

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2013-39

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

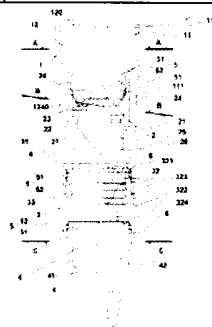
(22) Přihlášeno: **18.01.2013**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **30.07.2014**
(Věstník č. 31/2014)

(71) Přihlašovatel:
Wolf & Danniell s.r.o., Mladá Boleslav, CZ
Technická univerzita v Liberci, Liberec, CZ

(72) Původce:
MUDr. Jan Wolf, Dvůr Králové nad Labem, CZ
prof. Ing. Jaroslav Beran, CSc., Liberec 30, CZ
Ing. Jiří Komárek, Jablonec nad Nisou, CZ
Ing. Jozef Kaniok, Ph.D., Liberec 15, CZ
doc. Ing. Martin Bílek, Ph.D., Liberec, CZ
Ing. Martin Konečný, Ph.D., Bratislava, SK
Ing. Petr Žabka, Liberec 12, CZ

(74) Zástupce:
Ing. Dobroslav Musil, patentová kancelář, Ing.
Dobroslav Musil, Cejl 38, 602 00 Brno



(54) Název přihlášky vynálezu:

Prostředek pro izolaci nukleových kyselin a způsob prováděný pomocí tohoto prostředku

(57) Anotace:

Řešení popisuje způsob manipulace se vzorky biologického materiálu, zejména pro molekulární diagnostiku nebo pro izolaci nukleových kyselin. Vzorek biologického materiálu se na počátku procesu vloží do vkladací komory (11) prostředku pro manipulaci se vzorky biologického materiálu, v jehož zásobních komorách (12) byly před tím oddělené od sebe uloženy všechny pro příslušný proces potřebné reagenční chemikálie, přičemž následující etapy procesu probíhají uvnitř prostředku bez přímé manipulace obsluhy s reagenčními chemikáliemi, které se postupně mísí a reagují, přičemž nežádoucí zbytky z reakcí se ukládají do odpadní komory (41), která se nachází rovněž uvnitř prostředku a je bezpečně oddělena od ostatních prostor prostředku, obsluhy i okolí.

Způsob manipulace se vzorky biologického materiálu a prostředek pro takovou manipulaci

Oblast techniky

- 5 Vynález se týká způsobu manipulace se vzorky biologického materiálu, zejména pro molekulární diagnostiku nebo pro izolaci nukleových kyselin a z nich případnou následnou detekci určitého genomu, například patogenního, a/nebo diagnostiku geneticky podmíněných chorob živých organismů.

- 10 Dále se vynález týká prostředku pro manipulaci se vzorky biologického materiálu, zejména pro molekulární diagnostiku nebo pro izolaci nukleových kyselin a z nich případnou následnou detekci určitého genomu, například patogenního, a/nebo diagnostiku geneticky podmíněných chorob živých organismů.

Dosavadní stav techniky

- Molekulární *in vitro* diagnostika založená na přímém průkazu cílové sekvence DNA je dnes jedním z nejprogresivněji rostoucích segmentů trhu laboratorní *in vitro* diagnostiky. Tradičně nachází uplatnění v diagnostice tuberkulózy, kde nahradila zdlouhavé (3-9 týdnů) a málo citlivé (104 bakterií / 20 1ml vzorku) mikroskopické vyšetření, dále v diagnostice sexuálně přenosných chorob (chlamydiové infekce, syfilis) nebo v diagnostice virových onemocnění s nízkou protilátkovou odpovědí nebo příliš rychlým průběhem (virové hepatitidy B a C, herpetická meningoencefalitida, cytomegaloviroza). Stále častěji však bývá molekulární diagnostika využívána také v diagnostice respiračních infekcí 25 (byla jedním z prvních dostupných testů pro diagnostiku SARS) nebo nosokomiálních nákaz (metilicilin rezistentní stafylokokové infekce – MRSA) 2. Jedním z nedostatků molekulární diagnostiky je její značná náročnost jak na personál, tak na přístrojové vybavení. Ačkoliv samotná metodika molekulární detekce infekčního agens trvá při současném stavu techniky 2-4 hodiny, 30 laboratoře nejsou schopné optimalizovat při náročnosti metodiky svoji práci tak, aby výsledek v tomto čase dodaly.

Běžné je dnes (v ČR) dodání výsledků do 3-5 pracovních dnů, což však neumožňuje lékařům včasný a cílený zásah do léčebného schématu a vede ve svém důsledku (mimo jiné) k nadměrnému užívání antibiotik se všemi negativními důsledky pro společnost, jak ekonomickými v podobě vysokých primárních nákladů na lékovou politiku, tak epidemiologickými v podobě vzniku rezistence na běžná antibiotika se vznikem sekundárních nákladů za antibiotika speciální.

V současné době jsou dostupné dva typy molekulární diagnostiky, tzv. uzavřený typ a otevřený typ.

- 10 **Uzavřeným typem** se označují řešení, u nichž stejný výrobce dodává diagnostické soupravy i samotný laboratorní přístroj. Laboratorní přístroj je určený k vyšetření pouze s diagnostickými soupravami stejného výrobce, nelze jej použít s diagnostickými soupravami jiných dodavatelů. Výhodou tohoto řešení je pro zákazníka větší odpovědnost, kterou výrobce za výsledek vyšetření přejímá, garance daná dobrým jménem společnosti výrobce a v 15 některých případech vyšší stupeň automatizace. Nevýhodou bývají vyšší provozní náklady takového řešení a určitá smluvní nesvoboda zákazníka. Typickým zákazníkem bývá velká laboratoř s vysokými nároky na standardizaci metod a automatický provoz.
- 20 **Otevřený typ** řešení vychází vstříc menším laboratořím. Umožňuje koupit některý z laboratorních přístrojů volně dostupných na trhu a kombinovat jej s diagnostickou soupravou kteréhokoli jiného výrobce, popřípadě vyvinout si pro vyšetření metody vlastní. Výhodou jsou smluvní volnost a možnost 25 snižovat náklady na jedno vyšetření, nevýhodou bývá méně kvalitní zákaznická podpora ze strany výrobců a vyšší nároky na udržení požadovaného stupně kvality prováděných vyšetření.

Nevýhodou dosud známých řešení je potřeba školeného personálu v laboratořích, dlouhé časy dodání výsledků, vysoká cena přístroje a vysoké náklady na jedno vyšetření a zejména nebezpečí kontaminace životního prostředí nebezpečnými látkami, neboť dávkování reagenčních chemikálií do 30 zkumavek se v laboratořích provádí ručně pomocí pipet a podobně.

Cílem vynálezu je navrhnout a vytvořit způsob manipulace a prostředek pro manipulaci se vzorky biologického materiálu, který by zcela zabraňoval možnosti kontaktu obsluhy se vzorkem nebo reakčními chemikáliemi a zabraňoval jakémukoliv úniku reakčních činidel mimo prostředek pro manipulaci. Vynález by měl zároveň umožnit přesunutí molekulární diagnostiky z laboratorní přímo na místo, kde se nachází pacient, tedy Point of care testing (POCT) v důsledku zjednodušení manipulace se vzorky a umožnění zpracování každého vzorku samostatně při zachování laboratorní kvality a zkrácení času do dosažení výsledku na možné minimum, které v současné době představuje 2-4 hodiny.

Podstata vynálezu

Cíle vynálezu je dosaženo způsobem podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že vzorek biologického materiálu se na počátku procesu vloží do jedné komory manipulačního prostředku, v jehož dalších komorách byly před tím odděleně od sebe uloženy všechny pro příslušný proces potřebné reagenční chemikálie, přičemž následující etapy procesu probíhají uvnitř manipulačního prostředku bez přímé manipulace obsluhy s reagenčními chemikáliemi, které se postupně mísí a reagují, přičemž nežádoucí zbytky z reakcí se ukládají do odpadního prostoru, který se nachází rovněž uvnitř manipulačního prostředku a je bezpečně oddělen od ostatních prostor manipulačního prostředku, obsluhy i okolí. To zjednodušuje způsob manipulace se vzorky biologického materiálu a umožňuje provádět takovou manipulaci přímo na místě, kde se nachází pacient – point of care testing (POCT), místo v laboratořích.

Při tom je výhodné, když vzorek biologického materiálu se uvnitř manipulačního prostředku v jeho směšovací komoře smísí s lyzačním enzymem a současně nebo následně se z příslušné zásobní komory manipulačního prostředku přidá lyzační pufr a po dalším promíchání se směs ve směšovací komoře podrobí inkubaci, během níž se roztok směsi opakovaně promíchává a probíhá lyze roztoku, až vznikne lyzovaná směs, následně se k lyzované směsi přivede z další zásobní komory manipulačního prostředku precipitační činidlo, s výhodou etanol nebo isopropanol, načež se lyzovaná směs s precipitačním

činidlem homogenizuje a v průběhu reakce s precipitačním činidlem dochází ke srážení volné nukleové kyseliny, tedy k její precipitaci. Po precipitaci se směs přivede na separační membránu uspořádanou uvnitř manipulačního prostředku, přes kterou se přefiltruje do odpadního prostoru, který je vytvořen uvnitř
5 manipulačního prostředku, přičemž separační membrána zadrží zbytky buněčných struktur a precipitovanou nukleovou kyselinu, načež se zbytky buněčných struktur ze separační membrány odstraní propláchnutím promývacím puřem, který se přivede z další zásobní komory manipulačního prostředku, načež se uzavře odpadní prostor a k separační membráně se z
10 další zásobní komory manipulačního prostředku přivede eluční puř, který se nechá působit na separační membránu a následně projde separační membránou do reakční komory manipulačního prostředku, přičemž v roztoku je izolována příslušná nukleová kyselina ze zkoumaného vzorku biologického materiálu. To znamená, že všechny reakce potřebné k izolaci příslušné
15 nukleové kyseliny ze zkoumaného vzorku biologického materiálu proběhnou uvnitř manipulačního prostředku.

Pro urychlení procesu probíhá inkubace směsi při teplotě vyšší, než je teplota okolí, s výhodou 70 °C po dobu 10 až 30 min .

Dalšího urychlení a zkvalitnění procesu se dosáhne tím, že se teplota
20 separační membrány před přivedením elučního puřu zvýší nad teplotu okolí, s výhodou na 70 °C na dobu 3 min.

Pro urychlení startu a snížení počtu zásobních komor se vzorek biologického materiálu po zahájení procesu přivede do směřovací komory, do níž byl před tím umístěn lyzační enzym.

25 Ze stejných důvodů je výhodné, je-li lyzační enzym součástí lyzačního puřu.

Zrychlení průchodu směsi separační membránou se dosáhne působením odstředivé síly.

30 Ve výhodném provedení je separační membrána tvořena ionexovou membránou.

Po izolaci nukleové kyseliny může v reakční komoře probíhat polymerázová řetězová reakce, přičemž její výsledky lze snadno detekovat přes

stěnu reakční komory, která je s výhodou průhledná. V případě neprůhledné stěny reakční komory lze detekci provádět použitím radioaktivního záření.

Cíle vynálezu je dosaženo rovněž prostředkem pro manipulaci se vzorky biologického materiálu podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že v jednom uzavřeném celku obsahuje zásobní komory pro vzájemně oddělené uvolnitelné uložení reagenčních chemikálií, vkladací komoru pro vložení vzorku biologického materiálu, jímž je přiřazena směšovací komora, jejímuž výstupu je přiřaditelná filtrační komora, jejímuž výstupu je přes separační membránu přiřaditelná odpadní komora nebo reakční komora, přičemž pouze vkladací komora je opatřena pro obsluhu otevíratelným a uzavíratelným víčkem. Vzhledem k tomu, že všechny reakce probíhají v jednom uzavřeném celku bez možnosti přístupu k reagenčním chemikáliím a bez nutnosti takového přístupu, umožňuje takový prostředek provádět molekulární diagnostiku přímo na místě POCT, bez nároku na speciální prostory a speciálně školený personál.

V obecném provedení jsou zásobní komory a vkladací komora uspořádány v zásobníkové části, na kterou navazuje směšovací část opatřená směšovací komorou, jejímuž vstupu jsou volitelně přiřaditelné jednotlivé komory zásobníkové části, které jsou spřáhnutelné s otevíracím prostředkem pro vypuštění jejich obsahu do směšovací komory, přičemž výstupu směšovací komory je přiřaditelný vstup filtrační komory filtrační části, jejímuž výstupu je volitelně přiřaditelná odpadní komora nebo reakční komora reakční části, zásobníková část, přičemž směšovací část, filtrační část a reakční část jsou tvořeny samostatnými tělesy, která jsou vzájemně spojena, přičemž spojení umožňuje vzájemný pohyb a zajišťuje těsnost.

Toto obecné provedení má dvě možnosti konkrétního provedení, kdy jsou jednotlivé části spojeny buď otočně nebo suvně, přičemž je alespoň jedna z nich opatřena prostředkem pro spřažení s pohonem, alespoň jedna z nich je opatřena prostředkem pro fixaci její polohy a zbývající části jsou opatřeny prostředky pro přenos pohybu od části spřažené s pohonem.

V jednom z výhodných provedení je separační membrána tvořena ionexovou membránou.

Pro snadné otevírání zásobních komor a vkládací komory jsou tyto v dolní části opatřeny výstupky, jimž je přiřazen otevírací prostředek, který je s výhodou tvořen břitem pevně uloženým ve směšovací komoře. Uříznutím spodní částí výstupku příslušné komory je zajištěno uvolnění jejího obsahu a jeho transport do směšovací komory a v případě, že tato je již otevřena, transport do dalších částí prostředku.

Objasnění výkresů

Prostředek pro manipulaci se vzorky biologického materiálu podle vynálezu je schematicky znázorněn na přiložených výkresech, kde značí obr. 1 podélný řez prvním příkladným provedením prostředku pro manipulaci se vzorky biologického materiálu, obr. 2 řez A-A z obr. 1, obr. 3 řez B-B z obr. 1, obr. 4 řez C-C z obr. 1, obr. 5 pohled na první příkladné provedení prostředku a obr. 6 řez druhým příkladným provedením prostředku.

Příklady uskutečnění vynálezu

Prostředek pro manipulaci se vzorky biologického materiálu, zejména pro molekulární diagnostiku nebo pro izolaci nukleových kyselin a z nich případnou následnou detekci určitého genomu, například patogenního, a/nebo diagnostiku geneticky podmíněných chorob živých organismů bude popsán na příkladných provedeních, která slouží k vysvětlení konstrukce a funkce prostředku a nikoliv k omezení řešení pouze na tato provedení. Prostředek pro manipulaci je znázorněn a popisován ve svislé poloze, což nevylučuje možnost zaujímat během jeho funkce jiné polohy. Prostředek pro manipulaci obsahuje čtyři základní části, které jsou ve znázorněném provedení vzájemně otočně spojeny. V horní části je vytvořena zásobníková část 1, na kterou směrem dolů navazuje směšovací část 2, na kterou směrem dolů navazuje filtrační část 3, pod níž se nachází odpadní a reakční část 4. Jednotlivé části 1, 2, 3, 4 jsou vzájemně otočně spojeny zámkou 5, které jsou tvořeny výstupkem 51 na vnitřní ze spojovaných částí a drážkou 52 ve vnější ze spojovaných částí. Jednotlivé části 1, 2, 3, 4 jsou zároveň vzájemně utěsněny, například pomocí o-kroužků 6 znázorněných na obr. 1 nebo jiným vhodným známým způsobem. Tím je

zabráněno úniku reakční směsi mimo vymezený prostor prostředku či do okolí a nežádoucímú mísení zbytků z reakcí a výsledku reakcí.

V příkladu provedení znázorněném na obr. 1 až 5 je zásobníková část 1 uložena v objímce vytvořené ve směšovací části 2, takže výstupek 51 zámku 5 je vytvořen na obvodu zásobníkové části 1 a drážka 52 zámku je vytvořena ve směšovací části 2. Směšovací část 2 je na své výstupní straně opatřena objímkou, v níž je uložena filtrační část 3, takže výstupek 51 zámku je vytvořen na obvodu filtrační části 3 a drážka 52 zámku je vytvořena ve směšovací části 2. Filtrační část 3 je na své výstupní straně opatřena objímkou, v níž je uložena odpadní a reakční část 4, takže výstupek 51 zámku 5 je vytvořen na obvodu odpadní a reakční části 4 a drážka 52 zámku je vytvořena ve filtrační části 3.

Zejména pokud jsou prostředky pro manipulaci se vzorky biologického materiálu podrobovány během manipulace působení odstředivé síly ve směru od zásobníkové části 1 k odpadní a reakční části 4, je výhodné opačné vzájemné uspořádání spojení jednotlivých částí 2, 3, 4. To znamená, že při spojení filtrační části 3 odpadní a reakční části 4 je objímka vytvořena v odpadní a reakční části 4 a v této objímce je uložena filtrační část 3, takže výstupek 51 zámku je vytvořen na obvodu filtrační části 3 a drážka 52 zámku je vytvořena v odpadní a reakční části 4. Filtrační část 3 je na své vstupní straně opatřena objímkou, v níž je uložena směšovací část 2, takže výstupek 51 zámku je vytvořen na obvodu směšovací části 2 a drážka 52 zámku je vytvořena ve filtrační části 3. Spojení směšovací části 2 a zásobníkové části je tímto způsobem provedeno již ve znázorněném provedení. I toto spojení však může být vytvořeno opačně, to znamená, že objímka může být vytvořena na zásobníkové části 1 a v ní bude uložena směšovací část 2. Výstupek 51 zámku je pak vytvořen na obvodu směšovací části 2 a drážka 52 zámku je vytvořena v zásobníkové části 2.

Výše popsaná provedení zámků lze podle potřeby vzájemně kombinovat.

Zásobníková část 1 obsahuje vkladací komoru 11 pro vložení zkoumaného vzorku biologického materiálu, která je opatřena otevíratelným víkem 110. Zásobníková část 1 dále obsahuje zásobní komory 12, kterých je ve znázorněném provedení sedm a které slouží pro vzájemně oddělené

uvolnitelné uložení reagenčních chemikálií a po vložení reagenčních chemikálií jsou uzavřeny společným pevným víkem 120. Zásobníková část 1 je ve znázorněném provedení tvořena horní válcovou částí, která se směrem dolů zužuje do dolní válcové části, pod níž je vkladací komora 11 zakončena kapkovitým výstupkem 111 a jednotlivé zásobní komory 12 jsou zakončeny kapkovitými výstupky 1210 až 1270, jejichž stěna je ve výhodném provedení ztenčená. Na obvodu zásobníkové části 1 jsou vytvořeny dva polohovací výstupky 13, které slouží pro polohování prostředku pro manipulaci se vzorky biologického materiálu během diagnostiky, například v centrifuze.

10 V důsledku svého uložení zasahuje zásobníková část 1 svou dolní válcovou částí do vstupního prostoru směšovací části 2. Vstupní prostor směšovací části 2 je tvořen válcovou dutinou 21, v níž je uloženo sítko 22, v němž je uložen nůž 23, zasahující svým ostřím mezi kapkovité výstupky 112, 122 komor 11, 12 zásobníkové části 1 a sloužící k odříznutí jejich konců. Kolem
15 válcové dutiny 21 je na obvodu směšovací části vytvořen ozubený pastorek 24. Pod válcovou dutinou 21 je ve směšovací části 2 vytvořena směšovací komora 25, která se směrem dolů zužuje až k výstupnímu otvoru 26, který je vytvořen ve dně 27 směšovací části 2. Kolem výstupního otvoru 26 je v dolní straně dna 27 uloženo těsnění tvořené ve znázorněném provedení o-kroužkem 6, které
20 dosedá na víko 31 filtrační části 3 a zabraňuje úniku reagensů ze směšovací komory 25, dokud se její výstupní otvor 26 při vzájemném otáčení směšovací části 2 a filtrační části 3 nedostane nad vstupní otvor 321 filtrační komory 32.

Filtrační část 3 má v podstatě válcový tvar, přičemž filtrační komora 32 je ve znázorněném provedení tvořena válcovou dutinou a zbývající vnitřní prostor
25 je tvořen odlehčovací dutinou 33. Ve filtrační komoře 32 je uložena alespoň jedna separační membrána 322. Ve znázorněném provedení jsou ve filtrační komoře 32 uloženy dvě separační membrány 322, mezi nimiž je uložen oddělovací prstenec 323. Oddělovací prstenec 323 je podle znázorněného provedení uspořádán také nad horní separační membránou 322. Ve dně
30 filtrační komory 32 je vytvořen výstupní otvor 324.

Odpadní a reakční část 4 obsahuje odpadní komoru 41, která má ve znázorněném příkladu provedení tvar rozšířeného srpku měsíce, a reakční komoru 42, která je tvořena válcovou dutinou směrem dolů se zužující, přičemž

dolní část reakční komory **42** vyčnívá ze soustavy prostředku pro manipulaci směrem dolů, má ztenčenou stěnu a je ze všech stran volně přístupná jak pro optické, tak pro jiné vyhodnocovací prostředky.

Na obvodu odpadní a reakční části **4** jsou vytvořeny dva výstupky **13**,
5 které slouží pro polohování prostředku pro manipulaci se vzorky biologického materiálu během diagnostiky, například v centrifuze.

K ovládání vzájemné polohy jednotlivých částí 1, 2, 3, 4 prostředku během manipulace a diagnostiky slouží ozubený pastorek **24** na směšovací části, který je známým způsobem spřáhnutelný s neznázorněným ovládacím
10 ozubeným kolem nebo šnekem, přičemž zásobníková část **1** a odpadní a reakční část **4** mají stálou polohu, určenou ve znázorněném provedení zasunutím jejich obvodových výstupků **13** do odpovídajících vybrání v neznázorněném pouzdru. Směšovací část **2** je opatřena výstupkem **28**,
v provedení podle obr. 1 až 5 obvodovým výstupkem, který zasahuje do drážky
15 **34** ukončené dorazem **341**, který vymezuje úhel otočení směšovací části **2** vůči filtrační části **3**. V provedení podle obr. 1 až 5 je drážka **34** vytvořena na obvodu filtrační části **3**. Základní poloha filtrační části **3** vůči odpadní a reakční části **4** je vymezena výstupkem **35**, který zasahuje do vybrání mezi dvojicí dorazů **44**,
které jsou u provedení podle obr. 1 až 5 vytvořeny na obvodu odpadní a reakční
20 části **4** podobně jako mezi ně zasahující výstupek **35** vytvořený na obvodu filtrační části **3**. Ve směru otáčení filtrační části **3** za dvojicí dorazů **44** je v dráze výstupku **35** filtrační části situován na odpadní a reakční části **4** koncový doraz **45**, který po dosednutí výstupku **35** filtrační části **3** ukončí vzájemné otáčení filtrační části **3** a odpadní a reakční části **4** v koncové poloze, v níž se výstupní
25 otvor **43** filtrační a reakční části **4** nachází nad reakční komorou **42**.

Provedení polohovacích výstupků, drážek a dorazů znázorněných na obr. 1 až 5 je příkladné a slouží k vysvětlení konstrukce a funkce prostředku a nikoliv k jeho omezení. Výstupky, drážky a dorazy mohou být vytvořeny libovolným vhodným způsobem.

30 Ve druhém příkladu provedení znázorněném na obr. 6 se prostředek pro manipulaci se vzorky biologického materiálu liší od předchozího provedení jiným konkrétním spojení směšovací části **2**, filtrační části **3** a odpadní a reakční části **4**. Směšovací část **2** je na své výstupní straně opatřena objímkou, v jejíž

válcové dutině je otočně uložena svou vstupní částí filtrační část 3. Výstupní strana filtrační části 3 je otočně uložena v objímce vytvořené na vstupní straně odpadní a reakční části 4, přičemž tato objímka filtrační část 3 přesahuje až na směšovací část 2, kterou obepíná a která je v ní uložena svým vnějším obvodem. Výstupek 51 zámku je vytvořen na obvodu směšovací části 2 a drážka 52 zámku je vytvořena v odpadní a reakční části 4. Filtrační část 3 je uložena uvnitř směšovací části 2 a odpadní a reakční části 4 bez zámků. Toto provedení je výrobně jednodušší a levnější.

Odpadní a reakční část 4 je navíc opatřena pomocnou odpadní drážkou 43, která slouží ke shromažďování případných zbytků z reakcí, pokud se dostanou mezi dno filtrační části 3 a horní plochu odpadní a reakční části 4.

Prostředek pro manipulaci se vzorky biologického materiálu je určen k provádění rychlé a účinné diagnostiky infekčních a geneticky podmíněných chorob člověka v režimu POCT (Point of care testing) v zařízení s plně automatickým provozem ve všech fázích diagnostiky, jednoduchou obsluhou a vysokou bezpečností pro obsluhující personál i životní prostředí. Prostředek pro manipulaci se vzorky biologického materiálu je předem naplněn všemi potřebnými reagensy, které jsou uzavřeny v jednotlivých zásobních komorách 12 zásobníkové části 1. V níže uvedeném příkladu bude popisován prostředek pro manipulaci se vzorky biologického materiálu se sedmi zásobními komorami 12 a jednou vkládací komorou 11 v zásobníkové části 1.

Do vkládací komory 11 vloží obsluha vzorek biologického materiálu a vkládací komoru uzavře otevíratelným víkem 111.

V první zásobní komoře 121 je uložen lyzační enzym, například proteináza K.

V druhé zásobní komoře 122 je uložen lyzační pufr, který je tvořen směsí dodecylsulfátu sodného a chelatizačních činidel.

Ve třetí zásobní komoře 123 je uloženo precipitační činidlo, v konkrétním případě etanol.

Čtvrtá zásobní komora 124 je v popisovaném příkladném provedení prázdná.

V páté zásobní komoře **125** je uložen první promývací pufr, tvořený v popisovaném příkladném provedení sedmdesáti procentním etanolem a stabilizačními ionty.

5 V šesté zásobní komoře **126** je uložen druhý promývací pufr, tvořený v popisovaném příkladném provedení sedmdesáti procentním etanolem a stabilizačními ionty.

V sedmé zásobní komoře **127** je uložen eluční pufr, který je tvořen roztokem s nízkou koncentrací iontů Tris- hydroxymethylaminomethan + chelatační činidlo EDTA (kyselinu etylendiaminotetraoctovou).

10 V základní výchozí poloze je filtrační komora **32** svým výstupním otvorem **321** nad odpadní komorou **41**, přičemž vstupní otvor **321** filtrační komory **32** je mimo výstupní otvor **26** směšovací komory **25**, takže směšovací komora **25** je uzavřena a utěsněna těsněním, kterým je ve znázorněném provedení o-kroužek **6**. Dráha nože **23** protíná kapkovité výstupky **1210** až **1270** a v základní výchozí
15 poloze se ve směru otáčení nachází před kapkovitým výstupkem **111** vkladací komory **11**. Poloha prostředku pro manipulaci se vzorky biologického materiálu je přitom dána umístěním polohovacích výstupků **13** zásobníkové části **1** a polohovacích výstupků **13** odpadní a reakční části do příslušných vybrání v neznázorněné centrifuze, přičemž ve znázorněném a popisovaném provedení
20 zabraňují polohovací výstupky **13** otáčení zásobníkové části **1** a otáčení odpadní a reakční části **4**. Směšovací část **2** a filtrační část **3** se při manipulaci se vzorky biologického materiálu otáčejí, přičemž krouticí moment je na ně přenášen ozubeným pastorkem **24**.

Po vložení vzorku biologického materiálu do vkladací komory **11**
25 zásobníkové části **1** a uzavření otevíratelného víka **111** se prostředek pro manipulaci se vzorky biologického materiálu vloží do zařízení, v němž probíhá celý diagnostický proces a kterým je obvykle centrifuga. Po vložení je ozubený pastorek **24** spřažen se známým hnacím členem neznázorněného pohonu, například se šnekem nebo ozubeným kolem. Jednotlivé části prostředku pro
30 manipulaci se vzorky biologického materiálu jsou ve výchozí poloze, v níž se nůž nachází před výstupkem **111** vkladací komory **11**, výtokový otvor **26** směšovací komory **25** je uzavřen víkem **31** filtrační části **3** a výstupní otvor **324** filtrační komory **32** se nachází nad odpadní komorou **41**.

V provedeních znázorněných na Obr. 1 a 6 jsou všechny kapkovité výstupky 111, 1210 až 1270 znázorněny celé neuříznuté a nůž 23 je na Obr. 1 znázorněn schematicky před jedním z kapkovitých výstupků. Jedná se o schematické znázornění a jednotlivé kroky manipulace se vzorky budou
5 popsány níže včetně postupného uřezávání kapkovitých výstupků.

V prvním kroku se pomocí ozubeného pastorku 24 pootočí směšovací částí 4 o 45°, přičemž ostatní části stojí. Tím dojde k uříznutí spodní části kapkovitého výstupku 110 vkladací komory 11 a její obsah tvořený zkoumaným vzorkem vyteče do směšovací komory 25, přičemž odříznutá spodní část
10 kapkovitého výstupku 110 se zachytí na sítku 22. Výtokový otvor 26 se přemístil o 45° nad plnou částí víka 31 filtrační části 3 a je stále uzavřen. Pro dokonalé přemístění celého obsahu vkladací komory 11 do směšovací komory 25 se centrifuga krátce roztočí na cca 500 g.

Ve druhém kroku se pomocí ozubeného pastorku 24 pootočí směšovací
15 částí 2 o dalších 45°, zatímco ostatní části stojí. Tím dojde k uříznutí kapkovitého výstupku 1210 první zásobní komory 121, v níž se nachází lyzační enzym, například proteináza K. Výtokový otvor 26 se přemístí o dalších 45° nad plnou částí víka 31 filtrační části 3 a je stále uzavřen. Lyzační enzym, například proteináza K se přemístí do směšovací komory 25, s výhodou za působení
20 odstředivé síly, a prostředek pro manipulaci se vzorky biologického materiálu se ohřeje na teplotu vyšší, než je teplota okolí, s výhodou na 70 °C, čímž dojde k rozpuštění případně vysrážených komponent.

Ve třetím kroku se pomocí ozubeného pastorku 24 pootočí směšovací částí 2 o dalších 45°, zatímco ostatní části stojí. Celkové natočení směšovací
25 části 2 je 135°. Tím dojde k uříznutí kapkovitého výstupku 1220 druhé zásobní komory 122, v níž se nachází lyzační pufr. Výtokový otvor 26 se přemístil o dalších 45° nad plnou částí víka 31 filtrační části 3 a je stále uzavřen. Lyzační pufr se přemístí do směšovací komory 25, s výhodou za působení odstředivé síly, a po důkladném promíchání zkoumaného vzorku biologického materiálu
30 s enzymem a lyzačním pufrem se zahájí proces lyze, tedy odbourávání buněčných obalů a uvolnění DNA do roztoku.

Následuje inkubace směsi při teplotě vyšší než je teplota okolí, s výhodou 70 °C po dobu 10 až 30 min, během níž se roztok opakovaně promíchává.

Po inkubaci se teplota alespoň ve střední části prostředku pro manipulaci se vzorky biologického materiálu sníží na laboratorní teplotu (20 až 25 °C.).

Ve čtvrtém kroku se směšovací část 2 pootočí o dalších 45° na celkových 180°. Tím se odřízne kapkovitý výstupek 1230 třetí zásobní komory a dojde k transportu precipitačního činidla, v popisovaném příkladu provedení etanolu, ze třetí zásobní komory 1230. Kvalita a rychlost transportu precipitačního činidla do směšovací komory 25 se zvýší roztočením centrifugy na cca 500 g. Směs se důkladně promíchá. Důkladná homogenizace a promíchání následně zabezpečí správnou vazbu DNA na separační membránu 322, v popisovaném příkladném provedení na ionexovou membránu. Výtokový otvor 26 se přemístil o dalších 45° nad plnou částí víka 31 filtrační části 3 a je stále uzavřen.

V pátém kroku se směšovací část otočí o dalších 45° na celkových 225° a nyní odřízne kapkovitý výstupek 1240 čtvrté zásobní komory 124, která v příkladném provedení je prázdná. Výtokový otvor 26 směšovací komory 25 se přemístil o dalších 45° a nachází se nad vstupním otvorem 321 filtrační komory 32, jejíž výstupní otvor 324 se stále nachází nad odpadní komorou 41 odpadní a reakční části 4, neboť filtrační část 3 dosud stála. Výstupek 28 na směšovací části 2 dosedl na doraz 341 na konci drážky 34 ve filtrační části 3, čímž došlo ke spojení těchto částí, které se budou dále otáčet společně. Lyzační směs homogenizovaná s etanolem se ze směšovací komory 25 přemístí do filtrační komory na separační membránu 322, pod kterou se nachází odpadní komora 41.

Následuje centrifugace 5000 až 15000 g, při níž se lyzační směs přefiltruje přes separační membránu 322 do odpadní komory 41 odpadní a reakční části 4, přičemž separační membrána 322 zadrží zbytky buněčných struktur a DNA.

V šestém kroku se pomocí ozubeného pastorku 24 opět pootočí směšovací část 2 o dalších 45° na celkové natočení 270°, a v důsledku toho se

filtrační část 3 otočí o 45°, neboť je unášena výstupkem 28 a dorazem 341. Přitom výstupek 35 na filtrační části překoná sílu dvojice dorazů 44, které dosud vymezovaly jeho polohu. Výstupní otvor 26 směšovací komory 25 se stále nachází nad vstupním otvorem 321 filtrační komory 32 a výstupní otvor filtrační komory 32 je nad odpadní komorou 41 odpadní a reakční části 4. Nůž 23 odřízne kapkovitý výstupek 1250 páté zásobní komory 125 a z ní do směšovací komory 25 vyteče první promývací pufr, který proteče do filtrační komory 32 nad separační membránu 322.

Centrifugací při 5000 až 15000 g proteče první promývací pufr přes separační membránu 322 do odpadní komory 41 odpadní a reakční části 4. Tím dojde k promytí separační membrány 322 a odstranění zbytků buněčných struktur kromě DNA.

V sedmém kroku se pomocí ozubeného pastorku 24 pootočí směšovací částí 2 o dalších 45° a směšovací část pootočí o 45° i filtrační částí 3. Výstupní otvor 26 směšovací komory 25 se stále nachází nad vstupním otvorem 321 filtrační komory 32, neboť filtrační část 3 je unášena směšovací částí 2. Výstupní otvor 324 filtrační komory 32 se přes pootočení o 45° stále nachází nad odpadní komorou 41. Nůž 23 uřízne kapkovitý výstupek 1260 šesté zásobní komory 126, z níž vyteče druhý promývací pufr, který rovněž proteče do filtrační komory 32 nad separační membránu 322. Druhý promývací pufr protéká přes separační membránu 322 při centrifugaci při 5000 až 15000 g. Tím dojde k dalšímu promytí separační membrány 322 a úplnému odstranění zbytků buněčných struktur kromě DNA.

Následně se alespoň střední část prostředku pro manipulaci se vzorky biologického materiálu vytemperuje nad teplotu okolí, s výhodou na teplotu 70 °C.

V osmém kroku se pomocí ozubeného pastorku 23 pootočí směšovací část o dalších 45° na celkových 360° a dojde k dalšímu pootočení filtrační části 3 vzhledem k odpadní a reakční části 4. Výstupní otvor 26 směšovací komory 25 se stále nachází nad vstupním otvorem 321 filtrační komory 32. Výstupní otvor 324 filtrační komory 32 se tímto pootočením o 45° přemístí nad stěnu 40 mezi odpadní komorou 41 a reakční komorou 42, na níž je utěsněn těsnícím kroužkem 6. Při pootočení směšovací části 2 dojde k odříznutí kapkovitého

výstupku **1270** sedmé zásobní komory **127**, z níž po roztočení centrifugy na cca 500 g vyteče eluční pufr do filtrační komory **32** na separační membránu **322**. Při inkubaci po dobu 3 minut při teplotě 70 °C se ze separační membrány **322** uvolní DNA do elučního pufru. Inkubace může probíhat i při teplotě nižší, ale po delší časový interval.

V devátém kroku dojde k dalšímu otočení směšovací komory **2** o 45° a její celkové natočení činí opět 45°. Přitom se současně otočí o 45° i filtrační část **3** takže výstupní otvor **324** filtrační komory **32** se přemístí nad reakční komoru **42**. Centrifugací při 5000 až 15000 g proteče eluční pufr s izolovanou DNA separační membránou **322** do prostoru reakční komory **42**.

Dalším pootočením směšovací komory **2** v desátém kroku se výstupní otvor **324** filtrační komory přemístí nad odpadní komoru **41** a reakční komora **41** se uzavře, takže v ní může probíhat polymerázová řetězová reakce (PCR) nebo z ní lze izolovanou DNA odebrat k jinému použití. Polymerázová řetězová reakce probíhá standardním mechanismem cyklického chlazení a ohřívání směsi v reakčním prostoru.

Stejným způsobem probíhá izolace RNA i obecná molekulární diagnostika.

Lyzační enzym může být přidáván do vkladací komory **11** společně se vzorkem biologického materiálu nebo naopak vzorek může být přidáván do vkladací komory **11** k lyzačnímu enzymu. Potom bude první zásobní komora prázdná. Nůž **23** se tedy v jednom kroku pootočí o 90°, aby od řízl výstupek vkladací komory **11** s lyzačním enzymem a vzorkem a zároveň výstupek prázdné zásobní komory. Toto provedení je zřejmé, a nebude proto dále popisováno.

Pro zvýšení přesnosti je vhodné odstranit ze separační membrány **322** zbytkový obsah tekutin po propláchnutí separační membrány **322** promývacím puforem a před uzavřením odpadní komory **41**, aby se do reakční komory **42** nedostaly nežádoucí látky. Toho se dosáhne propláchnutím separační membrány **322** inertní tekutinou a/nebo elučním puforem v množství odpovídajícím známému zbytkovému obsahu tekutin v separační membráně **322**, čímž dojde k vytlačení těchto tekutin ze separační membrány. U tohoto

provedení je uspořádání obsahu vkladací komory **11** a jednotlivých zásobních komor následující:

Do vkladací komory **11** vloží obsluha vzorek biologického materiálu společně s lyzačním enzymem, například proteinázou K, a vkladací komoru
5 uzavře otevíratelným víkem **111**.

V první zásobní komoře **121** je uložen lyzační pufr, který je tvořen směsí dodecylsulfátu sodného a chelatizačních činidel.

Ve druhé zásobní komoře **122** je uloženo precipitační činidlo, v konkrétním případě etanol.

10 Třetí zásobní komora **123** je v popisovaném příkladném provedení prázdná. (v tomto provedení jsou upraveny unášecí detaily na směšovací komoře a směšovací části, které zajistí společné otáčení těchto dvou částí o jeden krok dříve = 45 stupňů).

Ve čtvrté zásobní komoře **124** je uložen první promývací pufr, tvořený
15 v popisovaném příkladném provedení sedmdesáti procentním etanolem a stabilizačními ionty.

V páté zásobní komoře **125** je uložen druhý promývací pufr, tvořený v popisovaném příkladném provedení sedmdesáti procentním etanolem a stabilizačními ionty.

20 V šesté zásobní komoře **126** je uložena inertní tekutina a/nebo eluční pufr v množství odpovídajícím zbytkovému obsahu tekutin v separační membráně

V sedmé zásobní komoře **127** je uložen eluční pufr, který je tvořen roztokem s nízkou koncentrací iontů Tris- hydroxymethylaminomethan +
25 chelatizační činidlo EDTA (kyselinu etylendiaminotetraoctovou).

V prvním kroku se pomocí ozubeného pastorku **24** pootočí směšovací části **4** o 45°, přičemž ostatní části stojí. Tím dojde k uříznutí spodní části kapkovitého výstupku **110** vkladací komory **11** a její obsah tvořený zkoumaným vzorkem a proteinázou K vyteče do směšovací komory **25**. Výtokový otvor **26**
30 směšovací komory **25** se přemístil o 45° nad plnou částí víka **31** filtrační části **3** a je stále uzavřen. Pro dokonalé přemístění celého obsahu vkladací komory **11**

do směšovací komory 25 se centrifuga krátce roztočí na cca 500 g. Prostředek pro manipulaci se vzorky biologického materiálu se ohřeje na teplotu vyšší, než je teplota okolí, s výhodou na 70 °C, čímž dojde k rozpuštění případně vysrážených komponent.

- 5 Ve druhém kroku se pomocí ozubeného pastorku 24 pootočí směšovací částí 2 o dalších 45°, zatímco ostatní části stojí. Tím dojde k uříznutí kapkovitého výstupku 1210 první zásobní komory 121, v níž se nachází lyzační pufr. Výtokový otvor 26 je stále uzavřen. Lyzační pufr, se přemístí do směšovací komory 25, s výhodou za působení odstředivé síly, a po důkladném
10 promíchání zkoumaného vzorku biologického materiálu s lyzačním enzymem a lyzačním pufrem se zahájí proces lyze, tedy odbourávání buněčných obalů a uvolnění DNA do roztoku.

- Následuje inkubace směsi při teplotě vyšší než je teplota okolí, s výhodou 70 °C po dobu 10 až 30 min, během níž se roztok opakovaně
15 promíchává.

Po inkubaci se teplota alespoň ve střední části prostředku pro manipulaci se vzorky biologického materiálu sníží na laboratorní teplotu (20 až 25 °C.).

- Ve třetím kroku se pomocí ozubeného pastorku 24 pootočí směšovací částí 2 o dalších 45°, zatímco ostatní části stojí. Celkové natočení směšovací
20 části 2 je 135°. Tím dojde k uříznutí kapkovitého výstupku 1220 druhé zásobní komory 122, v níž se nachází precipitační činidlo. Výtokový otvor 26 se přemístil o dalších 45° nad plnou částí víka 31 filtrační části 3 a je stále uzavřen. Kvalita a rychlost transportu precipitačního činidla do směšovací komory 25 se zvýší roztočením centrifugy na cca 500 g. Směs se důkladně promíchá. Důkladná
25 homogenizace a promíchání následně zabezpečí správnou vazbu DNA na separační membránu 322, v popisovaném příkladném provedení na ionexovou membránu. Výtokový otvor 26 se přemístil o dalších 45° nad plnou částí víka 31 filtrační části 3 a je stále uzavřen.

- Ve čtvrtém kroku se směšovací část 2 pootočí o dalších 45° na
30 celkových 180°. Tím se odřízne kapkový výstupek 1230 třetí zásobní komory, která je v příkladném provedení prázdná. Výtokový otvor 26 směšovací komory 25 se přemístil o dalších 45° a nachází se nad vstupním otvorem 321 filtrační

komory 32, jejíž výstupní otvor 324 se stále nachází nad odpadní komorou 41 odpadní a reakční části 4, neboť odpadní a reakční část 4 dosud stála. Výstupek 28 na směšovací části 2 dosedl na doraz 341 na konci drážky 34 ve filtrační části 3, čímž došlo ke spojení těchto částí, které se budou dále otáčet
5 společně. Lyzační směs homogenizovaná s etanolem se ze směšovací komory 25 přemístí do filtrační komory na separační membránu 322, pod kterou se nachází odpadní komora 41.

Následuje centrifugace 5000 až 15000 g, při níž se lyzační směs přefiltruje přes separační membránu 322 do odpadní komory 41 odpadní a
10 reakční části 4, přičemž separační membrána 322 zadrží zbytky buněčných struktur a DNA.

V pátém kroku se směšovací část otočí o dalších 45° na celkových 225° a v důsledku toho se filtrační část 3 otočí o 45°, neboť je unášena výstupkem 28 a dorazem 341. Výstupní otvor 26 směšovací komory 25 se stále nachází
15 nad vstupním otvorem 321 filtrační komory 32 a výstupní otvor filtrační komory 32 je nad odpadní komorou 41 odpadní a reakční části 4. Nůž 23 odřízne kapkovitý výstupek 1240 čtvrté zásobní komory 124 a z ní do směšovací komory 25 vyteče první promývací pufr, který proteče do filtrační komory 32 nad separační membránu 322. Centrifugací při 5000 až 15000 g proteče první
20 promývací pufr přes separační membránu 322 do odpadní komory 41 odpadní a reakční části 4. Tím dojde k promytí separační membrány 322 a odstranění zbytků buněčných struktur kromě DNA.

V šestém kroku se pomocí ozubeného pastorku 24 opět pootočí směšovací částí 2 o dalších 45° na celkové natočení 270° a směšovací část
25 pootočí o 45° i filtrační částí 3. Výstupní otvor 26 směšovací komory 25 se stále nachází nad vstupním otvorem 321 filtrační komory 32, neboť filtrační část 3 je unášena směšovací částí 2. Výstupní otvor 324 filtrační komory 32 se přes pootočení o 45° stále nachází nad odpadní komorou 41. Nůž 23 uřízne kapkovitý výstupek 1250 páté zásobní komory 125, z níž vyteče druhý
30 promývací pufr, který rovněž proteče do filtrační komory 32 nad separační membránu 322. Druhý promývací pufr protéká přes separační membránu 322 při centrifugaci při 5000 až 15000 g. Tím dojde k dalšímu promytí separační membrány 322 a úplnému odstranění zbytků buněčných struktur kromě DNA.

- V sedmém kroku se pomocí ozubeného pastorku 24 pootočí směšovací částí 2 o dalších 45° a směšovací část pootočí o 45° i filtrační částí 3. Výstupní otvor 26 směšovací komory 25 se stále nachází nad vstupním otvorem 321 filtrační komory 32, neboť filtrační část 3 je unášena směšovací částí 2.
- 5 Výstupní otvor 324 filtrační komory 32 se přes pootočení o 45° stále nachází nad odpadní komorou 41. Nůž 23 uřízne kapkovitý výstupek 1260 šesté zásobní komory 126, z níž vyteče inertní tekutina a/nebo eluční pufr v množství odpovídajícím zbytkovému obsahu tekutin v separační membráně 322 a proteče do filtrační komory 32 nad separační membránu 322. Tato inertní
- 10 tekutina a/nebo eluční pufr protéká přes separační membránu 322 při centrifugaci při 5000 až 15000 g a vytlačí zbytkové tekutiny v separační membráně 322, které pak nemohou ovlivňovat další reakce. Tím dojde k úplnému odstranění zbytků buněčných struktur kromě DNA.

- Následně se alespoň střední část prostředku pro manipulaci se vzorky
- 15 biologického materiálu vytemperuje nad teplotu okolí, s výhodou na teplotu 70 °C.

Další kroky osm až deset probíhají stejně jako u dříve popsaného způsobu.

20 **Průmyslová využitelnost**

- Způsob a prostředek pro manipulaci se vzorky biologického materiálu podle vynálezu jsou určeny pro molekulární diagnostiku nebo pro izolaci nukleových kyselin a z nich případnou následnou detekci určitého genomu, například patogenního, a/nebo diagnostiku geneticky podmíněných chorob
- 25 živých organismů, například pro automatickou izolaci DNA/RNA ze vzorku, automatickou detekci metodou qPCR a automatické vyhodnocení výsledku reakce mimo specializované laboratoře, tedy přímo na místě – Point of care testing (POCT).

Seznam vztahových značek

	1	zásobníková část
	11	vládací komora
	110	kapkovitý výstupek vládací komory
5	111	otevíratelné víko vládací komory
	12	zásobní komory
	120	pevné víko zásobních komor
	121	první zásobní komora
	122	druhá zásobní komora
10	123	třetí zásobní komora
	124	čtvrtá zásobní komora
	125	pátá zásobní komora
	126	šestá zásobní komora
	127	sedmá zásobní komora
15	1210-1270	kapkovité výstupky zásobních komor
	13	polohovací výstupky
	2	směšovací část
	21	válcová dutina
20	22	sítka
	23	nůž
	24	ozubený pastorek
	25	směšovací komora
	26	výstupní otvor směšovací komory
25	27	dno směšovací části
	28	výstupek
	3	filtrační část
	31	víko filtrační části
30	32	filtrační komora
	321	vstupní otvor filtrační komory
	322	separační membrána
	323	oddělovací prstenec
	324	výstupní otvor filtrační komory
35	33	odlehčovací dutina
	34	drážka
	341	doraz
	35	výstupek
40	4	odpadní a reakční část
	41	odpadní komora
	42	reakční komora
	43	pomocná odpadní drážka
	44	dvojice dorazů
45	45	koncový doraz
	5	zámky
	51	výstupek zámku
	52	drážka zámku
50	6	o-kroužek

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob manipulace se vzorky biologického materiálu, zejména pro molekulární diagnostiku nebo pro izolaci nukleových kyselin a z nich případnou
5 následnou detekci určitého, například patogenního, genomu a/nebo diagnostiku geneticky podmíněných chorob živých organismů, **vyznačující se tím, že** vzorek biologického materiálu se na počátku procesu vloží do vkladací komory (11) prostředku pro manipulaci se vzorky biologického materiálu, v jehož zásobních komorách (12) byly před tím odděleně od sebe uloženy všechny pro
10 příslušný proces potřebné reagenční chemikálie, přičemž následující etapy procesu probíhají uvnitř prostředku bez přímé manipulace obsluhy s reagenčními chemikáliemi, které se postupně mísí a reagují, přičemž nežádoucí zbytky z reakcí se ukládají do odpadní komory (41), která se nachází rovněž uvnitř prostředku a je bezpečně oddělena od ostatních prostor
15 prostředku, obsluhy i okolí.

2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím, že** vzorek biologického materiálu se uvnitř prostředku pro manipulaci se vzorky biologického materiálu v jeho směšovací komoře (25) smísí s lyzačním enzymem a současně nebo následně se z příslušné zásobní komory manipulačního prostředku přidá
20 lyzační pufr a po dalším promíchání se směs ve směšovací komoře (25) podrobí inkubaci, během níž se roztok směsi opakovaně promíchává a probíhá lyze roztoku, až vznikne lyzovaná směs, následně se k lyzované směsi přivede z další zásobní komory prostředku precipitační činidlo, načež se lyzovaná směs s precipitačním činidlem homogenizuje a v průběhu reakce s precipitačním
25 činidlem dochází k precipitaci volné nukleové kyseliny, po precipitaci se směs přivede na separační membránu (322) uspořádanou uvnitř prostředku, přes kterou se přefiltruje do odpadní komory (41), která je vytvořena uvnitř prostředku, přičemž separační membrána (322) zadrží zbytky buněčných struktur a precipitovanou nukleovou kyselinu, načež se zbytky buněčných
30 struktur ze separační membrány (322) odstraní propláchnutím promývacím pufrem, který se přivede z další zásobní komory prostředku, načež se uzavře odpadní komora (41) a k separační membráně (322) se z další zásobní komory prostředku přivede eluční pufr, který se nechá působit na separační membránu

(322) a následně projde separační membránou (322) do reakční komory (42) prostředku, přičemž v roztoku je izolována příslušná nukleová kyselina ze zkoumaného vzorku biologického materiálu.

3. Způsob podle nároku 2, **vyznačující se tím, že** po propláchnutí
5 separační membrány (322) promývacím pufrém a před uzavřením odpadní komory (41) se separační membrána (322) propláchne inertní tekutinou a/nebo elučním pufrém v množství odpovídajícím zbytkovému obsahu tekutin v separační membráně (322).

4. Způsob podle nároku 2 nebo 3, **vyznačující se tím, že** inkubace
10 směsi ve směšovací komoře (25) probíhá při teplotě vyšší, než je teplota okolí, s výhodou při teplotě 70 °C po dobu 10 až 30 minut.

5. Způsob podle libovolného z nároků 2 až 4, **vyznačující se tím, že** před přivedením elučního pufru se separační membrána (322) zahřeje na teplotu vyšší, než je teplota okolí, s výhodou na 70 °C na dobu 3 minuty.

6. Způsob podle libovolného z nároků 2 až 5, **vyznačující se tím, že**
15 vzorek biologického materiálu se po zahájení procesu přivede do směšovací komory (25) prostředku, v níž byl předem umístěn lyzační enzym.

7. Způsob podle libovolného z nároků 2 až 5, **vyznačující se tím, že** lyzační enzym je součástí lyzačního pufru.

8. Způsob podle libovolného z nároků 2 až 7, **vyznačující se tím, že**
20 průchodu směsi přes separační membránu (322) se napomáhá působením odstředivé síly.

9. Způsob podle libovolného z nároků 2 až 8, **vyznačující se tím, že** separační membránou (322) je ionexová membrána.

10. Způsob podle libovolného z nároků 2 až 9, **vyznačující se tím, že**
25 v reakční komoře (42) probíhá polymerázová řetězová reakce.

11. Prostředek pro manipulaci se vzorky biologického materiálu, zejména pro molekulární diagnostiku nebo pro izolaci nukleových kyselin a z nich případnou následnou detekci určitého genomu, například patogenního, a/nebo
30 diagnostiku geneticky podmíněných chorob živých organismů, **vyznačující se tím, že** v jednom uzavřeném celku obsahuje zásobní komory (12) pro vzájemně

oddělené uvolnitelné uložení reagenčních chemikálií, vkladací komoru (11) pro vložení vzorku biologického materiálu, jimž je přiřazena směšovací komora (25), jejímuž výstupu je přiřaditelná filtrační komora (32), jejímuž výstupu je přes separační membránu (322) přiřaditelná odpadní komora (41) nebo reakční komora (42), přičemž pouze vkladací komora (11) je opatřena pro obsluhu
5 otevíratelným a uzavíratelným víkem (111).

12. Prostředek podle nároku 11, **vyznačující se tím, že** zásobní komory (12) a vkladací komora (11) jsou uspořádány v zásobníkové části (1), na kterou navazuje směšovací část (2) opatřená směšovací komorou (25), jejímuž vstupu
10 jsou volitelně přiřaditelné jednotlivé komory (11, 12) zásobníkové části (1), které jsou spřáhnutelné s otevíracím prostředkem pro vypuštění jejich obsahu do směšovací komory (25), přičemž výstupu směšovací komory (25) je přiřaditelný vstup filtrační komory (32) filtrační části (3), jejímuž výstupu je volitelně přiřaditelná odpadní komora (41) nebo reakční komora (42) reakční části (4),
15 přičemž zásobníková část (1), směšovací část (2), filtrační část (3) a reakční část (4) jsou tvořeny samostatnými tělesy, která jsou vzájemně spojena, přičemž spojení umožňuje vzájemný pohyb a zajišťuje těsnost.

13. Prostředek podle nároku 12, **vyznačující se tím, že** zásobníková část (1), směšovací část (2), filtrační část (3) a reakční část (4) jsou vzájemně
20 otočně spojeny, přičemž alespoň jedna z nich je opatřena prostředkem pro spřažení s pohonem, alespoň jedna z nich je opatřena prostředkem fixaci její polohy a zbývající části jsou opatřeny prostředky pro přenos otočného pohybu od části spřažené s pohonem.

14. Prostředek podle nároku 12 nebo 13, **vyznačující se tím, že**
25 směšovací část (2) je na své výstupní straně opatřena objímkou, v jejíž válcové dutině je otočně uložena svou vstupní částí filtrační část (3), jejíž výstupní strana je otočně uložena v objímce vytvořené na vstupní straně odpadní a reakční části (4), přičemž tato objímka filtrační část (3) přesahuje až na směšovací část (2), kterou obepíná a která je v ní uložena svým vnějším
30 obvodem.

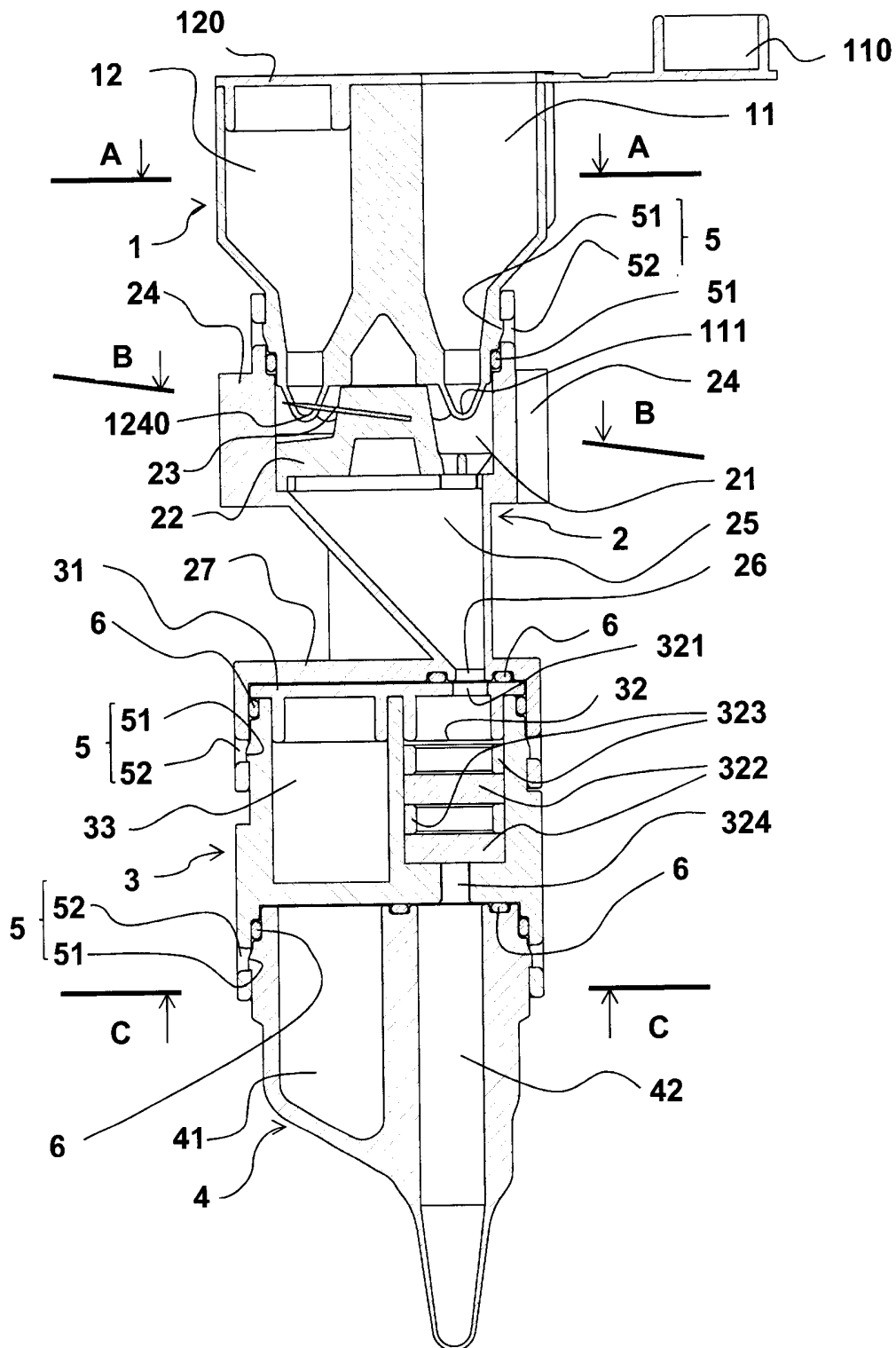
15. Prostředek podle libovolného z nároků 14, **vyznačující se tím, že** v odpadní a reakční části (4) je vytvořena odpadní drážka (41) pro

shromažďování případných zbytků z reakcí, pokud se dostanou mezi dno filtrační části (3) a horní plochu odpadní a reakční části (4).

16. Prostředek podle libovolného z nároků 11 až 15, **vyznačující se tím, že** separační membránou (322) je ionexová membrána.

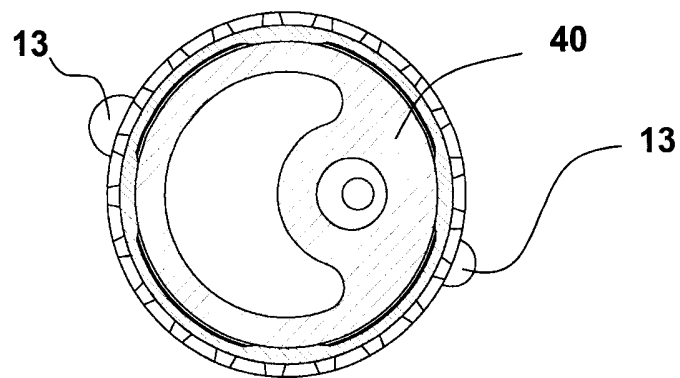
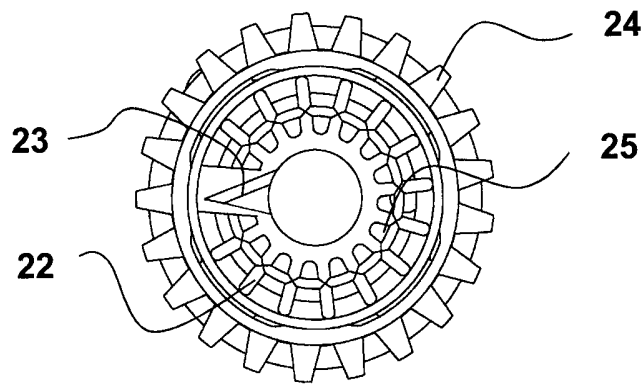
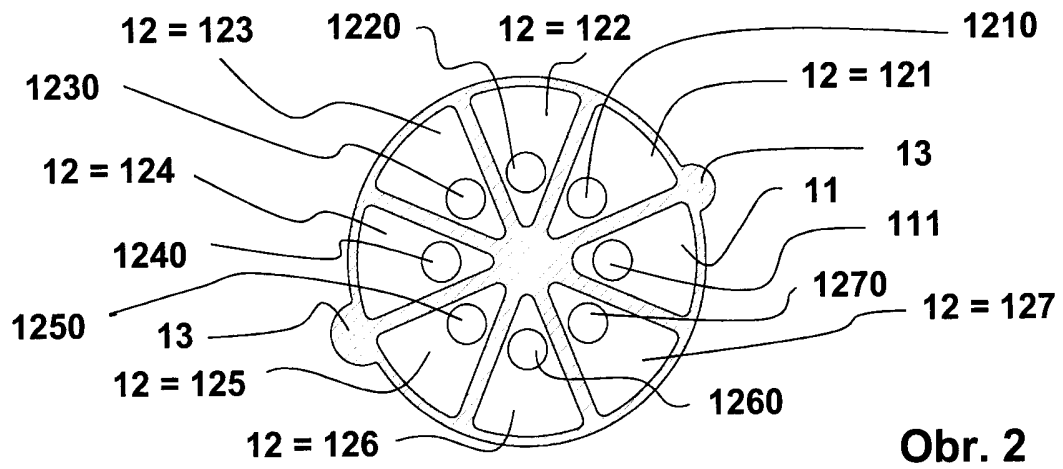
- 5 17. Prostředek podle libovolného z nároků 11 až 16, **vyznačující se tím, že** zásobníkové komory (12) a vkladací komora (11) jsou v dolní části opatřeny kapkovitými výstupky, jimž je přiřazen otevírací prostředek.

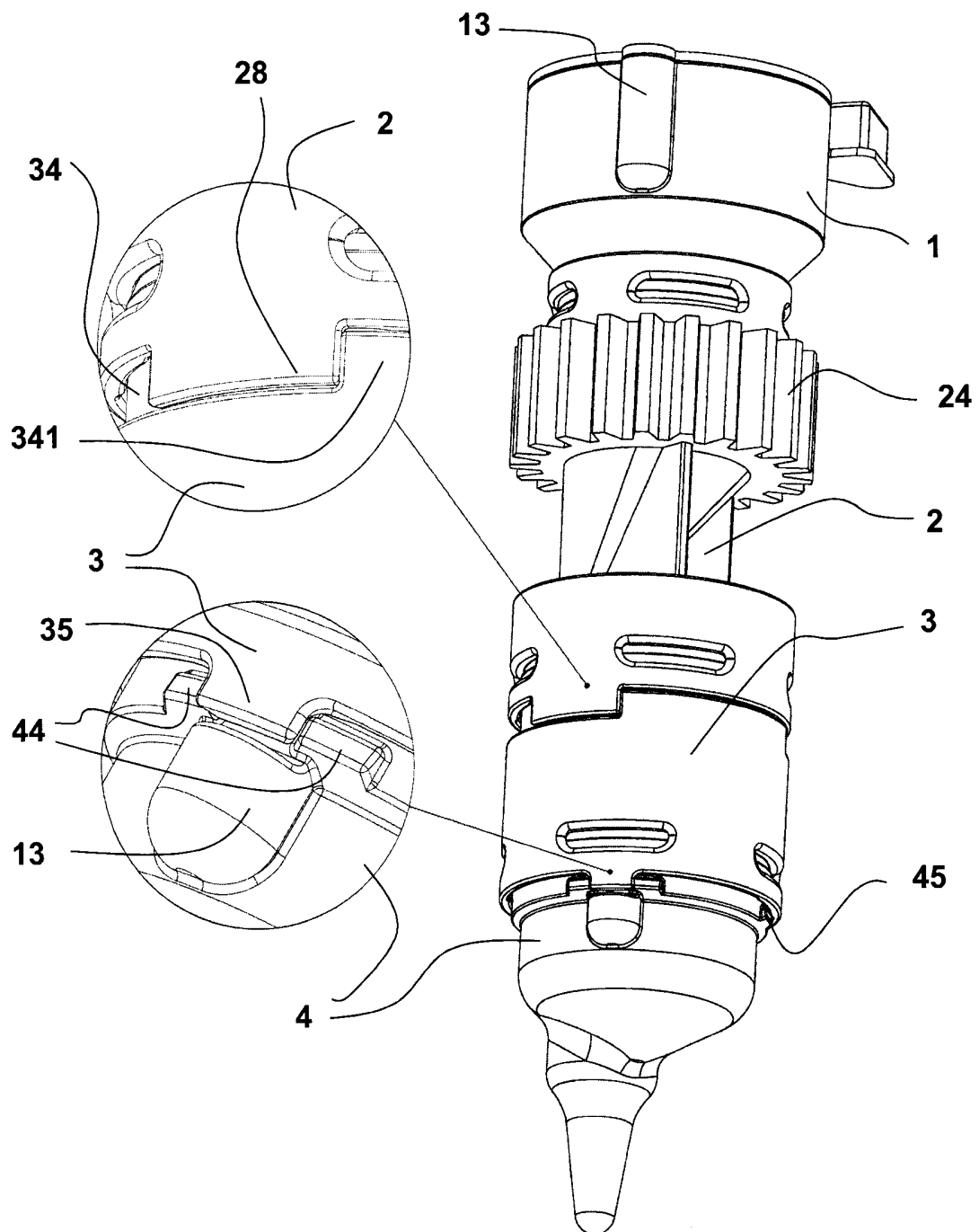
18. Prostředek podle nároku 17, **vyznačující se tím, že** otevíracím prostředkem je nůž (23) pevně uložený ve směšovací komoře (25).



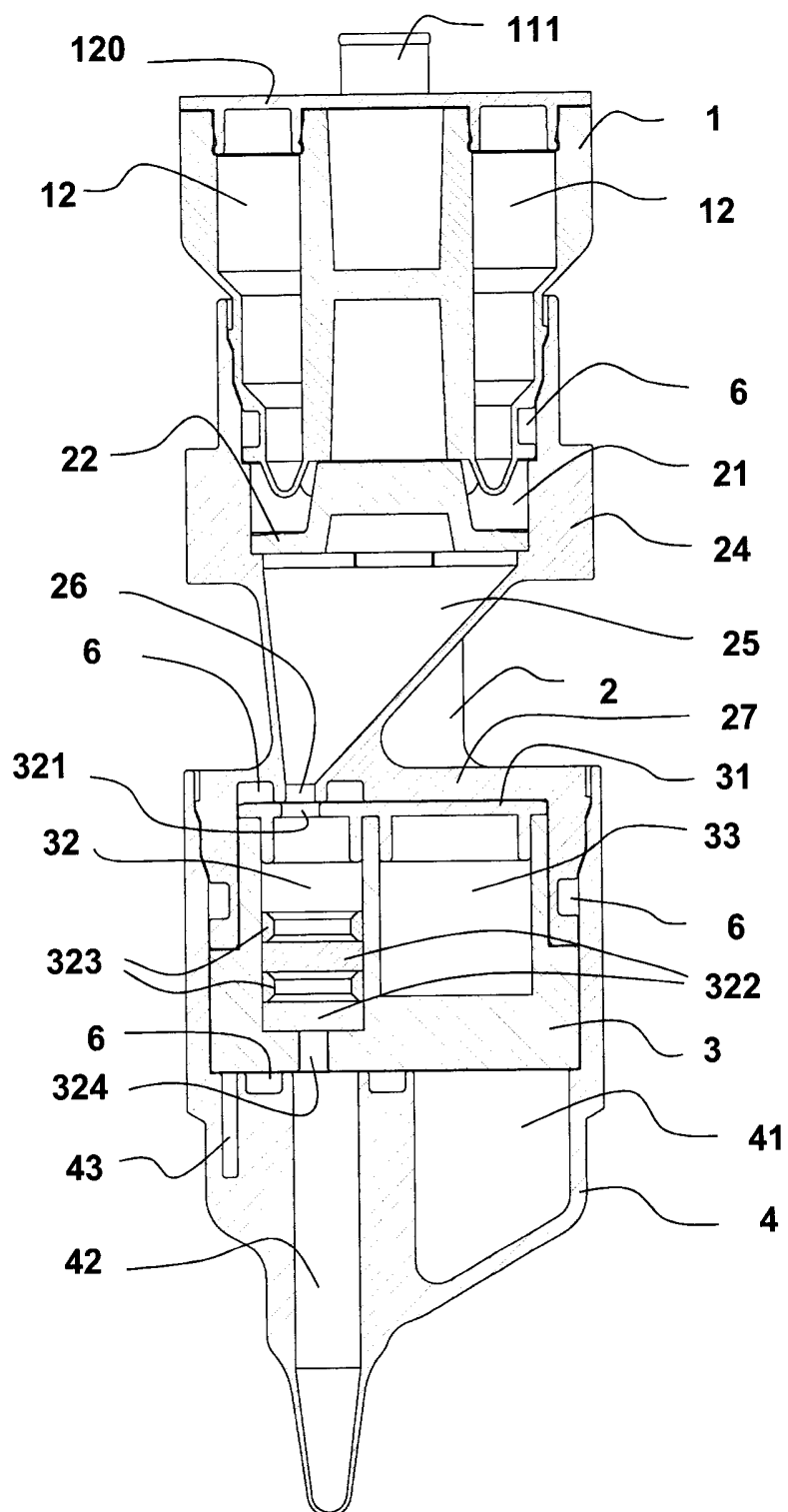
Obr. 1

2/4





Obr. 5



Obr. 6