

FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

273 408

(21) PV 7848-88.H
(22) Přihlášeno 29 11 88

(11)

(13) B1

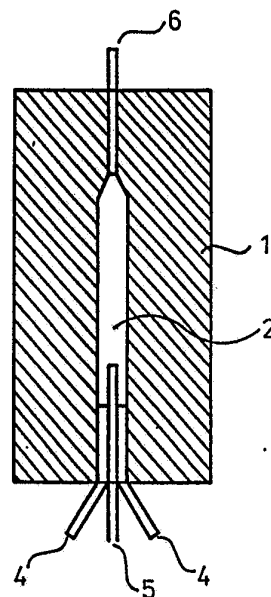
(51) Int. Cl.⁵
G 01 N 21/05

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

(75) Autor vynálezu PLÁŠEK JAROMÍR RNDr.CSc.,
GÁŠKOVÁ DANA RNDr.,
KRAJINA TOMÁŠ, PRAHA

(54) Průtoková kyveta pro optickou detekci a
počítání mikroskopických objektů
v suspenzích

(57) Průtoková kyveta k optické detekci a
počítání mikroskopických objektů v suspen-
zích, sestávající ze dvou průhledných vy-
leštěných desek (1), mezi které je vložena
neprůhledná distanční vrstva (3), jejímž
přerušením je vytvořen, po spojení dvou
průhledných, vyleštěných desek (1), přímý,
průhledný kanálek (2), na jehož jednom konci
vstupuje centrální kapilára (5) pro přívod
analyzované suspenze a přívod (4) nosné te-
kutiny obklopující symetricky centrální ka-
piláru (5), přičemž centrální kapilára (5)
zasahuje do 1/3 až 1/2 délky přímého, prů-
hledného kanálku (2), jehož druhý konec je
zúžen do odsávacího kanálku (6).



Vynález se týká průtokové kyvety pro určování koncentrace mikroskopických objektů v suspenzích s možností selektivně detegovat různé typy částic, které se liší buď velikostí, nebo fluorescenčními vlastnostmi.

V řadě technických, biologických a lékařských oborů se často setkáváme s požadavkem analyzovat soubory mikroskopických objektů z hlediska distribuce jejich velikostí nebo podle fluorescenčních vlastností, které mohou být svázány jak s jejich chemickým složením, tak s existencí povrchových receptorů, schopných specificky vázat určité fluorescenčně značené ligandy. K tomuto účelu slouží optická metoda označovaná jako proudová cytometrie. Název metody úzce souvisí s tím, že se používá převážně v biomedicínských aplikacích k analýze buněčných populací.

Dosud používaná zařízení pro proudovou cytometrii využívají k vyvolání proudění nosného média a injekci analyzovaného vzorku tlaku stlačeného plynu. Tlak působící na nosné médium činí zpravidla 1 až $1,5 \times 10^5$ Pa. Injekce vzorku do nosné kapaliny vyžaduje tlak větší o 10^4 Pa. K vybuzení optických signálů se nejčastěji používá laserového záření kvůli možnosti fokusovat laserový paprsek do ohniska o malém průměru, řádově 10 μm , čímž se dosáhne velmi vysoké intenzity záření, řádově až MW/cm^2 .

Dosud používané průtokové kyvety jsou válcovitého tvaru zužující se směrem k ústí, vyžadující přesnou regulaci tlaků, pod kterými jsou vháněny nosné médium a vzorek. Součástí zařízení jsou přetlakové zásobníky stlačeného plynu a regulovatelné zdroje tlaku, které činí zařízení složitým a nedostupným pro jednoduché aplikace například v biologických a lékařských laboratořích. Uvedené nedostatky podstatně snižuje průtoková kyveta k optické detekci a počítání mikroskopických objektů, podle vynálezu. Jeho podstata spočívá v tom, že průtoková kyveta se sestává ze dvou průhledných vyleštěných desek, mezi které je vložena neprůhledná distanční vrstva, jejímž přerušením je vytvořen, po spojení dvou průhledných, vyleštěných desek, přímý, průhledný kanálek, na jehož jednom konci vstupuje centrální kapilára pro přívod analyzované suspenze a přívod nosné tekutiny obklopující symetricky centrální kapiláru. Centrální kapilára zasahuje do 1/3 až 1/2 délky přímého, průhledného kanálku, jehož druhý konec je zúžen do odsávacího kanálku. Analyzovaná suspenze je tenkou tryskou zavedena do osy sloupce nosného média, které laminárně proudí průtokovou kyvetou. Toto médium unáší proud analyzovaného vzorku, který zůstává koncentrován na průměr řádově 0,2 mm téměř po celé délce přímého průhledného kanálku. Při koncentraci částic v suspenzi $1 \cdot 10^3 \cdot \text{ml}^{-1}$, činí potom jejich průměrná vzdálenost v tomto proudu asi 3 mm. Necháme-li takový proud procházet úzkým, intenzivním světelným paprskem, vysílají jednotlivé částice oddělené impulsy rozptýleného světla popřípadě fluorescence, které lze poslupně detegovat. Rozptýlené záření nese informaci o velikosti jednotlivých částic, fluorescence o jejich chemickém složení nebo povrchových vlastnostech.

Hlavní výhodou průtokové kyvety podle vynálezu je možnost provádět proudovou cytometrii v takových případech, kdy vysoká citlivost spojená s použitím laserových zdrojů světla není nutná, například prosté stanovení koncentrace buněk v suspenzích nebo selektivní stanovení koncentrací několika buněčných typů na základě rozdílů v intenzitách rozptýleného světla. Další výhody spočívají v možnosti zabezpečení definovaného proudění analyzované suspenze pomocí jediného sacího čerpadla, například rotačního zubového čerpadla, místo dvou regulovatelných zdrojů tlaku. Použitím sání místo přetlaku se navíc vyloučí nutnost používat přetlakových zásobníků stlačeného plynu a nosné kapaliny, čímž se značně zjednoduší konstrukce celého cytometru.

Vynález a jeho účinky jsou blíže vysvětleny v popise příkladu jeho provedení podle připojených výkresů, kde obr. 1 znázorňuje schematicky v náryse a obr. 2 v půdoryse v řezu, vedeném v horní třetině výšky přímého průhledného kanálku, průtokovou kyvetu pro optickou detekci a počítání mikroskopických objektů v suspenzích podle vynálezu.

Průtoková kyveta je tvořena dvěma leštěnými skleněnými deskami 1, které jsou paralelně připojeny na neprůhlednou distanční vrstvu 3 neprůhledného nekorodujícího materiálu, například gumy nebo nerezavějící oceli, o tloušťce 0,4 mm. Distanční vrstva 3 je tvořena dvěma oddělenými pásy, vytvářejícími přímý průhledný kanálek 2 o šířce 1,2 mm. Do tohoto přímého, průhledného kanálku 2 vstupují na jedné straně centrální kapilára 5 pro přívod analyzované suspenze a přívody 4 nosné tekutiny s vnějším průměrem 0,4 mm a světlostí 0,2 mm. Ve vzdálenosti 10 mm od ukončení centrální kapiláry 5 se nachází ústí průtokové kyvety zakončené odsávacím kanálkem 6, které je připojeno na odsávací zařízení. Po zapojení sání vtéká do kyvety přívody 4 nosná kapalina a centrální kapilára 5 přivádí analyzovanou suspenzi.

V popsaném provedení je proud buněk vzdálen od stěn přímého, průhledného kanálku 2 $\varnothing$ 0,5 mm. Při použití takových klasických světelných zdrojů jako jsou vysokotlaké výbojky nebo halogenové žárovky můžeme jejich světelné záření bez problému fokusovat do svazku o průměru - 0,2 mm. Tímto zářením lze potom detegovat mikroskopické částice proudící z centrální kapiláry 5 bez rušivého vlivu rozptylu světla na stěnách kanálu.

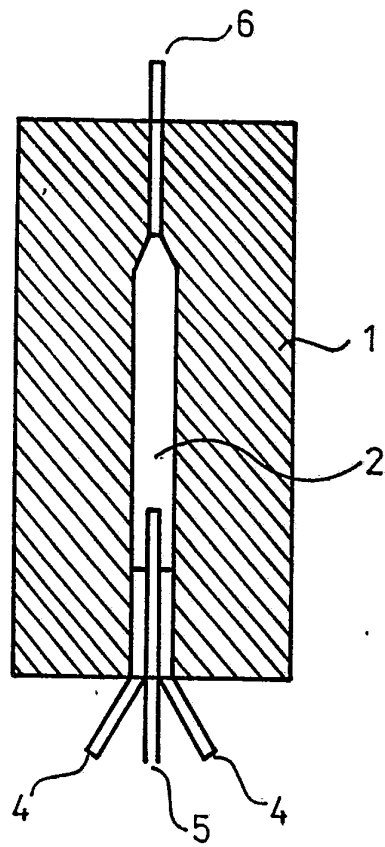
Potřebnému odstupu mezi jednotlivými částicemi procházejícími světelným svazkem se dosáhne větším zředěním suspenze, pro kapiláru o světlosti 0,2 mm postačí ředění 10^3 až 10^4 částic ml^{-1} .

Pomocí proudové cytometrie prováděné v popsané kyvetě lze počítat mikroorganismy, somatické buňky i jiné mikroskopické částice. Na základě rozdílů v intenzitě a spektrálních vlastnostech detegovaných světelných pulzů lze navíc selektivně stanovit koncentraci definovaných typů částic v analyzované suspenzi.

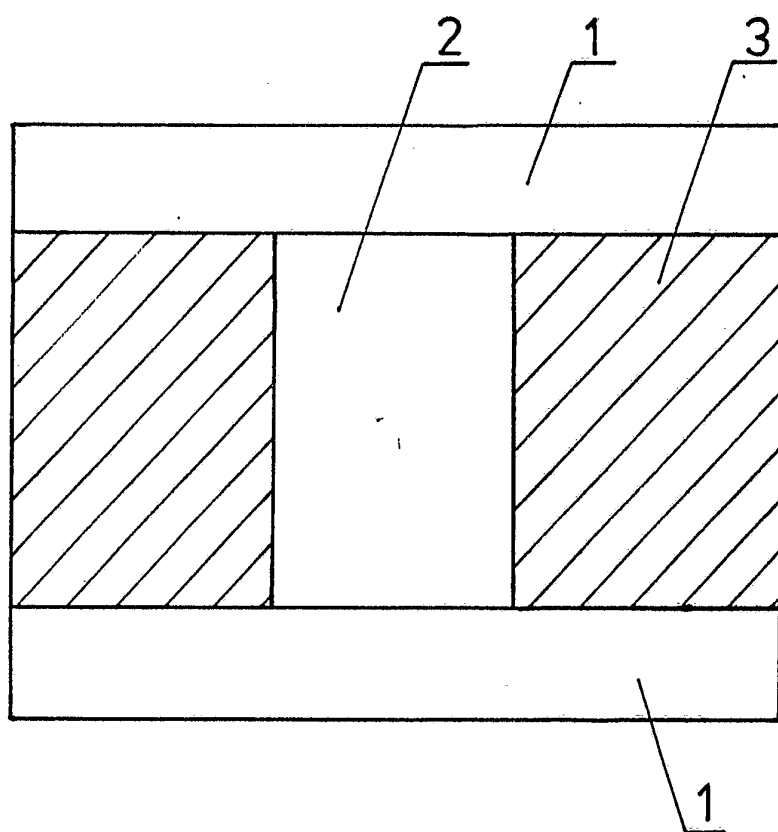
P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Průtoková kyveta k optické detekci a počítání mikroskopických objektů, vyznačující se tím, že sestává ze dvou průhledných vyleštěných desek (1), mezi které je vložena neprůhledná distanční vrstva (3), jejímž přerušením je vytvořen, po spojení dvou průhledných vyleštěných desek (1), přímý, průhledný kanálek (2), na jehož jednom konci vstupuje centrální kapilára (5) pro přívod analyzované suspenze a přívod (4) nosné tekutiny obklopující symetricky centrální kapiláru (5), přičemž centrální kapilára (5) zasahuje do 1/3 až 1/2 délky přímého, průhledného kanálku (2), jehož druhý konec je zúžen do odsávacího kanálku (6).

2 výkresy



Obr. 1



Obr. 2