



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2011 00136

(22) Data de depozit: 16.02.2011

(41) Data publicării cererii:
28.09.2012 BOPI nr. 9/2012

(71) Solicitant:
• CENTRUL INTERNAȚIONAL DE
BIODINAMICĂ,
INTRAREA PORTOCALELOR NR. 1B,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• GHEORGHIU EUGEN, BD. UNIRII NR. 12,
BL. 7 C, AP. 18, SECTOR 4, BUCUREȘTI,
B, RO

(54) METODĂ DE DETERMINARE A CONCENTRAȚIEI UNOR
ANALIȚI PRIN APLICAREA CONTROLATĂ A UNUI STIMUL
PERIODIC

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de detecție și de determinare a concentrației unor analiți de interes într-un fluid, destinată unor aplicații în controlul calității mediului, industria alimentară, farmaceutică, biotehnologie sau medicină. Metoda conform invenției constă din aplicarea anumitor câmpuri electrice, magnetice, mecanice, optice asupra unor constituenți dintr-un compartiment analitic, unde constituenții constau dintr-o probă de analizat și/sau o suspensie care conține particule indicatoare, și pot fi: analiți, structuri alcătuite din analiți și compuși legați afin de aceștia, sau compuși cu rol indicator, legați afin de un senzor, urmată de o etapă de monitorizare a oscilațiilor constituenților din compartimentul analitic, ca urmare a condițiilor aplicate, monitorizare realizată prin intermediul unor metode electrice, ca, de exemplu, prin măsurarea impedanței, și/sau optice, ca, de exemplu, prin rezonanța plasmonilor de suprafață, determinându-se parametrii utili, iar în final se determină prezența sau concentrația de analit din probă utilizând curbe de calibrare determinate în prealabil din analiza unor probe cu concentrații cunoscute de analiți.

Revendicări: 4
Figuri: 3

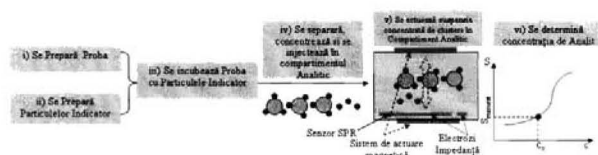


Fig. 1

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).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 2011 cu 32
Data depozit 16-02-2011

18

Metodă de detecție și de determinare a concentrației unor analiți prin aplicarea controlată a unui stimul periodic

DESCRIERE

Invenția se referă la o metodă de detecție și de determinare a concentrației unor analiți de interes într-un fluid (ex lichid) fiind destinată unor aplicații în controlul calității mediului, industria alimentară, farmaceutică, biotehnologie sau medicină.

Sunt cunoscute metode analitice optice (ex. Rezonanța Plasmonilor de Suprafață - SPR) sau electrice (bazate pe măsurători de impedanță) de detectare a prezenței, sau determinare a concentrației unor compuși într-o soluție de interes care se bazează pe principiile de recunoaștere specifică de tipul ligand – receptor. Deși răspund parțial cerințelor de sensibilitate, aceste metode se bucură de un interes deosebit pentru faptul că se pretează la automatizare și permit detecția specifică a analiților dintr-o gamă diversă de domenii aplicative, de la industria alimentară la medicină

În categoria analiților țintă se înscriu compuși cu dimensiuni, compoziție și structură diferită, de la molecule cu masă moleculară mică, până la celule patogene. Fiecare tip de analit impune abordări diferite:

Astfel, United States, US Patent 7718355 prezintă o metodă de detecție în timp real a micro-organismelor patogene utilizând un biosenzor SPR modificat în flux care constă în:

- a) o etapă volumică (în șarjă) de reacție imună realizată între micro-organismul patogen și un anticorp specific, urmată de
- b) separarea selectivă a micro-organismelor patogene legate de anticorp;
- c) legarea în flux de suprafața senzorului SPR a micro-organismelor patogene.

O altă metodă de detecție a micro-organismelor patogene folosind determinări de impedanță, prin utilizarea de anticorpi, este prezentată în US Patent (Application) 20020076690. Brevetul respectiv descrie o metoda de detecție a prezenței patogenilor atașați de particule acoperite cu anticorpi, prin măsurători de impedanță care constă în injecția probei (susceptibilă să conțină patogeni) într-un sistem cu (micro)fluidică. Circulând în imediata vecinătate a unor electrozi interdigitați, pe suprafața cărora au fost imobilizați anticorpi, patogenii se pot lega de anticorpii respectivi, caz în care se modifică impedanța electrozilor, modificare utilizată pentru detectarea prezenței patogenilor. Pentru a amplifica semnalul, după introducerea probei se injectează o suspensie cu particule acoperite cu aceiași anticorpi care se vor lega de patogenii captați specific pe senzor, determinând o modificare suplimentară a impedanței măsurate între electrozi alăturați.

Pentru analiza compușilor de masă moleculară mică amintim:

- Brevetul US 5641640 care prezintă o metodă de determinare a prezenței analitului într-o probă lichidă prin SPR, respectiv prin analiza modificărilor datorate variației indicelui de refracție de la nivelul unei suprafețe optice solide în contact cu proba. Schimbarea este cauzată de legarea specifică a analitului. Variația indicelui de refracție este dependentă atât de cantitatea de analit legat la suprafața senzorului, cât și de lungimea de undă. Conform invenției, metoda constă în determinarea variației cu lungimea de undă a indicelui de refracție rezultat datorită legării sau dezlegării compusului la nivelul suprafeței senzorului. Această variație este reprezentativă pentru cantitatea de analit din probă.
- Brevetul US 7678256 care prezintă o metodă de determinare a prezenței a cel puțin unei specii de analit folosind măsuratori de impedanță în microcanale. Determinarea de analiți în probe lichide se bazează pe concentrarea analitului în zona de măsură folosind dielectroforeza și detectarea analitului prin măsurători de impedanță.

Dezavantajul major al soluțiilor prezentate constă în sensibilitatea limitată a acestor abordări care se bazează exclusiv pe diferența semnalelor (SPR sau de impedanță) dintre nivelul corespunzător analitului legat de senzor și cel premergător injectiei probei, semnal inerent mic. Sensibilitatea scăzută face necesară apelarea la o etapă preliminară de concentrare, care de regulă este costisitoare (presupune reactivi și echipamente specializate) și este de durată; în cazul micro-organismelor patogene etapa de cultivare depășește de cele mai multe ori 24 de ore.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în creșterea sensibilității și obținerea unei limite de detecție corespunzătoare unor concentrații mici ale analiților țintă, fără să fie nevoie de etape suplimentare de preconcentrare/cultivare micro-biologică, prin actuaarea periodică a compușilor aflați în compartimentul de măsură prevăzut cu senzori pentru analize optice (ex. SPR) sau/și electrochimice (ex. impedanța).

Invenția descrie o metodă de detecție și de determinare a concentrației unor analiți într-un fluid (ex. mediu lichid), respectiv a unor compuși ex. celule, proteine, antibiotice, catene ADN, pentru care există parteneri afini (anticorpi, aptameri etc).

Metoda are la bază analiza amplitudinii, sau/si fazei cu care variaza un parametru electric ex. partea reală, sau imaginara (sau o funcție de acestea) a impedanței la o anumită frecvență și/sau un parametru optic (ex. unghiul pentru care apare minimul reflectivității, pentru analize SPR) la aplicarea unei acțiuni periodice.

Prezența unui analit țintă influențează oscilația rezultată în urma actuării, analiza parametrilor caracteristici oscilației permițând determinarea concentrației analitului țintă. Compuși cu relevanță pentru metoda analitică prezentată pot fi:

- analiții țintă (de care pot fi legate particule cu rol fie în actuare, fie în creșterea diferenței de semnal corespunzătoare celor două nivele extreme ale oscilației), în cazul celulelor (micro-organismelor) patogene;
- particule indicatoare legate de suprafața senzorului în zone complementare celor în care s-a legat în prealabil analitul țintă (ex. pentru determinarea concentrației analiților cu masă moleculară redusă);
- particule indicatoare legate de catena complementară, în cazul în care analitul țintă îl reprezintă o anumită catenă de ADN.

Semnalele utile se obțin prin monitorizarea modificărilor proprietăților ex. electrice, sau/ și optice aferente variațiilor datorate modificărilor unor parametri (ex: electrici, optici, de poziție, de deformare, sau/și de legare specifică) cauzate de aplicarea unei actuări asupra compușilor din compartimentul analitic. Măsurătorile se fac prin intermediul unor senzori (ex. electrozi modificați) care trebuie să fie compatibili cu metodele analitice respective. Astfel, pentru măsurătorile de impedanță (electrice) este necesară cel puțin o pereche de electrozi a căror configurație (formă, dimensiune, poziționare) să permită obținerea unui semnal cât mai sensibil. Electrozii corespunzători măsurătorii de impedanță pot fi distincți sau unul dintre ei poate fi comun cu suprafața cu proprietăți plasmonice utilizată pentru analize SPR.

Cunoașterea parametrilor la care se face actuarea permite amplificarea selectivă a semnalului util (aferent deplasării, sau/și deformării analiților țintă ex. celulele) cu multe ordine de mărime. De remarcat că astfel pot fi evidențiate semnale relativ mici, chiar sub nivelul de zgomot, corespunzătoare variației proprietăților electrice și optice aferente pozițiilor extreme determinate de actuare.

Metoda conform invenției constă în prepararea (funcționalizarea) elementelor senzorstice, sau de recunoaștere specifică, prepararea probei pentru a fi introdusă (în stare lichidă) în compartimentul analitic, injectarea în compartimentul analitic a probei, sau/și după caz, a suspensiei concentrate care conține particule indicatoare, alegerea parametrilor optimi de actuare și aplicarea actuării care să conducă la modificări periodice ale unor parametri (ex: electrici, optici, de poziție, de deformare, sau/și de legare specifică) ai constituenților din compartimentul analitic, monitorizarea efectului actuării asupra constituenților din compartimentul analitic, prin intermediul unor parametri ex. electrici (impedanța) și/sau optici

(SPR), cu determinarea parametrilor utili, detecția analitului și determinarea concentrației de analit în baza curbelor de calibrare aferente aceluiași analize aplicate unor probe cu concentrații cunoscute de analiți. Constituții din compartimentul analitic, pot fi analiți țintă, sau structuri alcătuite din analiți și compuși legați afin de aceștia.

Avantajele principale ale metodei constau în:

- sensibilitate crescută, ceea ce permite determinarea unor concentrații minime foarte mici ale analitului țintă, fără să fie nevoie de etape suplimentare de preconcentrare/cultivare micro-biologică;
- timp scurt de analiză, rezultatul se obține în una-două ore;
- modulele de actare și de analiză pot fi aceleași pentru întreaga plajă de analiți, de la celule la compuși cu masă moleculară mică sau catene ADN.
- sistemele implicate în realizarea determinărilor (pregătire a probei, microfluidică, actare și analiză) nu sunt costisitoare și nu presupun personal specializat;

Se prezintă în continuare trei posibile exemple de aplicare a acestei metode (care nu limitează domeniul ei de aplicare) și în legătură cu fig.1-3 care reprezintă:

Figura 1 - Schema de detecție și de determinare a concentrației unor micro-organisme (celule) patogene;

Figura 2 - Schema de detecție și de determinare a concentrației unor analiți cu masă moleculară mică (ex. toxine);

Figura 3- Schema de detecție și de determinare a concentrației unor catene ADN prin monitorizarea reacției de hibridizare;

Metoda se bazează pe monitorizarea variațiilor datorate modificărilor unor parametri (ex: electrici, optici, de poziție, de deformare, sau/și de legare specifică) cauzate de aplicarea unei acțiuni (electrice, magnetice, mecanice, optice etc) asupra compușilor din compartimentul analitic. Aceste variații pot corespunde unor parametri optici (ex.: corespunzători Rezonanței Plasmonilor de Suprafață, SPR), sau/și electrici (ex.: corespunzători impedanței la o frecvență specifică).

Monitorizarea semnalelor (ex. optice și electrice) cauzate de aplicarea acțiunii se realizează la nivelul unui compartiment (platformă) analitic unic în care este integrat un sistem de microfluidică care, de exemplu, cuprinde o cuvă prevăzută cu un senzor ex. SPR și cel puțin o pereche de senzori (electrozi) pentru analize electrice, electrochimice (ex. de impedanță).

Modulul de actare poate fi același indiferent de tipul analitului care se dorește să fie determinat. Condițiile de actare, respectiv: câmpul aplicat (ex. magnetic, electric, optic,

mecanic), precum și parametrii de actuare: frecvența, profilul evoluției intensității, pozițiile limită sunt întotdeauna cunoscute și controlate.

În vederea detecției și determinării concentrației unor analiți, metoda prevede parcurgerea următoarelor etape, în ordine cronologică:

- 1) Se prepară (funcționalizează) elementele senzorstice sau de recunoaștere specifică, respectiv:
 - a. se imobilizează elemente de recunoaștere afină pe suprafața unor particule indicatoare;
 - b. se prepară (funcționalizează) suprafața senzorilor din compartimentul analitic, realizându-se, după caz:
 - i. imobilizarea unor compuși care conțin elemente afine care, în funcție de tipul de analit țintă, pot avea legate particule indicatoare (la capătul opus senzorului);
 - ii. pasivarea acestora (pentru împiedicarea oricărei adsorbții) în cazul în care recunoașterea specifică a analitului se face prin incubarea probei cu particule indicatoare, în etapa de preparare a probei;
- 2) Se prepară proba pentru a fi introdusă, în stare lichidă în compartimentul analitic, după caz: direct, sau după incubare cu particule indicatoare;
- 3) Se injectează în compartimentul analitic proba, sau/și după caz, o suspensie concentrată care conține particule indicatoare;
- 4) Se stabilesc condițiile de actuare, respectiv: câmpul aplicat (ex. magnetic, electric, optic, mecanic etc), precum și parametrii de actuare, ex. frecvența, profilul evoluției intensității, pozițiile limită și se aplică actuarea care să conducă la modificări măsurabile, de regulă periodice, ale unor parametri (ex: electrici, optici, de poziție, de deformare), sau/și după caz, la eficientizarea legării afine, cauzate de aplicarea actuării asupra constituenților din compartimentul analitic: analiți, sau structuri alcătuite din analiți și compuși legați afin de aceștia, sau compuși cu rol indicator legați afin de senzor;
- 5) Se monitorizează semnalele (ex. optice și electrice) cauzate de aplicarea actuării asupra constituenților din compartimentul analitic prin intermediul unor parametri ce pot fi

electrici (impedanța) și/sau optici (SPR) determinându-se parametrii utili (ex. amplitudine și defazaj față de sistemul de actuare);

- 6) Se determină concentrația de analit utilizând curbe de calibrare determinate în prealabil din analiza unor probe cu concentrații cunoscute de analiți. Detecția, respectiv semnalarea prezenței analitului, indică faptul că analitul se găsește în probă la o concentrație cel puțin egală cu concentrația minimă (ce corespunde limitei de detecție a metodei).

În cele ce urmează se prezintă trei posibile exemple de aplicare ale acestei metode, care nu sunt limitative, după cum urmează:

A. Pentru detecția și determinarea concentrației unor analiți cu masa moleculară mare, de tipul: agregate, particule, sau micro-organisme așa cum este reprezentat în fig. 1 se parcurg următoarele etape:

- 1) se funcționalizează (prepară) particule indicatoare (ex. particule super-paramagnetice) imobilizându-se pe suprafața acestora compuși afini (ex. anticorpi sau aptameri) specifici analitului țintă (care se dorește să fie detectat);

- 2) se prepară proba susceptibilă să conțină analiți țintă prin aducere în stare lichidă și se incubează împreună cu o suspensie cu concentrație optimă de particule indicatoare care au imobilizate pe suprafața lor compuși care se pot lega specific de analitul țintă;

- 3) se extrage din compartimentul de incubare, se concentrează și se injectează în compartimentul analitic, suspensia în care se află clustere de analiți și particulele indicatoare, precum și (după caz) o cantitate reziduală de particule indicatoare nelegate de analiți; se poate considera o etapă de separare care să elimine din volumul care va fi analizat cantitatea de particule indicatoare nelegate de analiți;

- 4) se stabilesc condițiile de actuare, respectiv: câmpul aplicat (ex. magnetic, electric, optic, mecanic etc), precum și parametrii de actuare, ex. frecvența, profilul evoluției intensității, pozițiile limită și se aplică actuarea (cu ajutorul modulului cu acest rol) care conduce la modificări măsurabile ale unor parametri (ex: electrici, optici, de poziție, de deformare) cauzate de aplicarea actuării asupra constituenților din compartimentul analitic: analiți, sau conglomerate analiți -compuși legați afîn de acestea. Actuarea poate fi magnetică, electrică, optică, mecanică. Într-un exemplu de aplicare, actuarea poate fi directă, sau indirectă, prin intermediul unor câmpuri magnetice a căror configurație se modifică periodic, caz în care analitul țintă este legat specific cu un set de particule magnetice (indicatoare) care determină

deplasarea, sau/și deformarea respectivă a clusterelor și, după caz, a particulelor indicatoare nelegate de analiți.

5) se monitorizează semnalele (ex. optice, electrice, de poziție) cauzate de aplicarea acțiunii asupra constituenților din compartimentul analitic prin intermediul parametrilor electrice (impedanța) și/sau optici (SPR) determinându-se parametrii utili, precum amplitudinea și defazajul față de sistemul de actuare;

6) se detectează prezența, sau se determină concentrația de analiți utilizând curbe de calibrare.

În cele ce urmează prezentăm un exemplu concret de realizare, respectiv de determinare a concentrației unui analit cu masa moleculară mare, Escherichia Coli. Au fost parcurse următoarele etape:

Se prepară o suspensie de particule indicatoare, PI, la suprafața cărora se imobilizează elementele de recunoaștere afină astfel:

- se prepară o suspensie de PI super paramagnetice Masterbeads (Adembeads, Franța) cu diametrul de 500nm, în apă deionizată (A.D.) cu concentrația de 10^9 particule/mL
- suspensia de PI se spală cu soluție tampon acid 2-(N-morfolino) etansulfonic (MES) 50 mM pH 5.4
- se prepară un amestec de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)/ N-hidroxisuccinimida (NHS) 4:1 în MES
- se înlocuiește soluția de MES cu cea de EDC/NHS
- suspensia de PI se agită 10 min. la 37°C și 1500 rpm – etapă de activare a grupărilor carboxilice
- suspensia de PI se spală cu A.D. și apoi cu soluție tampon PBS pH 7.4
- se înlocuiește soluția de PBS cu soluția de PBS în care se găsește proteina de imobilizat (1 mg/mL) respectiv anticorpul Anti-*E. coli*
- suspensia de PI se agită 2 h la 37°C, 1500 rpm – etapa de imobilizare a proteinei
- suspensia de PI se spală de 2 ori cu PBS pH 7.4
- se înlocuiește soluția de PBS cu soluția de etanolamină pH 8.5 – etapa de blocare a situsurilor active de care nu s-a legat Anti-*E. coli*
- suspensia de PI se spală de 2 ori cu PBS pH 7.4
- Incubarea probei cu PI imobilizate cu elemente de recunoaștere specifică
- suspensia de PI imobilizate se ultrasonază 10 min.

- la un volum de 100 μL de probă se adaugă 1 μL de suspensie de PI imobilizate. Raportul de PI:celule (*E.coli*) este de 1:100 fiind optimizat pentru o concentrație de 10^5 celule/mL

- proba cu PI se agită 1 h la 7°C , 1500 rpm

- suspensia se spală cu soluție tampon de măsură PBS și se injectează imediat

Alegerea configurației de actuare: actuarea se face magnetic, cu ajutorul a doi magneti permanenți, unul fix, poziționat dedesubtul senzorului, iar celălalt se deplasează în plan vertical pe o distanță de 22mm, cu frecvență de 0,3 Hz

Injectarea probei

- cu magnetul fix dedesubtul senzorului, iar cu cel mobil aflat la distanța maximă, se injectează suspensia 5 min. la 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ și apoi se așteaptă 5 min. pentru stabilizarea semnalului;

Actuarea

- se actuează magnetul mobil la frecvență de 0,3 Hz, deplasarea făcându-se pe o distanță de 22mm.

Măsura

- se înregistrează semnalul electric cules de la electrozii de măsură, evoluția, în urma actuării, a valorii absolute a impedanței, $|Z|$ la frecvența de 500 kHz.

- semnalul electric se prelucrează astfel: se calculează spectrul de putere pentru fiecare interval de 4200 de achiziții (intervalul este ales pentru o rezoluție în frecvență $\sim 0.01\text{Hz}$) și se determină amplitudinea semnalului periodic cu frecvența de 0,3 Hz, care depinde de concentrația celulelor din probă.

- Pentru referință, respectiv pentru cazul concentrației zero, semnalul provine exclusiv din actuarea PI (nelegate de celule) se obține amplitudinea $A_R=8,8\pm 3,5$ mV. Prin reprezentarea variației relative a amplitudinilor oscilațiilor la frecvența de actuare față de amplitudinea referinței, în funcție de concentrațiile cunoscute ale celulelor (*E.coli*) se determină curba de calibrare. Prin raportarea semnalului măsurat pe probă la curba de calibrare se determină concentrația de *E.coli* din probă.

Astfel un semnal cu amplitudinea $A_c = 123,6 \pm 23,4$ mV, respectiv amplitudinea relativă definită prin: $A_c/A_R - 1 \cong 13$ corespunde concentrației de 10^5 celule/mL.

Alegerea tipului și dimensiunii particulelor indicatoare se face astfel încât: incubarea să conducă la legarea unui număr cât mai mare de analiți să nu se lege între ele, semnalul aferent oscilației particulelor nelegate de celule să fie cât mai mic (neglijabil) și oscilația fiecărui cluster să conducă la un semnal cât mai mare.

Pentru particulele indicatoare paramagnetice, etapele de separare și concentrare de după incubare, cât și cea de actuare se realizează cu ajutorul unor magneți.

Ca alternativă există posibilitatea separării particulelor indicatoare de analiți, ex micro-organismele legate afin de suprafața de măsură, pentru ca actuarea să se realizeze exclusiv asupra analiților țintă.

Metoda prezintă, pentru acest exemplu de aplicare, avantajul că același set de senzori poate fi utilizat pentru detecția oricărui tip de analit, ex. micro-organismele, specificitatea nefiind dată de tipul suprafeței sensorului (care este pasivată pentru a împiedica orice adsorbție) ci de legarea afină a particulelor indicatoare de analiți țintă (în faza de incubare).

B) Pentru detecția și determinarea concentrației unor analiți cu masă moleculară mică (de exemplu toxine, antibiotice etc) metoda presupune exclusiv utilizarea de particule indicatoare.

Pentru că, de regulă (pentru analiții cu masă moleculară mică), semnalul datorat legării directe de suprafața sensorului este extrem de mic, pentru obținerea unui semnal semnificativ metoda propune utilizarea particulelor indicatoare. Aceste particule trebuie să permită, ex. prin intermediul unor ancore, imobilizarea pe suprafața lor a unor structuri afine similare celor conținute de analitul țintă și prin care acesta se leagă de partenerul afin imobilizat pe suprafața sensorului. Proprietățile (modificate prin actuare), dimensiunea și forma particulelor indicatoare, precum și tipul și numărul ancorelor trebuie să fie alese astfel încât să nu rămână situsuri active ascunse, iar oscilația să corespundă unei variații a semnalului util (ex. electric, optic) cât mai mare. În cazul în care actuarea periodică a particulelor indicatoare se realizează prin intermediul unor câmpuri magnetice, particulele indicatoare trebuie să aibă proprietăți (super) paramagnetice.

Metoda pentru detecția și determinarea concentrației unor analiți cu masă moleculară mică este ilustrată în fig. 2 și implică o secvență de etape precum:

1) Se prepară:

a) suprafața senzorilor astfel încât să se imobilizeze compușii ce corespund unui partener afin (specific) la analitul țintă;

b) suprafața particulelor indicatoare astfel încât să se imobilizeze linkeri (ancore) care să aibă la celălalt capăt structuri afine i.e. specifice similare celor conținute de analitul țintă și care determină legarea analitului țintă de partenerul afin imobilizat pe suprafața sensorului. Legarea de zonele active de pe suprafața sensorului prin intermediul unor linkeri are rolul de a permite particulelor indicatoare să se deplaseze, ex. să oscileze fără afectarea legăturii

afine; în cazul în care semnalul util nu este datorat deplasării periodice a particulelor indicatoare, ci este determinat de modificarea, în urma actuării, a unor proprietăți (ex. electrice, optice etc) ale particulelor indicatoare, sau a unor compuși de care acestea sunt legate afin, lungimea linkerilor trebuie aleasă astfel încât să permită o legare afină cât mai eficientă.

2) Se prepară proba susceptibilă să conțină analitul țintă, care este adusă în stare lichidă;

3) Se injectează în compartimentul analitic, succesiv:

- proba, ceea ce va conduce la legarea specifică în funcție de concentrația analitului țintă din probă, inactivându-se astfel un procent din zonele de legare prezente pe suprafața senzorului;
- se injectează în locul probei suspensia de particule indicatoare funcționalizate; concentrația acestora trebuie să fie suficient de mare astfel încât să conducă la inactivarea tuturor zonelor aflate pe suprafața senzorului, pe care sunt imobilizați compuși parteneri specifici de legare cu analiții țintă, inclusiv în cazul în care proba nu conține analiți țintă;

4) Se stabilesc condițiile de actuare, respectiv: câmpul aplicat (ex. magnetic), precum și parametrii de actuare, ex. frecvența, profilul evoluției intensității, pozițiile limită și se aplică actuarea (cu ajutorul modulului cu acest rol) care conduce la modificări măsurabile ale unor parametri (ex: electrice, optici, de poziție etc) cauzate de aplicarea actuării asupra constituenților și se face actuarea (cu ajutorul modulului cu acest rol, de exemplu utilizând câmpuri magnetice) care să conducă atât la variații periodice ale unor parametri (ex. de poziție, electrice, optici etc) determinate de exercitarea actuării asupra particulelor indicatoare, cât și/sau la eficientizarea legării lor afin (specifice) de suprafața senzorului; pentru acest exemplu de utilizare a metodei este posibil ca legarea particulelor indicatoare să conducă direct la obținerea unui semnal util pentru determinarea concentrației analitului țintă, fără să fie nevoie de actuare, sau intensitatea actuării periodice să fie foarte mică.

5) Se monitorizează semnalele (ex. optice, electrice) cauzate de aplicarea actuării asupra particulelor indicatoare din compartimentul analitic prin intermediul parametrilor ex. electrice (impedanța) și/sau optici (SPR) determinându-se parametrii utili ex. amplitudine și defazaj față de sistemul de actuare, sau după caz, aferente legării directe a particulelor indicatoare de zonele de pe senzor pe care sunt imobilizați compuși parteneri specifici, rămase active după injectarea probei;

6) Se detectează prezența, sau se extrage concentrația de analiți utilizând curbe de calibrare. Amplitudinea oscilației este dependentă de numărul de particule indicatoare legate de zonele de pe senzor pe care sunt imobilizați compuși parteneri specifici, rămase active după injectarea probei. Curba de calibrare va arata un semnal, datorat oscilațiilor determinate de exercitarea acțiunii asupra particulelor indicatoare, cu atât mai mic cu cât concentrația analitului țintă din proba este mai mare. În cazul în care nu e nevoie de aplicarea unei acțiuni (intensitatea acesteia se alege zero) curba de calibrare se determină utilizând semnalele aferente legării directe a particulelor indicatoare de zonele de pe senzor pe care sunt imobilizați compuși parteneri specifici, rămase active după injectarea probei.

Metoda prezintă, pentru acest exemplu de aplicare, cel puțin două avantaje majore față de metodele actuale de detecție:

- a) este robustă, independentă de efectul legării nespecifice a unor alți compuși din probă, diferiți de analitul țintă (semnalul util provine exclusiv de la particulele indicatoare). În acest scop, curbele de calibrare vor fi realizate utilizând aceleași soluții (matrici complexe), similare probelor reale;
- b) poate fi utilizată cu succes chiar și în cazul analiților cu masă moleculară mică (e.g. toxine) pentru care semnalul datorat legării specifice directe analit-senzor este prea mic pentru a fi sesizat.

C) Pentru detecția și determinarea concentrației unor catene ADN, ilustrată în Fig. 3, metoda presupune monitorizarea reacției de hibridizare și implică următoarele etape:

1) Se funcționează (prepară) senzorii astfel încât pe suprafața acestora să se imobilizeze catene complementare structurii ADN țintă și care să aibă legate de capătul liber particule indicatoare.

2) Se prepară proba susceptibilă să conțină catenele ADN țintă astfel încât să fie adusă în stare lichidă;

3) Se injectează proba în compartimentul analitic;

4) Se stabilesc condițiile de actuale, respectiv: câmpul aplicat (ex. magnetic), precum și parametrii de actuale, ex. frecvența, profilul evoluției intensității, pozițiile limită și se realizează actuale (cu ajutorul modulului cu acest rol, de exemplu utilizând câmpuri magnetice) care să conducă la deplasarea periodică a particulelor indicatoare legate de senzor prin intermediul catenelor complementare structurii ADN țintă.

5) Se monitorizează procesul de hibridizare (ce se derulează în compartimentul analitic) prin analiza deplasărilor, sau oscilațiilor particulelor indicatoare relevate de metode electrice (impedanța) și/sau optice (SPR) determinându-se pentru fiecare metoda parametrii relevanți ai semnalelor respective (ex. amplitudine și defazaj față de sistemul de actuale). Hibridizarea presupune legarea specifică a unei catene ADN țintă de cea complementară, imobilizată la un capăt pe suprafața senzorului și care are la celălalt capăt o particulă indicatoare care poate oscila. Diferențele de rigiditate între structura ADN-ului bicatenar și monocatenar vor conduce la modificarea amplitudinii și fazei oscilației particulei indicatoare. Evoluția procesului de hibridizare este relevată de evoluția atât a amplitudinii oscilației (scăzătoare) cât și a defazajului.

6) Se detectează prezența, sau se extrage concentrația de catene ADN țintă prin utilizarea curbelor de calibrare care pot fi realizate atât pe baza parametrilor ce descriu dinamica procesului, cât și folosind parametrii oscilației particulelor indicatoare aferente atingerii unui nivel staționar, „final”.

Metoda prezintă, pentru acest exemplu de aplicare, avantajul că alegerea parametrilor de actuale permite poziționarea particulelor indicatoare corespunzătoare alungirii maxime (aferente dimensiunii catenei ADN) pe o durată optimă cu relevanță atât pentru măsură, dar are și un efect important la creșterea randamentului reacției de hibridizare, fără a fi nevoie de introducerea unor structuri suport, care sunt de regulă nelipsite la metodele senzorialice actuale pentru evaluarea hibridizării ADN.

Revendicări

1. Metodă de detecție și de determinare a concentrației unor analiți prin aplicarea controlată a unui stimul periodic, caracterizată prin aceea că, constă în parcurgerea următoarelor etape, în ordine cronologică:

- se prepară elementele senzorialice sau de recunoaștere specifică, respectiv:
 - a. se imobilizează elemente de recunoaștere afină pe suprafața unor particule indicatoare;
 - b. se prepară suprafața senzorilor din compartimentul analitic, realizându-se, după caz:
 - imobilizarea unor compuși care conțin elemente afine care, în funcție de tipul de analit țintă, pot avea legate particule indicatoare la capătul opus senzorului;
 - pasivarea acestora, pentru împiedicarea oricărei adsorbții, în cazul în care recunoașterea specifică a analitului se face prin incubarea probei cu particule indicatoare, în etapa de preparare a probei;
- se prepară proba pentru a fi introdusă în stare lichidă în compartimentul analitic, după caz: direct sau după incubare cu particule indicatoare;
- se injectează în compartimentul analitic proba, sau/și după caz, o suspensie concentrată care conține particule indicatoare;
- se stabilesc condițiile de actuare, respectiv: câmpul aplicat ex. magnetic, electric, optic, mecanic etc și parametrii de actuare, ex. frecvența, profilul evoluției intensității, pozițiile limită și se aplică actuarea care să conducă la modificări măsurabile, de regulă periodice, ale unor parametri, electrici, optici, de poziție, de deformare și după caz, la eficientizarea legării afine;
- se monitorizează semnalele ex. optice și electrice, cauzate de aplicarea actuării asupra constituenților din compartimentul analitic determinându-se parametrii utili;

- se detectează prezența și se determină concentrația de analit utilizând curbe de calibrare determinate în prealabil din analiza unor probe cu concentrații cunoscute de analiți.

2. Metoda conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, în scopul detecției și determinării concentrației unor analiți cu masa moleculară mare, de tipul: agregate, particule, sau micro-organisme se parcurg următoarele etape:

- se prepară particule indicatoare imobilizându-se pe suprafața acestora compuși afini specifici analitului țintă;

- se prepară proba susceptibilă să conțină analitul țintă prin aducere în stare lichidă și se incubează împreună cu o suspensie cu o concentrație optimă de particule indicatoare funcționalizate;

- se extrage din compartimentul de incubare, se concentrează într-un volum redus și se injectează în compartimentul analitic, suspensia în care se află clustere de analiți și particulele indicatoare, precum și, după caz, o cantitate reziduală de particule indicatoare nelegate de analit; se poate considera o etapă de separare care să elimine din volumul care va fi analizat cantitatea de particule indicatoare nelegate de analit;

- se stabilesc condițiile de actuare și se aplică actuarea care conduce la modificări măsurabile, de regulă periodice, ale unor parametri, electrici, optici, de poziție, de deformare a analiților, sau a unor conglomerate analit-compuși legați specific de acestea.

- se monitorizează semnalele cauzate de aplicarea actuării asupra constituenților din compartimentul analitic, determinându-se parametrii utili, care pot fi, după caz, amplitudinea sau/și defazajul față de sistemul de actuare;

- se detectează prezența și se determină concentrația de analiți utilizând curbe de calibrare.

3. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, în scopul detecției, și determinării concentrației unor analiți cu masă moleculară mică, se parcurg următoarele etape:

- se prepară:

a) suprafața senzorilor astfel încât să se imobilizeze compușii ce corespund unui partener specific la analitul țintă;

b) suprafața particulelor indicatoare astfel încât să se immobilizeze linkeri (ancore) care să aibă la celălalt capăt structuri afine i.e. specifice similare celor conținute de analitul țintă și care determină legarea analitului țintă de partenerul afîn immobilizat pe suprafața senzorului, legarea de zonele active de pe suprafața senzorului prin intermediul unor linkeri având rolul de a permite particulelor indicatoare să se deplaseze, ex. să oscileze fără afectarea legăturii afine, iar în cazul în care semnalul util nu este datorat oscilației particulelor indicatoare, ci este determinat de modificarea, în urma actuării, a unor proprietăți electrice, optice etc ale particulelor indicatoare, sau a unor compuși de care acestea sunt legate afîn, lungimea linkerilor trebuie aleasă astfel încât să permită o legare afină cât mai eficientă.

- se prepară proba susceptibilă să conțină analitul țintă, care este adusă în stare lichidă;

- se injectează în compartimentul analitic, succesiv:

- proba, ceea ce va conduce la legarea specifică în funcție de concentrația analitului țintă din probă, inactivându-se astfel un procent din zonele de legare prezente pe suprafața senzorului;
- suspensia de particule indicatoare funcționalizate, în locul probei;

- se stabilesc parametri de actuare și aplică actuarea care să conducă la variații periodice a unor parametri, de poziție, electrice, optice etc, determinate de exercitarea actuării asupra particulelor indicatoare, cât și la eficientizarea legării lor specifice, afine de suprafața senzorului;

- se monitorizează semnalele cauzate de aplicarea actuării asupra particulelor indicatoare, determinându-se parametri utili ex. amplitudine și defazaj față de sistemul de actuare, sau după caz, aferenți legării directe a particulelor indicatoare de suprafața activă a senzorului;

- se detectează prezența și se determină concentrația de analit utilizând curbe de calibrare.

4. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, în scopul în scopul detecției și determinării concentrației unor catene ADN se parcurg următoarele etape:

- se prepară senzorii astfel încât pe suprafața acestora să se imobilizeze catene complementare structurii ADN țintă și care să aibă legate de capătul liber particule indicatoare.

- se prepară proba de analizat, care conține catenele ADN țintă, prin aducere în stare lichidă;

- se injectează proba în compartimentul analitic;

- se stabilesc condițiile de actuare atât pentru creșterea sensibilității măsurătorilor, dar și pentru creșterea randamentului reacției de hibridizare;

- se realizează actuarea care să conducă la deplasarea, posibil periodică, a particulelor indicatoare legate de senzor prin intermediul catenelor complementare structurii ADN țintă;

- se monitorizează procesul de hibridizare prin analiza deplasărilor, sau oscilațiilor particulelor indicatoare determinându-se parametrii relevanți ai semnalelor respective ;

- se detectează prezența, sau/ și se determină concentrația de catene ADN țintă prin utilizarea curbelor de calibrare care pot fi realizate atât pe baza parametrilor ce descriu dinamica procesului, cât și folosind parametrii deplasării, posibil oscilatorii a particulelor indicatoare aferente atingerii unui nivel staționar, „final”.

DESENE

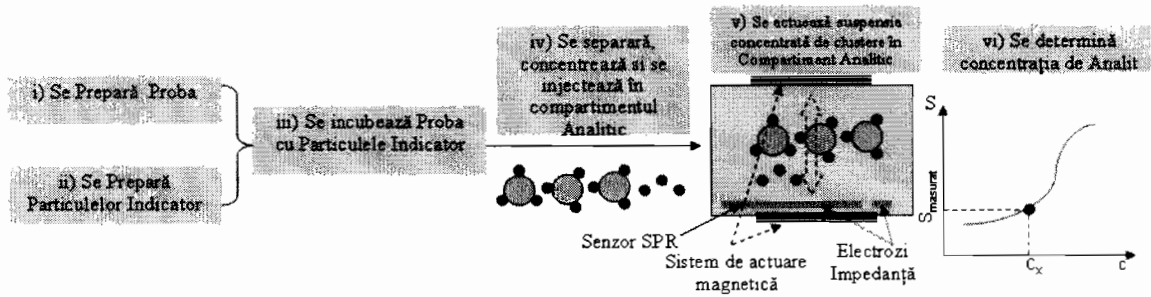


Fig.1

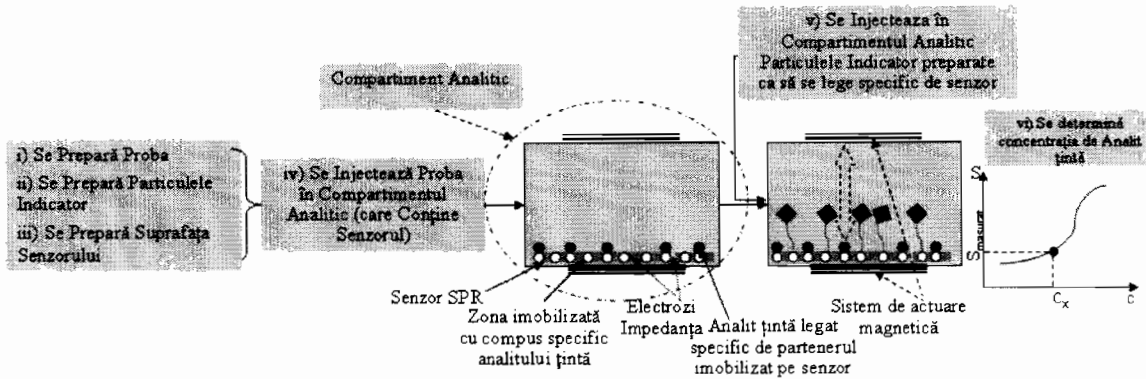


Fig.2

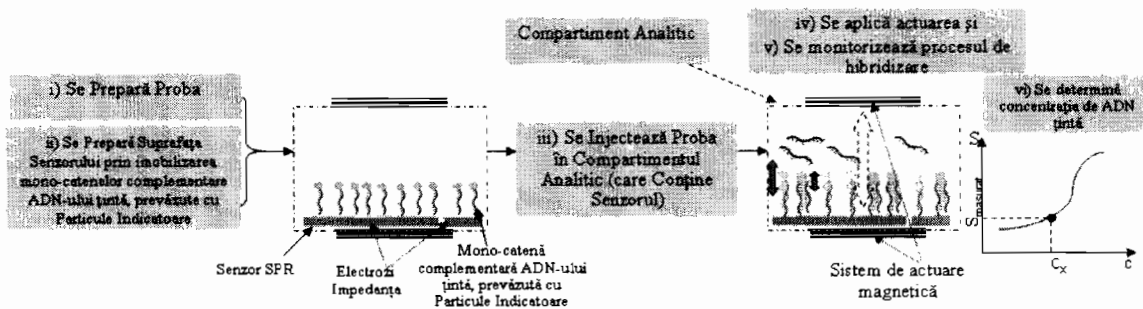


Fig.3