

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **218316**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **381607**

(51) Int.Cl.  
**G01N 5/02 (2006.01)**  
**G01N 33/48 (2006.01)**

(22) Data zgłoszenia: **25.01.2007**

(54)

**Czujnik wykrywający obecność endotoksyn**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

**04.08.2008 BUP 16/08**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

**28.11.2014 WUP 11/14**

(73) Uprawniony z patentu:

**INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII  
DOŚWIADCZALNEJ POLSKIEJ AKADEMII  
NAUK, Wrocław, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**ANDRZEJ GAMIAN, Wrocław, PL  
JACEK RYBKA, Wrocław, PL  
TEODOR GOTSZALK, Wrocław, PL  
JERZY MIELCZARSKI, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Rafał Witek**

**PL 218316 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest czujnik rezonansowy, nadający się do wykrywania obecności różnych substancji badanych, w szczególności endotoksyn w różnych środowiskach, przykładowo w ciekłych próbkach. Może on posłużyć do uzyskania urządzenia do wykrywania zanieczyszczeń mikrobiologicznych środowiska oraz jako element zestawu testowego do wykrywania lub określania stężenia badanych substancji. Urządzenia lub zestawy testowe zawierające rezonansowy element testowy znajdują zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym i spożywczym, w medycynie, w rolnictwie oraz w różnego rodzaju urządzeniach chłodniczych i klimatyzacyjnych, stosowanych w różnych gałęziach przemysłu i w budownictwie. Wykrywanie lub określanie stężenia endotoksyn przy użyciu rezonansowego elementu testowego odbywa się poprzez analizę częstotliwości rezonansowej elementu testowego oraz amplitudy rezonansu (tzw. dobroci rezonatora).

Zasada działania czujnika bazuje na zjawisku częstotliwości rezonansowej, której pomiar wykorzystano do określenia zmiany masy na powierzchni elementu rezonansowego.

Do matematycznego opisu układu rezonansowego użyć można fizycznego modelu rezonatora, składającego się ze skupionej w jednym punkcie masy, zawieszanej na sprężynie.

$$\omega_R = \sqrt{\frac{k}{m_R + \Delta m}}$$

Częstotliwość rezonansowa takiego układu zależy od stałej sprężystości sprężyny  $k$  oraz od jego masy. Zmiana masy pociągnie zatem za sobą zmianę częstotliwości układu, co wyliczyć można z poniższego wzoru:

$$\Delta m = 2k \frac{\Delta f}{f_R^3}$$

W przypadku zastosowania elementu rezonansowego wykonanego z kryształu piezoelektrycznego, deformację elementu wywołaną wibracjami śledzić można poprzez zmiany napięcia na jego powierzchni. Ponieważ element wzbudzany taką samą energią wykazuje największe deformacje (wibracje) będąc w stanie rezonansu, zatem największe napięcie pojawia się na jego powierzchni przy częstotliwości rezonansowej. Figura 1 przedstawia zależność napięcia na powierzchni elementu rezonansowego od częstotliwości mechanicznego wzbudzenia tego elementu.

Celem wynalazku było uzyskanie prostego czujnika pozwalającego na wykrywanie obecności badanej substancji w różnych środowiskach, w szczególności pomiar jej stężenia w płynnej próbce.

Nieoczekiwanie, cel ten został osiągnięty poprzez zaproponowanie czujnika według wynalazku. Przedmiotem wynalazku jest czujnik wykrywający obecność endotoksyn, składający się z elementu rezonansowego połączonego z układem pomiaru częstotliwości rezonansowej tego elementu, charakteryzujący się tym, że powierzchnia elementu rezonansowego pokryta jest cząsteczkami posiadającymi powinowactwo do badanej substancji, wybranymi z grupy zawierającej: lektyny, białka neutralizujące endotoksynę (ENP), antybiotyki, białka receptorowe, serotoniny i ich pochodne.

Czujnik według wynalazku korzystnie charakteryzuje się tym, że element rezonansowy składa się z warstwy podłożowej, matrycy pokrywającej warstwę podłożową, oraz związanych hydrofobowo lub kowalencyjnie z matrycą cząsteczkami posiadającymi powinowactwo do badanej substancji.

Korzystnie, w czujniku według wynalazku matryca jest warstwą polistyrenu pokrywającą bezpośrednio element testowy.

Korzystnie, zgodnie z wynalazkiem matryca jest samoorganizującą się warstwą (SAM) związaną kowalencyjnie z warstwą złota napyłoną bezpośrednio na element testowy.

W czujniku według wynalazku korzystnie warstwa SAM ma postać kwasu merkaptoundekanoowego i związana jest z podłożową warstwą złota wiązaniem kowalencyjnym poprzez atom siarki.

Zgodnie z wynalazkiem, matryca ma korzystnie charakter silanu i związana jest kowalencyjnie z podłożową warstwą kwarcu.

Główny element czujnika według wynalazku stanowi element rezonansowy, pokryty warstwą pozwalającą na wiązanie molekuł aktywnych biologicznie oraz związanych z tą warstwą poprzez siły fizyczne lub wiązania chemiczne (siły van der Waalsa, hydrofobowo lub kowalencyjnie) molekuł

aktywnych biologicznie, które z kolei zawierają grupy molekularne wiążące specyficznie wykrywaną substancję, którą w opisanych poniżej przykładach były endotoksyny. Nie jest jednak intencją twórców zawężanie zastosowania tylko do tej przykładowej substancji, ponieważ czujnik według wynalazku nadaje się do wykrywania różnych substancji.

Ujawniony element rezonansowy wykonany jest z monokryształu kwarcu wyciętego dla uzyskania różnorodnego kształtu, z niektórymi powierzchniami pokrytymi metalizowanymi elektrodami. Na kwarcu krystalicznym, który jest materiałem piezoelektrycznym, pojawia się pod wpływem deformacji ładunek elektryczny, zależny pozytywnie od siły deformacji kryształu. Jeśli element rezonansowy zostanie wprawiony w drgania o określonej częstotliwości, pomiar ładunku pojawiającego się na powierzchni pozwala określić stopień deformacji elementu rezonansowego pod wpływem wibracji. Deformacja ta, a tym samym mierzony na powierzchni elementu ładunek, będzie - przy takiej samej energii wzbudzenia elementu - największa dla jego częstotliwości rezonansowej. W ten sposób, przy wzbudzaniu elementu przy pomocy wibracji o regulowanej częstotliwości, można określić jego częstotliwość rezonansową poprzez pomiar napięcia powstającego pomiędzy metalizowanymi elektrodami elementu.

Warstwa pokrywająca element rezonansowy ma postać warstwy polimeru stworzonej poprzez zanurzenie elementu w roztworze polimeru w rozpuszczalniku a następnie jego wysuszenie. Wspomniana warstwa pokrywająca element rezonansowy ma postać warstwy cząsteczek typu silanu, związanych kowalencyjnie z powierzchnią kwarcu, ze związaną do domeny silanowej grupą umożliwiającą kowalencyjną immobilizację biologicznie aktywnych cząsteczek na powierzchni elementu rezonansowego. Warstwa pokrywająca element rezonansowy może mieć postać warstwy złota, stworzonej poprzez umieszczenie elementu w parach złota i napylenie na niego warstwy atomów Au, do której to warstwy związane są wiązaniami tiolowymi cząsteczki łącznika - kwasu 11-merkaptoundekanowego w postaci samoorganizującej się warstwy (SAM - self assembling monolayer).

Warstwa SAM stanowi warstwę zapewniającą osłonięcie warstwy złota poprzez hydrofobowe cząsteczki łącznika, posiadające grupy polarne ( $-NH_2$ ,  $-OH$  lub  $COOH$ ) pozwalające na kowalencyjne przyłączenie molekuł aktywnych biologicznie.

Molekuły aktywne biologicznie mają postać lektyn specyficznie wiążących grupę endotoksyn, lub posiadających specyficzność do regionu wspólnego dla wszystkich endotoksyn.

Wspomniane molekuły aktywne biologicznie mają postać serotoniny albo polimyksyny B wiążących endotoksynę lub białek neutralizujących endotoksynę (ENP), co poszerza spektrum wiązania swoistego endotoksyn o różnej budowie. Molekuły aktywne biologicznie mogą mieć postać molekuł antybiotyku.

Rezonansowy element testowy według wynalazku łączy w sobie zalety metody pomiarów opartych na testach płytkowych, takie jak możliwość wykonania przy jego pomocy testu w krótkim czasie i w temperaturze pokojowej oraz zalety testów z odczynnikami umieszczonymi na fazie stałej takie jak łatwość przechowywania odczynników, długoczasowa stabilność odczynników, łatwość przeprowadzenia testu przez personel niewykwalifikowany oraz możliwości automatyzacji testu w urządzeniu pomiarowym. Połączenie tych zalet nie było możliwe w żadnym znanym teście lub metodzie wykrywania endotoksyn.

Przykładowe realizacje przedstawiono na rysunku, na którym na figurze 1 pokazano wykres obrazujący zależność intensywności rezonansu kwarcowego elementu czujnikowego w powietrzu od częstotliwości wzbudzenia, na figurze 2 przedstawiono schemat blokowy systemu czujnikowego według wynalazku (przykład 8). Przykłady wykonania czujnika rezonansowego według wynalazku zostały szczegółowo omówione poniżej.

#### P r z y k ł a d 1.

W przykładzie 1 wykonania rezonansowy czujnik składa się z elementu rezonansowego wyciętego z kwarcu krystalicznego w kształcie dwuramiennego kamertonu, z umieszczonymi na ich powierzchni srebrnymi elektrodami, polimeru organicznego w postaci warstwy polistyrenu, przylegającej do powierzchni podłoża, oraz molekuł lektyny zawierającej fragmenty specyficznie wiążące endotoksyny bakterii ze szczepu *H. alvei* PCM 1186, w postaci molekuł białka konkanawaliny A (ConA) związanych wiązaniami hydrofobowymi z warstwą polistyrenu.

W eksperymentalnym wykonaniu czujnika rezonansowego według wynalazku element rezonansowy miał postać dwuramiennego kamertonu (wymiar ramienia: 4 x 0,4 x 0,3 mm). Element ten jest komercyjnie dostępny, na przykład jako wzorzec częstotliwości wykorzystywany przy pomiarze czasu.

Następnie, na element rezonansowy naniesiono warstwę polimeru organicznego z hydrofobowo związaną konkanawalina A (ConA):

### 1. Pokrywanie elementu rezonansowego warstwą polistyrenu:

1.1 po dokładnym oczyszczeniu powierzchni elementu rezonansowego przez płukanie toluenem element suszono w temperaturze pokojowej,

1.2 otrzymano roztwór polistyrenu (PS) poprzez rozpuszczenie stałego PS dostępnego komercyjnie w bezwodnym toluenie w ilości 1 mg/ml,

1.3 zanurzone element rezonansowy w tak otrzymanym roztworze polistyrenu na 10 sekund, następnie wysuwano z roztworu w tempie 10 mm/min i suszono 15 min w temperaturze pokojowej, otrzymując w ten sposób warstwę polistyrenu o grubości  $14 \text{ nm} \pm 1 \text{ nm}$ .

### 2. Wiązanie ConA do warstwy PS:

Element rezonansowy pokryty warstwą PS w kroku (1) inkubowano w roztworze ConA o stężeniu 0,5-2 mg/ml w 0,1 M buforze octanowo-amonowym (pH 5,5) przez 30 min w temp. pokojowej. Po inkubacji element rezonansowy płukano: buforem octanowym przez 10 min, następnie buforem: 0,1 M  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , 1 M  $\text{NaCl}$ , 0,02%  $\text{MgCl}_2$ , 0,02%  $\text{MnCl}_2$ , 0,022%  $\text{CaCl}_2$ , (bufor reakcyjny) przez 10 min, po tym wodą MiliQ przez 10 min i suszono 15 min. ConA zawiera fragmenty wiążące specyficznie endotoksyny bakterii ze szczepu *H.alvei* PCM 1186.

#### Przykład 2.

W przykładzie 2, wykonania wynalazku jako molekuł aktywnych biologicznie zawierających fragmenty specyficznie wiążące endotoksyny wykorzystano białko neutralizujące endotoksynę ENP (Associates of Cape Cod). Białko to specyficznie wiąże szerokie spektrum endotoksyn bakterii Gram-ujemnych.

#### Przykład 3.

W przykładzie 3, wykonania wynalazku jako molekuł aktywnych biologicznie zawierających fragmenty specyficznie wiążące endotoksyny wykorzystano molekuły antybiotyku w postaci Polimyksyny B. Polimyksyna B zawiera fragmenty specyficznie wiążące szerokie spektrum endotoksyn i bakterii Gram-ujemnych.

#### Przykład 4.

W przykładzie 4, wykonania wynalazku jako molekuł aktywnych biologicznie zawierających fragmenty specyficznie wiążące endotoksyny wykorzystano molekuły w postaci serotoniny. Serotonina zawiera fragmenty specyficznie wiążące szerokie spektrum endotoksyn i bakterii Gram-ujemnych,

#### Przykład 5.

Element rezonansowy pokryty złotem, czyszczono w mieszaninie  $\text{H}_2\text{O} : 25\% \text{H}_2\text{O}_2 : 30\% \text{NH}_4\text{OH}$  (w proporcjach objętościowych odpowiednio 5:1:1) przez 10 min w  $80^\circ\text{C}$ , płukano w wodzie MiliQ, etanolu i suszono. Następnie element zanurzano w 1 mM roztworze kwasu merkaptoundekawanowego w 95% etanolu na 1 h w temperaturze pokojowej. Po tym czasie element płukano w 95% etanolu i suszono. Aktywację grup karboksylowych prowadzono przy użyciu mieszaniny 75 mM EDC (N-(3-dimetyloaminopropyl)-N'-etylokarbodiimid) i 15 mM NHS (N-hydroksybursztyniimid) przez 1 h. Następnie element rezonansowy z aktywowanymi grupami COOH zanurzano w 0,1% roztworze ConA w buforze HBS (10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM  $\text{NaCl}$ , 3,4 mM EDTA) lub 100 mM octanie sodu, pH=4,8. Pozostałe wolne aktywowane grupy COOH neutralizowano 1M etanoloaminą.

#### Przykład 6.

W przykładzie 6 użyto (3-aminopropyl)-trójetyloksysilanu (APTES) do modyfikacji powierzchni kwarcu. Kwarc, po czyszczeniu w roztworze Piranha (mieszanina 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  i stężonego  $\text{H}_2\text{SO}_4$  w proporcji 1:3) przez 30 min w  $80^\circ\text{C}$  płukano w wodzie MiliQ, suszono, a następnie umieszczano w roztworze o składzie: 5% APTES, 5%  $\text{H}_2\text{O}$ , 90% etanol na 1 h w temperaturze pokojowej. W wyniku tego na powierzchni kwarcu wiązała się warstwa silanowa modyfikując powierzchnię poprzez powstanie warstwy grup  $\text{NH}_2$ , mogących służyć następnie do chemicznego wiązania biomolekuł.

#### Przykład 7,

Powierzchnię kwarcu zmodyfikowaną przy pomocy APTES jak w przykładzie 6, aktywowano z użyciem 1% roztworu glutaraldehydu w wodzie przez 24 h w temperaturze pokojowej.

Aktywowany kwarc płukano następnie wodą i umieszczano w roztworze ConA na 24 h w temperaturze pokojowej.

Przykład zastosowania rezonansowego elementu testowego do wykrywania endotoksyn w płynnej próbce

#### Przykład 8

Aby wykorzystać rezonansowy element testowy do wykrywania endotoksyn w ciekłej próbce należy zmierzyć częstotliwość rezonansową suchego elementu rezonansowego.

Następnie należy zanurzyć rezonansowy element testowy w buforze nie zawierającym endotoksyn, następnie w wodzie w celu odplukania osadzonych soli nieorganicznych, po czym - po wysuszeniu - dokonać pomiaru częstotliwości rezonansowej elementu testowego. Następnie element testowy należy zanurzyć w próbce potencjalnie zawierającej endotoksyny na czas wystarczający do utworzenia kompleksu endotoksyn i molekuł aktywnych biologicznie w elemencie testowym. Po tym czasie element rezonansowy suszy się, płucze w wodzie i ponownie dokonuje pomiaru częstotliwości rezonansowej. Zmiana częstotliwości przekraczająca istotnie wartość błędów pomiarowych świadczy o obecności endotoksyn w badanej próbce.

Przykładowo rezonansowy element testowy wykonany jak w przykładzie 1, eksperymentalnie wykorzystano do wykrywania endotoksyn bakterii ze szczepu *H.alvei* PCM 1186. W tym celu wykonano eksperyment w krokach:

1. Przygotowanie ciekłej próbki zawierającej endotoksyny w postaci zawiesiny endotoksyn bakterii ze szczepu *H.alvei* PCM 1186 w wodzie w stężeniu 2 mg/ml. Zawiesinę tę rozpuszczano w roztworze 0,1 M  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , 1M NaCl, 0,02%  $\text{MgCl}_2$ , 0,02%  $\text{MnCl}_2$ , 0,022%  $\text{CaCl}_2$ , (bufor reakcyjny) do uzyskania stężenia endotoksyny wynoszącego 50  $\mu\text{g/ml}$ .

2. Rezonansowy element testowy (kontrolny), po pomiarze jego wyjściowej częstotliwości rezonansowej  $f(k)_0$  zanurzono w buforze reakcyjnym nie zawierającym endotoksyn na czas 25 min, płukano w buforze reakcyjnym przez 10 min, następnie w buforze octanowym przez 10 min, następnie w wodzie MiliQ przez 10 min, po czym element suszono przez 15 min i zmierzono jego końcową częstotliwość rezonansową  $f(k)_t$ .

3. Rezonansowy element testowy (pomiarowy), po pomiarze jego wyjściowej częstotliwości rezonansowej  $f(m)_0$  zanurzono w próbce zawierającej endotoksyny przygotowanej w kroku (1) na 25 minut w temperaturze pokojowej, następnie płukano w buforze reakcyjnym przez 10 min, w buforze octanowym przez 10 min, następnie w wodzie MiliQ przez 10 min, po czym element suszono przez 15 min i zmierzono jego końcową częstotliwość rezonansową  $f(m)_t$ .

Pomiary częstotliwości rezonansowej na etapie (2) i (3) wykonano przy użyciu układu przedstawionego na figurze 2.

W skrócie, element rezonansowy osadzony został na aktuatorze piezoelektrycznym, pobudzonym do wibracji z określoną częstotliwością przez generator sygnałowy. Napięcie generowane przez końcówki wibrującego elementu rezonansowego mierzone jest poprzez układ składający się ze wzmacniacza niskoszumowego. Następnie, sygnał ten prowadzony jest do prostownika, którego wyjście obserwowane jest za pomocą oscyloskopu. Całość układu sterowana była poprzez komputer z oprogramowaniem umożliwiającym ustawienie zakresu modulowanych częstotliwości oraz parametrów wzbudzenia wibracji oraz odczytu częstotliwości rezonansowej elementu.

Obecność endotoksyn w ciekłej próbce przejawia się różnicą zmiany częstotliwości rezonansowej elementu zmierzonej w kroku (3) w stosunku do zmiany częstotliwości rezonansowej zmierzonej w etapie (2), powstała na skutek uformowania wiązania endotoksyn z molekułami aktywnymi biologicznie znajdującymi się na pomiarowym rezonansowym elemencie testowym. W opisanym przykładzie pomiaru różnica częstotliwości rezonansowych  $f(k)_t - f(k)_0$  zmierzona w kroku (2) wynosiła 0,3 Hz, natomiast różnica częstotliwości rezonansowych  $f(m)_t - f(m)_0$  zmierzonych w etapie (3) wynosiła -1,0 Hz, co oznacza różnicę o -1,3 Hz pomiędzy elementem pomiarowym a kontrolnym. Zmniejszenie częstotliwości rezonansowej elementu pomiarowego wskazuje na związanie do jego powierzchni dodatkowej masy, czyli wskazuje na obecność endotoksyny.

## Zastrzeżenia patentowe

1. Czujnik wykrywający obecność endotoksyn, składający się z elementu rezonansowego połączonego z układem pomiaru częstotliwości rezonansowej tego elementu, **znamienny tym**, że powierzchnia elementu rezonansowego pokryta jest cząsteczkami posiadającymi powinowactwo do badanej substancji, wybranymi z grupy zawierającej: lektyny, białka neutralizujące endotoksynę (ENP), antybiotyki, białka receptorowe, serotoniny i ich pochodne.

2. Czujnik według zastrz. 1, **znamienny tym**, że element rezonansowy składa się z warstwy podłożowej, matrycy pokrywającej warstwę podłożową, oraz związanych hydrofobowo lub kowalencyjnie z matrycą cząsteczkami posiadającymi powinowactwo do badanej substancji.

3. Czujnik według zastrz. 2, **znamienny tym**, że matryca jest warstwą polistyrenu pokrywającą bezpośrednio element testowy.

4. Czujnik według zastrz. 2, **znamienny tym**, że matryca jest samoorganizującą się warstwą (SAM) związaną kowalencyjnie z warstwą złota napyłoną bezpośrednio na element testowy.

5. Czujnik według zastrz. 4, **znamienny tym**, że warstwa SAM ma postać kwasu merkaptoundekanowego i związana jest z podłożową warstwą złota wiązaniem kowalencyjnym poprzez atom siarki.

6. Czujnik według zastrz. 2, **znamienny tym**, że matryca ma charakter silanu i związana jest kowalencyjnie z podłożową warstwą kwarcu.

## Rysunki

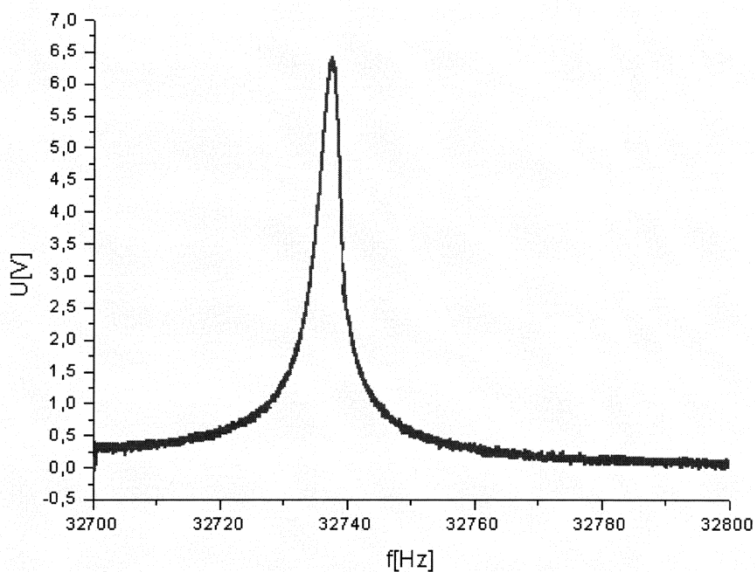


Fig. 1

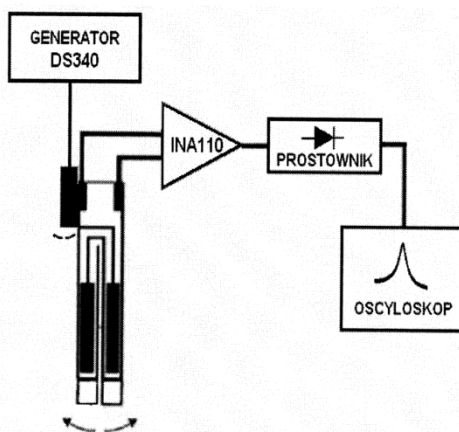


Fig. 2