

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

36 471

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/00 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2022-40136**
(22) Přihlášeno: **09.08.2022**
(47) Zapsáno: **19.10.2022**

- (73) Majitel:
Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně, Brno, Staré
Brno, CZ
Institute for Chemical and Bioengineering, ETH
Zürich, 8093 Zürich, CH
- (72) Původce:
Mgr. David Kovář, Ph.D., Milonice, CZ
prof. RNDr. Zbyněk Prokop, Ph.D., Brno, Královo
Pole, CZ
Stavros Stavrakis, Ph.D., 8044 Zürich, CH
Stanislav Mazurenko, Ph.D., Brno, Veveří, CZ
prof. Mgr. Jiří Damborský, Dr., Brno, Židenice, CZ
prof. Andrew deMello, Ph.D., 8044 Zürich, CH
- (74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,
170 00 Praha 7, Holešovice

- (54) Název užitného vzoru:
**Mikrofluidní zařízení pro provádění a
monitoring enzymatických reakcí**

CZ 36471 U1

Mikrofluidní zařízení pro provádění a monitoring enzymatických reakcí

Oblast techniky

5

Předmětem technického řešení je mikrofluidní zařízení umožňující provádění a současný monitoring enzymatických reakcí.

Dosavadní stav techniky

Dosavadní techniky pro monitoring kinetiky chemických, či biochemických reakcí využívají buď neprůtočné nebo průtočné uspořádání. Mezi neprůtočné přístupy lze zahrnout automatické analyzátoři, nebo automatizované linky sestávající z pipetovacích stanic, podavačů a destičkových spektrometrů [*Trends Biotechnol.* 38/8 (2020) 888-906, doi: 10.1016/j.tibtech.2020.01.001], kde jsou jednotlivé reakce separovány do reakčních kyvet, nebo jamek mikrotitračních destiček. Takováto zařízení však vyžadují vyšší objemy reagensů a značné množství spotřebního materiálu, který zatěžuje životní prostředí. Alternativně lze využít průtočné systémy, které řeší obě hlavní nevýhody zmíněné výše [*J. Anal. Methods Chem.* (2012) 450716, doi: 10.1155/2012/450716].

20

Jednoduchou, avšak ne zcela rozšířenou technikou, je průtoková injekční analýza (Flow Injection Analysis – FIA), která byla popsána i v miniaturizované formě na čipu [*Anal. Chem.* 75 (2003) 967 – 972, doi: 10.1021/ac026112l]. Ve druhé generaci odnožená sekvenční injekční analýza (Sequential Injection Analysis – SIA) nenašla zdaleka takové uplatnění, jako třetí generace průtokové injekční analýzy označovaná jako mikrosekvenční injekční analýza v uspořádání „lab-on-valve“ (μSIA-LOV), případně obdobně v uspořádání „lab-on-chip“ (μSIA-LOC) [*Anal. Sci.* 22/1 (2006) 9-14, doi: 10.2116/analsci.22.9; *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 1831-1857, doi: 10.1039/c2ja30214d].

30

U techniky FIA se vzorky nastříkují do nosné kapaliny, která může obsahovat jednu či více reagujících složek. Injektovaný vzorek difunduje a zároveň se disperguje v toku nosné kapaliny, přičemž dochází k reakci mezi promíchanými komponentami. Vhodný typ detektoru pak kontinuálně monitoruje tok mobilní fáze a výsledkem odezvy na reagující zónu je charakteristický průběh signálu označovaný jako pík – v případě pozitivního píku signál roste do maxima, naopak v případě negativního píku klesá do minima, a pak se signál vrací na původní hodnotu pozadového signálu z nosného pufru. Disperze vzorku v toku nosné kapaliny je klíčovým parametrem a nelze ji opomenout při plánování experimentu. V ideálním případě by objem nastříkovaného vzorku měl být konstantní, a toto klade další nároky na zapojení předreaktorů, mísících smyček, nebo automatických ventilů do systému. Interpretace a vyhodnocení dat při screeningu reakčních podmínek je také do značné míry ovlivněno rozmýváním reakčních zón, což se projeví i na výsledném průtokogramu výrazným rozšířením píků. Rozmývání se prohlubuje s časem, což neumožňuje delší inkubační časy (desítky minut a více). U sekvenční injekční analýzy jsou vzorky dávkovány za sebou a k jejich vzájemnému promíchání dochází až vlivem průtoku kapaliny. Dalším způsobem umožňujícím vyšší kombinovatelnost reagujících složek je aplikování reverzního toku a nástřik dalších komponent do již reagující zóny. Je-li vyžadován delší čas pro reakci, nebo je potřeba prodloužit integrační dobu na detektoru, lze průtok zastavit („stopped flow“ režim) a poté opětovně spustit. Procesy jsou elektronicky řízeny a sekvence nástřiků a průtoky jsou plně automatizovány a synchronizovány. Výhodou průtočných technik je opakovaný nástřik vzorku do toku nosného pufru a vytvoření sekvence píků. Je ovšem potřeba počítat s rozmytím zón a ponechat patřičnou prodlevu mezi jednotlivými nástřiky.

45

Nedostatky spojené s rozmýváním zón a inkubačním časem u výše zmíněných jednofázových systémů lze zcela eliminovat v mikrofluidních systémech využívajících dvoufázový systém – čili emulzi dvou vzájemně nemísitelných kapalin – nejčastěji voda v oleji (water-in-oil) nebo olej ve vodě (oil-in-water). V základním uspořádání se do toku olejové fáze nastříkuje, nebo kontinuálně

55

tlací, reakční vodná fáze a jsou generovány uniformní kapénky. Každá kapénka pak představuje izolovaný reakční kompartment, který se podle velikosti průtočných kanálků a generátorů kapének pohybuje v objemech od nanolitru po femtolitry [Appl. Phys. Lett. 98 (2011) 091916, doi: 10.1063/1.3560453]. Je-li potřeba zachovat kapénky pro další analýzu, nebo inkubovat mimo mikrofluidní systém, je nutné kapénky stabilizovat pomocí vhodného surfaktantu kompatibilního s olejovou fází a inertního k reagujícím složkám [Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 20 (2015) 183–191; doi: 10.1016/j.cocis.2015.07.005]. Slouží-li kapénky pouze k monitoringu (bio)chemických reakcí, nebo k syntéze produktů, lze pracovat bez surfaktantu. Izolaci jednotlivých zón zajistí přirozená odpudivost a nemísitelnost obou komponent. V uzavřených hadičkách nebo kanálcích o neměnném profilu pak kapénky proudí v řadě za sebou a na výsledném výstupu z detektoru tvoří sekvenci piků.

Další nespornou výhodou dvoufázového systému je možnost manipulace s hydrofobními reaktanty nebo produkty. Zejména v případech, kdy je reaktant i jen částečně rozpustný ve vodném prostředí. S vhodnou detekční esejí lze tedy monitorovat procesy, které by v čistě jednofázovém prostředí nemohly probíhat.

Dosavadní systémy však neumožňují monitoring průběhu reakcí v čase, nebo jej umožňují pouze ve velmi omezené míře. Dále je omezena úprava podmínek, například se neprovádí kontrola teploty v průběhu reakce.

Podstata technického řešení

Předmětem předloženého technického řešení je temperované mikrofluidní reakční zařízení umožňující provádět a monitorovat enzymatické reakce lokalizované v izolovaných kapénkách o objemech maximálně v řadu nanolitru, přičemž kapénky lze jednotlivě lokalizovat, a monitorovat jejich pohyb a umístění v zařízení. Poměry a koncentrace reaktantů lze v zařízení dynamicky měnit v průběhu experimentu. Zařízení umožňuje stabilizovat a monitorovat reakční teplotu v rozsahu od 0,5 °C nad teplotou okolí například do 160 °C. Vývoj reakce spřažený s luminiscentní esejí lze monitorovat pomocí optických detektorů, a díky pohyblivé reakční cívce lze provádět i kinetická měření.

Mikrofluidní zařízení podle technického řešení obsahuje reakční cívku tvořenou závití průhledné hadičky o vnějším průměru v rozmezí 360 μm až 1600 μm a s vnitřním průměrem do 500 μm, s výhodou od 1 μm do 500 μm, navinutými na vyhřívacím jádru, přičemž reakční cívka je opatřena prostředky pro posuvný pohyb cívky podél podélné osy cívky a prostředky pro otočný pohyb cívky kolem podélné osy cívky, a přičemž reakční cívka má vstup pro kapaliny, který je opatřen alespoň dvěma přívody kapalin opatřenými prostředky pro pohon kapalin reakční cívkou, a dále mikrofluidní zařízení obsahuje alespoň jeden detekční optický systém.

Kapalně reaktanty jsou vedeny přívody kapalin, které mají obvykle průměr v rozmezí 360 μm až 1600 μm, s vnitřním průměrem do 500 μm, tj. jedná se o kapiláry. Každý reaktant má svůj přívod opatřený prostředky pro pohon kapalin, tedy počet přívodů odpovídá alespoň počtu reaktantů. Je-li počet přívodů vyšší než počet reaktantů, mohou být nevyužité přívody zaslepeny.

Do přívodů kapalin, mohou být vloženy ventily, vícecestné spojky a vícecestné kohouty. Lze použít součástky používané běžně v kapalinové chromatografii či jiných kapalinových systémech. Pro každou kapalinu je vhodné mít samostatně řízenou přívodní větev regulovanou pomocí ventilů.

Prostředkem pro pohon kapalin může být čerpadlo nebo rezervoár se stlačeným plynem. Čerpadlem může být stříkačková pumpa nebo peristaltická pumpa. Stříkačkové pumpy jsou přesnější, peristaltické pumpy obvykle vykazují vyšší pulzaci dávkovaných kapalin. Samotné reakce pak probíhají ve vzájemně izolovaných kapénkách putujících v kapilárách v řadě za sebou. Lze říci, že se jedná o emulzi dvou vzájemně nemísitelných kapalin. V nejčastějším uspořádání to

jsou vodné roztoky obsahující reakční složky, přičemž tyto vodné roztoky jsou dispergované do organických rozpouštědel nemísitelných s vodou (např. oktan, butanol), nebo rostlinných, silikonových, minerálních či fluorovaných olejů. Díky rozšíření v průmyslu jsou tyto oleje snadno komerčně dostupné. Nevodná fáze může být zcela inertní, přičemž reaktanty, meziprodukty, ani produkty (bio)chemických reakcí nejsou v této nevodné fázi rozpustné a neunikají tak z kapének. Druhou alternativou je určitá rozpustnost některé, nebo vícero výše zmíněných látek v nevodné i vodné fázi, a tohoto efektu lze využít např. k dopování vodných kapének substrátem, nebo k odsávání produktů do nevodné fáze. Se znalostí rozdělovacího koeficientu ($\log P$) postačí takovouto látku detekovat v jedné z obou fází a dopočítat koncentraci ve fázi druhé.

Složení kapének lze ovlivnit vzájemným poměrem průtoků kapalin. Přesné průtoky kapalin jsou zajištěny čerpadly. Mísení a postupné přimíchávání kapalin lze realizovat pomocí kapalinových spojek různých tvarů – trojcestné Y a T, křížové i vícecestné spojky – v přívodech kapalin. Takto lze ovlivnit složení vodných i nevodných fází, které jsou na vstupu do reakční cívky použity pro vygenerování řady kapének (emulze). Jednotlivé kapaliny se v přívodech kapalin postupně slévají, tím se cíleně ovlivňuje jejich složení a těsně před reakční cívkou už vodná i nevodná fáze (fáze nemísitelná s vodou) pokračují jako jediné dva přívody. Na poslední trojcestné spojce (T, nebo Y) se do sebe obě fáze „vlévají“ a díky vzájemné nemísitelnosti obou kapalin pokračuje na reakční cívku sekvence jednotlivých kapének.

Vygenerované kapénky pak vstupují do vyhřívané reakční cívky, která slouží jako reaktor a umožňuje sběr luminiscenčního signálu. Reakční cívka obsahuje vyhřívací jádro, kolem kterého je omotána průhledná kapilára, již prochází kapénky. Vyhřívací jádro s výhodou obsahuje zdroj tepla a regulátor teploty. Regulátor teploty je s výhodou zpětnovazební. Vyhřívací jádro je s výhodou válcového tvaru. Pro snazší uchycení kapilár k vyhřívacímu jádru a pro snadné kalibrování odečítání je s výhodou ve vyhřívacím jádru válcového tvaru vysoustružen závit o definovaném stoupání. Šířka žlábků závitu pak odpovídá vnějšímu průměru použité kapiláry.

Důležitou vlastností kapilár je jejich transparentnost, tepelná stálost a chemická odolnost, z tohoto důvodu se s výhodou využívají teflonové (PTFE) nebo perfluoralkoxyalkanové (PFA) hadičky. Po průchodu kapének reakční cívkou je konec kapiláry s výhodou zaveden do odpadní nádoby.

Prostředky pro posuvný pohyb cívky podél podélné osy cívky a prostředky pro otočný pohyb cívky kolem podélné osy cívky mohou být motory, s výhodou lineární krokový motor a rotační motor.

Pomocí otáčivého pohybu kolem podélné osy reakční cívky a posunu v podélné ose lze při vhodné synchronizaci pohybů obou motorů a proudění kapének docílit trasování konkrétní kapénky. Při vypnuté rotaci cívky lze v pravidelných intervalech posouvat reakční cívku ve směru podélné osy a monitorovat intenzitu luminiscence v jednotlivých smyčkách reakční cívky. Na základě polohy smyček a rychlosti proudění kapének lze určit reakční dobu v daných smyčkách.

Detekční systém s výhodou zahrnuje kinematickou kostku osazenou asférickou čočkou umístěnou ve směru kolmo k podélné ose reakční cívky a opatřenou alespoň jedním zdrojem excitačního záření a alespoň jedním detektorem. Kinematická kostka může být volitelně dále osazena dalšími optickými komponentami, např. dichroickým filtrem, excitačními a/nebo emisními optickými filtry.

Zdroje excitačního záření a detektory, a potřeba dalších optických komponent závisí na konkrétní aplikaci, pro kterou je mikrofluidní zařízení určeno, a na konkrétní detekční esaji. Detekční systémy pro jednotlivé eseje jsou známy.

Detekční systém může zejména zahrnovat CCD detektor, fotonásobič, DAD detektor. Optický signál je možné distribuovat mezi dva různé detekční systémy, přičemž se s výhodou využije dělič světelného svazku.

V některých provedeních je detekční systém proveden následovně: V bezprostřední blízkosti reakční cívky je kolmo k její ose pevně instalovaná kinematická kostka s držákem asférické čočky. Kinematickou kostku lze osadit dichroickým filtrem, excitačními a emisními optickými filtry (fluorescence), případně ponechat prázdnou (bioluminiscence), to vše podle zvolené analytické
 5 eseje, nebo způsobu detekce (např. monochromatická detekce, spektra). Ke kinematické kostce může být připojen zdroj excitačního záření (například širokospektrý zdroj UV-VIS světla, monochromatické světlo emitující diody LED, případně laser). Intenzita excitačního záření se dá volit manuálně, nebo pomocí softwarového rozhraní. Ke kinematické kostce může být dále připojen optický detektor. Luminiscenci lze detekovat pomocí CCD spektrometru, fotonásobiče (či fotonásobičů), případně kombinací obou typů. Vedle CCD spektrometru lze alternativně využít
 10 DAD detektor. Při zapojení dvou a více detektorů je ke kinematické kostce s výhodou připojena přídatná kinematická kostka, nebo více přídatných kinematických kostek s děličem světelného svazku (např. 50/50, případně až 80/20), nebo osazených dichroickými filtry. Optický svazek může být před vstupem do každého detektoru vystředěn na plochu detektoru pomocí XY translační
 15 šterbiny s nainstalovanou asférickou čočkou.

Hardwarové komponenty mikrofluidního zařízení mohou být kontrolovány a monitorovány pomocí softwarové aplikace. V některých provedeních může být softwarová aplikace vytvořena v prostředí LabVIEW (National Instruments, USA). Softwarová aplikace uživateli dovoluje
 20 definovat průběh experimentu (průtoky, reakční teploty, pozice reakční cívky) a zajišťuje plně automatický proces experimentu a sběr dat. Naměřená data lze ukládat do dílčích binárních, nebo ASCII souborů, které je možné importovat do běžných analytických SW a dále zpracovávat.

25 Objasnění výkresů

Obr. 1: Schéma příkladu mikrofluidního zařízení pro provádění a monitoring enzymatických reakcí.

30 Obr. 2: Data získaná z mikrofluidního zařízení dle příkladu 2. Na obr. 2 jsou znázorněny kinetické křivky enzymu DspoA pro substrát 1,3-dibrompropan v koncentračním rozsahu 1 až 5 mM. Uvedeny jsou závislosti koncentrace produktu (protonů) na čase. Termodynamická data byla naměřena v teplotním rozsahu 25 až 50 °C a s intervalem 5 °C. Každý bod v grafu je výsledkem průměrné hodnoty z přibližně 20 měřených kapének. Data jsou proložena nejvhodnějším modelem (plná čára) nalezeným pomocí globální analýzy.
 35

Obr. 3: Na základě globální analýzy dat, ukázaných na Obr. 2, byly vypočteny hodnoty pro čísla přeměny (k_{cat}), rychlostní konstanty (k_{cat}/K_m) a termodynamická data. Sloupcové grafy dokládají vypočtené hodnoty včetně odchylek. Pro srovnání byly doplněny hodnoty (šedé sloupce) pro referenční enzymy (LinB vs. 1-chlorhexan a vylepšenou variantu LinB86 vs. 1,2-dibromethan).
 40 Dále jsou graficky ukázány vypočtené příspěvky aktivační entalpie (ΔH^\ddagger) a entropie ($-T \cdot \Delta S^\ddagger$) na Gibbsovu energii (ΔG^\ddagger) odvozené z teplotních závislostí k_{cat} a k_{cat}/K_m s referenční teplotou 37 °C.

45 Příklady uskutečnění technického řešení

Příklad 1: Mikrofluidní zařízení

Mikrofluidní zařízení podle tohoto příkladu je znázorněno na obr. 1.

50

Srdcem mikrofluidního zařízení je reakční cívka RC tvořená transparentní PFA hadičkou omotanou kolem vyhřívacího jádra – kovového válečku s odporovou patronkou (6,5x40 mm, 100 W, Farnell, Švýcarsko). Cívka se díky krokovému lineárnímu motoru M1 pohybuje v podélné ose a díky rotačnímu motoru M2 se může otočně pohybovat kolem podélné osy. Kapaliny jsou
 55 dávkovány pomocí sady čerpadel SČ, jejichž počet se volí s ohledem na počet roztoků plánovaných

v experimentu. Od čerpadel vedou přívody kapalin a postupně se spojují až ke vstupu do reakční cívky RC. Detekční optický systém mikrofluidního zařízení je v základním uspořádání složen z kinematické kostky osazené dichroickým filtrem F, která odráží excitační záření ze světelného zdroje S na asférickou čočku AC, která je umístěna ve vhodné vzdálenosti od reakční cívky RC.
 5 Emitované světlo je stejnou čočkou AC vedeno zpět, prochází dichroickým filtrem F a je snímáno optickým detektorem D.

Sada čerpadel SC vtláče do systému kapalně reaktanty, které po průchodu kapilárami a kapalinovými spojkami v přívodech kapalin vygenerují kapénky.

10 Vygenerované kapénky pak vstupují do vyhřívané reakční cívky RC, která slouží jako reaktor a umožňuje sběr luminiscenčního signálu. Teplota reakční cívky RC je snímána a regulována pomocí univerzálního regulátoru (CN7800, Omega, USA) se zpětnou vazbou na teplotní čidlo uvnitř válečku a sadu teplotních čidel na povrchu válečku monitorovaných kompaktní kartou pro
 15 sběr dat a doplněnou teplotním modulem (cDAQ-9171 a NI-9213, National Instruments, USA). Kapilára s kapénkami je omotána kolem tohoto válečku a pro snazší uchycení a kalibrované odečítání je ve válečku vysoustružen závit o definovaném stoupání. Šířka žlábků pak odpovídá vnějšímu průměru použité kapiláry. Po průchodu kapének reakční cívkou je konec kapiláry zaveden do odpadní nádoby.

20 Pro pohyb reakční cívky RC je v zařízení plošinka, poháněná lineárním krokovým motorem M1 (LTS150/M, Thorlabs, Německo), na které je nainstalován držák rotačního krokového motoru M2 (CR1/M-Z7E, Thorlabs, Německo). Reakční cívka RC je připojena k rotačnímu motoru M2 v podélné ose k lineárnímu motoru M1. Pomocí otáčivého pohybu kolem středové osy reakční
 25 cívky RC a posunu v podélné ose lze při vhodné synchronizaci pohybů obou motorů M1, M2 a proudění kapének docílit trasování konkrétní kapénky. Při vypnuté rotaci cívky RC lze v pravidelných intervalech posouvat reakční cívku RC ve směru podélné osy a monitorovat intenzitu luminiscence v jednotlivých smyčkách reakční cívky RC. Na základě polohy smyček a rychlosti proudění kapének lze určit reakční dobu v daných smyčkách.

30 Detekční optický systém je závislý na konkrétní aplikaci a detekční esaji. Ve znázorněném provedení je v bezprostřední blízkosti reakční cívky RC kolmo k její ose pevně instalovaná kinematická kostka s držákem asférické čočky AC. Kinematickou kostku lze osadit dichroickým filtrem F, excitačními a emisními optickými filtry (fluorescence), případně ponechat prázdnou
 35 (bioluminiscence), to vše podle zvolené analytické esaje, nebo způsobu detekce (monochromatická detekce, spektra). Ke kinematické kostce lze připojit vhodný zdroj S excitačního záření (například širokospektrý zdroj UV-VIS světla, monochromatické světlo emitující diody LED, případně laser). Ke kinematické kostce může být osazen optický detektor D. Optický svazek je před vstupem do detektoru vystředěn na plochu detektoru pomocí XY translační štěrbiny s nainstalovanou
 40 asférickou čočkou AC.

Hardwarové komponenty jsou kontrolovány a monitorovány pomocí softwarové aplikace, vytvořené v prostředí LabVIEW (National Instruments, USA), která uživateli dovoluje definovat průběh experimentu (průtoky, reakční teploty, pozice reakční cívky) a zajišťuje plně automatický
 45 proces experimentu a sběr dat. Naměřená data jsou ukládána do dílčích binárních souborů (*.TDMS), které je možné importovat do běžných analytických SW a dále zpracovávat.

Příklad 2: Měření s využitím mikrofluidního zařízení

50 Mikrofluidní zařízení bylo použito pro měření kinetických a termodynamických parametrů šesti enzymů s halogenalkandehalogenasovou aktivitou. Tento typ enzymů hydrolyticky přeměňuje halogenované uhlovodíky na příslušné alkoholy a halogenovodíkové kyseliny. Díky tomu lze ve slabě pufovaných roztocích zachytit vývoj reakce změnou pH, a tuto změnu lze monitorovat pomocí fluorescenčního indikátoru HPTS (8-hydroxypyren-1,3,6-trisulfonová kyselina; Sigma-
 55 Aldrich, Německo) citlivého právě na změnu pH. V důsledku snižujícího pH se snižuje intenzita

fluorescence emitované tímto indikátorem. Substrát – halogenovaný uhlovodík 1,3-dibrompropan (Sigma-Aldrich, Německo) byl nejprve rozpuštěn ve fluorovaném oleji Fluorinert FC-40 (3M, USA) a koncentrace tohoto zásobního roztoku byla změřena pomocí plynového chromatografu 7890A s hmotnostním spektrometrem 5975C (Agilent Technologies, USA). Koncentraci substrátu putující do reakční cívky lze jednoduše kontrolovat pomocí sekundární stříkačky obsahující čistý olej. Toho se dosáhne prostou změnou poměrů průtoků mezi oběma oleji (čistý olej a olej s rozpuštěným substrátem), přičemž celkový průtok olejové fáze zůstává konstantní (typicky $20 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$). Přesné a dlouhodobé dávkování kapalin bylo zajištěno pomocí stříkačkových pump neMesys (Cetoni, Německo). Olejová větev mikrofluidního systému byla tvořena dvěma stříkačkami o vnitřním objemu 25 ml (Luer-lock GASTIGHT, Hamilton, USA), které byly spojeny do jediného výstupu pomocí Y-spojky (P-512, IDEX Health & Science, USA). Substrát z oleje difunduje do vodné kapénky, a na základě znalosti rozdělovacího koeficientu bylo možné dopočítat koncentraci substrátu, který vstupoval do reakce. Vodná fáze slabého pufru (1 mM HEPES s 20 mM Na_2SO_4 , pH 8,2) obsahovala enzym ($50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) a fluorescenční indikátor HPTS ($50 \mu\text{M}$) citlivý na změnu pH. Část tohoto reakčního roztoku byla titrována bromovodíkovou kyselinou (HBr) o známé koncentraci a byla sestrojena kalibrační křivka zohledňující pufrací kapacitu enzymu.

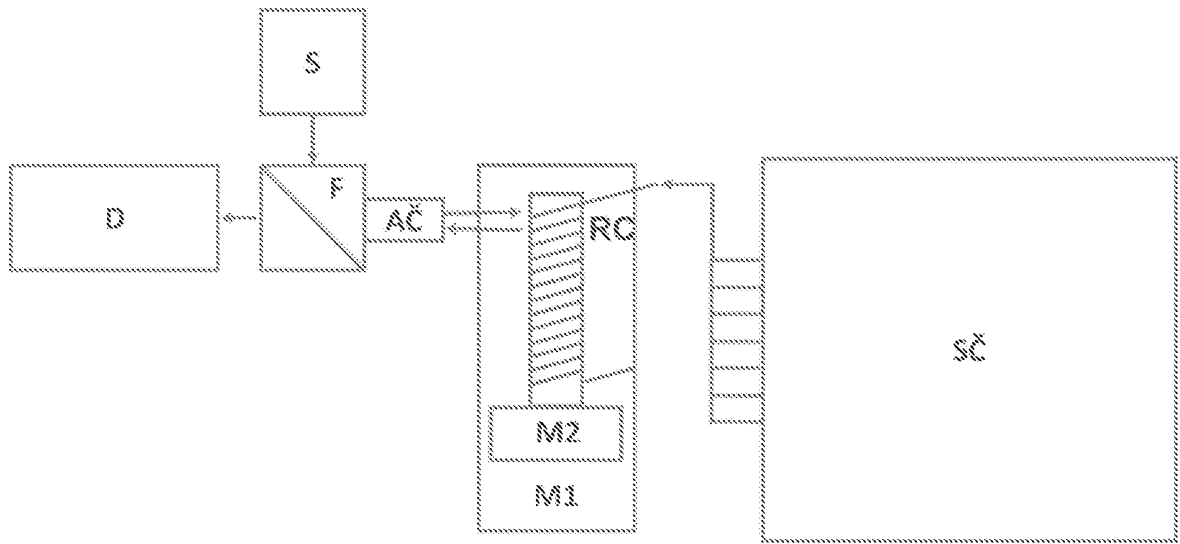
Tříbodová kalibrace systému byla dostatečná pro vyhodnocení změny koncentrace protonů (pH) prostřednictvím změny fluorescence HPTS. Za tímto účelem se z výchozího reakčního roztoku vydělily dvě frakce roztoků a každá z nich se kyselinou nastavila na požadované pH (typicky o 0,6 a 1,2 jednotky pH nižší, než výchozí 8,2). Ke kalibraci mikrofluidního zařízení se postupně generovaly kapénky ze všech tří roztoků. Vstup vodné fáze z jednotlivých stříkaček (10 ml Luer-lock GASTIGHT, Hamilton, USA) byl zajištěn pomocí křížové spojky (P-891, IDEX Health & Science, USA). Výstup z této spojky a z výše popsané olejové Y-spojky byl napojen na další Y-spojku, která sloužila jako generátor kapének a odtud pokračovala jediná hadička jakožto vstup reakční cívky RC. Hodnota pH, intenzita fluorescence a podobně i rozdělovací koeficient, jsou závislé na teplotě. Kalibrace fluorescence na koncentraci protonů se tedy prováděla pro každou teplotu, stejně jako se pro každou teplotu přepočítávala koncentrace substrátu v kapénkách. V typickém uspořádání se na každé smyčce reakční cívky sesbírala data o intenzitě fluorescence přibližně z 15 až 20 kapének. Indikátor HPTS byl excitován pomocí S LED zdroje M470L3 a v kinematické kostce byl osazen dichroický filtr F DMLP490R (obojí Thorlabs, Německo). Jako detektor D byl použit optovláknový CCD spektrometr QE Pro (OceanOptics, USA). Z přepočtených a zprůměrovaných koncentrací produktu (H^+) byly sestrojeny reakční křivky (typické reakční křivky jsou ukázány na Obr. 2) a pomocí globální analýzy v SW aplikaci KinTek Explorer (KinTek Corporation, USA) byly vyhodnoceny kinetické a termodynamické parametry enzymaticky katalyzovaných reakcí (Obr. 3).

NÁROKY NA OCHRANU

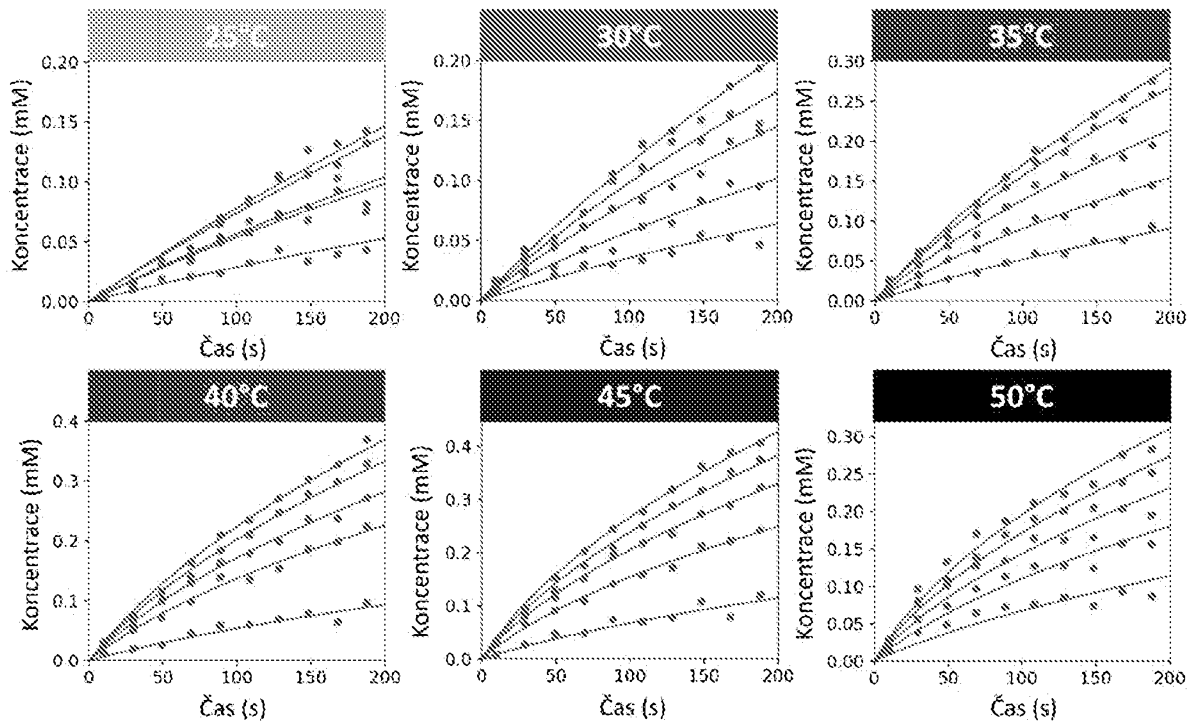
- 5 1. Mikrofluidní zařízení pro provádění a monitoring enzymatických reakcí, **vyznačující se tím**, že obsahuje reakční cívku (RC) tvořenou závitou průhledné hadičky o vnějším průměru v rozmezí 360 μm až 1600 μm a s vnitřním průměrem do 500 μm , s výhodou od 1 μm do 500 μm , navinutými na vyhřívacím jádru, přičemž reakční cívka (RC) je opatřena prostředky pro posuvný pohyb cívky podél podélné osy cívky a prostředky pro otočný pohyb cívky kolem podélné osy cívky, a přičemž reakční cívka (RC) má vstup pro kapaliny, který je opatřen alespoň dvěma přívody kapalin opatřenými prostředky pro pohon kapalin reakční cívkou (RC), a dále mikrofluidní zařízení obsahuje alespoň jeden detekční optický systém.
- 10 2. Mikrofluidní zařízení podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že do přívodů kapalin jsou vloženy ventily, vícecestné spojky a vícecestné kohouty.
- 15 3. Mikrofluidní zařízení podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že prostředkem pro pohon kapalin je čerpadlo nebo rezervoár se stlačeným plynem, s výhodou je prostředkem pro pohon kapalin stříkačková pumpa nebo peristaltická pumpa.
4. Mikrofluidní zařízení podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že vyhřívací jádro obsahuje zdroj tepla a regulátor teploty, přičemž regulátor teploty je s výhodou zpětnovazební.
5. Mikrofluidní zařízení podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, **vyznačující se tím**, že vyhřívací jádro je válcového tvaru a je v něm vysoustružen závit stoupání.
- 20 6. Mikrofluidní zařízení podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5, **vyznačující se tím**, že prostředky pro posuvný pohyb cívky podél podélné osy cívky zahrnují lineární krokový motor (M1) a prostředky pro otočný pohyb cívky kolem podélné osy cívky zahrnují rotační motor (M2).
- 25 7. Mikrofluidní zařízení podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6, **vyznačující se tím**, že detekční optický systém zahrnuje kinematickou kostku osazenou asférickou čočkou (AČ) umístěnou ve směru kolmo k podélné ose reakční cívky (RC) a opatřenou alespoň jedním zdrojem (S) excitačního záření a alespoň jedním detektorem (D), přičemž kinematická kostka může být volitelně dále osazena dichroickým filtrem (F), excitačními a/nebo emisními optickými filtry.

3 výkresy

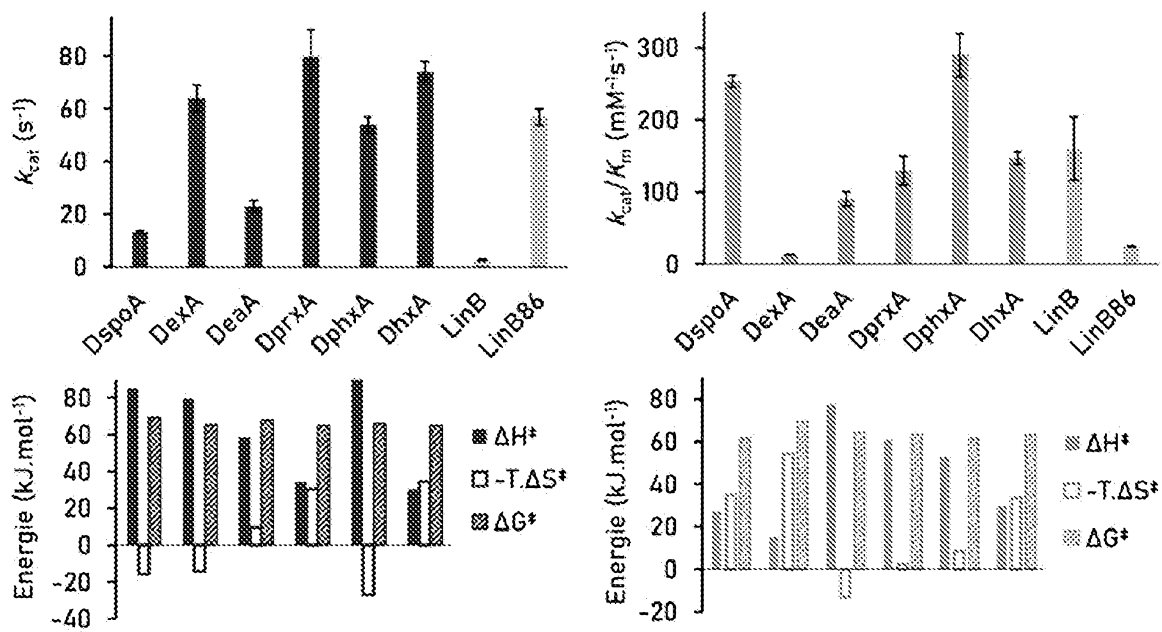
30



Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3