

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

37 961

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

G01N 21/65 (2006.01)
C12Q 1/18 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2024-41991**
(22) Přihlášeno: **28.05.2024**
(47) Zapsáno: **25.06.2024**

(73) Majitel:
Masarykova univerzita, Brno, Brno-město, CZ
Ústav přístrojové techniky AV ČR, v. v. i., Brno,
Královo Pole, CZ

(72) Původce:
Ing. Veronika Holá, Ph.D., Moutnice, CZ
Mgr. Katarína Rebrošová, Brno, Kohoutovice, CZ
prof. MUDr. Filip Růžička, Ph.D., Brno, Soběšice,
CZ
Ing. Jan Ježek, Ph.D., Brno, Bystrc, CZ
Dr. Ota Samek, Ph.D., Tišnov, CZ
Ing. Lukáš Silhan, Ivanovice na Hané, CZ

(74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,
170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název užitného vzoru:
**Mikrofluidní čip a analytická sestava pro
charakterizaci a identifikaci mikrobů
pomocí optických detekčních metod**

CZ 37961 U1

Mikrofluidní čip a analytická sestava pro charakterizaci a identifikaci mikrobů pomocí optických detekčních metod

5 Oblast techniky

Technické řešení se týká mikrofluidního čipu a analytické sestavy pro charakterizaci a identifikaci mikrobů. Lze ji využít pro měření vlivu antibiotik na bakterie, pro uchovávání bakterií v mikrokomůrkách a k měření jejich vitality prostřednictvím různých detekčních metod (např. fluorescence, ramanovské spektroskopie, atd.). Uvedenou sestavu je tedy možné připojit například k Ramanovu spektrometru.

15 Dosavadní stav techniky

Rychlá a přesná identifikace patogenů je jednou z největších výzev medicíny. Včasná identifikace bakterií a jejich antimikrobiální rezistence by zjednodušila a zefektivnila nasazení odpovídající léčby infekcí, čímž by snížila náklady na zdravotní péči, výrazně pomohla zmírnit problém s narůstající antimikrobiální rezistencí, a především v mnoha případech by pomohla zachránit životy.

Zlatý standard diagnostiky u většiny infekcí vychází z kultivace na agarových plotnách a/nebo hemokultur v automatizovaných systémech (pro infekce krevního řečiště). Rutině následuje biochemická identifikace a fenotypová charakterizace profilu citlivosti/rezistence k antimikrobiálním látkám. Čas potřebný pro identifikaci je mezi 48 hodinami až několika dny (pro pomalu rostoucí mikroby).

Existují i sérologické a/nebo imunochromatografické metody, které jsou vysoce specifické a mohou být použity pro potvrzení/vyloučení přítomnosti určitých mikrobů.

V posledních dekádách dochází k mnoha snahám o zrychlení procesu klinické diagnostiky různými metodami. Přelomem byl nástup hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF MS (matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry), která je rychlá, efektivní a relativně levná metoda založená na fingerprintingu proteinů v mikrobiálních buňkách. Avšak i u MALDI-TOF MS je pro přesnou identifikaci krok kultivace potřebný a využívá poměrně nákladný spotřební materiál.

Oproti molekulárně-biologickým metodám (které také možno využít pro diagnostiku z malých objemů vzorků) ponechává Ramanova spektrometrie buňky živé, co umožňuje jejich další testování. Příprava vzorku je jednoduchá a rychlá, nevyžaduje nutně nákladný spotřební materiál.

Zavedení dodatečného zdroje záření v technikách mikroskopie lze využít například k excitaci fluorescence, k fotopolymeracím, k laserovému řezání biologických preparátů a také k vytváření fokusovaných zářivých polí pro manipulaci s částicemi (např. viry a bakteriemi).

Jedním ze zařízení, které lze použít pro zavedení dodatečného zdroje záření kolmo vůči optické ose objektivu mikroskopu, je optická pinzeta popsaná v užitém vzoru č. CZ 21642. Podstata optické pinzety spočívá v tom, že silové účinky fokusovaného laserového svazku zacíleného na mikrometrové objekty (živé i neživé) umožní prostorové zachycení těchto objektů. Tyto objekty jsou následně charakterizovány pomocí mikroskopu.

Uvedená optická pinzeta je v podstatě adaptér, který umožňuje snadné zavedení ultrafialového, viditelného a infračerveného záření do optické cesty mikroskopu. Tento adaptér zahrnuje hlavní část adaptéru a kovové, s výhodou invarové, těleso, které jsou vzájemně spojeny tak, že záření vycházející z kovového (invarového) tělesa je kolmé vůči optické ose mikroskopového objektivu, přičemž v hlavní části adaptéru je umístěno dichroidní zrcadlo, nakloněné vůči optické ose

mikroskopového objektivu pod úhlem 45° , za dichroidním zrcadlem je umístěno skleněné okénko, svírající s optickou osou mikroskopového objektivu úhel 45° a zároveň s dichroidním zrcadlem úhel 90° , na spodní straně hlavní části adaptéru je přišroubován upevňovací šroub pro připojení adaptéru k tělu optického mikroskopu, k upevňovacímu šroubu je připevněn optický filtr blokující záření použitého zdroje záření a na vrchní straně hlavní části adaptéru je vlisována mosazná objímka se závitem pro připojení mikroskopového objektivu. Kovové (invarové) těleso zahrnuje zdroj záření a čočku, která je umístěna za zdrojem záření, blíže k hlavní části adaptéru.

Popsaná optická pinzeta umožňuje manipulaci s částicemi, ale nijak neřeší paralelní stanovení jejich vitality za různých podmínek, které je zásadní pro rychlou a přesnou identifikaci patogenů, popřípadě pro studium vlivu různých léčiv na jednotlivé skupiny patogenů.

Podstata technického řešení

Výše popsané nevýhody řeší mikrofluidní čip, který obsahuje mikrofluidní kanály a k nim připojené komory. Studované patogeny jsou ke komorám přiváděny uvedenými mikrofluidními kanály a do jednotlivých komor mohou být transportovány výše popsanou optickou pinzetou. Při jednom měření je možné použít více nezávislých komor, do kterých je možné vložit jak stejné tak i rozdílné druhy bakterií a následně je všechny ovlivňovat stejným typem a koncentrací antibiotik.

Mikrofluidní čip je umístěn na podstavě, která je umístěna kolmo k ose objektivu optického mikroskopu, ke kterému je připojena výše popsaná optická pinzeta, a které dohromady tvoří analytickou sestavu. Mikroskopovým objektivem je svazek záření přiveden do mikrofluidního čipu a slouží k výběru a zachycení požadovaných buněk.

Předkládané technické řešení umožňuje neinvazivní a nedestruktivní detekci a další charakterizaci mikrobů a jejich citlivosti, případně rezistence vůči antimikrobiálním látkám, a to přímo z lidských tělesných tekutin (krev, sliny apod.). V porovnání s jinými dostupnými metodami dokáže analytická sestava pracovat s nízkým množstvím mikrobů ve vzorku, dokáže identifikovat velké množství možných patogenů a její provoz je relativně levný.

Předmětem předkládaného technického řešení je tedy mikrofluidní čip pro mikroskopickou analýzu, který obsahuje centrální kanál, opatřený na jednom konci alespoň jedním vstupním kanálkem, připojeným ke vstupnímu otvoru pro kapalně médium, a na druhém konci alespoň jedním výstupním kanálkem, připojeným k výstupnímu otvoru pro kapalně médium. Počet vstupních a výstupních kanálků je variabilní podle účelu mikroskopické analýzy. V jednom provedení může mikrofluidní čip obsahovat až 10 vstupních a až 10 výstupních kanálků, umístěných na opačných koncích mikrofluidního čipu.

Centrální kanál je v jedné své části uspořádán do meandru, který slouží k promíchání protékající kapaliny. Meandrem se rozumí několik (typicky 3 až 5) půlkruhových zatáček centrálního kanálu, kde dochází změnou rychlostí kapaliny na vnitřní a vnější straně oblouku k promíchání a homogenizaci postupující kapaliny. Poloměr půlkruhové zatáčky centrálního kanálu je s výhodou v rozmezí od $100\ \mu\text{m}$ do $500\ \mu\text{m}$.

Mezi meandrem centrálního kanálu a výstupním kanálkem je k centrálnímu kanálu připojen alespoň jeden boční kanálek opatřený na svém konci mikrokomorou. Ta slouží k umístění testovaného vzorku, například buněk. Centrálním kanálem a bočním kanálkem je při mikroskopické analýze k testovanému vzorku přiváděno kapalně médium obsahující testované sloučeniny a kombinace. Počet bočních kanálků může být od 1 do několika desítek, například od 1 do 50.

Všechny kanálky mikrofluidního čipu, s výjimkou vstupních a výstupních otvorů, jsou po celé své délce uzavřeny vzduchotěsnou a kapalinotěsnou vrstvou.

Mikrofluidní čip je vyrobený z opticky čistého materiálu. Opticky čistým materiálem se rozumí materiál, který má velmi malé množství nečistot a defektů, což umožňuje volný průchod světla bez výrazného rozptylu nebo absorpce.

5

Mikrofluidní čip má s výhodou takové rozměry, aby byl kompatibilní s laboratorním mikroskopem. S výhodou má mikrofluidní čip rozměry plochy krycího nebo podložního sklíčka mikroskopu. V jednom provedení jsou rozměry mikrofluidního čipu v rozmezí od 20 mm x 40 mm x 0,5 mm do 26 mm x 76 mm x 10 mm.

10

V jednom konkrétním provedení mají vstupní a výstupní kanálky s výhodou obdélníkový průřez 250 μm x 20 μm . Jednotlivé vstupní kanálky se postupně spojují do centrálního kanálu o stejném průřezu. Centrální kanál se dále s výhodou ještě před meandrem zúží, s výhodou na průřez 100 μm x 20 μm . Za meandrem z centrálního kanálu odbočuje několik (jednotky až desítky) bočních kanálků, s výhodou o průřezu 20 μm x 20 μm a s výhodou o délce 50 μm , které jsou zakončeny válcovou mikrokomorou, s výhodou o průměru 150 μm .

15

Regulací toku kapalného média ve vstupních kanálcích je možné přesně a rychle měnit koncentraci látek (například koncentraci antibiotik) v mikrokomoře.

20

V jednom provedení je mikrofluidní čip vyrobený z opticky čistého materiálu, vybraného ze skupiny zahrnující polydimethylsiloxan (PDMS), polymethylmethakrylát a sklo. Příprava mikrofluidních čipů z polymethylmethakrylátu nebo skla je však výrazně náročnější a to jak po přístrojové, chemické, finanční i časové stránce, nežli příprava mikročipů z PDMS. S výhodou je tedy materiálem mikrofluidního čipu PDMS.

25

V jednom provedení může být mikrofluidní čip vyroben metodou „soft lithography“ (měkká litografie), odléváním na masku z SU-8 vytvořenou UV litografií na křemíkovou destičku. Na mikrofluidním čipu jsou měkkou litografií vytvořeny kanálky. Reliéfní kanálek je následně uzavřen vzduchotěsným a kapalino těsným přilepením krycího sklíčka, s výhodou plasmatickou aktivací, které tuto strukturu uzavře a je dostatečně opticky vhodné pro následné měření a případnou manipulaci optickou pinzetou.

30

Kanálky mají s výhodou obdélníkový nebo čtvercový průřez, tento tvar je jednodušší vytvořit metodou litografie než kanálek o kruhovém či půlkruhovém průřezu (tyto typy kanálků se vyrábějí spíše chemickým leptáním). Další výhodou čtvercového nebo obdélníkového průřezu kanálku je, že nezkrsluje obraz, protože horní i spodní plocha jsou rovnoběžné a rovinné. Válcová plocha by tvořila jakousi čočku a kazila by obraz měřené bakterie a mohla by deformovat svazek optické pinzety. Výhodou je i to, že v případě čtvercového/obdélníkového průřezu se nebude příliš měnit rovina zaostření objektivu při pozorování bakterií a bakterie budou plavat kanálkem přibližně ve stejné vzdálenosti od krycího skla a bude jednodušší je zachytit optickou pinzetou a změřit jejich spektrum.

35

40

Samotný centrální kanál je opatřen vstupními a výstupními kanálky, s výhodou obdélníkového průřezu o rozměrech 250 \pm 50 μm x 25 \pm 10 μm , které jsou připojené ke vstupním a výstupním otvorům pro kapalně médium, které je do/z nich přiváděno/odváděno pomocí hadiček. Jednotlivé vstupní kanálky se postupně spojují do jednoho centrálního kanálu o stejném průřezu. Centrální kanál se následně zúží alespoň na polovinu své původní šířky, s výhodou se centrální kanál zúží na 30 až 50 % své původní šířky. V jednom provedení se centrální kanál zúží do kanálku o průřezu 100 \pm 20 μm x 25 \pm 10 μm .

45

50

V další části je zúžený centrální kanál uspořádán do meandru (jedná se o 3 až 5 půlkruhových zatáček kanálku), kde dochází změnou rychlostí kapaliny na vnitřní a vnější straně oblouku k promíchání kapaliny, která se jinak pohybuje pouze laminárně a k mísení dochází pouze difúzí zamíchá a homogenizuje.

55

Z centrálního kanálu za meandrem odbočuje několik (jednotky až desítky) bočních kanálků, s výhodou obdélníkového průřezu o rozměrech $25 \pm 10 \mu\text{m} \times 25 \pm 10 \mu\text{m}$ o délce $50 \pm 20 \mu\text{m}$, z nichž každý je zakončen mikrokomorou, s výhodou válcového tvaru, výhodněji o průměru $150 \pm 50 \mu\text{m}$ a výšce $25 \pm 10 \mu\text{m}$. Veškeré kapaliny, jak vstupní tak i výstupní, jsou přivedeny do mikrofluidního čipu pomocí hadiček.

Mikrokomorou jsou určeny pro umístění vzorku. Výše uvedené výhodné rozměry mikrokomor umožňují zkoumání i velmi malého množství vzorku (například buněk). Díky mikrokomorám v mikrofluidním čipu je možné vystavovat buňky stresovým faktorům, včetně antimikrobiálních látek, v uzavřeném prostředí.

Mikrokomora má s výhodou objem v rozmezí od 100 do 1100 mm^3 , výhodněji je ve tvaru válce o průměru $150 \pm 50 \mu\text{m}$ a výšce $25 \pm 10 \mu\text{m}$.

Předmětem předkládaného technického řešení je dále analytická sestava pro charakterizaci a identifikaci mikrobů pomocí optických detekčních metod, která obsahuje výše popsany mikrofluidní čip, umístěný na podstavě, která je svou rovinou v podstatě kolmá vůči optické ose objektivu mikroskopu.

Ve výhodném provedení je rovina podstavy (a tedy i v ní umístěného mikrofluidního čipu) nastavitelná vůči optické ose objektivu mikroskopu, který je osazen optickou pinzetou popsanou v CZ 21642. Pro optickou pinzetu je potřeba objektivů s vysokou numerickou aperturou (větší než 1, s výhodou je numerická apertura v rozmezí od 1,2 do 1,3). Pracovní vzdálenost těchto objektivů je v rozmezí mezi 0,2 mm a 0,5 mm. Vzdálenost mezi objektivem mikroskopu a mikrofluidním čipem umístěným na podstavě je v témže rozmezí mínus tloušťka krycího skla ($0,15 \text{ mm} \pm 0,05 \text{ mm}$).

Ve výhodném provedení je podstavou tříosý stolek, s výhodou tříosý říditelný stolek, který umožňuje naklápění mikrofluidního čipu vůči ose objektivu mikroskopu a tím paralelizovat měření rychlým přesunem kapaliny mezi jednotlivými komorami. Je tak možné měřit více vzorků najednou, každý v jiné mikrokomoře, což značně urychluje měření.

V jednom provedení je mikroskop připojen k Ramanovu spektrometru. Toto uspořádání umožňuje studium vitality bakterií pomocí Ramanovy spektroskopie. V jednom uspořádání je mikroskop součástí Ramanova spektrometru, respektive optická pinzeta a mikrofluidní čip jsou vloženy do Ramanovského mikroskopu tak, že se optická pinzeta našroubuje mezi tělo mikroskopu a mikroskopový objektiv a mikrofluidní čip se vloží do říditelného stolku mikroskopu.

Optická pinzeta je popsána v užitém vzoru č. CZ 21642. Jedná se o adaptér, který umožňuje snadné zavedení ultrafialového, viditelného a infračerveného záření do optické cesty mikroskopu. Tento adaptér zahrnuje hlavní část adaptéru a kovové těleso, které jsou vzájemně spojeny tak, že záření vycházející z kovového tělesa je kolmé vůči optické ose mikroskopového objektivu, přičemž v hlavní části adaptéru je umístěno dichroidní zrcadlo, nakloněné vůči optické ose mikroskopového objektivu pod úhlem 45° , za dichroidním zrcadlem je umístěno skleněné okénko, svírající s optickou osou mikroskopového objektivu úhel 45° a zároveň s dichroidním zrcadlem úhel 90° , na spodní straně hlavní části adaptéru je přišroubován upevňovací šroub pro připojení adaptéru k tělu optického mikroskopu, k upevňovacímu šroubu je připevněn optický filtr blokující záření použitého zdroje záření a na vrchní straně hlavní části adaptéru je vlisována mosazná objímka se závitem pro připojení mikroskopového objektivu. Uvedené kovové těleso je s výhodou z invarového materiálu a zahrnuje zdroj záření a čočku, která je umístěna za zdrojem záření, blíže k hlavní části adaptéru.

Optická pinzeta obsahuje jeden chytací a druhý analyzační laserový paprsek. Optická pinzeta slouží pro výběr a zachycení požadovaného vzorku, umožňuje bezkontaktní transport tohoto vzorku do

mikrokomory a jeho analýzu Ramanovou spektroskopií s využitím jednoho chytacího a druhého analyzačního laserového svazku.

5 V objektivu mikroskopu jsou chytací laserový svazek a analyzační laserový svazek optické pinzety přivedeny do mikrofluidního čipu.

10 Hadičky během provozu analytické sestavy přivádějí do vstupních otvorů mikrofluidního čipu veškeré vstupní kapaliny a odvádějí veškeré výstupní kapaliny z výstupních otvorů mikrofluidního čipu. Ve výhodném provedení jsou používány dva typy hadiček. Tenké hadičky o vnějším průměru $360 \pm 20 \mu\text{m}$ a vnitřním průměru $140 \pm 20 \mu\text{m}$ vyrobené z materiálu PEEK a hadičky o vnějším průměru $1,5 \pm 0,1 \text{ mm}$ a vnitřním průměru od $0,1 \text{ mm}$ do 1 mm , tyto hadičky mohou být vyrobené též z PEEKu nebo z teflonu.

15 Tenké hadičky se používají pro přívod kapalných vzorků do čipu z důvodu nutnosti přesnější manipulace s průtoky kapalin a jejich průměr bývá lépe definovaný, silnější hadičky slouží spíše k odvodu kapaliny z čipu. Mají zpravidla větší vnitřní průřezy, aby nedocházelo k jejich ucpávání.

20 Krycí sklíčko slouží k uzavření profilu mikrofluidního kanálku, který je po odlití nebo otištění z masky tvořen otevřeným reliéfem v opticky čistém materiálu mikrofluidního čipu (plastu nebo skle) a je potřeba ho překrýt. Je vhodné použít krycí sklíčko, protože má optické a rozměrové vlastnosti vhodné a potřebné pro použití optické pinzety. Lze použít i jiné materiály, ale jejich tloušťka nesmí být větší než je pracovní vzdálenost mikroskopového objektivu s vyšší numerickou aperturou a to je $0,15 \text{ mm}$ až $0,5 \text{ mm}$. V jednom provedení je pracovní vzdálenost optické pinzety od krycího sklíčka v rozmezí od 0 do $100 \mu\text{m}$.

25 Během provozu analytické sestavy jsou hadičkami do mikrofluidního čipu přiváděny vstupní kapaliny. Vzorek (například mikroby v nosném médiu) je přiváděn vstupním kanálkem, centrálním kanálem a následně je bočním kanálkem transportován do mikrokomory prostřednictvím optické pinzety. Optická pinzeta obsahuje jeden chytací a druhý analyzační laserový paprsek. Díky tomu je možné vybrat a zachytit požadovaný vzorek, bezkontaktně transportovat tento vzorek do mikrokomory a analyzovat jej například Ramanovou spektroskopií s využitím Ramanova spektrometru. Po vyčištění centrálního kanálu od zbytků vzorků (mikrobů) jsou s výhodou vstupními kanálky, dále centrálním kanálem a následně bočními kanálky do mikrokomory prostřednictvím optické pinzety přiváděny další látky, jejichž vliv na vzorek může být zkoumán (například roztok antibiotik a média). Koncentrace těchto látek v mikrokomoře může být ovlivňována změnou rychlosti toku kapaliny ve vstupních kanálcích. Vzorky jsou následně měřeny Ramanovou spektroskopií s využitím Ramanova spektrometru.

40 Záření nepružně rozptýlené zachyceným vzorkem (Ramanův rozptyl) nese informaci o molekulárních vazebných vibracích ve vzorku a napomáhá určit jeho chemické složení s mikrometrovým prostorovým rozlišením. Jediný laserový svazek tak umožní bezkontaktně a sterilně zachytit vzorky v kapalině a současně je diagnostikovat, aniž by byla poškozena jejich struktura nebo fyziologie. Vlnová délka je volena tak, aby nedocházelo k absorpci záření, a tím i k destrukci vzorku a současně, aby byl Ramanův rozptyl detekovatelný. Pro živé mikroorganismy je vhodné volit delší vlnové délky (700 až 900 nm). Při takto zvolené vlnové délce, je možné požadovaný vzorek sledovat i několik hodin (tzv. časosběrná měření) nebo naopak sledovat velmi rychlé dynamické procesy.

50 Analytickou sestavu podle předkládaného technického řešení lze s výhodou použít pro měření vlivu antibiotik na bakterie, při němž jsou bakterie uchovávány v mikrokomorách a jejich vitalita je měřena prostřednictvím různých detekčních metod, např. fluorescence, Ramanovy spektroskopie, atd.

55 Koncentrace antibiotik se mění v závislosti na rychlosti toku média s antibiotiky ve vstupních kanálcích. Vitalita bakterií se měří například Ramanovou spektroskopií a hledá se koncentrace

a typ antibiotik, které dané bakterie zabíjejí. Při jednom měření je možné použít více nezávislých mikrokomor, do kterých je možné vložit jak stejné, tak i rozdílné druhy bakterií a následně tyto rozdílné druhy bakterií ovlivňovat stejným typem a koncentrací antibiotik.

- 5 Předkládané technické řešení umožňuje rychlé, bezkontaktní a šetrné měření Ramanova spektra živých i neživých vzorků (například bakteriálních buněk). Měření je nedestruktivní, bakteriální buňky měření přežijí, a je tedy možné je využít pro následné analýzy.

10 Objasnění výkresů

Obrázek 1: Axonometrický pohled na analytickou sestavu.

Obrázek 2: Boční pohled na analytickou sestavu.

Obrázek 3: Nákres mikrofluidního čipu a schéma kanálu 6.

15

Příklad uskutečnění technického řešení

20 Byla sestrojena analytická sestava pro charakterizaci a identifikaci mikrobů Ramanovou spektroskopií podle obrázků 1 a 2. Analytická sestava obsahuje mikrofluidní čip 2, z jehož horní strany po bocích vystupují hadičky 3 z materiálu PEEK a který je svou spodní stranou uložený na říditelném tříosém stolku, sloužícím jako podstava 4, který je umístěn na horní části objektivu 5 mikroskopu (s numerickou aperturou 1,3), který je dále svou spodní částí připojen k optické pinzetě 7 dle CZ 21642. Objektivem 5 mikroskopu jsou chytací a analytické laserové svazky optické
25 pinzety 7 přivedeny do mikrofluidního čipu 2. Mikroskop je součástí Ramanova spektrometru, optická pinzeta 7 a mikrofluidní čip 2 jsou vloženy do Ramanovského mikroskopu tak, že optická pinzeta 7 se našroubuje mezi tělo mikroskopu a mikroskopový objektiv 5 a mikrofluidní čip 2 (obrázek 3) se vloží do říditelného stolku mikroskopu.

30 Mikrofluidním čipem 2 (obrázek 3) prostupuje centrální kanál 6, k němuž jsou připojeny vstupní 6.1, výstupní 6.2 a boční kanálky 12. Vstupní a výstupní kanálky mají obdélníkový průřez 250 μm x 20 μm . Jednotlivé vstupní kanálky se postupně spojují do centrálního kanálu 6 o průřezu 250 μm x 20 μm . Centrální kanál 6 se dále zužuje na průřez 100 μm x 20 μm a jím procházející kapalný obsah se následně v meandru 11 zamíchá a homogenizuje. Meandr 11 obsahuje
35 5 půlkruhových zatáček o poloměru 125 μm . Z centrálního kanálu 6 odbočuje 10 bočních kanálků 12 o průřezu 20 μm x 20 μm a o délce 50 μm , které jsou zakončeny válcovými mikrokomorami o průměru 150 μm a výšce 20 μm .

40 Mikrofluidní čip 2 byl vyroben metodou měkké litografie, odléváním na masku z SU-8 vytvořenou UV litografií na křemíkovou destičku. Na mikrofluidním čipu 2 byly měkkou litografií z PDMS vytvořeny reliéfní kanálky, které byly následně uzavřeny vzduchotěsným a kapalino těsným přilepením krycího sklíčka plasmatickou aktivací.

45 Během provozu analytické sestavy jsou hadičkami 3 do mikrofluidního čipu 2 přiváděny vstupní i výstupní kapaliny. Vzorek (například mikroby v nosném médiu) je přiváděn vstupním kanálkem 6.1, dále centrálním kanálem 6 a následně je bočním kanálkem 12 transportován do mikrokomory 11 prostřednictvím optické pinzety 7. Optická pinzeta 7 obsahuje jeden chytací a druhý analyzační laserový paprsek. Díky tomu je možné vybrat a zachytit požadované vzorky, bezkontaktně transport tyto vzorky do mikrokomory a analyzovat je Ramanovou spektroskopií s využitím
50 Ramanova spektrometru. Následuje vyčištění centrálního kanálu 6 od zbytků vzorků a přivedení dalších látek, jejichž vliv na vzorek může být zkoumán, vstupním kanálkem, dále centrálním kanálem 6 a následně transport bočním kanálkem do mikrokomory prostřednictvím optické pinzety 7. Koncentrace těchto látek v mikrokomoře může být ovlivňována změnou rychlosti toku kapaliny ve vstupních kanálcích. Vzorky jsou následně měřeny Ramanovou spektroskopií s využitím
55 Ramanova spektrometru. Říditelný tříosý stolek sloužící jako podstava 4 umožňuje paralelizaci

měření rychlým přesunem mezi jednotlivými mikrokomorami. Je tak možné měřit více vzorků najednou, každý v jiné mikrokomoře, což značně urychluje měření. Velice malé rozměry mikrokomory umožňují zkoumaní i velmi malého množství vzorku (například bakteriálních buněk).

5

Průmyslová využitelnost

Uplatnění tohoto zařízení může být jak ve výzkumu, tak i v klinické diagnostice, či jiných aplikacích, kde je potřeba zkoumat bakterie na úrovni jednotlivých buněk, případně kde je žádoucí jejich kultivace v kontrolovaném mikroprostředí, včetně vystavování různým stresovým faktorům (změna teploty nebo koncentrace různých látek).

10

NÁROKY NA OCHRANU

1. Mikrofluidní čip (2) pro mikroskopickou analýzu, **vyznačený tím**, že obsahuje:

5 - centrální kanál (6), opatřený na jednom konci alespoň jedním vstupním kanálkem (6.1), připojeným ke vstupnímu otvoru (8) pro kapalné médium, a na druhém konci alespoň jedním výstupním kanálkem (6.2), připojeným k výstupnímu otvoru (9) pro kapalné médium;

příčemž centrální kanál (6) je v jedné své části uspořádán do meandru (11) pro promíchání kapaliny;

a příčemž mezi meandrem (11) centrálního kanálu (6) a výstupním kanálkem (6.2) je k centrálnímu kanálu (6) připojen alespoň jeden boční kanálek (12) opatřený na svém konci mikrokomorou (10);

10 příčemž mikrofluidní čip je vyrobený z opticky čistého materiálu.

2. Mikrofluidní čip (2) podle nároku 1, **vyznačený tím**, že centrální kanál (6) a boční kanálek (12) mají čtvercový nebo obdélníkový průřez.

3. Mikrofluidní čip (2) podle kteréhokoliv z předchozích nároků 1 až 2, **vyznačený tím**, že je vyrobený z polydimethylsiloxanu, polymethylmethakrylátu a/nebo skla, s výhodou je vyrobený
15 z polydimethylsiloxanu.

4. Mikrofluidní čip (2) pro mikroskopickou analýzu, **vyznačený tím**, že obsahuje:

- centrální kanál (6), opatřený na jednom konci alespoň jedním vstupním kanálkem (6.1), připojeným ke vstupnímu otvoru (8) pro kapalné médium, a na druhém konci alespoň jedním výstupním kanálkem (6.2), připojeným k výstupnímu otvoru (9) pro kapalné médium;

20 příčemž centrální kanál (6) je v jedné své části uspořádán do meandru (11) pro promíchání kapaliny;

a příčemž mezi meandrem (11) centrálního kanálu (6) a výstupním kanálkem (6.2) je k centrálnímu kanálu (6) připojen alespoň jeden boční kanálek (12) opatřený na svém konci mikrokomorou (10);

příčemž mikrofluidní čip je vyrobený z opticky čistého materiálu;

a příčemž centrální kanál (6) a boční kanálek (12) mají čtvercový nebo obdélníkový průřez;

25 a příčemž meandr (11) sestává ze třech až pěti půlkruhových zatáček centrálního kanálu (6).

5. Mikrofluidní čip (2) podle nároku 4, **vyznačený tím**, že půlkruhové zatáčky meandru (11) centrálního kanálu (6) mají poloměr v rozmezí od 100 μm do 500 μm .

6. Mikrofluidní čip (2) pro mikroskopickou analýzu, **vyznačený tím**, že obsahuje:

30 - centrální kanál (6), opatřený na jednom konci alespoň jedním vstupním kanálkem (6.1), připojeným ke vstupnímu otvoru (8) pro kapalné médium, a na druhém konci alespoň jedním výstupním kanálkem (6.2), připojeným k výstupnímu otvoru (9) pro kapalné médium;

příčemž centrální kanál (6) je v jedné své části uspořádán do meandru (11) pro promíchání kapaliny;

a příčemž mezi meandrem (11) centrálního kanálu (6) a výstupním kanálkem (6.2) je k centrálnímu kanálu (6) připojen alespoň jeden boční kanálek (12) opatřený na svém konci mikrokomorou (10);

35 příčemž mikrofluidní čip je vyrobený z polydimethylsiloxanu;

a příčemž centrální kanál (6) a boční kanálek (12) mají čtvercový nebo obdélníkový průřez;

a příčemž meandr (11) sestává ze třech až pěti půlkruhových zatáček centrálního kanálu (6), příčemž průřez centrálního kanálu (6) má rozměry od 100 x 15 μm do 300 x 35 μm a půlkruhové zatáčky centrálního kanálu (6) mají poloměr v rozmezí od 100 μm do 500 μm .

5 7. Mikrofluidní čip (2) pro mikroskopickou analýzu, **vyznačený tím**, že obsahuje:

- centrální kanál (6), opatřený na jednom konci alespoň jedním vstupním kanálkem (6.1), připojeným ke vstupnímu otvoru (8) pro kapalně médium, a na druhém konci alespoň jedním výstupním kanálkem (6.2), připojeným k výstupnímu otvoru (9) pro kapalně médium;

příčemž centrální kanál (6) je v jedné své části uspořádán do meandru (11) pro promíchání kapaliny;

10 a příčemž mezi meandrem (11) centrálního kanálu (6) a výstupním kanálkem (6.2) je k centrálnímu kanálu (6) připojen alespoň jeden boční kanálek (12) opatřený na svém konci mikrokomorou (10);

příčemž mikrofluidní čip je vyrobený z polydimethylsiloxanu a má tvar kvádrů o rozměrech v rozmezí od 20 mm x 40 mm x 0,5 mm do 26 mm x 76 mm x 10 mm;

a příčemž centrální kanál (6) má obdélníkový průřez o rozměrech od 100 x 15 μm do 300 x 35 μm ;

15 a příčemž boční kanálek (12) má čtvercový nebo obdélníkový průřez o rozměrech 25 \pm 10 μm x 25 \pm 10 μm a délka bočního kanálku (12) je v rozmezí od 30 do 70 μm ;

a příčemž meandr (11) sestává ze třech až pěti půlkruhových zatáček centrálního kanálu (6), které mají poloměr v rozmezí od 100 μm do 500 μm .

8. Mikrofluidní čip (2) pro mikroskopickou analýzu, **vyznačený tím**, že obsahuje:

20 - centrální kanál (6), opatřený na jednom konci alespoň jedním vstupním kanálkem (6.1), připojeným ke vstupnímu otvoru (8) pro kapalně médium, a na druhém konci alespoň jedním výstupním kanálkem (6.2), připojeným k výstupnímu otvoru (9) pro kapalně médium;

příčemž centrální kanál (6) je v jedné své části uspořádán do meandru (11) pro promíchání kapaliny;

25 a příčemž mezi meandrem (11) centrálního kanálu (6) a výstupním kanálkem (6.2) je k centrálnímu kanálu (6) připojen alespoň jeden boční kanálek (12) opatřený na svém konci mikrokomorou (10);

příčemž mikrofluidní čip je vyrobený z polydimethylsiloxanu, polymethylmethakrylátu a/nebo skla a má tvar kvádrů o rozměrech

v rozmezí od 20 mm x 40 mm x 0,5 mm do 26 mm x 76 mm x 10 mm;

a příčemž centrální kanál (6) má obdélníkový průřez o rozměrech od 100 x 15 μm do 300 x 35 μm ;

30 a příčemž boční kanálek (12) má čtvercový nebo obdélníkový průřez o rozměrech 25 \pm 10 μm x 25 \pm 10 μm a délka bočního kanálku (12) je v rozmezí od 30 do 70 μm ;

a příčemž meandr (11) sestává ze třech až pěti půlkruhových zatáček centrálního kanálu (6), které mají poloměr v rozmezí od 100 μm do 500 μm ;

35 a příčemž mikrofluidní čip (2) je ve formě reliéfu z polydimethylsiloxanu, jehož vystupující plocha je vzduchotěsně a kapalinotěsně uzavřena krycím sklem (1).

9. Mikrofluidní čip (2) podle kteréhokoliv z předchozích nároků 1 až 8, **vyznačený tím**, že mikrokomora (10) má objem v rozmezí od 100 do 1100 mm³.

10. Analytická sestava pro charakterizaci a identifikaci mikrobů pomocí optických detekčních metod, **vyznačená tím**, že obsahuje:

- 5 - Ramanův mikroskop,
- optickou pinzetu (7) pro výběr, zachycení a transport požadovaného vzorku do mikrokomory (10), která je umístěna mezi tělem a objektivem (5) Ramanova mikroskopu, a přičemž analytická sestava je uzpůsobena pro přivedení chytacího laserového svazku a analyzačního laserového svazku optické pinzety (7) skrze objektiv (5) mikroskopu do mikrofluidního čipu (2);
- 10 - mikrofluidní čip (2) pro mikroskopickou analýzu, umístěný na podstavě (4), která je svou rovinou v podstatě kolmá vůči optické ose objektivu (5) mikroskopu; přičemž mikrofluidní čip (2) obsahuje:
- centrální kanál (6), opatřený na jednom konci alespoň jedním vstupním kanálkem (6.1), připojeným ke vstupnímu otvoru (8) pro kapalné médium, a na druhém konci alespoň jedním výstupním kanálkem (6.2), připojeným k výstupnímu otvoru (9) pro kapalné médium;
- 15 přičemž centrální kanál (6) je v jedné své části uspořádán do meandru (11) pro promíchání kapaliny;
- a přičemž mezi meandrem (11) centrálního kanálu (6) a výstupním kanálkem (6.2) je k centrálnímu kanálu (6) připojen alespoň jeden boční kanálek (12) opatřený na svém konci mikrokomorou (10);
- přičemž mikrofluidní čip je vyrobený z opticky čistého materiálu.
11. Analytická sestava pro charakterizaci a identifikaci mikrobů pomocí optických detekčních metod, **vyznačená tím**, že obsahuje:
- 20 - Ramanův mikroskop, jehož objektiv (5) má numerickou aperturu větší než 1;
- optickou pinzetu (7) pro výběr, zachycení a transport požadovaného vzorku do mikrokomory (10), která je umístěna mezi tělem a objektivem (5) Ramanova mikroskopu, a přičemž analytická sestava je uzpůsobena pro přivedení chytacího laserového svazku a analyzačního laserového svazku optické pinzety (7) skrze objektiv (5) mikroskopu do mikrofluidního čipu (2);
- 25 - mikrofluidní čip (2) pro mikroskopickou analýzu, umístěný na tříosém říditelném stolku, uzpůsobeném pro naklápění mikrofluidního čipu (2) vůči ose objektivu (5) mikroskopu, která je svou rovinou v podstatě kolmá vůči optické ose objektivu (5) mikroskopu; přičemž mikrofluidní čip (2) obsahuje:
- 30 - centrální kanál (6), opatřený na jednom konci alespoň jedním vstupním kanálkem (6.1), připojeným ke vstupnímu otvoru (8) pro kapalné médium, a na druhém konci alespoň jedním výstupním kanálkem (6.2), připojeným k výstupnímu otvoru (9) pro kapalné médium;
- přičemž centrální kanál (6) je v jedné své části uspořádán do meandru (11) pro promíchání kapaliny;
- a přičemž mezi meandrem (11) centrálního kanálu (6) a výstupním kanálkem (6.2) je k centrálnímu kanálu (6) připojen alespoň jeden boční kanálek (12) opatřený na svém konci mikrokomorou (10);
- 35 přičemž mikrofluidní čip je vyrobený z polydimethylsiloxanu, polymethylmethakrylátu a/nebo skla a má tvar kvádrů o rozměrech
- v rozmezí od 20 mm x 40 mm x 0,5 mm do 26 mm x 76 mm x 10 mm;

a přičemž centrální kanál (6) má obdélníkový průřez o rozměrech od 100 x 15 μm do 300 x 35 μm ;

a přičemž boční kanálek (12) má čtvercový nebo obdélníkový průřez o rozměrech 25 \pm 10 μm x 25 \pm 10 μm a délka bočního kanálku (12) je v rozmezí od 30 do 70 μm ;

5 a přičemž meandr (11) sestává ze třech až pěti půlkruhových zatáček centrálního kanálu (6), které mají poloměr v rozmezí od 100 μm do 500 μm ;

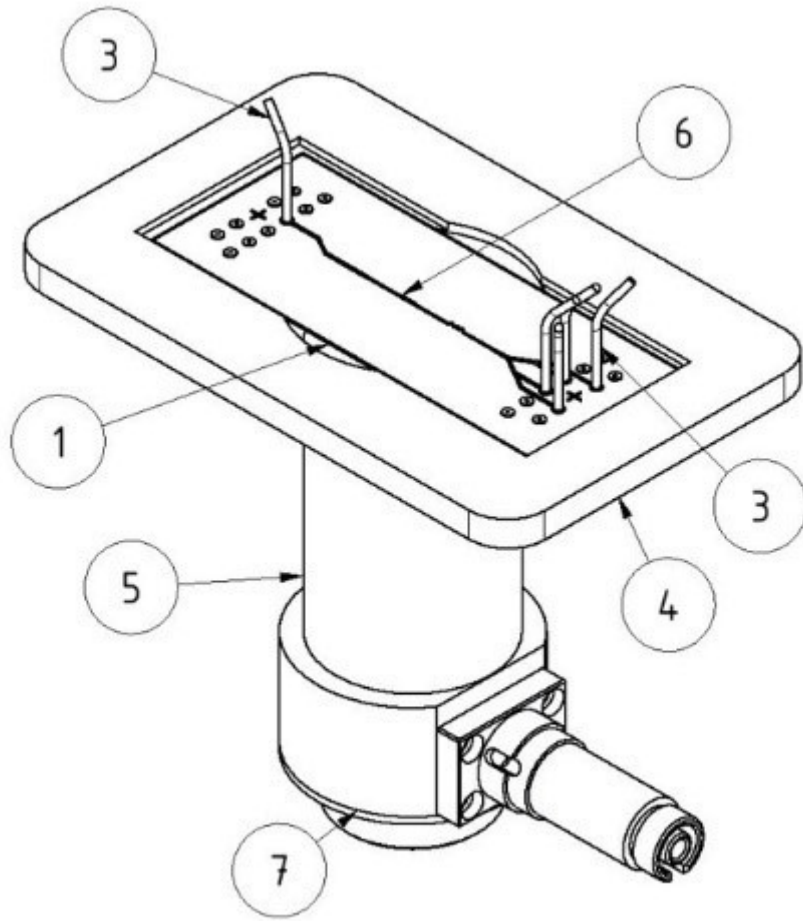
a přičemž mikrofluidní čip (2) je ve formě reliéfu z polydimethylsiloxanu, jehož vystupující plocha je vzduchotěsně a kapalinotěsně uzavřena krycím sklem (1).

3 výkresy

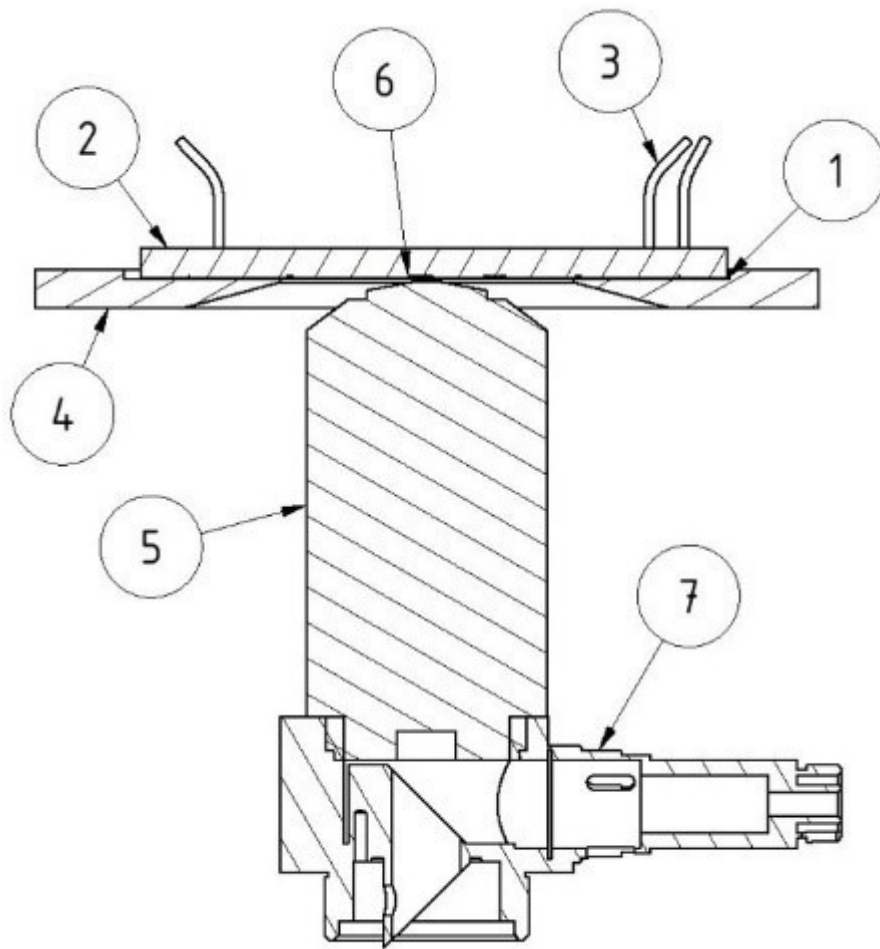
10

Seznam vztahových značek:

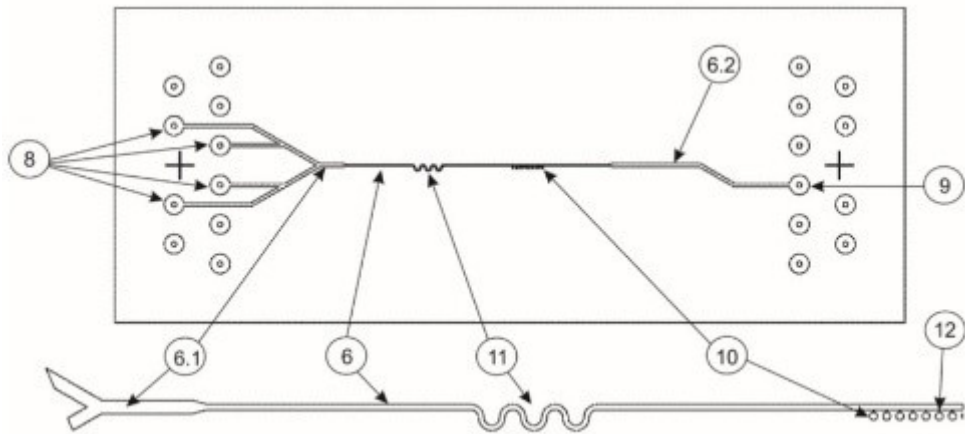
- 1 – krycí sklíčko
- 2 – mikrofluidní čip
- 3 – hadička
- 4 – podstava
- 5 – objektiv mikroskopu
- 6 – centrální kanál
- 6.1 – vstupní kanálek
- 6.2 – výstupní kanálek
- 7 – optická pinzeta
- 8 – vstupní otvor
- 9 – výstupní otvor
- 10 – mikrokomora
- 11 - meandr
- 12 – boční kanálek



Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3