



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) **PI9908767-7 B1**

(22) Data de Depósito: 16/03/1999
(45) Data da Concessão: 06/09/2011
(RPI 2122)



(51) *Int.Cl.:*
G02B 13/14

(54) Título: **SISTEMA DE FORMAÇÃO DE IMAGEM CONFOCAL, SISTEMA DE FOCALIZAÇÃO PARA USO COM UM SUBSTRATO, E, PROCESSOS DE EXAMINAR UM OBJETO, E DE FOCALIZAÇÃO PARA USO COM UM SUBSTRATO.**

(30) Prioridade Unionista: 16/03/1998 US 09/042527

(73) Titular(es): Amersham Biosciences Corp, GE Healthcare Bio-Sciences Corp, Praelux Incorporated

(72) Inventor(es): Jay K. Trautman, Neal A. Nicklaus, Richard L. Hansen, Timothy D. Harris, William Karsh

“SISTEMA DE FORMAÇÃO DE IMAGEM CONFOCAL, SISTEMA DE FOCALIZAÇÃO PARA USO COM UM SUBSTRATO, E, PROCESSOS DE EXAMINAR UM OBJETO, E DE FOCALIZAÇÃO PARA USO COM UM SUBSTRATO”

5 Esta é uma continuação em parte do pedido de patente US no. de série 09/042.527, depositado em 16 de março de 1998, que é incorporado aqui por referência em sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

10 A presente invenção refere-se a processos e aparelho para identificar agentes farmacológicos úteis para a diagnose e tratamento de doença pela realização de uma variedade de ensaios dos extratos de célula, células ou tecidos, em que a medição da atividade biológica envolve o uso de várias versões de um sistema de formação de imagem confocal de varredura em linha e rotinas de processamento de dados associadas.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

15 Há atualmente uma necessidade de descoberta e desenvolvimento de droga e, em geral, de pesquisa biológica para processos e aparelhos para precisamente realizar ensaios baseados em célula. Os ensaios baseados em célula são vantajosamente empregados para estimar a atividade biológica dos compostos químicos e o mecanismo de ação dos novos alvos biológicos. Em um ensaio baseado em célula, a atividade de
20 interesse é medida na presença de processos tanto competentes como complementares. Quando pertence à triagem do composto químico, a informação é disponível quanto à atividade específica do composto. Por exemplo, é possível estimar não somente se um composto liga-se ao alvo do ensaio, mas também se ele é um agonista ou um antagonista da atividade normal do alvo. Frequentemente, o alvo é um receptor de superfície de
25 célula. Em alguns trajetos de sinalização, o membro do trajeto de maior valor terapêutico potencial não é o receptor mas uma proteína de sinalização intracelular associada com o receptor. Portanto, é desejável desenvolverem-se processos para ensaiar a atividade por todo o trajeto, preferivelmente no meio celular.

 Além disso, há necessidade de rápida e não dispendiosamente

triar grandes números de compostos químicos. Esta necessidade surgiu na indústria farmacêutica, em que é comum testar compostos químicos quanto à atividade contra uma variedade de alvos bioquímicos, por exemplo, receptores, enzimas e ácidos nucleicos. Estes compostos químicos são coletados em grandes coleções, às vezes excedendo um milhão de compostos distintos. O uso do termo composto químico destina-se a ser interpretado amplamente a fim de incluir mas não ser limitado a simples moléculas orgânicas e inorgânicas, proteínas, peptídeos, ácidos nucleicos e oligonucleotídeos, carboidratos, lipídeos ou qualquer estrutura química de interesse biológico.

No campo de triagem de composto, os ensaios baseados em célula são realizados em coleções de células. A resposta medida é usualmente uma média em relação à população celular. Por exemplo, um instrumento popular usado para ensaios de canal iônico é descrito na Patente US 5.355.215. Um ensaio típico consiste de medir-se a dependência de tempo da fluorescência de um corante sensível a íon, a fluorescência sendo uma medida da concentração intracelular do íon de interesse que muda em consequência da adição de um composto químico. O corante é carregado dentro da população de células disposta na base da cavidade de uma placa multicavidades em uma ocasião antes da medição. Em geral, a resposta das células é heterogênea tanto em magnitude e tempo. Esta variabilidade pode obscurecer ou impedir a observação da atividade biológica importante para a triagem do composto. A heterogeneidade pode surgir de fontes experimentais, porém mais importantemente, a heterogeneidade é fundamental em qualquer população de células. Entre outras, a origem da variabilidade pode ser uma consequência da divergência do ciclo-de-vida entre a população, ou o resultado da divergência evolucionária do número de moléculas alvo ativas. Um processo que mitigue, compense ou mesmo utilize as variações aumentaria o valor dos ensaios baseados em célula na

caracterização da atividade farmacológica dos compostos químicos.

A quantificação da resposta das células individuais evita os problemas propostos pela não-uniformidade daquela resposta de uma população de células. Consideremos o caso em que uma fração menor da população responde ao estímulo. Um dispositivo que mede a resposta média terá menos sensibilidade do que um determinando a resposta celular individual. O último processo gera uma caracterização estatística do perfil de resposta, permitindo que se selecione o subconjunto de células ativas. Caracterização adicional da população aumentará a interpretação do perfil de resposta.

Vários dispositivos de medição têm sido usados na arte anterior em uma tentativa de tratar esta necessidade. Ensaio baseado em citômetro de fluxo são largamente praticados e medem as propriedades das células uma de cada vez passando as células através de um feixe laser focalizado. Diversas desvantagens acompanham este processo. O mais importante para a indústria farmacêutica é que os ensaios não podem prontamente ser realizados nos compostos dispostos em placas de microtitulação. Além disso, a produção é fraca, tipicamente 10-100 segundos por amostra, o tempo de observação de cada célula é <1 ms, proibindo ensaios cinéticos e, finalmente, somente o sinal mediado pela célula pode ser determinado.

Além disso, muitos ensaios requerem determinação dos locais relativos dos sinais de fluorescência. Os dispositivos chamados citômetros de varredura, como descritos nas Patentes US Nos. 5.107.422 e Patente US 5.547.849, são largamente usados para formar imagem de células únicas. A fim de ganhar velocidade aceitável, estes dispositivos operam a baixa (~ 5 - 10 μm) resolução. Assim, estes dispositivos oferecem pouca vantagem em relação aos citômetros de fluxo para ensaios requerendo informação espacial sobre a distribuição dos sinais de fluorescência.

Uma tecnologia alternativa adicional é o microscópio de campo total de câmara-rápida. Estes dispositivos têm a capacidade de obter imagens em uma resolução e velocidade comparáveis à presente invenção, em certas amostras. Entretanto, eles não são confocais e são
5 consequentemente susceptíveis a fundo de fluorescência e não podem ser usados para opticamente seccionar a amostra. Além disso, dados simultâneos de multi-parâmetros não são prontamente obteníveis.

Ao contrário da arte anterior, a presente invenção pode ser usada para realizar formação de imagem de fluorescência de multi-
10 parâmetros em células simples e populações de células de uma maneira que é suficientemente rápida e versátil para uso na triagem de composto. Processos e aparelhos são fornecidos para obterem-se e analisarem-se tanto a resposta primária das células individuais como as medidas adicionais da heterogeneidade da população de amostra. Além disso, os locais destes
15 múltiplos fluoróforos podem ser determinados com resolução sub-celular. Finalmente, a presente invenção pode ser usada para formar imagens rapidamente de eventos mudando em taxas de vídeo. Juntas estas capacidades possibilitam novas áreas de pesquisa dentro do mecanismo de ação dos candidatos de droga.

20 A presente invenção pode também ser empregada em um ensaio bioquímico baseado em fluorescência da invenção, um tanto análogo ao ensaio de cintilação de superfície (“SSA”), que se encontra entre os processos mais largamente usados para triar compostos químicos.

As figuras 1(a) - 1(f) representam as etapas de um SSA de
25 ligação de receptor. Na Figura 1(a), membranas solúveis 10 com receptores escolhidos 12 são adicionadas a uma cavidade 20 contendo um líquido 30. Estas membranas são isoladas das células expressando os receptores. Na Fig. 1(b), ligandos radiorrotulados 14 são adicionados à cavidade. O ligando é sabido ter uma elevada afinidade de ligação para os receptores de membrana.

Os radiorrótulos mais comuns são ^3H , ^{35}S , ^{125}I , ^{33}P e ^{32}P . Na figura 1(c), as contas 16 são adicionadas à cavidade. As contas são revestidas com um material, tal como aglutinina de germe de trigo, a que as membranas aderem fortemente. As contas têm um diâmetro de 3-8 μm e são feitas de plástico dopado comum cintilante. Alternativamente, a ordem das operações representadas nas Figuras 1(b) e 1(c) pode ser intercambiada.

Os radiorrótulos deterioram-se pela emissão de elétrons de elevada energia, ou beta partículas, que se deslocam a aproximadamente 1-100 μm antes de parar, dependendo do radioisótopo. Se os radiorrótulos forem ligados às membranas ligadas às contas, as partículas beta podem deslocar-se para dentro das contas e provocar surtos de luminescência. Se os radiorrótulos forem dispersos por todo o líquido, as partículas beta emitidas geralmente não excitarão a luminescência das contas. Na Fig. 1(d), a luminescência das contas, causada pela desintegração dos radiorrótulos é detectada. Na fig. 1(e), um composto de teste 18 é adicionado à cavidade. A finalidade do ensaio é determinar a extensão em que este composto deslocará os ligandos radiorrotulados. Se os ligandos radiorrotulados forem deslocados e difundirem-se dentro do líquido, a luminescência das contas será reduzida. Na Fig. 1(f), a luminescência das contas é novamente detectada. Medindo-se a redução de luminescência, a atividade do composto de teste pode ser determinada.

As Figuras 2(a) - 2(f) representam uma versão alternativa de um SSA de ligação de receptor. Esta versão é essencialmente a mesma que a descrita nas Figuras 1(a) - 1(f), exceto que, em vez de utilizarem-se contas, a versão mostrada nas Figuras 2(a) - 2(f) utiliza uma base conhecida 22 feita de plástico dopado com cintilante e revestido com um material em que as membranas aderem. Consequentemente, em vez de detectar a luminescência das contas, a versão mostrada nas Figuras 2(a) -2(f) detecta a luminescência do fundo de cavidade.

As figuras 3(a) - 3(d) representa as etapas de uma versão de um SSA de enzima. Na fig. 3(a), as contas dopadas com cintilante 40 com peptídeos radiorrotulados 42 fixados nelas são adicionadas a uma cavidade 50 contendo um líquido 60. Na Fig. 3(b), um composto de teste 44 é adicionado à cavidade. Na Fig. 3(c), enzimas 46 são adicionadas à cavidade. Se não inibidas, as enzimas 46 clivarão os peptídeos radiorrotulados 42 das contas 40. Em conseqüência, o radiorrótulo difundir-se-á dentro da solução e a desintegração do radiorrótulo não produzirá luminescência nas contas 40. Se, por outro lado, o composto de teste 44 inibir as enzimas 46, tipicamente pelo bloqueio do sítio ativo de enzima, as enzimas 46 não clivarão o radiorrótulo e a desintegração do radiorrótulo produzirá luminescência nas contas. Na Fig. 3(d), a luminescência das contas é medida e a atividade do composto de teste pode ser determinada.

As figuras 4(a) - 4(d) representam uma versão alternativa de um SSA de enzima. Na fig. 4(a), os peptídeos radiorrotulados 42 são fixados a uma base de cavidade dopada com cintilante 52. Na Fig. 4(b), o composto de teste 44 é adicionado à cavidade. Na Fig. 4(c), enzimas 46 são adicionadas à cavidade. Na Fig. 4(d), a luminescência da base de cavidade é medida para determinar a atividade do composto de teste.

Os exemplos acima ilustram o princípio geral da SSA, isto é, que a atividade de interesse é ensaiada por uma mudança do número de radiorrótulos dentro de uma extensão de rádio-desintegração do cintilante. Uma das atrações dos SSAs é que os radiorrótulos não ligados ao cintilante não precisam ser removidos da cavidade em uma etapa de lavagem. Isto é, os SSAs são ensaios homogêneos.

Um radioimunoensaio (RIA) é uma forma específica de um ensaio de ligação de receptor em que o receptor é um anticorpo e o ligando é mais freqüentemente um natural ou sintético peptídeo, proteína, carboidrato ou pequena molécula orgânica. Os RIAs são um processo indireto para medir

a concentração de ligando em qualquer amostra preparada, muito freqüentemente uma amostra biológica tal como plasma, fluido cerebrospinal, urina ou extrato celular. Em um RIA padrão, o anticorpo tem uma afinidade específica para o ligando e o ensaio contém o anticorpo, uma concentração
5 fixa de ligando radiorrotulado e uma concentração desconhecida de ligando não-rotulado. A concentração do ligando não-rotulado é determinada pelo grau em que ele se liga ao anticorpo e, desse modo, bloqueia a ligação de ligando rotulado. Os RIAs são mais freqüentemente realizados como ensaios heterogêneos que requerem a separação do ligando ligado do ligando
10 desligado com uma etapa de lavagem. Os RIAs foram também desenvolvidos utilizando-se uma configuração SSA em que o receptor de anticorpo é ligado a uma conta enchida com cintilante e a etapa de lavagem é eliminada.

Os SSAs e RIAs, entretanto, ressentem-se de diversas desvantagens. Primeira, estes ensaios requerem o manuseio de material
15 radioativo, que é tanto caro como demorado. Segundo, estes ensaios são somente eficazes em grandes cavidades. A taxa de emissão de luminescência das contas ou fundos de cavidades é proporcional à taxa de emissão da partícula beta. Um ensaio ^3H típico produz menos do que um fóton detectado por desintegração ^3H . Para aumentar a velocidade do ensaio, a quantidade de
20 ligando radiorrotulado deve ser aumentada e, correspondentemente, as quantidades de membranas, contas e composto de teste. A fim de realizar um SSA de trítio em 10-60 segundos, 10^7 contas devem ser usadas. Esta quantidade de contas requer uma cavidade de aproximadamente 150 μL . Os SSAs não são eficazes nas cavidades de volume- μL desejáveis para triagem
25 de grandes números de compostos.

Como descrito abaixo, a presente invenção, entre outras coisas, substitui os ligandos radiorrotulados do SSA e do RIA com ligandos rotulados-fluorescentes. Ao assim proceder, ele introduz um formato homogêneo para o RIA e vantajosamente retém o formato homogêneo do

SSA. Isto é particularmente importante em cavidades de volume- μL , cuja tensão superficial torna a lavagem impraticável. Entretanto, em um formato homogêneo, a fluorescência pode ser um problema como pode ser ilustrado com o ensaio de ligação de receptor. Quando o composto de teste é adicionado, alguns ligandos rotulados-fluorescentes são deslocados e difundem-se livremente por todo o volume da cavidade, enquanto outros permanecem ligados às membranas. É a fluorescência dos ligandos rotulados-fluorescentes ligados às membranas que é usada para determinar a atividade do composto de teste. Se a fluorescência for detectada de toda a cavidade, entretanto, a emissão dos ligandos rotulados-fluorescentes do volume da cavidade obscurecerá a emissão dos ligandos rotulados fluorescentes ligados às membranas.

Um processo de tratar este problema é descrito na Patente US 5.355.215 de Schroeder e outros e mostrado nas Figuras 5(a) e 5(b). De acordo com o processo de Schroeder e outros, as amostras são iluminadas por um feixe 134 de luz, que é direcionado na base da cavidade em um ângulo oblíquo, mostrado como A na Fig. 5, de modo que ele não ilumina toda a cavidade. Além disso, enquanto o feixe ilumina a área 114', a fluorescência é detectada somente a partir da área 114a, que está sob o volume de cavidade que recebe a menos quantidade de iluminação.

O processo de Schroeder e outros, entretanto, resente-se de diversas desvantagens. Primeira, em razão de ele detectar somente uma pequena parte do fundo da cavidade, o processo Schroeder e outros pode somente ser realizado com um suficiente grau de precisão em cavidades razoavelmente grandes. Não é adequado formar imagens de amostras dispostas nas cavidades de aproximadamente 1 mm de diâmetro de uma placa de 1536-cavidades. Segundo, as restrições geométricas da iluminação angulada impede o uso de óptica de coleção de elevada abertura numérica, necessária para obter-se suficiente sensibilidade e resolução para formar

imagens de objetos micro-dimensionados, tais como células individuais, na base da cavidade.

Outro caminho para este problema utilizar um microscópio de varredura pontual. Por exemplo, na Patente US 5.547.849 de Baer e outros, o uso de um sistema confocal de varredura pontual é ensinado. Baer e outros ensinam um processo para aumentar a lenta velocidade de ganho de imagem, inerente das técnicas confocais de varredura pontual, pelo sacrifício da resolução espacial. Se, por exemplo, expandir-se o diâmetro do feixe de iluminação da amostra em um fator de 10, então a área de iluminação é aumentada 100-vezes, permitindo que se varra 100-vezes mais rápido, sob certas condições. O aumento da velocidade é conseguido, entretanto, às custas da resolução. Além disso, os dispositivos de detecção apropriados para dito processo de varredura, como descrito na patente '849, são inferiores, principalmente em termos de sensibilidade, àqueles vantajosamente utilizados na presente invenção. Assim, o dispositivo descrito na patente '849 tem menor sensibilidade, mais elevado fundo e mais baixa resolução do que o da presente invenção, todos sendo importantes no presente pedido.

A presente invenção inclui novas versões de um microscópio confocal de varredura em linha. Os microscópios confocais de varredura em linha são conhecidos na arte. Duas versões representativas são o sistema descrito por White e outros na Patente US 5.452.125 e aquele publicado por Brakenhoff e Visshcer em *J. Microscopy* 171 17-26 (1993), mostrados na Fig. 7. Ambos utilizam um espelho explorador para varrer a iluminação através da amostra. O mesmo espelho desvarre a radiação de fluorescência. Após filtragem espacial com uma fenda, a fluorescência é revarrida para visualização pelos olhos. O uso do espelho oscilante possibilita que estes microscópios varram rapidamente um campo-de-visão. A iluminação em linha é vantajosa principalmente em aplicações requerendo rápida formação de imagem. O aumento da velocidade potencial inerente no paralelismo de

iluminação em linha, em comparação com iluminação pontual, é, entretanto, somente realizado se o sistema de formação de imagem for capaz de detectar a luz emitida de cada ponto da amostra ao longo da linha de iluminação, simultaneamente. Um aspecto essencial do aparelho descrito é o uso de um dispositivo de detecção tendo múltiplos elementos de detecção independentes em um plano conjugado com o plano objeto.

De acordo com a presente invenção, a amostra deve situar-se em um “plano”, onde a profundidade do campo do sistema formador de imagem determine a precisão de “planaridade”. Em uma versão preferida, a área com formação de imagem é de 1 mm^2 e a profundidade do campo é de $10 \text{ }\mu\text{m}$. Assim, se o inteiro campo for para ficar em foco simultaneamente, a amostra deve ser plana em 1 parte em 100. Isto é verdadeiro dos muitos substratos de amostra (p. ex., placas de microtitulação) sobre uma área local (tal como a área central da base de cavidade). Não é prático, entretanto, requerer que o substrato de amostra seja plano através de sua inteira superfície. Para uma placa de microtitulação tendo uma extensão de $\sim 100 \text{ mm}$, a planaridade de 1 parte em 10.000 seria necessária.

A presente invenção fornece um sistema de autofoco ótico que mantém em “foco” a parte do substrato de amostra tendo sua imagem formada. Um mecanismo de autofoco ótico tem a vantagem de ser rápido e ser operacional com substratos não-condutores, tais como placas de microtitulação e lâminas de microscópio plásticas. Vantajosamente, este mecanismo de foco opera com retardo desprezível, isto é, o tempo de resposta do mecanismo de focalização é curto em relação ao tempo de ganho de imagem, preferivelmente uma fração de um segundo. Mecanismos de autofoco opticamente baseados, adequados para a presente aplicação, são conhecidos. Por exemplo, um sistema baseado em lente astigmática para a geração de um sinal de erro de posição adequado para servo controle é descrito em *Applied Optics* 23 565-570 (1984) e um sistema de detecção de

erro de foco utilizando um “feixe inclinado” é descrito em SPIE 200 73-78 (1979). Em uma versão preferida da presente invenção, o substrato de amostra é uma placa de microtitulação. Neste caso, o meio preferido de realizar a focalização depende mais das propriedades da placa. Se a espessura da base de placa for uniforme dentro de uma fração da profundidade de foco, então um mecanismo de focalização que mantivesse a base de placa em um constante deslocamento do plano objeto seria adequado. Presentemente, as placas de microtitulação comumente usadas não são suficientemente uniformes. Assim, o mecanismo de focalização deve rastrear a superfície sobre a qual a amostra reside, que é tipicamente o lado interno da cavidade da placa de microtitulação. Um aspecto da presente invenção é um novo mecanismo de autofoco para rapidamente focalizar uma superfície descontínua, tal como a base de cavidade de uma placa de microtitulação.

Portanto, há necessidade de um processo e aparelho para triar grandes números de compostos químicos precisa, rápida e não-dispendiosamente em um formato homogêneo. Além disso, há necessidade de processos e aparelho que possam realizar formação de imagem fluorescentes de multi-parâmetros com suficiente resolução para formar imagem de células individuais e eventos sub-celulares. Há também necessidade de um sistema de formação de imagem que possa adicionalmente monitorar uma população estatisticamente significativa de células em taxas de vídeo.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um microscópio confocal de varredura de linha e ao uso de um sistema de formação de imagem confocal de varredura de linha (LCI) para ensaiar a atividade biológica.

Em uma versão preferida, o sistema de formação de imagem confocal de varredura de linha emprega fontes de luz laser de múltiplos comprimentos de onda para iluminar a amostra e excitar os fluoróforos a emitirem energia eletromagnética. Estes comprimentos de onda incluem o

espectro de luz ultravioleta, bem como a visível.

A presente invenção é capaz de conduzir uma rápida série de ensaios em placas de microcavidades pelo uso de uma capacidade de autofoco que permite que o sistema LCI rapidamente mova-se de uma
5 cavidade para outra, porém não perca a vantagem da capacidade inerente do microscópio confocal para decompor as seções ópticas delgadas.

Em várias versões da presente invenção, a amostra é movida para realizar uma varredura da linha de iluminação através da amostra. Em outras versões, um espelho oscilante é usado para produzir uma linha de
10 iluminação movendo-se rapidamente efetuando uma varredura da amostra que permanece em uma posição fixa. Como exemplo, as imagens podem ser obtidas em uma taxa de até 50 quadros por segundo.

A presente invenção preferivelmente fornece ministração integrada, permitindo a adição de substâncias para iniciar rapidamente
15 eventos biológicos de mudança, tais como a propagação de um potencial de ação em células nervosas ou musculares.

A presente invenção preferivelmente faz uso de um dispositivo de detecção de estado sólido de multi-elementos, tal como um dispositivo de carga acoplada (CCD). Este dispositivo é preferivelmente lido
20 continuamente. Em uma versão preferida, a presente invenção utiliza um CCD retangular, que evita a necessidade de detetor bidimensional completo e permite mais elevadas velocidades de leitura. Além disso, um campo-de-visão efetivo maior é obténível na versão de varredura por estágio.

A presente invenção também fornece, em uma versão
25 preferida, uma capacidade de conduzir análise de dados especializada, simultaneamente com ganho de dados, para permitir a operação em um modo de triagem de elevada produção.

Esta invenção fornece processos de realizar uma larga variedade de ensaios biológicos utilizando fluorescência. Em uma versão, o

alvo de interesse pode ser em uma célula fixa ou viva ou em organela subcelular ou na membrana de célula. Estes ensaios envolvem a determinação de um ou mais parâmetros, o que requer a excitação de um ou mais rótulos fluorescentes que sejam, em geral, sensíveis aos diferentes comprimentos de onda da luz incidente. Além disso, estes ensaios requerem formação de imagem simultânea e precisa da luz emitida em um ou mais comprimentos de onda pelos quais o local em duas ou três dimensões e a intensidade da espécie fluorescentemente rotulada e suas correlações são determinados.

Além disso, esta invenção fornece processos para realizar ensaios que requerem uma única formação de imagem de uma resposta, por meio de emissão fluorescente, ou formação de imagem rapidamente repetida da mesma área ou célula. Em várias versões, a formação de imagem é realizada em taxas tão elevadas quanto 50 quadros por segundo. Esta capacidade de formar imagem rapidamente, em múltiplos comprimentos de onda e com elevada resolução espacial, permite que a presente invenção realize ensaios que não poderiam anteriormente ser realizados ou realize-os de uma maneira superior.

A presente invenção refere-se a diversos processos para triar compostos químicos e para realizar muitos tipos de ensaios envolvendo o uso de fluoróforos ou sondas fluorescentes. Em geral estes ensaios e procedimentos de triagem envolvem o uso de um composto de teste e reagentes, alguns ou todos dos quais são intrinsecamente fluorescentes, etiquetados com rótulos fluorescentes ou são metabolizados dentro do produto fluorescente. O composto de teste e os reagentes podem ser combinados em uma variedade de maneiras.

Em uma versão, os reagentes são adicionados a uma cavidade contendo um líquido. Esta pode ser uma única cavidade ou uma de muitas cavidades de uma placa de multi-cavidades. A atividade biológica de interesse é determinada pela presença ou ausência de fluoróforos dispostos na

base do peço ou na superfície de contas dispostas na base da cavidade, conforme medido com um microscópio confocal de varredura de linha. Esta versão tem em comum com o formato SSA a determinação da atividade da localização da espécie detectada. No caso do SSA, a localização é proximal ao cintilante. No presente processo, a localização é em uma região da cavidade, preferivelmente a base. No caso do SSA, a sensibilidade da espécie proximal é determinada pela extensão de desintegração das partículas beta. No presente processo, a sensibilidade ao fluoróforo localizado é determinada pela profundidade de seccionamento ótico do microscópio confocal.

Além disso, a presente invenção pode realizar ensaios de elevada produção, requerendo varrer múltiplas amostras de uma maneira rápida e automática. Estas amostras podem ser micro-cavidades individuais e podem envolver cavidades contendo um líquido e células vivas ou fixas ou componentes de células. A presente invenção também fornece controles ambientais requeridos para reter amostras líquidas ou sustentar as células vivas durante a análise.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Estes e outros objetivos, aspectos e vantagens da invenção serão mais prontamente evidentes pela seguinte descrição detalhada, em que:

As figuras 1(a) - 1(f) ilustram um SSA de ligação de primeiro receptor.

As figuras 2(a) - 2(f) ilustram um SSA de ligação de segundo receptor.

As figuras 3(a) - 3(d) ilustram um SSA de primeira enzima.

As figuras 4(a) - 4(d) ilustram um SSA de segunda enzima.

As figs. 5(a) e 5(b) são vistas esquemáticas de um aparelho da arte anterior para formação de imagem de amostras dispostas na base de uma cavidade.

A fig. 6 é uma vista esquemática de uma primeira versão de

um microscópio confocal de varredura em linha, usado para formar imagens de amostras de acordo com a presente invenção.

A fig. 7 é uma vista esquemática de um microscópio da arte anterior.

5 As figuras 8(a) e 8(b) são, respectivamente, uma vista de topo e uma vista lateral do trajeto de raio de uma versão multicolor da presente invenção, sem um espelho explorador. A fig. 8(c) é uma vista de topo do trajeto de raio de um autofoco de feixe único.

10 As figuras 9(a) e 9(b) são, respectivamente, uma vista de topo e uma vista lateral do trajeto de raio da versão multicolor da presente invenção com o espelho explorador. A Fig. 9(c) é uma vista de topo do trajeto de raio do autofoco de feixe único.

A figura 10 é uma vista lateral do sistema de autofoco de dois feixes.

15 As figuras 11(a)-11(c) ilustram a câmera CCD retangular e o registro de leitura.

20 As figs. 12(a) e 12(b) são vistas em seção transversal dos trajetos de raio formados pelo microscópio confocal de varredura de linha da presente invenção, empregando formação de imagem de campo escuro convencional.

As figs. 13(a) e 13(b) são vistas em seção transversal dos trajetos de raio formados pelo microscópio confocal de varredura de linha da presente invenção, empregando formação de imagem de campo escuro inversa.

25 A fig. 14 é uma vista em seção transversal dos trajetos de raio formados pelo microscópio confocal de varredura de linha da presente invenção, empregando formação de imagem de campo escuro inversa, em que uma área maior do que a área limitada por difração do plano da amostra é iluminada.

As figs. 15(a) - 15(f) ilustram uma primeira versão de um ensaio de ligação de receptor de acordo com a presente invenção.

As figs. 16(a) - 16(f) ilustram uma segunda versão de um ensaio de ligação de receptor de acordo com a presente invenção.

5 As figs. 17(a) - 17(d) ilustram uma primeira versão de um ensaio de enzima de acordo com a invenção.

As figs. 18(a) - 18(d) ilustram uma segunda versão de um ensaio de enzima de acordo com a invenção.

10 As figuras 19(a)-(p) mostram resposta de cálcio de célula de neuroblastoma a Carbacol. As respostas na ocasião da pré-injeção, 0, 1,2, 2,4, 3,6, 4,8, 6,0, 7,2, 8,4, 9,6, 10,8, 12,0, 13,2, 14,4, 15,6 segundos, são mostradas (isto é, Figs. 19(a)-o), respectivamente).

15 As figs. 20(a) - 20(h) mostram resposta de cálcio de células de neuroblastoma a KCl 50 mM. As respostas a 0, 0,6, 3,0, 5,4, 7,8, 10,2, 12,6 e 15,0 segundos são mostradas (isto é, Figuras 20(a)-(h), respectivamente).

20 As figs. 21(a) - 21(c) mostram ensaio de ligação de receptor de células vivas homogêneas. A fig. 21(a) mostra células coloridas com ligando de peptídeo rotulado com fluoresceína. A Fig. 21(b) mostra uma máscara gerada de corante citoplásmico com LDS 751. A fig. 21(c) é uma sobreposição das Figs. 21(a) e (b), que mostra a atividade de receptor variável.

25 As figs. 22(a) - 22(d) mostram ensaio de ligação de receptor de células vivas homogêneas. A fig. 22(a) representa graficamente ligação competitiva de ligando rotulado e não-rotulado em um receptor de superfície de célula. As figs. 22(b)-(d) mostram imagens de imunofluorescência nos pontos indicados do gráfico.

As figs. 23(a) - 23(d) mostram ensaio de ligação de receptor de células vivas homogêneas com ligando rotulado Cy3.

As figuras. 24(a) -24(d) mostram contas de sílica 4 μ m de

diâmetro com números variáveis de rótulos Cy5. A fig. 24(a) mostra uma imagem de contas que não são rotuladas. As figuras 24(b)-(d) mostram imagens de contas que têm a média de 17, 170 ou 1700 moléculas rotuladas Cy5 por conta, respectivamente. A imagem mostrada na Fig. 24(d) é reduzida de escala dez vezes, em comparação com as imagens das Figs. 24(a)-(c).

As Figuras 25(a) - 25(c) mostram os dados do ensaio de canal iônico como gráficos. A fig. 25(a) refere-se à resposta das células de neuroblastoma à adição de carbacol. As figuras 25(b)-(c) refere-se à resposta de cálcio das células de neuroblastoma à adição de KCl 50 mM.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Todos os pedidos de patente, publicações e outras referências que são listadas aqui são por este meio incorporadas por referência em suas totalidades.

A presente invenção é útil para identificar agentes farmacológicos para o tratamento de doença. Ela supre um processo de elevada produção para conduzir uma larga variedade de ensaios biológicos, em que um ou mais reagentes fluorescentes são empregados para medir uma resposta biológica. Tais ensaios podem ser conduzidos em compostos químicos ou qualquer molécula de interesse biológico, incluídos mas não limitados a candidatos de droga, tais como aqueles encontrados em coleções combinatoriais. Além disso, esta invenção fornece um processo para o diagnóstico de estados patológicos de amostras de célula e de tecido. Esta invenção também fornece um processo para traçar o perfil de múltiplas respostas biológicas de candidatos de drogas em células inteiras empregando reagentes fluorescentes.

As técnicas da presente invenção podem ser usadas em ensaios em que os dados são adquiridos de células individuais, em um nível celular ou subcelular, suficientemente de modo rápido a fim de permitir a obtenção de tais dados em um número suficiente de células, para constituir

uma amostra estatisticamente significativa da população de células. A presente invenção é capaz de fazer medições simultâneas em parâmetros múltiplos e é também capaz de correlacionar múltiplos sinais de células individuais. Portanto, pode ser empregado o ensaio de respostas celulares heterogêneas e o ensaio de respostas confinadas em um pequeno subconjunto de células.

Além disso, a presente invenção pode formar imagem da ativação simultânea dos trajetos de multi-sinais e pode correlacionar múltiplos sinais simultaneamente e durante o tempo. Esta capacidade é vital quando a resposta temporal das células individuais ou uma comparação da resposta temporal das células individuais é requerida para o ensaio específico.

Além disso, a presente invenção pode formar imagem dos sinais fluorescentes do plano confocal de células, na presença de fluoróforo não-ligado ou na presença de compostos químicos intrinsecamente fluorescentes, incluindo candidatos de drogas potenciais.

Estes ensaios podem fazer uso de qualquer fluoróforo ou rótulo fluorescente conhecido, incluindo mas não limitado a fluoresceína, rodamina, Texas Red, Amersham Corp., corantes Cy3, Cy5, Cy5.5 e Cy7 da Amersham Corp., corantes nucleares e corantes de cumarina da Hoechst (vide Haugland R.P. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals 6a. Ed., 1996, Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon).

Estes ensaios incluem mas não são limitados a ensaios de ligação de receptor, ensaios de potencial elétrico intra-celular ou pH, ensaios de concentrações iônicas, ensaios de atividade enzimática, ensaios traficantes, ensaios de formação de imagem cinética e ensaios de eventos celulares raros.

Os ensaios de atividade enzimática e de ligação de receptor podem ser ensaios baseados-em-contas ou baseados-em-célula. Alguns

exemplos de ensaios baseados em contas são descritos em WO 98/55866. Entretanto, o processo descrito ali faz uso da tecnologia confocal de varredura pontual e o presente sistema de formação de imagem confocal de varredura em linha teria uma significativa vantagem em termos de taxa de aquisição de dados.

CONFIGURAÇÃO ÓPTICA

A fig. 6 mostra uma primeira versão da presente invenção. O microscópio compreende uma fonte 400 ou 410 de radiação eletromagnética, por exemplo, na faixa óptica, de 350 - 750 nm, uma lente cilíndrica 420, uma primeira máscara de fenda 430, uma primeira lente relé 440, um espelho dicróico 450, uma lente objetiva 470, uma placa de microtitulação 480 contendo um agrupamento bidimensional de cavidades de amostra 482, uma lente tubular 490, um filtro 500, uma segunda máscara de fenda 510 e um detetor 520. Estes elementos são dispostos ao longo do eixo geométrico AO com aberturas de fenda 432, 512 nas máscaras 430, 510 estendendo-se perpendiculares ao plano da Fig. 6. Os comprimentos focais das lentes 440, 470 e 490 e os espaçamentos entre estas lentes, bem como os espaçamentos entre a máscara 430 e a lente 440, entre a lente objetiva 470 e a placa de microtitulação 480 e entre a lente 490 e a máscara 510 são de modo a fornecerem um microscópio confocal. Nesta versão, a radiação eletromagnética de uma lâmpada 400 ou um laser 410 é focalizada em uma linha utilizando-se uma lente cilíndrica 420. O formato da linha é otimizado por uma primeira máscara de fenda 430. A máscara de fenda 430 é representada em um plano de imagem do sistema ótico, isto é, em um plano conjugado com o plano objeto. A barra de iluminação formada pela abertura 432 da máscara de fenda 430 é revezada pelas lentes 440, espelho dicróico 450 e lente objetiva 470 sobre uma placa de microtitulação 480, que contém uma formação bidimensional de cavidades de amostra 482. Por conveniência de ilustração, os elementos óticos da Fig. 6 são representados em seção

transversal e a placa de cavidade em perspectiva. A projeção da linha de iluminação sobre a placa de cavidade 480 é representada pela linha 484 e é também entendido ser perpendicular ao plano da Fig. 6. Como indicado pelas setas A e B, a placa de cavidade 480 pode ser movida em duas dimensões (X, Y) paralelas às dimensões da formação por meios não mostrados.

Em uma versão alternativa, a máscara de fenda 430 reside em um plano Fourier do sistema ótico, isto é, em um plano conjugado com o plano retrofocal objetivo (BFP) 460. Neste caso, a abertura 432 situa-se no plano da figura, a lente 440 reverte a barra de iluminação formada pela abertura 432 sobre o plano retro focal 460 da objetiva 470, que a transforma em uma linha 484 do plano objetivo perpendicular ao plano da Fig. 6.

Em uma versão alternativa adicional, a máscara de fenda 430 é removida inteiramente. De acordo com esta versão, a fonte de iluminação é o laser 410, a luz de que é focalizado dentro do plano retro focal 460 da objetiva 470. Isto pode ser realizado pela combinação da lente cilíndrica 420 e da lente esférica 440, como mostrado na fig. 6, ou a iluminação pode ser focalizada diretamente dentro do plano 460 pela lente cilíndrica 420.

Uma imagem da área de amostra, por exemplo, uma amostra em uma pequena cavidade 482, é obtida projetando-se a linha de iluminação sobre um plano dentro da amostra, formando a imagem de emissão de fluorescência dela sobre um detetor 520 e movendo a placa 480 em uma direção perpendicular à linha de iluminação, sincronicamente com a leitura do detetor 520. Na versão representada na Fig. 6, a emissão de fluorescência é coletada pela lente objetiva 470, projetada através do divisor de feixe dicróico 450 e sua imagem formada pela lente 490 através dos filtros 500 e uma segunda máscara de fenda 510 sobre um detetor 520, tal como é apropriado para um sistema de formação de imagem confocal tendo uma lente objetiva corrigida ao infinito 470. O feixe divisor dicróico 450 e o filtro 500 preferencialmente bloqueiam luz no comprimento de onda de

iluminação. O detetor 520 ilustrativamente é uma câmera e pode ser um dimensional ou bidimensional. Se um detetor dimensional for usado, a máscara de fenda 510 não é necessária. Os procedimentos de iluminação, detecção e translação são continuados, até que a área prescrita tenha sua
 5 imagem formada. O movimento mecânico é simplificado se a amostra for transladada em uma taxa contínua. O movimento contínuo é mais útil se o tempo de leitura da câmera for pequeno em comparação com o tempo de exposição. Em uma versão preferida, a câmera lê continuamente. O deslocamento 'd' da amostra durante o tempo de exposição e tempo de leitura
 10 combinados pode ser maior do que ou menor do que a largura da linha de iluminação W, exemplarmente $0,5W \leq d \leq 5W$. Todas as cavidades de uma placa multi-cavidades pode ter sua imagem formada de uma maneira similar.

Alternativamente, o microscópio pode ser configurado para focalizar uma linha de iluminação através de um número de cavidades
 15 adjacentes, limitado principalmente pelo campo de visão do sistema ótico. Finalmente, mais do que um microscópio pode ser usado simultaneamente.

O tamanho e formato da barra de iluminação 484 são determinados pela largura e comprimento da barra de transformação de Fourier do plano retro focal 460 da lente objetiva. Por exemplo, o
 20 comprimento da linha 484 é determinado pelo comprimento de 460. Para desempenho limitado por difração, o comprimento da barra de iluminação em 460 é escolhido para transbordar abertura traseira da objetiva. Será evidente para uma pessoa hábil na arte que o tamanho e formato da barra de iluminação 484 podem ser controlados pela combinação do comprimento
 25 focal da lente cilíndrica 420 e do tamanho de feixe em 420, isto é, pela abertura numérica efetiva de cada dimensão, dentro das restrições impostas pelas aberrações da objetiva e campo de visão da objetiva.

As dimensões da linha de iluminação 484 são escolhidas para otimizar a relação de sinal-ruído. Consequentemente, elas são dependentes da

amostra. Dependendo do ensaio, a resolução pode ser variada entre limitada-por-difração, isto é, menos do que $0,5\ \mu\text{m}$ e aproximadamente $5\ \mu\text{m}$. O comprimento do feixe é preferivelmente determinado pelo campo de visão da objetiva, exemplarmente entre $0,5$ e $1,5\ \text{mm}$. Uma objetiva Nikon ELWD, $0,6\ \text{NA}$, $40\times$, por exemplo, tem um campo de visão de aproximadamente $0,75\ \text{mm}$. A resolução limitada por difração para radiação de $633\ \text{nm}$ com esta objetiva é de aproximadamente $0,6\ \mu\text{m}$ ou aproximadamente 1100 elementos de resolução.

A resolução de profundidade efetiva é determinada principalmente pela largura da abertura 512 da máscara de fenda 510 ou a largura do detetor unidimensional e a ampliação de imagem criada pela combinação das lentes objetivas 470 e 490. A resolução de melhor profundidade de um microscópio confocal aproxima-se de $1\ \mu\text{m}$. No presente pedido, uma resolução de profundidade de $5\text{-}10\ \mu\text{m}$ pode ser suficiente ou mesmo vantajosa.

Por exemplo, quando a amostra de interesse, tal como uma célula viva, contém insuficientes fluoróforos em um volume limitado por difração, para permitir uma imagem sinal-ruído adequada em um tempo de aquisição de imagem breve, é vantajoso iluminar e coletar a emissão de um volume maior do que limitado por difração. Uma situação similar prevalece no caso de estudos cinéticos de taxa de vídeo de eventos transitórios, tais como aberturas de canal iônico. Praticamente, isto é realizado sub-enchendo-se a abertura traseira da lente objetiva, que é equivalente a aumentar o diâmetro da abertura de iluminação. A abertura numérica efetiva (“NA”) da iluminação é menor do que a NA da objetiva. A emissão de fluorescência é, entretanto, coletada com a NA total da lente objetiva. A largura da abertura 512 deve ser aumentada a fim de detectar a emissão do maior volume de iluminação. Em uma largura de abertura algumas vezes maior do que o limite de difração, a óptica geométrica fornece uma adequada aproximação para o

tamanho do elemento detecção-volume:

$$\text{Largura Lateral: } a_d = d_d/M$$

$$\text{Largura Axial: } z_d = \sqrt{2}a_d/\tan\alpha,$$

5 onde M é a ampliação, d_d é a largura da abertura 512 e α é o semi-ângulo subtendido pela objetiva 470. É uma importante parte da presente invenção que a abertura de iluminação 432 ou seu equivalente da versão não tendo abertura e a abertura de detecção 512 sejam independentemente controláveis.

CONFIGURAÇÃO DE MULTI-COMPRIMENTOS DE ONDA

10 Uma versão possibilitando formação de imagem de fluorescência de multi-comprimentos de onda é preferida para certos tipos de ensaios. É geralmente vantajoso e com frequência necessário que duas ou mais medições sejam feitas simultaneamente, uma vez que um importante parâmetro de uma resposta biológica é o tempo.

15 O número de comprimentos de onda ou cores independentes dependerá do ensaio específico sendo realizado. Em uma versão, três comprimentos de onda de iluminação são usados. As Figs. 8(a) e 8(b) representam os trajetos de raio em um sistema de formação de imagem confocal de varredura de linha tricolor, de uma vista de topo e uma vista lateral, respectivamente. Em geral, o sistema compreende diversas fontes S_n de radiação eletromagnética, lentes de colimação L_n , e espelhos M_n para 20 produzir um feixe colimado que é focalizado pelas linhas cilíndricas CL dentro de um feixe alongado no primeiro filtro espacial SF_1 , um microscópio confocal entre o primeiro filtro espacial SF_1 e o segundo filtro espacial SF_2 e uma lente formadora de imagem IL, divisores de Feixe DM_1 e DM_2 e 25 detetores D_n para separar e detectar os diferentes componentes de comprimento de onda de radiação fluorescente da amostra. Os filtros espaciais SF, SF_1 e SF_2 preferivelmente são mascaras de fenda.

Em particular, a Fig. 8(a) representa as fontes S_1 , S_2 e S_3 para as cores λ_1 , λ_2 e λ_3 , e as lentes L_1 , L_2 e L_3 , que colimam a luz das respectivas

fontes. As lentes L_1 , L_2 e L_3 preferivelmente são ajustadas para compensar por qualquer cromaticidade das outras lentes do sistema. Os espelhos M_1 , M_2 e M_3 são usados para combinar as cores de iluminação das fontes S_n . Os espelhos M_2 e M_1 são parcialmente transmissores, parcialmente refletores e preferencialmente dicróicos. M_2 , por exemplo, deve preferencialmente transmitir λ_3 e preferencialmente refletir λ_2 . É assim preferível que λ_3 seja maior do que λ_2 .

A operação do microscópio em um modo confocal requer que os feixes de excitação combinados das fontes S_n sejam focalizados em uma “linha” ou uma elipse altamente concêntrica, no plano objeto OP. Como discutido com relação à Fig. 6 acima, uma variedade de configurações pode ser usada para realizar isto. Na versão representada na Fig. 8, os feixes de iluminação combinados são focalizados pela lente cilíndrica CL em uma elipse alongada, que é coincidente com a fenda do filtro espacial SF_1 . Como representado nas Figs. 8a e 8b, a máscara de fenda SF_1 reside em um plano de imagem do sistema, alinhado perpendicular à propagação da luz de iluminação e com seu eixo geométrico longitudinal no plano da página da Fig. 8a. As lentes TL e OL revezam a linha de iluminação do plano contendo SF_1 para o plano objeto OP. Um espelho de rotação, TM é por conveniência. Em outra versão, DM_3 situa-se entre TL e OL e CL focaliza a luz de iluminação diretamente dentro de BFP. Outras versões serão evidentes para uma pessoa hábil na arte.

Com referência à Fig. 8(b), a luz emitida pela amostra e coletada pela lente objetiva, OL, tem imagem formada pela lente tubular, TL, no filtro espacial, SF_2 . SF_2 é preferencialmente uma fenda alinhada a fim de estender-se perpendicular ao plano da página. Assim, a luz passada pelo filtro SF_2 é substancialmente uma linha de iluminação. SF_2 pode ser colocado no plano de imagem primária ou qualquer plano conjugado com ele. DM_3 é parcialmente refletor, parcialmente transmissor e preferivelmente

“multicróico”. Podem ser obtidos Espelhos “dicróicos” de multi-comprimentos de onda, ou espelhos “dicróicos”, que refletem preferencialmente certas faixas de comprimentos de onda e preferencialmente transmitem outras.

5 $\delta\lambda_1$ será definido como sendo a emissão de fluorescência excitada por λ_1 . Isto será, em geral, uma distribuição de comprimentos de onda um tanto maiores do que λ_2 . $\delta\lambda_2$ e $\delta\lambda_3$ são definidos analogamente. DM_3 preferencialmente reflete λ_n e preferencialmente transmite $\delta\lambda_n$, $n = 1, 2, 3$. A luz transmitida por SF_2 tem imagem formada nos dispositivo de detecção, que
10 residem em planos conjugados com o plano de imagem primária. Na Fig. 8(a), uma imagem do filtro espacial SF_2 é criada pelas lentes IL em todos os três detetores, D_n . Esta versão é preferida em aplicações requerendo alinhamento quase perfeito entre as imagens geradas pelos respectivos detetores. Em outra versão, as lentes individuais IL_n são associadas com os
15 dispositivo de detecção, os pares de lente IL e IL_n servindo para revezar a imagem do filtro espacial SF_2 nos respectivos detetores D_n . A luz é dividida entre os detetores pelos espelhos DM_1 e DM_2 . Os espelhos são parcialmente transmissores, parcialmente refletores e preferencialmente dicróicos. DM_1 preferencialmente reflete $\delta\lambda_1$ e preferencialmente transmite $\delta\lambda_2$ e $\delta\lambda_3$. O filtro
20 de bloqueio, BF_1 , preferencialmente transmite $\delta\lambda_2$, efetivamente bloqueando todos os outros comprimentos de onda presentes. DM_2 preferencialmente reflete $\delta\lambda_2$ e preferencialmente transmite $\delta\lambda_3$. Os filtros de bloqueio, BF_2 e BF_3 preferencialmente transmitem $\delta\lambda_2$ e $\delta\lambda_3$, respectivamente, eficazmente bloqueando todos os outros comprimentos de onda presentes.

25 CONFIGURAÇÃO DO ESPELHO DE VARREDURA

Em algumas versões desta invenção, rápida aquisição de dados requer enquadrar imagens em taxas de vídeo. A geração de imagem em taxa de vídeo geralmente refere-se a 30 ou 60 quadros por segundo. No presente uso, pretende-se conotar as taxas de quadro com uma ordem de

grandeza de 30 Hz. Em uma versão preferida, a geração de imagem de taxa de vídeo é conseguida iluminando-se ao longo de uma dimensão do plano de amostra e varrendo-se o feixe de iluminação na direção perpendicular a ele, a fim de realizar uma relativa translação da iluminação e amostra. O estágio de varredura é geralmente massivo. Consequentemente, ele não pode ser movido suficientemente rápido.

A fig. 9 representa uma versão da invenção utilizando um espelho explorador, SM. O espelho é vantajosamente colocado em um plano conjugado com o plano focal traseiro objetivo (BFP): Uma rotação do BFP (ou um plano conjugado com ele) realiza uma translação no plano objeto (OP) e seus planos conjugados. A inteira faixa de varredura de SM precisa somente ser alguns graus para valores típicos dos comprimentos focais das lentes RL_1 e RL_2 . Como mostrado na Fig. 9, este par de lentes gera imagens de BFP em SM em uma ampliação de um, porém uma variedade de ampliações pode ser vantajosamente usada. Os fatores limitantes para a taxa de aquisição de imagem são a taxa de leitura da câmera e a intensidade do sinal. No modo de geração de imagem descrito acima, os dados podem ser adquiridos continuamente na taxa de leitura de câmera, exemplificativamente 1 MHz. Com um espelho de varredura, é preferível adquirirem-se dados unidirecionalmente. O movimento de varredura idealizado, permitindo-se adquirir dados continuamente, é o denteado. Na prática, a combinação de tempos de varredura de voltar e retornar constituirão $\sim 1/3$ - $2/3$ do período de varredura. Presumindo-se 50% de tempo morto, uma frequência de oscilação de espelho de 50 Hz e uma taxa de aquisição de pixel de 1 MHz, ~ 10.000 pixéis, seria adquirida por quadro a 50 quadros por segundo, que é suficiente para definir e rastrear objetos individuais, tais como células, de quadro a quadro. 10^4 pixéis por imagem é, entretanto, 10^2 -vezes menos do que era geralmente considerado acima. Dependendo da aplicação, é vantajoso adquirirem-se imagens relativamente menores em elevada resolução, por ex.,

50 μm X 50- μm X 0,5- μm pixelação, ou imagens relativamente maiores em resolução mais baixa, p. ex., 200 μm X 200- μm em pixelação de 2- μm .

AUTOFOCO

De acordo com a presente invenção, a amostra deve situar-se
 5 no plano objeto de um sistema de geração de imagem. Portanto, a invenção fornece um mecanismo de autofoco que mantém a parte da amostra o campo-de-visão do sistema gerador de imagem dentro do plano objeto daquele sistema. A precisão de planaridade é determinada pela profundidade-de-campo do sistema. Em uma versão preferida, a profundidade de campo é de
 10 aproximadamente 10 μm e o campo de visão é de aproximadamente 1 mm^2 .

O sistema de autofoco descrito opera com retardo desprezível, isto é, o tempo de resposta é curto em relação ao tempo de aquisição de imagem, exemplificativamente 0,01-0,1 s. Além disso, a fonte de luz de autofoco é independente das fontes de luz de iluminação e das propriedades
 15 de amostra. Entre outras vantagens, esta configuração permite que a posição da portadora de amostra ao longo do eixo geométrico ótico do sistema de geração de imagem seja determinada independente da posição do plano objeto.

Uma versão de um autofoco de feixe único é fornecida nas
 20 Figs. 8 e 9, em que uma fonte de luz separada, S_4 de comprimento de onda λ_4 , e detetor D_4 são mostrados. O comprimento de onda λ_4 é necessariamente distinto da fluorescência da amostra e preferencialmente de um comprimento de onda que não pode excitar fluorescência apreciável na amostra. Assim, λ_4 é preferencialmente próximo do infravermelho, exemplificativamente 800-
 25 1000 nm. O espelho parcialmente transmissor e parcialmente refletor, DM_4 , é preferencialmente dicróico, refletindo λ_4 e transmitindo λ_n e $\delta\lambda_n$, $n = 1, 2, 3$. São descritos em Applied Optics 23 565-570 (1984) mecanismos de autofoco opticamente baseados para a geração de um sinal de erro de posição, adequado para servo controle. Um sistema de detecção de erro de foco,

utilizando um “feixe inclinado”, é descrito em SPIE 200 73-78 (1979). A última abordagem é prontamente implementada de acordo com as figuras 8 e 9, onde D_4 é um detector fendido.

Para uso com uma placa de microtitulação tendo uma amostra residindo no fundo da cavidade, o servo laço deve, entretanto, ser rompido para mover-se entre cavidades. Isto pode resultar em substanciais retardos de tempo, por causa da necessidade de refocar cada vez que a iluminação é movida para outra cavidade.

Controle contínuo do circuito-fechado da posição relativa do mesmo plano e do plano objeto é fornecido em uma versão preferida da presente invenção, representada na Fig. 10. Este sistema utiliza dois feixes independentes de radiação eletromagnética. Um originando-se de S_5 , é focalizado na superfície contínua, exemplificativamente a base de uma placa de microtitulação. O outro, originando-se de S_4 , é focalizado sobre a face descontínua, exemplificativamente a base de cavidade de uma placa de microtitulação. Em uma versão, os feixes originando-se de S_4 e S_5 têm comprimentos de onda λ_4 e λ_5 , respectivamente. λ_4 é colimado por L_4 , com abertura pela íris I_4 e focalizado sobre a superfície descontínua pela lente objetiva OL. λ_5 é colimado por L_5 , com abertura pela íris I_5 e focalizado sobre a superfície contínua pela lente CFL em conjunto coma lente objetiva OL. A luz refletida é focalizada nos detectores D_4 e D_5 pelas lentes IL_4 e IL_5 , respectivamente. O espelho parcialmente transmissor, parcialmente refletor, DM_4 , é preferencialmente dicróico, refletindo λ_4 e λ_5 e transmitindo λ_n e $\delta\lambda_n$, $n = 1, 2, 3$. Os espelhos M_4 , M_5 e M_6 são parcialmente transmissores, parcialmente refletores. No caso de que λ_4 e λ_5 sejam distintos, M_6 é preferencialmente dicróico.

De acordo com a versão em que a amostra reside em uma placa de microtitulação, λ_4 é focalizado o fundo da cavidade. O plano objeto pode ser deslocado do fundo de cavidade por uma distância variável. Isto é

realizado ajustando-se L_4 ou alternativamente por um ajuste de deslocamento do circuito de servo controle. Para conveniência de descrição, será presumido que λ_4 focaliza no plano objeto.

A operação do sistema de autofoco é como segue. Se a base da cavidade de amostra não estiver no plano focal da lente objetiva OL, o detector D_4 gera um sinal de erro que é suprido através do comutador SW para o controle Z. O controle Z controla um motor (não mostrado) para mover a placa de microtitulação para e afastando-se da lente objetiva. Alternativamente, o controle Z poderia mover a lente objetiva. Se o fundo PB da placa de microtitulação não estiver no plano focal da combinação das lente CFL e da lente objetiva OL, o detector D_5 gera um sinal de erro que é aplicado através do comutador SW ao controle Z. Um controle XY controla um motor (não mostrado) para mover a placa de microtitulação no plano objeto OP da lente OL.

Como indicado, a inteira varredura se encontra sob controle do computador. Segue uma varredura exemplificativa: no término de uma imagem de uma cavidade particular, o computador opera SW para mudar o controle do servo mecanismo do sinal de erro gerado por D_4 para aquele gerado por D_5 ; o computador então direciona o controle XY para mover a placa para a cavidade seguinte, após o que o servo é comutado de volta para D_4 .

O mecanismo de focalização grosseira, utilizando o sinal do fundo da placa, é usado para manter a posição do plano de amostra dentro das variações de cavidade-para-cavidade da espessura do fundo de placa, de modo que a faixa sobre a qual o mecanismo “fino” é requerido pesquisar é minimizada. Se, por exemplo, o diâmetro da íris I_5 for de 2 mm e IL_5 for 100 mm, então o tamanho de imagem do detector será $\sim 100 \mu\text{m}$. Similarmente, se o diâmetro da íris I_4 for de 0,5 mm e IL_4 for de 100 mm, então o tamanho da imagem do detector será $\sim 400 \mu\text{m}$. O último é escolhido para ser menos

sensível a fim de funcionar como um foco “grosseiro”.

Como com a versão de foco único descrita acima, os comprimentos de onda λ_4 e λ_5 são necessariamente distintos da fluorescência da amostra e preferencialmente comprimentos de onda que não podem excitar fluorescência apreciável na amostra. Assim, λ_4 e λ_5 são preferencialmente próximos de infravermelho, tais como 800-1000 nm. Além disso, os dois comprimentos de onda são preferivelmente distintos, por exemplo, $\lambda_4 = 830$ nm, $\lambda_5 = 980$ nm.

Em uma versão alternativa de autofoco de dois feixes, $\lambda_4 = \lambda_5$ e os dois feixes podem originar-se da mesma fonte. Preferencialmente, os dois feixes são polarizados perpendiculares entre si e M_6 é um divisor de feixe polarizante.

Controle de circuito pseudo-fechado é fornecido na versão preferida do autofoco de feixe simples, que opera como segue. No final de uma varredura o computador opera SW para comutar o controle para um dispositivo de amostragem-e-retenção, que mantém a saída do controle Z em um nível constante, enquanto a placa é movida para a próxima cavidade, após o que SW é comutado de volta para D_4 .

DISPOSITIVOS DE DETECÇÃO

Um aspecto adicional do aparelho descrito é o uso de um dispositivo de detecção tendo diversos elementos de detecção independentes em um plano conjugado com o plano objeto. Como discutido acima, a iluminação de linha é vantajosa principalmente em aplicações requerendo rápida formação de imagem. O aumento de velocidade potencial inerente do paralelismo de iluminação de linha, em comparação com a iluminação pontual, é, entretanto, somente realizado se o sistema de formação de imagem for capaz de detectar a luz emitida por cada ponto da amostra ao longo da linha de iluminação, simultaneamente.

É possível colocar-se um dispositivo acoplado por carga

(CCD), ou outra câmera, na saída dos sistemas formadores de imagem da arte anterior descritos acima (White e outros, US 5.452.125 e Brakenhoff e Visscher, J. Microscopy 171 17-26 (1993)). O aparelho resultante tem três desvantagens significativas, em comparação com a presente invenção. Uma é a exigência de revarrer a imagem no detetor bidimensional, que acrescenta desnecessária complexidade ao aparelho. Outra é a exigência de um detetor completo bidimensional tendo suficiente qualidade através da disposição de 1000 pixéis x 1000 pixéis que tipicamente constitui a câmera. A terceira desvantagem é o tempo adicional requerido para ler a imagem total pelo dispositivo bidimensional.

A presente invenção é projetada para evitar estas desvantagens e otimizar não somente a velocidade de formação de imagem, dentro das limitações de elevada sensibilidade e detecção de baixo ruído, mas também a produção. Uma versão utiliza uma câmera de linha de leitura contínua e, em uma versão preferida, um CCD retangular é usado como uma câmara de linha. Ambas as versões não têm tempo morto entre as linhas dentro de uma imagem ou entre imagens. Uma vantagem adicional da presente invenção é que obtenível um campo de visão efetivo maior na versão de varredura-por-estágio, discutida acima.

As propriedades requeridas do dispositivo de detecção podem ser mais esclarecidas considerando-se a seguinte versão preferida. O limite de resolução da lente objetiva é $< 1 \mu\text{m}$, tipicamente $\sim 0,5 \mu\text{m}$, e o detetor compreende um agrupamento de ~ 1000 elementos independentes. Resolução, campo-de-visão (FOV) e taxa de aquisição de imagem não são variáveis independentes, necessitando transigência entre estes parâmetros de desempenho. Em geral, a ampliação do sistema ótico é ajustada a fim de gerar um FOV tão grande quanto possível, sem sacrificara resolução. Por exemplo, um campo de visão de $\sim 1 \text{ mm}$ poderia ter sua imagem formada em um agrupamento de 1000 elementos em uma pixelação de $1 \mu\text{m}$. Se os elementos

de detecção forem de 20 μm quadrados, então o sistema de ampliação seria ajustado a 20X. Observe-se que isto não resultará em resolução de 1 μm . A pixelação não é equivalente à resolução. Se, por exemplo, o limite de resolução inerente da lente objetiva for de 0,5 μm e cada região de 0,5 μm x 0,5 μm do plano objeto for mapeada em um pixel, a resolução verdadeira da imagem digital resultante não é 0,5 μm . Para obter-se resolução de 0,5 μm verdadeira, a pixelação necessitaria corresponder a uma região $\sim 0,2 \mu \text{ X } 0,2 \mu\text{m}$ no plano objeto. Em uma versão preferida, a ampliação do sistema de formação de imagem é ajustada para obter a verdadeira resolução da óptica.

Presentemente, os dispositivos de mais elevada eficiência de detecção e mais baixa detecção de ruído, tendo suficiente velocidade de leitura para as presentes aplicações, são câmeras CCD. Na Figura 11, uma câmera CCD retangular é representada tendo um agrupamento x n de elementos detetores, em que m é substancialmente menor do que n. A imagem da emissão de fluorescência cobre uma fileira que é preferivelmente próxima ao registro de leitura. Isto minimiza o tempo de transferência e evita acumular contagens espúrias dentro do sinal das fileiras entre a fileira iluminada e o registro de leitura.

Em princípio, poder-se-ia ajustar a ampliação do sistema ótico de modo que a altura da imagem da fenda SF_2 sobre a câmera CCD seja um pixel, como representado na Figura 11. Na prática, é difícil manter o perfeito alinhamento entre a linha de iluminação e o eixo geométrico da fileira de câmera e mesmo mais difícil manter o alinhamento entre três câmeras e a iluminação na versão de multi-comprimentos de onda, como exemplificado nas Figs. 8 e 9. Depositando-se juntos alguns dos elementos detetores, exemplarmente dois a cinco, em cada coluna da câmera, a condição de alinhamento pode ser relaxada enquanto sofrendo uma penalidade mínima em leitura-ruído ou leitura-tempo.

Uma vantagem adicional da versão preferida, tendo uma ou

mais câmeras CCD retangulares como dispositivo de detecção, em conjunto com um filtro espacial de detecção de largura variável, SF₂ nas Figs. 8 e 9 e 510 na Fig. 6, cada uma disposta em um plano conjugado como plano objeto, é elucidada a seguir. Como discutido acima, em uma versão da presente invenção o filtro espacial de detecção é omitido e uma câmera de linha é usada como um filtro espacial de detecção combinado e dispositivo de detecção. Porém, como foi também discutido acima, um filtro espacial de detecção de largura variável permite a otimização do volume de detecção, a fim de otimizar a relação sinal-ruído dependente da amostra. A seguinte versão preferida retém a vantagem de uma câmera de linha, isto é, velocidade, e a flexibilidade de um volume de detecção variável. A ampliação é ajustada a fim de formar uma imagem de uma linha limitada por difração de altura h sobre uma fileira da câmera. A largura do filtro espacial de detecção d é preferivelmente variável $h \geq d \geq 10 h$. Os detetores das colunas iluminadas da câmera são depositados, antes da leitura, o que é uma operação que requer um tempo desprezível em comparação com os tempos de exposição e leitura.

Em uma versão preferida, as câmeras são Princeton Instruments NTE/CCD-1340/100-EMD. A taxa de leitura de uma versão preferida é de 1 MHz a alguns elétrons de leitura-ruído. O formato do pixel é 1340x100 e a câmera pode ser ligada por fio para mudar a maior parte das fileiras (80%) afastadas da região de interesse, tornando a câmera efetivamente 1340x20.

Além da vantagem acima mencionada de uma câmera de leitura contínua, isto é, a ausência de tempo morto entre sucessivas aquisições, uma vantagem adicional é que ela permite a aquisição de imagens retangulares, tendo um comprimento limitado somente pela extensão da amostra. O comprimento é determinado pela menor de largura de câmera e extensão da linha de iluminação. Em uma versão preferida, a amostra é

disposta sobre o fundo de uma cavidade de uma placa de microtitulação de 96 cavidades, cujo diâmetro é de 7 mm. Uma faixa de 1 μm X 1 mm é iluminada e a radiação emitida pela área iluminada forma imagem sobre o dispositivo de detecção. O trem ótico é projetado de modo que o campo de visão seja de ~ 1 mm². De acordo com a presente invenção, uma imagem do fundo da cavidade pode ser gerada em uma pixelação de 1 μm através de um campo 1X 7-mm.

CONTROLE AMBIENTAL

Em uma versão da presente invenção, os ensaios são realizados em células vivas. Os ensaios em células vivas freqüentemente requerem uma aproximação razoável das condições fisiológicas para funcionar apropriadamente. Entre os parâmetros importante está a temperatura. É desejável incorporar um meio de elevar e abaixar a temperatura, em particular, para manter a temperatura da amostras a 37°C. Em outra versão, o controle sobre a umidade relativa e/ou CO₂ e/ou O₂ é necessário para manter a viabilidade das células vivas. Além disso, controlar a umidade para minimizar a evaporação é importante para pequenos volumes de amostra.

Três versões fornecendo uma placa de microtitulação em uma elevada temperatura, preferivelmente 37°C, compatível com o sistema LCI, segue.

O sistema de formação de imagem preferivelmente reside dentro de um recinto a prova de luz. Em uma primeira versão, a placa de amostra é mantida na temperatura desejada mantendo-se o inteiro interior do recinto naquela temperatura. A 37°C, entretanto, a menos que elevada umidade seja propositalmente mantida, o esfriamento por evaporação reduzirá o volume da amostra, limitando a duração do ensaio.

Uma segunda versão fornece uma cobertura aquecida para a placa de microcavidades, que permite que a placa mova-se sob a cobertura estacionária. A cobertura tem uma única abertura acima da cavidade alinhada

com o eixo geométrico ótico do microscópio. Esta abertura permite aplicação dentro da cavidade ativa, enquanto mantendo o aquecimento e circulação limitada para o resto da placa. Um espaço entre a placa de cobertura aquecida e a placa de microcavidades de aproximadamente 0,5 mm permite movimento
5 livre da placa de microcavidades e minimiza a evaporação. Quando o conteúdo da cavidade interrogada é exposto às condições ambientes, embora o ministrador abrindo-se por no máximo alguns segundos, dito conteúdo sofre mudança de temperatura não significativa durante a medição.

Em uma terceira versão, uma janela de safira delgada e
10 aquecida é usada como um recinto de fundo de placa. Um padrão de aquecedores resistivos, ao longo dos separadores de cavidade, mantém a temperatura da janela no nível desejado.

Em versões adicionais, os três processos descritos podem ser variavelmente combinados.

15 MINISTRADOR INTEGRADO

Uma versão da configuração de taxa de vídeo do sistema formador de imagem é ainda configurada para iniciar ensaios cinéticos, em particular ensaios de canal iônico, com uma ministração de reagente regulada. A iniciação da abertura de canal é realizada ministrando-se uma solução
20 dentro da micro-cavidade. Por exemplo, canais controlados em porta por voltagem podem ser abertos pela adição de uma solução de KCl para despolarizar a membrana de plasma. A dependência de tempo da abertura de canal e subsequente fechamento e a correspondente mudança na concentração intracelular é com frequência suficientemente rápida para requerer formação
25 de imagem de taxa de vídeo. A velocidade intrínseca do sistema de formação de imagem é irrelevante, a não ser que a resposta do canal possa ser iniciada rapidamente.

Uma versão da presente invenção fornece um ministrador integrado. Para ensaios realizados nas placas de 96 ou 384 cavidades, os

volumes de adição nesta faixa de 20 - 100 μ L são desejáveis. Um ministrador de cabeça simples, como é apropriado, por exemplo, para a adição de um agonista de atividade de canal iônico, é o IVEK Dispense 2000. Unidades comparáveis são disponíveis na CAVRO. Mais geralmente, é desejável ser-se capaz de ministrar um único composto dentro de cada cavidade. Uma versão fornece um ministrador de cabeça simples em um dispositivo de movimento robótico, que move em vaivém a cabeça de ministrador entre a estação de análise, a placa de fonte contendo os únicos compostos e a estação de limpeza de ponta. A última é uma estação de lavagem para um ministrador de ponta fixa e uma estação de troca de ponta para um ministrador de ponta descartável. Este sistema fornece a desejada funcionalidade relativamente de modo barato, porém é de baixa produção, requerendo aproximadamente 30 segundos por ciclo de aspiração-ministração-limpeza do composto. Uma versão alternativa é fornecida integrando-se um ministrador de multicabeças, tal como o Hamilton Microlab MPH-96 dentro do sistema LCI descrito. O MPH-96 consiste de 96 ministradores de ponta fixos independentes, montados em um dispositivo de movimento robótico, capaz de executar o ciclo de aspiração-ministração-lavagem descrito acima.

Em uma versão adicional preferida da invenção, empregada em ensaios de triagem automatizados, o sistema de formação de imagem é integrado com os robôs de manuseio de placa, tais como o Zymark Twister.

CONFIGURAÇÃO CONFOCAL DE CAMPO ESCURO

No caso em que a resolução lateral desejada for menor do que o limite de difração, a fluorescência de fundo, devida ao líquido sobrenadante, pode ser diminuída por uma aplicação inventiva da técnica de formação de imagem de campo escuro. As figuras 12(a) e 12(b) representam os trajetos de raio do convencional campo escuro. Na Fig. 12(a), uma amostra 600 é iluminada por um cone oco de luz 610 de uma lente objetiva 620. Este cone de luz é criado, por exemplo, colocando-se uma barra opaca 630 na

lente 440 da Fig. 10(a). Na Fig. 12(b), a emissão fluorescente da amostra 600 é então coletada através do centro da lente objetiva 620. Em razão dos diferentes ângulos de iluminação e coleta, o único plano que é tanto iluminado como detectado é o plano contendo a amostra 600.

5 As figs. 13(a) e 13(b) representam os trajetos de raio de campo escuro invertido. Na Fig. 13(a), uma amostra 700 é iluminada com um feixe de luz 710, que passa através do centro de uma lente objetiva 720. Na fig. 13(b), emissões fluorescentes são então coletadas somente em torno do lado externo da lente objetiva 720. A coleta em torno do lado externo da objetiva
10 pode ser conseguida colocando-se, por exemplo, uma barra opaca 730 na lente 490 da Fig. 10(a). Como o campo-escuro convencional, o campo escuro invertido envolve a iluminação de um ângulo e coleta em um diferente ângulo, de modo que somente o plano de amostra é tanto iluminado como detectado.

15 A Fig. 14 representa a região focal no caso descrito acima, onde é vantajoso iluminar uma área maior do que a limitada por difração do plano de amostra. Os raios de iluminação e coleta são os mesmos da geometria de campo escuro invertido da Fig. 13. Se um batente for colocado em um plano conjugado com o plano focal traseira objetivo, tendo uma
20 largura igual à do feixe de iluminação, a configuração de campo escuro é conseguida. Que esta configuração confere uma diminuição da fluorescência fora de plano colidindo com o detetor pode ser entendido pela Fig. 14. A fluorescência das regiões sombreadas, acima e abaixo do plano objeto, não é passada pelo batente. Em confocal de varredura pontual, a fluorescência
25 destas regiões fora de plano é rejeitada eficientemente pela abertura de detecção. Em confocal de varredura de linha, a fluorescência fora de plano de uma posição lateral ao longo da linha contribui para o sinal de fundo em outros pontos ao longo da linha: isto é a origem da degradação de sinal-para-fundo em varredura de linha relativa a confocal de varredura pontual. A

configuração de campo escuro inversa de confocal de varredura de linha, recupera uma fração significativa dos atributos de rejeição de fundo de confocal de varredura pontual, enquanto retendo a vantagem da velocidade da configuração de varredura de linha.

5 ANÁLISE DE DADOS DE TEMPO REAL

A presente invenção é capaz de gerar megabytes de dados por segundo, continuamente. Em uma versão, o sistema é integrado com um dispositivo de armazenagem rápida de alta densidade e elevado volume, a que os dados podem ser enrolados em tempo real para subsequente análise. Em
10 uma versão preferida, a análise de dados é realizada essencialmente simultaneamente com aquisição de dados. Assim, os dados são processados antes da armazenagem. Em geral, somente os resultados da análise são arquivados, porém é vantajoso selecionarem-se dados brutos também.

Exemplos de rotinas de análise de tempo real são fornecidos
15 abaixo em conjunto com cada um dos grupos de ensaio. Em todos os casos, são usados procedimentos para otimizar o código de software para operação na plataforma de hardware de interesse. Em uma versão presentemente preferida, o computador é um processador de 32-bits, tal como o Pentium II. Neste caso, todos os dados são acessados em pacotes de 32-bits.

20 Em geral, a aquisição e análise dos dados compreende diversas etapas distintas. Primeira, a fluorescência é convertida em uma ou mais imagens digitais, em que os valores digitais são proporcionais à intensidade da radiação fluorescente incidente em cada pixel do dispositivo de detecção. Dentro desta etapa, é feita uma correção para a resposta não-
25 uniforme do sistema formador de imagens, através do campo de visão, em que os dados subtraídos do fundo são divididos por um chamado arquivo de campo plano. Segunda, um mapa de bits binário é gerado de uma das imagens digitais em que todos os valores satisfazendo certos critérios são substituídos por um, todos os valores deixando de satisfazer os critérios substituídos por

zero. Em uma versão, os critérios incluem um valor limite determinado pela própria imagem. Terceira, o mapa de bits é pesquisado quanto a grupos de pixels de valor-um contíguos. Em uma versão, os grupos são ainda testados contra critérios de tamanho mínimo e/ou máximo. Quarta, para os grupos qualificados, os valores dos pixels correspondentes da mesma imagem ou de outra imagem são somados e registrados, e a média e outras propriedades estatísticas das somas determinadas e registradas. Adições ao e variações deste procedimento básico apropriado para os vários ensaios, são descritos abaixo.

10 ENSAIOS

Numerosas variações dos processos de ensaio descritos abaixo podem ser praticadas de acordo com a invenção. Em geral, uma espacial característica e/ou distribuição temporal de uma ou mais espécies fluorescentemente rotuladas é/são usada(s) para quantificar o ensaio.

15 Vantajosamente, a fluorescência é observada de uma superfície essencialmente planar, empregando-se um microscópio confocal de varredura de linha. Esta seção é organizada por tipo-de-ensaio, de acordo geralmente com o grau de aumento de complexidade da rotina de análise de dados associada. A organização não é exata, entretanto, porque os algoritmos de análise são freqüentemente aplicáveis a mais do que um tipo de ensaio.

20 ENSAIOS DE LIGAÇÃO

Um primeiro tipo-de-ensaio que pode ser vantajosamente realizado de acordo com os processos da presente invenção é um ensaio de ligação. Em geral, o grau de ligação de um ligando fluorescentemente rotulado ao alvo de interesse é quantificado pela análise de uma ou mais imagens de fluorescência de uma amostra contendo pelo menos o alvo e o ligando rotulado e obtido com o sistema de formação de imagem confocal de varredura de linha descrito. Os ligandos utilizados incluem mas não são limitados a peptídeos naturais e sintéticos conjugados com fluoróforo e

proteínas, açúcares, lipídeos, seqüências de ácidos nucleicos, partículas virais, partículas bacteriófagas, toxinas naturais e sintéticas, agentes farmacêuticos conhecidos, pequenas moléculas orgânicas ou análogos sintéticos de neuro-transmissores ou pequenas moléculas intrinsecamente fluorescentes, peptídeos ou proteínas, compostos sintéticos de coleções combinatoriais, peptídeos aleatórios, proteínas de coleções de expressão de cDNA e peptidomiméticos (Vide Haugland R.P. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals 6^a. ed. (Cap. 18). Os alvos incluem mas não são limitados a extratos celulares ou preparações purificadas de receptores, proteínas de canal portado por ligando ou portado por íon, enzimas, fatores de transcrição, proteínas citoesqueléticas e anticorpos e podem ser derivados de vírus, bactérias, bacteriófagos, células de invertebrados e vertebrados. Receptores exemplificativos incluem mas não são limitados a acetilcolina, adrenérgico (α e β), muscarínico, dopamina, glicina, glutamina, serotonina, aspartato, ácido gama-amino butírico, neurotensina, colecistocinina (CCK), endorfina (opióide), melanocrotina/ACTH, somatostatina, hormônio prateróide, hormônio do crescimento, tiotropina, tiroxina, citocina, quemocina, insulina, fator de crescimento semelhante a insulina (IGF), fator de célula tronco, hormônio de liberação do hormônio luteinizante, gonadotropina, angiotensina, endotelina, neurotensina, interferon, bradicinina, vasopressina, oxitocina, polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP), hormônio de liberação de corticotropina, neurotrofina, eritropoetina, prostaglandina, leucotrieno, tromboxano A₂, calcitonina, célula-T, LDL/HDL, fator do crescimento epidérmico (EGF), Estrogênio e Galainano.

25 LIGAÇÃO BASEADA EM CONTA

As figuras 15(a) - 15(f) representam as etapas de uma versão de um ensaio de ligação de receptor, que pode ser realizada de acordo com a invenção. Na fig. 15(a), membranas 210, preparadas de células ou tecidos e contendo o alvo receptor 212, são adicionadas a uma cavidade 220 contendo

um líquido 230. Na Fig. 15(b), ligandos rotulados fluorescentes 214 são adicionados à cavidade 220; estes ligandos ligam-se aos receptores de membrana 212. Na Fig. 15(c), as contas 224 são adicionadas à cavidade 220. Alternativamente, a ordem de 15(b) e 15(c) pode ser intercambiada e, em uma versão preferida, as contas revestidas com membrana são preparadas separadamente, antes da adição à cavidade. As contas 224 têm um diâmetro na faixa de aproximadamente 1-20 μm e são revestidas com um material, tal como aglutinina de germe de trigo, a que as membranas 210 aderem ou têm uma superfície que permite a ligação direta covalente ou não-covalente das membranas.

As etapas precedentes são as mesmas etapas correspondentes do SSA da arte anterior representadas nas Figs. 1(a) - 1(f), exceto que os rótulos são fluorescentes em vez de radioativos. Entretanto, na presente invenção, as contas 224 não são luminescentes e elas têm uma densidade de modo que elas afundam para ou podem ser rodopiadas para baixo para o fundo da cavidade ou são magnéticas, de modo que elas podem ser movidas para o fundo da cavidade usando-se um ímã externo. Na Fig. 15(d), os rótulos fluorescentes têm imagem formada usando-se, por exemplo, um microscópio confocal de varredura de linha esquematicamente representado como elemento 240. Na fig. 15(e), um composto de teste 218 é adicionado à cavidade. Como nos ensaios da arte anterior, a finalidade do presente ensaio é determinar a extensão em que o composto de teste desloca os ligandos fluorescentemente rotulados 214 dos receptores de membrana 212. Na fig. 15(f), os rótulos fluorescentes ainda ligados às membranas 210 têm imagem formada. Comparando-se as duas imagens fluorescentes, a atividade do composto de teste pode ser determinada.

Em uma versão alternativa do ensaio representado nas Figs. 15(a) - 15(e), a etapa de formação de imagem representada na Fig. 15(d) pode ser eliminada e a atividade do composto de teste pode ser determinada

comparando-se a imagem obtida na Fig. 15(f) com a imagem de uma cavidade de controle ou a imagem esperada da quantidade conhecida dos ligandos rotulados fluorescentes adicionados à cavidade e sua afinidade conhecida com os receptores.

5 Em uma versão específica do ensaio representado nas Figs. 15(a) - 15(f), o receptor é um anticorpo que reconhece o ligando e o ligando fluorescentemente rotulado é adicionado ao longo da reação com uma amostra contendo uma quantidade desconhecida de ligando não-rotulado. Como nos radioimunoensaios da arte anterior, a finalidade do presente ensaio
10 é determinar a concentração de ligando não-rotulado da amostra pela medição da extensão em que ele desloca o ligando fluorescentemente rotulado 214 do receptor de anticorpo.

LIGAÇÃO DE SUPERFÍCIE

As figs. 16(a) - 16(f) representam as etapas de uma segunda
15 versão de um ensaio de ligação de receptor de acordo com a presente invenção. Na fig. 16(a), as membranas 250 preparadas de células ou tecidos e contendo o alvo receptor 252 são adicionadas a uma cavidade 260 contendo um líquido 270. O fundo da cavidade 262 é revestido com um material tal como aglutinina de germe de trigo, a que as membranas aderem. Na fig.
20 16(b), as membranas 250 são mostradas ligadas a este material. Na fig. 16(c), ligandos fluorescentemente rotulados 254 são adicionados à cavidade 260 e ligam-se aos receptores de membrana 252. Alternativamente, a ordem das Figs. 16(b) e 16(c) pode ser intercambiada.

Na fig. 16(d), a fluorescência dos rótulos fluorescentes tem
25 imagem formada empregando-se, por exemplo, um microscópio confocal de varredura de linha, esquematicamente representado pelo elemento 280. Na fig. 16(e), um composto de teste 258 é adicionado à cavidade 260. Na fig. 16(f), os rótulos fluorescentes ainda fixados às membranas 250 têm imagem formada e são comparados com a primeira imagem, para determinar a

atividade do composto de teste 258.

Em uma versão alternativa do ensaio representado nas Figs. 16(a) - 16(f), a formação de imagem da Fig. 16(d) pode ser eliminada e a atividade do composto de teste pode ser determinada comparando-se a
5 imagem obtida na Fig. 16(f) com a imagem de uma cavidade de controle ou a imagem esperada da quantidade conhecida dos ligandos rotulados fluorescentes adicionados à cavidade e sua afinidade conhecida com os receptores.

LIGAÇÃO BASEADA EM CÉLULA

10 Em uma versão alternativa, a ligação alvo de ligando é vantajosamente ensaiada em coleções de células expressando o alvo. Em geral, há diversas vantagens para os ensaios baseados em célula para triar compostos químicos. Em particular, a atividade de interesse é medida na
15 presença de processos celulares competentes e complementares afetando a atividade biológica do composto. Nos ensaios celulares, as células são preparadas de linhagens de célula ou tecidos são colocados em cavidades de cultura de tecido ou em lâminas de microscópio. As células podem ser vivas e intactas ou permeabilizadas com reagentes tais como digoxigenina ou,
alternativamente, fixadas com reagentes tais como formaldeído. Um ou mais
20 ligandos rotulados fluorescentes são adicionados às células juntamente com quaisquer reagentes não-fluorescentes requeridos para o ensaio; os ligandos rotulados fluorescentes ligam-se a um ou mais componentes das células. Um composto de teste é então adicionado às células. Alternativamente, a ordem de adição dos ligandos fluorescentes e compostos químicos pode ser
25 intercambiada. Os rótulos fluorescentes têm sua imagem formada empregando-se, por exemplo, um microscópio confocal de varredura de linha esquematicamente representado como elemento 240. A finalidade do presente ensaio é determinar a extensão em que o composto de teste desloca os ligandos fluorescentemente rotulados dos receptores. Os rótulos fluorescentes

ainda ligados às células têm imagem formada na presença e na ausência do composto de teste. Comparando-se as duas imagens fluorescentes, a atividade do composto de teste pode ser determinada.

Em uma versão alternativa de um ensaio de ligação de receptor baseado em célula, a etapa de formação de imagem na ausência do composto pode ser eliminada e a atividade do composto de teste pode ser determinada comparando-se a imagem obtida na presença do composto com a imagem de uma cavidade de controle ou a imagem esperada da quantidade conhecida dos ligandos rotulados fluorescentes adicionados à cavidade e sua afinidade conhecida com os receptores.

VANTAGENS DE FORMAÇÃO DE IMAGEM CONFOCAL DE VARREDURA DE LINHA EM ENSAIOS DE LIGAÇÃO

Em uma primeira versão, a ligação ligando-alvo é realizada com um comprimento de onda de excitação e um comprimento de onda de emissão. Dados são fornecidos na Fig. 24 exemplificando a velocidade e sensibilidade da presente invenção. Segue uma análise detalhada de seu desempenho relativo à arte anterior, em que os ligandos são radiorrotulados para permitir sua detecção. A arte anterior para ensaios de receptor-ligando inclui formatos SSA bem como formatos em que ligando ligado e não-ligado são fisicamente separados e a quantidade de ligando ligado ao receptor é medida pela adição de cintilante líquido.

Primeiro, a presente invenção pode ser usada em cavidades de pequeno volume, exemplificativamente 1 μL . Em um ensaio de ligação de receptor-ligando empregando ligando radiorrotulado, cada radiorrótulo, ^3H por exemplo, pode desintegrar-se somente uma vez, produzindo no máximo 90 fótons por desintegração, em uma taxa de desintegração de menos do que 10^{-8} por segundo. Uma única molécula fluorescente produzirá $10^4 - 10^7$ fótons no total e emitirá entre 10^3 e 10^6 fótons por segundo. Assim, a taxa de contagem para um rótulo fluorescente é de aproximadamente 10^{11} em relação

a ^3H . A presente invenção, portanto, requer rótulos, membranas e contas imensamente menores por cavidade. Por exemplo, enquanto um SSA de trítio requer 10^7 contas por cavidade, a presente invenção requer menos do que 10^3 contas por cavidade. Em consequência, a presente invenção pode ser realizada em cavidades de volume- μL e em tempo muito menor. Além disso, em um SSA é difícil alterar o tempo de formação de imagem, porque os radiorrótulos desintegram-se em uma taxa fixa. Ao contrário, a taxa de excitação dos rótulos fluorescentes pode ser aumentada a fim de aumentar a taxa de emissão de fóton, desse modo reduzindo o tempo requerido de formação de imagem. A taxa de excitação não pode, entretanto, ser aumentada sem limite. Na realidade, é a existência do chamado limite de saturação da taxa de emissão de fluoróforo que subjaz a substancial vantagem do confocal de varredura de linha em relação ao confocal de varredura pontual do presente pedido. Segundo, a presente invenção não requer o tempo e despesa de manusear radioatividade. Terceiro, em razão de a presente invenção poder ser realizada em cavidades de pequeno volume, o consumo de composto e reagente é muito mais baixo do que para os SSAs, resultando em mais reduções de custo. Finalmente, a presente invenção não requer contas ou fundos de cavidade dopados com cintilante, reduzindo os custos ainda mais. O aspecto confocal do microscópio permite seccionamento ótico, isto é, detecção de fluorescência do plano em que a amostra é localizada, enquanto minimizando a detecção de fluorescência da massa da solução. Isto elimina a necessidade de etapas de lavagem para remover ligando rotulado fluorescente não-ligado; esta etapa, embora não seja requerida em um SSA, é ainda necessária em qualquer ensaio de ligação de receptor-ligando, incluindo RIA, em que as contas contendo cintilante não são usadas. O aspecto confocal do microscópio também elimina qualquer interferência que possa originar-se dos compostos de teste fluorescente intrínseco. O aspecto de varredura de linha permite que a amostra tenha

imagem formada mais rapidamente do que na varredura pontual tradicional, sem perder apreciável rejeição de fundo. O aumento da velocidade depende da densidade do fluoróforo, da resolução lateral, do campo de visão e dos parâmetros do hardware incluindo a NA objetiva, da sensibilidade de detecção e da taxa de leitura de câmera. Teoricamente, o aumento de velocidade pode aproximar-se do número de pixels por linha, que é de 1000 em uma versão preferida da presente invenção. Praticamente, o aumento é de aproximadamente 100X.

A fim de quantificar estas vantagens, uma amostra exemplificativa será descrita. O ensaio é baseado em célula, em que o local da fluorescência é para ser decomposta a uma precisão de 1 μm . Assim, a imagem de uma área de amostra de diâmetro de 1 mm consistirá de $\sim 10^3$ linhas de $\sim 10^3$ pixels. O sinal de fluorescência de interesse poderia originar-se de ligandos da superfície de célula ou de uma fonte localizada dentro da célula, tal como um receptor do núcleo. Em um ou em outro caso, a concentração local do fluoróforo é o parâmetro importante. Para uma linhagem de célula construída expressando $\sim 10^5$ receptores por célula, a concentração média de células é de $\sim 1 \mu\text{M}$. Alguns milhares de receptores localizados no núcleo resulta em uma concentração local comparável. Consistente com a resolução lateral desejada de $\sim 1 \mu\text{m}$, há $\sim 2 \times 10^3$ fluoróforos por pixel. Presume-se que a fluorescência de fundo celular intrínseca seja menor do que a porém da ordem da fluorescência de rótulo e que a desejada relação sinal-ruído seja minimamente 10. Em seguida, o número de fótons detectados precisa ser próximo de 10^3 , considerando-se o ruído de disparo do sinal e fundo e o ruído de leitura de um detector de estado sólido de elevada qualidade. A eficiência de coleta e detecção do presente dispositivo, empregando uma objetiva NA de aproximadamente 0,7, filtros de bloqueio e uma câmera de estado sólido é de $\sim 1\%$, requerendo que $\sim 10^5$ fótons sejam emitidos por pixel ou $\sim 10^2$ fótons por molécula. É desejável que

a imagem seja adquirida em menos do que 1 segundo, preferivelmente em uma fração de um segundo. Se os pixéis forem adquiridos em um modo serial, então o tempo de permanência do pixel deve ser menor do que 1 μ s, requerendo uma taxa de emissão de fóton maior do que 10^8 por segundo por molécula. Esta é além do valor de saturação da maioria dos fluoróforos, que é tipicamente de 10^6 . Importantemente, o fluxo requerido para obter saturação, $10^5 - 10^6$ W/cm², é suficiente para acionar branqueamento foto-induzido não-linear dos fluoróforos também. Finalmente, os dispositivos de detecção da mais elevada eficiência não podem ser usados nas taxas de dados requeridas na varredura serial. Ao contrário, a taxa de emissão por fluoróforo precisa somente ser $\sim 10^5$ se 10^3 pixéis forem iluminados simultaneamente. A rejeição aumentada da fluorescência de fundo do confocal de varredura pontual não garante a desvantagem da dramaticamente diminuída velocidade de varredura.

Os dados exemplificativos da Fig. 24 demonstram que o sistema descrito tem suficiente sensibilidade para quantificar dezenas de fluoróforos por conta, enquanto claramente decompondo centenas de contas individuais em menos do que 1 segundo. Dados comparáveis podem ser adquiridos em experimentos de ligação baseados em células, como será exemplificado abaixo.

ANÁLISE DE DADOS

As rotinas de análise de dados são estreitamente relacionadas se a ligação for baseada em célula ou baseada em conta e são apresentadas juntas abaixo. Os dados podem ser analisados pelas seguintes rotinas, a mais simples das quais é o algoritmo Análise de Imagem Limiar. A finalidade da rotina é determinar a quantidade de uma espécie fluorescentemente rotulada, que é localizada de uma maneira contígua ou pontuada, a fim de exceder uma intensidade de fluorescência mínima e, opcionalmente, a fim de não exceder uma intensidade de fluorescência máxima. Em uma versão, a análise é usada

para ensaiar a atividade de um composto químico.

As etapas do algoritmo são como segue:

1. Adquire uma imagem digitalizada da espécie rotulada.
2. Abre o arquivo fileira por fileira e
 - 5 i. Subtrai o valor deslocado de câmera da imagem,
 - ii. Multiplica cada fileira da imagem pelo inverso da correspondente fileira do arquivo de imagem de campo-plano.
3. Opcionalmente, histograma a imagem, para determinar o nível de fundo.
- 10 4. Estabelece critérios de seleção, incluindo um valor mínimo e, opcionalmente, um valor máximo. Os valores são determinados, por exemplo, como um múltiplo fixo do nível de fundo médio, como um número fixo de contagens acima do nível de fundo médio, por análise estatística da largura de pico de histograma de fundo ou
 - 15 utilizando-se um valor predeterminado.
5. Compara cada pixel da imagem com os critérios de seleção. Para cada pixel da imagem satisfazendo os critérios, adiciona o valor a uma soma em andamento. O número total de pixels qualificados e a intensidade média são informados.

20 Esta rotina é usada vantajosamente para processar dados similares àqueles da Fig. 24, em que as contas individuais são claramente distinguíveis do fundo e os artefatos devidos às contas ou células acumuladas são pequenos. Tal rotina é apropriada para o tipo de ensaio tendo membranas ligadas ao fundo de cavidade também.

25 Uma segunda rotina, aplicável à análise dos dados de ligação é o algoritmo de Análise de Localização, que requer um protocolo de análise de formato adicional. Como com a rotina de Limiar, a finalidade é determinar a quantidade de uma espécie fluorescentemente rotulada que seja localizada de uma maneira contígua ou pontuada. Em uma versão, a análise é usada para

ensaiar a atividade de um composto químico.

As etapas do algoritmo como segue:

1. Adquire imagem da espécie rotulada.
2. Abre o arquivo fileira-por-fileira e
 - 5 i. Subtrai o valor de deslocamento de câmera da imagem,
 - ii. Multiplica cada fileira da imagem pelo inverso da correspondente fileira do arquivo de imagem de campo plana.
3. Opcionalmente, histograma e soma os valores de pixel da imagem.
4. Estabelece critérios de seleção, incluindo um valor mínimo e,
 - 10 opcionalmente, um valor máximo. Os valores são determinados, por exemplo, como um múltiplo fixo do nível de fundo médio, como um número fixo de contagens acima do nível de fundo médio, por análise estatística da largura de pico do histograma de fundo ou pela utilização de um valor predeterminado.
- 15 5. Compara cada pixel da imagem com os critérios de seleção. Todos os pixels qualificados recebem um valor de 1 e todos os outros recebem um valor de 0, desse modo realizando uma compressão de 16 a 1-bit.
6. “Limpa” a borda da imagem pelo ajuste a 0 de todos os pixels
 - 20 contíguos de valor-1 da máscara binária tendo um membro de toque de borda.
7. Pesquisa o mapa de bits por objetos, definidos como grupos pixels contíguos de valor-1:
 - 25 1. Pesquisando a imagem em um padrão de linha por linha, para encontrar um pixel de valor 1.
 2. Determinando todos os pixels de valor-1 contíguos ao pixel identificado em i).
 3. Opcionalmente, aplicando um filtro de tamanho mínimo e máximo ao objeto, os tamanhos tendo sido previamente

determinados.

4. Se o objeto qualificar-se, prosseguir para a etapa 8, caso contrário, mudar todos os pixéis valorizados-1 do objeto para 0 e continuar pesquisando para o objeto seguinte.

5. Se o final do mapa de bits for alcançado, prosseguir para a etapa 9.

Para cada objeto passando pelos critérios de filtro:

1. Opcionalmente criar um novo mapa de bits retangular, com limites estendidos, que contenha o objeto mais n extra pixéis 0 em cada direção da borda do objeto. n é o número de etapas de dilatação a serem realizadas abaixo e foi previamente determinada.
2. Se a etapa 8.i. fosse implementada, então dilatar o objeto pela aplicação de uma etapa de dilatação n vezes, em que os pixéis de valor 0 que tocam os pixéis estimados 1 são ajustados no valor 1.
3. Para cada coleção de pixéis estimados-1 do mapa de bits dilatado ou do mapa de bits original, se a etapa 8.i. não foi implementada, somar e verificar a média dos valores de pixéis correspondentes da imagem, para calcular as intensidades médias de pixéis sob a máscara.
4. Mudar para 0 todos os pixéis do objeto da imagem de mapa de bits original e retornar para a etapa 7 para procurar mais objetos.

Após todos os objetos terem sido contados, a intensidade média da espécie fluorescentemente rotulada por objeto e opcionalmente da fração da intensidade total da espécie localizada é calculada para todos os objetos da imagem e informada junto com a informação estatística, tal como o desvio padrão.

A operação distinta desta rotina, compartilhada por todos os seguintes algoritmos, é a criação da máscara binária das etapas 4-6. Os critérios de seleção dos objetos para a máscara pode opcionalmente incluir

valores máximos e mínimo, tamanho e formato. Por exemplo, em uma versão, a rotina de análise para os ensaios baseados em conta incluem um filtro de redondeza na etapa 7.iii.

Em uma segunda versão, a emissão de duas ou mais espécies fluorescentemente rotuladas é detectada simultaneamente, excitada por um ou mais comprimentos de onda de iluminação. Como aplicado em um ensaio de ligação, a primeira espécie fluorescentemente rotulada é usada para identificar o objeto em que a segunda espécie fluorescentemente rotulada se liga. Dois exemplos de ensaios de ligação baseados em célula bicolor são fornecidos nas Figuras 21 e 23. Um procedimento exemplificativo que pode ser usado para analisar tais imagens é a rotina de Análise de Co-localização, que é designada para determinar a quantidade de uma primeira espécie fluorescentemente rotulada, com respeito a uma segunda espécie fluorescentemente rotulada. Em uma versão, a análise é usada para ensaiar a atividade de um composto químico, por exemplo, em que a atividade depende de uma localização subcelular de interesse.

As etapas do algoritmo são como segue:

1. Adquire imagens digitalizadas das primeira e segunda espécies rotuladas, respectivamente.
2. Abre arquivos fileira por fileira e
 - i. Subtrai os valores de deslocamento de câmera respectivos de cada imagem,
 - ii. Multiplica dada fileira de cada imagem pelo inverso da fileira correspondente em seu respectivo arquivo de imagem de campo plano.
3. Opcionalmente, histograma a imagem da primeira espécie, para determinar o nível de fundo e soma a intensidade da imagem da segunda espécie.
4. Estabelece critérios de seleção incluindo um valor mínimo e,

opcionalmente, um valor máximo. Testes valores são determinados, por exemplo, como um múltiplo fixo do nível de fundo médio, como um número fixo de contagens acima do nível de fundo médio, por análise estatística da largura de pico de histograma de fundo ou pela utilização de um valor predeterminado.

5. Compara cada pixel da imagem da primeira espécie com os critérios de seleção. Todos os pixéis qualificados recebem um valor de 1 e todos os outros recebem um valor de 0, desse modo realizando uma compressão de 16 para 1 bit.
6. “Limpa” a borda da imagem pelo ajuste em 0 de todos pixéis contíguos estimados-1 da máscara binária tendo um membro de toque de borda.
7. Pesquisa o mapa de bits por objetos, definidos como grupos de pixéis contíguos estimados-1:
 1. Pesquisando a imagem em um padrão de linha por linha para encontrar um pixel de valor 1.
 2. Determina todos os pixéis de valor-1 contíguos ao pixel identificado em i).
 3. Opcionalmente, aplicando um filtro de tamanho mínimo e máximo ao objeto, os tamanhos tendo sido anteriormente determinados.
 4. Se o objeto qualificar-se, prosseguir para a etapa 8, caso contrário, mudar todos os pixéis estimados-1 do objeto para 0 e continuar a pesquisar para o objeto seguinte.
 5. Se o fim do mapa de bits for alcançado, prosseguir para a etapa 9.

Para cada objeto passando pelos critérios de filtro:

 1. Opcionalmente criar um novo mapa de bits retangular com bordas estendidas, que contenham o objeto mais n extra pixéis

0 em cada direção a partir da borda do objeto. n é o número de etapas de dilatação a serem realizadas e foi previamente determinado.

2. Se a etapa 8.i. tiver sido implementada, então dilatar o objeto pela aplicação de uma etapa de dilatação n vezes em que os pixels de valor 0 que tocam os pixels estimados-1 são ajustados ao valor 1.
3. Para cada coleta de pixels estimados-1 do mapa de bits dilatado, ou do mapa de bits original se a etapa 8.i. não foi executada, somar e calcular a média dos correspondentes valores de pixel da imagem da segunda espécie, para calcular as intensidades médias dos pixels sob a máscara.
4. Mudar para 0 todos os pixels do objeto da imagem de mapa de bits original e retornar para a etapa 7, para pesquisar por mais objetos.

Após todos os objetos terem sido contados, a intensidade média da segunda espécie fluorescentemente rotulada por objeto e opcionalmente a fração da intensidade total da segunda espécie co-localizada com a primeira espécie são calculadas para todos os objetos da imagem e informados juntos com a informação estatística, tal como o desvio padrão.

A vantagem desta rotina mais elaborada é que o objeto, quer ele seja uma célula ou uma conta, pode ser independentemente identificado. Como exemplificado na Fig. 21, nem todas as células respondem. A identificação independente de células possibilita, por exemplo, que a relação de células que respondem para que não respondem seja tabulada juntamente com o grau de resposta entre aquelas que respondem. Este algoritmo, apesar de sua complexidade adicional, pode ser implementado a fim de analisar imagens de 1-megapixel sob 1 segundo em uma plataforma Pentium II.

ENSAIOS DE TRANSLOCAÇÃO

Um tipo de ensaio adicional que pode ser realizado vantajosamente de acordo com a segunda versão, isto é, onde a emissão de duas ou mais espécies fluorescentemente rotuladas é detectada simultaneamente, excitada por um ou mais comprimentos de onda de
5 iluminação, é o ensaio de translocação. Nestes ensaios, a translocação de interesse é de uma ou mais espécies, que podem ser proteínas, lipídeos ou outros complexos moleculares ou estruturas sub-celulares, tais como vesículas, de uma região bem definida de uma célula para outra. Estas incluem mas não são limitadas a: sinaptina (proteína da membrana da
10 vesícula), fatores de transcrição (NF- κ B, NFAT, AP-1), receptores de hormônio, receptores LDL/HDL, receptores de célula-T e receptores PTH.

O ensaio de translocação prototípica é um caso especial da medição de co-localização. Exemplarmente, a co-localização das primeira e segunda espécies é quantificada pela fração da segunda espécie co-localizada
15 com respeito à primeira, ou a relação da segunda espécie co-localizada com a primeira e aquela residente em outra parte da célula. Uma rotina de análise expandida preferencialmente usada para processar os dados de imagem de translocação é fornecida abaixo.

A localização rotulada é o núcleo de célula, o rótulo sendo um
20 fluoróforo específico para DNA, tal como Hoescht 33342. Outros corantes específicos de ácido nucleico são conhecidos na arte (p. ex., vide Haugland, R.P. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 6a. Ed., Capítulo 8). A segunda espécie é um fator de transcrição cuja migração do citoplasma para o núcleo é o assunto do ensaio. Esta proteína pode ser
25 rotulada por uma variedade de processos, incluindo expressão como uma fusão com GFP, e contatando-se a amostra com um anticorpo fluorescentemente rotulado, específico para a proteína de fator de transcrição.

A seguinte rotina de Análise de Dados de Translocação pode ser usada para determinar a quantidade de uma primeira espécie

fluorescentemente rotulada, que é distribuída em uma maneira correlacionada ou anti-correlacionada com respeito a uma segunda espécie fluorescentemente rotulada. Em uma versão, a análise é usada para ensaiar a atividade de um composto químico.

5 As etapas do algoritmo são como segue:

1. Adquire imagens das primeira e segunda espécies rotuladas, respectivamente.
2. Abre os arquivos fileira por fileira e
 - 10 i. Subtrai os respectivos valores de deslocamento de câmera de cada imagem,
 - ii. Multiplica cada fileira de cada imagem pelo inverso da correspondente fileira de seu respectivo arquivo de imagem de campo plano.
3. Opcionalmente, histograma a imagem da primeira espécie para
15 determinar o nível de fundo e soma a intensidade da imagem da segunda espécie.
4. Estabelece critérios de seleção incluindo um valor mínimo e, opcionalmente, um valor máximo. Estes valores são determinados, por exemplo, como um múltiplo fixo do nível médio de fundo,
20 como um número fixo de contagens acima do nível médio de fundo, por análise estatística da largura de pico de histograma de fundo ou utilizando-se um valor predeterminado.
5. Compara cada pixel da imagem da primeira espécie com os critérios de seleção. Todos os pixéis qualificados recebem um valor
25 de 1 e todos os outros recebem um valor de 0, desse modo realizando uma compressão de 16 para 1 bit.
6. “Limpa” a borda da imagem pelo ajuste em 0 de todos os pixéis contíguos estimados-1 da máscara binária tendo um membro de toque de borda.

7. Pesquisa o mapa de bits por objetos, definidos como grupos de pixéis contíguos de valor-1:

1. Pesquisando a imagem em um padrão de linha por linha, para encontrar um pixel de valor 1.

5 2. Determina todos os pixéis de valor 1 contíguos ao pixel identificado em i).

3. Opcionalmente, aplica um filtro de tamanho mínimo e máximo ao objeto, o tamanho tendo sido previamente determinado.

10 4. Se o objeto qualifica-se, prosseguir para a etapa 8, caso contrário mudar todos os pixéis estimados-1 do objeto para 0 e continuar a pesquisar pelo objeto seguinte.

5. Se o fim do mapa de bits for alcançado, prosseguir para a etapa 9.

Para cada objeto passando pelos critérios de filtro:

15 1. Criar um novo mapa de bits retangular com bordas estendidas que contêm o objeto mais n extra pixéis 0 em cada direção da borda do objeto. n é o número de etapas de dilatação a serem realizadas abaixo e foi previamente determinado.

20 2. Dilatar o objeto pela aplicação de uma etapa de dilatação n vezes em que os pixéis de valor 0 que tocam os pixéis estimados-1 são ajustados ao valor 1.

25 3. Comparar o mapa de bits dilatado com o mapa de bits de tamanho total original. Ajustar a 0 todos os pixéis do mapa de bits dilatado que são estimados-1 na correspondente região do mapa de bits original. Isto produz uma máscara anular e assegura somente que um objeto seja capturado quando as bordas do mapa de bits forem aumentadas durante a dilatação.

4. Criar outro mapa de bits do objeto original, erodí-lo m vezes pelo ajuste em 0 dos pixéis de valor-1 tocando os pixéis de

valor-0. m é tipicamente igual a n e determinado previamente.

5. Para cada coleção de pixéis estimados-1 dos mapas de bits anular e erodido, calcular a média dos correspondentes valores de pixel da imagem da segunda espécie, para calcular as intensidades médias dos pixéis sob as máscaras erodida e anular.
6. Calcular a relação de intensidades erodida para anular para cada objeto e salvar em uma tabela.
7. Mudar para 0 todos os pixéis do objeto da imagem de mapa de bits original e retornar para a etapa 7 para pesquisar por mais objetos.

Após todos os objetos terem sido contados, a relação de intensidade média de todos os objetos da imagem é calculada juntamente com informação estatística como o desvio padrão.

O novo aspecto desta rotina em relação àqueles descritos acima é a criação na Etapa 8 de duas máscaras irmãs, uma extensão anular da máscara primária e uma versão erodida da máscara primária. A última é usada para quantificar a co-localização da espécie-dois com a espécie-um, o fator de transcrição e o núcleo da célula (atualmente, DNA), respectivamente, no presente exemplo. A primeira máscara é usada para quantificar a espécie-dois não co-localizada. No presente exemplo, a relação destas duas quantidades é formada em uma base de célula-por-célula e os resultados tabulados.

De acordo com os processos da presente invenção, a aquisição e análise de dados podem ser realizadas em aproximadamente um segundo.

Para comparação, dois exemplos da arte anterior são citados. Em Ding e outros (J. Biol. Chem. 273, 28897-28905 (1998)), foi realizado um ensaio de translocação bicolor comparável. As vantagens da presente invenção incluem: 1) aquisição de imagem aproximadamente 50X mais rápida por canal de dados, 2) aquisição de imagem bicolor simultânea, 3) sensibilidade

superior de aproximadamente 10X, permitindo níveis de coloração mais baixos, 4) detecção confocal, permitindo eliminação de uma etapa de enxágüe, 5) foco-tempo de aproximadamente 0,1 s em comparação com aproximadamente 30 s, 6) tempo de análise de dados de aproximadamente 0,2 s/quadro, em comparação com 3-6 s/quadro, e 7) aquisição de imagem contínua. O segundo exemplo da arte anterior é Deptala e outros (Cytometry, 33, 376-382, (1998)). A presente invenção fornece 1) resolução espacial mais elevada, aproximadamente 4X, 2) taxas de aquisição de pixel de aproximadamente 16X mais elevada, 3) análise de dados mais rápida, 4) autofoco operável em placas de microtitulação e 5) tempo de análise de dados de aproximadamente 0,2 s/quadro, em comparação com 3-6 s/quadro.

ENDOCITOSE, EXOCITOSE E SEQÜESTRO DE RECEPTOR

A endocitose e exocitose, geralmente, e seqüestro e reciclagem de receptor, especificamente, são processos adicionais que podem ser ensaiados de acordo com as primeira e segunda versões e os protocolos de análise de imagem associados descritos acima. Rotulação de fluorescência pode ser realizada de acordo com uma variedade de processos conhecidos. Por exemplo, um experimento elegante, compreendendo a rotulação tanto do receptor como do ligando, é descrito por Tarasova e outros (J. Biol. Chem., 272, 14817-14824 (1997)). O presente sistema de formação de imagem é aproximadamente 50X mais rápido por canal de dados e adquire as duas imagens simultaneamente. Além disso, os presentes protocolos de análise, o algoritmo de Co-localização por exemplo, podem ser usados para processar seqüestro de dados de imagem em tempo real. Tais exemplos não são conhecidos na arte anterior.

Muitos outros ensaios requerendo capacidades similares de formação de imagem e análise são conhecidos na arte. Por exemplo, ensaios envolvendo fagocitose e eventos celulares relacionados (p. ex., J. Immunology (1983) 130, 1910; J. Leukocyte Biol. (1988) 43, 304); ensaios

adicionais envolvendo endocitose e exocitose tanto mediada por receptor e não mediada por receptor (p. ex., Neuron 14, 983 (1995); J. Physiol. 460, 287 (1993) e Science 255, 200 (1992), incluindo endocitose mediada por receptor de Complexos de Lipoproteína de Baixa-Densidade (vide J. Cell Biol. 121, 1257 (1993) e o suprimento de Transferina para as células de vertebrados (vide Cell 49, 423 (1994)); formação de imagem da endocitose e da mobilidade lateral do fator de crescimento epidérmico fluorescentemente rotulado (vide Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2135 (1975); J. Cell Biol. 109, 2105 (1989)); monitoramento da absorção e processamento interno de materiais exógenos pela endocitose dos dextranos fluorescentes (vide J. Biol. Chem. 269, 12918 (1994)) e a formação de imagem da reciclagem mediada pela endocitose de vesículas sinápticas em neurônios ativamente disparando pelo uso de corantes hidrofílicos (vide Nature 314, 357 (1985)). Além disso, a engenharia genética das linhagens de células expressando proteína fluorescente verde (GFP) fundida em proteínas que localizam-se nas vesículas exocitóticas e secretórias (tais como cromogranina B, uma proteína granular secretória (vide J. Cell Sci. 110, 1453 (1997) ou tPA, que é localizada aos cones de crescimento nas células neuronais diferenciadas (vide Mol. Biol. Cell 9: 2463 (1998)), permite o monitoramento da exocitose. Uma larga variedade de rótulos fluorescentes é disponível para tais ensaios (vide Haugland R.P. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 6a. Ed. Cap. 17).

CANAIS IÔNICOS

Uma terceira versão da presente invenção, cuja versão é representada na Fig. 9, pode ser usada para formar imagem da resposta dependente do tempo de uma ou mais espécies fluorescentemente rotuladas, em uma taxa de aproximadamente 30 quadros por segundo. Isto permite a captura de fenômeno provisório, tal como a abertura e fechamento dos canais iônicos. Canais iônicos exemplificativos incluem mas não são limitados a:

voltagem controlada a porta- K^+ , voltagem controlada a porta-Na, voltagem controlada a porta- Ca^{++} , Cl^- , Na^+/K^+ ATPase e P-glicoproteínas.

O seguinte algoritmo de Análise de Dados de Formação de Imagem Cinética define e rastreia células individuais de quadro para quadro, possibilitando simultânea análise cinética em um número suficiente de células, para obter dados estatisticamente significativos. As etapas do algoritmo são como segue:

1. Adquire uma (somente indicador), duas (marcador e indicador ou dois indicadores) ou mais imagens digitalizadas em função do tempo.
2. Abre arquivos fileira por fileira e
 - i. Subtrai os respectivos valores deslocados de câmera de cada imagem,
 - ii. Multiplica cada fileira de cada imagem pelo inverso da fileira correspondente de seu respectivo arquivo de imagem de campo-plano. Subtrai os respectivos valores deslocados de câmera de cada imagem.
3. Opcionalmente, histograma a imagem da primeira espécie para determinar o nível de fundo.
4. Estabelece critérios de seleção incluindo um valor mínimo e, opcionalmente, um valor máximo. Os valores são determinados, por exemplo, como um múltiplo fixo do nível de fundo médio, como um número fixo de contagens acima do nível de fundo médio, por análise estatística da largura de pico de histograma de fundo ou pela utilização de um valor predeterminado.
5. Compara cada pixel da imagem da primeira espécie com os critérios de seleção. Todos os pixéis qualificados recebem um valor de 1 e todos os outros recebem um valor de 0, desse modo realizando uma compressão de 16 para 1 bit.

6. “Limpa” a borda da imagem ajustando a 0 todos os pixéis contíguos estimados-1 da máscara binária tendo um membro de toque de borda.
7. Pesquisa o mapa de bits por objetos, definidos como grupos de
5 pixéis contíguos de valor-1:
 - i. Pesquisando a imagem em um padrão de linha por linha para encontrar um pixel de valor 1.
 - ii. Determinando todos os pixéis de valor-1 contíguos ao pixel identificado em i.
 - 10 iii. Opcionalmente, aplicando um filtro de tamanho mínimo e máximo ao objeto, o tamanho tendo sido previamente determinado.
 - iv. Se o objeto qualificar-se, prosseguir para a etapa 8, caso contrário, mudar para 0 todos os pixéis estimados-1 do objeto
15 e continuar pesquisando pelo próximo objeto.
 - v. Se o fim do mapa de bits for alcançado, prosseguir para a etapa 9.
8. Para cada objeto passando pelos critérios de filtro: calcular a média dos correspondentes pixéis de cada uma das imagens da série de
20 tempo. Se um único indicador for usado, registrar as intensidades. Se forem usados indicadores de medição de relação forem usados, dividir o valor de uma imagem pelo outro de cada imagem da série de tempo e registrar os resultados.
9. Após todos os objetos terem sido analisados, os resultados da
25 análise da etapa 8 são informados para cada objeto. Parâmetros cinéticos, incluindo o tempo de elevação, tempo de queda e amplitude, são informados para cada objeto como o é a informação estatística derivada do conjunto de análises cinéticas e do conjunto de todos os objetos em tempos fixos.

Dois exemplos do uso da presente invenção para formar imagem e analisar eventos transitórios associados com os canais de íon são fornecidos nas Figs. 19 e 20. Estes ensaios empregaram o corante Ca^{++} -sensível, Fluo-3 para indicar as mudanças da concentração Ca^{++} intracelular.

- 5 No primeiro dos experimentos, a mudança foi causada por um segundo sinal Ca^{++} iniciado pela ativação dos receptores da acetilcolina e, no segundo experimento, a mudança foi devida à ativação dos canais de voltagem controlada em porta Ca^{++} .

Os canais de íon têm sido uma área de intensa atividade de
10 pesquisa nos últimos anos. As vantagens da presente invenção sobre a arte anterior serão tornadas claras pelas seguintes comparações.

Nas aplicações de triagem de composto, um padrão da arte anterior, citado na Seção de Fundamentos, é descrito na Patente US 5.355.215. Este dispositivo, usado principalmente para detectar mudanças
15 induzidas em Ca^{2+} intracelular, inclui um ministrador para iniciar eventos transitórios. As vantagens principais da presente invenção em relação a esta arte anterior são as seguintes: 1) formação de imagem e análise permitindo a determinação de respostas celulares individuais, em comparação com uma resposta com média calculada sobre a cavidade, 2) sensibilidade aumentada,
20 requerendo mais baixa carga de reagente e mais baixa intensidade de iluminação e possibilitando menores volumes de amostra e 3) a aquisição de imagens em taxas de vídeo em comparação com uma taxa máxima de 1 ponto por segundo.

Em aplicações de pesquisa, o sistema de Tsien e colaboradores
25 descritos no Handbook of Biological Confocal Microscopy, J.B. Pawley, ed. Plenum Press, New York, 1995, págs. 459-478, serve como um padrão. Ele tem uma capacidade demonstrada para formar imagem em taxas além as da presente invenção. Isto não pode ser realizado, entretanto, nas amostras presentemente de interesse. A arte anterior requer 10^2 - 10^3 mais fluoróforos

por pixel para obter taxas comparáveis à presente invenção em uma comparável relação sinal-ruído. Além disso, a presente invenção pode adquirir imagens em resolução de 12 ou 16-bits, dando-lhe uma faixa dinâmica maior de 4-16X.

5 Um segundo exemplo de um sistema de pesquisa é descrito em Sun e outros, J. Physiology, 509, 67-80, 1998. De acordo com Sun, os dados são gerados em taxas de até 650 Hz por linha de 600 pixéis com tempo de integração por pixel de 5 microssegundos, empregando-se microscópio confocal de varredura por pontos convencional. Somente uma “formação de
10 imagem” unidimensional é realizada. Transientes podem ser monitorados para objetos situando-se ao longo da linha varrida. Além disso, esta taxa poderia somente ser obtida com um tempo de integração de pixel de 1 μ s, requerendo uma concentração maior de 10^2 - 10^3 de fluórofos para obter-se qualidade de imagem comparável à da presente invenção.

15 As capacidades da presente invenção para formar imagem e analisar mudanças em concentrações iônicas intracelulares, em resposta a estímulos externos, tem múltiplas aplicações na triagem de composto e em aplicações de pesquisas biológicas gerais (vide, p.ex., J. Cell Biol. 137(3), 633-648 (1977); J.Biol. Chem. 271(9), 4999-5006 (1996); Science 280, 69-76
20 (1998); Biochem, J., 324, 645-651 (1997)). Uma larga variedade de indicadores fluorescentes é disponível sensível a íons específicos (vide Haugland R.P. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 6a. Ed., Caps. 18, 22 e 24). Estes indicadores permitem a medição de concentrações de Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , Fe^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} ,
25 Al^{3+} , Ga^{2+} , Eu^{3+} , Tb^{3+} , Sm^{3+} , e Dy^{3+} . Além disso, ensaios para Na^+ e K^+ podem ser realizados mesmo na presença de concentrações fisiológicas de outros cátions monovalentes (vide J.Biol. Chem. 264, 19449 (1989)), incluindo ensaios de níveis de Na^+ ou efluxo de Na^+ em uma variedade de células, tais como células de sangue, cérebro e músculo (vide J.Biol. Chem.

268, 18640 (1993); J. Neurosci. 14, 2464 (1994); Am J. Physiol. 267, H568 (1994)), e mudanças de K^+ de células de esperma, sinaptossomas de terminais nervosos e linfócitos. Além disso, a presente invenção pode ser usada para ensaiar concentrações de Cl^- em vesículas, lipossomas e células vivas (vide Am. J. Physiol. 259, c375 (1990).

Além disso, a presente invenção pode ser usada para ensaiar mudanças em potencial de membrana de células e organelas subcelulares. A capacidade de rapidamente formar imagem das mudanças do potencial de membrana é vital para os ensaios para viabilidade de células e organelas, geração de impulso de nervo, contração muscular, sinalização celular e acesso de canal iônico (vide Biophys. J. 67, 208 (1994), Neuron 13, 1187 (1994); J. Membrane Biol. 130, 1 (1992)). Estão disponíveis indicadores fluorescentes que respondem a rápidas mudanças de potencial em células excitáveis, tais como neurônios, células cardíacas e células cerebrais intactas (vide Haugland R.P. Handbook of Fluorescent probes and Research Chemicals, 6a. Ed., Cap. 25). As sondas fluorescentes que respondem a rápidas mudanças do potencial transmembrana tipicamente mostram somente uma mudança de 2-10% de fluorescência por 100 mv. A membrana de plasma de uma célula tem um potencial transmembrana de aproximadamente -70 mv e algumas organelas, tais como mitocôndria, mantêm potenciais transmembrana de -150 mV. Assim, ensaios envolvendo tais rápidas mudanças requerem a elevada sensibilidade e rápida capacidade de aquisição de dados comuns às várias versões da presente invenção.

MEDIÇÕES BASEADAS EM FRET

A presente invenção pode ser vantajosamente usada para realizar ensaios que envolvem transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET). FRET ocorre quando um fluoróforo, o doador, absorve um fóton e transfere a energia absorvida não radiativamente para outro fluoróforo, o receptor. O receptor então emite a energia em seu

comprimento de onda característico. As moléculas doadoras e receptoras devem estar em estreita proximidade, menos do que aproximadamente 10 nm, para que ocorra eficiente transferência de energia (vide Methods Enzymol. 211, 353-388 (1992); Methods Enzymol. 246, 300-334 (1995)). O requisito de proximidade pode ser usado para construir ensaios sensíveis a pequenas separações entre o par doador-receptor. FRET tipicamente requer um único comprimento de onda de excitação e dois comprimentos de onda de emissão e uma análise consistindo da relação das intensidades de emissão de doador e receptor. Os pares de doador-receptor FRET podem ser construídos tanto para ensaios baseados em contagens como ensaios baseados em células. Diversos mutantes de proteína fluorescente verde (GFP) exibindo fluorescência aumentada e comprimentos de onda de emissão alterados podem ser emparelhados para ensaios baseados em célula FRET, fundindo-se o doador de FRET GFP em uma proteína e o receptor FRET GFP para a mesma proteína ou para outra proteína expressa dentro da mesma célula. Tal emparelhamento FRET pode ser usado para medir as mudanças intramoleculares, tais como ligação Ca^{2+} -calmodulina de Ca^{2+} ou interações intermoleculares, tais como dimerização de receptor. O algoritmo de Formação de Imagem Cinética descrito acima pode ser preferencialmente usado.

TRANSFECCÃO TRANSIENTE

Entre as vantagens significativas de uma medição baseada em imagem é a oportunidade tanto de observar eventos raros, perdidos dentro da média, como de normalizar a resposta primária em uma base de objeto-por-objeto a uma resposta secundária. Ambos aspectos podem ser importantes em ensaios utilizando uma linhagem de célula tendo um alvo transientemente transfectado. A expressão genética e subsequente produção de proteína em seguida à transfecção é com frequência ineficiente e transiente (vide Bio Techniques 24:478-482 (1998)). Processos para monitorar a eficiência de

transfecção que pode ser vantajosamente usada com a presente invenção são conhecidos na arte. Por exemplo, o gene de interesse pode ser transfectado junto com o gene para proteína fluorescente verde (GFP), de modo que as duas proteínas serão expressas como uma fusão ou como entidades separadas.

- 5 A presente invenção pode ser usada para medir a quantidade de indicador presente em um comprimento de onda e a resposta associada com o alvo em outra. O primeiro sinal pode ser usado para normalizar a resposta do último para a extensão de alvo presente. Isto permite que a presente invenção realize ensaios em alvos demasiado instáveis para serem usados em triagem
- 10 atualmente disponível e para monitorar as eficiências de transfecção de somente alguns por cento. O algoritmo de Formação de Imagem Cinética descrito acima pode ser usado para analisar tais dados, em que somente um quadro de imagem é requerido. Infecção viral de células pode ser monitorada diretamente através da expressão das proteínas virais, ou indiretamente por
- 15 aquisição de um novo fenótipo, mesmo se somente alguns por cento de células forem infectados. Finalmente, esta invenção fornece um processo para detectar um raro evento, tal como a aquisição de um novo fenótipo por uma célula individual ou grupo de células, devida à transfecção de um cDNA específico, como resultado da transfecção da inteira população celular com
- 20 uma coleção de diversos cDNAs.

ENSAIOS ENZIMÁTICOS

- A presente invenção pode também ser usada para conduzir ensaios gerais de atividade de enzima. Enzimas intracelulares exemplificativas incluem mas não são limitadas a: anidrase carbônica,
- 25 proteínas de ligação guanina nucleotídeo (proteínas G), adenil ciclase, calmodulina, cinases PI, PIP e PIP₂, cinase cAMP e hidrolase cAMP, citocromo P-450, cinases de proteína treonina/serina, cinase de proteína tirosina, fosfatases de proteína, β -lactamase, β -galactosidase, reductase diidrofolato, fosfodiesterases, caspases, proteases de proteossomo, sintase de

óxido nítrico, cinase de timidina, deaminase de nucleosídeo, glutathione-S-transferase, lipoxigenases e fosfolipases.

As Figs. 17(a) - 17(d) representam as etapas de uma primeira versão de um ensaio de enzima de acordo com a invenção. Na Fig. 17(a), as
5 contas 310 com uma quantidade conhecida de peptídeos rotulados fluorescentes 312 fixados nelas são adicionadas a uma cavidade 320 contendo um líquido 330. As contas 310 têm uma densidade de modo que elas afundam para o fundo da cavidade. Na Fig. 17(b), um composto de teste 314 é adicionado à cavidade. Na Fig. 17(c), as enzimas 316 são adicionadas à
10 cavidade. A ordem das etapas representadas nas Figs. 17(a), 17(b) e 17(c) é intercambiável, exceto que nunca deve a cavidade conter os peptídeos e enzimas sem o composto de teste. Se não inibidas, as enzimas 316 clivarão os peptídeos 312 e os rótulos fluorescentes, que se difundirão dentro do líquido. Se, por outro lado, o composto de teste 314 inibir as enzimas 316,
15 tipicamente pelo bloqueio dos sítios ativos de enzima, as enzimas 316 não clivarão os rótulos fluorescentes. Na Fig. 17(d), os rótulos fluorescentes ainda ligados às contas têm sua imagem formada usando-se, por exemplo, um microscópio confocal de varredura de linha, esquematicamente representado como elemento 340. Desta imagem, a atividade do composto de teste 314
20 pode ser determinada.

Em uma versão alternativa do ensaio representado nas Figs. 17(a) - 17(d), a atividade do composto de teste pode ser determinada comparando-se a imagem obtida na Fig. 17(d) com a imagem obtida formando-se imagem da fluorescência dos rótulos fluorescentes das Figs.
25 17(a) ou 17(b) ou a imagem de uma cavidade de controle.

As figuras 18(a) - 18(d) representam as etapas de uma segunda versão de um ensaio de enzima de acordo com a invenção. Na fig. 18(a), uma quantidade conhecida de peptídeos rotulados fluorescentes 352 é fixada ao fundo 362 de uma cavidade 360. Na fig. 18(b), um composto de teste 354 é

adicionado à cavidade. Na Fig. 18(c), as enzimas 356 são adicionadas à cavidade. Na Fig. 18(d), os rótulos fluorescentes ainda fixados ao fundo da cavidade têm sua imagem formada usando-se, por exemplo, um microscópio confocal de varredura de linha, esquematicamente representado como elemento 380, para determinar a atividade do composto de teste 354.

Em uma versão alternativa do ensaio representado nas Figs. 18(a) - 18(d), a atividade do composto de teste pode ser determinada comparando-se a imagem obtida na Fig. 18(d) à imagem obtida formando-se imagem da fluorescência dos rótulos fluorescentes das Figs. 18(a) ou 18(b) ou a imagem de uma cavidade de controle.

Outro exemplo de um ensaio que pode ser realizado de acordo com a invenção é um ensaio de tirosina cinase. As tirosina cinases fosforilam os resíduos da tirosina de peptídeos do substrato. O peptídeo de substrato tem tanto um resíduo de tirosina como uma etiqueta fluorescente. Neste ensaio, um anticorpo que em uma extremidade é seletivo para tirosina fosforilada é ligado na outra extremidade a uma superfície tal como uma conta ou o fundo de uma cavidade. A tirosina cinase e um peptídeo etiquetado fluorescente com um resíduo de tirosina são adicionados à cavidade. Se a tirosina cinase fosforilar o peptídeo, a tirosina fosforilada ligar-se-á ao anticorpo, desse modo localizando a etiqueta fluorescente na superfície em que o anticorpo está ligado. Se a tirosina cinase não fosforilar o peptídeo, as etiquetas fluorescentes dos peptídeos serão dispersas por toda a cavidade. A extensão da fosforilação do peptídeo pode ser determinada medindo-se a fluorescência adjacente à superfície. Tal ensaio pode também ser conduzido onde um anticorpo for usado que seja específico para o produto fluorescente produzido pela ação da enzima sobre o substrato fluorescente.

Além disso, os ensaios de enzima de células vivas podem ser realizados de acordo com a invenção. Diversas técnicas para investigar a atividade enzimática em células vivas são conhecidas na arte (Vide Biochem.,

Histochem 70, 243 (1995), J. Fluorescence 3, 119 (1993)) como o são os substratos que produzem produtos fluorescentes quando atuados pelas enzimas (vide Haugland R.P. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemical 6a. ed. Cap. 10). Em geral, estes ensaios utilizam sondas que passivamente penetram na célula e são subseqüentemente processadas pelas enzimas intracelulares para gerar produtos retidos dentro da célula. Outros substratos produzem produtos fluorescentes insolúveis, que se precipitam no sítio da atividade enzimática. A presente invenção pode ensaiar o grau de atividade enzimática e determinar a precisa localização espacial da atividade enzimática empregando tais sondas. As sondas são disponíveis para ensaiar uma larga variedade de enzimas utilizando a presente invenção, incluindo mas não limitado a fosfatases, ATPases, 5'-nucleotidase, DNA e RNA polimerases, peptidases, proteases, esterases e peroxidase.

Os ensaios da atividade enzimática podem ser realizados de acordo com a primeira ou segunda versões experimentais e os protocolos de análise de imagem associados descritos acima.

MORFOLOGIA

Os processos da presente invenção podem também ser usados para realizar ensaios que requerem uma determinação da morfologia celular ou subcelular, incluindo mas não limitado a axônios e organelas. Para realizar tais ensaios, uma sonda fluorescente é introduzida dentro da estrutura de interesse, tal como uma célula ou organela, por micro-injeção direta ou contatando-se as células com reagentes permeantes de célula, que são metabolizados ou de outro modo alterados a fim de serem retidos na estrutura de interesse. Se for para ser usado com células vivas, o rótulo fluorescente deve ser não-tóxico e biologicamente inerte. Muitos corantes apropriados são disponíveis comercialmente (vide Haugland R.P. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals 6a. Ed., Cap. 15) para uso em ensaios, por exemplo, envolvendo fluxo em capilares, conectividade de célula neuronal,

translocação do corante através das junções de intervalo, divisão de célula e lise celular e fusão de lipossoma. Além disso, estes traçadores podem ser usados para rastrear o movimento das células rotuladas da cultura, tecidos ou organismos intactos. Muitas técnicas empregando traçadores fluorescentes para ensaiar a morfologia ou movimento de célula ou sub-celular são conhecidas na arte e podem envolver o uso de traçadores de membrana, conjugadores de dextrano biotinilados, microesferas fluorescentes ou proteínas e conjugados de proteína (vide Meth. Cell Biol. 29, 153 (1989); Cytometry 21, 230 (1995); Cell 84, 381 (1996); Biochem. Biophys. Acta 988, 319 (1989); Cytometry 14, 747 (1993). As várias versões da presente invenção têm significativas vantagens quando usadas nestes tipos de ensaios. A presente invenção permite rápida formação de imagem de múltiplos parâmetros com resolução espacial muito fina.

ÁCIDOS NUCLEICOS

A presente invenção pode também ser usada para conduzir ensaios de ácidos nucleicos. Um ensaio de DNA específico que se beneficiaria da resolução espacial e da capacidade de formação de imagem de multi-comprimentos de onda da presente invenção é hibridização de fluorescência-in-situ (FISH). A FISH é uma importante técnica para localizar e determinar a abundância relativa das seqüências de ácido nucleico específicas das células, tecido, núcleos de interfase e cromossomos de metafase e é usada em diagnósticos clínicos e mapeamento genético (vide Histo-chem J. 27, 4 (1995); Science 247, 64 (1990); Trends Genet. 9, 71 (1993) e Science 250, 559 (1990)). Uma variedade de sondas de hibridização fluorescente são disponíveis para técnicas de hibridização de DNA e RNA fluorescente multicores (vide Haugland R.P. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 6a. Ed. Cap. 8.4). Uma técnica adicional determina bandagem de cromossomo pelo uso de corantes-DNA seletivos AT ou GC com uma coloração de contador de ácido nucleico. Esta técnica é largamente

usada para análise carotipo e estudos de estrutura de cromossoma (vide Human Genet. 57.1 (1981)).

ESPÉCIES DE OXIGÊNIO REATIVO

A presente invenção pode também ser usada para ensaiar
 5 níveis de várias espécies de oxigênio reativo, tais como oxigênio singlete, superóxidos e óxido nítrico. A importância destas espécies de oxigênio reativo foi somente recentemente entendida (vide Biochem Pharmacol 47.373 (1994), J. Cell Biol., 126, 901 (1994)). Sabe-se agora que o oxigênio singlete é responsável por muito do dano fisiológico causado pelas espécies de
 10 oxigênio reativo (Vide J. Photochem. Photobiol. 11,241(1991)). O óxido nítrico (NO), em particular, é agora conhecido representar um papel crítico como um mediador molecular em uma variedade de processos fisiológicos incluindo neurotransmissão e regulação da pressão sangüínea (vide Current Biology 2, 437 (1995), J.Med. Chem. 38, 4343 (1995), Cell 78, 919 (1994)).
 15 São conhecidas técnicas na arte para realizar ensaios para medir NO indiretamente. Por exemplo, sob condições fisiológicas, NO é oxidado em nitrito e este pode ser detectado monitorando-se a absorvência a 548 nm ou pelo uso de uma sonda que reaja com nitrito para formar um produto fluorescente identificável (vide Haugland R.P., Handbook of Fluorescent
 20 Probes and Research Chemicals 6a. Ed. Cap. 21).

pH

A presente invenção pode também ser usada para realizar ensaios envolvendo medições de mudanças de pH dentro de células ou em meios livres de célula. A importância do papel do pH intracelular foi
 25 reconhecida em muitos processos fisiológicos e patológicos incluindo proliferação celular, apoptose, fertilização, malignidade, resistência a multi-drogas, transporte de íon, distúrbios de armazenagem lisossomais e doença de Alzheimer (vide Cell Physiol. Biochem.2, 159 (1992); J. Biol. Chem. 270, 6235 (1995); Biophys. J. 68, 739 (1995); J. Biol. Chem. 270, 19599 (1995);

Cancer Res. 54, 5670 (1994)). Sondas fluorescentes úteis para ensaios de pH na faixa fisiológica são comercialmente disponíveis (vide Haugland R.P., Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals 6a. Ed. Cap. 23).

EXEMPLOS

- 5 A invenção descrita e reivindicada aqui pode ser mais apreciada por uma pessoa hábil na arte através de referência aos exemplos que seguem. Estes exemplos são fornecidos simplesmente para ilustrar diversos aspectos da invenção e não serão interpretados para limitara invenção de forma alguma.
- 10 Translocação do Fator de Transcrição
- Células foram cultivadas em placas com 96 cavidades, fixadas, incubadas com anticorpo rotulado-Texas-Red na proteína de fator de transcrição, enxaguadas e em seguida coloridas com 5 μ M Hoechst 33342 em tampão.
- 15 As imagens foram vistas a 0,5x0,5 mm² com pixelação de 1,08 x 1,08 μ m². A emissão Texas Red foi excitada a 568 nm e detectada com um filtro de passagem longo de 600-nm. A emissão Hoechst foi excitada a 364 nm e detectada com um filtro de passagem de faixade420-480 nm. O tempo de aquisição de imagem foi de 0,9 seg. Houve ~150 células por imagem.
- 20 Uma imagem de um campo de células que não foram ativadas antes da fixação foi feita. A intensidade de Texas Red no núcleo é baixa em comparação com o citoplasma. Um compósito das imagens das células coloridas com anticorpo rotulado Texas-Red e Hoechst 33342 foi gerado.
- Uma imagem de um campo de células que foram ativadas
- 25 antes da fixação foi feita. Devido ao escalonamento de cores, o citoplasma é difícil de ver sem saturar o núcleo. Um compósito das imagens das células coloridas com anticorpo rotulado Texas Red e Hoechst 33342 foi gerado.
- A análise de dados foi realizada de acordo com o seguinte processo. Uma representação binária da imagem Hoechst foi gerada

aplicando-se um apropriado limiar, aqueles valores maiores do que o limiar foram ajustados em um, aqueles menores do que o limiar foram ajustados em zero. Isto serviu como a máscara primária. Duas máscaras irmãs foram então geradas, uma erodindo-se a máscara primária, a outra dilatando-se a máscara primária e subtraindo-se a máscara original para formar uma máscara anular. A imagem de emissão Texas-Red foi multiplicada pela máscara binária erodida e os pixéis somados como uma medida da quantidade de fator de transcrição rotulado no núcleo. Similarmente, a imagem de emissão Texas-Red foi multiplicada pela máscara binária anular e os pixéis somados como uma medida da quantidade de fator de transcrição rotulado no citoplasma. O grau de ativação é avaliado usando-se a relação de intensidade nuclear para citoplásmica.

Formação de Imagem Ca Transiente de Receptor Muscarínico e Estimulação de Canal Porteadopor-Voltagem

As células das Figs. 19 e 20 foram de uma linhagem de neuroblastoma. Elas foram cultivadas e tiveram a imagem formada em meio padrão. Estas células expressam um receptor de acetilcolina muscarínico que pode ser estimulado com Carbacol, gerando uma grande liberação Ca intracelular como um segundo sinal. Além disso, as células expressam um canal Ca “L” porteadopor-voltagem, que pode ser estimulado despolarizando-se a membrana celular com uma grande mudança da concentração de K^+ externo e que pode ser inibida com Verapamil.

Em geral, as seqüências das imagens foram iniciadas rapidamente adicionando-se 100 μ L de reagente em meios de crescimento em células em 100 μ L de meios de crescimento em uma placa com 96-cavidades. A turbulência causada pelo volume adicionado gera uma pequena distorção no formato de célula. Esta distorção é visível como uma alteração transiente da fluorescência Ca atribuída a cada célula no primeiro quadro de imagem após a adição.

Na fig. 19 um filme com um 1,2 segundos entre quadros é exibido. A seqüência da imagem foi iniciada pela rápida adição de 100 μM de Carbacol. A imagem final é uma máscara binária, usada para identificar e enumerar objetos fluorescentes na imagem, gerada do quadro de pré-injeção.

5 Mesmo embora a imagem de pré-injeção apareça obscura, ela é muito brilhante. A máscara é aplicada a cada imagem da série e, para cada objeto, a intensidade integrada, normalizada para a imagem de pré-injeção, é plotada vs. tempo, como exibido na Fig. 25a. A máscara não foi processada para as células sobrepondo-se. Por exemplo, o objeto 1 é provavelmente mais do que
10 uma célula, porém não apresentou resposta. O objeto 7 pode ser 2 células sobrepondo-se, com uma mostrando uma resposta retardada.

As Figs. 20a-h são quadros selecionados de um filme mostrando a resposta das células de neuroblastoma em um evento de despolarização iniciado pela adição de KCl 50 mM que abre os canais “L”
15 porteados por voltagem. O procedimento de análise foi como é descrito acima com relação à Fig. 25a. Os resultados são exibidos na Fig. 25b. Note-se a sensibilidade aumentada, obtida usando-se a “média celular” em vez de a “média de imagem”.

Ligação de Receptor Acoplado a Proteína-G de Célula-Viva

20 As imagens exibidas nas Figs. 21a-c a 22a-c foram obtidas em células vivas de placas de 96-cavidades. As células tinham sido transfectadas com um receptor acoplado a proteína-G, cujo ligando de peptídeo natural é conhecido. Antes da formação da imagem, as células foram incubadas com o ligando não-rotulado nativo em meios de crescimento normal, contendo 10%
25 de soro, por 20 minutos a 37°C, seguido por 20 minutos com ligando rotulado com fluoresceína 20 nM e LDS 751 100nM, também a 37°C. As amostras não foram enxaguadas.

Estas imagens são (0,5 x 0,5) mm^2 e são com pixelação de (1,08 x 1,08) μm^2 . A emissão de fluoresceína foi excitada a 488 nm e

detectada com um filtro de passagem de faixa de 45-nm, centrado a 535 nm. A emissão LDS 751 também excitou-se a 488 nm e foi detectada com um filtro de passagem de faixa de 40 nm, centrado a 690 nm. O tempo de aquisição de imagem foi de 0,9 seg. Estas células têm ~100.000 receptores/célula ou cerca de 25 receptores/ μm^2 de superfície de membrana.

A Fig. 21a é uma imagem das células após incubação com o ligando rotulado. Nenhuma etapa de lavagem foi realizada antes da formação de imagem. A variação substancial da atividade de recepção é evidente. Algumas células ligam-se a tão pouco ligando que elas aparecem como depressões no fundo. Uma análise célula-por-célula da atividade de ligação é facilitada produzindo-se uma máscara de uma imagem de emissão LDS 751, uma coloração de ácido nucleico não específica, mostrada na Fig. 21b. A coloração não é inteiramente uniforme, porém a vasta maioria do volume de célula é revelada. A sobreposição da Fig. 21c da máscara binária gerada limitando-se os dados da Fig. 21b com a imagem de ligação de receptor produz um mapa pseudo-colorido da atividade do receptor. Elevada atividade é representada como amarelo, enquanto baixa atividade é mostrada como vermelho-alaranjado.

Na fig. 22 três imagens são exibidas correspondendo a pontos da curva de titulação do ligando rotulado 20-nm com o ligando não-rotulado. A curva é exibida na Fig. 22a. A $K_i = 3 \pm 1 \times 10^{10}$ M para o ligando não-rotulado é calculado.

As imagens ilustrando ligação de receptor em uma diferente linhagem de célula de mamífero são mostradas na Fig. 23a-d. A Fig. 23a é uma imagem das células incubadas com um ligando rotulado Cy3 256 nM. Uma faixa de atividade de ligação é visível. A Fig. 23b mostra uma sobreposição dos dados Cy3 com uma imagem simultaneamente adquirida dos núcleos coloridos com Hoechst 33342 1 μm . A última serve como um identificador confiável das células individuais. Na Fig. 23c, a imagem é das

células incubadas com ligando rotulado Cy3 256 nM, na presença de ligando não-rotulado 10 μ M e na Fig. 23d estes dados são exibidos com as imagens dos núcleos coloridos Hoechst 33342 1 μ m sobrepostas. O efeito do fluido deslocado pelas células não-rotuladas é evidente na fig. 23c. A elevada correlação entre as Figs. 23c e d exemplifica a eficácia de identificação das células por seu volume excluído.

Ligação Simulada de Receptor Baseada em Contas

Nas Figs. 24a-d são apresentadas imagens das contas de sílica rotuladas Cy5. O experimento é uma simulação de um ensaio de ligação de receptor, em que os ligandos fluorescentemente rotulados ligam-se aos receptores ligados a membrana, suportados em microesferas.

As microesferas de sílica, 4 μ m de diâmetro, foram revestidas com polietilenimina e biotiniladas com um éster-NHS de biotina. A atividade das contas foi ensaiada com um fluorímetro quantificando-se a quantidade de estreptavidina rotulada-Cy5 removida da solução pela adsorção sobre uma quantidade conhecida de contas. Cada conta foi constatada conter $1,3 \times 10^6$ moléculas de estreptavidina. As contas foram carregadas com uma quantidade conhecida de moléculas Cy5 pela pré-mistura de uma apropriada relação de estreptavidina rotulada-Cy5 e não rotulada e incubando-se com as contas. Cada conta tinha uma média de 17, 170 ou 1700 rótulos, respectivamente. As amostras foram colocadas em placas com 96-cavidades Costar para formação de imagem. Cy5 foi excitada com luz laser de 647 nm e a fluorescência emitida foi detectada através de um filtro de passagem de faixa de 40-nm centrado a 690 nm. As imagens varridas foram adquiridas em pixelação de 1 μ m em aproximadamente 0,7 segundos.

As contas carregadas com 170 e 1700 moléculas foram prontamente detectáveis e as contas fluor-17 são discerníveis em imagens constituindo a Fig. 24. As contas carregadas com somente estreptavidina não-rotulada não produziram apreciáveis intensidades.

REIVINDICAÇÕES

1. Sistema de formação de imagem confocal, a partir de um objeto localizado sobre uma superfície descontínua de um substrato que tem uma superfície contínua estendendo-se na mesma direção da superfície descontínua, compreendendo um sistema de foco que compreende:

a) um primeiro feixe de focalização de radiação eletromagnética tendo um primeiro comprimento de onda, o primeiro feixe sendo direcionado através da lente objetiva para a superfície descontínua e refletido pela superfície descontínua retornando através da lente objetiva;

b) um segundo feixe de focalização de radiação eletromagnética tendo um segundo comprimento de onda, o segundo feixe sendo direcionado através da lente objetiva para a superfície contínua e refletido pela superfície contínua retornando através da lente objetiva;

c) um meio para separar a radiação do primeiro comprimento de onda da radiação do segundo comprimento de onda que é refletido retornando através da lente objetiva;

d) um primeiro detector para detectar o primeiro feixe de focalização refletido pela superfície descontínua retornando através da lente objetiva;

e) um segundo detector para detectar o segundo feixe de focalização refletido pela superfície contínua retornando através da lente objetiva; e

f) um meio móvel para mover a lente objetiva em relação ao substrato ou o substrato em relação à lente objetiva,

caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente:

g) um controlador conectado aos primeiro e segundo conectores e ao meio móvel, em que o controlador opera o meio móvel em resposta ao sinal do primeiro detector ou o segundo detector de acordo com a posição do primeiro feixe de focalização ou o segundo feixe de focalização

no substrato.

2. Sistema de formação de imagem confocal, a partir de um objeto localizado na superfície descontínua de um substrato compreendendo uma superfície contínua estendendo-se na mesma direção da superfície descontínua, o sistema compreendendo um sistema de focalização que compreende:

a) um feixe de focalização de radiação eletromagnética direcionado através da lente objetiva para superfície descontínua e refletido pela superfície descontínua retornando através da lente objetiva;

b) um detector de foco para detectar feixe de focalização refletido por uma superfície descontínua retornando através da lente objetiva; e

c) um meio móvel para mover a lente objetiva em relação ao substrato ou substrato em relação à lente objetiva,

caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente

d) um controlador conectado ao detector de foco e ao meio móvel, em que o controlador ajusta o meio móvel em resposta ao sinal do detector de foco de acordo com a posição do feixe de focalização no substrato.

3. Sistema, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato dos primeiro e segundo comprimentos de onda serem iguais.

4. Sistema, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato do substrato ser uma placa de microtitulação e a superfície descontínua estar na base de uma cavidade na placa de microtitulação.

5. Sistema, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que dois ou mais comprimentos de onda de radiação eletromagnética são emitidos a partir do objeto, o sistema de foco compreendendo adicionalmente:

a) um primeiro feixe de focalização de radiação

eletromagnética tendo um primeiro comprimento de onda, o primeiro feixe sendo direcionado através da lente objetiva para a superfície descontínua e refletido pela superfície descontínua retornando através da lente objetiva;

5 b) um segundo feixe de focalização de radiação eletromagnética tendo um segundo comprimento de onda, o segundo feixe sendo direcionado através da lente objetiva para a superfície contínua e refletido pela superfície contínua retornando através da lente objetiva;

10 c) um meio para separar a radiação do primeiro comprimento de onda da radiação do segundo comprimento de onda que é refletido retornando através da lente objetiva;

d) um primeiro detector para detectar o primeiro feixe de focalização refletido pela superfície descontínua retornando através da lente objetiva;

15 e) um segundo detector para detectar o segundo feixe de focalização refletido pela superfície contínua retornando através da lente objetiva;

f) um meio móvel para mover a lente objetiva em relação ao substrato ou o substrato em relação à lente objetiva; e

20 g) um controlador conectado aos primeiro e segundo conectores e ao meio móvel, em que o controlador opera o meio móvel em resposta ao sinal do primeiro detector ou o segundo detector de acordo com a posição do primeiro feixe de focalização ou o segundo feixe de focalização no substrato.

25 6. Sistema, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que dois ou mais comprimentos de onda de radiação eletromagnética são emitidos a partir do objeto, o sistema de focalização compreendendo adicionalmente:

a) um feixe de focalização de radiação eletromagnética direcionado através da lente objetiva para superfície descontínua e refletida

pela superfície descontínua retornando através da lente objetiva;

b) um detector de foco para detectar feixe de focalização refletido por uma superfície descontínua retornando através da lente objetiva;

c) um meio móvel para mover a lente objetiva em relação ao substrato ou substrato em relação à lente objetiva; e

d) um controlador conectado ao detector de foco e o meio móvel, em que o controlador ajusta o meio móvel em resposta ao sinal do detector de foco de acordo com a posição do feixe de focalização no substrato.

10 7. Sistema de focalização para uso com um substrato, caracterizado pelo fato de compreender uma superfície descontínua e uma superfície contínua estendendo-se na mesma direção da superfície descontínua, o sistema compreendendo:

a) uma lente objetiva através da qual é direcionado um primeiro feixe de radiação eletromagnética que é para ser focalizada sobre a superfície descontínua ou sobre um objeto localizado na superfície descontínua;

b) um segundo feixe de radiação eletromagnética tendo um primeiro comprimento de onda, o segundo feixe sendo direcionado através da lente objetiva para um foco na superfície descontínua e refletido pela superfície descontínua retornando através da lente objetiva;

c) um terceiro feixe de radiação eletromagnética tendo um segundo comprimento de onda, que pode ser o mesmo que ou diferente do primeiro comprimento de onda, o terceiro feixe sendo direcionado através da lente objetiva para um foco na superfície contínua e refletido pela superfície contínua retornando através da lente objetiva;

d) um meio para separar a radiação do primeiro comprimento de onda da radiação do segundo comprimento de onda que é refletido retornando através da lente objetiva;

e) um primeiro detector para detectar o segundo feixe refletido pela superfície descontínua retornando através da lente objetiva;

f) um segundo detector para detectar o terceiro feixe refletido pela superfície contínua retornando através da lente objetiva;

5 g) um meio móvel para mover a lente objetiva em relação ao substrato ou o substrato em relação à lente objetiva, assim como para controlar o foco dos feixes refletidos retornando através da lente objetiva; e

h) um controlador conectado aos primeiro e segundo conectores e o meio móvel, em que o controlador opera o meio móvel em
10 resposta ao sinal do primeiro detector ou o segundo detector de acordo com a posição do primeiro feixe de focalização ou o segundo feixe de focalização no substrato.

8. Sistema de focalização para uso com um substrato, caracterizado pelo fato de compreender uma superfície descontínua e uma
15 superfície contínua estendendo-se na mesma direção da superfície descontínua, o sistema compreendendo:

a) uma lente objetiva através da qual é direcionado um primeiro feixe de radiação eletromagnética que é para ser focalizada sobre a superfície descontínua ou sobre um objeto localizado na superfície
20 descontínua;

b) um feixe de focalização de radiação eletromagnética direcionado através da lente objetiva para a superfície descontínua e refletida pela superfície descontínua retornando através da lente objetiva;

c) um detector de foco para detectar o feixe de focalização
25 refletido pela superfície descontínua retornando através da lente objetiva;

d) um meio móvel para mover a lente objetiva em relação ao substrato ou o substrato em relação à lente objetiva, assim como para controlar o foco dos feixes refletidos retornando através da lente objetiva; e

e) um controlador conectado ao detector de foco e o meio

móvel, em que o controlador opera o meio móvel em resposta ao sinal do detector de foco de acordo com a posição do feixe de focalização no substrato.

9. Sistema de focalização de acordo com a reivindicação 7 ou 8, caracterizado pelo fato do substrato ser uma placa de microtitulação e a superfície descontínua estar na base de uma cavidade na placa de microtitulação.

10. Processo de examinar um objeto, a partir de um objeto localizado sobre uma superfície descontínua de um substrato que tem uma superfície contínua estendendo-se na mesma direção da superfície descontínua, o processo compreendendo adicionalmente um processo de focalização compreendendo as etapas de:

a) direcionar um primeiro feixe de focalização de radiação eletromagnética tendo um primeiro comprimento de onda através da lente objetiva para a superfície descontínua, tal que o primeiro feixe de focalização é refletido pela superfície descontínua retornando através da lente objetiva;

b) direcionar um segundo feixe de focalização de radiação eletromagnética tendo um segundo comprimento de onda, que pode ser o mesmo que ou diferente do primeiro comprimento de onda, através da lente objetiva para a superfície contínua, tal que o segundo feixe de focalização é refletido pela superfície contínua retornando através da lente objetiva;

c) separar a radiação do primeiro comprimento de onda da radiação do segundo comprimento de onda que é refletido retornando através da lente objetiva;

d) detectar o primeiro feixe de focalização refletido pela superfície descontínua retornando através da lente objetiva com um primeiro detector; e

e) detectar o segundo feixe de focalização refletido pela superfície contínua retornando através da lente objetiva com um segundo

detector,

caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente a etapa de:

- 5 f) mover a lente objetiva em relação ao substrato ou o substrato em relação à lente objetiva em resposta ao sinal do primeiro ou segundo detector de acordo com a posição do primeiro feixe de focalização ou segundo feixe de focalização no substrato.

10 11. Processo, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato do processo de focalização compreender adicionalmente as etapas de:

- a) direcionar um feixe de focalização de radiação eletromagnética através da lente objetiva para superfície descontínua retornando através da lente objetiva;
- 15 b) detectar feixe de focalização refletido por uma superfície descontínua retornando através da lente objetiva com um detector de foco; e
- c) mover a lente objetiva em relação ao substrato ou substrato em relação à lente objetiva em resposta ao sinal do detector de foco de acordo com a posição do feixe de focalização no substrato.

20 12. Processo de focalização para uso com um substrato, caracterizado pelo fato de compreender uma superfície descontínua e uma superfície contínua estendendo-se na mesma direção da superfície descontínua, o processo compreendendo as etapas de:

- a) direcionar um primeiro feixe de radiação eletromagnética através de uma lente objetiva para ser focalizada sobre a superfície descontínua ou sobre um objeto localizado na superfície descontínua;
- 25 b) direcionar um segundo feixe de radiação eletromagnética, tendo um primeiro comprimento de onda, através da lente objetiva para ser focalizada na superfície contínua é refletida pela superfície descontínua retornando através da lente objetiva;

c) direcionar um terceiro feixe de radiação eletromagnética tendo um segundo comprimento de onda, que pode ser a mesma que ou diferente do primeiro comprimento de onda, através da lente objetiva para ser a superfície contínua tal que o segundo feixe de focalização é refletido pela superfície contínua retornando através da lente objetiva;

d) separar a radiação do primeiro comprimento de onda da radiação do segundo comprimento de onda que é refletido retornando através da lente objetiva;

e) detectar o segundo feixe refletido pela superfície descontínua retornando através da lente objetiva com um primeiro detector;

f) detectar o terceiro feixe refletido pela superfície contínua retornando através da lente objetiva com um segundo detector; e

g) mover a lente objetiva em relação ao substrato ou o substrato em relação à lente objetiva em resposta ao sinal do primeiro detector ou o segundo detector de acordo com a posição do primeiro feixe de focalização ou o segundo feixe de focalização no substrato, de modo a controlar o foco dos feixes refletidos retornando através da lente objetiva.

13. Processo de focalização para uso com um substrato, caracterizado pelo fato de compreender uma superfície descontínua e uma superfície contínua estendendo-se na mesma direção da superfície descontínua, o processo compreendendo as etapas de:

a) direcionar um primeiro feixe de radiação eletromagnética através de uma lente objetiva para ser focalizada sobre a superfície descontínua ou sobre um objeto localizado na superfície descontínua;

b) direcionar um feixe de focalização de radiação eletromagnética através da lente objetiva para a superfície descontínua, tal que ela é refletida pela superfície descontínua retornando através da lente objetiva;

c) detectar feixe de focalização refletido pela superfície

descontínua retornando através da lente objetiva com um detector de foco; e

- d) mover a lente objetiva em relação ao substrato ou o substrato em relação à lente objetiva em resposta ao sinal do detector de foco de acordo com a posição do feixe de focalização no substrato, de modo a
- 5 controlar o foco do feixe de focalização refletido retornando através da lente objetiva.

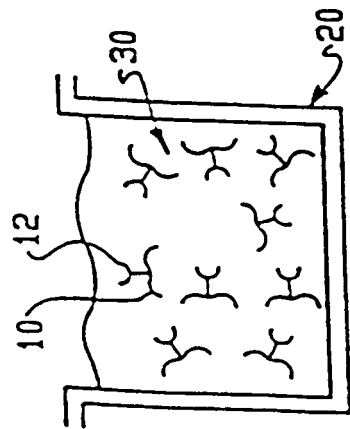


FIG. 1A

ARTE ANTERIOR

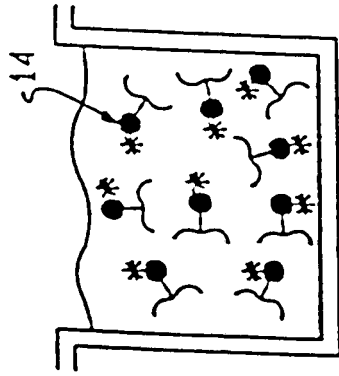


FIG. 1B

ARTE ANTERIOR

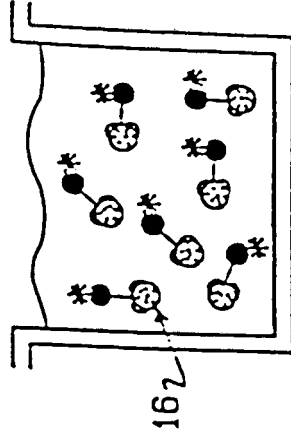


FIG. 1C

ARTE ANTERIOR

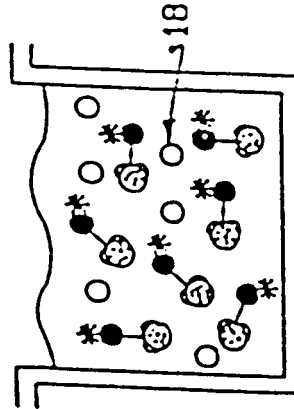


FIG. 1E

ARTE ANTERIOR

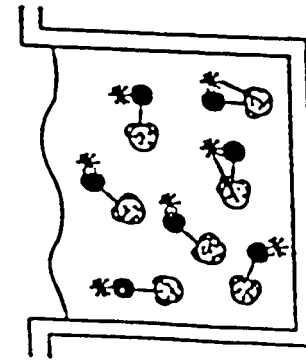


FIG. 1D

ARTE ANTERIOR

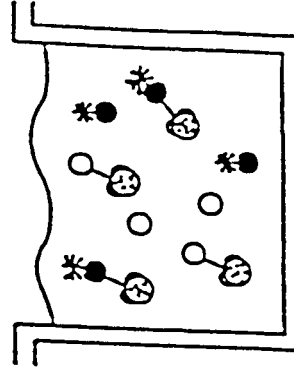


FIG. 1F

ARTE ANTERIOR

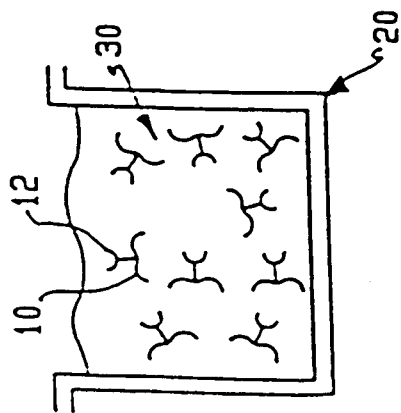


FIG. 2A
ARTE ANTERIOR

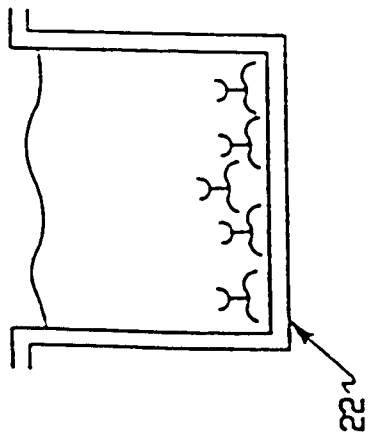


FIG. 2B
ARTE ANTERIOR

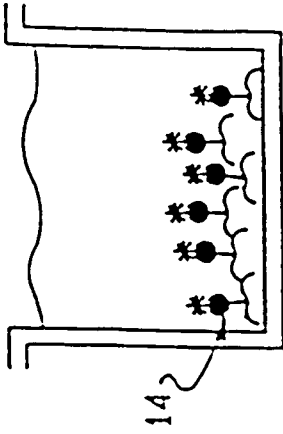


FIG. 2C
ARTE ANTERIOR

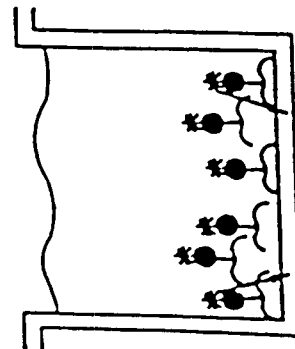


FIG. 2D
ARTE ANTERIOR

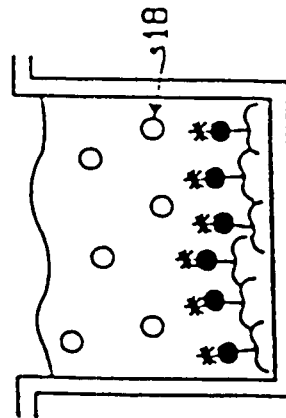


FIG. 2E
ARTE ANTERIOR

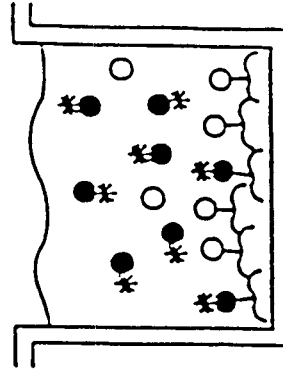


FIG. 2F
ARTE ANTERIOR

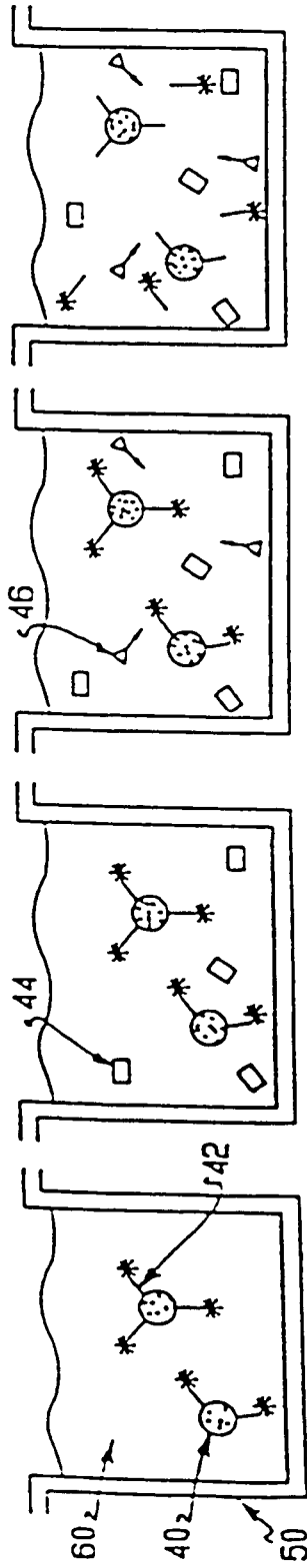


FIG. 3D

ARTE ANTERIOR

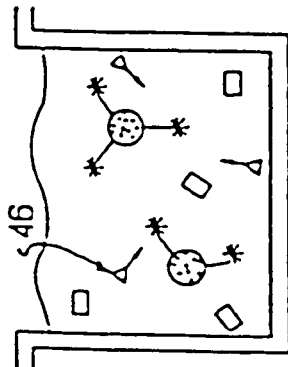


FIG. 3B

ARTE ANTERIOR

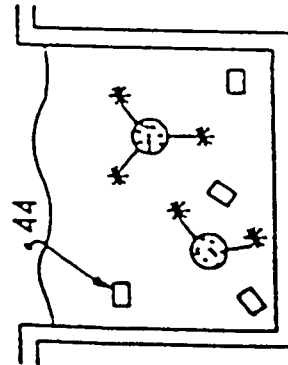


FIG. 4D

ARTE ANTERIOR

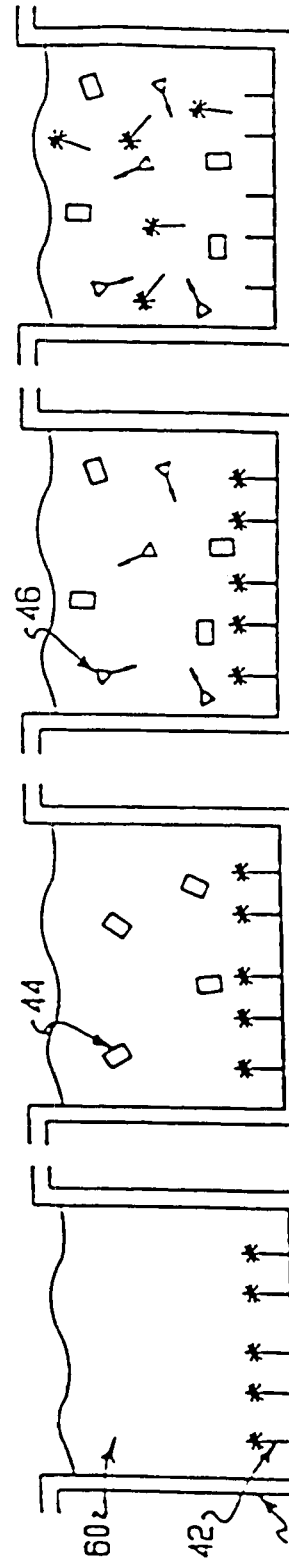
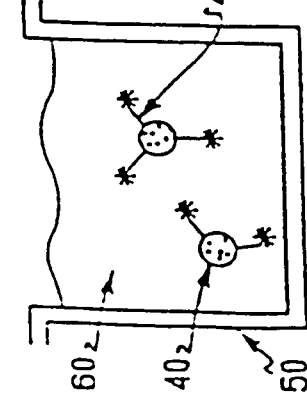


FIG. 4C

ARTE ANTERIOR

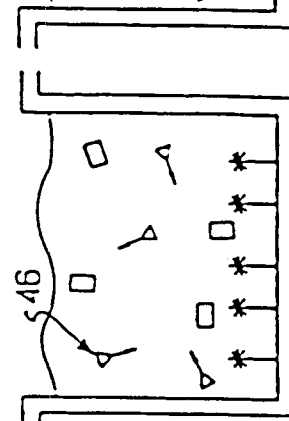


FIG. 4B

ARTE ANTERIOR

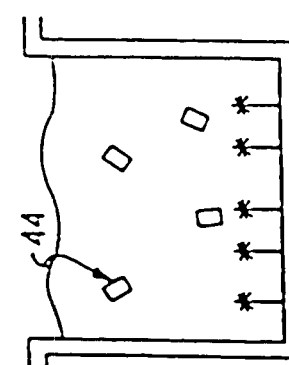
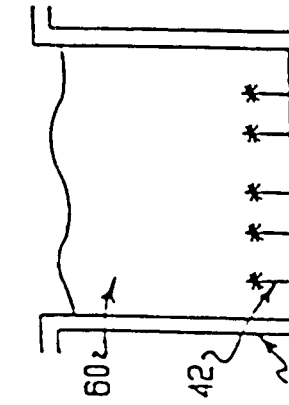


FIG. 4A

ARTE ANTERIOR



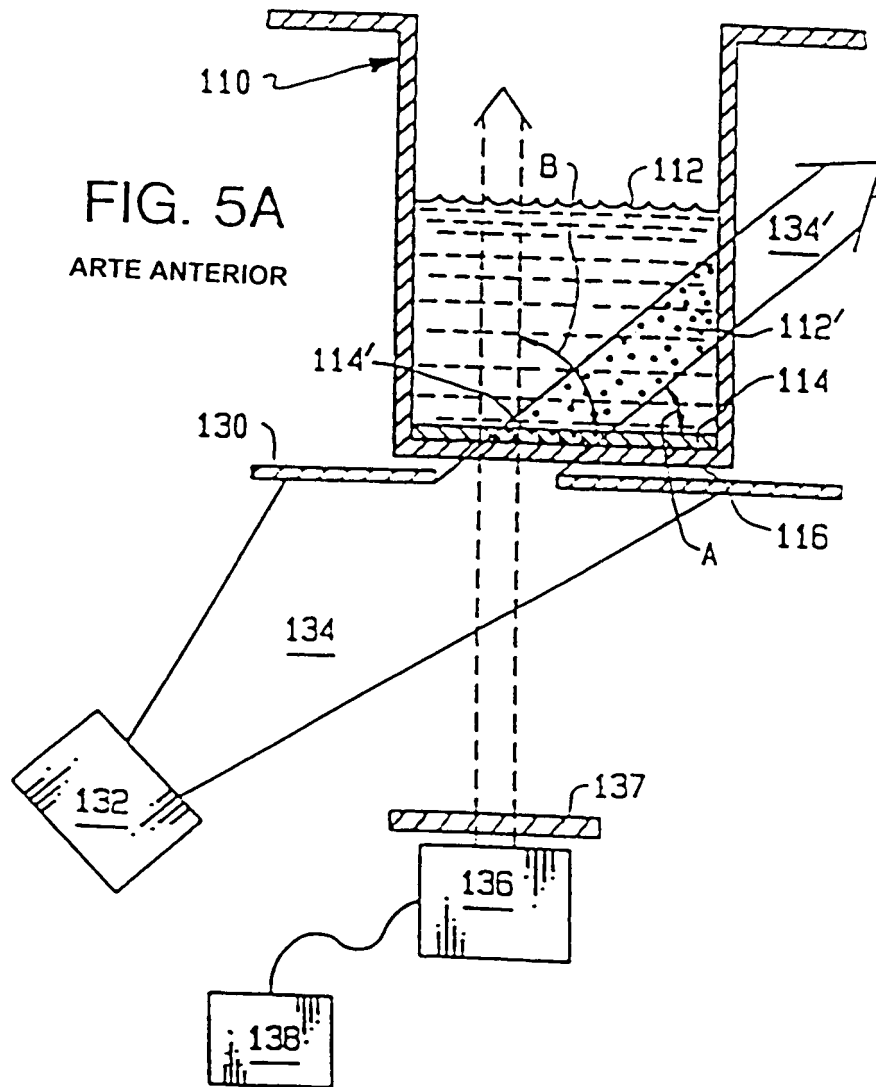
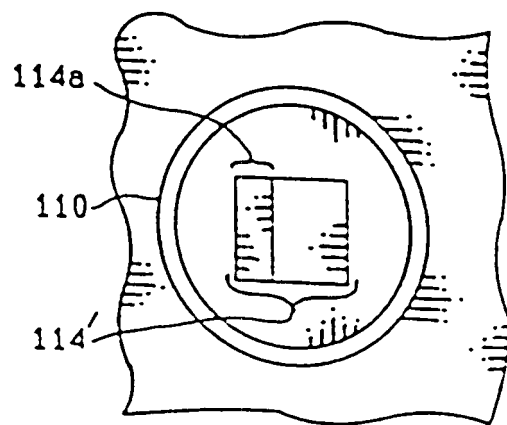
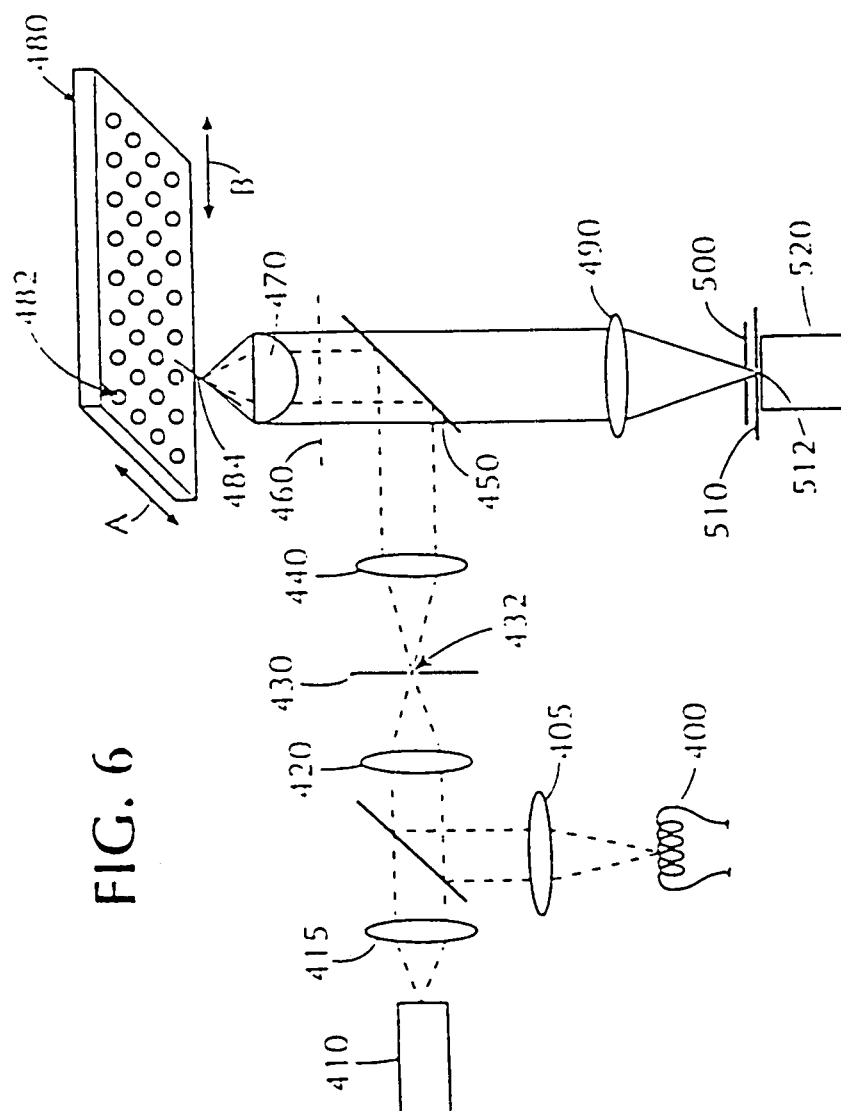


FIG. 5B
ARTE ANTERIOR





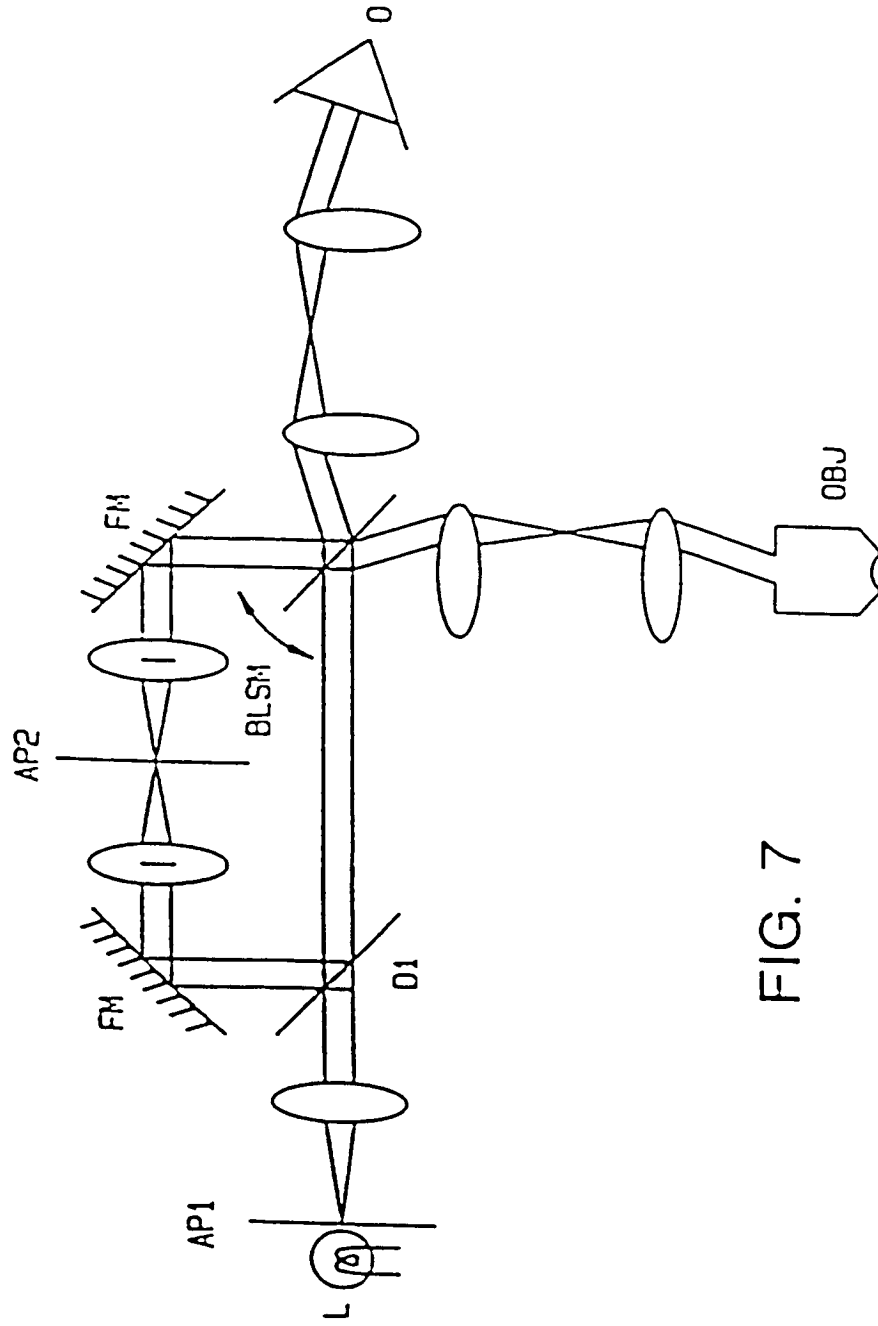


FIG. 7

FIG. 8A

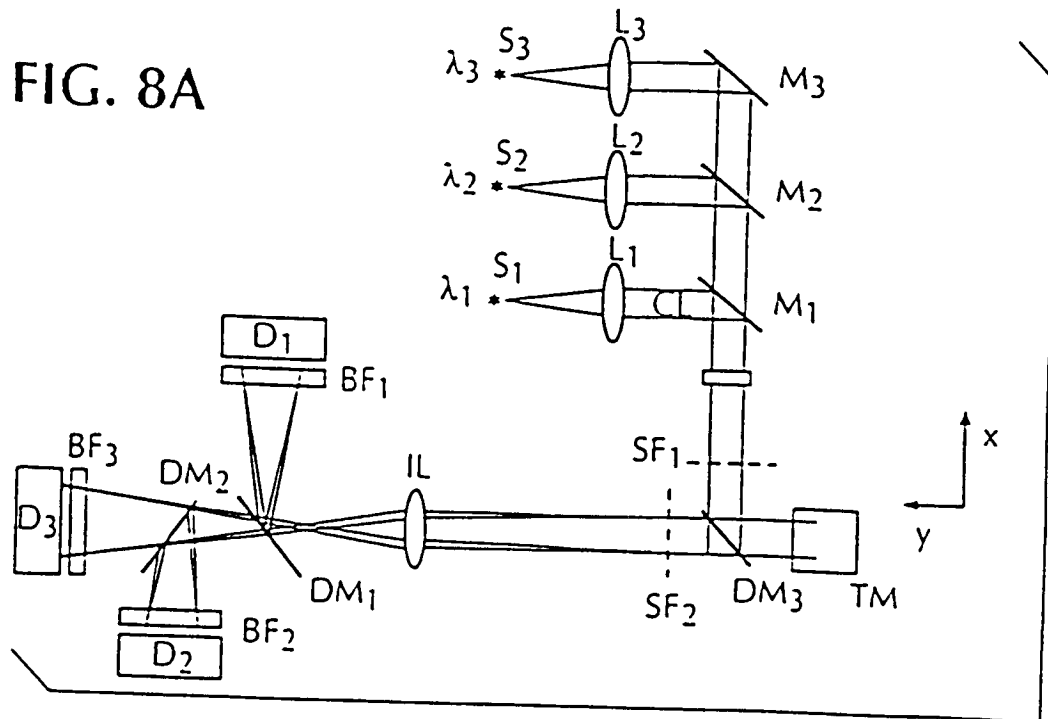


FIG. 8B

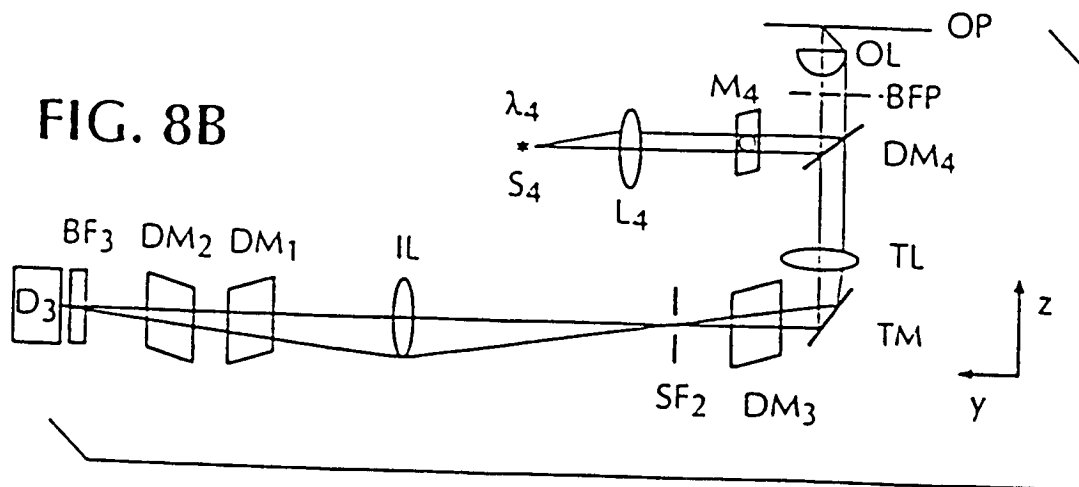


FIG. 8C

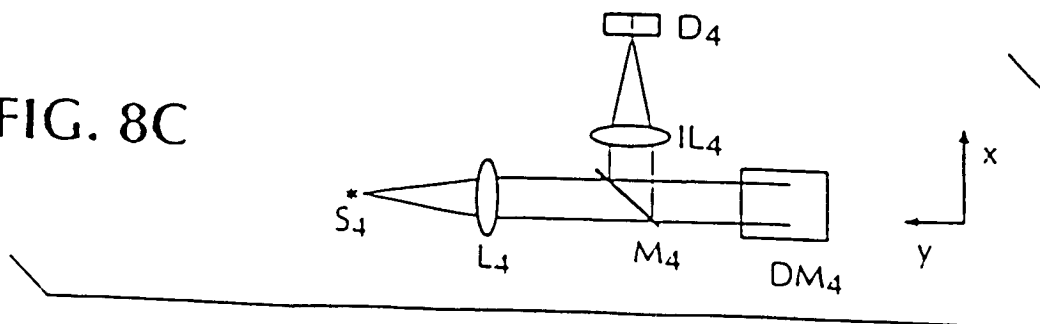


FIG. 9A

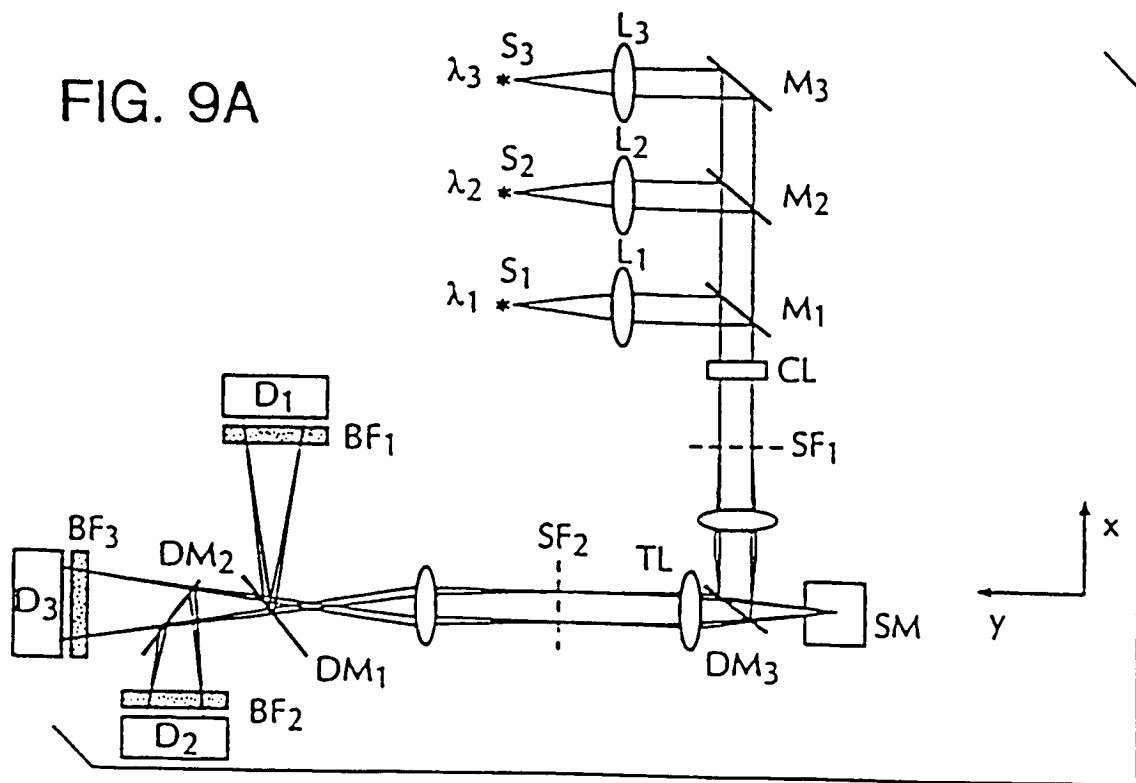


FIG. 9B

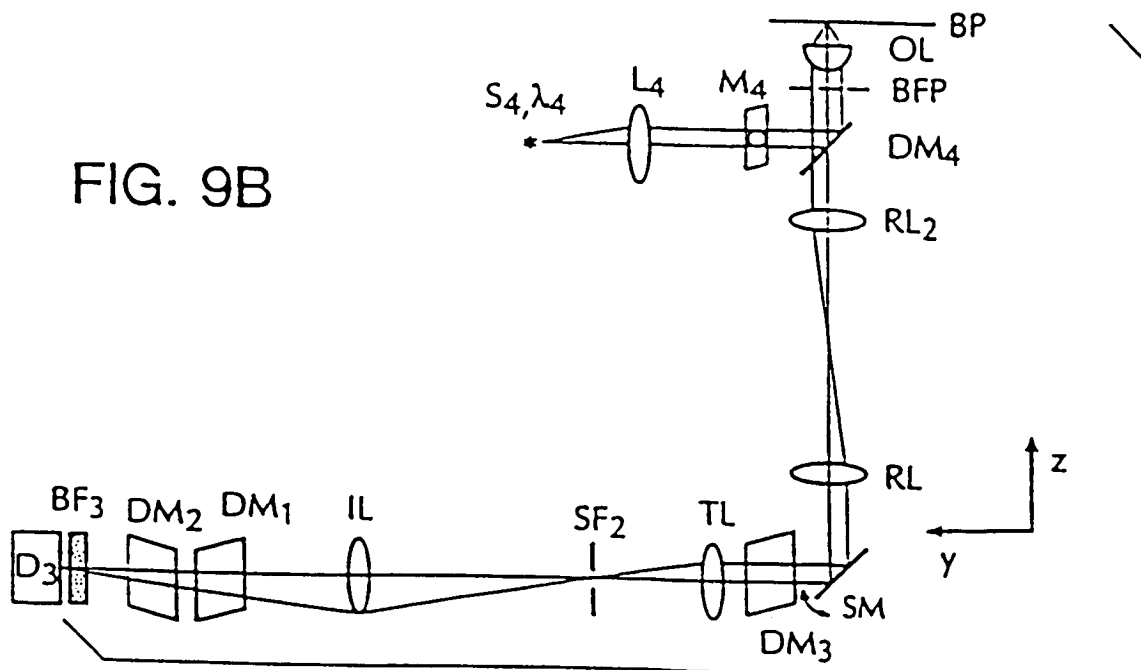
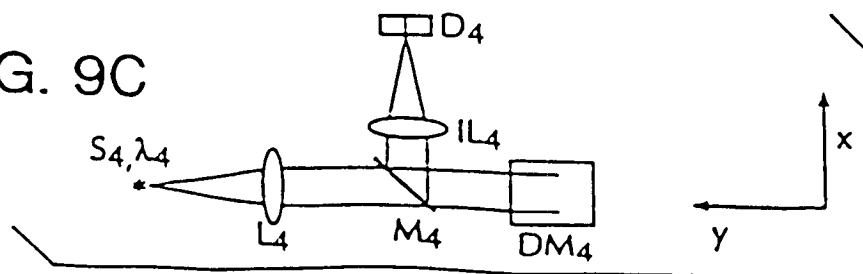


FIG. 9C



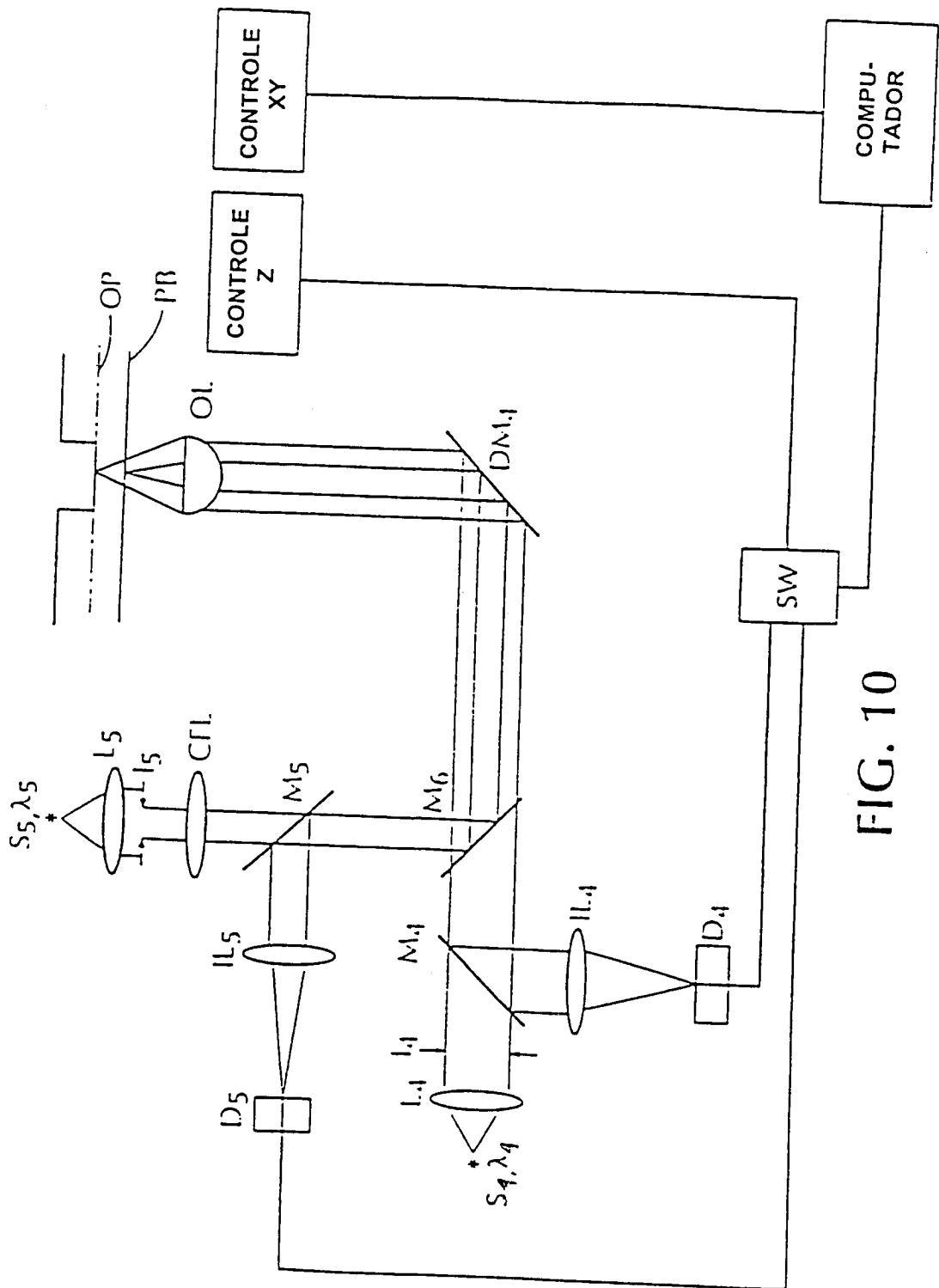


FIG. 10

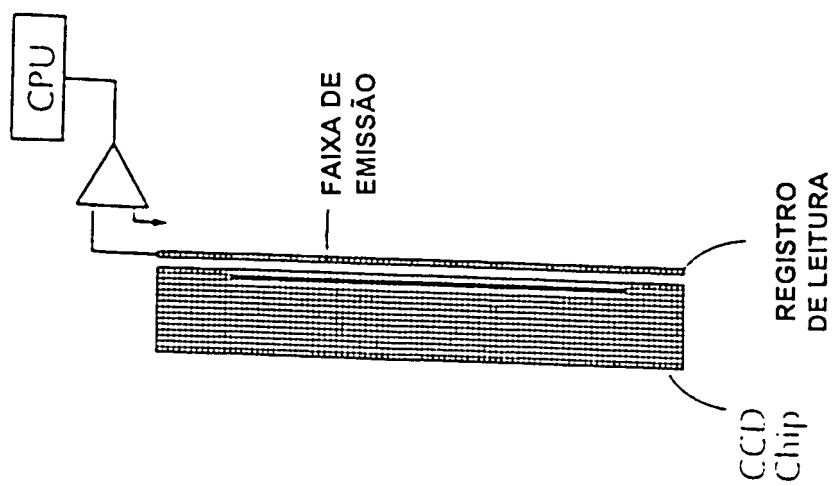


FIG. 11a

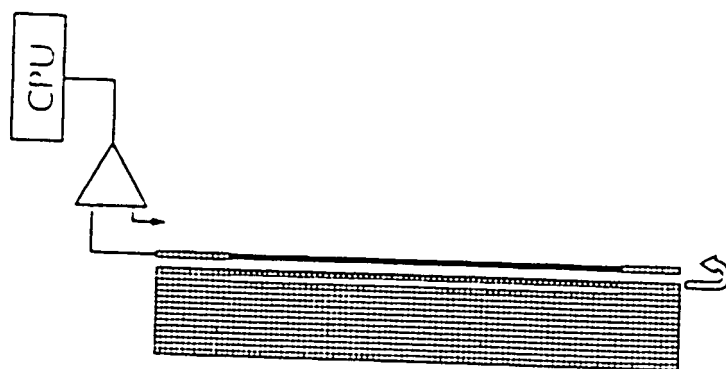


FIG. 11b

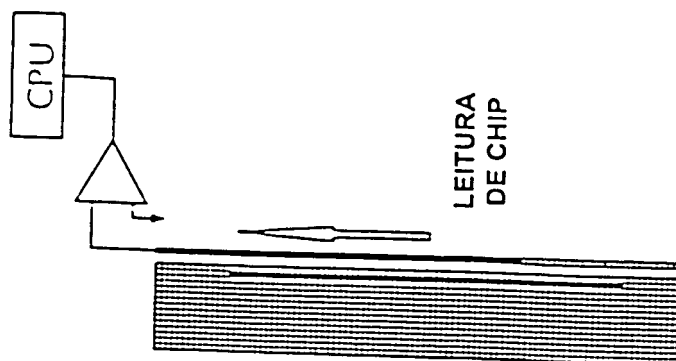


FIG. 11c

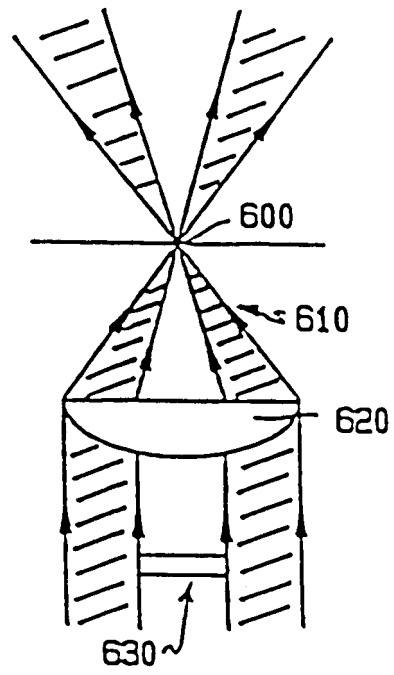


FIG. 12A

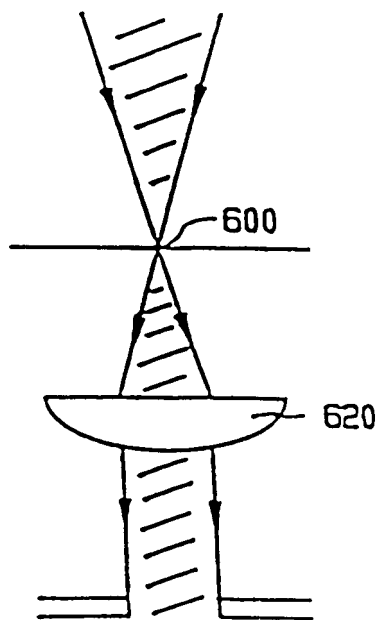


FIG. 12B

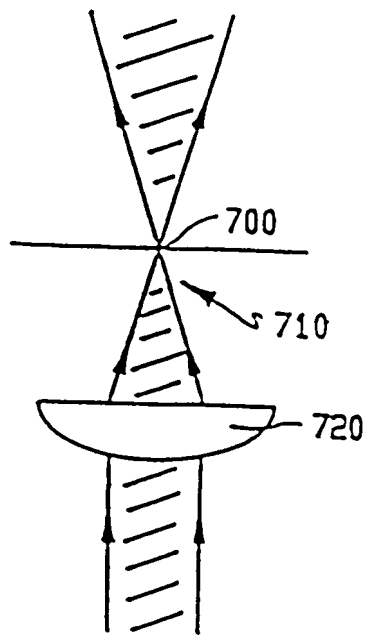


FIG. 13A

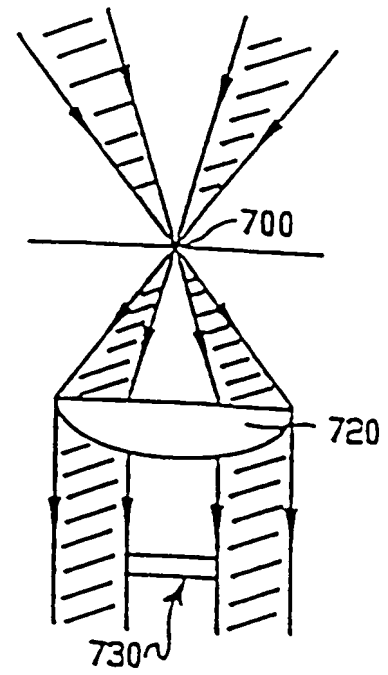


FIG. 13B

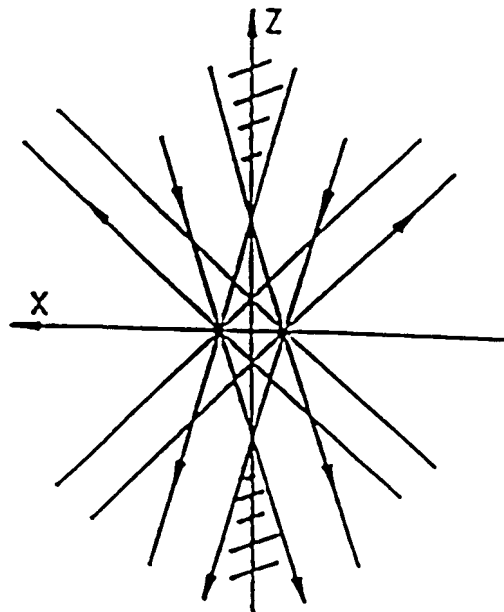


FIG. 14

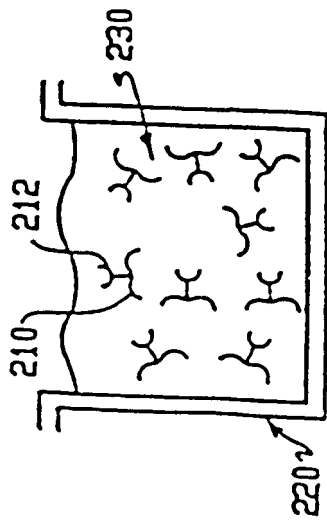


FIG. 15A

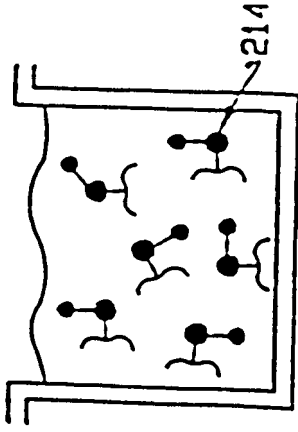


FIG. 15B

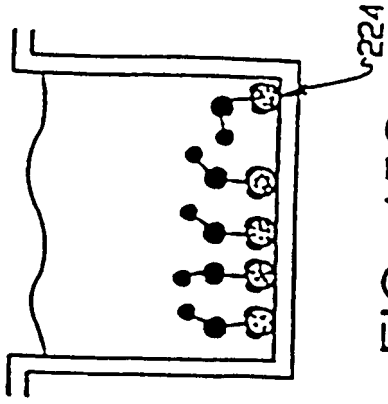


FIG. 15C

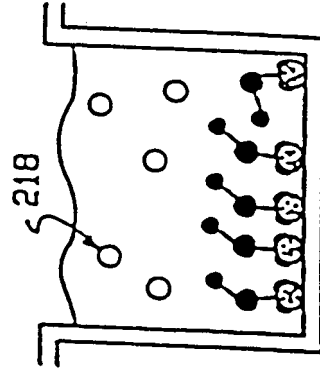


FIG. 15E

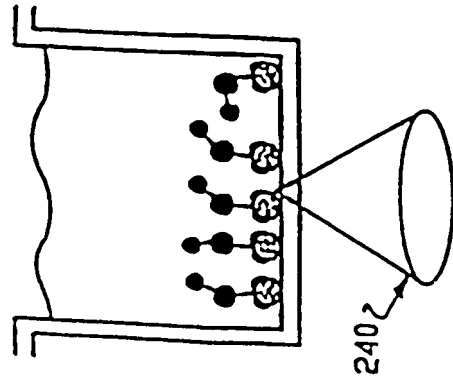


FIG. 15D

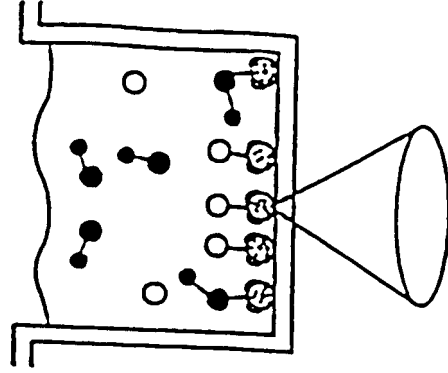


FIG. 15F

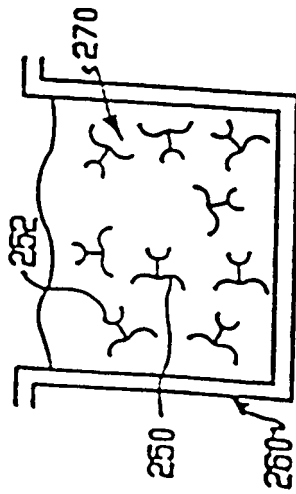


FIG. 16A

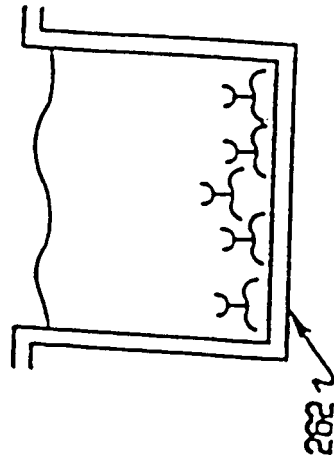


FIG. 16B

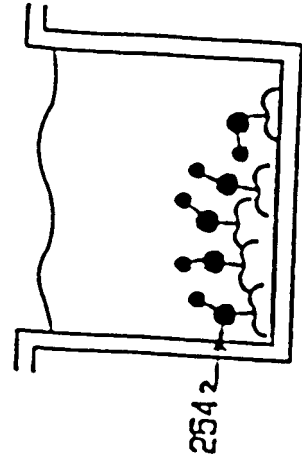


FIG. 16C

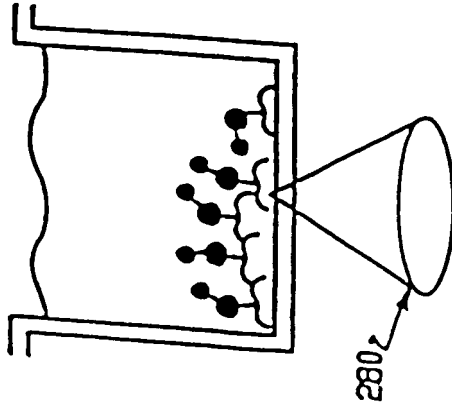


FIG. 16D

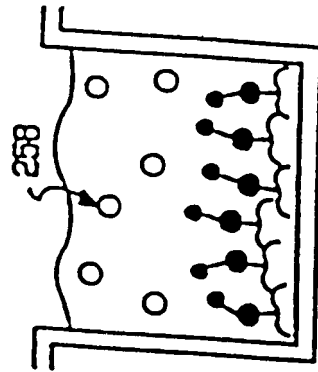


FIG. 16E

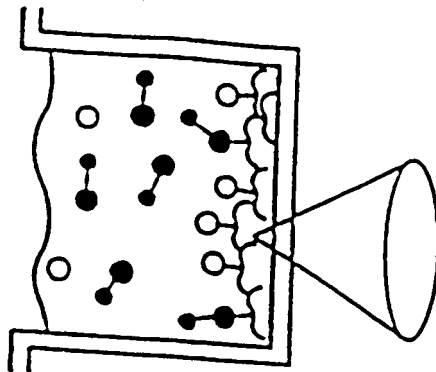
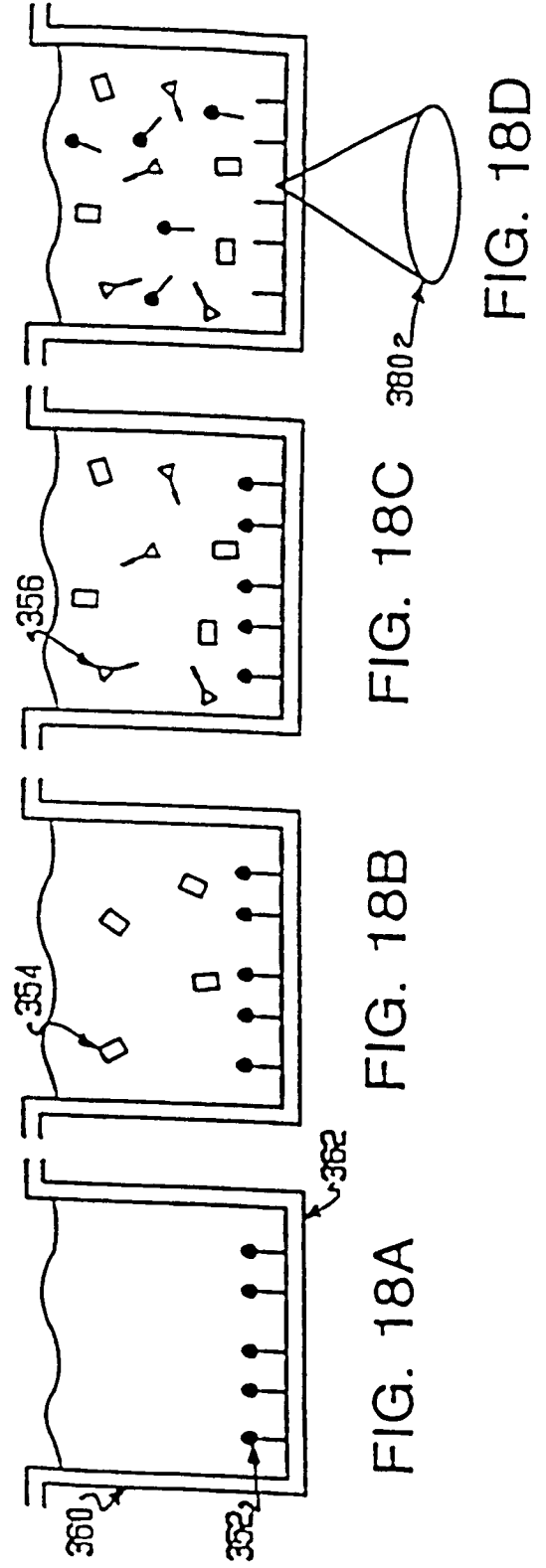
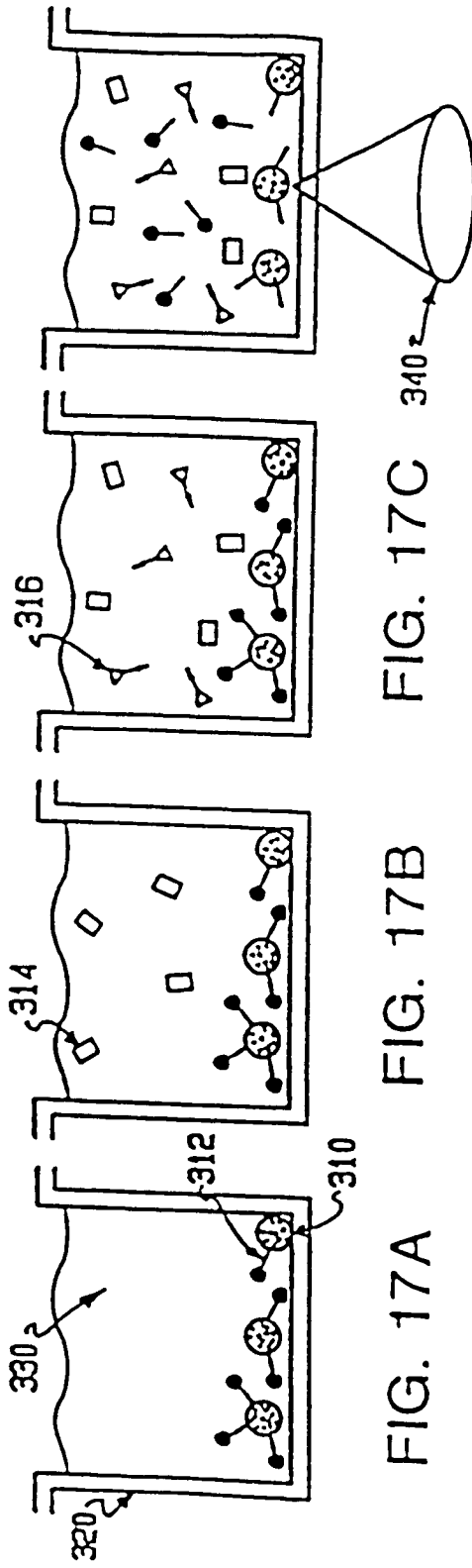


FIG. 16F



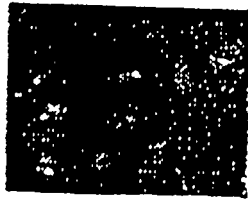


FIG. 19a



FIG. 19b



FIG. 19c



FIG. 19d



FIG. 19e



FIG. 19f

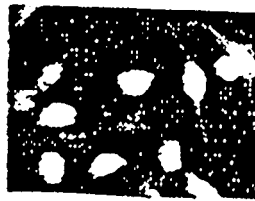


FIG. 19g



FIG. 19h



FIG. 19i

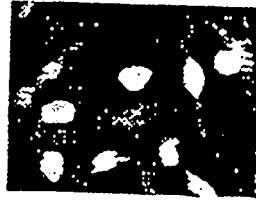


FIG. 19j



FIG. 19k



FIG. 19l



FIG. 19m



FIG. 19n

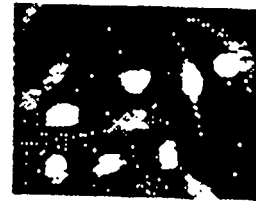


FIG. 19o



FIG. 19p



FIG. 20a

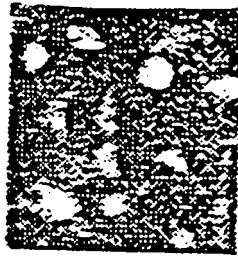


FIG. 20b

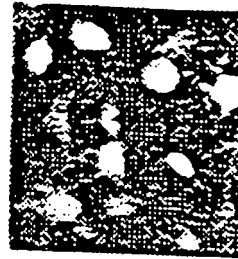


FIG. 20c

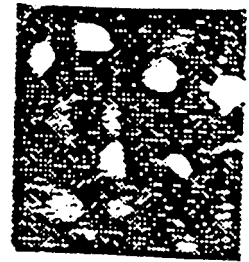


FIG. 20d

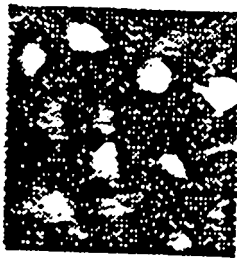


FIG. 20e

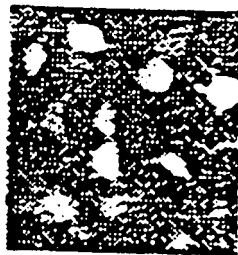


FIG. 20f

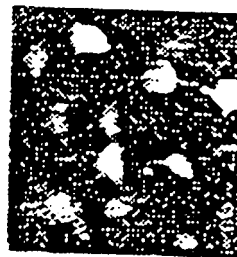


FIG. 20g

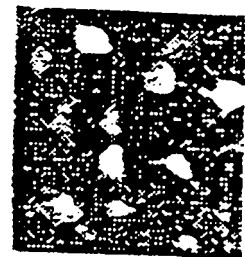


FIG. 20h

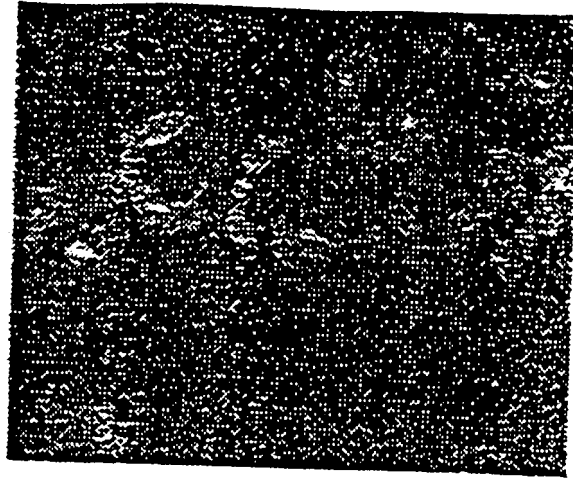


FIG. 21a

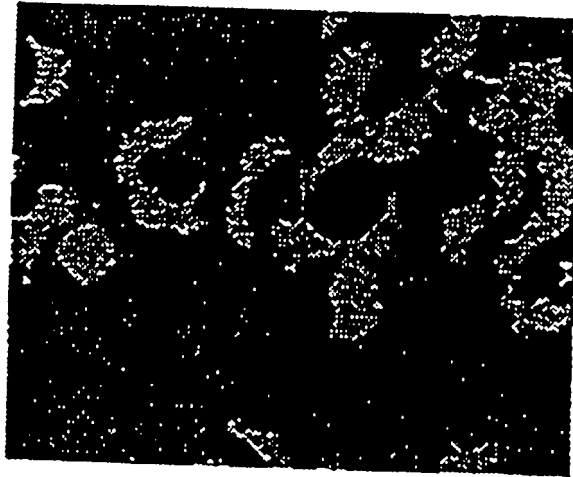


FIG. 21b

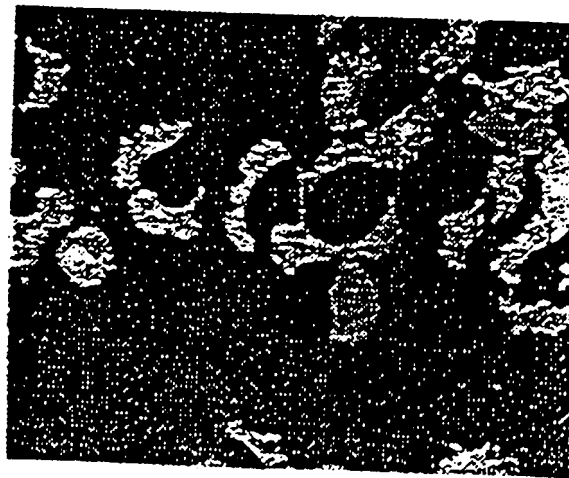


FIG. 21c

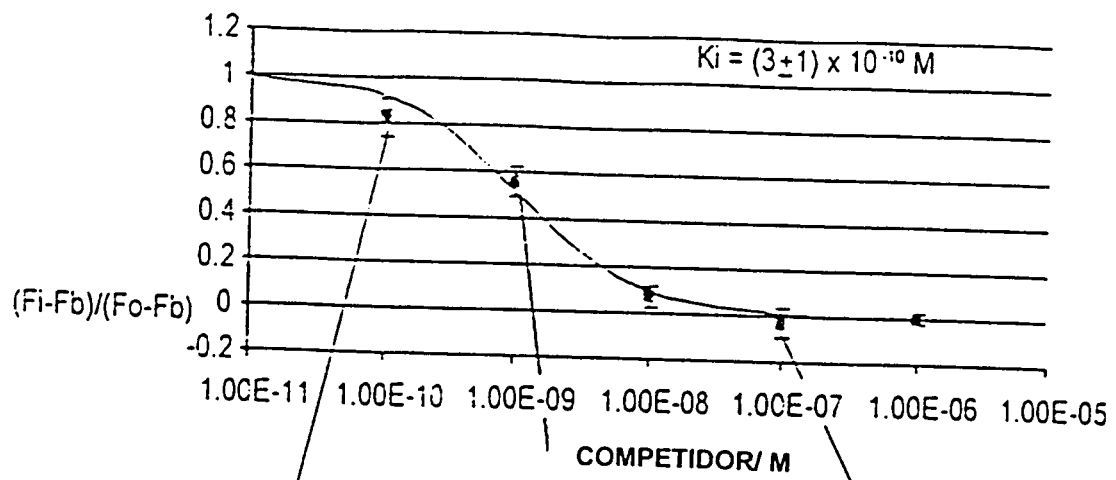


FIG. 22a

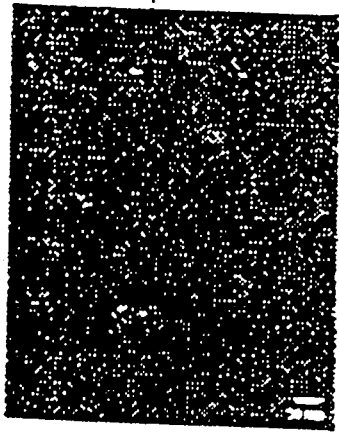


FIG. 22b



FIG. 22c

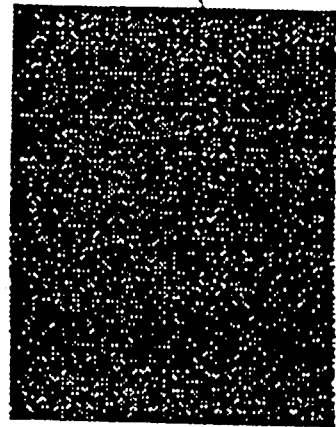


FIG. 22d

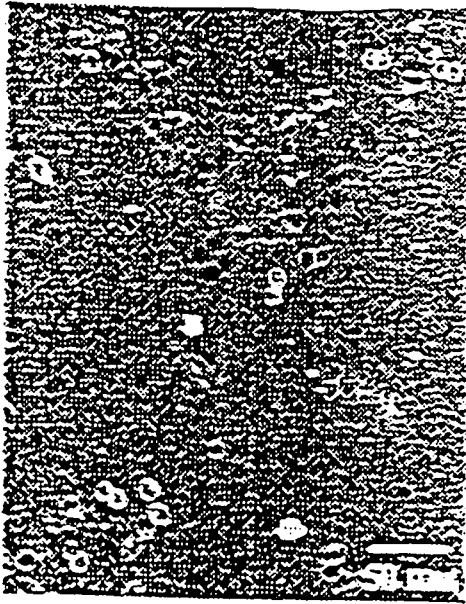


FIG. 23a

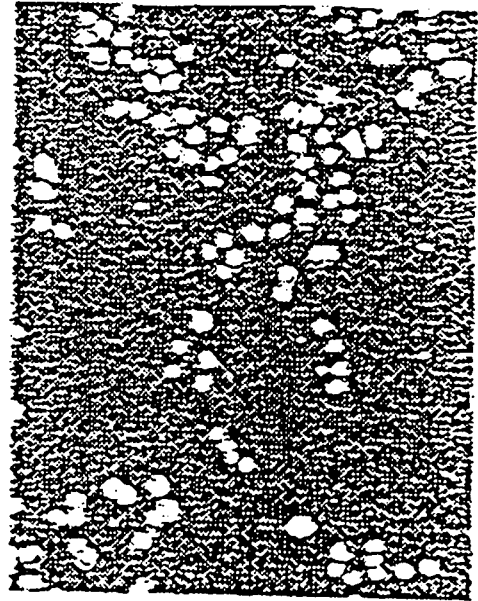


FIG. 23b

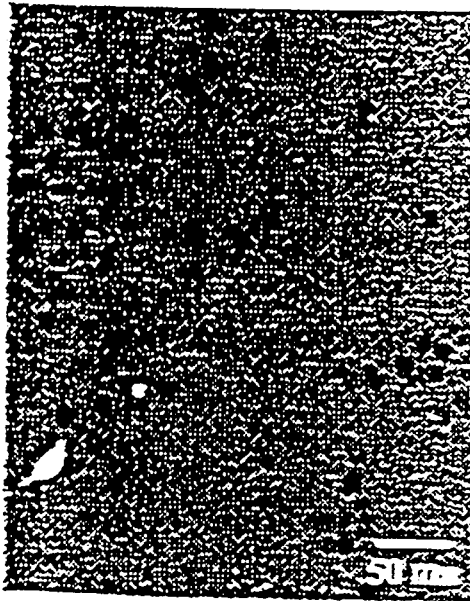


FIG. 23c

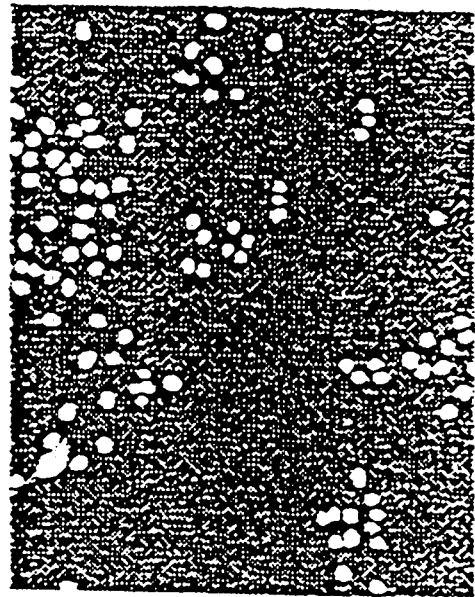


FIG. 23d

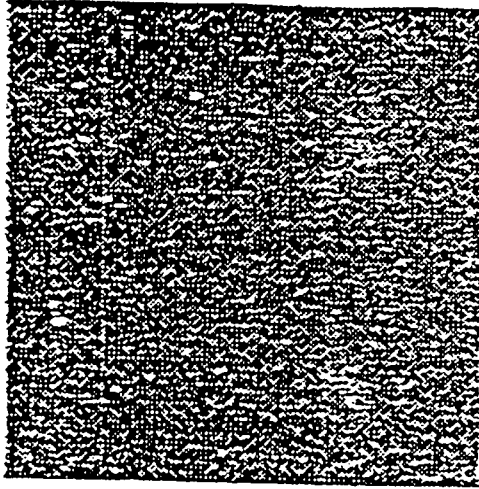


FIG. 24a

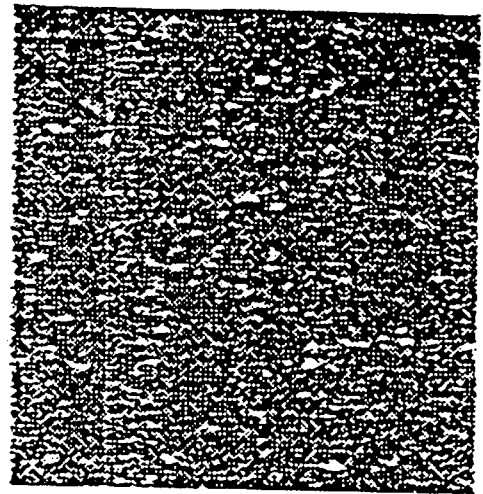


FIG. 24b

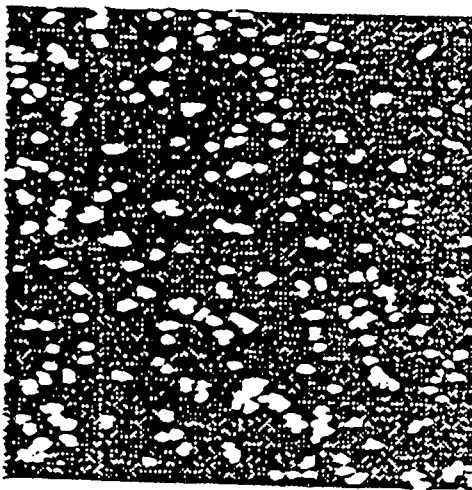


FIG. 24c

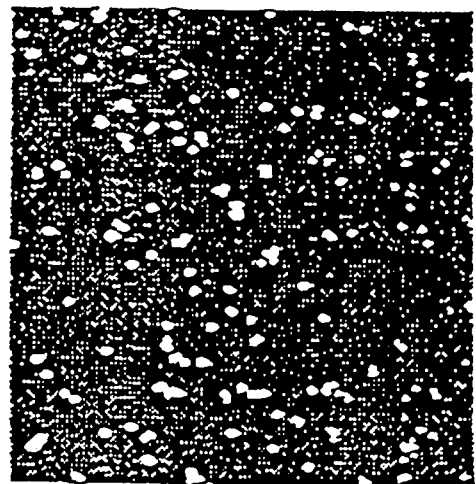


FIG. 24d

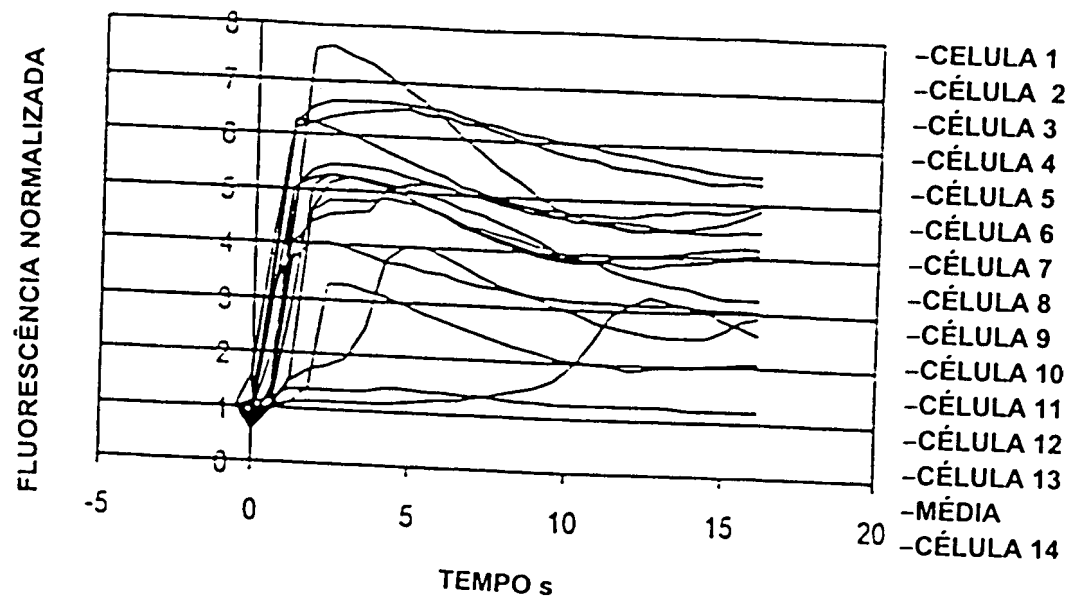


FIG. 25a

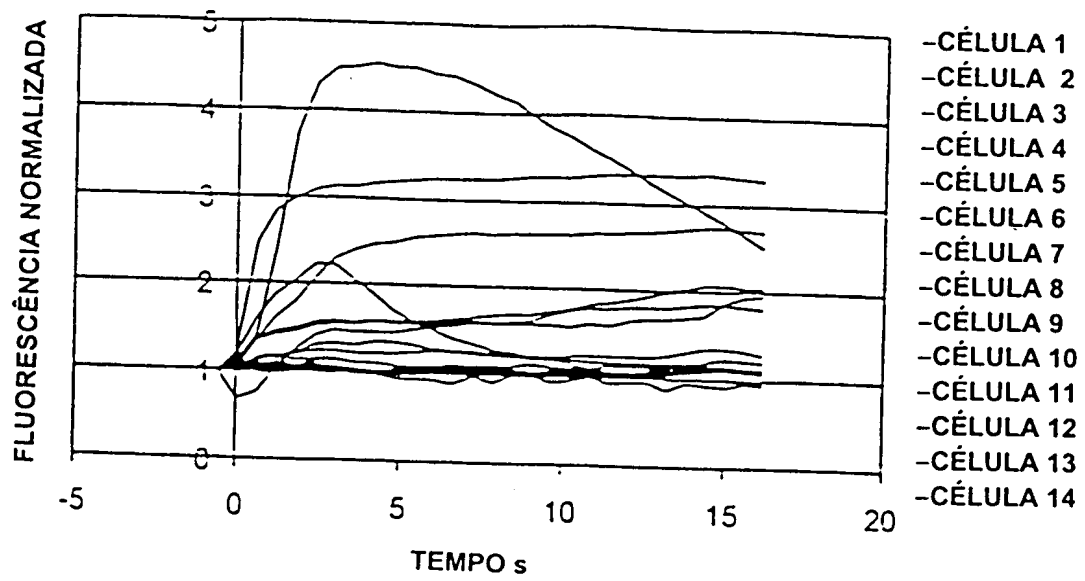


FIG. 25b

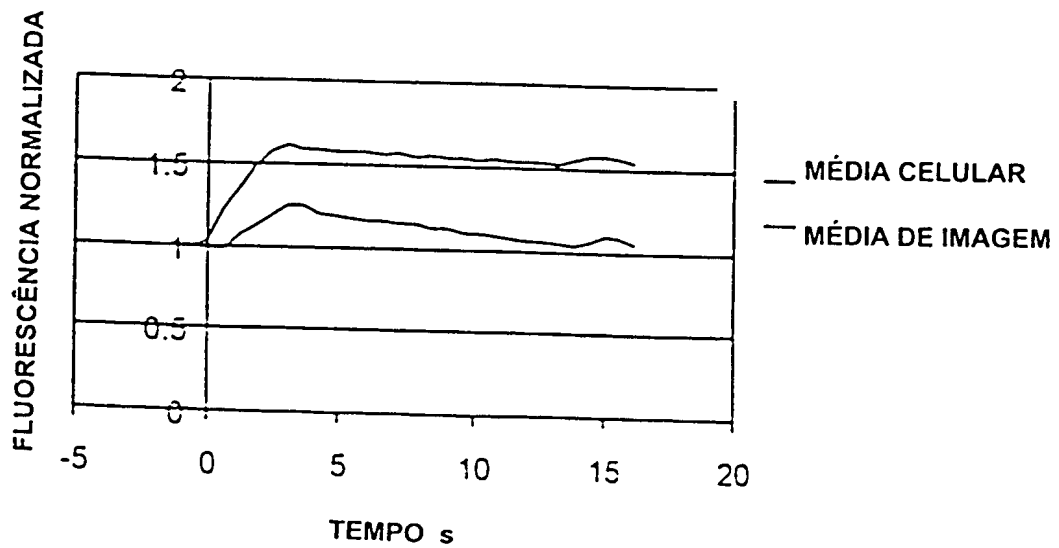


FIG. 25c

RESUMO

“SISTEMA DE FORMAÇÃO DE IMAGEM CONFOCAL, SISTEMA DE FOCALIZAÇÃO PARA USO COM UM SUBSTRATO, E, PROCESSOS DE EXAMINAR UM OBJETO, E DE FOCALIZAÇÃO PARA USO COM UM SUBSTRATO”

Um sistema de formação de imagem confocal utilizando um feixe alongado. Modos de realização específicos são dirigidos a um aparelho com dispositivos de carga acoplada (CCD) e aqueles em que o aparelho é usado em observação de um objeto fluorescente.