



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2010 01004

(22) Data de depozit: 22.10.2010

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

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
DEZVOLTARE PENTRU FIZICA
MATERIALELOR, STR. ATOMIȘTILOR
NR. 105 BIS, MĂGURELE, IF, RO

(72) Inventatori:
• FRUNZĂ ȘTEFAN, PREL. GHENCEA
NR. 28, BL. C5, SC.A, AP. 1, BUCUREȘTI, B,
RO;
• BEICA TRAIAN, STR. CRINUL DE
PĂDURE NR.3, BL. G6, 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 28, BL. C5,
AP. 1, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• NUȚA ALEXANDRINA,
STR. ALEEA PLEȘEȘTI NR.3, BL.Z12, SC.3,
AP.32, BUCUREȘTI, B, RO;
• SORESCU ANA ALEXANDRA,
STR. DR. OBEDENARU NR.25, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;
• ZAHARIA CORNELIU NICOLAE,
BD. BASARABIA NR.84, BL.B2, 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

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

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la o metodă și la un dispozitiv pentru determinarea prezenței unor proteine care sunt anticorpi sau agenți patogeni, în vederea utilizării acestora în diagnosticul medical. Metoda conform invenției presupune determinarea unghiului de contact al apei cu substraturi nanostructurate, având în final proteina cu grup funcțional care interacționează specific cu proteina ce urmează a fi identificată. Determinarea unghiului de contact se realizează prin prelucrare adecvată a imaginilor optice ale formei picăturilor de apă, care să permită evaluarea unghiurilor de avans și recesiune. Dispozitivul conform invenției este prezentat în două variante: în prima variantă, dispozitivul conține straturi de (3-aminopropil) trietoxisilan (APES), disuccinimidil suberat (DSS) și proteina care interacționează specific, depuse succesiv pe o plăcuță

de sticlă; în a doua variantă, dispozitivul conține o plăcuță de sticlă pe care sunt depuse un strat de SiOx nanostructurat și apoi straturile de APES, DSS și proteina care interacționează specific.

Revendicări: 12
Figuri: 5



Fig. 1



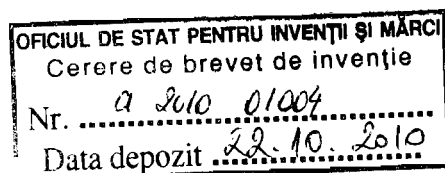
DISPOZITIV ȘI METODA PENTRU DETECTAREA INTERACȚIUNILOR DE TIP ANTIGEN VIRAL - ANTICORP SPECIFIC, PRIN DETERMINAREA UNGHIULUI DE CONTACT

Prezenta invenție se referă la o un dispozitiv 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 medical. Metoda de o înalta sensibilitate este bazată pe determinarea unghiului de contact al apei pe dispozitivul multistrat pe bază de nanosisteme care să permită detectarea perturbațiilor rezultate în urma interacțiunilor specifice de tip ligand-receptor (antigen-anticorp) și reprezintă o alternativă la unele tehnici curente de decelare a agenților patogeni.

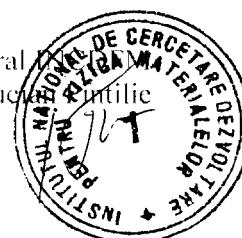
Nanosisteme funcționalizate pe substrat pentru determinările de unghi de contact din cadrul metodei se bazează pe depunerea unor straturi succesive, foarte subțiri pe substrat și constituie dispozitivul pentru detectarea prezenței unor agenți patogeni. Sunt prezentate două variante pentru substrat care includ un suport cu suprafața superioară depusă sau nu, cu un nanostrat de oxid de siliciu, iar peste suprafața superioară sunt suprapuse pe rând, mai multe straturi ultimul alcătuit dintr-o proteina atașată la suprafața superioară și care are un grup funcțional care interacționează cu proteina ce urmează a fi identificată.

Metoda pentru detectarea unui compus din categoria agenților patogeni cuprinde determinarea unghiului de contact al apei (sau a unui alt lichid) cu aceste substraturi auto-asamblate nanostructurate, abordat într-o manieră nouă, printr-o prelucrare adecvată a imaginilor optice ale formei picăturilor de apă folosind un aparat disponibil comercial, care să permită evaluarea unghiurilor de avans și recesiune. Metoda se poate aplica în laboratoare de cercetare din domeniul virusologie, biologie moleculară, biofizică, fizică stării condensate, chimie de sinteză fină și macromoleculară sau în laboratoarele de analize medicale din spitalele județene și municipale, clinici particulare etc. Metoda are potențiale aplicații în medicina de laborator pentru trierea pacienților în vederea unor analize mai laborioase și costisitoare, precum și la obținerea de biosenzori cu aplicații, de exemplu, în protecția mediului.

În prezent, în țară, în laboratoarele de cercetare medicală și în laboratoarele de analize clinice sunt utilizate curent tehnicile de analiza imunoenzimatică, radiometrică sau prin



Director General
Dr. Lucian



imunofluorescență, care detectează antigene prin conjugarea cu un anticorp marcat enzimatic sau marcat cu cromogen, fluorogen sau radionuclid. Tehnicile de analiză imunologica implică examinarea directă prin microscopie, măsurători turbidimetrice, metode biochimice și serologice. Pentru obținerea rezultatului analizei se consuma timp îndelungat, tehnicile fiind laborioase. Tehnicile mai noi, care utilizează sonde nucleotidice (tehnica PCR, biosenzori etc.), au scăzut timpii de analiza la câteva ore. Dezavantajul acestor tehnici consta în necesitatea utilizării unor materiale de unica folosință scumpe și a unor aparate de citire care au preț de cost ridicat; în plus testele trebuie efectuate de personal înalt specializat.

Recent, pe plan internațional, a fost deschisa o direcție nouă de evidențiere a complexilor liganzi - receptori prin folosirea sensibilității orientării cristalelor lichide pe stratul de aliniere în prezenta liganzilor. Aceasta direcție se bazează pe proprietatea de amplificare a semnalului optic apărut ca urmare a interacțiunii ligand – receptor specific [1-4]. Tehnica de amplificare cu cristale lichide a fost patentată în diverse variante [5-9] sau este încă în stadiul de cercetare, căutându-se sistemele și condițiile optime pentru realizarea unei metodologii standardizate. Dezavantajul acestora constă în aceea că necesită aparatură sofisticată și costisitoare în toate etapele de preparare.

Straturile subțiri de oxid de siliciu SiOx care reprezintă sau nu primul strat depus pe plăcuțele de sticlă din dispozitivul propus au fost mult investigate și sunt folosite pentru obținerea filmelor intermediare dielectrice la semiconductori, la bariera de gaz, la protecția unor componente optice, și se cunosc mai multe metode de obținere (de ex. [10-13]).

Metoda pentru detectarea prezenței unor proteine care sunt anticorpi sau agenți patogeni pentru om sau animale este bazată pe determinarea unghiului de contact al apei pure deionizate depusă pe dispozitivul de nanosisteme de mai sus care să permită detectarea perturbațiilor rezultate în urma interacțiunilor specifice de tip ligand–receptor (antigen-anticorp).

În cadrul prezentei invenții este folosită metoda picăturii așezate. Este o metodă statică de echilibru, bazată pe studiul profilului picăturii și pe o teorie fizică exactă. Se știe că metodele de neechilibru, care implică o curgere a materialului pot influența alinierea fluidelor (în special anizotrope) la interfață și, prin urmare, pot influența valoarea mărimii interfaciale măsurate. Alte metode cunoscute pentru măsurarea unghiului de contact [14,15] sunt



următoarele: metoda dinamică a picăturii așezate, metoda dinamica Wilhelmy, aplicabila solidelor uniforme, necesita cunoașterea tensiunii superficiale a lichidului, metoda fibrei unice Wilhelmy și metoda unghiului de contact pe pulberi.

Studiul literaturii de specialitate a arătat că metoda picăturii așezate a fost îmbunătățită succesiv prin creșterea numărului de puncte folosite în calcule [16-18], prin tehnica de determinare a profilului picăturii [19]. La început, metoda a implicat folosirea valorilor a două diametre ale picăturii, apoi a mai multor diametre, dar precizia metodei nu s-a îmbunătățit semnificativ, datorită erorilor în localizarea primului diametru. O altă îmbunătățire constă în folosirea achiziției imaginii profilului picăturii cu o cameră video care a permis un număr mare de citiri ca și a folosirii unui program de calcul special realizat, ceea ce a condus la creșterea preciziei metodei la o valoare comparabilă cu cea dată de metodele standard de măsurare a tensiunii superficiale.

Analiza formei picăturii este o modalitate convenabila pentru a măsura tensiunea superficiala și unghiul de contact. Principalele presupuneri sunt următoarele:

- Picătura este simetrica fata de o axa verticala: deci este irelevanta direcția (in plan orizontal) din care aceasta este privita.
- Picătura este statica (nu este în mișcare), cu alte cuvinte vâscozitatea și inerția joaca un rol important în determinarea formei: aceasta înseamnă ca gravitația și tensiunea superficiala sunt singurele forte care modelează forma picăturii

Unghiul de contact este unghiul la care interfața lichid/vapori întâlnește suprafața solidului. Unghiul de contact este specific pentru orice sistem și este determinat de interacțiile la cele 3 interfețe. Cel mai adesea, conceptul este ilustrat de imaginea unei picături așezate pe o suprafața solida. în principiu, unghiul de contact al unei picături de lichid pe o suprafața solida este guvernat de echilibrul mecanic al unor tensiuni interfaciale (trei la număr), tensiunea superficiala lichid – vapori, γ_{lv} , tensiunea superficiala solid – vapori γ_{sv} și tensiunea superficiala solid – lichid γ_{sl} .

Pentru descrierea teoretica a unghiului de contact, consideram echilibrul termodinamic al celor 3 faze. La echilibru, potențialul chimic al celor 3 faze este egal. Folosim energiile interfaciale γ_{lv} , γ_{sv} și γ_{sl} . Energia lichid-vapor (tensiunea superficiala) este γ , și scriem ecuația care satisface echilibrul (cunoscuta ca ecuația Young) [20]:



$$\gamma_{LV} \cos \theta_Y = \gamma_{SV} - \gamma_{SL}$$

unde θ_Y este unghiul de contact Young, adică un unghi care poate fi inserat în ecuația lui Young. Deoarece numai γ_{LV} și θ_Y sunt cantități măsurabile, este necesară o relație suplimentară, obținută din abordări indirecte. Ar trebui precizat că doar unghiurile de contact experimentale pe suprafețe solide omogene și netede pot să aibă semnificație pentru determinarea tensiunilor superficiale ale solidelor în contextual ecuației lui Young [21].

O picătură care stă pe o suprafață solidă și e înconjurată de gaz formează un unghi de contact caracteristic.

Amintim cele două unghiuri importante, unghiul de avans θ_A , care are valoarea cea mai mare, și unghiul de recesiune θ_R , care are valoarea cea mai mică. Între aceste unghiuri există relații importante [22], care dau unghiul de contact de echilibru:

$$\theta_C = \arccos \frac{r_A \cos \theta_A + r_R \cos \theta_R}{r_A + r_R}$$

unde există notațiile

$$r_A = \sqrt[3]{\frac{\sin^3 \theta_A}{2 - 3 \cos \theta_A + \cos^3 \theta_A}}$$

și

$$r_R = \sqrt[3]{\frac{\sin^3 \theta_R}{2 - 3 \cos \theta_R + \cos^3 \theta_R}}$$

precum și energia interfacială ΔW_{SLV} :

$$\gamma(1 + \cos \theta_C) = \Delta W_{SLV}$$

cunoscută ca și ecuația Young-Dupre.

Dispozitivul folosit la detectarea prezenței unor agenți patogeni virali

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 (nano)straturi, incluzând în final o proteină cu un grup funcțional care interacționează specific cu proteina ce urmează să fie identificată constituită în proba biologică moleculară (vezi fig. 1).



Obținerea dispozitivului pentru detectarea prezenței unor agenți patogeni virali pornește de la plăcuțe subțiri de sticla (de grosime 1mm) disponibile comercial (de ex. Cole Parmer) ca plăcuțe pentru microscop. Acestea se aduc la dimensiunile 25x8x1mm prin zgâriere cu un vârf ascuțit și dur, de exemplu, diamantat, disponibil comercial. Urmează ruperea după linia zgâriată, curățarea și în apoi, depunerea cu nanostraturi specifice (fig. 1, substratul 1).

Curățarea avansată a plăcuțelor se asigură prin metoda umedă, care cuprinde o curățare "mecanică" prin frecarea plăcilor cu o bucată de țesătură înmuiată în soluție de detergent, ultrasonare la cald în soluție de detergent a plăcilor introduse într-un stativ din teflon, cu dimensiuni adecvate, care să nu permită atingerea plăcuțelor una de alta. Ultrasonarea se execută într-o baie de ultrasonare de ex. Ultramet II Sonic Cleaner (de la Buehler-Met) disponibilă comercial (unele mărci apar și în magazinele de menaj). Urmează o clătire îndelungată în apă curentă caldă, clătire prin ultrasonare la cald (90°C) în multă apă bidistilată (de câteva ori volumul stativului) și uscare în etuvă la 120°C.

Plăcuțele de sticla astfel curățate sunt mai departe tratate în plasmă de oxigen, la presiunea de 0.4 mBar timp de 30 minute, într-o instalație comercială de ex. 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).

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

- 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 [23] (fig. 1, stratul 3).

- Activarea suprafeței cu disuccinimidil suberat (DSS) (Pierce#68528803), care constă în tratare cu soluție 1mM de DSS în metanol anhidru timp de 1 h, cu agitare magnetică. Soluția 1mM de DSS a rezultat din diluarea cu metanol anhidru a unei soluții de DSS în dimetilsulfoxid [23]. Clătirea s-a făcut cu metanol și apoi, cu apa deionizată (fig. 1, stratul 4).

- Cuplarea suprafeței activate cu proteina cu grup funcțional, care interacționează specific cu proba biologică moleculară, de ex. cu Albumina Serică Bovină biotilată (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 +40C. Soluția de BSA-b (Pierce#29130) a fost preparată prin



dizolvare în amestec tampon fosfat salin (PBS) (Pierce#1890535), la pH 7.2 [23]. La sfârșitul reacției, plăcuțele se clătesc cu PBS (5 x10 s) și apa deionizată (2 x10 s), apoi se usucă în aer (fig. 1, stratul 5).

Alegerea albuminei serice biotinilate 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 avidina-biotina, aici în forma streptavidină - albumină serica biotinilată.

Grosimea fiecărui strat din dispozitivul multistrat de nanosisteme este dată de condițiile de depunere și incubare, dar în general straturile sunt de ordinul de mărime al monostraturilor.

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

Dispozitivul este conceput și în varianta în care pe suprafața plăcuței de sticlă, curățată așa cum se arată mai sus, se depune mai întâi un strat nanostructurat de oxid de siliciu. Astfel, după curățarea umedă următoare tăierii plăcuțelor de sticlă și după uscare, pe plăcuțe sunt depuse succesiv straturi de oxid de siliciu (SiOx) (fig. 2, stratul 2) prin evaporare oblică în vid la unghi de 60° cu normala la suprafața, folosind o instalație de depunere în vid (de minimum 10⁻⁵ Torr) disponibilă comercial, de ex. B30.2 (Hochvakuum Dresden) și oxid de siliciu (SiO) pur pentru acoperiri (minimum 99%) disponibil de asemenea, comercial (de ex. Balzers). Grosimea stratului de SiOx este de aproximativ 25 nm, ceea ce înseamnă un strat gros de aproximativ 25-50 nm la incidența normală, citit după o metoda dezvoltată în literatură [24].

Plăcuțele astfel depuse cu SiOx sunt mai departe tratate în plasmă de oxigen, ca mai sus, plăcuțele fără strat SiOx, ceea ce conduce la un strat hidrofilic (fig. 2, stratul 3).

Straturile următoare se depun prin imersare succesivă în soluțiile unor reactanți specifici, după cum a fost descris mai sus: silanizare cu APES (fig. 2, stratul 4), activarea suprafeței cu disuccinimidil suberat (fig. 2, stratul 5) și cuplarea suprafeței activate cu proteina cu grup funcțional specific (fig. 2, stratul 6).

Grosimea fiecărui strat din dispozitivul de nanosisteme este dată de condițiile de depunere și incubare, dar în general straturile sunt de ordinul de mărime al monostraturilor, așa cum s-a menționat mai sus.



Depozitarea plăcuțelor astfel obținute, pana la momentul măsurătorii unghiului de contact, s-a realizat într-o cutie de depozitare, cu atmosfera uscata cu silicagel, ca și în cazul variantei simple a plăcuțelor fără strat SiOx.

De menționat ca dimensiunea plăcuțelor a fost astfel aleasa incat sa fie suficient de mica, pentru a consuma o cantitate mica de reactivi la depunerile multistrat, dar suficient de mare pentru a putea repeta măsurătorile de unghi de contact pe același substrat.

Pregătirea dispozitivului pentru măsurători

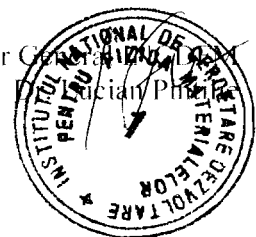
Dispozitivul ce conține ca strat superior proba biologica este cufundat timp de 1.5 ore, la temperatura camerei, în soluția de analizat, de ex. în soluție de Streptavidina (Pierce #21125) de concentrație 0.1 mg/ml, obținută prin dizolvare în amestec fosfat salin (PBS) pH 7.2. La sfârșitul reacției, plăcuțele se clătesc cu PBS (5 x10 s) și apă deionizată (2 x10 s), apoi se usucă în aer.

Metoda pentru detectarea prezenței unor agenți patogeni virali

Metoda pentru determinarea unghiului de contact se poate efectua cu orice instrument de tip goniometru, care este disponibil comercial, de exemplu un sistem de analiză a formei picăturilor DSA100 de la Krüger, care permite măsurători într-o incintă controlată, ce asigură păstrarea constantă a unor factori precum temperatura și umiditatea.

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 dinamica a creșterii volumului picăturii până la volumul maxim permis. Unghiul de contact de avans este unghiul de contact rămas constant deși diametrul picăturii a crescut. Volumul lichidului (apei) este apoi retras treptat, din picătura. În cazul în care se ajunge la volumul maxim care poate fi retras fără a reduce interfața solid/lichid, se măsoară unghiul numit unghi de recesiune.

Picătura de apă se depune pe suprafața superioară a dispozitivului (fig. 3) astfel încât imaginea ei sa fie captata de o camera de luat vederi (inclusa în goniometrul DSA100) și analizata cu programul inclus în software. Depunerea picăturii se efectuează printr-un tub capilar (de ex. cu diametru exterior de 0.51 mm).



Dimensiunea picăturii crește treptat și tot așa descrește. La început, picătura crește proporțional, așa încât unghiul de contact rămâne congruent. Datele acumulate la creștere oferă un set pentru mediere. Unghiul de recesiune poate fi evaluat dacă se prelucrează imaginile obținute prin micșorarea volumului picăturii.

Pentru calculul unghiului de contact, se aplica metoda numita „Tangenta 2” (în cazul software de la Krüss) care este bazată pe fitarea unei părți a profilului picăturii (partea de la punctul de întâlnire al celor 3 faze) cu o funcție ca cea de mai jos:

$$y = a + bx + cx^{0,5} + d/\ln x + e/x^2$$

unde x este variabila și a, b, c, \dots sunt parametri. Profilul picăturii este aproximat iterând valorile parametrilor. Derivata se calculează la punctul de întâlnire al celor 3 faze, pe linia de baza. Unghiul de contact este dat de direcția tangentei la curba care aproximează profilul picăturii în punctul de intersecție cu linia de contact. Metoda este sensibilă la distorsiunile din regiunea de contact, cauzate de “contaminanți” ai suprafeței.

Exemplul 1

Exemplul 1 este constituit din comportarea dispozitivului principal (plăcuță de sticlă fără strat de SiO_x, funcționalizată) 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.

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 recesiune 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 figura și tabel scăderea accentuată (de aprox. 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 aprox. 2.5%.

Tabelul 1. Unghiul de contact în funcție de compoziția stratului în dispozitivul principal

Sticla	APES	DSS	BSA-b	Streptavidi	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 – recesiune.

Exemplul 2

Exemplul 2 este constituit din comportarea variantei propuse pentru dispozitiv (plăcuță de sticla cu strat de SiOx, funcționalizată) atât în forma finala proteina cu grup funcțional specific cu BSA-b, cat și în formele intermediare, la măsurarea unghiului de contact prin metoda dinamică. De asemenea, este considerata și modificarea acestui unghi prin adăugarea unui strat de streptavidină care este modelul folosit pentru proba biologică de proteină a carei prezență trebuie detectată.

Fig. 5 redă dependența unghiului de contact de diametrul bazei picăturii, măsurat în unități arbitrare. Valoarea limita a acestui diametru corespunde la un volum maxim considerat pentru picătura de 3.5 microlitri.

Se observa 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 picătura. Valorile unghiurilor de avans și recesiune corespunzătoare acestor dependențe sunt



date în Tabelul 2. Aceste valori au suferit procesul de mediere, așa cum s-a menționat mai sus.

Tabelul 2. Unghiul de contact în funcție de compoziția stratului în varianta cu SiOx

SiOx nanostructurat	APES	DSS	BSA-b	Streptavidină	Unghi de contact*
X	X				A 64.4±1.1 /R 18.8±1.1
X	X	X			A 65.2±2.4 /R 23.9±1.3
X	X	X	X		A 68.83±3.83 /R 11.81±5.41
X	X	X		X	A 26.90±1.16 /R 11.14±1.58

* A-avans; R – recesiune.

Exista mai multe avantaje ale metodei:

- Calibrarea este simplă, în sensul că este necesară doar cunoașterea măririi optice. Aceasta poate fi efectuată cu precizie mare și pot fi folosite cu ușurința standarde metrologice.
- Suprafețele solide ale aparatului implicat nu au nevoie de cerințe speciale de curățenie pentru ca proprietățile lor de udare în sine nu afectează rezultatul. Acesta este un avantaj substanțial fata de metode, în care curățenia este necesara.
- Este o metodă rapidă, robustă și simplă;
- Unghiul de contact pe sticle este mic și suprafețele de sticla “contaminate” cu substanțe organice conduc la un unghi de contact mai mare, deci mai ușor de măsurat;
- Unghiul de contact este sensibil și la cantități mici de “contaminant”, de ordinul monostraturilor;
- Unghiul de contact se poate măsura fără cunoașterea teoriilor complicate care fundamentează măsurarea;
- Nu sunt necesare operații și operatori cu experiența în domeniu.
- Din punctul de vedere al proteinelor care interacționează, se pot găsi perechi cu mare grad de afinitate și specificitate



Legendele figurilor

Fig. 1. Schița ce reprezintă dispozitivul folosit la detectarea prezenței unor agenți patogeni virali, vedere din profil: 1- substrat din placa de sticla; 2- strat superior după tratament plasma 3- strat de APES; 4- strat de DSS; 5- strat de BSA. în figura nu exista proporționalitate între grosimile substratului și straturilor.

Fig. 2. Schița ce reprezintă o variantă a dispozitivului folosit la detectarea prezenței unor agenți patogeni virali, vedere din profil: 1- plăcuța de sticla; 2- strat SiOx; 3- strat SiOx după tratament plasma 4- strat de APES; 5- strat de DSS; 6- strat de BSA. În figura nu există proporționalitate între grosimile substratului și straturilor.

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

Fig. 4. Dependența unghiului de contact de diametrul bazei picăturii, în ciclul de măsurare. Straturile depuse pe plăcuța de sticlă se citesc în legendă.

Fig. 5. Dependența unghiului de contact de diametrul bazei picăturii, în ciclul de măsurare. Straturile depuse pe plăcuța de sticla se citesc în legendă.

Legendele tabelelor

Tabelul 1. Unghiul de contact în funcție de compoziția stratului în dispozitivul principal

Tabelul 2. Unghiul de contact în funcție de compoziția stratului în varianta cu SiOx a dispozitivului

BIBLIOGRAFIE

-
- [1] V.K. Gupta, J.J Skaife, T.B. Dubrovsky, N.L. Abbott, Science 279, 2077-2080 (1998).
 - [2] J.J Skaife, J.M. Brake, N.L. Abbott, Langmuir 17, 5448-5457 (2001).
 - [3] Y.-Y. Luk, M.L. Tingey, D.J. Hall, B.A. Israel, C.J. Murphy, P.J. Bertics, N.L. Abbott, Langmuir 19, 1671-1680 (2003).
 - [4] L.A. Tercero Espinoza, K.R. Schumann, Y.-Y. Luk, B.A. Israel, N.L. Abbott, Langmuir



-
- 20, 2375-2385 (2004).
- [5] N.L. Abbott, Scaife, Patent US 6288392 (2001).
- [6] N.L. Abbott, Patent US 0104612 (2007).
- [7] N.L. Abbott, R.R. Shah, Patent US 0110614 (2007).
- [8] J. T. Koberstein, P. Wang, F. Pan, Patent US 0134420 (2007).
- [9] N.L. Abbott, J.M. Bracke, Patent US 7125592 (2006).
- [10] S. Nozaki, K. Uchida, H. Morisaki, T. Kawasaki, M. Ibukiyama, Patent WO 035663 (2006).
- [11] D.E. Stevenson, L. Q. Zhou, R. L. Stearns, Patent WO 022275 (2007).
- [12] Y. Imamura, R. Nonogaki, Patent US 7.585.480 B2.
- [13] K. Yamamoto, Patent US 5517037 (1996).
- [14] Cipriano B.H., S.R. Raghavan, P.M. McGuiggan, Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 262, 8–13 (2005).
- [15] Shin J. Y. and N. L. Abbott, Langmuir, 15, 4404-4410 (1999).
- [16] A.W. Adamson, Physical Chemistry of Surfaces, Fifth Ed., New York, Wiley, 1990.
- [17] A.I. Rusanov, V.A. Prokhorov, Interfacial Tensiometry, Studies in Interface Science Series, D. Moebius and R. Hiller (Eds.), vol.3, Elsevier, Amsterdam, 1996.
- [18] A.W. Neumann, J.K. Spelt (Eds.), Applied Surface Thermodynamics, Surfactant Science Series, vol. 63, Marcel Dekker Inc., 1996.
- [19] J. Juza, Czech. J. Phys. 47, 351 (1997).
- [20] P. G. de Gennes, Rev. Mod. Phys. 57, 827-882 (1985).
- [21] D.Y. Kwok, A.W. Neumann, Adv. Colloid Interface Sci. 81 167-171 (1999).
- [22] R. Tadmor, Langmuir, 20, 7659-7664 (2004).
- [23] S.-R. Kim, R. R. Shah, and Nicholas L. Abbott, Anal. Chem. 72, 4646–4653 (2000).
- [24] R. Moldovan, T. Beica, S. Frunza, M. Tintaru, Mol. Cryst. Liq. Cryst. 329, 43-49 (1999).



REVENDICĂRI

1) **Metoda** pentru detectarea unui compus din categoria agenților patogeni care cuprinde determinarea unghiului de contact al apei cu substraturi nanostructurate, având în final o proteina cu grup funcțional care interacționează specific cu proteina ce urmează a fi identificată, constituite într-un dispozitiv. Determinarea unghiului de contact este abordată într-o manieră nouă, printr-o prelucrare adecvată a imaginilor optice ale formei picăturilor de apă folosind un aparat disponibil comercial, care să permită evaluarea unghiurilor de avans și recesiune.

2) **Dispozitivul** pentru detectarea a prezenței unor proteine care sunt anticorpi sau agenți patogeni pentru om sau animale asigură prin **elementele sale constructive** (depuneri multistrat) o variație predictibilă a unghiului de contact în prezenta agentului patogen față de cazul când acesta lipsește și permițând detectarea a prezenței unui astfel de agent. Acest dispozitiv este elementul cheie al invenției care permite dezvoltarea metodei.

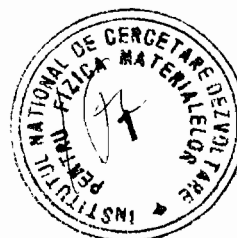
3) **Dispozitivul** multistrat (conform revendicării 2) este prezentat în **doua variante**. Dispozitivul principal conține straturi de (3-aminopropil)trietoxisilan (APES), disuccinimidil suberat (DSS) și proteina care interacționează specific depuse succesiv pe o plăcuța de sticlă. Varianta a doua prezintă o plăcuța de sticlă pe care sunt depuse un strat de SiOx nanostructurat, și apoi, straturile de APES, DSS și proteina care interacționează specific.

4) Curățarea plăcuțelor de sticlă ce intră în componența dispozitivului multistrat (conform revendicării 2) are loc prin spălare cu **agenți de spălare comuni**, și care nu necesită precauții speciale pentru protejarea persoanelor/mediului.

5) Prin **suprafața sa redusă**, dispozitivul (conform revendicării 2) este compatibil cu incinte de depunere a straturilor, de volum mic, care să permită un **consum mic de reactivi**.

6) Prin **suprafața sa**, dispozitivul (conform revendicării 2) este compatibil cu depunerea câtorva picături, care să permită **repetarea determinărilor**.

7) **Pregătirea dispozitivului** (conform revendicării 2) pentru maturatori consta în crearea pe suprafața superioară a unui exemplar din dispozitiv, a unui nou strat ce conține proteina de analizat, prin cufundarea dispozitivului în această soluție de analizat, iar la sfârșitul reacției, clătirea dispozitivului cu amestec tampon fosfat salin și apa deionizată, apoi uscarea în



aer.

8) **Metoda de determinare** a unghiului de contact (conform revendicării 1) care este specific pentru un sistem și este determinat de interacțiile la cele 3 interfețe, asigură **sensibilitatea determinărilor**, precum și corectitudinea interpretării valorilor găsite.

9) **Echipamentul** de măsură pentru aplicarea metodei de determinare a unghiului de contact (conform revendicării 1) este disponibil comercial. El se bazează pe analiză profilului/formei unei picături depuse pe substratul de interes. Achiziția imaginii profilului picăturii cu o cameră video a permis un număr mare de citiri. Existența unui program de calcul special realizat, a condus la îmbunătățirea preciziei metodei.

10) **Lichidul** al cărui unghi de contact se măsoară prin metoda (conform revendicării 1) este apa pura (bidistilată), adică un material foarte cunoscut, bine caracterizat și la îndemâna.

11) Metoda (conform revendicării 1) este **ușor de aplicat** și nu necesită operatori cu experiența mare în domeniul măsurătorilor.

12) Dispozitivul și metoda (conform revendicărilor 1 și 2) **necesită substanțe** care se găsesc în multe laboratoare și **aparatură** nu excesiv de scumpă și ușor de procurat.



DESENE EXPLICATIVE

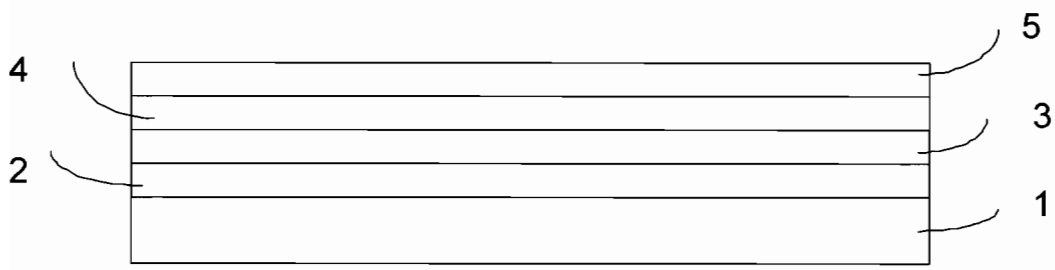


Figura 1

1



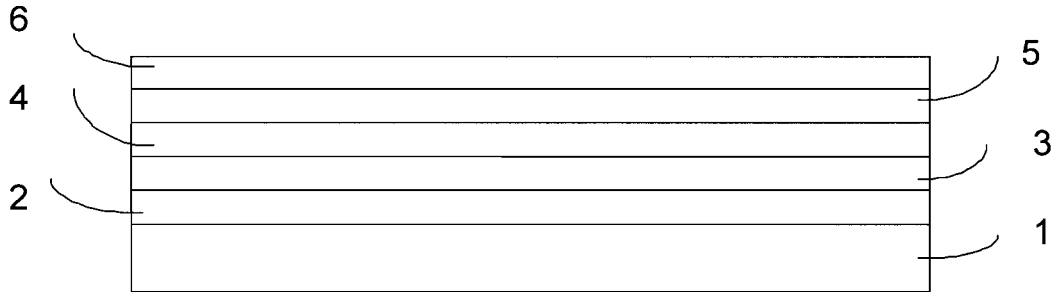


Figura 2



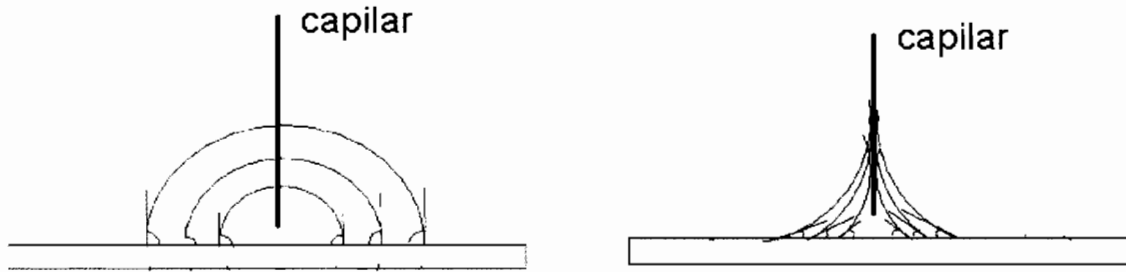


Figura 3



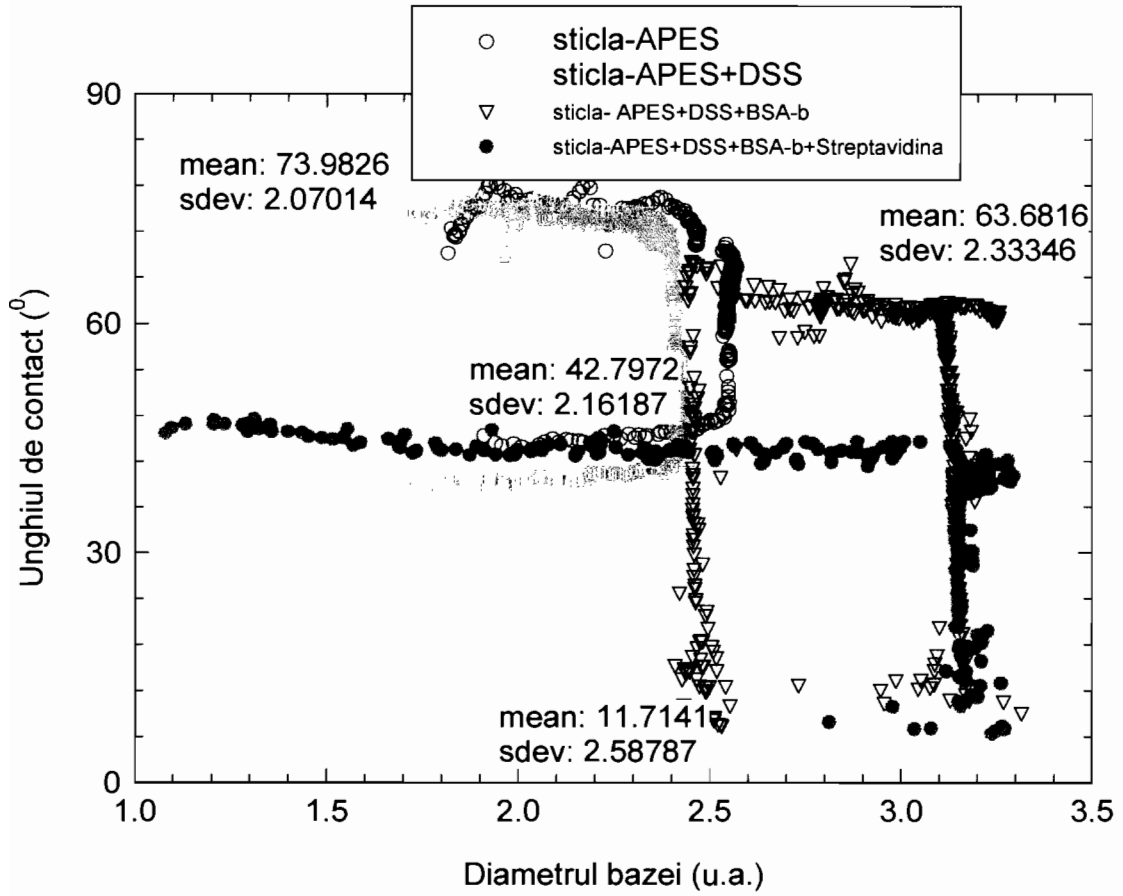


Figura 4



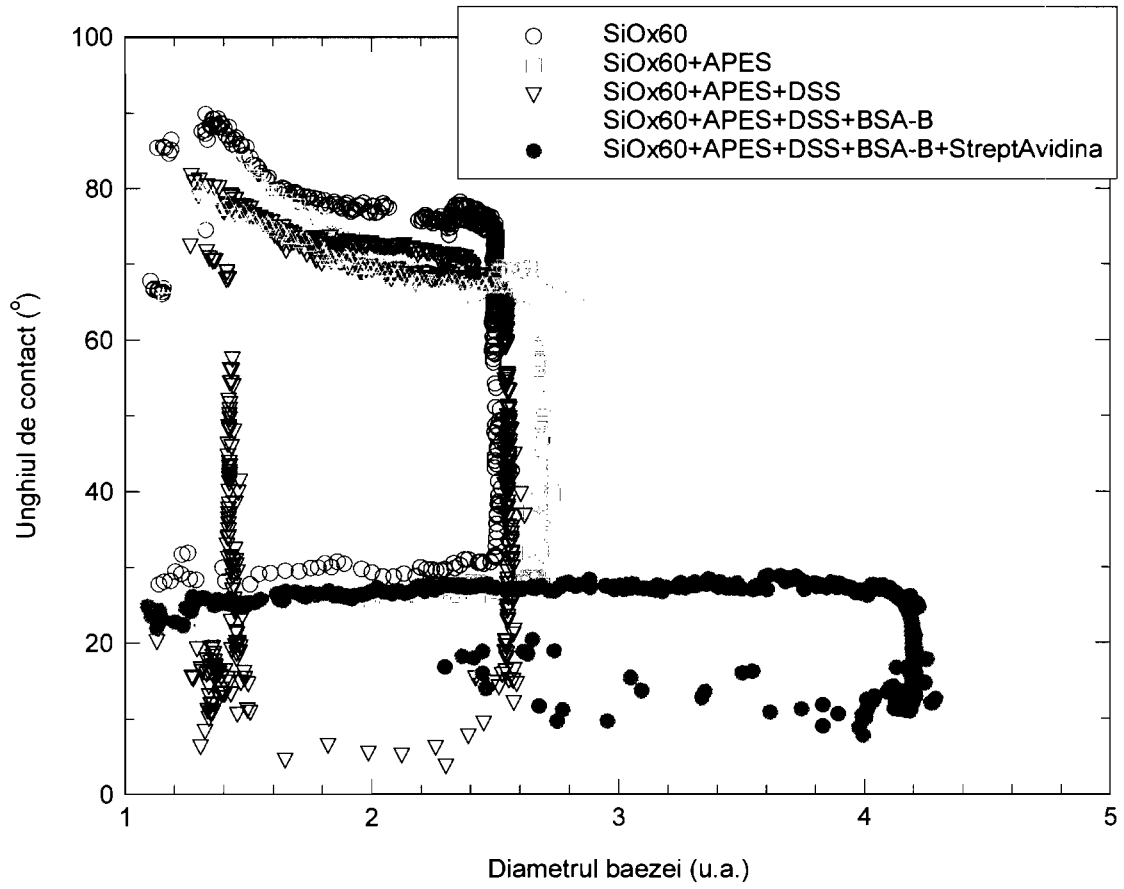


Figura 5

