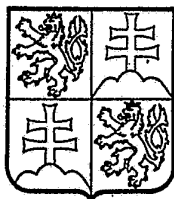


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(21) PV 7849-88.J
(22) Přihlášeno 29. 11. 88

(40) Zveřejněno 12. 07. 90
(45) Vydáno 03. 02. 92

273 409

(11)

(13) B1

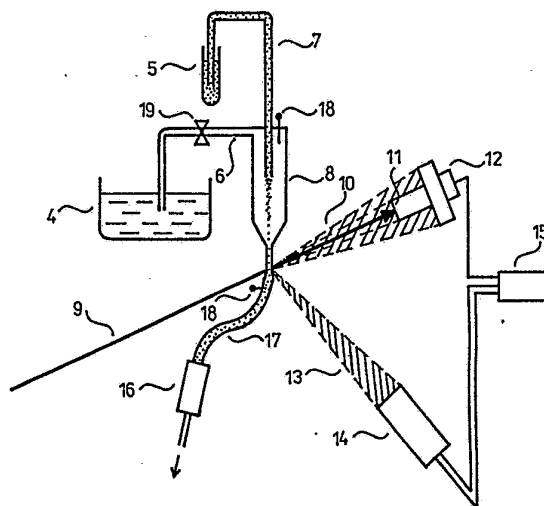
(51) Int. Cl.⁵
G 01 N 21/05

(75) Autor vynálezu PLÁŠEK JAROMÍR RNDr.CSc., PRAHA

(54)

Proudový cytometr s hydrodynamickou
fokusací vzorku

(57) Proudový cytometr s hydrodynamickou fokusací vzorku, sestávající z průtokové kyvety, zásobníků nosného média a vzorku, detekčního zařízení a laseru, přičemž do otevřeného zásobníku (4) nosného média je volně zanořen přívod (6) nosného média s regulovatelným ventilem (19) do kyvety (8), do které také zasahuje jedním koncem přívod (7) analyzovaného vzorku, jehož druhý konec je volně zanořen do otevřeného zásobníku (5) analyzovaného vzorku a k ústí kyvety (8) je trubičkou (17) připojeno sací čerpadlo (16).



Vynález se týká proudového cytometru s hydrodynamickou fokusací vzorku pro analýzu suspenzí mikroskopických částic, prováděné metodou označovanou jako proudová cytometrie. Podstata této metody spočívá v tom, že analyzované částice jsou přinuceny procházet jednotlivě světelným paprskem, přičemž vysílají charakteristické, světelné impulzy. Tyto nejsou informací o velikosti jednotlivých částic a jejich fluorescenčních vlastnostech, které mohou být vázány jak s jejich chemickým složením, tak s existencí povrchových receptorů schopných specificky vázat určité fluorescenčně značené ligandy.

Analyzovaná suspenze je tenkou tryskou zavedena do osy sloupce nosné kapaliny, která laminárně proudí zužující se průtokovou kyvetou. V zúženém ústí kyvety dochází k hydrodynamické fokusaci centrálního proudu, zpravidla na průměr 20 nm. Při koncentraci částic v suspenzi rovnající se $1 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ činí potom jejich průměrná vzdálenost v hydrodynamicky fokusovaném proudu 3 mm. Takto je zajištěno, že analyzované částice procházejí odděleně fokusovaným laserovým paprskem. Dosud známé proudové cytometry využívají k vyvolání proudění nosného média a injekci vzorku do proudové kyvety tlaku stlačeného plynu. Ventilem se nastaví tlak plynu vytlačujícího nosnou kapalinu ze zásobníku na hodnotu 1 až $1,5 \times 10^5 \text{ Pa}$. Tlak plynu vytlačující vzorek ze zásobníku je nastaven na hodnotu o 10^4 Pa větší. Během měření musí být udržován konstantní rozdíl tlaků působících na vzorek a nosnou kapalinu. K detekci pulsů rozptýleného záření a fluorescence slouží detektory. Amplitudy pulsů jsou zpracovány elektronickým blokem. U některých cytometrů je optické měření velikosti částic doplněno o konduktometrické stanovení jejich objemu, Coulterovou metodou.

Uvedené cytometry jsou konstrukčně značně náročné. Součástí cytometrů jsou dva zdroje stlačeného plynu, mezi kterými musí být udržován konstantní rozdíl. Zásobníky vzorků a nosné kapaliny musí být realizovány jako tlakové nádoby, utěsněné proti unikání stlačených plynů, působících pod tlakem 1 až $1,5 \cdot 10^5 \text{ Pa}$. Z tohoto důvodu je nutné utěsnit také hrdlo kyvety, kterým prochází přívod analyzovaného vzorku, což komplikuje konstrukci zařízení pro automatizovanou výměnu vzorků.

Výše uvedené nevýhody podstatně snižuje proudový cytometr s hydrodynamickou fokusací vzorku, sestávající z průtokové kyvety, zásobníků nosného média vzorku, detekčního zařízení a laseru, podle vynálezu. Jeho podstata spočívá v tom, že do otevřeného zásobníku nosného média je volně zanořen přívod nosného média s regulovatelným ventilem do kyvety, do které zasahuje jedním koncem přívod analyzovaného vzorku, jehož druhý konec je volně zanořen do otevřeného zásobníku analyzovaného vzorku a k ústí kyvety je trubičkou připojeno sací čerpadlo. V trubičce spojující kyvetu s sacím čerpadlem a v kyvetě mohou být umístěny elektrody k měření objemu mikroskopických částic.

Hlavní výhody proudového cytometru podle vynálezu spočívají v konstrukční jednoduchosti. K vyvolání proudění vzorku a jeho hydrodynamické fokusaci se použije jediné sací čerpadlo. Hydrodynamická fokusace se snadno reguluje poměrem světlosti přívodů analyzovaného vzorku a přívodu nosného média. Konstrukce cytometru je dále zjednodušena provedením zásobníků nosného média a vzorku ve formě otevřených nádob. Nasávání vzorku z otevřeného zásobníku je výhodné pro cytometry s automatizovanou výměnou vzorků.

Proudový cytometr je znázorněn na připojeném výkresu.

Do otevřeného zásobníku 4 nosného média je vnořen přívod 6 nosného média kyvety 8, do které zasahuje jedním koncem přívod 7 analyzovaného vzorku. Druhý konec je volně zanořen do otevřené nádoby 5 analyzovaného vzorku. Ústí kyvety 8 je trubičkou 17 připojeno na sací čerpadlo 16. V trubičce 17 a v kyvetě 8 jsou umístěny elektrody 18. Analyzované částice procházejí laserovým paprskem 9. K detekci pulsů rozptýleného záření a fluorescence slouží detektory 12, 14. Amplitudy pulsů jsou zpracovány elektronickým blokem 15.

Analyzovaný vzorek je přívodem 7 analyzovaného vzorku zaveden do osy přívodu 6 nosného média, které laminárně proudí kyvetou 8. V zúženém ústí kyvety 8 dochází k hydrodynamické fokusaci centrálního proudu. Při koncentraci částic analyzovaného vzorku $1 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ činí potom jejich průměrná vzdálenost v hydrodynamicky fokusovaném proudu 3 mm. Analyzo-

vané částice procházejí odděleně fokusovaným laserovým paprskem 9 a vysílají fluorescenci 13 a rozptýlené světlo 10, které jsou analyzovány pomocí detektorů 12, 14. Signály z fotodetektorů jsou vyhodnocovány elektronickou jednotkou 15.

Příkladem možného provedení proudového cytometru je proudová kyveta vrtaná v skleněném hranolu, jejíž přívod 7 analyzovaného vzorku má průměr 0,2 mm, ústí kyvety 8 má průměr 2 mm, výška kuželové části kyvety 8 je 8 mm, výška válcové části kyvety 8 je 20 mm. Celková výška kyvety 8 je 30 mm a její průměr je 10 mm. Ústí kyvety 8 je připojeno k rotačnímu zubovému čerpadlu 16.

Zařízení je určeno k měření koncentrace mikroskopických částic v suspenzích, k určení distribuce jejich velikostí a k měření distribuce intenzity jejich fluorescence, která vypovídá o jejich chemickém složení. Takto lze měřit například obsah nukleových kyselin v buňkách, rozlišovat různé typy krvinek a jejich koncentraci nebo měřit koncentraci receptorů na povrchu lymfocytů. Proudové cytometrie lze využívat také k měření distribuce velikostí a studiu chemického složení anorganických mikroskopických částic.

P R Ě D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Proudový cytometr s hydrodynamickou fokusací vzorku, sestávající z průtokové kyvety, zásobníků nosného média a vzorku, z detekčního zařízení a laseru, vyznačující se tím, že do otevřeného zásobníku (4) nosného média je volně zanořen přívod (6) nosného média s regulovatelným ventilem (19) do kyvety (8), do které také zasahuje jedním koncem přívod (7) analyzovaného vzorku, jehož druhý konec je volně zanořen do otevřeného zásobníku (5) analyzovaného vzorku a k ústí kyvety (8) je trubičkou (17) připojeno sací čerpadlo (16).
2. Proudový cytometr podle bodu 1, vyznačující se tím, že v trubičce (17) a kyvetě (18) jsou umístěny elektrody (18).

1 výkres

