Neumann, **Contact angle measurement and contact angle**
36 **interpretation , Adv. Colloid Interface Sci. 81 167-171 (1999)**], iar dispozitivul propus
37 satisface această cerință, după cum rezultă din descrierea acestuia.

38 Unghiul de contact se poate calcula și din măsurători dinamice când se determină două
39 unghiuri importante, unghiul de avans A , care are valoarea cea mai mare, și unghiul de
40 retragere R , care are valoarea cea mai mică. Între aceste unghiuri există cunoscute relații [R.
41 **Tadmor, Line Energy and the Relation between Advancing, Receding, and Young Contact**
42 **Angles, Langmuir, 20, 7659-7664 (2004)**], care dau unghiul de contact de echilibru, dar valorile
43 lor pot fi de asemenea folosite pentru compararea unor sisteme.

44 Dispozitivul multistrat, conform invenției, are ca elemente constructive depuneri
45 succesive de multistrat pe plăcuțe curățate de sticlă, și anume, de (3-aminopropil)trietoxisilan,
46 disuccinimidil suberat și proteina care interacționează specific, suprafața sa fiind compatibilă
47 cu depunerea câtorva picături de apă, care să permită repetarea determinărilor de unghi de

RO 126242 B1

contact, pregătirea dispozitivului constând în crearea pe suprafața superioară a unui nou strat ce conține proteina de analizat, prin cufundarea dispozitivului în această soluție de analizat, la sfârșitul reacției, clătirea făcându-se cu amestec tampon fosfat salin și apă deionizată, și fiind urmată apoi de uscarea în aer și de măsurătoarea propriu-zisă a unghiului de contact. 1 3

În continuare, este descris modul de realizare a invenției în legătură și cu fig. 1...5, care reprezintă dispozitivele multistrat. 5

Fig. 1. Schița ce reprezintă dispozitivul pregătit pentru detectarea prezenței unor agenți patogeni virali, vedere din profil: 1 - substrat din placa de sticlă; 2 - strat superior după tratament plasmă; 3 - strat de APES; 4 - strat de DSS; 5 - strat de BSA. În figură, grosimile substratului și ale straturilor nu sunt reprezentate la scară. 7 9

Fig. 2. Schița ce reprezintă o variantă a dispozitivului folosit la detectarea prezenței unor agenți patogeni virali, vedere din profil: 1 - plăcuța de sticlă; 2 - strat SiOx; 3 - strat SiOx după tratament plasmă; 4 - strat de APES; 5 - strat de DSS; 6 - strat de BSA. În figură, grosimile substratului și ale straturilor nu sunt reprezentate la scară. 11 13

Fig. 3. Variația dimensiunii picăturii de apă pe suport (plăcuța gri) la depunere (stânga) sau extragere (dreapta). 15

Fig. 4. Dependența unghiului de contact de diametrul bazei picăturii, în ciclul de măsurare pe dispozitivul principal (varianta A). Straturile depuse se explică în legendă. 17

Fig. 5. Dependența unghiului de contact de diametrul bazei picăturii, în ciclul de măsurare pe dispozitivul în varianta B. Straturile depuse se explică în legendă. 19

Dispozitivul folosit la detectarea prezenței unor agenți patogeni virali, varianta A 21

Dispozitivul conținut în invenție, pentru detectarea interacțiunilor de tip antigen viral-anticorp specific, este format dintr-un substrat reprezentat de suprafața superioară a unei plăci de sticlă, depusă pe rând, cu mai multe straturi foarte subțiri, de ordinul nanometrilor, incluzând în final un strat depus cu o proteină cu un grup funcțional care interacționează specific cu proteina ce urmează a fi identificată constituită în proba biologică moleculară. 23 25

În varianta A, reprezentată schematic în fig. 1, nanostraturile dispozitivului au fost obținute în mai multe etape, după cum urmează: 27

1) Se pornește de la plăcuțe subțiri de sticlă (de grosime 1mm) disponibile comercial (de exemplu la Cole Parmer) ca plăcuțe pentru microscop. Acestea se aduc la dimensiunile 25x8x1 mm prin zgâriere cu un vârf ascuțit și dur, de exemplu, diamantat, disponibil comercial. Urmează ruperea după linia zgâriată, curățarea și apoi depunerea cu nanostraturi specifice. 29 31

2) Curățarea avansată a plăcuțelor se asigură prin metoda umedă, care cuprinde: 33

- o curățare mecanică prin frecarea plăcilor cu o bucată de țesătură înmuiată în soluție de detergent; 35

- ultrasonare la cald în soluție de detergent a plăcilor introduse într-un stativ din teflon, cu dimensiuni adecvate pe dimensiunile plăcuțelor, care să nu permită atingerea plăcuțelor una de alta. Ultrasonarea se execută într-o baie de ultrasonare, de exemplu Ultramet II Sonic Cleaner (de la Buehler-Met) disponibilă comercial (unele mărci apar chiar și în magazinele de menaj); 37 39

- urmează o clătire îndelungată în apă curentă caldă, clătire prin ultrasonare la cald (90°C) în multă apă bidistilată (de câteva ori volumul stativului); 41

- Uscare în etuvă la 120°C. Rezultă substratul 1 (fig. 1, substratul 1). 43

3) Plăcuțele de sticlă astfel curățate sunt mai departe tratate în plasmă de oxigen, la presiunea de 0,4 mBar, timp de 30 min, într-o instalație comercială de exemplu Standard Plasma Systems, model PICO (Electronic Diener), ceea ce conduce la o curățare și mai avansată a lor, precum și la hidrofilara suprafeței acestora (fig. 1, stratul 2). 45 47

RO 126242 B1

1 Straturile următoare se depun prin imersare succesivă în soluțiile unor reactanți specifici, după cum urmează:

3 4) Silanizare cu (3-aminopropil)triethoxisilan (APES) (Sigma Aldrich#919302), timp de 3 ore la 80°C într-o soluție de APES de concentrație 10% în amestec tampon acetat/acid acetic la un pH = 5. După reacție, plăcuțele sunt clătite cu apă deionizată și uscate la 120°C pentru 3 ore [S. R. Kim, R. R. Shah, Abbott N. L., **Orientations of Liquid Crystals on Mechanically Rubbed Films of Bovine Serum Albumin: A Possible Substrate for Biomolecular Assays Based on Liquid Crystals**, Anal. Chem. 72, 4646-4653 (2000)]. Rezultă stratul 3 (fig. 1, stratul 3).

5 5) Activarea suprafeței cu disuccinimidil suberat (DSS) (Pierce#68528803), care constă în tratare cu soluție 1 mM de DSS în metanol anhidru timp de 1 h, cu agitare magnetică. Soluția 1 mM de DSS a fost preparată prin diluarea cu metanol anhidru a unei soluții de DSS în dimetilsulfoxid [S. R. Kim, R. R. Shah, Abbott N. L., **Orientations of Liquid Crystals on Mechanically Rubbed Films of Bovine Serum Albumin: A Possible Substrate for Biomolecular Assays Based on Liquid Crystals**, Anal. Chem. 72, 4646-4653 (2000)]. Clătirea s-a făcut cu metanol și apoi, cu apă deionizată. Uscarea în aer conduce la stratul 4 (fig. 1, stratul 4).

7 6) Cuplarea suprafeței activate cu proteina cu grup funcțional, care interacționează specific cu proba biologică moleculară, de exemplu cu Albumina Serica Bovina biotinitată (BSA-b), a fost efectuată prin imersarea într-o soluție de BSA-b de concentrație 1 mg/ml, timp de 12 h, la temperatura de +40°C. Soluția de BSA-b (Pierce#29130) a fost preparată prin dizolvare în amestec tampon fosfat salin (PBS) (Pierce#1890535), la pH 7.2 [J. T. Koberstein et al., **Methods for modifying surfaces**, Patent US 0134420 (2007)]. La sfârșitul reacției, plăcuțele se clătesc cu PBS (de 5 ori câte 10 s) și apă deionizată (de 2 ori câte 10 s), apoi se usucă în aer. Rezultă stratul 5 (fig. 1, stratul 5).

9 Alegerea albuminei serice biotinite ca proteină cu grup funcțional care interacționează specific provine de la aceea că, pentru cercetarea interacțiunilor de tip antigen-anticorp, s-a utilizat, ca model experimental, sistemul binecunoscut avidină-biotină, aici în forma streptavidină - albumină serică biotinitată.

11 Grosimea fiecărui strat din dispozitivul multistrat de nanosisteme este dată de condițiile de depunere și incubare menționate, dar în general straturile rezultate sunt de ordinul de mărime al monostraturilor, adică sunt straturi cu grosime de nanometri.

13 7) Depozitarea plăcuțelor astfel obținute, până la momentul măsurătorii unghiului de contact, s-a realizat într-o cutie de depozitare, cu atmosferă uscată cu silicagel.

15 *Dispozitivul folosit la detectarea prezenței unor agenți patogeni virali, varianta B*

17 Dispozitivul este conceput și în varianta în care pe suprafața plăcuței de sticlă, curățată după tăiere așa cum se arată mai sus, se depune un strat nanostructurat de oxid de siliciu. Astfel, etapele parcurse pentru obținerea dispozitivului în această variantă sunt următoarele:

19 1) Se pornește de la plăcuțe subțiri de sticlă aduse la dimensiune ca în varianta A.

21 2) Se curăță avansat plăcuțele prin metoda umedă, descrisă în varianta A.

23 3) Plăcuțele sunt depuse cu un strat de oxid de siliciu (SiOx) prin evaporare oblică în vid la unghi de 60° cu normala la suprafață, folosind o instalație de depunere în vid (de minimum 10⁻⁵ Torr) disponibilă comercial, de exemplu B30.2 (Hochvakuum Dresden). Sursa de oxid de siliciu este SiO pur pentru acoperiri (minimum 99%) disponibil de asemenea, comercial (de exemplu Balzers). Grosimea stratului de SiOx este de aproximativ 25 nm [R. Moldovan et al., **Orientalional transitions in nematic liquid crystals on subtrrates with controlled topography**, Mol. Cryst. Liq. Cryst. 329, 43-49 (1999)]. Rezultă stratul 2 (fig. 2, stratul 2).

RO 126242 B1

- 4) Plăcuțele de sticlă astfel curățate sunt mai departe tratate în plasmă de oxigen, după descrierea de mai înainte (varianta A, a dispozitivului) (fig. 2, stratul 3). 1
- 5) Silanizare cu (3-aminopropil)trietoxisilan (APES), clătire și uscare, ca mai înainte în varianta A. Rezultă stratul 4 (fig. 2, stratul 4). 3
- 6) Activarea suprafeței cu disuccinimidil suberat (DSS), clătire și uscare după cum s-a specificat la punctul 5, varianta A; Se obține stratul 5 (fig. 2, stratul 5). 5
- 7) Cuplarea suprafeței activate cu proteina cu grup funcțional, așa cum s-a menționat la punctul 6, varianta A; rezultă stratul 6 (fig. 2, stratul 6). 7
- Grosimea fiecărui strat din dispozitivul de nanosisteme este dată de condițiile de depunere și incubare, dar în general straturile sunt tot de ordinul de mărime al monostraturilor, așa cum s-a menționat mai sus (câțiva nanometri, până la zeci de nanometri). 9 11
- Depozitarea plăcuțelor astfel obținute, până la momentul măsurătorii unghiului de contact, s-a realizat într-o cutie de depozitare, cu atmosferă uscată cu silicagel, ca și în cazul variantei simple a plăcuțelor fără strat SiOx. 13
- De menționat că dimensiunea plăcuțelor a fost astfel aleasă încât să fie suficient de mică, pentru a consuma o cantitate mică de reactivi la depunerile multistrat, dar suficient de mare pentru a putea repeta măsurătorile de unghi de contact pe același substrat. 15 17
- Pregătirea dispozitivului pentru măsurători*
- Dispozitivul (în varianta A sau B) ce conține ca strat superior proba biologică este cufundat timp de 1,5 h, la temperatura camerei, în soluția de analizat, de exemplu în soluție de Streptavidină (Pierce #21125) de concentrație 0,1 mg/ml, obținută prin dizolvare în amestec fosfat salin (PBS), pH 7,2. La sfârșitul reacției, plăcuțele se clătesc cu PBS (de 5 ori câte 10 s) și apă deionizată (de 2 ori câte 10 s), apoi se usucă în aer. 19 21 23
- Metoda pentru detectarea prezenței unor agenți patogeni virali*
- Metoda pentru detectarea prezenței agenților patogeni virali se bazează pe determinarea unghiului de contact al apei pe dispozitivul de nanostraturi, determinare care se poate efectua cu orice instrument de tip goniometru, disponibil comercial, de exemplu un sistem de analiză a formei picăturilor DSA100 de la Krüss. Măsurătorile de unghi de contact se efectuează în general, prin metoda statică a picăturii așezate. Sistemul optic al aparatului DSA100 captează imaginea și analizează unghiul de contact cu un soft comercial adecvat. Totuși, deoarece măsurătorile necesare invenției sunt de precizie, s-a folosit metoda dinamică a picăturii așezate, a determinării unghiului de avans și de retragere, adică se depune picătura și apoi, se adaugă lichid, treptat, după care se descrește volumul de lichid, tot treptat. Unghiul de contact de avans este unghiul de contact rămas constant deși diametrul picăturii a crescut. Unghiul de retragere este unghiul care se măsoară când se retrage lichidul până se ajunge la volumul maxim retras. 25 27 29 31 33 35
- Unghiul de contact este dat de direcția tangentei la curba care aproximează profilul picăturii în punctul de intersecție cu linia de contact. Profilul picăturii se aproximează cu un cerc, o elipsa sau mai bine, cu ecuații mai complicate, date de software al goniometrului. De exemplu în cazul software de la Krüss se aplica metoda numită „Tangenta 2”, care este bazată pe fitarea profilului picăturii (partea de la punctul de întâlnire al celor 3 faze) cu o funcție de tipul 37 39 41
- $$y = a + bx + cx^{0.5} + d/\ln x + e/x^2,$$
- unde x este variabila și a, b, c ... sunt parametri. Profilul picăturii este aproximat iterând valorile parametrilor, prin software. Derivata (tangenta) se calculează la punctul de întâlnire al celor 3 faze, pe linia de bază. Metoda este sensibilă la distorsiunile din regiunea de contact, cauzate de “contaminanți” ai suprafeței. 43 45

RO 126242 B1

1 *Măsurarea unghiului de avans*

2 Picătura de apă se depune pe suprafața superioară a dispozitivului (fig. 3) astfel încât
3 imaginea ei să fie captată de o cameră de luat vederi (inclusă în goniometrul DSA100) și anali-
4 zată cu programul inclus în software. Depunerea picăturii se efectuează printr-un tub capilar (de
5 exemplu cu diametru exterior de 0.51 mm).

6 Creștem apoi dimensiunea picăturii, treptat. La început, picătura crește și picătura
7 avansează proporțional cu volumul nou introdus, așa încât unghiul de contact rămâne practic,
8 congruent. Valorile unghiurilor la creștere reprezintă datele acumulate la creștere și oferă un
9 set pentru mediere.

10 Picătura rămasă pe suprafață mai mult timp, se modifică foarte puțin. Dacă se observă
11 modificări, se repetă măsurătorile cu mai multă atenție.

12 Măsurătorile se repetă pentru câteva picături (până la 10 picături).

13 *Măsurarea unghiului de retragere*

14 Din picătura de apă rămasă în contact cu capilarul, se soarbe treptat apa. Unghiul de
15 retragere poate fi evaluat dacă se prelucrează imaginile obținute prin micșorarea volumului
16 picăturii.

17 Măsurătorile se repetă pentru câteva picături (până la 10 picături).

18 *Mijloacele tehnice utilizate* în cadrul invenției sunt: cutter pentru sticlă; baie de
19 ultrasonare cu volum relativ mic (aproximativ 1,5 L); etuvă pentru uscare la 120°C; agitator
20 magnetic; stativ pentru placutele depuse cu nanostraturi; goniometru cu seringă pentru picurare,
21 cu cameră video pentru achiziția de imagini și cu software pentru calcule.

22 *Materiale utilizate:* apă deionizată; apă curentă; apă bidistilată; bucată de țesătură de
23 30 cm x 30 cm, detergent pentru sticlă, sticlute de microscop; (3-aminopropil)triethoxisilan
24 (APES); tampon acetat/acid acetic pH = 5; disuccinimidil suberat (DSS); metanol anhidru,
25 dimetilsulfoxid; tampon fosfat salin; Albumina Serică Bovina biotinilată (BSA-b); streptavidină
26 (sau perechi corespunzătoare de antigen-anticorp).

27 *Rezultatul final* este modificarea mare (câteva zeci de grade) a unghiurilor de avans și
28 retragere în cazul prezentei antigenului viral.

29 *Reproductibilitatea* este asigurată de tipul de interacții antigen-anticorp, care sunt foarte
30 puternice, iar validitatea rezultatelor este dată de repetabilitatea valorilor de unghi de contact
31 pentru mai multe picături și medierea lor. Corectitudinea interpretării valorilor obținute este
32 asigurată pe de o parte de faptul ca interacțiile antigen-anticorp sunt extrem de puternice și
33 foarte specifice și pe de altă parte de faptul că valorile obținute pentru unghiurile de contact sunt
34 de încredere.

35 Avantajele invenției constau în:

36 - Calibrarea este simplă, în sensul că este necesară doar cunoașterea măririi optice.
37 Aceasta poate fi efectuată cu precizie mare și pot fi folosite cu ușurință standarde metrologice;

38 - Suprafețele solide ale aparatului implicat nu au nevoie de cerințe speciale de curățenie
39 pentru ca proprietățile lor de udare în sine nu afectează rezultatul. Acesta este un avantaj
40 substanțial față de metodele în care curățenia este necesară;

41 - Este o metodă rapidă, robustă și simplă;

42 - Unghiul de contact pe sticlă este mic și suprafețele de sticlă "contaminate" cu subs-
43 tanțe organice conduc la un unghi de contact mai mare, deci mai ușor de măsurat;

44 - Unghiul de contact este sensibil și la cantități mici de "contaminant", de ordinul
45 monostraturilor, deci aceștia sunt ușor de evidențiat, dacă apar;

RO 126242 B1

- Unghiul de contact se poate măsura fără cunoașterea teoriilor complicate care fundamentează măsurarea; 1
- Nu sunt necesare operații și operatori cu experiență în domeniu; 3
- Din punctul de vedere al proteinelor care interacționează, se pot găsi perechi cu mare grad de afinitate și specificitate. 5

În continuare se prezintă două exemple de realizare a invenției.

Exemplul 1. Cuprinde comportarea dispozitivului principal (în varianta A) (plăcuță de sticlă fără strat de SiO_x, funcționalizată după cum a fost descris mai înainte) atât în formă finală cu proteina cu un grup funcțional care interacționează specific cu proteina ce urmează a fi identificată, cât și în formele intermediare, în diferite stadii ale depunerii de straturi, la măsurarea unghiului de contact prin metoda dinamică. De asemenea, este considerată și modificarea acestui unghi prin adăugarea unui strat de proteină ce urmează a fi identificată. 7-11

Fig. 4 redă dependența unghiului de contact de diametrul bazei picăturii (exprimat în unități arbitrare pentru a elimina operațiunea de calibrare a capilarului utilizat, calibrarea neavând nici o influență asupra valorii unghiului de contact). Valoarea limită a acestui diametru corespunde la un volum maxim considerat pentru picătura de 3,5 microlitri. Se observă variația valorii unghiului de contact atât cu natura stratului depus, cât și în cursul ciclului de măsurare, creștere a volumului picăturii - extragere a materialului din picătură. Valorile unghiurilor de avans și retragere corespunzătoare acestor dependențe sunt date în tabelul 1. Aceste valori au suferit procesul de mediere, pentru a obține valoarea medie pe porțiunea de interes, așa cum s-a menționat mai sus. Se observă din figură și din tabel scăderea accentuată (de aproximativ 18°) a unghiului de contact de avans pentru situația sticlă-APES-DSS-BSA-b-streptavidină față de cazul sticlă-APES-DSS-BSA-b. Totodată, se observă din figura că eroarea este foarte mică, de aproximativ 2,5%. 13-23

Exemplul 2. Cuprinde comportarea variantei B propuse pentru dispozitiv (plăcuță de sticlă cu strat de SiO_x, funcționalizată) atât în forma finală de proteină cu grup funcțional specific cu BSA-b, cât și în formele intermediare, la măsurarea unghiului de contact prin metoda dinamică. De asemenea, este considerată și modificarea acestui unghi prin adăugarea unui strat de streptavidină care este modelul folosit pentru proba biologică de proteină a cărei prezență trebuie detectată. 25-29

Fig. 5 redă dependența unghiului de contact de diametrul bazei picăturii, măsurat în unități arbitrare. Valoarea limită a acestui diametru corespunde la un volum maxim considerat pentru picătura de 3,5 microlitri (așa cum rezultă din folosirea acului de seringă menționat). Se observă variația valorii unghiului de contact, atât cu natura stratului depus, cât și în cursul ciclului de măsurare, creștere a volumului picăturii - extragere a materialului din picătură. Valorile unghiurilor de avans și retragere corespunzătoare acestor dependențe sunt date în tabelul 2. Aceste valori au suferit procesul de mediere menționat mai sus. 31-37

Tabelul 1

Unghiul de contact în funcție de compoziția stratului în dispozitivul principal

Sticla	APES	DSS	BSA-b	Streptavidină	Unghi contact*
X	X				A74,35±2,14/R46,03±1,55
X	X	X			A73,66±2,19/R40,19±1,16
X	X	X	X		A62,41±2,02/R13,21±3,24
X	X	X	X	X	A44,04±1,39/R8,93±1,97

*A - avans; R - retragere.

Unghiul de contact în funcție de compoziția stratului în varianta cu SiOx

Sticla	SiOx nano-structurat	APES	DSS	BSA-b	Strept-avidină	Unghi de contact*
X	X	X				A64,4±1,1/R18,8±1,1
X	X	X	X			A65,2±2,4/R23,9±1,3
X	X	X	X	X		A68,83±3,83/R11,81±5,41
X	X	X	X		X	A26,90±1,16/R11,14±1,58

* A - avans; R - retragere.

A fost studiată influența solventului pentru antigenul viral asupra unghiului de contact, în ambele cazuri descrise de exemplele de mai sus: După ce s-a depus BSA-b, dispozitivul s-a imersat în solventul folosit pentru Streptavidină și s-a uscat în aceleași condiții. Valoarea unghiului de contact după „tratamentul” cu solvent nu a fost alterată față de valoarea fără acest tratament, ceea ce dovedește că pentru modificarea unghiului de contact este nevoie de o modificare mai profundă a stratului, adusă prin legarea de anticorp.

RO 126242 B1

Revendicări

1. Metodă pentru detectarea unui compus din categoria agenților patogeni, care cuprinde determinarea unghiului de contact din evaluarea unghiurilor de avans și retragere, prin prelucrarea adecvată a imaginilor optice ale formei picăturilor de apă pe un substrat nanostructurat, având o proteină cu grup funcțional care interacționează specific cu proteina ce urmează a fi identificată, substratul făcând parte dintr-un sistem multistrat, constituit într-un dispozitiv care asigură o variație predictibilă a unghiului de contact în prezența agentului patogen față de cazul când acesta lipsește și permite detectarea prezenței unui astfel de agent. 3
2. Dispozitiv pentru detectarea prezenței unor proteine care sunt anticorpi sau agenți patogeni pentru om sau animale, care are ca elemente constructive depuneri succesive de multistrat pe plăcuțe curățate de sticlă, și anume de (3-aminopropil)triethoxisilan, disuccinimidil suberat și proteina care interacționează specific, suprafața sa fiind compatibilă cu depunerea câtorva picături de apă, care să permită repetarea determinărilor de unghi de contact, pregătirea dispozitivului constând în crearea pe suprafața superioară a unui nou strat ce conține proteina de analizat, prin cufundarea dispozitivului în această soluție de analizat, la sfârșitul reacției, clătirea făcându-se cu amestec tampon fosfat salin și apă deionizată, și fiind urmată apoi de uscarea în aer și de măsurătoarea propriu-zisă a unghiului de contact. 5
3. Dispozitiv conform revendicării 2, care este prezentat și în a doua variantă, în care pe plăcuța de sticlă curățată este depus mai întâi un strat de SiO_x nanostructurat și apoi straturile de (3-aminopropil)triethoxisilan, disuccinimidil suberat și proteina care interacționează specific, celelalte operații de pregătire pentru analiza și măsurătoarea propriu-zise fiind descrise în revendicarea 2. 7
- 11
- 13
- 15
- 17
- 19
- 21
- 23

(51) Int.Cl.

G01N 33/50 (2006.01),
C04B 35/14 (2006.01),
C09K 19/02 (2006.01),
G01N 33/536 (2006.01)

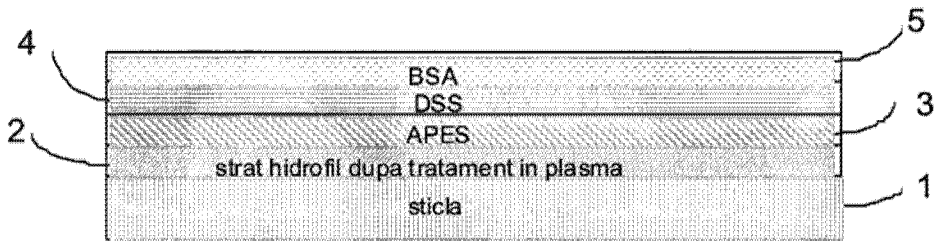


Fig. 1

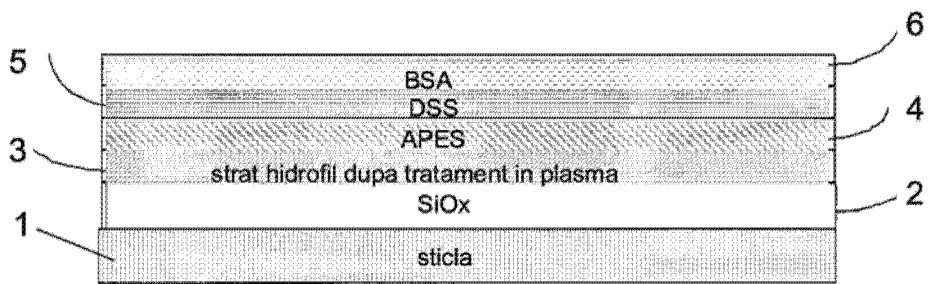


Fig. 2

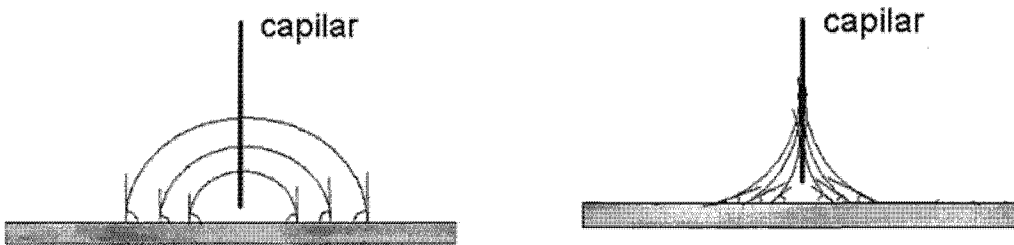


Fig. 3

(51) Int.Cl.

G01N 33/50 (2006.01),
C04B 35/14 (2006.01),
C09K 19/02 (2006.01),
G01N 33/536 (2006.01)

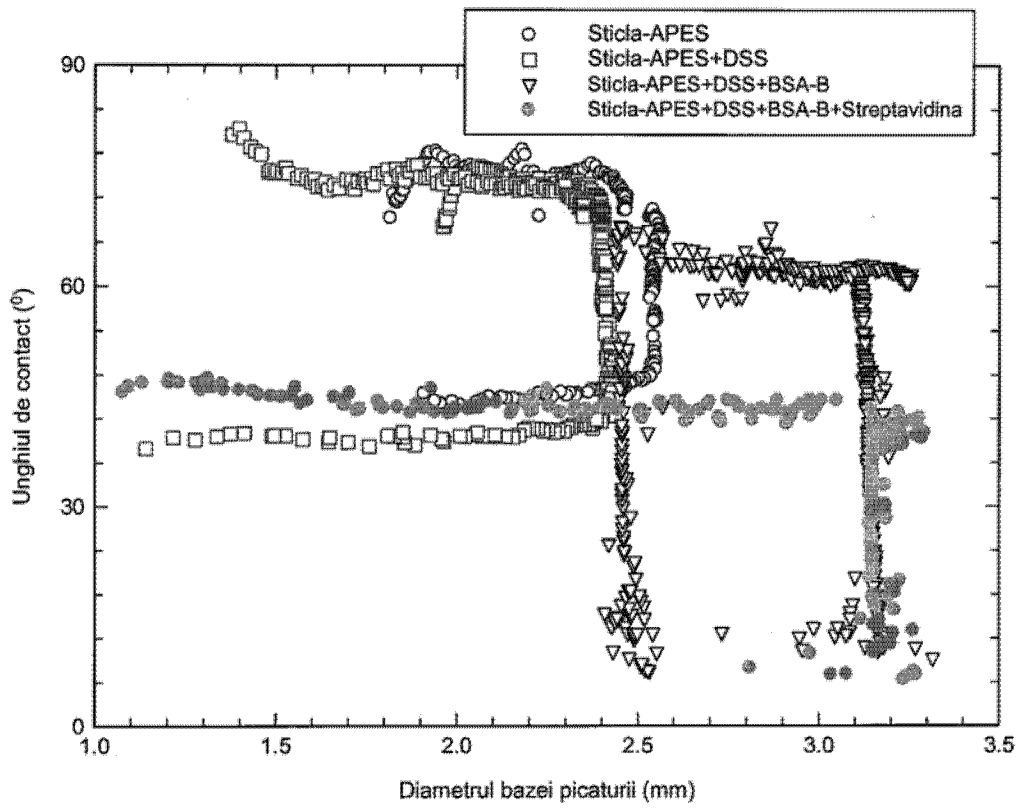


Fig. 4

(51) Int.Cl.

G01N 33/50 (2006.01),
C04B 35/14 (2006.01),
C09K 19/02 (2006.01),
G01N 33/536 (2006.01)

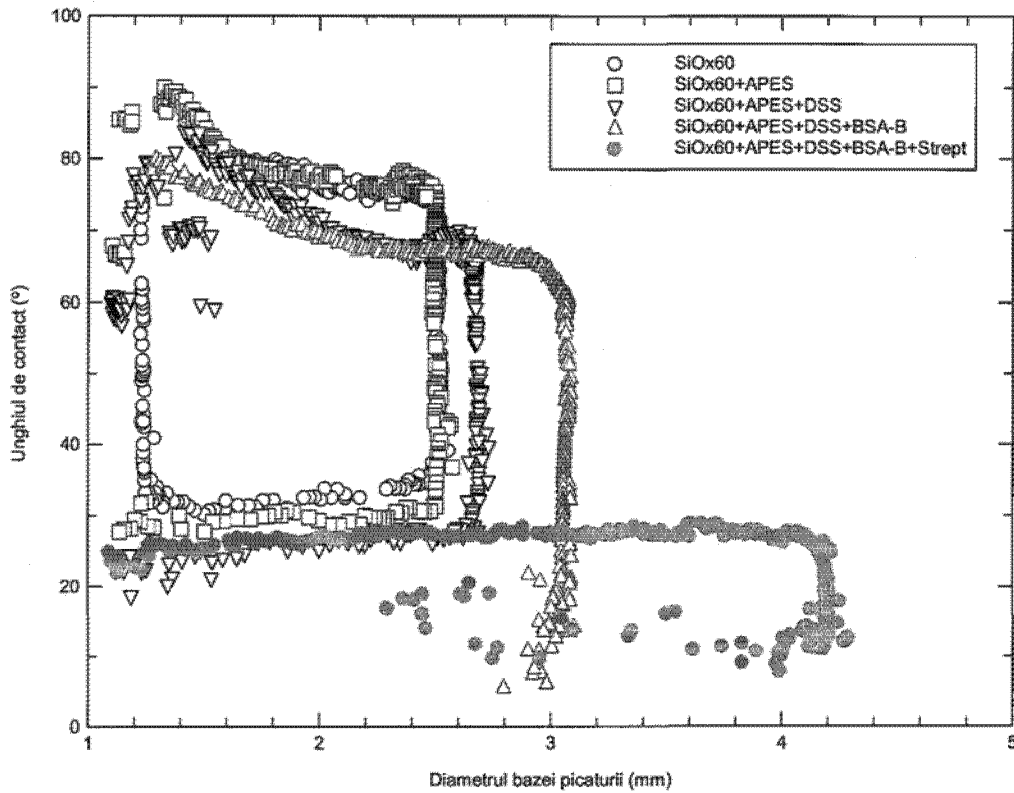


Fig. 5



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
 Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
 sub comanda nr. 967/2013