

UŽITNÝ VZOR

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2013 - 27879**
(22) Přihlášeno: **29.04.2013**
(47) Zapsáno: **16.09.2013**

(11) Číslo dokumentu:

25864

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:
G01N 33/569 (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01)
G01N 21/65 (2006.01)
G01N 21/62 (2006.01)

(73) Majitel:

Ústav přístrojové techniky Akademie věd ČR v.v.i., Brno, CZ
Photon Systems Instruments, spol. s r.o., Brno - Řečkovice a Mokrá hora, CZ

(72) Původce:

Ing. Ph.D. Mojmír Šerý, Brno-sever, CZ
Ing. Ph.D. Jan Ježek, Brno, CZ
Mgr. Zdeněk Pilát, Praha, CZ
Mgr. Dr. Ota Samek, Tišnov, CZ
Prof. RNDr. Ph.D. Pavel Zemánek, Třebíč, CZ
Ing. Martin Trtílek, Brno, CZ

(74) Zástupce:

KANIA, SEDLÁK, SMOLA Patentová a známková kancelář, Ing. František Kania,
Mendlovo nám. 1a, Brno, 60300

(54) Název užitného vzoru:

Zařízení pro třídění živých buněk fotoautotrofních mikroorganismů

CZ 25864 U1

Zařízení pro třídění živých buněk fotoautotrofních mikroorganismů

Oblast techniky

Technické řešení se týká zařízení pro třídění živých buněk fotoautotrofních mikroorganismů.

Dosavadní stav techniky

- 5 V posledních několika desetiletích došlo k velkému rozvoji využívání rozmanitých metod pro třídění mikroorganismů. Obecně je lze rozdělit na metody pasivní a aktivní. Pasivní metody využívají fyzikálních vlastností tříděných objektů, velikosti, hmotnosti, elektrického náboje, adheze, indexu lomu, chemického složení bez vnějšího zásahu, jak je popsáno např. ve spisech Huang Y, Mather EL, Bell JL, et al. MEMS-based sample preparation for molecular diagnostics. Anal Bioanal Chem. 2002;372:49-65, nebo Mohamed H, McCurdy LD, Szarowski DH, et al. Development of a rare cell fractionation device: Application for cancer detection. IEEE Trans Nanobioscience. 2004;3:251-6 nebo Mandrusov E, Houng A, Klein E, et al. Membrane-based cell affinity-chromatography to retrieve viable cells. Biotechnol Prog. 1995;11:208-13 nebo konečně Voldman J, Gray ML, Toner M, et al. A microfabrication-based dynamic array cytometer. Anal Chem. 2002;74:3984-90. Aktivní metody využívají rozhodovacího procesu pro separaci vhodných či nevhodných objektů. U objektu je detekován a analyzován Ramanův rozptyl, fluorescence, absorpční, nebo emisní spektrum. Objekt je pak selektován na základě zvolené podmínky, založené na výsledku analýzy, jak je popsáno např. ve spise Huh D, Gu W, Kamotani Y, et al. Microfluidics for flow cytometric analysis of cells and particles. Physiol Meas. 2005;26:R73-98.
- 20 U třídících systémů je s výhodou využito mikrofluidních čipů, které usnadňují dopravu organismů do místa vlastní separace a taktéž poslouží k rozdělení a uchování separovaných objektů v ideálních podmínkách. Běžným nedostatkem mikrofluidních čipů je adheze a sedimentace objektů při procesu separace.

Podstata technického řešení

- 25 Uvedené nedostatky dosavadního stavu techniky do značné míry eliminuje zařízení pro třídění živých buněk fotoautotrofních mikroorganismů podle technického řešení, které je opatřeno průhledným mikrofluidním čipem s vertikálním kanálem o šířce od 0,5 do 2 mm, na jehož horním konci je vstup tříděných fotoautotrofních mikroorganismů v nosné kapalině. Do vertikálního kanálu je v jeho střední části zaústěn výstupní mikroport, tvořený šikmo dolů směřujícím mikrokanálkem o šířce od 30 do 100 μm , který se následně stáčí vzhůru a rozšiřuje se do jímky pro vybrané buňky fotoautotrofních mikroorganismů. Tato jímka je zaslepena oddělovací uzávěrou pro zabránění kolísání tlakových poměrů v mikrofluidním systému. K průhlednému mikrofluidnímu čipu je připojen zdroj světla pro vyvolání emise elektromagnetického záření z tříděných fotoautotrofních mikroorganismů v nosné kapalině. Dále je k němu připojen detektor emitovaného elektromagnetického záření fotoautotrofních mikroorganismů s analyzátozem emitovaného elektromagnetického záření fotoautotrofních mikroorganismů a jejich polohy a nástavec pro fokusování laserového svazku pro zachycení a přemísťování vybraných buněk fotoautotrofních mikroorganismů do mikroportu pro vybrané buňky fotoautotrofních mikroorganismů.

- 40 Ve výhodném provedení zařízení podle tohoto technického řešení je zdroj světla připojený k mikrofluidnímu čipu tvořen LED diodami nebo laserem.

V jiném výhodném provedení zařízení podle tohoto technického řešení, a to tam, kde se měří a vyhodnocuje autofluorescence z fotosyntetizujících pigmentů fotoautotrofních mikroorganismů, je detektorem emitovaného elektromagnetického záření tříděných fotoautotrofních mikroorganismů CCD kamera.

- 45 V dalším výhodném provedení zařízení podle tohoto technického řešení, a to tam, kde se měří a vyhodnocuje Ramanovský rozptyl, je detektorem emitovaného elektromagnetického záření tříděných fotoautotrofních mikroorganismů spektrometr a citlivá CCD kamera.

Přehled obrázku na výkrese

Technické řešení bude dále podrobněji popsán podle přiloženého výkresu, na němž je schematicky znázorněno příkladné provedení zařízení pro třídění živých buněk fotoautotrofních mikroorganismů.

5 Příklady provedení technického řešení

Na výkrese je schematicky znázorněno zařízení pro třídění živých buněk fotoautotrofních mikroorganismů podle technického řešení. Toto zařízení je opatřeno průhledným mikrofluidním čipem 4 s vertikálním kanálkem 1 o šířce od 0,5 do 2 mm, na jehož horním konci je vstup 5 tříděných fotoautotrofních mikroorganismů v nosné kapalině. Do vertikálního kanálku 1 je v jeho střední části zaústěn výstupní mikroport 3, tvořený šikmo dolů směřujícím mikrokanálkem 6 o šířce od 30 do 100 μm, který se stáčí vzhůru a rozšiřuje se do jímky, která je zásobníkem 2 pro vybrané buňky fotoautotrofních mikroorganismů a která je zaslepena neznázorněnou oddělovací uzávěrou pro zabránění kolísání tlakových poměrů v mikrofluidním systému. Délka šikmo dolů směřující části mikrokanálku 6 je u příkladného provedení asi 0,1 mm. K mikrofluidnímu čipu 4 je připojen zdroj 7 světla pro vyvolání emise elektromagnetického záření z tříděných fotoautotrofních mikroorganismů v nosné kapalině. Zdrojem 7 světla může být zdroj s LED diodami nebo laserový zdroj. Zdroj 7 světla osvětluje přes průhlednou hmotu mikrofluidního čipu 4 fotoautotrofních mikroorganismů v nosné kapalině ve vertikálním kanálku 1. Další součástí systému je detektor 8 emitovaného elektromagnetického záření fotoautotrofních mikroorganismů s analyzátozem emitovaného elektromagnetického záření fotoautotrofních mikroorganismů a jejich polohy. V případě, že systém měří autofluorescenci z fotosyntetizujících pigmentů fotoautotrofních mikroorganismů, je detektorem emitovaného elektromagnetického záření tříděných fotoautotrofních mikroorganismů běžná CCD kamera. V případě, že systém měří Ramanovský rozptyl, je detektorem emitovaného elektromagnetického záření tříděných fotoautotrofních mikroorganismů spektrometr a citlivá CCD kamera. Součástí systému je i laserový zdroj 9, generující laserový svazek pro zachycení a přemístování vybraných buněk fotoautotrofních mikroorganismů do mikroportu pro vybrané buňky fotoautotrofních mikroorganismů. U dna mikrofluidního čipu 4 je vytvořen odpadní kanálek 10 pro odvod těch sedimentovaných fotoautotrofních mikroorganismů v nosné kapalině, které nebyly přemístěny do zásobníku 2 vybraných buněk fotoautotrofních mikroorganismů. Mikrofluidní čip 4 je uložen na nástavci 11 s mikroposuvem pro fokusování laserového svazku.

V činnosti prvního příkladného provedení tohoto zařízení se vzorek zkoumaných fotoautotrofních mikroorganismů vstříkne do vstupu 5 tříděných fotoautotrofních mikroorganismů v nosné kapalině, načež mikroorganismy sedimentují do dolní části mikrofluidního čipu 4. Zdroj 7 světla, což může být zdroj s LED diodami, osvětlí zkoumané fotoautotrofní mikroorganismy v nosné kapalině. Pak se zdroj 7 světla vypne a detekuje se autofluorescence z fotosyntetizujících pigmentů fotoautotrofních mikroorganismů. Přibližně v polovině mikrofluidního čipu 4 jsou zobrazeny optickým systémem na detektoru 8 emitovaného elektromagnetického záření fotoautotrofních mikroorganismů, což je CCD kamera. Tato autofluorescence se analyzuje a zkoumá se, jestli daný fotoautotrofní mikroorganismus splňuje podmínky pro výběr, to jest zda splňuje prahovou podmínku na velikost fluorescenční stopy a intenzitu autofluorescence. Současně se i určí, jaká je jeho poloha. Pokud je fotoautotrofní mikroorganismus vybrán, je uchopen v blízkosti ohniska laseru z laserového zdroje 9 laserovým paprskem, což je princip optické pinzety, a přemístěn k výstupnímu mikroportu 3 pro sběr vybraných buněk fotoautotrofních mikroorganismů tak, aby proudnice kapaliny procházející tímto místem odplavila fotoautotrofní mikroorganismus k výstupnímu mikroportu 3 a od něj mikrokanálkem 6 do zásobníku 2 pro vybrané buňky fotoautotrofních mikroorganismů.

V činnosti druhého příkladného provedení tohoto zařízení se vzorek zkoumaných fotoautotrofních mikroorganismů rovněž vstříkne do vstupu 5 tříděných fotoautotrofních mikroorganismů v nosné kapalině, načež mikroorganismy sedimentují do dolní části mikrofluidního čipu 4. Zdroj 7

světla, což je v tomto případě zdroj laserového svazku o vlnové délce 785 nm, osvětlí zkoumané fotoautotrofní mikroorganismy v nosné kapalině. Pak se zdroj 7 světla vypne a detekuje se spektrum Ramanova rozptylu na mikroorganismu. Toto spektrum Ramanova rozptylu umožňuje bezkontaktní a nedestruktivní identifikaci chemických vazeb v mikroorganismu. Z poměru spektrálních maxim odpovídajících beta-karotenu lze určit jeho koncentraci a u některých druhů řas i určit velikost lipidických kapének. Poměr spektrálních maxim odpovídajících jednoduché a dvojné vazbě mezi uhlíky umožňuje určení nasycenosti lipidů uvnitř mikroorganismu. Zařízení pracuje tak, že jakmile je detekována přítomnost mikroorganismu, zacílí na něj chytací svazek a tento mikroorganismus přemístí do pozice ramanovského svazku, načež se vypne chytací svazek, zapne se měřicí svazek pro detekci ramanovských spekter, sejme se Ramanovo spektrum, vyfiltruje se, vyhodnotí se poměry vybraných spektrálních maxim, vypne se měřicí svazek pro detekci ramanovských spekter, zapne se chytací svazek a jím se mikroorganismus přesune do příslušné proudnice, která tento mikroorganismus dopraví k výstupnímu mikroportu 3 a od něj mikrokanálkem 6 do zásobníku 2 pro vybrané buňky fotoautotrofních mikroorganismů.

Výhodou zařízení pro třídění živých buněk fotoautotrofních mikroorganismů je, že vertikální orientace vertikálního kanálku 1 brání kontaktu mikroorganismů se stěnou, takže nedochází k přichycování mikroorganismů ke stěně. Není třeba řídit pohyb kapaliny v průhledném mikrofluidním čipu 4, protože mikroorganismy samy sedimentují i v kapalině, která je statická. Rychlost sedimentace mikroorganismů lze řídit hustotou nosné kapaliny. Třebaže není možné analyzovat všechny mikroorganismy v kapalině, ty, které nejsou analyzované, samy sedimentují na dno mikrofluidního čipu 4 a nedostanou se mikrokanálkem 6 do zásobníku 2 pro vybrané buňky fotoautotrofních mikroorganismů. Naopak je možno je odčerpát odpadním kanálkem 10 pro opakované třídění. Vybrané mikroorganismy se zase samovolně nedostanou zpět do vertikálního kanálku 1 a je možné je odebrat mikropipetou nebo mikrofluidní stříkačkou. Další výhodou je, že se minimalizuje vzdálenost a čas, kdy mikroorganismy proudí v systému, protože jsou vstříknuty přímo do vertikálního kanálku 1 mikrofluidního čipu 4. Celý systém je přitom možné plně automatizovat, přičemž velkou výhodou způsobu i zařízení je, že se s mikroorganismy zachází bezkontaktně a nedestruktivně, což sebou nese i to, že kontaminace vytríděných mikroorganismů je minimální.

30 Průmyslová využitelnost

Způsob i zařízení podle technického řešení lze použít pro laboratorní i průmyslový výběr mikroorganismů pro jejich další využití v lékařství nebo v průmyslu.

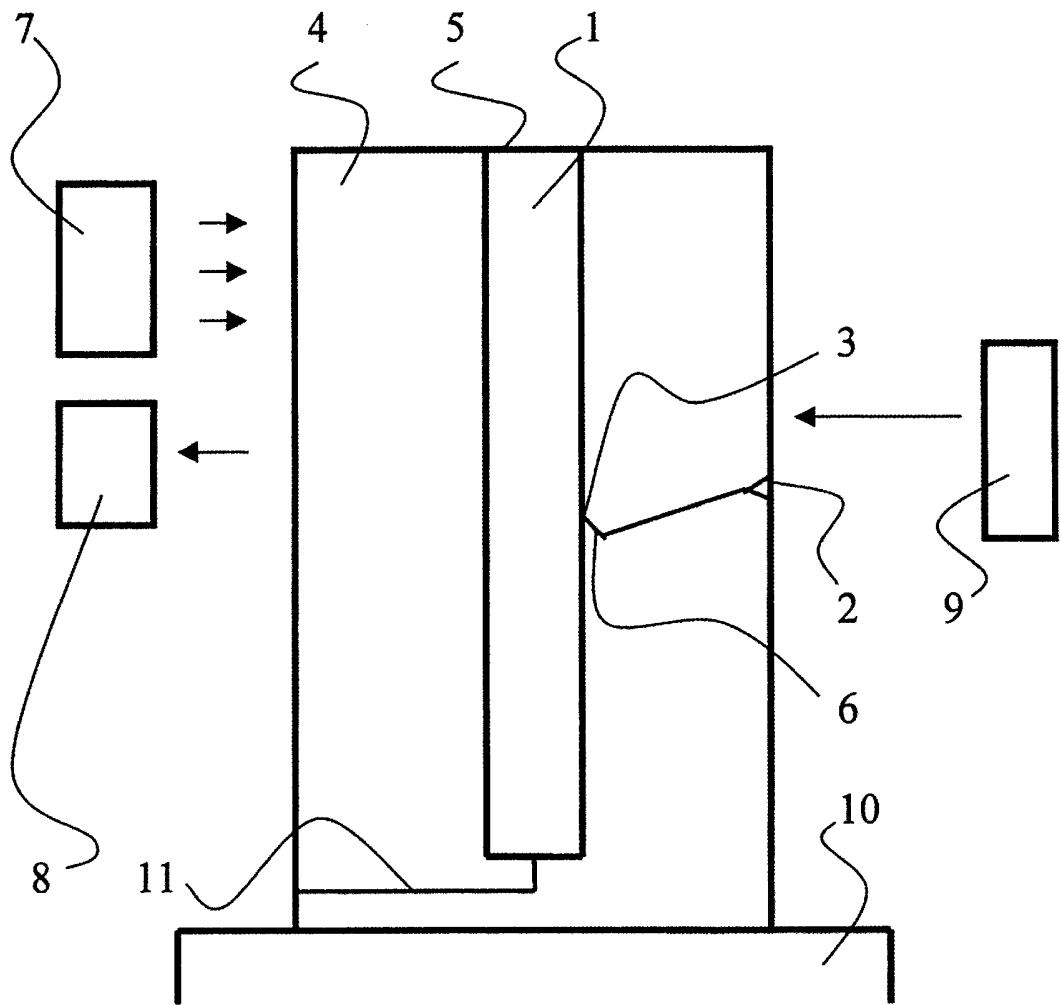
N Á R O K Y N A O C H R A N U

1. Zařízení pro třídění živých buněk fotoautotrofních mikroorganismů, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že je opatřeno průhledným mikrofluidním čipem (4) s vertikálním kanálkem (1) o šířce od 0,5 do 2 mm, na jehož horním konci je vstup (5) tříděných fotoautotrofních mikroorganismů v nosné kapalině, přičemž do vertikálního kanálku (1) je v jeho střední části zaústěn výstupní mikroport (3), tvořený šikmo dolů směřujícím mikrokanálkem (6) o šířce od 30 do 100 μm , který se stáčí vzhůru a rozšiřuje se do jímky pro vybrané buňky fotoautotrofních mikroorganismů, která je zaslepena oddělovací uzávěrou pro zabránění kolísání tlakových poměrů v mikrofluidním systému, a přičemž k mikrofluidnímu čipu (4) je připojen zdroj (7) světla pro vyvolání emise elektromagnetického záření z tříděných fotoautotrofních mikroorganismů v nosné kapalině, detektor (8) emitovaného elektromagnetického záření fotoautotrofních mikroorganismů s analyzátozem emitovaného elektromagnetického záření fotoautotrofních mikroorganismů a jejich polohy a nástavec (11) pro fokusování laserového svazku pro zachycení a přemísťování vybra-

ných buněk fotoautotrofních mikroorganismů do výstupního mikroportu (3) pro vybrané buňky fotoautotrofních mikroorganismů.

2. Zařízení podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že k mikrofluidnímu čipu (4) je připojen zdroj (7) světla ve formě LED diod nebo laseru.
- 5 3. Zařízení podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že detektorem (8) emitovaného elektromagnetického záření tříděných fotoautotrofních mikroorganismů je CCD kamera pro snímání autofluorescence z fotosyntetizujících pigmentů fotoautotrofních mikroorganismů.
- 10 4. Zařízení podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že detektorem (8) emitovaného elektromagnetického záření tříděných fotoautotrofních mikroorganismů je spektrometr a citlivá CCD kamera pro snímání spektra Ramanova rozptylu na mikroorganismu.

1 výkres



Konec dokumentu