

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **235261**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **424462**

(22) Data zgłoszenia: **02.02.2018**

(51) Int.Cl.

G01N 27/327 (2006.01)

C12Q 1/26 (2006.01)

(54)

Biosensor optyczny do detekcji adrenaliny

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

05.11.2018 BUP 23/18

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

15.06.2020 WUP 07/20

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, Wrocław, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

SYLWIA BALUTA, Trzebnica, PL

JOANNA CABAJ, Wrocław, PL

KAROL MALECHA, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Katarzyna Paprzycka

PL 235261 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest biosensor wykonany w technologii niskotemperaturowej współwypalanej ceramiki (LTCC) służący do detekcji epinefryny (adrenaliny) w roztworach wodnych, znajdujący zastosowanie w diagnostyce medycznej lub przemyśle spożywczym. Biosensor pozwala na wykrycie bardzo niskich stężeń adrenaliny, może zatem informować o punktach kryzysowych.

Ze zgłoszenia patentowego nr US2017108437 (A1) znany jest biosensor optyczny oparty na pomiarach luminescencji. Zawiera on w swojej budowie porowate podłoże krzemowe lub tlenek glinowy wraz z układem wykrywającym unieruchomionym na ich powierzchni. Biologiczny układ wykrywający zawiera domenę czułą i domenę sygnalizacyjną. Domena czuła zaopatrzona jest w łącznik zdolny do oddziaływania z docelowym bioanalitem i domeną sygnalizacyjną posiadającą donor i akceptor luminescencji – donor i akceptor są optycznie sprzężone przez łącznik w przypadku braku bioanaliów docelowych, co stanowi podstawę do detekcji danego bioanalitu.

W koreańskim zgłoszeniu patentowym nr KR20160107086 (A) przedstawiony jest system optyczny biosensora do wykonywania nieinwazyjnego monitorowania glukozy we krwi. Urządzenie do oznaczania poziomu glukozy we krwi przenosi penetrujące światło do biosensora plazmonowego wykrywającego glukozę. Pomiar polega na ocenie śliny pacjenta, która przepływa przez kanał wykonany w technologii indukowanej folii, zawierającej związek selektywnie reagujący na glukozę próbki.

Następne zgłoszenie patentowe holenderskich naukowców nr W02016096908 (A1) ujawnia biosensor oparty na fluorescencyjnym oznaczaniu pojedynczych molekuł, głównie dzięki emiterom fluorescencyjnym.

Wynalazek przedstawiony w zgłoszeniu o numerze CN103196970 (A) dotyczy biosensora zawierający akceptor beta2, służący do oznaczania epinefryny w roztworach wodnych. Biosensor akceptora beta2 charakteryzuje się tym, że rekombinowany receptor purynergiczny epinefryny beta2 modyfikuje się na elektrodzie złota, a rekombinowany receptor purynergiczny epinefryny beta2 jest sekwencją podstawową. Taki układ może znaleźć zastosowanie między innymi do nadzoru nad higieną żywności czy w gospodarstwach przy hodowli bydła do monitorowania poziomu adrenaliny.

Polij[2-([2,2'-bitiofen]-5-ylo)-6-([2,3'-bitiofen]-5'-ylo)-4-(5-heksylotiofen-2-ylo)pirydna] znana jest z publikacji K. Olech, J. Sołoducho, S. Roszak, K. Łaba, P. Data, M. Łapkowski, Donor – Acceptor-Type of Electrochromic Polymer with Low Band-gap based on Pyridine as an Acceptor Unit, Indian Journal of Applied Research, Vol. 7, 6, 593–597, 2017.

Istota biosensora optycznego do detekcji adrenaliny, zawierającego korpus wykonany z co najmniej trzech warstw dolnej, środkowej oraz górnej niskotemperaturowej współwypalanej ceramiki, który posiada kanał przepływowy wyposażony w warstwę platynową połączony światłowodem ze źródłem światła i jednocześnie drugim światłowodem z czujnikiem światła polega na tym, że kanał przepływowy pokryty jest chemoczułym filmem enzymatycznym wytworzonym z poli [2-([2,2'-bitiofen]-5-ylo)-6-([2,3'-bitiofen]-5'-ylo)-4-(5-heksylotiofen-2-ylo)pirydny] oraz lakazy lub tyrozinazy.

Korzystnie światłowód połączony ze źródłem światła usytuowany jest równolegle, a światłowód połączony z czujnikiem światła położony jest prostopadle względem kanału przepływowego.

Korzystnie warstwa platynowa naniesiona jest na powierzchnię warstwy dolnej metodą sitodruku.

Korzystnie warstwa platyny zawiera część detekcyjną którą stanowi roztwór adrenaliny z dodatkiem barwnika opartego o jony żelaza (II).

Korzystnie światłowody są światłowodami polimerowymi lub kwarcowymi.

Korzystnie czujnikiem światła jest fotodioda lub fototranzystor.

Korzystnie źródłem światła jest dioda laserowa lub dioda elektroluminescencyjna.

Biosensor optyczny do detekcji adrenaliny według wynalazku jest urządzeniem miniaturowym, wykonanym z folii niskotemperaturowej współwypalanej ceramiki LTCC. Sensor według wynalazku do oznaczania adrenaliny w roztworach wodnych wyposażony jest w dwa światłowody oraz korpus wykonany z ceramiki, która jest niewrażliwa na substancje chemiczne oraz biologiczne, co umożliwia prowadzenie pomiarów niezależnie od składu chemicznego badanej próbki. Miniaturowy czujnik wykonany jest przy użyciu lasera lub wykrojnika mechanicznego z niskotemperaturowej ceramiki.

Przedmiot wynalazku przedstawiony jest bliżej w przykładach realizacji oraz na rysunku, na którym fig. 1 przedstawia biosensor optyczny służący do detekcji adrenaliny w widoku z góry i w przekroju A-A, a fig. 2 przedstawia wykres przedstawiający zależność intensywności fluorescencji od stężenia epinefryny w badanej próbce.

Przykład 1

Ceramiczny biosensor fluorescencyjny ma korpus KS wykonany z trzech warstw WD, WS, WG niskotemperaturowej współwypalanej ceramiki, zawiera kanał przepływowy KP wyposażony w warstwę platyny PT pokrytą cienkim filmem polimerowym otrzymanym z 2-([2,2'-bitiofen]-5-ylo)-6-([2,3'-bitiofen]-5'-ylo)-4-(5-heksylofiofen-2-ylo)pirydny wraz ze zimmobilizowaną lakazą, połączony światłowodem S1 umocowanym w kanale wykonanym w korpusie KS ze źródłem światła ZS w postaci diody elektroluminescencyjnej. Jednocześnie kanał przepływowy KP połączony jest drugim światłowodem S2 z czujnikiem światła CS w postaci fotodiody. Kanał światłowodowy S1 oraz kanał przepływowy KP wykonane są w warstwie środkowej WS, a kanał światłowodowy S2 w warstwie dolnej WD.

Ceramiczny czujnik fluorescencyjny wykonany jest z surowej folii niskotemperaturowej współwypalanej ceramiki, z której wycina się jedną warstwę dolną WD, na której naniesiona jest metodą sitodruku warstwa platyny PT.

Zgodnie z wynalazkiem, warstwy WD, WS, WG zgrywa się i laminuje za pomocą metody termokompensacyjnej w temperaturze 70°C, pod ciśnieniem 5 MPa, przez 10 minut. Zalaminowane warstwy WD, WS, WG wypala się podczas wieloetapowej obróbki termicznej. Kolejno, obróbkę termiczną prowadzi się przez 240 minut i w temperaturze otoczenia (rt) – do 450°C. W temperaturze 450°C wygrzewa się spodnią część obudowy przez 60 minut, kolejno spodnią część obudowy podgrzewa się do temperatury 850°C (60 minut). Następnie, zgodnie z wynalazkiem układ chłodzi się powoli do temperatury otoczenia (rt). W dalszym etapie do kanałów światłowodowych wkłada się światłowody polimerowe przy użyciu kleju epoksydowego.

Roztwór detekcyjny zawiera barwny kompleks tworzony pomiędzy jonami Fe^{2+} i cząsteczkami epinefryny. Utworzenie kompleksu potwierdza zmiana koloru barwnika z jasnozielonego na-w zależności od pH kolor krwistoczerwony, ciemnofioletowy bądź ciemnogrnatowy, po dodaniu do barwnika roztworu chlorowodoru epinefryny. Warstwa enzymatyczna lakazy jest cienkim filmem zaadsorbowanym na matrycy polimerowej poli [2-([2,2'-bitiofen]-5-ylo)-6-([2,3'-bitiofen]-5'-ylo)-4-(5-heksylofiofen-2-ylo)pirydny] pokrywającej warstwę platynową. Następnie roztwory epinefryny o różnych stężeniach mieszane są w stosunku 1:1 z roztworem barwnika i jest to podstawą do detekcji adrenaliny. Im wyższe stężenie adrenaliny w próbce, tym wyższa wartość sygnału. Zaletą układu jest jego duża czułość i fakt, że nadaje się do wykrywania różnych stężeń. Powtarzalność otrzymanych wyników oraz różne odpowiedzi czujnika, na różne stężenia adrenaliny, typują ten materiał do budowy czujników stosowanych w diagnostyce medycznej.

Działanie miniaturowego ceramicznego czujnika fluorescencyjnego do oznaczania stężenia adrenaliny w roztworach wodnych, polega na tym, że w kanale przepływowym KP wyposażonym w chemoczułą warstwę enzymatyczną zbudowaną z polimeru wytworzonego z 2-([2,2'-bitiofen]-5-ylo)-6-([2,3'-bitiofen]-5'-ylo)-4-(5-heksylofiofen-2-ylo)pirydny oraz lakazy, umieszcza się próbkę barwnika wraz z adrenaliną, która ulega reakcji enzymatycznej. Próbkę oświetla się diodą, która podczas przepływu próbki wzbudza związki obecne w roztworze. Rejestrowany przez czujnik światła wzrost intensywności fluorescencji jest zatem proporcjonalny do stężenia oznaczanej substancji. Pomiar intensywności fluorescencji wykonuje się za pomocą czujnika światła, a intensywność fluorescencji jest określana wielkością wzrostu napięcia na rezystorze pomiarowym podłączonym do czujnika światła. Rejestrowany wzrost intensywności fluorescencji jest wprost proporcjonalny do stężenia oznaczanej substancji. Limit detekcji dla układu wynosi 2,1 nM.

Przykład 2

Ceramiczny biosensor fluorescencyjny wykonany jak w przykładzie pierwszym z tą różnicą, że czujnikiem światła CS jest fotodioda, a źródłem światła ZS jest dioda laserowa, ponadto światłowody S1 i S2 są światłowodami kwarcowymi, i przyklejone są klejem epoksydowym do kanału wykonanego w korpusie KS.

Przykład 3

Elektroda enzymatyczna zawierająca tyrozynazę immobilizowaną adsorpcyjnie z dodatkiem czynnika sieciującego (glutaraldehyd) w elektroprzewodzącym materiale wytworzonym z 2-([2,2'-bitiofen]-5-ylo)-6-([2,3'-bitiofen]-5'-ylo)-4-(5-heksylofiofen-2-ylo)pirydny powstała w wyniku depozycji tyrozynazy na elektrodzie platynowej zmodyfikowanej materiałem przewodzącym. Proces depozycji białka na modyfikowanej elektrodzie pracującej prowadzono za pomocą adsorpcji kowalencyjnej z dodatkiem czynnika sieciującego w buforze fosforanowym o pH 6,8 w ciągu dwóch godzin. Następnie biosensor białkowy według wynalazku wprowadzono do układu optycznego, wykonanego w technologii LTCC. Do pomiaru aktywności wytworzonej warstwy chemoczułej użyto różnych stężeń epine-

fryny jako substratu, wraz z barwnikiem żelaza. Układ pomiarowy w trakcie prowadzonego procesu zmieniał sygnał chemiczny na mierzalny sygnał optyczny (Fig. 2).

Przykład 4

Ceramiczny biosensor fluorescencyjny ma korpus KS wykonany z trzech warstw WD, WS, WG niskotemperaturowej współwypalanej ceramiki, zawiera kanał przepływowy KP wyposażony w warstwę platyny PT pokrytą cienkim filmem polimerowym otrzymanym z 2-([2,2'-bitiofen]-5-ylo)-6-([2,3'-bitiofen]-5'-ylo)-4-(5-heksylotiofen-2-ylo)pirydny wraz ze zimmobilizowaną tyrozinazą, połączony światłowodem S1 umocowanym w kanale wykonanym w korpusie KS ze źródłem światła ZS w postaci diody elektroluminescencyjnej. Jednocześnie kanał przepływowy KP połączony jest drugim światłowodem S2 z czujnikiem światła CS w postaci fotodiody. Kanał światłowodowy S1 oraz kanał przepływowy KP wykonane są w warstwie środkowej WS, a kanał światłowodu S2 w warstwie dolnej WD.

Ceramiczny czujnik fluorescencyjny wykonany jest z surowej folii niskotemperaturowej współwypalanej ceramiki, z której wycina się jedną warstwę dolną WD, na której naniesiona jest metodą sitodruku warstwa platyny PT.

Roztwór detekcyjny, według wynalazku, zawiera barwny kompleks tworzony pomiędzy jonami Fe^{2+} i cząsteczkami epinefryny. Utworzenie kompleksu potwierdza zmiana koloru barwnika z jasnozielonego na – w zależności od pH kolor krwistoczerwony, ciemnofioletowy bądź ciemnogrnatowy, po dodaniu do barwnika roztworu chlorowodoru epinefryny. Warstwa enzymatyczna tyrozinazy jest cienkim filmem zaadsorbowanym na matrycy polimerowej poli [2-([2,2'-bitiofen]-5-ylo)-6-([2,3'-bitiofen]-5'-ylo)-4-(5-heksylotiofen-2-ylo)pirydny] pokrywającej warstwę platynową. Następnie roztwory epinefryny o różnych stężeniach mieszane są w stosunku 1:1 z roztworem barwnika i jest to podstawą do detekcji epinefryny. Im wyższe stężenie epinefryny w próbce, tym wyższa wartość sygnału. Zaletą układu jest jego duża czułość i fakt, że nadaje się do wykrywania różnych stężeń. Powtarzalność otrzymanych wyników oraz różne odpowiedzi czujnika, na różne stężenia epinefryny, typują ten materiał do budowy czujników stosowanych w diagnostyce medycznej.

Działanie miniaturowego ceramicznego czujnika fluorescencyjnego do oznaczania stężenia adrenaliny w roztworach wodnych, polega na tym, że w kanale przepływowym KP wyposażonym w chemoczułą warstwę enzymatyczną zbudowaną z polimeru wytworzonego z 2-([2,2'-bitiofen]-5-ylo)-6-([2,3'-bitiofen]-5'-ylo)-4-(5-heksylotiofen-2-ylo)pirydny oraz tyrozinazy, umieszcza się próbkę barwnika wraz z adrenaliną, która ulega reakcji enzymatycznej. Próbkę oświetla się diodą, która podczas przepływu próbki wzbudza związki obecne w roztworze. Rejestrowany przez czujnik światła wzrost intensywności fluorescencji jest zatem proporcjonalny do stężenia oznaczanej substancji. Pomiar intensywności fluorescencji wykonuje się za pomocą czujnika światła, a intensywność fluorescencji jest określana wielkością wzrostu napięcia na rezystorze pomiarowym podłączonym do czujnika światła. Rejestrowany wzrost intensywności fluorescencji jest wprost proporcjonalny do stężenia oznaczanej substancji. Limit detekcji dla układu wynosi 2,07 nM.

Zastrzeżenia patentowe

1. Biosensor optyczny do detekcji adrenaliny zawierający korpus (KS) wykonany z co najmniej trzech warstw dolnej (WD), środkowej (WS) oraz górnej (WG) niskotemperaturowej współwypalanej ceramiki, który posiada kanał przepływowy (KP) wyposażony w warstwę platynową (PT) połączony światłowodem (S1) ze źródłem światła (ZS) i jednocześnie drugim światłowodem (S2) z czujnikiem światła (CS) **znamienny tym, że** kanał przepływowy (KP) pokryty jest chemoczułym filmem enzymatycznym wytworzonym z poli [2-([2,2'-bitiofen]-5-ylo)-6-([2,3'-bitiofen]-5'-ylo)-4-(5-heksylotiofen-2-ylo)pirydny] oraz lakazy lub tyrozinazy.
2. Biosensor według zastrz. 1, **znamienny tym, że** światłowód (S1) połączony ze źródłem światła (ZS) usytuowany jest równolegle, a światłowód (S2) połączony z czujnikiem światła (CS) położony jest prostopadle względem kanału przepływowego (KP).
3. Biosensor według zastrz. 1, **znamienny tym, że** warstwa platynowa (PT) naniesiona jest na powierzchnię warstwy dolnej (WD) metodą sitodruku.
4. Biosensor według zastrz. 1, **znamienny tym, że** warstwa platyny (PT) zawiera część detekcyjną którą stanowi roztwór adrenaliny z dodatkiem barwnika opartego o jony żelaza (II).
5. Biosensor według zastrz. 1, **znamienny tym, że** światłowody (S1, S2) są światłowodami polimerowymi lub kwarcowymi.

6. Biosensor według zastrz. 1, **znamienny tym, że** czujnikiem światła (CS) jest fotodioda lub fototranzystor.
7. Biosensor według zastrz. 1, **znamienny tym, że** źródłem światła (ZS) jest dioda laserowa lub dioda elektroluminescencyjna.

Rysunki

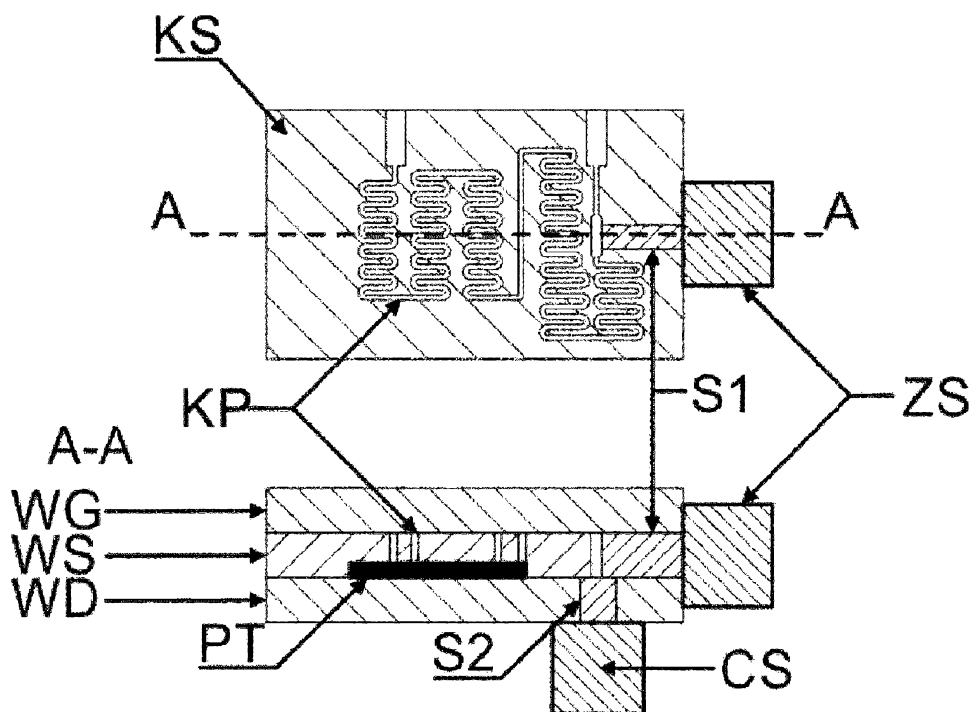


Fig. 1

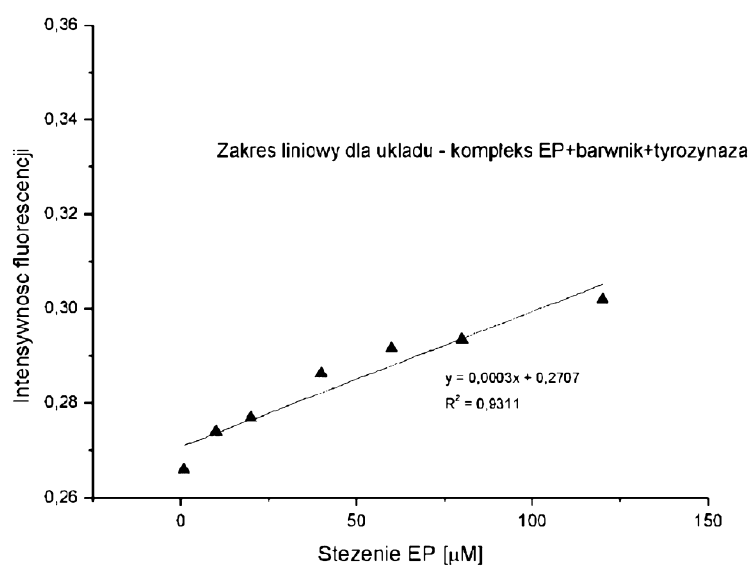


Fig. 2