



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0030124

(51)⁷ A61L 27/54; G01N 33/569; A61L 27/34; (13) B
A61L 27/50; A61L 29/04; A61L 29/06;
A61L 29/08; A61L 29/14; A61L 29/16;
A61L 31/04; A61L 31/06; A61L 31/10;
A61L 31/14; A61L 31/16; C08L 71/02;
A61L 27/18; A61L 27/22

(21) 1-2017-02207

(22) 05/11/2015

(86) PCT/NL2015/050771 05/11/2015

(87) WO2016/076707 19/05/2016

(30) 2013786 13/11/2014 NL

(45) 25/11/2021 404

(43) 25/09/2017 354A

(73) ORIGINAL G B.V. (NL)

Verdilaan 1, NL-9603 AP Hoogezaand, The Netherlands

(72) GAZENDAM, Jurjen (NL).

(74) Công ty Luật TNHH quốc tế BMVN (BMVN INTERNATIONAL LLC)

(54) CHẤT PHỦ BỀ MẶT VẬT THỂ, VẬT THỂ CHỨA CHẤT PHỦ BỀ MẶT VẬT THỂ, PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ CHẤT PHỦ BỀ MẶT VẬT THỂ, PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN SỰ PHÁT XẠ PHOTON TỪ VẬT THỂ CHỨA CHẤT PHỦ BỀ MẶT VẬT THỂ VÀ PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN VI KHUẨN TRÊN VẬT THỂ

(57) Sáng chế đề cập đến chất phủ bề mặt vật thể chứa một hoặc nhiều polyme và peptit được liên kết đồng hóa trị với ít nhất một trong số một hoặc nhiều polyme này, peptit này chứa a) vị trí phân cắt thứ nhất, trong đó vị trí phân cắt thứ nhất này được phân cắt bởi hợp chất thứ nhất được tạo ra một cách đặc hiệu bởi vi khuẩn thuộc nhóm thứ nhất gồm có một số lượng giới hạn các chủng, các loài hoặc các giống vi khuẩn, và không bị phân cắt bởi bất kỳ hợp chất nào được tạo ra bởi bất kỳ vi khuẩn nào không thuộc nhóm thứ nhất này, b) chất huỳnh quang thứ nhất có bước sóng phát xạ nằm trong khoảng 650 nm - 900 nm, c) chất không phát huỳnh quang thứ nhất có bước sóng hấp thụ nằm trong khoảng 650 nm - 900 nm, dùng để dập tắt sự phát xạ của chất huỳnh quang thứ nhất này, trong đó sự phân cắt ở vị trí phân cắt thứ nhất này làm giải phóng chất không phát huỳnh quang thứ nhất này ra khỏi chất phủ, sự giải phóng chất không phát huỳnh quang thứ nhất này là chỉ báo về sự có mặt của vi khuẩn thuộc nhóm thứ nhất này. Sáng chế cũng đề xuất vật thể chứa chất phủ bề mặt này, phương pháp điều chế chất phủ bề mặt vật thể, phương pháp phát hiện sự phát xạ photon từ vật thể được phủ bằng chất phủ bề mặt này và phương pháp phát hiện vi khuẩn trên vật thể bằng cách sử dụng chất phủ bề mặt này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chất phủ bề mặt vật thể, phương pháp điều chế chất phủ bề mặt vật thể này cũng như việc sử dụng chất phủ bề mặt vật thể này để phát hiện các vi sinh vật.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sự sinh trưởng của các vi sinh vật gây bệnh trên các bề mặt, ví dụ như các thiết bị y tế và các bề mặt chế biến thực phẩm dẫn đến sự phát triển sự nhiễm khuẩn. Hiện nay, không có các phương tiện để phát hiện với giá rẻ và nhanh chóng sự có mặt của các vi sinh vật gây bệnh trên các thiết bị y tế và các bề mặt chế biến thực phẩm. Tiêu chuẩn hiện nay để phát hiện sự có mặt của các vi sinh vật trên bề mặt là bằng cách nuôi cấy vi sinh được lấy từ mẫu thử bị nghi ngờ là đã bị nhiễm khuẩn. Các thiết bị y tế đã được cấy mô cần được loại bỏ trước khi thu gom mẫu thử để nuôi cấy. Các nhược điểm của các thử nghiệm như vậy là chúng tiêu tốn thời gian, chi phí cao và tốn nhiều nhân công, và cần phải loại mô cấy ra.

Các nỗ lực để khắc phục các vấn đề này đối với các thiết bị y tế đã được biết đến trong lĩnh vực này. Ví dụ, Patent Mỹ số US6306422 mô tả mô cấy được phủ chất nền hydrogel, chứa các hoạt chất có thể giải phóng được gắn vào, như các chất chữa bệnh và/hoặc chẩn đoán bệnh, do các biến đổi của môi trường. Do sự thay đổi độ pH trong vật chủ tại vị trí của mô cấy, các hoạt chất đưa vào này được giải phóng.

Một hạn chế của các mô cấy như vậy là mô cấy này không đáp ứng với vi khuẩn gây bệnh đặc hiệu và do đó, có thể xảy ra các phản ứng dương tính giả do các nguyên nhân môi trường thuần túy chứ không phải do vi khuẩn.

Các chất phủ bề mặt vật thể để phát hiện các vi sinh vật đã được biết đến trong lĩnh vực này. Công bố đơn sáng chế quốc tế WO2014098603 mô tả sự giải phóng của các chất chữa bệnh và/hoặc chẩn đoán bệnh từ chất phủ bề mặt vật thể khi có mặt các vi khuẩn gây bệnh đặc hiệu. Hạn chế của chất phủ này là chất huỳnh quang được giải phóng vào chất nền hoặc vùng xung quanh. Do đó, việc phát hiện các chất huỳnh quang đã được giải phóng phụ thuộc vào sự khuếch tán từ chất phủ bề mặt. Trong các trường hợp khuếch tán chậm, có thể tạo ra phản ứng âm tính giả.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là giải quyết các vấn đề của các chất phủ bề mặt vật thể trong lĩnh vực này.

Sáng chế đề xuất chất phủ bề mặt vật thể chứa một hoặc nhiều polyme và peptit liên kết đồng hóa trị với ít nhất một trong số một hoặc nhiều polyme này, peptit này bao gồm:

a) vị trí phân cắt thứ nhất, trong đó vị trí phân cắt thứ nhất này được phân cắt bởi hợp chất thứ nhất được tạo ra một cách đặc hiệu bởi vi khuẩn thuộc nhóm thứ nhất gồm có một số lượng giới hạn các chủng, các loài hoặc các giống vi khuẩn, và không bị phân cắt bởi bất kỳ hợp chất nào được tạo ra bởi bất kỳ vi khuẩn nào không thuộc nhóm thứ nhất này,

b) chất huỳnh quang thứ nhất có bước sóng phát xạ nằm trong khoảng 650 nm - 900 nm,

c) chất không phát huỳnh quang thứ nhất có bước sóng hấp thụ nằm trong khoảng 650 nm - 900 nm, để dập tắt sự phát xạ của chất huỳnh quang thứ nhất nêu trên,

trong đó sự phân cắt của vị trí phân cắt thứ nhất này giải phóng chất dập tắt thứ nhất nêu trên từ chất phủ, việc giải phóng chất thứ nhất này là chỉ báo về sự có mặt của vi khuẩn thuộc nhóm thứ nhất này.

Sáng chế đề xuất chất phủ bề mặt vật thể bao gồm:

a) một hoặc nhiều polyme,

b) chất huỳnh quang thứ nhất có bước sóng phát xạ nằm trong khoảng 650 nm - 900 nm,

c) chất không phát huỳnh quang thứ nhất có bước sóng hấp thụ nằm trong khoảng 650 nm - 900 nm, để dập tắt sự phát xạ của chất huỳnh quang thứ nhất nêu trên,

d) peptit liên kết đồng hóa trị với ít nhất một trong số một hoặc nhiều polyme nêu trên, peptit này chứa chất không phát huỳnh quang thứ nhất có bước sóng hấp thụ nằm trong khoảng 650 nm - 900 nm, để dập tắt sự phát xạ của chất huỳnh quang thứ nhất nêu trên và vị trí phân cắt thứ nhất,

trong đó vị trí phân cắt thứ nhất này được phân cắt bởi hợp chất thứ nhất được tạo ra một cách đặc hiệu bởi vi khuẩn thuộc nhóm thứ nhất gồm có một số lượng giới hạn các chủng, các loài hoặc các giống vi khuẩn, và không bị phân cắt bởi bất kỳ hợp chất nào được tạo ra bởi bất kỳ vi khuẩn nào không thuộc nhóm thứ nhất này,

trong đó sự phân cắt ở vị trí phân cắt thứ nhất này làm giải phóng chất không phát huỳnh quang thứ nhất nêu trên từ chất phủ, sự giải phóng chất không phát huỳnh quang thứ nhất nêu trên là chỉ báo về sự có mặt của vi khuẩn thuộc nhóm thứ nhất này.

Sáng chế đề xuất chất phủ bề mặt vật thể trong đó sự phân cắt ở vị trí phân cắt thứ nhất đồng thời tạo ra sự phân cắt của chất không bị dập tắt thứ nhất ra khỏi chất phủ bề mặt vật thể này sao cho sự phát xạ của chất huỳnh quang thứ nhất có thể được phát hiện.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một phương án được ưu tiên, sự phân cắt ở vị trí phân cắt thứ nhất không làm giải phóng chất huỳnh quang thứ nhất từ chất phủ bề mặt vật thể. Nói cách khác, sau khi phân cắt ở vị trí phân cắt thứ nhất, chất huỳnh quang thứ nhất vẫn liên kết đồng hóa trị với chất phủ bề mặt vật thể.

Ảnh hưởng của việc chỉ giải phóng chất không phát huỳnh quang thứ nhất từ chất phủ bề mặt vật thể là chất phủ bề mặt vật thể này biến đổi trạng thái của nó từ "tối", tức là không phát xạ ánh sáng có bước sóng nằm trong khoảng 650 nm - 900nm, sang tình trạng "sáng", tức là phát xạ ánh sáng có bước sóng nằm trong khoảng 650 nm - 900 nm, chất phủ này phát xạ ánh sáng có thể được ghi lại bởi bộ dò thích hợp. Ưu điểm của sự biến đổi từ trạng thái "tối (tắt)" sang trạng thái "sáng (bật)" như vậy là làm giảm khả năng xảy ra các phản ứng dương tính giả.

Ví dụ, trong các chất phủ đã được biết đến trong lĩnh vực này mà chúng không chứa nhóm không phát huỳnh quang theo sáng chế, chất phủ bề mặt vật thể phát xạ ánh sáng khi không có mặt các vi sinh vật, nhưng khi có mặt các vi sinh vật thì chất huỳnh quang được giải phóng ra khỏi chất phủ và chất phủ thay đổi sang trạng thái tối trong đó không phát xạ ánh sáng. Tuy nhiên, trong trường hợp này, chất phủ bề mặt vật thể có thể vẫn phát xạ ánh sáng nếu chất huỳnh quang thứ nhất không khuếch tán ra khỏi chất phủ, do đó sẽ quan sát thấy kết quả giả. Trong chất phủ theo sáng chế, khả năng xảy ra các phản ứng dương tính giả như vậy giảm đi do ngay sau khi phân cắt, khoảng cách giữa chất huỳnh quang thứ nhất và chất không phát huỳnh quang thứ nhất tăng lên khiến cho sự phát xạ không còn bị dập tắt nữa.

Không mong muốn bị hạn chế bởi lý thuyết, việc giải phóng chất không phát huỳnh quang thứ nhất từ chất phủ bề mặt vật thể có nghĩa là việc dập tắt ánh sáng phát xạ từ chất huỳnh quang thứ nhất không phụ thuộc vào sự khuếch tán của chất huỳnh quang thứ nhất ra khỏi chất phủ bề mặt vật thể như trong các chất phủ đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Sự phân cắt này bị ảnh hưởng bởi hợp chất được tạo ra bởi vi khuẩn thuộc nhóm gồm có một số lượng giới hạn các chủng, các loài hoặc các giống vi khuẩn. Các vi khuẩn thuộc nhóm này, để thuận tiện được gọi là nhóm thứ nhất, gồm các chủng, các loài hoặc các giống vi khuẩn có khả năng tạo hợp chất một cách đặc hiệu, mà hợp chất này phân cắt vị trí phân cắt thứ nhất nêu trên. Thuật ngữ 'đặc hiệu' có nghĩa là các chủng, các loài hoặc các giống vi khuẩn không thuộc nhóm thứ nhất này không có khả năng tạo hợp chất có thể nhận ra và phân cắt vị trí phân cắt nêu trên, ngược với các vi khuẩn thuộc nhóm thứ nhất này. Hợp chất có thể được tạo ra, ví dụ bởi sự giải phóng hợp chất này từ vi khuẩn, hoặc ví dụ có thể hiện diện trên bề mặt bên ngoài của vi khuẩn này. Trong trường hợp thứ hai, sự phân cắt sẽ được thực hiện khi vi khuẩn tiếp xúc với chất phủ, trong khi nếu hợp chất được giải phóng khỏi vi khuẩn, vi khuẩn này có thể nằm cách xa vật thể được phủ, miễn là hợp chất được giải phóng có khả năng đi tới chất phủ sau khi được giải phóng từ vi khuẩn.

Cũng có thể là đối với vi khuẩn thuộc nhóm khác, khi lây nhiễm ở vật chủ, sẽ giải phóng hoặc tạo ra hợp chất đặc biệt bởi vật chủ này. Trong trường hợp thứ hai, hợp chất này sẽ không được tạo ra hoặc giải phóng bởi vật chủ khi lây nhiễm vi khuẩn khác không thuộc nhóm khác nêu trên. Sự phân cắt có thể được thực hiện bởi hợp chất, hoặc ví dụ có thể được gây ra bởi sự liên kết của hợp chất này tạo thành phức chất, phức chất này được nhận ra bởi yếu tố phân cắt có trong môi trường chứa chất phủ, nghĩa là được tạo ra bởi vi khuẩn hoặc vật chủ bị nhiễm vi khuẩn và chứa vật thể. Đối với các vi khuẩn thuộc nhóm nhất định, như là nhóm thứ nhất gồm các chủng, các loài, hoặc các giống, sự có mặt của các vi khuẩn thuộc nhóm này phải gây ra sự phân cắt ở vị trí phân cắt, trong khi các vi khuẩn thuộc nhóm khác không gây ra sự phân cắt này. Sự phân cắt này có thể xảy ra bởi cùng hợp chất, tuy nhiên cũng có thể bởi nhiều hợp chất khác nhau, miễn là các hợp chất này gây ra phân cắt ở cùng một vị trí phân cắt. Ví dụ, nhóm thứ nhất bao gồm ba loài vi khuẩn khác nhau, các loài thứ nhất và thứ hai tạo ra hợp chất giống nhau phân cắt vị trí phân cắt của chất phủ, loài thứ ba tạo ra hợp chất khác với hợp chất được tạo ra từ các loài thứ nhất và thứ hai, nhưng cũng phân cắt đặc hiệu cùng vị trí phân cắt trong chất phủ. Thuật ngữ 'giới hạn' có nghĩa là nhóm này không bao gồm tất cả các vi khuẩn hoặc tất cả các loại vi khuẩn, nhưng bao gồm một số ít vi khuẩn, nghĩa là số lượng bị giới hạn sao cho sự giải phóng chất thứ nhất thực sự là chỉ báo cho một hoặc nhiều vi khuẩn, chứ không phải cho tất cả hoặc bất kỳ vi khuẩn hoặc loại vi khuẩn nào.

Theo một phương án, chất huỳnh quang thứ nhất có bước sóng phát xạ nằm trong khoảng từ 300 nm - 450 nm, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 450 nm - 650 nm, còn tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng 650 nm - 900 nm.

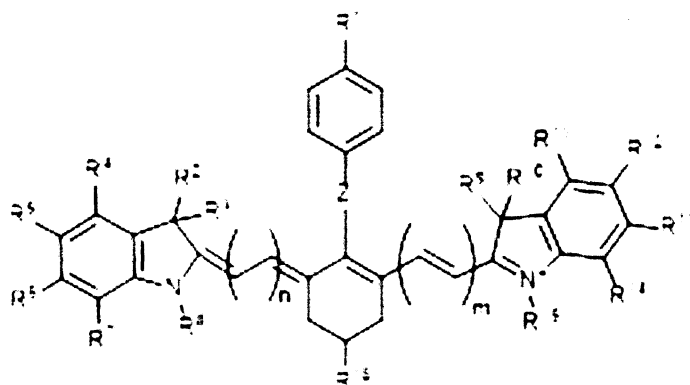
Chất huỳnh quang thứ nhất có bước sóng phát xạ nằm trong khoảng 650 nm - 900 nm có thể là bất kỳ hợp chất nào phát xạ ánh sáng ở bước sóng cần thiết nằm trong khoảng 650 nm - 900 nm và hợp chất này có quang phổ trùng với chất không phát huỳnh quang thứ nhất để khi chất huỳnh quang thứ nhất và các chất không phát huỳnh quang thứ nhất cùng có mặt trên peptit chưa được phân cắt trong chất phủ bề mặt vật thể thì không phát xạ ánh sáng.

Theo một phương án, chất huỳnh quang thứ nhất có bước sóng phát xạ nằm trong khoảng từ 450 nm - 650 nm có thể là bất kỳ hợp chất nào phát xạ ánh sáng ở bước sóng yêu cầu nằm trong khoảng từ 450 nm - 650 nm và hợp chất này có quang phổ trùng với chất không phát huỳnh quang thứ nhất để khi chất huỳnh quang thứ nhất và các chất không phát huỳnh quang thứ nhất cùng có mặt trên peptit chưa được phân cắt trong chất phủ bề mặt vật thể thì không phát xạ ánh sáng.

Theo phương án khác, chất huỳnh quang thứ nhất có bước sóng phát xạ nằm trong khoảng từ 300 nm - 350 nm có thể là bất kỳ hợp chất nào phát xạ ánh sáng ở bước sóng yêu cầu nằm trong khoảng từ 300 nm - 350 nm và hợp chất này có quang phổ trùng với chất không phát huỳnh quang thứ nhất để khi chất huỳnh quang thứ nhất và các chất không phát

huỳnh quang thứ nhất cũng có mặt trên peptit chưa được phân cắt trong chất phủ bề mặt vật thể thì không phát xạ ánh sáng.

Chất không phát huỳnh quang thứ nhất có bước sóng hấp thụ nằm trong khoảng 650 nm - 900 nm, là hợp chất có ít hoặc không có huỳnh quang bên trong và hợp chất này có thể đập tắt một cách hiệu quả huỳnh quang phát ra từ nhóm huỳnh quang sát hồng ngoại gần NIR (Near Infarred) cần ít chất nền. Theo một phương án, thuốc nhuộm không phát huỳnh quang thứ nhất là phân tử xyanin. Các phân tử xyanin, còn được gọi là các thuốc nhuộm xyanin, bao gồm các hợp chất có hai vòng dị vòng chứa nitơ được thế hoặc không được thế được nối bởi mạch polymethin (Công thức I):



Công thức I

Theo một phương án, chất huỳnh quang thứ nhất là thuốc nhuộm xyanin có công thức chung như được thể hiện trong công thức I, trong đó R^1 được chọn từ nhóm gồm có H, hydrocarbyl, halo, carboxyl, amino và $SO_3^-Cat^+$ trong đó Cat^+ là cation, ưu tiên kim loại kiềm thổ, tốt hơn nếu là natri, kali hoặc liti; Z được chọn từ nhóm gồm có H, O, S, NH và N-hydrocarbyl; mỗi R^2, R^3, R^9, R^{10} độc lập được chọn từ nhóm gồm có H và hydrocarbyl; mỗi R^4, R^5, R^{11}, R^{12} độc lập được chọn từ nhóm gồm có H, hydrocarbyl và sulfonato hoặc cùng với các nguyên tử mà chúng gắn vào tạo thành vòng thơm; mỗi R^6, R^7, R^{13}, R^{14} độc lập được chọn từ nhóm gồm có H và hydrocarbyl, hoặc cùng với các nguyên tử mà chúng gắn vào tạo thành vòng thơm; mỗi R^8 và R^{15} độc lập được chọn từ nhóm gồm có hydrocarbyl, $(CH_2)_qFG$ hoặc $(CH_2)_pLN$ trong đó ít nhất một trong số R^8 và R^{15} là $(CH_2)_qFG$, trong đó q là số nguyên từ 1 đến 20 và FG là nhóm chức không phản ứng trực tiếp với các nhóm carboxyl, hydroxyl, amino hoặc thiol, trong đó p là số nguyên từ 1 đến 20 và LN nhóm liên kết phản ứng với các nhóm carboxyl, hydroxyl, amino hoặc thiol; R^{15} là H hoặc hydrocarbyl.

Chất không phát huỳnh quang thứ nhất cũng có thể là ví dụ như BHQ3, (Biosearch) QC-1 (Li-COR.com), hoặc các hạt chứa các hợp chất này, ví dụ các hạt nano vàng và các hạt nano sắt.

Theo một phương án, một hoặc nhiều polyme được chọn từ nhóm gồm có polyetylen glycol, polyetylen glycol diacrylat, polylactit, rượu polyvinyllic, chất đồng trùng hợp poly DL-lactit-co-glycolit/polyetylen glycol và các tổ hợp của chúng.

Người ta đã phát hiện rằng các polyme có lợi cho các chất phủ bề mặt vật thể là các polyme nền polyetylen glycol do bản chất tương hợp sinh học của các polyme nền polyetylen glycol này.

Theo một phương án, peptit được liên kết đồng hóa trị qua đầu tận cùng N hoặc C hoặc mạch bên với ít nhất một trong số một hoặc nhiều polyme nêu trên bằng chất liên kết C₄-C₃₀ hydrocarbyl, tốt hơn là qua đầu tận cùng C hoặc mạch bên, tốt nhất là qua đầu tận cùng C.

Thuật ngữ hydrocarbyl như được sử dụng trong bản mô tả sáng chế này có nghĩa là chất liên kết chứa các nguyên tử hydro và cacbon; chất liên kết này có thể có mạch thẳng, mạch nhánh hoặc mạch vòng, no hoặc không no, chẳng hạn như alkyl, alkenyl và alkynyl; nhóm thế vòng béo như xycloalkyl, xycloalkenyl, vòng thơm. Chất liên kết này có thể được thế bằng một hoặc nhiều nhóm thế không phải là hydrocarbyl, ví dụ nguyên tử khác loại. Chất liên kết được ưu tiên được chọn từ nhóm gồm có 4, 5, 6 và 7 nguyên tử cacbon.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện rằng nhờ sự liên kết đồng hóa trị giữa peptit thông qua đầu tận cùng C với một hoặc nhiều polyme của chất phủ bề mặt vật thể, vị trí phân cắt xuất hiện theo hướng dễ dàng phân cắt bởi vi sinh vật.

Theo một phương án, chất phủ bề mặt vật thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên đây, trong đó chất liên kết C₄-C₃₀ bao gồm nhóm hydrocarbyl vòng hoặc nhóm dị vòng chứa vòng, ưu tiên nhóm dị vòng này là nhóm triazol.

Theo một phương án của sáng chế, chất liên kết có thể được tạo ra bởi phản ứng của nhóm phản ứng ở mạch đầu tận cùng N hoặc C hoặc mạch bên của peptit với nhóm phản ứng bù trên polyme. Nhóm phản ứng được ưu tiên đặc biệt là nhóm azit và nhóm phản ứng bù được ưu tiên là nhóm alkyn. Phản ứng của azit và alkyn xảy ra khi có mặt các chất huỳnh quang thứ nhất và các chất không phát huỳnh quang thứ nhất mà không xảy ra các phản ứng phụ không mong muốn.

Các ví dụ khác bao gồm các phản ứng ghép cặp xúc tác-Pd(O) khác nhau, phản ứng buộc Staudinger, các phản ứng cộng vòng (Diels-Alder, cộng vòng 1,3-lưỡng cực), các phản ứng alkyl hóa khử, phản ứng tạo thành oxim và hydrazin, phản ứng cộng thiol, và phản ứng ghép cặp oxi hóa.

Theo một phương án, vị trí phân cắt thứ nhất được phân cắt bởi hợp chất được tạo ra bởi vi khuẩn gram dương hoặc vi khuẩn gram âm, tốt hơn là vi khuẩn gram dương, tốt hơn nữa là từ các chủng *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, và *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Clostridium*, *Actinobacteria*, và *Listeria*.

Ưu điểm của chất phủ bề mặt vật thể theo sáng chế là chất phủ này có thể được tạo ra theo cách sao cho chất phủ này chỉ đáp ứng với nhóm vi sinh vật nhất định. Ví dụ, theo một phương án được ưu tiên, vị trí phân cắt thứ nhất được phân cắt bởi hợp chất được tạo ra bởi vi khuẩn gram dương, như là *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, và *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Clostridium*, *Actinobacteria*, và *Listeria*. Theo phương án được ưu tiên đặc biệt, vi khuẩn gram dương được chọn từ các chủng *Staphylococcus*, *Streptococcus*, tốt hơn là *Staphylococcus*.

Theo một phương án, vị trí phân cắt thứ nhất được phân cắt bởi hợp chất được tạo ra bởi vi khuẩn gram âm như *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, và *Campylobacter jejuni*.

Theo một phương án, hợp chất thứ nhất là proteaza được chọn từ nhóm gồm có Endoproteinaza Glu-C từ *Staphylococcus aureus* V8, IgA1 proteaza, aureolysin.

Ví dụ về hợp chất đặc hiệu đối với vi khuẩn gram dương là V8 proteaza từ *Staphylococcus aureus*, còn được biết đến là endoproteinaza Glu-C, Glu-C proteaza, staphylococcal serin proteinaza, *Staphylococcus* V8 serin endopeptidaza. Proteaza này phân cắt đặt hiệu ở mạch bên carboxyl của các gốc aspartat và glutamat.

Theo một phương án, vị trí phân cắt thứ nhất bao gồm kiểu axit amin đặc hiệu, ưu tiên được chọn từ nhóm gồm có EFRIV, EFRIK (SEQ ID SỐ: 1), DFRIK (SEQ ID SỐ: 2), GIGEFRIK (SEQ ID SỐ: 3), GIGDFRIK (SEQ ID SỐ: 4).

Theo một phương án được ưu tiên, vị trí phân cắt bao gồm axit amin được chọn từ nhóm gồm serin, threonin, arginin, lysin, axit aspartic và axit glutamic, ưu tiên axit aspartic và axit glutamic, vị trí phân cắt này nằm trong hợp chất từ ít nhất một vi khuẩn được chọn từ nhóm gồm có *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, và *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Clostridium*, *Actinobacteria*, và *Listeria*.

Theo một phương án được ưu tiên, vị trí phân cắt bao gồm axit amin được chọn từ nhóm gồm alanin, leuxin, valin, isoleuxin và prolin, vị trí phân cắt này nằm trong hợp chất từ ít nhất một vi khuẩn được chọn từ nhóm gồm có *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, và *Campylobacter jejuni*.

Vị trí phân cắt ở đây được hiểu là có nghĩa đã được biết rõ của nó, là phần cấu trúc phân tử của chất phủ bề mặt vật thể được phân cắt bởi hợp chất đặc hiệu mà vị trí phân cắt này chứa một hoặc nhiều liên kết amit.

Vị trí phân cắt có thể có cấu trúc XYZ, trong đó X là ít nhất một axit amin, Y là một phần của cấu trúc phân tử gồm ít nhất hai axit amin chứa vị trí phân cắt thứ nhất, và Z là ít nhất một axit amin. Các axit amin này được sử dụng có thể là axit amin bất kỳ nào, tốt hơn nếu được chọn từ nhóm gồm các axit amin có trong tự nhiên hoặc từ nhóm gồm các axit amin tổng hợp, đặc biệt là các chất dẫn xuất của các axit amin tự nhiên. Tốt hơn nếu các axit amin này là loại có thể liên kết với hợp chất gây ra sự phân cắt ở vị trí phân cắt thứ nhất.

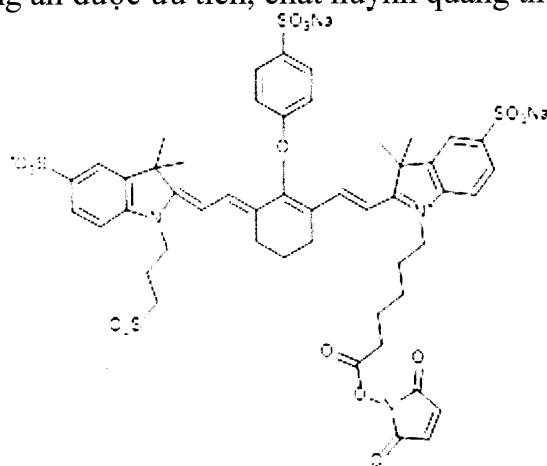
Theo một phương án, vị trí phân cắt thứ nhất bao gồm các axit amin là các cơ chất và/hoặc các vị trí liên kết đối với các proteaza được tiết ra bởi các vi sinh vật chẳng hạn như vi khuẩn gram dương, như là *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, và *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Clostridium*, *Actinobacteria*, và *Listeria*. Theo phương án được ưu tiên đặc biệt, vi khuẩn gram dương được chọn từ các giống *Staphylococcus*, *Streptococcus*, ưu tiên *Staphylococcus*.

Theo một phương án, vị trí phân cắt thứ nhất bao gồm các axit amin là các cơ chất hoặc các vị trí liên kết đối với các proteaza được tiết ra bởi các vi sinh vật chẳng hạn như vi khuẩn gram âm như là *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, và *Campylobacter jejuni*.

Peptit trong đó có vị trí phân cắt có thể chứa, ví dụ từ 4 đến 14, ví dụ như các axit amin, ví dụ từ 5 đến 12 axit amin, ví dụ từ 6 đến 11 axit amin, ví dụ từ 7 đến 10 axit amin và ví dụ từ 8 đến 9 axit amin. Tốt hơn nếu peptit chứa 6 axit amin, 7 axit amin, 8 axit amin, 9 axit amin hoặc 10 axit amin.

Tốt hơn nếu vị trí phân cắt chứa một số axit amin, ví dụ ít nhất là hai, tốt hơn nếu ít nhất là ba axit amin, tốt hơn nữa nếu ít nhất là bốn axit amin, còn tốt hơn nữa nếu ít nhất là năm axit amin, như được mô tả trong tài liệu The Standard Handbook Biochemistry, Ed. L. Stryer, 7th Edition, 2012, WH Freeman, Part 1, Chapter 2: Protein Composition and Structure. Một phần cấu trúc phân tử trong vị trí phân cắt cũng có thể được gọi là "kiểu axit amin". Theo sáng chế, vị trí phân cắt được bố trí sao cho nó được nhận ra bởi hợp chất được tạo ra bởi vi khuẩn thuộc nhóm gồm có một số lượng giới hạn các chủng, các loài hoặc các giống vi khuẩn.

Theo một phương án được ưu tiên, chất huỳnh quang thứ nhất có công thức II:



Công thức II

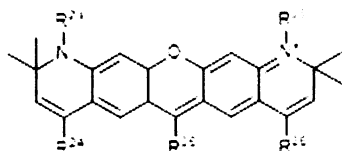
trong đó Z là O, trong đó R^1 là $\text{SO}_3^- \text{Na}^+$; R^2 , R^3 , R^9 , R^{10} là hydrocarbyl; R^4 và R^{11} là H; R^5 và R^{12} là sulfonato; R^6 , R^7 , R^{13} , R^{14} là H; R^8 là $(\text{CH}_3)_q \text{SO}_3^-$ và R^{15} là $(\text{CH}_2)_5\text{-H}$ -hydroxysuccinimide este, chất huỳnh quang thứ nhất là tetranatri 6-(2-[(E)-2-[(3E)-3-[(2E)-2-[3,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(4-sulfonatobutyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-

yliden]etyliden}-2-(4-sulfonatophenoxy)-1-xyclohexen-1-yl]vinyl}-3,3-dimetyl-5-sulfonato-3H-indolium-1 -yl)hexanoat và các chất dẫn xuất của chúng.

Theo một phương án, chất dẫn xuất của tetranatri 6-(2-{(E)-2-[(3E)-3-{(2E)-2-[3,3-dimetyl-5-sulfonato-1-(4-sulfonatobutyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-yliden] etyliden}-2-(4-sulfonatophenoxy)-1-xyclohexen-1 -yl]vinyl}-3,3-dimetyl-5- sulfonato-3H-indolium-1 -yl)hexanoat là amit, axit cacboxylic hoặc maleimit.

Theo một phương án, chất huỳnh quang thứ nhất, ví dụ thuốc nhuộm xyanin, và/hoặc chất không phát huỳnh quang thứ nhất được liên kết với peptit qua liên kết amit, este hoặc liên kết sản phẩm cộng Michael.

Theo một phương án, chất huỳnh quang thứ nhất là hợp chất theo công thức III:



Công thức III

trong đó mỗi R²³ và R²⁵ độc lập là H hoặc hydrocarbyl, mỗi R²⁴ và R²⁶ độc lập được chọn từ nhóm gồm có H, hydrocarbyl, và (CH₂)_qFG, trong đó q là số nguyên từ 1 đến 20 và FG là nhóm chức không phản ứng trực tiếp với các nhóm carboxyl, hydroxyl, amino hoặc thiol; mỗi R²⁷ độc lập được chọn từ nhóm gồm có H, hydrocarbyl và aryl trong đó aryl tùy ý được thế bằng các nhóm clo, halo hoặc axyl.

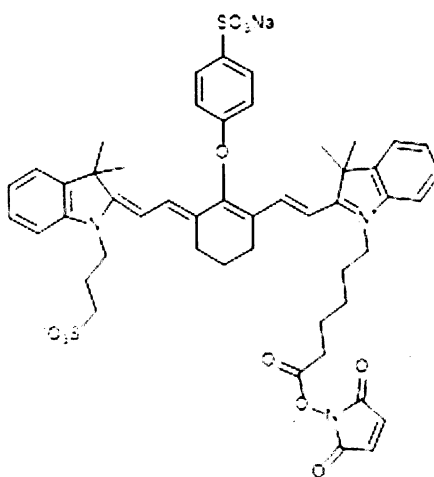
Các ví dụ về các chất huỳnh quang thứ nhất thích hợp có thể được sử dụng theo sáng chế bao gồm, nhưng không bị giới hạn trong Alexa Fluor® 350, Alexa Fluor® 430, Alexa Fluor® 488, Alexa Fluor® 555, Alexa Fluor® 594, Alexa Fluor® 647, Alexa Fluor® 660, Alexa Fluor® 680, Alexa Fluor® 700, Alexa Fluor® 750 ATTO 680, ATTO 700, DY-647, DY-650, DY-673, DY-675, DY-676, DY-680, DY-681, DY- 682, DY-690, DY-700, DY-701, DY-730, DY-731, DY-732, DY-734, DY-750, DY-751, DY-752, DY-776, DY-781, DY-782, DY-831, La Jolla Blue, Cy5, Cy5.5, Cy7, IRDye® 800CW, IRDye® 38, IRDye® 800RS, IRDye® 700DX, IRDye® 680, và một số chất khác. Các thuốc nhuộm "Alexa Fluor" do Molecular Probes Inc., Eugene, OR, Mỹ (www.probes.com) cung cấp. Các thuốc nhuộm "ATTO" do ATTO-tec GmbH, Siegen, Đức (www.atto-tec.com) cung cấp. Các thuốc nhuộm "DY" do Dyomics GmbH, Jena, Đức (www.dyomics.com) cung cấp. La Jolla Blue do Hyperion Inc. cung cấp. Các thuốc nhuộm "Cy" do Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, Mỹ, (www.amersham.com) cung cấp. "Thuốc nhuộm phát hồng ngoại IRDye®" do LI-COR® Bioscience, Inc., Lincoln, NE, Mỹ (www.licor.com) cung cấp.

Theo một phương án, chất không phát huỳnh quang thứ nhất là thuốc nhuộm xyanin có bước sóng hấp thụ nằm trong khoảng 650 nm - 900 nm. Ưu điểm của các thuốc nhuộm xyanin trong các bước sóng hồng ngoại gần là việc phát hiện hồng ngoại gần làm giảm nền, sự tán xạ và sự giao thoa bởi các hợp chất khác trong mẫu thử được đo, làm tăng độ tin cậy

của phương pháp theo sáng chế trong các hệ thống ngoài cơ thể và trong cơ thể. Hơn nữa, các bước sóng như vậy có khả năng xuyên qua mô làm cho các thuốc nhuộm này đặc biệt thích hợp cho các sử dụng trong cơ thể.

Theo phương án được ưu tiên, chất không phát huỳnh quang thứ nhất này là Diethylamino-5-phenylphenazinium-7-diazobenzene-4''-(N-ethyl-2-O-(4,4'-dimethoxytrityl))-N-ethyl-2-O (BHQ3) (Biosearch), QC-1, IRDye® 800RS (Li-COR.com), các hạt nano vàng và các hạt nano sắt.

Theo một phương án, chất không phát huỳnh quang thứ nhất này là hợp chất có công thức IV:

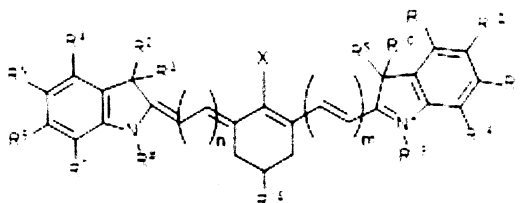


Công thức IV

trong đó Z là O, trong đó R¹ là SO₃⁻Na⁺; R², R³, R⁹, R¹⁰ là hydrocarbyl; R⁴ và R¹¹ là R⁵ và R¹² là H; R⁶, R⁷, R¹³, R¹⁴ là H; R⁸ là (CH₃)₄SO₃⁻ và R¹⁵ là (CH₂)₅-H-hydroxysuccinimide este.

Theo một phương án được ưu tiên, nếu chất huỳnh quang thứ nhất giống với chất không phát huỳnh quang thứ nhất, chất huỳnh quang thứ nhất này là hợp chất có công thức IV, IRDye® 800RS. Theo phương án này, IRDye® 800RS có đặc tính tự dập tắt ánh sáng phát xạ trong chất phủ. Khi phần thuốc nhuộm IRDye® 800RS bị loại ra khỏi chất phủ, khoảng cách giữa các phân tử IRDye® 800RS tăng lên khiến cho sự tự dập tắt xảy ra ở mức độ thấp hơn và do đó ánh sáng được phát xạ từ chất phủ.

Theo phương án thay thế, chất không phát huỳnh quang thứ nhất là hợp chất có công thức V:



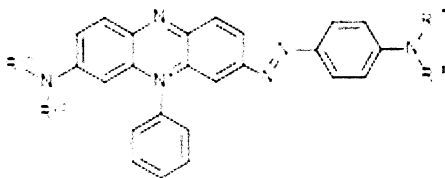
Công thức V

trong đó X được chọn từ nhóm gồm có H, clo, flo, brom, O-aryl trong đó aryl được thế ở vị trí para bởi nhóm được chọn từ nhóm gồm có sulfato, halogen, hydroxyl và amin; mỗi R^2 , R^3 , R^9 , R^{10} độc lập là H hoặc hydrocarbyl, mỗi R^4 , R^5 , R^{11} , R^{12} độc lập được chọn từ nhóm gồm có H, hydrocarbyl, sulfato và N-hydrocarbyl hoặc cùng với các nguyên tử mà chúng gắn vào tạo thành vòng thơm; mỗi R^6 , R^7 , R^{13} , R^{14} độc lập được chọn từ nhóm gồm có H, sulfato, hydrocarbyl, hoặc cùng với các nguyên tử mà chúng gắn vào tạo thành vòng thơm; mỗi R^8 và R^{15} độc lập là hydrocarbyl, $(CH_2)_qFG$ hoặc $(CH_2)_pLN$ trong đó ít nhất một trong số R^8 và R^{15} là $(CH_2)_qFG$, trong đó q là số nguyên từ 1 đến 20 và FG là nhóm chức không phản ứng trực tiếp với các nhóm carboxyl, hydroxyl, amino hoặc thiol, trong đó p là số nguyên từ 1 đến 20 và LN là nhóm liên kết phản ứng với các nhóm carboxyl, hydroxyl, amino hoặc thiol; R^{15} là H hoặc hydrocarbyl.

Tốt hơn nếu, hợp chất có công thức V là hợp chất trong đó X là clo; R^2 , R^3 , R^9 , R^{10} là hydrocarbyl, R^4 , R^6 , R^7 , R^{11} , R^{12} , R^{14} là H, R^5 là N-hydrocarbyl;

R^{13} là sulfato, R^8 là $(CH_3)_qSO_3^-$ và R^{15} là $(CH_2)_5$ -H-hydroxysuccinimide este, chất không phát huỳnh quang thứ nhất nêu trên là natri 4-((E)-6-((E)-2-[3,3-dimetyl-1-(4-sulfonatobutyl)-indolin-2-ylidene]etyliden}-2-((E)-2-(1-6-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yloxy)-6-oxyhexyl)-3,3-dimetyl-3H-indolium-2yl)vinyl)xyclohex-1-enyloxy)benzensulfonat.

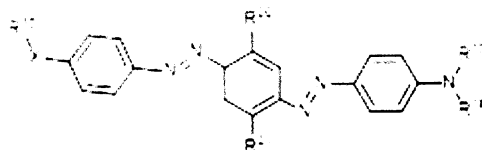
Theo phương án khác nữa, chất không phát huỳnh quang thứ nhất là hợp chất có công thức VI:



Công thức VI

trong đó mỗi R^{17} , R^{18} , R^{19} và R^{20} độc lập là hydrocarbyl hoặc hydrocarbyl được thế trong đó hydrocarbyl này được thế bằng các nhóm hydroxyl, halo, phốt pho hoặc sulfato.

Theo phương án khác, chất không phát huỳnh quang thứ nhất là hợp chất có công thức VII:



Công thức VII

trong đó mỗi R^{17} , R^{18} và R^{19} độc lập là hydrocarbyl hoặc hydrocarbyl được thế trong đó hydrocarbyl này được thế bằng các nhóm hydroxyl, halo, phốt pho hoặc sulfato; R^{20} và R^{21} là H, hydrocarbyl, alkoxy hoặc các nhóm halo.

Theo một phương án, chất không phát huỳnh quang thứ nhất có bước sóng hấp thụ nằm trong khoảng từ 300 nm - 450 nm, tốt hơn là trong khoảng 450 nm - 650 nm, tốt hơn nữa là trong khoảng 650 nm - 900 nm. Chất không phát huỳnh quang thứ nhất được chọn sao cho thu được quang phổ có lợi trùng với chất huỳnh quang thứ nhất để khi chất không phát huỳnh quang thứ nhất nêu trên và chất huỳnh quang thứ nhất này nằm gần nhau, sự phát xạ tín hiệu từ chất huỳnh quang thứ nhất này bị dập tắt.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chất phủ bề mặt vật thể theo điểm bất kỳ trong các điểm nêu trên, phương pháp này bao gồm các bước:

- a) tạo peptit chứa chất huỳnh quang thứ nhất, chất không phát huỳnh quang thứ nhất, vị trí phân cắt thứ nhất và alkyn để phản ứng;
- b) cho peptit thu được trong bước a) tiếp xúc với C₅-C₂₅ diacrylat chứa nhóm azit,
- c) liên kết chéo chất liên hợp peptit-diacrylat thu được trong bước b) với một hoặc nhiều polyme.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện rằng nhờ sự hợp nhất trong chất phủ của chất huỳnh quang thứ nhất và chất không phát huỳnh quang thứ nhất trên peptit được biến đổi diacrylat, việc tổng hợp chất phủ bề mặt vật thể là hiệu quả hơn so với các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Trong lĩnh vực này, đã biết rằng trộn các polyme đánh dấu huỳnh quang và sau đó liên kết chéo các polyme đã được trộn này. Trong phương pháp theo sáng chế, không cần phải đánh dấu trực tiếp polyme này. Điều này khiến phương pháp theo sáng chế tiết kiệm nguyên tử và thời gian hơn so với các phương pháp đã biết đến trong lĩnh vực này.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất vật thể chứa chất phủ bề mặt vật thể theo sáng chế, vật thể này được chọn từ nhóm gồm có các mô cấy y tế, các dụng cụ y tế, các miếng gạc y tế, các đĩa vi lỗ, các bề mặt chế biến thực phẩm, các trang thiết bị.

Chất phủ bề mặt vật thể theo sáng chế thích hợp để sử dụng trên nhiều loại vật nền khác nhau. Ưu điểm của chất phủ theo sáng chế là nó có thể được sử dụng để phát hiện sự xuất hiện nhiễm khuẩn trên mô cấy y tế, các dụng cụ và trang thiết bị y tế. Ví dụ về trang thiết bị thích hợp là giường bệnh viện, các bàn bệnh viện, các bàn phẫu thuật mà bề mặt chúng cần phải giữ sạch và nếu có mặt vi khuẩn gây bệnh thì sẽ bị phát hiện nhanh chóng.

Theo một phương án, vật thể được chọn từ nhóm gồm các kim tiêm, các ống thông, các ống dây dẫn, các đinh vít, các đĩa cấy và các vít cấy.

Chất phủ bề mặt vật thể theo sáng chế đặc biệt thích hợp để sử dụng trên các vật thể được cấy ghép trong cơ thể. Bằng cách sử dụng các mô cấy được phủ chất phủ theo sáng chế, sự nhiễm khuẩn có thể được phát hiện dễ dàng và do đó, các bác sỹ có thể dễ dàng quyết định bước điều trị tiếp theo.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề xuất phương pháp phủ vật thể bao gồm các bước:

- a) tạo ra chất phủ bề mặt vật thể theo sáng chế,

b) nhúng phủ vật thể được chọn từ nhóm gồm có các mô cấy y tế và các dụng cụ y tế để vật thể này được phủ chất phủ bề mặt thu được trong bước a),

c) làm khô vật thể thu được trong bước b).

Vật thể theo sáng chế có thể được phủ bằng chất phủ polyme nêu trên bằng cách sử dụng các kỹ thuật như nhúng-phủ, phun-phủ, quay-phủ, hoặc đổ khuôn dung môi. Các kỹ thuật phủ liên quan đến ghép hóa học các phân tử lên bề mặt vật liệu sinh học cũng có thể được áp dụng. Các chất phủ mỏng nano trên các đơn lớp tự sắp xếp (self - assembled monolayers - SAMs), các polyme được nối với bề mặt (surface-tethered polymers (polymer brushes)), hoặc các chất phủ đa lớp dựa vào kết cấu lớp-trên-lớp tạo ra sự kiểm soát chính xác về vị trí và hướng của các nhóm hóa học và các phân tử sinh học trên bề mặt của chất phủ cũng đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này để áp dụng các chất phủ khác nhau cho các bộ phận chỉnh hình và các thiết bị y tế khác cho nhiều lý do khác nhau, xem Handbook of Materials for Medical Device, Davis, J. R. (Ed.), Chapter 9, "Coatings" 2003.

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế đề xuất phương pháp phủ vật thể bao gồm các bước:

a) tạo chất phủ bề mặt vật thể theo sáng chế, và

b) cho vật thể được chọn từ nhóm gồm gạc y tế, các đĩa vi lỗ, các bề mặt chế biến thực phẩm, các trang thiết bị tiếp xúc với chất phủ bề mặt nêu trong bước a).

Theo phương án được ưu tiên đặc biệt, sáng chế đề xuất chất phủ bề mặt vật thể ở dạng dung môi, ví dụ dung môi chứa nước hoặc dung môi hữu cơ, chất phủ này có thể dùng cho bề mặt ví dụ như gạc y tế, các đĩa vi lỗ, các bề mặt chế biến thực phẩm, các trang thiết bị. Chất phủ này có thể được sử dụng bằng cách, ví dụ quét lên. Theo cách khác, chất phủ này có thể được chứa trong băng keo. Ưu điểm của việc sử dụng chất phủ bằng cách quét lên hoặc bởi băng keo là tạo ra các phương tiện dễ dàng và tiết kiệm thời gian để tạo ra lớp phủ bề mặt trên vật thể để phát hiện các vi sinh vật gây bệnh.

Theo khía cạnh thứ sáu, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chất phủ bề mặt vật thể theo sáng chế, bao gồm các bước:

a) tạo bề mặt vật thể chứa một hoặc nhiều polyme nêu trên, một hoặc nhiều polyme này chứa nhóm phản ứng A, và

b) cho bề mặt vật thể theo bước a) tiếp xúc với peptit chứa chất huỳnh quang thứ nhất, chất không phát huỳnh quang thứ nhất, vị trí phân cắt thứ nhất và nhóm phản ứng B bổ sung cho nhóm phản ứng A, để điều chế chất phủ bề mặt vật thể nêu trên.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện rằng các bề mặt được phủ bằng các nhóm alkynyl, ví dụ các bề mặt thủy tinh hoặc các đĩa vi chuẩn được phủ bằng các alkynyl PEG polyme, có thể phản ứng với các peptit, peptit này chứa nhóm azido, nhóm azido này được bổ sung cho nhóm alkyllyl nêu trên. Bất ngờ là phương pháp này cho phép dễ dàng sản xuất các bề

mặt được phủ peptit, các bề mặt này giải phóng chất huỳnh quang hoặc chất không phát huỳnh quang khi có mặt vi khuẩn.

Theo một phương án, nhóm phản ứng A nêu trên được chọn từ nhóm gồm có rượu (OH), thiol (SH), amin (NH₂), axit (CO₂H), alkyn, alken, azit, tốt hơn là alkyn hoặc azit, tốt hơn nữa là alkyn.

Theo một phương án, nhóm phản ứng B nêu trên được chọn từ nhóm gồm có rượu (OH), thiol (SH) amin (NH₂), axit (CO₂H), alkyn, alken, azit, tốt hơn là alkyn hoặc azit, tốt hơn nữa là azit.

Theo một phương án, sản phẩm của phản ứng của nhóm phản ứng A và nhóm phản ứng B là nhóm được chọn từ nhóm gồm có este, amit, carbamat, thioeste, maleimit và các liên kết sản phẩm cộng Michael.

Theo một phương án, peptit chứa vị trí phân cắt thứ nhất và chất huỳnh quang thứ nhất và chất không phát huỳnh quang thứ nhất còn chứa nhóm phản ứng A. Nhóm phản ứng A này được chọn từ nhóm gồm có rượu, thiol, amin, axit carboxylic, azit hoặc nhóm hydrocacbon không no, ví dụ alkyn hoặc alken. Peptit này được cho tiếp xúc với chất phủ bề mặt vật thể chứa nhóm phản ứng B là nhóm bổ sung cho nhóm phản ứng A. Nhóm phản ứng B này được chọn từ nhóm gồm rượu, thiol, amin, axit carboxylic, azit và/hoặc nhóm hydrocacbon không no, ví dụ alkyn hoặc alken. Tốt hơn nếu peptit chứa azit và bề mặt vật thể chứa alkyn. Nhóm phản ứng B này có thể được liên kết đồng hóa trị với một hoặc nhiều polyme của bề mặt vật thể. Theo sáng chế, polyme này có thể là hữu cơ hoặc vô cơ. Các ví dụ thích hợp về các polyme hữu cơ là polyetylen glycol, polyetylen glycol diacrylat, polylactit, rượu polyvinyl, poly DL-lactit-co-glycolit/polyetylen glycol copolyme và các tổ hợp của chúng. Các ví dụ thích hợp về các polyme vô cơ là các polyme silica, ví dụ như các siloxan, ví dụ như các siloxan có đơn vị lặp (-O-SiR₂-O)_n trong đó R là mạch hydrocarbyl, tốt hơn nếu là C1-C20 hydrocarbyl.

Theo một phương án, bề mặt vật thể nêu trên cần được xử lý trước. Việc xử lý trước này có thể là xử lý cơ học hoặc hóa học. Việc xử lý trước này cải thiện hình thái học bề mặt như độ nhám, hoa văn và độ rỗng của, ví dụ như các bề mặt kim loại hoặc nhựa, để tăng sự bám dính của chất phủ polyme.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp nhận biết sự phát xạ photon từ vật thể theo sáng chế, bao gồm bước phát xạ vật thể bằng các photon có bước sóng nằm trong khoảng 650 nm - 900 nm và phát hiện các photon phát xạ này.

Khi chất phủ bề mặt vật thể được chiếu sáng bằng ánh sáng có bước sóng nằm trong khoảng 650 nm - 900 nm và có mặt vi sinh vật gây bệnh, vi sinh vật này giải phóng hợp chất đặc hiệu đối với vị trí phân cắt trong chất phủ bề mặt vật thể, bộ dò thích hợp sẽ phát hiện các photon từ chất phủ này. Phương pháp như vậy tạo ra các phương tiện dễ dàng để xác định sự có mặt của vi sinh vật gây bệnh. Phương pháp theo sáng chế có lợi so với các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này ở chỗ không cần sử dụng nhiều nhân công, không

cần phải nuôi cấy vi sinh tốn chi phí và thời gian để phát hiện sự xuất hiện của, ví dụ sự nhiễm khuẩn.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp nhận biết sự phát xạ photon từ các đồ đựng được phủ chất phủ bề mặt vật thể theo sáng chế, bao gồm các bước cho đồ đựng này tiếp xúc với mẫu thử chứa dịch cơ thể và phát hiện các photon phát xạ.

Khi chất phủ bề mặt vật thể được cho tiếp xúc với dịch cơ thể, ví dụ nước bọt hoặc nước tiểu hoặc dịch ngoại bào nói chung, và sau đó chiếu sáng bằng ánh sáng có bước sóng nằm trong khoảng 650 nm - 900 nm, và có mặt vi sinh vật gây bệnh, vi sinh vật này giải phóng hợp chất đặc hiệu đối với vị trí phân cắt trong chất phủ bề mặt vật thể, bộ dò thích hợp sẽ phát hiện các photon từ chất phủ này. Phương pháp như vậy tạo ra các phương tiện dễ dàng để phát hiện sự có mặt của vi sinh vật gây bệnh ở người được lấy mẫu dịch thể. Phương pháp theo sáng chế có lợi so với các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này ở chỗ không cần sử dụng nhiều nhân công, không cần phải nuôi cấy vi sinh tốn chi phí và thời gian để phát hiện sự xuất hiện của, ví dụ sự nhiễm khuẩn.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng vật thể theo sáng chế để phát hiện sự xuất hiện các vi khuẩn lây nhiễm.

Phương pháp theo sáng chế có lợi so với các phương pháp trong lĩnh vực này ở chỗ không cần sử dụng nhiều nhân công, không cần phải nuôi cấy vi sinh tốn chi phí và thời gian để phát hiện sự xuất hiện của, ví dụ sự nhiễm khuẩn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ không giới hạn sau đây thể hiện các phương án cụ thể của sáng chế so với các giải pháp kỹ thuật đã biết.

Tổng hợp peptit

Các peptit 1 và 2 do Cambridge Research Biochemicals (UK) cung cấp và được sử dụng mà không cần tinh chế thêm.

Peptit 1: Ac-X-[K(IRDye800RS)]-GLLEFRIVAK(IRDye800RS)-amit, trong đó X là δ -azido-norvalin (SEQ ID SỐ: 5)

Peptit 2: Ac-X-GLLEFRIVAC(IRDye800CW)amit, trong đó X là δ -azido-L-norvalin, còn được gọi là axit (S)-5-azido-2-(Fmoc-amino) pentanoic) (SEQ ID SỐ: 6).

V8 proteaza

Proteaza vi khuẩn do Sigma-Aldrich cung cấp (Endoproteinaza Glu-C từ *Staphylococcus aureus* V8, P2922 SIGMA), còn được gọi là "proteaza V8" hoặc "V8" trong bản mô tả này.

GranzymB proteaza

Proteaza tái tổ hợp ở người do MerckMillepore cung cấp (368043 Granzyme B, Human, Recombinant, *E. coli*).

Các tiêu bản thủy tinh được tạo chức alkyn

Các tiêu bản hiển vi thủy tinh được tạo chức alkyn (1013-1014 nhóm alkyn/cm², 75mm x 25mm) do Microsurfaces, Inc. cung cấp và đã được cắt thành kích cỡ bởi mũi cắt kính kim cương. Các tiêu bản này được bảo quản trong túi kín đặt trong tối ở -20°C. Trong các thử nghiệm, các tiêu bản được giữ trong tối trong tủ sấy trên P₂O₅.

Ví dụ 1

Gắn các peptit vào các tiêu bản thủy tinh

Các peptit 1 và 2 được gắn vào các bề mặt thủy tinh.

Thử nghiệm đối chứng âm tính, không có CuSO₄ (có thể không có sự liên hợp đồng hóa tri)

10 µl dung dịch gốc peptit chứa peptit 1 (10 mg/mL; trong DMSO) được trộn với 26,5 µl dung dịch natri ascorbat (1 mg/mL; trong DMSO/nước theo tỷ lệ 1/1) và 13,5 µl DMSO được thêm vào để làm tăng độ hòa tan của peptit. Tỷ lệ DMSO/nước cuối cùng là 73:27. Nồng độ peptit cuối cùng là 0,65 mM, nồng độ natri ascorbat cuối cùng là 2,7 mM.

Peptit 1: liên hợp với CuSO₄

10 µl dung dịch gốc peptit chứa peptit 3 (10 mg/mL; trong DMSO) được trộn với 12,5 µl dung dịch CuSO₄ (1 mg/mL; trong DMSO/nước theo tỷ lệ 1/1) và 14 µl dung dịch natri ascorbat (1mg/mL; trong DMSO/nước theo tỷ lệ 1/1) và 13,5 µl DMSO được thêm vào để làm tăng độ hòa tan của peptit. Tỷ lệ DMSO/nước cuối cùng là 73:27. Nồng độ peptit cuối cùng là 0,65 mM, nồng độ CuSO₄ cuối cùng là 1mM, nồng độ natri ascorbat cuối cùng là 1,4 mM.

Dung dịch tạo thành (50 µl) được chuẩn độ lên tiêu bản thủy tinh, và tiêu bản này được giữ trong môi trường ẩm trong 1 giờ. Giọt nhỏ được rửa sạch bằng cách rửa 3 lần bằng 1 mL hỗn hợp DMSO:H₂O theo tỷ lệ 80/20; sau đó, tiêu bản này được đặt trong dung dịch rửa gồm DMSO:H₂O theo tỷ lệ 80/20 và khuấy nhẹ trong 1 phút. Dung dịch rửa được rửa bằng nước (5 x 1 mL) và tiêu bản được làm khô bởi dòng khí nitơ.

Các tiêu bản thủy tinh được xác định đặc tính bằng cách sử dụng quang phổ học UV-VIS, trong đó chỉ các đĩa đã được xử lý bằng peptit và CuSO₄ thể hiện sự hấp thụ kép tối đa thường nằm trong khoảng từ 0,01 - 0,05 trong vùng bước sóng được dự đoán nằm trong khoảng từ 600 nm - 800 nm.

Ví dụ 2

Kiểm soát sự tiêu hủy của peptit 1 bởi quang phổ học ánh sáng

Sự phân cắt của peptit 1 khi có mặt V8 proteaza và GranzymB proteaza được kiểm soát trong dung dịch bằng quang phổ học ánh sáng. Quang phổ phát quang do bức xạ được đo trên máy đo quang phổ Perkin-Elmer Luminescence LS50 B. Quang phổ được ghi lại

nằm trong khoảng từ 250 nm đến 900 nm, bằng cách sử dụng bước sóng nhấp nháy là 720 nm và sử dụng độ rộng khe là 15 nm.

Sự tiêu hủy trong dung dịch được thực hiện trong lọ thủy tinh. 100 μ l dung dịch gốc chứa peptit 1 (10 mg/mL) được pha loãng bằng 625 μ l H₂O và 250 μ l dung dịch đệm photphat 100 mM (độ pH = 7,8). Lấy mẫu thử 10 μ l ở thời điểm $t = 0$. Sau đó, 50 μ l dung dịch gốc V8 hoặc Granzyme B proteaza (25 đơn vị, $\pm 25 \mu$ g) được thêm vào, lắc hỗn hợp và giữ ở nhiệt độ trong phòng. Trong quãng thời gian thử nghiệm, dung dịch nuôi cấy được giữ trong (không kết tủa peptit nhuộm). Ở các thời điểm khác nhau (30 giây, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 150 và 180 phút, và ở 18 giờ), lấy 10 μ l mẫu thử nuôi cấy và pha loãng bằng 3 ml nước. Các mẫu pha loãng sẵn được đo bằng quang phổ học ánh sáng, để kiểm soát sự phân cắt dễ tiêu hủy ở peptit 1. Sử dụng các mẫu trắng là các chậu thủy tinh chứa nước và lượng DMSO giống như dung dịch mẫu thử.

Khi không có V8 proteaza, quan sát thấy huỳnh quang cơ bản là khoảng 1 AU. Sau khi thêm V8 proteaza 30 giây, cường độ huỳnh quang tăng đến 4 AU và trong vòng 6 phút cường độ huỳnh quang là 6 AU. Điều này chứng tỏ rằng peptit theo sáng chế có khả năng phát hiện vi khuẩn trong vài phút, đây là sự cải thiện đáng kể so với các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ như thử nghiệm dựa trên ATP đối với vật liệu hữu cơ (thường từ 4-8 giờ) hoặc các nuôi cấy vi khuẩn (24 giờ).

Khi có mặt Granzyme B, peptit 1 không bị cắt và huỳnh quang cơ bản là 1AU được duy trì trong suốt thử nghiệm. Granzyme B là serin proteaza có mặt với nồng độ thông thường nằm trong khoảng từ 20 - 4 pg/ml trong huyết tương. Các kết quả thể hiện rằng peptit có tính chọn lọc đối với sự có mặt của các proteaza vi khuẩn và không bị phân cắt khi có mặt các proteaza được giải phóng bởi cơ thể người như là một phần của các phản ứng tự miễn.

Ví dụ 3

Kiểm soát sự tiêu hủy của peptit 1 được liên kết bề mặt bởi quang phổ học ánh sáng

Thiết bị Li-Cor Odyssey CLX được sử dụng tại chỗ ở Westburg (Leusden, NL; Timo Kreike, Moniek Kors). Tất cả các phép đo Odyssey CLX được thực hiện bởi sự kích thích ở bước sóng 800 nm.

Khi có mặt V8 proteaza, cường độ tăng từ khoảng 6000 đơn vị đến 25000 đơn vị, chứng tỏ rằng V8 kích thích sự giải phóng của nhóm dật tắt từ peptit 1 .

Khi có mặt V8 proteaza, không thấy cường độ thay đổi đối với peptit 2. Cường độ quan sát thấy duy trì ở 8000 đơn vị, chứng tỏ rằng mặc dù nhóm huỳnh quang có thể bị phân cắt, nhóm huỳnh quang này không khuếch tán ra khỏi bề mặt, do đó không quan sát thấy tín hiệu bị giảm nên không thu được kết quả âm tính giả.

Các kết quả chứng tỏ rằng chất phủ theo sáng chế có thể phát hiện sự có mặt của vi khuẩn và không thể xảy ra các kết quả âm tính giả.

Ví dụ 4

Chất phủ ống thông

Các chất phủ vật thể bao gồm PEG polyme (MeO-PEG-alkyn, IRIS biotech) và peptit chứa vị trí phân cắt và chất huỳnh quang thứ nhất và chất không phát huỳnh quang thứ nhất. Ví dụ so sánh không chứa chất không phát huỳnh quang thứ nhất này.

Các peptit được tổng hợp bằng phương pháp tổng hợp peptit pha rắn tiêu chuẩn (standard solid phase peptit synthesis - SPPS) bằng cách sử dụng các chất phản ứng, các kỹ thuật ghép cặp và tinh chế tiêu chuẩn.

Việc ghép cặp peptit với chất huỳnh quang thứ nhất và chất không phát huỳnh quang thứ nhất được thực hiện sau khi tinh chế peptit và được tạo thuận lợi bằng cách ghép cặp maleimit với xystein hoặc ghép cặp amit với lysin.

Sự ghép cặp của peptit chứa vị trí phân cắt và chất huỳnh quang thứ nhất và chất không phát huỳnh quang thứ nhất được thực hiện bằng cách sử dụng các điều kiện phản ứng cộng vòng azit alkyn Huisgen tiêu chuẩn.

Ống thông được sử dụng là ống thông 14F silicon Foley có chiều dài 6 mm và đường kính 4,2 mm. Dịch huyền phù đặc chứa nước của mỗi chất phủ polyme được chuẩn bị và mỗi ống thông được nhúng vào hỗn hợp huyền phù đặc này. Các ống thông đã được phủ được bảo quản ở 20°C trong tối trong 15 phút trước khi lặp lại quy trình nhúng. Quy trình nhúng được lặp lại tổng số bốn lần. Sau lần nhúng cuối cùng, các ống thông đã được phủ được bảo quản ở 35°C trong 48 giờ để tạo thuận lợi cho việc làm khô chất phủ.

Ví dụ 5

Mỗi ống thông đã được phủ và mẫu đối chứng là một ống thông không được phủ được nuôi cấy với sự có mặt của 2×10^6 đơn vị tạo khuẩn lạc (colony-forming units-CFU) ml^{-1} *S. aureus* trong 4 giờ. Sau đó, các ống thông đã được phủ được bỏ ra khỏi tủ cấy và phơi trước máy ảnh huỳnh quang đa phổ dùng trong lâm sàng (hệ hình ảnh T3, SurgOptix BV, Groningen, Hà Lan) có quang phổ IVIS (kích thích: 710 nm, phát xạ: 800nm, thời gian thu nhận 5 giây, gộp điểm 4, Khẩu độ 2, FOV 21.2).

Các kết quả thu được từ quang phổ IVIS Spectrum và IVIS Lumina II được phân tích bằng Living Image 4.2. (Caliper LS, Hopkinton MA, Mỹ). Các giới hạn phát hiện tối ưu được đặt ở tín hiệu thấp nhất mà tại đó tín hiệu dương tính được dễ dàng phân biệt với các mẫu đối chứng âm tính. Cường độ tín hiệu được xác định bằng cách vẽ các vùng được quan tâm (regions of interests - ROI's) và đo các số đếm trung bình trong các vùng này. Tín hiệu được hiệu chỉnh đối với cơ sở bằng cách lấy tín hiệu được quan tâm trừ đi tín hiệu cơ sở, được gọi trong bản mô tả này là các số thực. Tín hiệu hồng ngoại gần mạnh được chỉ định cho chất huỳnh quang thứ nhất.

Các kết quả được thể hiện trong Bảng 1

Bảng 1

Ví dụ	Chất phủ	Vật thể	Phản ứng chất phủ với thử nghiệm <i>S. aureus</i>
5.1	không	ống thông silicon Foley (14F, 4,6 mm)	++ (được thử nghiệm bởi muối cấy vi sinh 24 giờ)
5.2	G-(pol)-X-LLEFRIVAC-IRDye800CW (SEQ ID SỐ: 7)		-
5.3	(IRDye800RS)-KG-(Pol)-X-LLEFRIVAK(IRDye800RS) (SEQ ID SỐ: 8)		+
5.4	Ac-(IRDye800CW)CG-(Pol)-X-LLEFRIVAK(IRDyeQC-1) (SEQ ID SỐ: 9)		++

trong đó Pol là MeO-PEG-alkyn và X là axit (S)-5-Azido-2-(Fmoc-amino) pentanoic

Các kết quả này chứng tỏ rằng các chất phủ theo sáng chế bao gồm chất không phát huỳnh quang với phổ hấp thụ trùng với phổ phát xạ của chất huỳnh quang thứ nhất (Ví dụ 5.4) dẫn đến sự phát hiện rất tốt sự có mặt của các vi sinh vật gây bệnh, ví dụ trong trường hợp này là *S. aureus*. Việc dập tắt bởi chất không phát huỳnh quang thứ nhất phụ thuộc hoàn toàn vào khoảng cách từ chất huỳnh quang thứ nhất, do đó ngay khi chất không phát huỳnh quang thứ nhất bị phân cắt, ánh sáng phát xạ ra bị phát hiện.

Ví dụ 5.4 cũng chứng tỏ rằng có thể thu được mức phát hiện tương tự bằng cách sử dụng các chất phủ theo sáng chế giống như nuôi cấy vi sinh thông thường (ví dụ 5.1) tuy nhiên các kết quả thu được nhanh hơn nhiều, trong 4 giờ so với 24 - 36 giờ đối với các nuôi cấy vi sinh.

Ví dụ 5.3 chứng tỏ chất huỳnh quang thứ nhất cũng hoạt động như chất không phát huỳnh quang thứ nhất cũng tạo ra các phương tiện thích hợp để phát hiện các vi sinh vật. Tuy nhiên, do sự khuếch tán bị giới hạn của chất huỳnh quang thứ nhất đã bị phân cắt nên chỉ phát hiện tín hiệu yếu.

Các chất phủ chỉ chứa chất huỳnh quang thứ nhất không tạo ra sự phát hiện tốt các vi sinh vật (ví dụ so sánh 5.2). Kết quả này là do tốc độ khuếch tán chậm của chất huỳnh quang thứ nhất ra khỏi bề mặt, do đó chỉ phát hiện sự thay đổi nhỏ của cường độ ánh sáng được phát xạ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chất phủ bề mặt vật thể chứa một hoặc nhiều polyme và peptit được liên kết đồng hóa trị với ít nhất một trong số một hoặc nhiều polyme này, trong đó peptit này chứa:

a) vị trí phân cắt bao gồm kiểu axit amin đặc hiệu được chọn từ nhóm gồm có EFRİK (SEQ ID SỐ: 1), DFRİK (SEQ ID SỐ: 2), GIGEFRİK (SEQ ID SỐ: 3) và GIGDFRİK (SEQ ID SỐ: 4), trong đó vị trí phân cắt này được phân cắt bởi hợp chất được tạo ra một cách đặc hiệu bởi vi khuẩn thuộc nhóm gồm có một số lượng giới hạn các chủng, các loài hoặc các giống vi khuẩn, và không bị phân cắt bởi bất kỳ hợp chất nào được tạo ra bởi bất kỳ vi khuẩn nào không thuộc nhóm này,

b) chất huỳnh quang có bước sóng phát xạ nằm trong khoảng 650 nm-900 nm,

c) chất không phát huỳnh quang có bước sóng hấp thụ nằm trong khoảng 650 nm-900 nm, dùng để dập tắt sự phát xạ của chất huỳnh quang này,

trong đó sự phân cắt ở vị trí phân cắt này làm giải phóng chất không phát huỳnh quang này ra khỏi chất phủ này, sự giải phóng chất không phát huỳnh quang này là chỉ báo về sự có mặt của vi khuẩn thuộc nhóm này, và

trong đó vi khuẩn này là vi khuẩn gram dương.

2. Chất phủ bề mặt vật thể theo điểm 1, trong đó một hoặc nhiều polyme này được chọn từ nhóm gồm có polyetylen glycol, polyetylen glycol diacrylat, polylactit, rượu polyvinyllic, poly DL-lactit-co-glycolit/polyetylen glycol copolyme và các tổ hợp của chúng.

3. Chất phủ bề mặt vật thể theo điểm 1, trong đó peptit này được liên kết đồng hóa trị qua đầu tận cùng N- hoặc C- hoặc mạch bên với ít nhất một trong số một hoặc nhiều polyme nêu trên bởi chất liên kết C₄-C₃₀ hydrocarbyl, ưu tiên qua đầu tận cùng C- hoặc mạch bên, ưu tiên nhất là qua mạch bên.

4. Chất phủ bề mặt vật thể theo điểm 3, trong đó chất liên kết C₄-C₃₀ bao gồm nhóm hydrocarbyl vòng hoặc nhóm dị vòng chứa vòng, ưu tiên nhóm dị vòng này là nhóm triazol.

5. Chất phủ bề mặt vật thể theo điểm 1, trong đó vị trí phân cắt này được phân cắt bởi hợp chất được tạo ra một cách đặc hiệu bởi vi khuẩn thuộc nhóm gồm có vi khuẩn gram dương hoặc vi khuẩn gram âm.

6. Chất phủ bề mặt vật thể theo điểm 1, trong đó vị trí phân cắt này được phân cắt bởi hợp chất là proteaza được chọn từ nhóm gồm có V8 proteaza, IgA1 proteaza, aureolysin.

7. Chất phủ bề mặt vật thể theo điểm 1, trong đó chất huỳnh quang này là xyanin có bước sóng phát xạ nằm trong khoảng 650 nm - 900 nm.

8. Chất phủ bề mặt vật thể theo điểm 1, trong đó chất không phát huỳnh quang này là thuốc nhuộm xyanin có bước sóng hấp thụ nằm trong khoảng 650 nm - 900 nm.

9. Vật thể chứa chất phủ bề mặt vật thể theo điểm 1, trong đó vật thể này được chọn từ nhóm gồm có các mô cấy y tế, các dụng cụ y tế, gạc y tế, các đĩa vi lỗ, các bề mặt chế biến thực phẩm và trang thiết bị.

10. Vật thể chứa chất phủ bề mặt vật thể theo điểm 1, trong đó vật thể này được chọn từ nhóm gồm có các kim tiêm, các ống thông, các dây dẫn, các vít, các đĩa cấy và các vít cấy.

11. Phương pháp điều chế chất phủ bề mặt vật thể theo điểm 1 chứa một hoặc nhiều polyme và peptit được liên kết đồng hóa trị với ít nhất một trong số một hoặc nhiều polyme này, trong đó peptit này chứa:

a) vị trí phân cắt bao gồm kiểu axit amin đặc hiệu được chọn từ nhóm gồm có EFRIK (SEQ ID SỐ: 1), DFRIK (SEQ ID SỐ: 2), GIGEFRIK (SEQ ID SỐ: 3) và GIGDFRIK (SEQ ID SỐ: 4), trong đó vị trí phân cắt này được phân cắt bởi hợp chất được tạo ra một cách đặc hiệu bởi vi khuẩn thuộc nhóm gồm có một số lượng giới hạn các chủng, các loài hoặc các giống vi khuẩn, và không bị phân cắt bởi bất kỳ hợp chất nào được tạo ra bởi bất kỳ vi khuẩn nào không thuộc nhóm này,

b) chất huỳnh quang có bước sóng phát xạ nằm trong khoảng 650 nm - 900 nm,

c) chất không phát huỳnh quang có bước sóng hấp thụ nằm trong khoảng 650 nm - 900 nm, dùng để dập tắt sự phát xạ của chất huỳnh quang này,

trong đó sự phân cắt ở vị trí phân cắt này làm giải phóng chất không phát huỳnh quang này ra khỏi chất phủ này, sự giải phóng chất không phát huỳnh quang này là chỉ báo về sự có mặt của vi khuẩn thuộc nhóm này, phương pháp này bao gồm các bước sau:

i) tạo bề mặt vật thể chứa một hoặc nhiều polyme, một hoặc nhiều polyme này còn chứa nhóm phản ứng A, và

ii) cho bề mặt vật thể theo bước a) tiếp xúc với peptit chứa chất huỳnh quang này, chất không phát huỳnh quang này, vị trí phân cắt này và nhóm phản ứng B bổ sung cho nhóm phản ứng A để cho nhóm phản ứng A và nhóm phản ứng B tạo liên kết đồng hóa trị để điều chế chất phủ bề mặt vật thể này.

12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó nhóm phản ứng A này được chọn từ nhóm gồm có rượu (OH), thiol (SH), amin (NH₂), axit (CO₂H), alkyn, alken, azit.

13. Phương pháp theo điểm 11, trong đó nhóm phản ứng B này được chọn từ nhóm gồm có rượu (OH), thiol (SH), amin (NH₂), axit (CO₂H), alkyn, alken, azit.

14. Phương pháp phát hiện sự phát xạ photon từ vật thể chứa chất phủ bề mặt vật thể theo điểm 1 chứa một hoặc nhiều polyme và peptit được liên kết đồng hóa trị với ít nhất một trong số một hoặc nhiều polyme này, trong đó peptit này chứa:

a) vị trí phân cắt bao gồm kiểu axit amin đặc hiệu được chọn từ nhóm gồm có EFRIK (SEQ ID SỐ: 1), DFRIK (SEQ ID SỐ: 2), GIGEFRIK (SEQ ID SỐ: 3) và GIGDFRIK

(SEQ ID SỐ: 4), trong đó vị trí phân cắt này được phân cắt bởi hợp chất được tạo ra một cách đặc hiệu bởi vi khuẩn thuộc nhóm gồm có một số lượng giới hạn các chủng, các loài hoặc các giống vi khuẩn, và không bị phân cắt bởi bất kỳ hợp chất nào được tạo ra bởi bất kỳ vi khuẩn nào không thuộc nhóm này,

b) chất huỳnh quang có bước sóng phát xạ nằm trong khoảng 650 nm - 900 nm,

c) chất không phát huỳnh quang có bước sóng hấp thụ nằm trong khoảng 650 nm - 900 nm, dùng để dập tắt sự phát xạ của chất huỳnh quang này,

trong đó sự phân cắt ở vị trí phân cắt này làm giải phóng chất không phát huỳnh quang này ra khỏi chất phủ này, sự giải phóng chất không phát huỳnh quang này là chỉ báo về sự có mặt của vi khuẩn thuộc nhóm này,

trong đó vật thể này được chọn từ nhóm gồm có các mô cấy y tế, các dụng cụ y tế, gạc y tế, các đĩa vi lỗ, các bề mặt chế biến thực phẩm và trang thiết bị, hoặc được chọn từ nhóm gồm có các kim tiêm, các ống thông, các dây dẫn, các vít, các đĩa cấy và các vít cấy,

phương pháp này bao gồm bước chiếu xạ vật thể này bằng các photon có bước sóng nằm trong khoảng 650 nm - 900 nm và phát hiện các photon được phát xạ này.

15. Phương pháp phát hiện vi khuẩn trên vật thể, phương pháp này bao gồm:

a) tạo chất phủ bề mặt vật thể theo điểm 1 chứa một hoặc nhiều polyme và peptit được liên kết đồng hóa trị với ít nhất một trong số một hoặc nhiều polyme này, trong đó peptit này chứa: vị trí phân cắt bao gồm kiểu axit amin đặc hiệu được chọn từ nhóm gồm có EFRIK (SEQ ID SỐ: 1), DFRIK (SEQ ID SỐ: 2), GIGEFRIK (SEQ ID SỐ: 3) và GIGDFRIK (SEQ ID SỐ: 4), trong đó vị trí phân cắt này được phân cắt bởi hợp chất được tạo ra một cách đặc hiệu bởi vi khuẩn thuộc nhóm gồm có một số lượng giới hạn các chủng, các loài hoặc các giống vi khuẩn, và không bị phân cắt bởi bất kỳ hợp chất nào được tạo ra bởi bất kỳ vi khuẩn nào không thuộc nhóm này; chất huỳnh quang có bước sóng phát xạ nằm trong khoảng 650 nm - 900 nm; và chất không phát huỳnh quang có bước sóng hấp thụ nằm trong khoảng 650 nm - 900 nm, dùng để dập tắt sự phát xạ của chất huỳnh quang này, trong đó sự phân cắt ở vị trí phân cắt này làm giải phóng chất không phát huỳnh quang này ra khỏi chất phủ này, sự giải phóng chất không phát huỳnh quang này là chỉ báo về sự có mặt của vi khuẩn thuộc nhóm này; và

b) nhúng phủ vật thể được chọn từ nhóm gồm có các mô cấy y tế và các dụng cụ y tế bằng chất phủ bề mặt thu được trong bước a) hoặc cho vật thể được chọn từ nhóm gồm gạc y tế, các đĩa vi lỗ, các bề mặt chế biến thực phẩm và các trang thiết bị tiếp xúc với chất phủ bề mặt thu được trong bước a).

DANH MỤC TRÌNH TỰ

< 160 > Số lượng SEQ ID : 9

< 210 > SEQ ID SỐ 1

< 211 > CHIỀU DÀI : 5

< 212 > LOẠI : PRT

< 213 > SINH VẬT : Trình tự Nhân tạo

< 220 > ĐẶC ĐIỂM :

< 223 > THÔNG TIN KHÁC : Trình tự axit amin

< 400 > TRÌNH TỰ : 1

Glu Phe Arg Ile Lys

1 5

< 210 > SEQ ID SỐ 2

< 211 > CHIỀU DÀI : 5

< 212 > LOẠI : PRT

< 213 > SINH VẬT : Trình tự Nhân tạo

< 220 > ĐẶC ĐIỂM :

< 223 > THÔNG TIN KHÁC : Trình tự axit amin

< 400 > TRÌNH TỰ : 2

Asp Phe Arg Ile Lys

1 5

< 210 > SEQ ID SỐ 3

< 211 > CHIỀU DÀI : 8

< 212 > LOẠI : PRT

< 213 > SINH VẬT : Trình tự Nhân tạo

< 220 > ĐẶC ĐIỂM :

< 223 > THÔNG TIN KHÁC : Trình tự axit amin

< 400 > TRÌNH TỰ : 3

Gly Ile Gly Glu Phe Arg Ile Lys

1 5

< 210 > SEQ ID SỐ 4

< 211 > CHIỀU DÀI : 8

< 212 > LOẠI : PRT
 < 213 > SINH VẬT : Trình tự Nhân tạo
 < 220 > ĐẶC ĐIỂM :
 < 223 > THÔNG TIN KHÁC : Trình tự axit amin

< 400 > TRÌNH TỰ : 4
 Gly Ile Gly Asp Phe Arg Ile Lys
 1 5

< 210 > SEQ ID SỐ 5
 < 211 > CHIỀU DÀI : 10
 < 212 > LOẠI : PRT
 < 213 > SINH VẬT : Trình tự Nhân tạo
 < 220 > ĐẶC ĐIỂM :
 < 223 > THÔNG TIN KHÁC : Trình tự axit amin

< 400 > TRÌNH TỰ : 5
 Gly Leu Leu Glu Phe Arg Ile Val Ala Lys
 1 5 10
 < 210 > SEQ ID SỐ 6
 < 211 > CHIỀU DÀI : 10
 < 212 > LOẠI : PRT
 < 213 > SINH VẬT : Trình tự Nhân tạo
 < 220 > ĐẶC ĐIỂM :
 < 223 > THÔNG TIN KHÁC : Trình tự axit amin

< 400 > TRÌNH TỰ : 6
 Gly Leu Leu Glu Phe Arg Ile Val Ala Cys
 1 5 10
 < 210 > SEQ ID SỐ 7
 < 211 > CHIỀU DÀI : 9
 < 212 > LOẠI : PRT
 < 213 > SINH VẬT : Trình tự Nhân tạo
 < 220 > ĐẶC ĐIỂM :
 < 223 > THÔNG TIN KHÁC : Trình tự axit amin

< 400 > TRÌNH TỰ : 7
 Leu Leu Glu Phe Arg Ile Val Ala Cys

1 5

< 210 > SEQ ID SỐ 8

< 211 > CHIỀU DÀI : 9

< 212 > LOẠI : PRT

< 213 > SINH VẬT : Trình tự Nhân tạo

< 220 > ĐẶC ĐIỂM :

< 223 > THÔNG TIN KHÁC : Trình tự axit amin

< 400 > TRÌNH TỰ : 8

Leu Leu Glu Phe Arg Ile Val Ala Lys

1 5

< 210 > SEQ ID SỐ 9

< 211 > CHIỀU DÀI : 9

< 212 > LOẠI : PRT

< 213 > SINH VẬT : Trình tự Nhân tạo

< 220 > ĐẶC ĐIỂM :

< 223 > THÔNG TIN KHÁC : Trình tự axit amin

< 400 > TRÌNH TỰ : 9

Leu Leu Glu Phe Arg Ile Val Ala Lys

1 5