

(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2009 00856

(22) Data de depozit: 23.10.2009

(41) Data publicării cererii:
29.07.2011 BOPi nr. 7/2011

(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 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

(54) ECHIPAMENT PENTRU DETERMINAREA VARIAȚIEI DE MASĂ ȘI A GROSIMII DE STRAT

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un echipament optoelectronic pentru determinarea variațiilor extrem de mici de masă și/sau grosime de strat activ biologic cu ajutorul rezonanței plasmonice de suprafață. Echipamentul conform invenției este alcătuit dintr-o prismă (1) optică, lipită prin intermediul unui strat subțire de ulei, cu indice de refracție ridicat, de o lamelă (2) din sticlă optică pe care este depus un strat (3) subțire din aur pur, iar pe acesta, un strat (4) subțire din material biologic activ, dintr-o sursă (9) de radiație monocromatică de tip diodă laser sau led, dintr-un detector (10) optoelectronic de tip Diode- Array, dintr-o unitate (11) electronică centrală și dintr-o unitate (12) de calcul. În cazul folosirii echipamentului pentru măsurători continue ale grosimii de strat, acesta este prevăzut cu o celulă (13) de curgere alimentată de o pompă (15) peristaltică, legată în bypass cu un recipient sau un reactor (14) care conține materialul biologic analizat.

Revendicări: 1

Figuri: 3

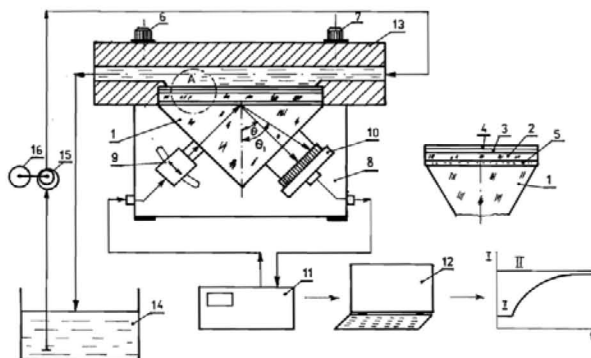
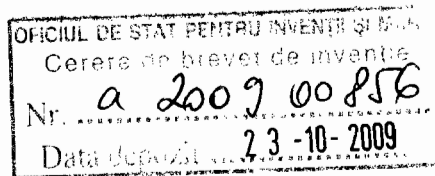


Fig. 3



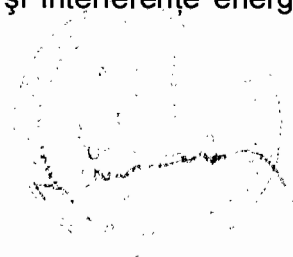


ECHIPAMENT PENTRU DETERMINAREA VARIAȚIEI DE MASĂ ȘI A GROSIMII DE STRAT

Invenția se referă la un echipament optoelectronic pentru determinarea variațiilor extrem de mici de masă și/sau de grosime activă de strat biologic cu ajutorul rezonanței plasmonice de suprafață și constituie o aplicație de biosenzor.

În vederea determinării modificărilor masice și implicit a grosimii filmelor în zona activă a biosenzorilor este folosită la ora actuală așa zisa "balanța piezoelectrică" bazată pe corelarea frecvenței de rezonanță a unei plăcuțe de cuarț, cu masa depusă pe cele două fețe plan paralele ale ei. Pe cele două fețe se găsește depus un strat subțire de aur, iar peste acesta o substanță biologic activă. La scufundarea într-un mediu biologic a plăcuței piezoelectrice, substanța activă de pe fețele plan paralele ale acesteia interacționează cu specia urmărită, cea din urmă fiind reținută pe cele două fețe ale plăcuței piezoelectrice pe care o îngreunează provocând o abatere a frecvenței de rezonanță de ordinul MHz pentru creșteri de masă de ordinul mg, ceea ce asigură o rezoluție finală și o limită de detecție foarte bună a metodei. Dezavantajul metodei balanței cu cristal de cuarț constă în prețul de cost relativ mare al piezo-oscilatoarelor aurite pe două fețe, acestea fiind elemente de uzură ele putând fi refolosite un număr limitat de ori, iar lipsa standardizării dimensionale a piezo-oscilatoarelor duce la dependența de anumiți producători și prin aceasta implicit la prețuri mari. La aceasta se mai adaugă faptul că piezosenzori sînt deosebit de sensibili la variații de temperatură, determinări exacte necesitînd termostatări avansate și scumpe, de asemenea nu pot fi utilizați ca detectori în celule de curgere pentru analiza continuă in by-pass deoarece traduc cele mai mici variații de presiune sau de debit în indicații eronate de variație de masă ale speciei urmărite.

Tot în scopul determinării grosimii filmelor în zona activă a biosenzorilor mai sînt folosite aparate și echipamente bazate pe rezonanța plasmonică de suprafață (SPR) ce permite măsurarea unor variații de masă în domeniul 10^{-15} g sau a unor grosimi de strat în domeniul nm. Tehnica folosirii rezonanței plasmonice de suprafață (SPR) pentru determinarea de creșteri de masă și de grosimi de strat este relativ simplă și constă în transmiterea unei radiații monocromatice, emisă de o diodă laser sau de un LED, perpendicular pe latura unei prisme echilaterale de sticlă, latură care este acoperită cu un strat foarte subțire de metal (zeci de nm), de regulă aur sau argint. Aceste metale au un nor de electroni liberi la suprafață denumiți plasmoni. Fotonii de iradiere ai radiației monocromatice interferă energetic cu acești electroni, iar dacă sînt îndeplinite condițiile rezonanței o parte din energia radiației monocromatice incidente este consumată pentru menținerea stării de rezonanță, radiației reflectate lipsindu-i această energie și ca atare ea se abate cu un anumit unghi de la valoarea unghiului normal de reflexie. Valoarea acestui unghi de refracție este direct proporțională cu intensitatea rezonanței plasmonice de suprafață. Rezonanța plasmonică de suprafață are efecte și interferențe energetice și pe



fața exterioară a metalului depus pe prismă prin așa numitul "cîmp evanescent", orice modificare de masă extrem de mică pe această față a prisme se reflectă în modificarea condițiilor de rezonanță și se manifestă prin deplasarea peak-urilor din poziția 1 în poziția 2, (fig. 1) deplasarea acestor peak-uri fiind proporțională cu creșterea de masă (de grosime de strat) pe suprafața exterioară a stratului metalic. Rezonanța plasmonică de suprafață are utilizări importante în bioanalitică în special ca senzori de afinitate în analiza de interacțiune biomoleculară fără markeri (BIA), pe suprafața stratului metalic pot fi imobilizați parteneri de legare foarte diferiți. În cazul clasic acesta este un anticorp orientat spre o anumită proteină pe care o leagă rezultînd produse ce provoacă creșteri masice pe suprafața metalizată a prisme, modificări care sînt sesizate prin fenomenul de rezonanță plasmonică care se materializează în modificări ale unghiului de refracție al unei radiații monocromatice incidente în funcție de masa speciei ce s-a depus pe suprafața exterioară a metalului de pe prismă. Spre deosebire de piezobalanță, aplicația rezonanței plasmonice de suprafață poate fi extinsă și la celule de curgere cu ajutorul ei putîndu-se urmări cinetica diferitelor aplicații biochimice. În cazul unor măsurări unice expresiile grafice se prezintă sub forma unor reprezentări în coordonate: unități ale intensității radiației reflectate (URI) în funcție de unghiul de refracție (θ), iar în cazul unor fenomene dinamice, măsurate prin intermediul unor celule de curgere, expresiile grafice se prezintă sub forma unor reprezentări în coordonate, unități ale intensității radiației reflectate (URI) în funcție de timpul (t). Dezavantajul pe care-l prezintă acest procedeu îl constituie faptul că activarea suprafeței prisme cu un ligand specific este greoaie, operația necesită de regulă demontarea urmată de timpi de uscare care duc la scăderea productivității procesului. De asemenea, uzura cauzată stratului de aur cu ocazia acestor manipulări duce după un timp la necesitatea remetalizării în vacuum a suprafeței prisme, operație care este scumpă și greoaie.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în realizarea unui echipament care permite pe baza măsurării rezonanței plasmonice de suprafață (SPR) determinarea rapidă și precisă a creșterii grosimii de strat la măsurări succesive independente sau care permite determinarea continuă a grosimii de strat atunci cînd pe el este montată o celulă de curgere. În scopul materializării invenției este folosită o structură modificată a aparatului clasic de rezonanță plasmonică de suprafață, astfel:

- în loc ca aurirea să fie realizată pe o față a unei prisme optice aceasta se realizează pe una din fețele plan paralele ale mai multor lamele din sticlă optică, lamele ce au suprafața aurită egală cu cea a unei laturi a prisme. În funcție de situațiile analitice concrete, partea aurită a lamelor se tratează cu același sau cu mai mulți liganzi biologici specifici după care sînt fixate pe rînd pe prisma de măsurare folosindu-se pentru cuplarea optică un ulei cu indice de refracție mare.

- în locul unui goniometru electronic de mare precizie echipat cu detector optic singular, specific aparatelor clasice, ce are ca sarcină căutarea manuală a unghiului de refracție obținut ca urmare a modificării rezonanței plasmonice de suprafață, este folosit un detector optoelectronic de tip diode-array care

determină indicele de refracție instantaneu, fără căutare unghiulară, cu o rezoluție foarte mare.

Din montajul experimental pentru măsurători succesive și independente fac parte o sursă de radiație monocromatică de tip diodă laser sau LED prevăzut cu un sistem de rotație fără divizare unghiulară, un detector optic de tip diode-array și o unitate de calcul cu un program de achiziție și prelucrarea datelor, iar la măsurători continue în by-pass mai este folosită suplimentar o pompă peristaltică, o celulă de curgere și furtunuri siliconice transparente cu diametru interior mic.

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- folosirea unor plăcuțe de sticlă optică cu fețe plan paralele, din care o față este aurită, fixate pe o prismă de sticlă cu un material lichid transparent cu indice de refracție mare dă posibilitatea folosirii succesive și rapide a mai multor lamele pregătite în prealabil cu material biologic și prin această crește mult productivitatea procesului de analiză.
- evitarea auririi directe a suprafeței prisme scade costurile și timpii morți datorati nefolosirii acesteia în timpul procesului de aurire și crește totodată durata de viață a prisme optice.
- face posibilă folosirea aceleiași echipări a prisme atât la măsurători succesive independente cât și la măsurători in-situ continue, în regim de by - pass.
- folosirea unui detector optoelectronic de tip diode-array în locul unui fotodetector monocelular montat pe un sistem goniometric de precizie duce la eliminarea celui din urmă al cărui preț reprezintă cca 2/3 din prețul unui aparat actual de rezonanță plasmonică de suprafață. În plus un detector diode-array face posibilă preluarea instantanee a tuturor unghiurilor de refracție eliminând timpii necesari pentru căutarea și măsurarea unghiului de refracție. De asemenea, detectorul de tip diode-array face posibilă urmărirea automată a unor cinetici chimice sau chimico-biologice.

Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției în legătura cu figura 1, figura 2 și figura 3 care reprezintă :

Fig.1 - Schema de principiu a fenomenului rezonanței plasmonice de suprafață

Fig.2 - Schema de principiu la folosirea echipamentului pentru determinarea variației de masă la măsurători succesive independente pe baza rezonanței plasmonice de suprafață

Fig.3 - Schema de principiu la folosirea echipamentului pentru determinarea variației de masă la măsurători continue în regim de by-pass pe baza rezonanței plasmonice de suprafață

Echipamentul, conform figurii 2, pentru determinarea masei (sau a grosimii de strat) sau a urmării variației acestor mărimi în timp este format dintr-o prismă 1 din sticlă optică, o lamela 2 din sticlă optică avînd o depunere 3 de aur subțire de înaltă puritate pe una din fețe, un strat 4 biologic activ depus pe stratul de aur, un strat 5 subțire de ulei special cu indice de refracție ridicat folosit pentru cuplarea prisme cu lamela de sticlă, un sistem 6 și 7 de



strângere, un corp **8**, o sursă **9** de radiație monocromatică de tip diodă laser sau LED, un detector **10** optoelectronic de tip diode-array pentru măsurarea unghiului de refracție θ , o unitate **11** electronică centrală, și o unitate **12** de calcul ce dispune de un soft specific pentru achiziția și prelucrarea datelor.

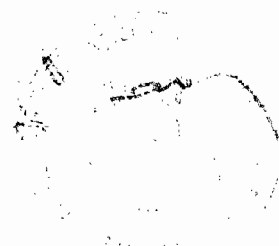
Echipamentul pentru determinarea variației grosimii de strat, conform figurii 3, este format dintr-o prismă **1** optică din sticlă, o lamela **2** optică avînd o depunere **3** de aur subțire de înaltă puritate pe una din fețe, un strat **4** biologic activ depus pe stratul de aur, un strat **5** subțire de ulei special cu indice de refracție ridicat, un sistem **6 și 7** de strângere cu colier, un corp **8**, o sursă **9** de radiație monocromatică de tip diodă laser sau LED, un detector **10** optoelectronic de tip diode-array pentru măsurarea unghiului de refracție θ , o unitate **11** electronică centrală, o unitate **12** de calcul, o celulă **13** de curgere, un recipient sau reactor **14** cu speciile biologice urmărite, o pompă **15** peristaltică acționată cu un motor **16** electric.



23-10-2009

REVENDICARE

Invenția Echipament pentru determinarea variației masei și a grosimii de strat, caracterizată prin aceea că în vederea măsurării creșterii de masă sau de grosime de strat activ la biosenzori este folosită o structură bazată pe fenomenul de rezonanță plasmonică de suprafață, compusă dintr-o prismă (1) optică lipită prin intermediul unui strat (5) subțire de ulei, cu indice de refracție ridicat, de o lamelă (2) din sticlă optică pe care este depus un strat (3) subțire din aur pur, iar pe acesta un strat (4) subțire din material biologic activ, în compunerea echipamentului mai intră o sursă (9) de radiație monocromatică de tip diodă laser sau LED, un detector (10) optoelectronic de tip diode-array pentru măsurarea unghiului de refracție, o unitate (11) electronică centrală și o unitate (12) de calcul, iar în cazul folosirii structurii pentru măsurări continue a grosimii de strat pe echipamentul descris este montată o celulă (13) de curgere alimentată de o pompă (15) peristaltică legată în by-pass cu un recipient sau reactor (14) ce conține materialul biologic analizat.



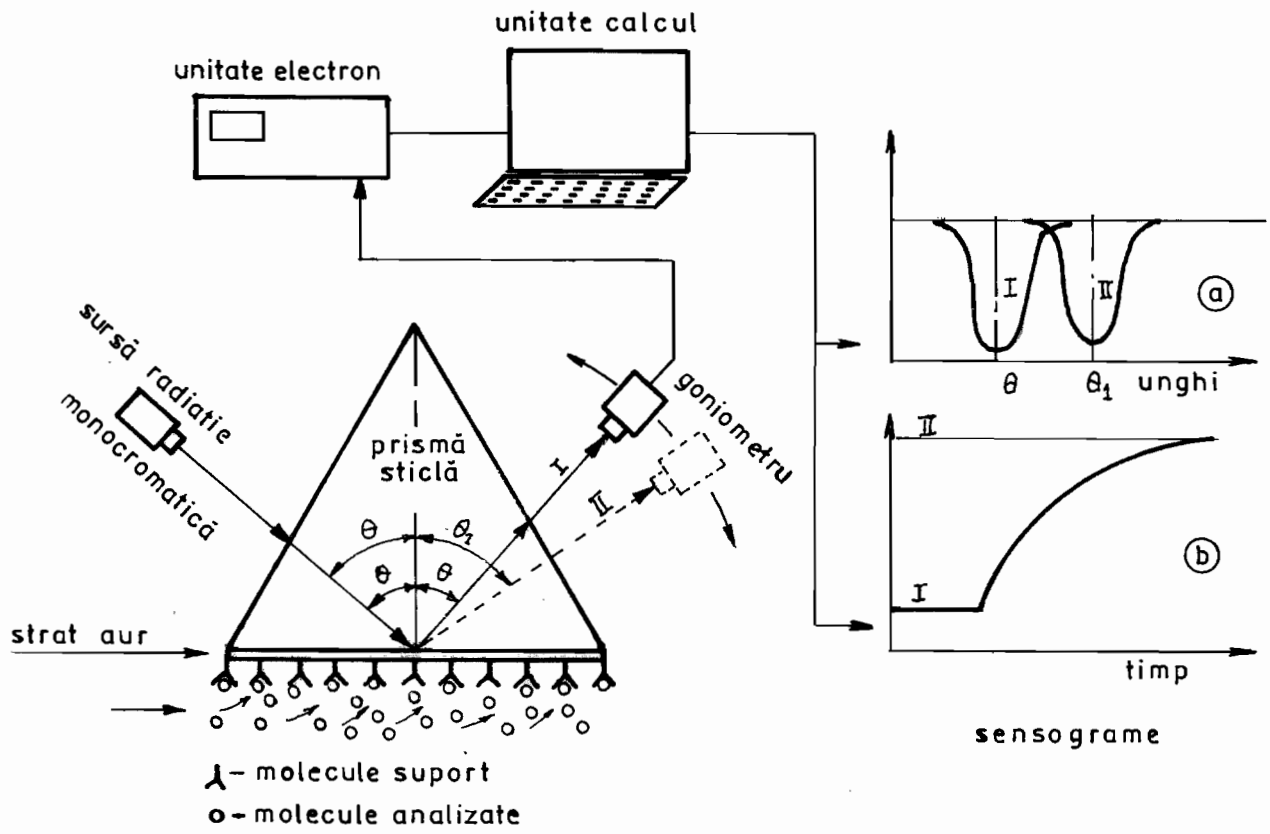
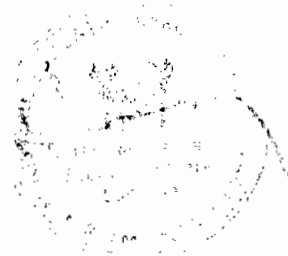


FIG. 1



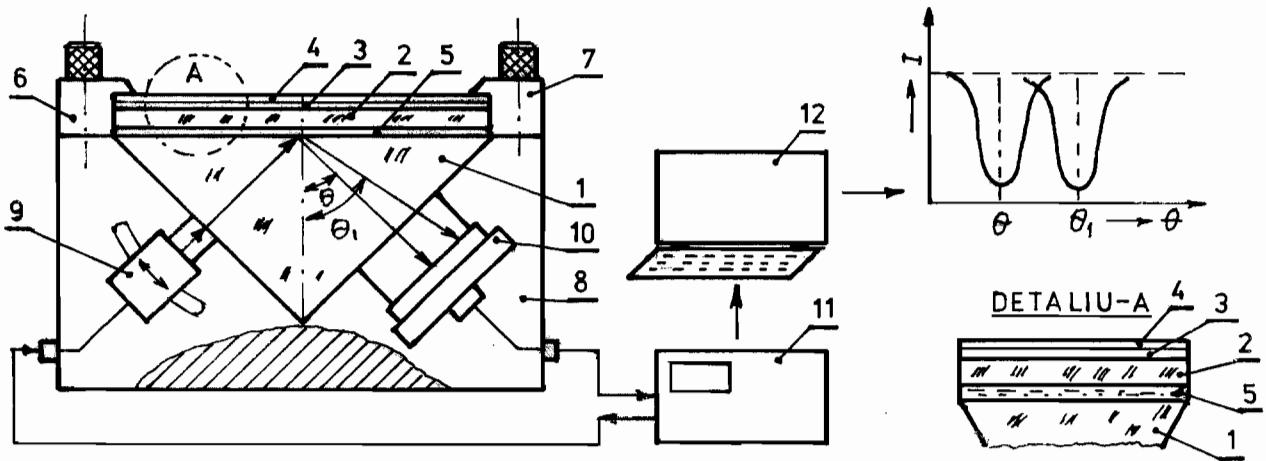


FIG.2



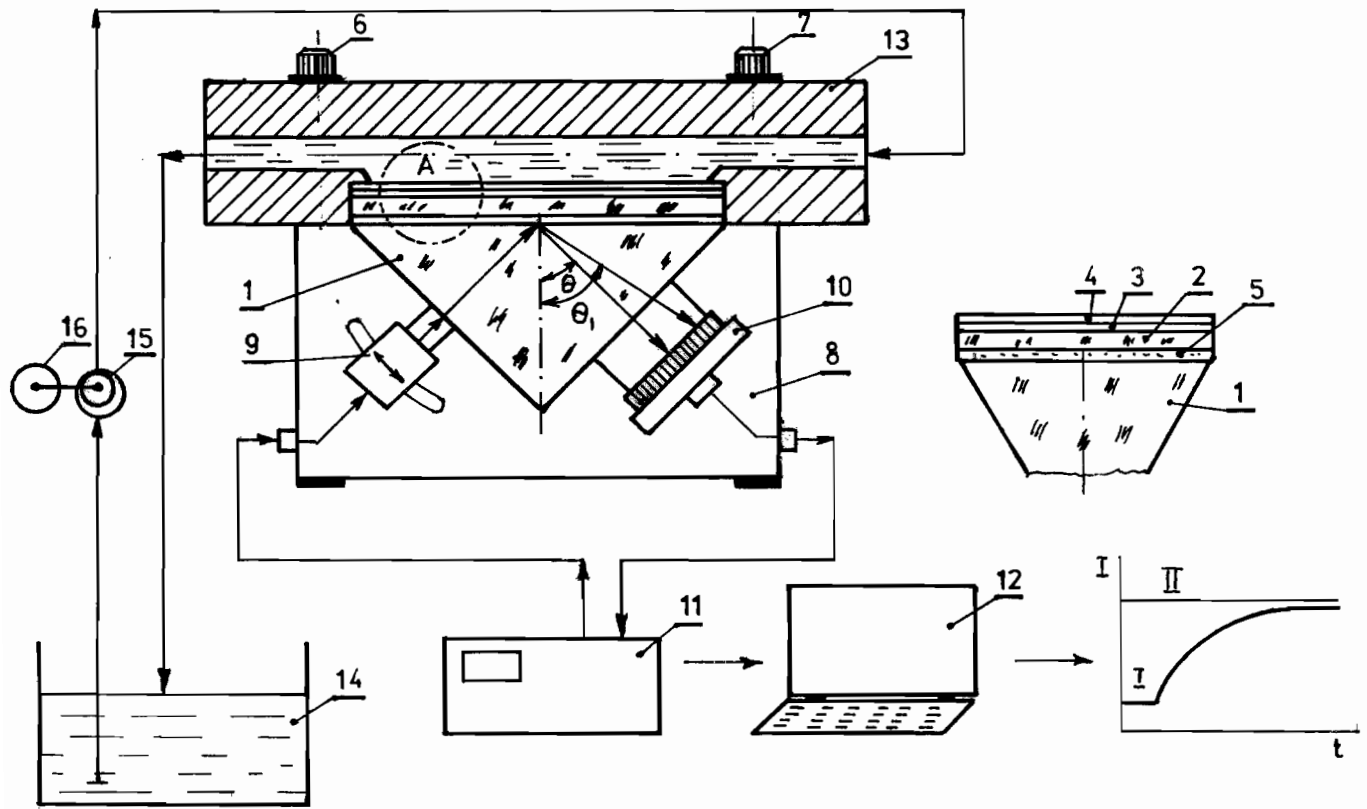


FIG. 3

