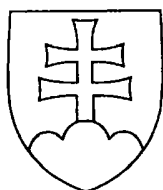


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ
PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA**

- (22) Dátum podania prihlášky: **18. 4. 2001**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **0009719.6**
PCT/GB00/04696
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **19. 4. 2000**
8. 12. 2000
(33) Krajina alebo regionálna
organizácia priority: **GB, GB**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **4. 3. 2003**
Vestník ÚPV SR č.: **3/2003**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky
v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: **PCT/GB01/01779**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: **WO01/78889**

(11), (21) Číslo dokumentu:

1512-2002

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁷ :

B01J 19/00

(71) Prihlasovateľ: **3D MOLECULAR SCIENCES LIMITED, Harston, Cambridgeshire, GB;**

(72) Pôvodca: **Som Amit Kumar, Harston, Cambridgeshire, GB;**
Skinner Nigel Guy, Harston, Cambridgeshire, GB;
Watson Susan Louise, Harston, Cambridgeshire, GB;

(74) Zástupca: **PATENTSERVIS BRATISLAVA, a. s., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Spôsob výroby kódovaných častíc**

(57) Anotácia:
Kódované mikročastice na použitie pri tvorbe chemickej
alebo biologickej knižnice sú vyrábané rozrysovaním častíc
v plastovej fólii nesenej na podklade a odobraním častíc
z podkladu.

SK 1512-2002 A3

Spôsob výroby kódovaných častíc

Oblasť techniky

Vynález sa týka spôsobu výroby kódovaných častíc. Jedným z mnohých použití takýchto častíc je identifikovanie sekvencie oligomérov.

Doterajší stav techniky

Vo veľkom rozsahu biochemických a chemických postupov existuje potreba identifikácie sekvencie neznámeho oligoméru známej (pomerne krátkej) dĺžky. Oligomér môže byť tvorený z nukleotidov (RNA alebo DNA), aminokyselín (peptidov a proteínov), cukrov alebo akýchkoľvek iných oligomérnych chemických zlúčenín. Oligomér môže byť dokonca komplex antigénnych protilátok použitý napr. v imunologických testoch.

S ohľadom na oligonukleotidy je jedným prístupom umiestnenie neznámeho (cieľového) reťazca do prítomnosti všetkých možných (analytických vzoriek) reťazcov nejakej kratšej dĺžky. Malý počet komplementárnych analytických vzoriek reťazcov sa naviaže s cieľovým reťazcom a táto väzbová udalosť môže byť identifikovaná akýmkoľvek vhodným prostriedkom, napríklad fluorescenciou, elektrochemiluminescenciou, chemiluminescenciou alebo fosforescenciou. V existujúcej technológii sú analytické vzorky reťazcov priestorovo rozmiestnené na povrchu. Sekvencia analytickej vzorky reťazca je kódovaná v jeho polohe na povrchu. Identita cieľového reťazca môže byť potom odvodená z fyzického miesta väzbovej udalosti vzhľadom k povrchu.

Alternatívna technológia je založená na malých, fyzikálne diferencovateľných zrnkách. Aspoň jedna analytická vzorka reťazca o známej sekvencii je spojená so zrnkom takým spôsobom, že všetky z pripojených reťazcov majú zhodnú sekvenciu. Týmto spôsobom sekvencia určitého reťazca môže byť identifikovateľná z určitého zrnka, ku ktorému je reťazec pripojený. Zrnká sú potom vystavené cieľovému reťazcu

a väzba medzi cieľovým reťazcom a akýmkoľvek analytickými vzorkami reťazcov môže byť detekovaná použitím akéhokoľvek detekčného prostriedku, napríklad fluorescence. Zrnká, na ktorých nastala väzbová udalosť, môžu byť oddelené z objemu zrníek a sekvencia cieľového reťazca odvodená zo sekvencie naviazanej vzorky reťazca je identifikovateľná množstvom prostriedkov.

Spôsob výroby strojovo čitateľných zrníek je opísaný v GB-A-2334347. Prihláška opisuje spôsob výroby kódovaných častíc obsahujúci kroky :

- obalenie líca doštičky z kremíka alebo podobného kryštalického materiálu alebo inertného kovu alebo kovovej zliatiny fotocitlivým chrániacim polymérom,
- vystavenie obaleného líca doštičky UV žiareniu cez fotolitografickú masku, určujúcu veľkosť častice a/alebo polohu kódovaných miest na častici;
- rozpustenie alebo iné odstránenie buď UV exponovaných alebo UV neexponovaných plôch fotocitlivého chrániaceho polyméru;
- leptanie exponovaných miest doštičky, z ktorých bol odstránený fotocitlivý chrániaci polymér, s použitím vhodného leptacieho činidla;
- uvoľnenie častíc.

Ťažkosti s obidvoma týmito systémami spočívajú vo výrobe analytických vzoriek vlákien takým spôsobom, aby mohli byť následne identifikované.

Použitie takýchto strojovo čitateľných zrníek pre biologické vedy (kombinatorická chémia, proteómia, genómia, farmakogenómia) vyžaduje ďalšiu derivatizáciu vhodných ligandov (protilátok, antigénov, oligonukleotidov, atď), často spolu s pridaním označovacích chemikálií (napr. fluorofórov, ruténiových solí). Polyméry poskytujú vhodný podklad pre mnoho takých aplikácií a zrnká zlepšujú pomer signálu k šumu (väčšia povrchová plocha poskytujúca prostriedky pre viazanie viacej molekúl). Jednou z nevýhod, obzvlášť pre vysoké mnohonásobné skúšky (napríklad určovanie DNA sekvencií), kde je nevyhnutné derivatizovať niekde medzi 1 a viacej ako 60 000 rôznymi molekulami je obaľovanie zrníek. Napríklad pre získanie každej jednotlivej možnej kombinácie 4 nukleotidových báz predstavovaných v oligonukleotidovej sekvencií s dĺžkou 8 nukleotidov (8 mer) je potrebných 65 636 rôznych zrníek na reprezentáciu každého čísla ($4^8 = 65536$). Existujú tu dva zdroje :

- manipulácia s veľkým počtom malých (menších ako 100 μm v priemere) zrníek pred, počas a po obaľovacom procese;

- na radenie DNA, schopných vybudovať požadované sekvencie.

Na vyriešenie tohto problému bol vyvinutý kombinatorický spôsob syntézy. Tento prístup obsahuje selektívne masikovanie/demaskovanie sekvencií a použitie fotolabilných skupín na prepojenie k základniám. To je zložitý a nákladný postup, ktorý nie je ľahko prispôsobiteľný v dôsledku vysokých nenávratných nákladov (masky, optimalizácia procesu) a rovnako tak trpí nízkym pomerom signálu k šumu a zlým difúznym miešaním v dôsledku rovinnej topológie poskytovanej analytickým vzorkám.

WO 97/15390 opisuje koncepciu zhotovenia tvarom kódovaných mikročastíc z polyméru, ale neponúka žiadny životaschopný spôsob na jej uskutočnenie.

Podstata vynálezu

Vynález chce prekonať tieto a ďalšie nevýhody alebo nedostatky bežných spôsobov. V súlade s tým v prvom hľadisku vynálezu je poskytnutý spôsob výroby kódovaných častíc, ktorý obsahuje :

- prípravu fólie polymérneho materiálu na podklade;
- rozrysovanie fólie do množiny častíc bez porušenia integrity podkladu;
- strojovo čitateľné kódovanie častíc;
- odobratie častíc z podkladu.

Výroba strojovo čitateľných polymérnych zrníek je lákavá z niekoľkých dôvodov. Po prvé poskytuje výrobný spôsob s nižšími nákladmi ako pre kremíkové zrnká. Po druhé polyméry (hlavne polystyrén, polyimid a polykarbonát) sú prednostnými podkladmi na následné derivizovanie so širokou mnohotvárnosťou ligandov.

V druhom hľadisku vynálezu je poskytnutý spôsob výroby kódovaných častíc v modifikovanom formáte mikrotitrovej doštičky.

Častice môžu byť odobraté z podkladu rôznymi spôsobmi, ako je bližšie opísané nižšie. V niektorom z týchto spôsobov je podklad strateným podkladom, ktorý sa zničí odobratím častíc z neho.

Keď sú umiestnení členovia chemickej knižnice na zrnká alebo častice pred odobratím zo strateného podkladu, spôsob použitý na uvoľnenie zrníek a zničenie

stratenej vrstvy nesmie poškodiť pripojené molekuly. To je zvlášť pravda o biologických molekulách a platí pre obidva formáty : doštičku i mikrotitrovú doštičku. V obidvoch prípadoch zrnká môžu byť uvoľnené zničením integrity strateného podkladu. Tam, kde je vrstva SPLOR30B (ako je opísané nižšie), jedným spôsobom ako to urobiť, je použiť špeciálny vývojkový roztok vyvinutý pre SPLOR30B, ktorý je zhodou okolností zásaditý.

Tento zásaditý materiál nemusí byť vhodný pre všetky biologické molekuly, a preto môžu byť použité ďalšie stratené vrstvy na umožnenie prichytenia biologických molekúl k podkladom pred uvoľnením jednotlivéj štruktúry zrníek.

Stratená vrstva môže byť polyolefín (napr. polyetylén) alebo rozpustná v rozpúšťadlách alebo vo vode. Môže byť taktiež citlivá na teplotu, napr. želatína, alebo na pH.

Ak sú zrnká na doštičke alebo na mikrotitrovom podklade, môžu byť odobraté použitím mechanickej energie, napr. priamym lúčom ultrazvukovej energie k jemnému mechanickému oprášeniu zrníek z podkladu. Väzbovým médiom pre ultrazvukovú energiu môže byť biologicky zlučiteľná tekutina, ako je voda alebo rozpúšťadlo.

Stratená vrstva môže byť tixotropný materiál, tj. je tuhý v rovnováhe a drží zrnká na mieste. Keď sú ultrazvukové šmykové vlny zamerané na túto vrstvu, materiál stratí svoju tuhosť a začne tiecť a tak umožní uvoľnenie zrníek.

Stratená vrstva môže mať také vlastnosti, že pri izbovej teplote vrstva drží zrnká na mieste. Keď je doštička zmrazená, napr. použitím prúdu kvapalného dusíka, vrstva zmrzne a skrehne tak, že sa zrnká uvoľnia.

Stratená vrstva môže byť citlivá na žiarenie, napr. UV a jasne to pôsobí v podkladoch, ktoré sú priehľadné pre UV. V prípade doštičkového formátu, hoci kremík bol použitý ako poklad v nižšie uvedenom príklade, môže byť použitý akýkoľvek plochý podklad, napr. plochá kryštálová doštička, ktorá umožňuje prechod UV energie k rozhraniu filmu a zrníek.

Ďalší spôsob na pripojenie a uvoľnenie zrníek obsahuje použitie individuálne adresovateľných elektród buď na pevnej doštičke alebo na poddajnom obvodovom materiáli, napr. polyamide, uloženom na plochom tuhom objekte. Zrnká sú vyrobené na vršku elektród a sú pridržované na podklade elektrostatickou príťažlivosťou.

Namiesto jednoduchých, plochých elektród môže byť vyššie uvedená myšlienka rozšírená na MEMS (mikro-elektro-mechanické) konzoly v miestach elektród, ktoré dvíhajú zrnká z podkladov a lámu mostíky.

Zrnká môžu byť vyrábané s tenkými mostíkmi medzi nimi (veľmi podobnými spôsobmi, akými sú vstrekové lisované plastové súčasti spojené s lícnyimi kanálkami). Mostíky môžu sedieť na vršku stĺpikov GSM (vysoko magnetostrikčného) materiálu. Pri aktivácii stĺpca z GSM materiálu prelomia mostíky a uvoľnia zrnká. Tenké mostíky môžu byť porušené mnohými spôsobmi. Častice môžu byť zoradené takým spôsobom, že ťah na jednom konci lícneho kanálika „rozopne“ všetky zrnká do suspenzie. Mostíky môžu byť taktiež porušené laserovým rezaním, napríklad Nd:YAG laserom alebo CO₂ laserom.

Na doštičku môže byť namotaný SU-8 alebo iný polymérový chránič opatrený otvormi, ktoré odpovedajú veľkosti zrníek. To zabezpečí, že akonáhle sú zrnká vyrobené, sedia na otvore. Keď sa vyžaduje uvoľnenie zrníek, tenká ihla tlačí zrnko z doštičky, alebo prúd vzduchu odfúkne zrnko z podkladu, do suspenzného média. Povrchové napätie kvapalného polyméru je vybrané tak, aby nepretekalo otvormi.

Zrnká môžu byť vyrobené ako magnetické, buď pridaním magnetických častíc s chráničom alebo vhodným povlakom. Akonáhle sú zrnká uvoľnené, môžu byť izolované a zhromažďované vplyvom vonkajšieho magnetického poľa. To zvyhodňuje manipuláciu so zrnkami.

Do zrnka môže byť pridaný scintilant, napr. fluorid počas alebo po rozrysovaní. Väzobné príhody medzi rádioaktívne označenými ligandami v roztoku a scintilačným materiálom sú detekované detekciou zábleskov svetla.

Časticami sú prednostne mikročastice s maximálnym rozmerom 1 mm alebo menšie, prednostne 500 μm alebo menšie a ešte výhodnejšie 200 μm alebo menšie. Druhý a prípadne tretí rozmer takýchto mikročastíc je prednostne 100 μm alebo menší, výhodnejšie 50 μm alebo menší, napr. 25 alebo menší.

Častice môžu mať akýkoľvek tvar, napríklad doštičky alebo kotúča, ale prednostne sú paličkové častice.

Na poskytnutie priestoru pre značky, ktoré sú ako binárny kód schopné odlišne kódovať aspoň 32 000 rôznych častíc v rozmedzí povedzme 20 μm na značku, prednostné častice majú ako najväčší rozmer veľkosť aspoň 50 μm , výhodnejšie aspoň 100 μm . Častice v rozsahu veľkosti od 100 μm do 250 μm sú

preto prednostné. Knižnica častíc však nepotrebuje obsahovať množstvo až 32 000 rôznych kódovaných častíc a tak častice schopné niesť menej označovacích kódovacích prvkov sú napriek tomu užitočné. Napríklad knižnica s množstvom 4 000 častíc môže byť kódovaná iba 12 kódovacími prvkami.

Značky môžu byť vytvorené pozdĺž aspoň dvoch strán každej častice.

Častice môžu byť morfológicky kódované počas rozrysovacieho procesu tak, že celkový tvar častíc je určený vzormi trojrozmerných rysov, ktoré opatrujú každej častici jej strojne čitateľný kód.

Alternatívne môžu byť častice kódované, či už morfológicky alebo inak po rozrysovaní ich celkového tvaru, ale pred oddelením od podkladu.

Nemorfológické spôsoby kódovania obsahujú bielenie výberovej oblasti alebo nanášanie atramentu, farieb alebo farbív, ktoré môžu byť jednofarebné alebo viacfarebné alebo fluorescenčné alebo fosforescenčné.

Poklad, na ktorom sú častice tvorené rozrysovacím procesom, môže byť jednorázovým dielom ako doštička, ktorá je vyhodená po odobratí častíc z nej alebo to môže byť diel, ktorý tvorí konštrukčnú súčasť zariadenia, v ktorom sú častice následne použité, ako základná doska mikrotitrovej dosky, ako je podrobne opísané nižšie.

V obvyklom postupe podľa vynálezu obsahuje podklad základnú vrstvu a stratenú vrstvu, na ktorom je nesená fólia polymérneho materiálu na rozrysovanie na častice. Častice sú potom odobrané porušením adhézie častíc k stratenej vrstve. To môže byť spôsobené tak, že častice sú uvoľnené UV alebo iným žiarením alebo ďalšími prostriedkami, ako rozpustením rozpúšťadlom.

Častice sú prednostne tvorené vo fotocitlivom chrániacom polyméri a sú v ňom rozrysované použitím svetla cez masku určujúcu obrysy okrajov častíc. Alternatívne môžu byť rozrysované laserovým obrábaním.

Kódovanie použité na mikročastice môže pozostávať zo sekvencie binárnych znakov, napr. pozdĺž okrajov častíc. Každá častica môže byť opatrená jedným alebo viacej kódovacími znakmi slúžiacimi ako identifikátor zmyslu čítania, tj. označenie smeru, v ktorom má byť sekvencia binárnych znakov čítaná.

Alternatívne môže byť sekvencia binárnych znakov taká, že žiadna chyba identifikácie častice nenastane, hoci je sekvencia čítaná v akomkoľvek smere. To môže byť dosiahnuté len použitím sekvencií, ktoré čítané odzadu neodpovedajú

sekvencii žiadnej inej častice čítanej odpredu. Tak napríklad, ak jedno zrnko má sekvenciu 11101, neexistuje žiadna častica so sekvenciou 10111. Podľa potreby zrnká obrátenej sekvencie (tj. 100111 podľa tohto príkladu) môžu byť prítomné a čítačka použitá na čítanie sekvencií môže byť naprogramovaná, aby ich považovala za rovnaké.

Prípadne je kódovanie predmetom paritných pravidiel, ktoré pomáhajú odstrániť chybné čítanie kódu. Tak kódovanie môže byť také, že všetky kódy majú párny počet jednotiek. V alternatívnych paritne kódovaných sústavách majú všetky kódy nepárny počet jednotiek alebo párny alebo nepárny počet núl. To znamená, že ak jeden bit je chybné prečítaný, výsledok bude nezmyselný kód a čítanie bude vyradené.

Kódované častice môžu byť použité na rôzne ciele neobmedzene od použitia vzťahujúceho sa ku kombinátornej chémii. Tak napríklad môžu byť použité na poskytnutie sledovateľného označovacieho kódu začlenením do tovaru mnohých druhov. Častice nesúce určitý kód môžu byť vložené do farby nanášanej na výrobok, ktorý má byť sledovateľný, ako je automobil alebo iný predmet vysokej hodnoty. Môžu byť začlenené do dávok materiálov ako sú oleje, mazacie oleje, mazivá automatických prevodoviek, hydraulické tekutiny alebo chemikálie, aby pôsobili ako zápisy čísiel dávok. Kódy častíc môžu kódovať dátové informácie, ako je dátum výroby alebo plánovaný dátum výmeny.

Môžu byť taktiež samozrejme použité ako podklady pri vytváraní kombinatorickej chemickej knižnice, v ktorej veľký počet chemicky vzdialených materiálov je umiestňovaný na príslušné častice alebo časti častíc. To môžu byť oligoméne zlúčeniny navzájom sa líšiace v sekvenciách monoménych jednotiek, ako nukleové kyseliny alebo ich analógy (vrátane DNA, RNA, PNA a ďalšie modifikované analógy nukleových kyselín alebo ich hybridy), proteíny, polypeptidy alebo peptidy a oligosacharídy.

Všeobecne zlúčeniny z knižnice môžu byť buď najskôr syntetizované a potom viazané na svoje častice, alebo môžu byť syntetizované postupne na časticiach. Na každý spôsob počas pripájania zlúčenín môžu byť častice ešte pripojené k podkladu, na ktorom boli rozrysované, alebo môžu byť rozrysované, alebo môžu byť od neho oddelené.

Všeobecne je v chemickej knižnici určené, že každá častica nesúca určitý kód by mala niesť jednu známu zlúčeninu z knižnice chemických zlúčenín.

Hlavne tam, kde počet chemických entít v knižnici je väčší a aj tam, kde častice sú malé, môže sa stať, že objem zabieraný celou knižnicou častíc je príliš veľký z hľadiska ľahkosti manipulácie. V princípe, objem použitého časticového materiálu môže byť zmenšený zmenšením každej častice. Avšak ďalšie zmenšovanie častíc môže byť nežiaduce z rôznych dôvodov, vrátane ťažkostí, ktoré sa môžu prejaviť pri identifikácii častíc.

Častice podľa vynálezu môžu byť využité v chemickej knižnici obsahujúcej častice, z ktorých každá má aspoň prvú zónu a druhú zónu, pričom každá z uvedených zón má na sebe príslušný chemický člen uvedenej knižnice a každá častica má označenie slúžiace na identifikáciu častice a slúžiace na identifikáciu uvedených zón častice a tým na identifikáciu chemického člena knižnice na akejkoľvek vybranej zóne.

Použitím každej častice pre viac ako jednu chemickú entitu v knižnici, ale označením častice tak, aby každá chemická entita mohla byť oddelene identifikovaná podľa svojej čitateľnej polohy na častici, počet častíc potrebných pre knižnicu obsahujúcu určitý počet chemických entít môže byť zmenšený aspoň o polovicu.

Alternatívne, pre daný počet častíc a daný počet členov chemickej knižnice nesený na časticiach, môže byť zvýšený počet fyzických miest v knižnici častíc, na ktorých sa ktorýkoľvek určitý chemický člen môže nachádzať. Napríklad, ak knižnica podľa GB-A-2334347 pozostáva z n častíc nesúcich n zlúčenín (jedna zlúčenina na jednu časticu), s každou zlúčeninou sa môže stretnúť iba na jednom mieste v hmote častíc tvoriacich knižnicu. Avšak, ak podľa vynálezu sú na každej častici prítomné dve zlúčeniny bez zvýšenia hmoty časticového materiálu alebo množstva každej chemickej zlúčeniny v knižnici, umožní sa stretnutie s každou zlúčeninou na dvoch odlišných miestach. Tak môže byť znížený čas potrebný pre reakciu s knižnicou.

V princípe môže byť použitý akýkoľvek tvar častice. Napríklad častica môže mať kotúčový tvar so zónami obsadenými príslušnými členmi chemickej knižnice v tvare výseče a so zárezmi alebo inými podobnými značkami v jednej alebo viacej polohách po obvode na označenie identity každej zóny. Jedna taká obvodová značka postačí nezávisle od počtu použitých výsekov, pretože ktorýkoľvek výsek môže byť nájdený vzhľadom k jednej značke podľa svojej uhlovej polohy vzhľadom k nej.

Prednostne však každá častica má paličkový tvar s prvým koncom a druhým koncom s prvou zónou, ktorá sa rozprestiera z miesta na prvom konci alebo v blízkosti prvého konca a s druhou zónou, ktorá sa rozprestiera z miesta na druhom konci alebo v blízkosti druhého konca.

Každá častica môže mať označenie slúžiace na identifikáciu častice a značku slúžiacu na identifikáciu prvého konca alebo druhého konca častice.

Označenie môže byť tvorené tvarmi ako sú jamky, drážky, zárezy alebo hrbolky. Môže byť taktiež vytvorené ako fluorescenčné alebo farebné alebo jednofarebné značenie, ako pružky alebo bodky, ktoré môžu byť nanášané ako povrchové značky, napr. tlačou.

Vynález obsahuje spôsob výroby chemickej knižnice, obsahujúci fóliu podkladového materiálu nesúcu rozrysované prichytené častice, ako je opísané vyššie, (a) vytvorenie nánosov vybraných členov chemickej knižnice v známych príslušných priestorových zónach na povrchu častíc na podkladovom materiáli tak, že každá častica obsahuje aspoň dve z uvedených priestorových zón, z ktorých každá nesie odlišný z členov chemickej knižnice, pričom každá častica je označená kódom knižnice, a každá častica je označená kódom identifikujúcim časticu a ukazujúcim orientáciu častice vzhľadom k zónam tak, že každá zóna je samostatne identifikovaná.

Výraz „chemická knižnica“ zahŕňa „biologické knižnice“.

V závislosti od spôsobu rozrysovania častíc však ukladaniu chemických členov knižnice môže predchádzať alebo nasledovať tvorenie značiek identifikujúcich častice.

Chemické členy knižnice môžu byť oligomérne zlúčeniny, ako sú oligonukleotidy alebo peptidy, v ktorých monomérne jednotky vybrané z obmedzeného rozsahu chemický príbuzných zlúčenín sú usporiadané v sekvencii charakterizujúcej oligomér. Môžu to byť neoligomérne zlúčeniny, možno príbuzné s ďalšími členmi knižnice nejakou spoločnou štruktúrou alebo skutočnou alebo potenciálnou vlastnosťou. Zlúčeniny môžu mať zložitú štruktúru, napr. protilátky alebo inej biomolekuly.

Zlúčeniny z knižnice môžu byť vopred syntetizované a potom umiestnené na častice, alebo môžu byť syntetizované na povrchu častíc. Zlúčeniny môžu byť chemicky viazané na povrch častíc alebo môžu byť na ňom fyzikálne adsorbované.

Častice môžu byť porézne a zlúčeniny z knižnice môžu byť prítomné v póroch takej štruktúry, hoci sa dáva prednosť, aby zlúčeniny boli na povrchu častice.

Zrnká môžu byť akéhokoľvek vhodného tvaru. Prednostne sú zrnká navrhnuté ako tenké, bežne 25 μm , pravouholníkové tvary s bežnými dĺžkami 250 μm a šírkami 40 μm .

Akonáhle sú oligoméry alebo iné zlúčeniny nanesené na zrnká, jednotlivé skupiny zrníek môžu byť uvoľnené a upravené, napríklad použitím prietokovej cytometrie. Dlhý pomer strán pravouholníkových zrníek prispieva k dobrému miešaniu v kvete, čím podporuje účinné viazanie základní analytických vzoriek oligonukleotidov na komplementárne cieľové sekvencie.

Každé zrnko môže mať okolo svojho obvodu definované tvary dávajúce mu jedinečný kód. Štruktúrne uskutočnenie diskutované nižšie navrhuje, aby bolo kompatibilné s terajšími mikrotitrovými doštičkami s 96 jamkami, hoci uvedené postupy sú rovnako použiteľné pre väčšie veľkosti jamôk. Pri takýchto rozmeroch každá štvorcová jamka 3,5 mm môže ľahko obsahovať pole 100 krát (či 4000) zrníek. Celkový počet zrníek definovaný v obchodne dostupnej štruktúre 96 jamôk môže potom byť v rozsahu 384 000.

Na ilustráciu 200 μm zrnko môže mať svoj horný povrch vymedzený do dvoch zón, z ktorých jedna nesie prvý člen chemickej knižnice (biomolekulu 1') a druhá nesie druhý člen chemickej knižnice (biomolekulu 2'). Jeden koniec častice môže byť opatrený hlavou v tvare T s dlhším driekom ako podobná formácia na druhom konci, takže sú rozlíšiteľné. Prítomnosť člena knižnice môže slúžiť ako označenie identifikujúce čo je horný povrch na odstránenie nejednoznačnosti, ktorý dlhý okraj častice je ktorý. Alternatívne môže byť použité ďalšie kódové označenie slúžiace na identifikáciu jedného dlhého okraja častice.

Po vystavení testovacej zlúčenine, ktorá sa môže viazať alebo reagovať s kompatibilnou zlúčeninou na určitom zrnku v knižnici takých zrníek, môžu byť zrnká dôkladne prehliadnuté na identifikáciu, na ktorom zrnku a na ktorom konci zrnka nastala väzba alebo iná reakcia. To môže byť urobené vybratím zrníek z jamky a ich prechodom vhodným prietokovým systémom do detektora, v ktorom sú po jednom preskúvané. Keď je zodpovedajúca reakcia detekovaná, je prečítaný kód zrnka na identifikáciu reagujúcej zlúčeniny knižnice.

Prípadne každá častica v knižnici častíc, hoci na použitie, alebo inak vytvorená spôsobom podľa vynálezu, môže obsahovať fluorescenčný materiál, ktorý bol selektívne bielený na vybraných miestach na definovanie označenia tvoriaceho strojom čitateľný kód.

Fluorescenčný materiál môže byť polymér tvoriaci častice, alebo to môže byť vrstva materiálu nanosená na takýto polymér. Môže byť lokálne bielený použitím dostatočnej intenzity svetelnej energie, napr. z laseru. Môže byť vytvorený obrazec bielených bodov alebo prúžkov tvoriacich binárny kód. Alternatívne celá plocha častice môže byť bielená s výnimkou obrazca bodov alebo prúžkov tvoriacich binárny kód.

Laserová bieliaca operácia môže byť urobená namiesto opísanej laserovej rezacej alebo obrábacej operácie, zatiaľ čo častice sú udržiavané na podklade polymérnej vrstvy, ktorej uvoľnenie je aktivované svetlom alebo rozpúšťadlami. Deliace čiary medzi časticami môžu byť urobené laserovým rezaním alebo fotolitografiou. Napríklad môže byť použitá maska určujúca množinu mikročastíc pre expozíciu fotolitografickej fotocitlivej chrániacej polymérovej vrstvy nesenej na podklade fotoaktiváciou uvoľneným materiálom. Fotocitlivý chránič môže potom byť vyvolaný rozpúšťadlom na vytvorenie kanálikov pre ohraničenie uvoľniteľných častíc ako je opísané vyššie. Tie môžu byť vybielené pre vytvorenie kódových značiek s použitím lasera alebo iného svetelného zdroja a prípadne môže byť použitá chemická knižnica a častice môžu byť potom uvoľnené. Uvoľnené častice môžu byť ďalej spracované akýmkoľvek tu opísaným spôsobom.

Ak sa to požaduje, môže mať každá častica aspoň prvú zónu a druhú zónu, pričom každá zóna má na sebe príslušný chemický člen knižnice, každá častica má označenie slúžiace na identifikáciu častice a slúžiace na identifikáciu uvedených zón častice a tým na identifikáciu chemického člena knižnice na akejkoľvek vybranej zóne.

V princípe môže byť použitý akýkoľvek tvar častice. Napríklad častica môže mať tvar kotúča s vybielenými značkami kódovanými na jednej alebo viacej polohách okolo obvodu.

Prednostne však každá častica má paličkový tvar s vybielenými kódovými značkami vytvorenými pozdĺž každého dlhého okraja.

Každá častica môže mať označenie slúžiace na identifikáciu častice a koncovú značku alebo značky slúžiace na identifikáciu prvého konca a druhého konca častice.

Častice majú prednostne tu opísanú veľkosť.

Označenie môže byť vytvorené pozdĺž aspoň dvoch strán každej častice.

Ukladanie chemických členov knižnice môže predchádzať alebo nasledovať po vytvorení identifikačných značiek častíc a rozdelení spojitú fóliu do oddelených častíc.

Chemické členy knižnice môžu byť také, ako je opísané vyššie.

Zlúčeniny z knižnice môžu byť vopred syntetizované a potom umiestnené na častice, alebo môžu byť syntetizované na povrchu častíc. Zlúčeniny môžu byť chemicky viazané na povrch častíc, alebo môžu byť na nich fyzikálne adsorbované. Častice môžu byť porézne a zlúčeniny z knižnice môžu byť prítomné v póroch takej štruktúry, hoci je dávaná prednosť, keď sú zlúčeniny na povrchu častice.

Chemické knižnice zhotovené podľa vynálezu môžu byť využité v ktoromkoľvek z niekoľkých odborov, v ktorých boli v minulosti chemické knižnice používané alebo navrhované na použitie, vrátane skúšok odhaľujúcich drogy, skúmanie sekvencií DNA, imunologických skúšok a kombinatorickej chémie.

Existujú tri hlavné spôsoby, ako môžu byť chemické molekuly pripojené na častice alebo zrnká. Takéto molekuly obsahujú DNA, RNA, PNA, protilátky, antigény, proteíny, peptidy, ligandy, vírusové častice, fágy, bunky, chemické zlúčeniny atď. Molekuly môžu byť pripojené na zrnká, keď sú ešte na podklade, alebo pripojenie môže byť urobené po uvoľnení zrní. Materiály a postupy použité na výrobu zrní sú vhodne kompatibilné s aspoň jedným a výhodnejšie so všetkými tromi spôsobmi. Tieto tri spôsoby budú teraz podrobnejšie opísané.

V prvom spôsobe izolované alebo vopred syntetizované biomolekuly sú pripojené priamo na oddelené polymérové zrnká. Počas postupu pripájania sú zrnká stále na doštičke. Po pripojení sú zrnká uvoľnené. V druhom spôsobe sú zrnká oddelené z doštičky a uložené v oddelených nádobách tak, že kódy sú sekvenčné. Každá nádoba obsahuje množinu zrní rovnakého kódu. Vopred zhotovený oligomér z výberu je potom spojený priamo so zrnkami. Zrnká z rôznych nádob s rôznymi oligomérmi sú potom zmiešané pre nasledujúcu analýzu. V treťom spôsobe sú zrnká uvoľnené z podkladu do nosnej kvapaliny a sú postupne zmiešané s chemickými stavebnými blokmi. Alternatívne sú zrnká stále na podklade a

oligoméry sú budované na zrnkách postupne stupňovitým spôsobom. Výhody toho spôsobu sú : menšia manipulácia, priame budovanie rôznych molekúl na jednom podklade a zaistenie množstva oligomérov pomerne s malým počtom krokov.

Štyri prednostné spôsoby čítania kódov na časticách sú nasledujúce :

Výstup laserového lúča vhodnej vlnovej dĺžky je vedený optickými prvkami, ktoré prevádzajú lúč do tenkého vejárovitého lúča. Zárezy v zrnku prechádzajúcom prietokovou bunkou preruší lúč. Na detekovanie dopredu smerujúcej rozptýlenej energie môže byť senzor umiestnený v priamke s dopadajúcou energiou a za zrnkom. Výstup tohto senzora sa mení podľa množstva energie dopadajúcej na neho. V prípade dopredu smerujúcej rozptýlenej energie zárezy bránia, aby energia dosiahla detektor a medzery medzi zárezmi dovoľujú, aby energia dosiahla detektor. Ako dopredu alebo do strany rozptýlené signály alebo kombinácie týchto signálov môžu byť použité na odvodenie kódu na zrnku.

V ďalšom uskutočnení môžu byť pravouholníkové polymérne zrnká vyrobené s kovovými prúžkami tvoriacimi kód. Typickými kovmi, ktoré môžu byť použité sú nikel-chróm, titan a zlato. Keď sú použité zrnká v spojení s vyššie uvedeným systémom, je laserové svetlo silne absorbované v nekovových oblastiach a silne odražené v kovových oblastiach. Absorbovaný alebo odrazený výstup reprezentuje kódy.

V druhom spôsobe vysoko rýchlostná obrazová kamera zachytáva celý dvojrozmerný obraz zrnka. Kód na zrnku je odvodený podrobením zachyteného dvojrozmerného obrazu obchodne dostupného softwaru pre obrazovú analýzu. Alternatívnym spôsobom je využitie výhody vyplývajúcej zo skutočnosti, že zrnko sa pohybuje v prúde stacionárnej kamery a zachytáva jednorozmerné priamkové snímky vysokou rýchlosťou. Kompletný dvojrozmerný obrázok je tak vybudovaný zlúčením sérií týchto jednorozmerných priamkových snímok a analyzovaný ako predchádzajúci.

V treťom spôsobe je použitá viacnásobná obrazová analýza. To je významné hlavne pre mikrotitrový doskový formát. Zatiaľ čo sú zrnká v jamkách, je treba zobrazit' mnohé zrnká na vytvorenie snímky jamky a analyzovať obrazy off-line.

V štvrtom spôsobe sa používa prirodzená fluorescencie zrnka. Polymérové zrnká môžu byť zhotovené tak, že fluoreskujú, keď na ne dopadá svetlo určitej vlnovej dĺžky a vo vyššie nastavenom systéme v súlade s prvým čítacím spôsobom,

táto vlnová dĺžka je vlnová dĺžka príslušného laseru. Táto vlastnosť môže byť použitá na čítanie kódu na zrnkách s použitím detektorov fluorescencie. Ako je opísané podrobnejšie nižšie, miesto kódovania vytváraním zárezov po obvode zrnka, rovnaký kód môže byť zapísaný na zrnku s jednoduchým pravouhelníkovým obvodom využitím výhody buď základnej fluorescencie zrnka alebo fluorescencie ďalšieho materiálu naneseného na zrnko. Vo všetkých prípadoch je materiál miestne bielený vystavením dostatočnej intenzity svetelnej energie, napr. laseru. Rôzne nastavenia expozície majú za následok vytvorenie rôznych kódov, ako je dané nasledujúcim zoznamom, ktorý však nie je vyčerpávajúci :

Najzákladnejšie je použitie vysoko zaostreného lúča laserovej energie na zapísanie kódu priamo na zrnko.

Ako expozičný zdroj môže byť taktiež použitý interferometrový systém. Tieto systémy sú bežne používané pri produkcii hologramov.

Ďalší spôsob vytvárania kódov je priechodom laserového lúča dvoma optickými mriežkami, jednej pevnej, druhej otočnej po malých prírastkoch. Výsledný difrakčný obrázok je pridelený kód.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Nasleduje opis, v ktorom sú pomocou príkladov a odkazov na pripojené výkresy opísané uskutočnenia vynálezu. Na výkresoch :

Obr. 1 znázorňuje rez časti fólie polymérneho materiálu na podklade uvoľniteľnom UV žiarením ;

Obr. 2 znázorňuje pôdorys príkladu kódovanej častice ;

Obr. 3 znázorňuje rez časti rozrysovej fólie polymérneho materiálu na podklade uvoľniteľnom UV žiarením ;

Obr. 4 znázorňuje rez časti rozrysovej fólie polymérneho materiálu na podklade uvoľniteľnom UV žiarením na spodnej vrstve bežnej mikrotitrovej dosky ;

Obr. 5 znázorňuje pôdorys bežnej mikrotitrovej dosky obsahujúcej rozrysovanú fóliu polymérneho materiálu na podklade uvoľniteľnom UV žiarením ;

Obr. 6 znázorňuje bokorys časti bežnej mikrotitrovej dosky znázornenej na obr. 5 ;

Obr. 7 je schematickým znázornením bokorysu mikrotitrovej dosky znázornenej na obr. 5 a 6, spoločne s prostriedkami na odobratie zrníek z mikrotitrovej dosky ;

Obr. 8. znázorňuje výsledky čítania z čítacieho zariadenia kódu.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Nižšie opísaný spôsob môže vytvoriť ľahko ovládateľné zoskupenie oddelených častíc (alternatívne označených ako zrnká) polymérového materiálu. Monoméry ako nukleotidy môžu byť otláčené na horný povrch zrníek použitím systému typu atramentovej prúdovej tlačiarne. Zrnká môžu mať akýkoľvek vhodný tvar. Prednostne sú zrnká navrhované tak, aby mali tenké, typicky s hrúbkou 25 μm , pravouholníkové tvary s typickou dĺžkou 250 μm a šírkou 40 μm .

Akonáhle boli na zrnká nanesené monoméry, môžu byť jednotlivé skupiny zrníek uvoľnené a spracované použitím prietokovej cytometrie. U pravouholníkových zrníek pomer strán s prevažujúcou dĺžkou prepožičiava sám o sebe dobrú miešateľnosť v kvete a tým podporuje účinné viazanie základov na pôvodnej sekvencii.

Každé zrnko môže mať rysy definované po jeho obvode priradené mu jedinečný kód. Štrukturálne uskutočnenie, rozobrané nižšie, je navrhnuté tak, aby bolo kompatibilné s mikrotitrovými doskami s 96 jamkami, pretože uvedené postupy sú rovnako použiteľné pre väčšiu alebo menšiu veľkosť jamôk alebo počty. Pri takýchto rozmeroch každá štvorcová jamka s rozmerom 3,5 mm môže ľahko obsahovať pole 100 krát 40 (alebo 4000) zrníek. Celkový počet zrníek definovaných v obchodne dostupnej štruktúre s 96 jamkami bude preto v rozsahu 384 000.

V uskutočnení vynálezu znázornenom na obr. 1 fólia plastového materiálu 10, povedzme z 20 alebo 25 μm hrubého polyesteru alebo polykarbonátu je umiestnená na ďalšej plastovej fólii 12 so špecifickou vlastnosťou, že je to materiál uvoľniteľný UV žiarením (napr. 130 μm hrubý Furukava UV pás série SP). Obidve fólie sú uložené vzájomne na sebe s vylúčením všetkých vzduchových medzier.

Táto sendvičová štruktúra je uložená na plochý povrch vákuového spínača umiestneného na súradnicovom stolíku laserového mikroobrábacieho systému. Prednostne je použitý CO₂ laserový systém s galvanometrickou snímacou hlavou.

Typické galvanometrické snímacie polia majú rozmer 50 mm x 50 mm s vytvorenými 500 znakmi za sekundu. Bežné systémy majú 4 až 5 bitový kódovací systém. Toto uskutočnenie dovoľuje použitie napríklad 18 bitového kódovacieho systému vytvorením 18 „prvkov“ 14, ktorý môže byť zapnutý alebo vypnutý podľa potreby (obr. 2). Tu sa uvažuje so šírkou prvku 10 μm a s odstupmi medzi prvkami 10 μm. Ak sú všetky prvky definované na rovnakej strane, celková dĺžka zrnka bude tesne pod 500 μm, ktorá je považovaná za dlhšiu ako je optimum. Táto dĺžka môže byť znížená na 250 μm, ak sú prvky definované po oboch stranách. Čítačka bude potom potrebovať informácie týkajúce sa zmyslu čítania zrnka, napr. by mohlo nastať nepresné čítanie kódu, keď sa zrno pretočí apod. Tu je navrhnutý spôsob, keď pridanie dvoch ďalších znakov 15, 17 na zrno sa postará o všetky kombinácie zmyslu čítania.

Za predpokladu rozpätia 20 μm a 9 prvkov na každej strane je teraz dĺžka zrnka približne 250 μm, ktorá je prijateľná. Príklad 18 bitového zrnka je znázornený na obr. 2.

Najvyšší výkon laseru je nastavený tak, že plastový materiál 10 je v miestach 16 celkom prerezaný, ale pás 12 citlivý na UV žiarenie je iba „poznačený“ niekoľkými μm a je pre všetky zámery a ciele celkom neporušený. Na obr. 3 je znázornené, že integrita vrstvy uvoľniteľnej UV žiarením je v podstate neovplyvniteľná. Tomu sa dáva prednosť vo všetkých uskutočneniach vynálezu.

Opracovaný sendvič je odobratý z vákuového spínača a umiestnený na spodnú dosku 18 bežnej 96 jamkovej mikrotitrovej dosky 24 (obr. 4) na dodanie 4000 zrníek na jamku. Bežne existujú dosky, ktoré sú vyrábané tlakovým vstrekaním v jednom kuse a ďalšie, ktoré sú vyrábané v dvoch častiach s plochou základnou doskou ultrazvukovo zváranou s dierovanou hornou doskou 26. V prítomnom uskutočnení nukleotidy alebo oligonukleotidy 20 sú nanášané na povrch častíc ponechaných na základnej doske pred pripojením hornej dosky.

Horná doska mikrotitrovej dosky je teraz umiestnená na základnej doske na uzavretie laserom opracovanej vrstvy plastových častíc vo výsledných jamkách 22. Výsledná mikrotitrová doska je znázornená na obr. 5 a 6.

Ďalším krokom je vybratie skupiny zrníek (presný počet nie je dôležitý) v jednej operácii a ich spracovanie v ústrojnom roztoku prietokového systému.

Prvý krok je miestne porušenie lepivej vlastnosti na styku medzi UV pásom a špecifickou skupinou zrníek. Typické hodnoty lepivej sily UV pásu (v súčasnosti dostupného) sú 2,5 N/25 mm pred UV ožiarení a 0,05 N/25 mm po UV ožiarení. Typické dávky UV žiarenia požadované pre takýto účinok sú radu 1000 MJ/cm². V tomto uskutočnení zdroj 30, napr. impulzový laserový lúč dodávajúci energiu tohto typu veľkosti na pulz, je umiestnený na presnom súradnicovom stole a dodáva energiu zospodu mikrotitrovej dosky. Akonáhle bolo dodané potrebné množstvo energie na špecifickú skupinu zrníek, je druhým problémom vybratie tejto špecifickej skupiny zrníek.

Proces vybratia zrníek nesmie poškodiť horné povrchy obsahujúce podklady DNA. Jeden spôsob uskutočnenia je použitie plochej presne brúsenej dutej ihly alebo podtlakového vyberača 32 s vnútornými priermi v rozsahu medzi napr. 200 až 500 μm. Otvor môže byť uzavretý mikroporéznu membránou. Ihla sa upevní na presný súradnicový stôl a zamieri dole v jamke na skupinu 4000 zrníek. Postup výberu je znázornený na obr. 7.

Podľa potreby môže byť porézny a môže pôsobiť počas použitia častíc ako filter. Tak napríklad plastová vrstva na vytváranie častíc môže byť prevlečená cez stratenú plastovú vrstvu na povrchu porézneho podkladu, ako je acetylcelulóza nylón alebo polyétersulfón. Po rozrysovaní zrníek a nanosení členov chemickej knižnice na častice môže byť pripojená perforovaná doska na vytvorenie mikrotitrovej dosky. Po alebo pred pridaním skúšobných činidiel k časticiam môžu byť častice v jamkách dosky uvoľnené. Po každom pridaní kvapaliny v týchto procesoch môže byť prebytočná kvapalina odstránená cez filtračný materiál. Hlavne ak je stratená vrstva porušená pridaním rozpúšťadla na uvoľnenie častíc v jamkách, prebytočné rozpúšťadlo môže byť odsaté cez filter a/alebo podklad tak, aby častice zostali vo svojich jamkách.

Výsledkom vynálezu je výroba zrníek, ktoré majú priestorovo definované strojom čitateľné kódy. Môže byť jedno alebo niekoľko zrníek, ktoré nesú každý jednotlivý kód. Bežné na silikóne založené systémy majú značné nedostatky, ktoré zahŕňajú nízky pomer signálu k šumu a zlú difúziu počas miešania. Pri použití vynálezu výsledky dosiahnuté z takýchto rozsiahlych množstiev zrníek v jamke vedú

k vyššiemu stupňu spoľahlivosti v určovaní sekvencií. Na zaistenie dobrého miešania môže do prietokového systému prejsť až do celkových 4000 zrníek v jamke.

Požadovaná povrchová úprava môže byť prípadne uskutočňovaná mikroleptacím alebo elektrickým leštiacim postupom. Funkčné vrstvy môžu byť elektricky ukladané a/alebo pasívne nanášané.

Biovrstvy môžu byť „vzorované“ priamo na polymérové fólie atramentovou prúdovou tlačou. Oligoméry môžu byť vybudované priamou atramentovou prúdovou tlačou monomérov a tak znížením prebytku činidiel a problémov spojených s manipuláciou so zrnkami. Tento spôsob je obzvlášť použiteľný na výrobu oligonukleotidov.

Teraz je opísaný alternatívny výrobný spôsob výroby na polyméroch založených mikročastic.

V tomto spôsobe sa prednostne používa kremiková doštička ako podklad pre vyplývajúce kroky, hoci odborníkovi v odbore bude zrejmé, že môže byť použitý akýkoľvek plochý podklad, vrátane poréznych podkladov, ako bolo opísané vyššie. Kremiková doštička je vyčistená a vypálená a potom je na povrch podkladu pri otáčaní nanesený fotocitlivý chránič s hrúbkou približne 3 μm , ktorý pôsobí ako stratená vrstva. Typickým príkladom fotocitlivého chrániča pre tento krok je SPORLR30B z MicroChem Corporation Massachusetts.

Táto podzostava je potom pred nanesením ďalšieho fotocitlivého chrániča pri otáčaní vypálená. Druhá vrstva fotocitlivého chrániča má hrúbku približne 20 μm a je tvorená zosilneným negatívnym fotocitlivým chráničom, ako SU8-25, taktiež z MicroChem Corporation Massachusetts. To je podrobené predexpozičným vypálením v súlade s inštrukciami výrobcu. Potom je cez vrstvu SU8 umiestnená leptaná maska chróm na skle a vrstva je potom exponovaná použitím expozičného UV prostriedku alebo podobného excitačného zariadenia. Poexpozičné vypálenie je uskutočnené znova podľa inštrukcii výrobcu a exponovaný materiál je potom vyvolaný použitím odpovedajúcej vývojky na ponechanie poľa podľa patentu alebo profilovaných mikročastic na podkladovej doštičke.

Ako predtým, môžu byť mikročastice uvedené do funkčného stavu pred alebo následne po uvoľnení z doštičky. Uvoľnenie je uskutočnené použitím rozriedenej vývojky, ktorá rozpúšťa vrstvu SPORLR30B.

Použitím postupov vysvetlených vyššie môžu byť získané častice s dĺžkou radu 50 až 200 μm . Typické rozmery mikročastíc sú nasledujúce :

dĺžka	< 100 μm
šírka	30 μm
hrúbka	20 μm

Na použitie v chemickej knižnici je nevyhnutné zaistiť uvedenie častíc do funkcie, aby boli citlivé na chemikálie a biochemikálie, od ktorých sa očakáva, že budú vystavené v ďalšom spracovaní. Uvedenie do funkčného stavu môže byť uskutočnené akýmikoľvek vhodnými chemickými prostriedkami alebo plynovými prostriedkami, ako je plazmové leptanie, účinné pridanie požadovanej chemickej skupiny na povrch mikročastíc na spojenie analytických vzoriek alebo iných prekursorových špecií.

Napríklad vyššie opísané častice môžu byť uvedené do funkčného stavu, aby umožnili pripojenie DNA, presnejšie oligonukleotidu príslušnej DNA, ktorú má detekovať. V prvom kroku uvedenia do funkčného stavu sú mikročastice silanolované HMDS (hexametyldisilazanom) nasledovaným organosilanom, ako je N-2-aminoetyl-3-aminopropyl-trimetoxyasilan, ktorý tvorí samovytvárateľný sa film na hydroxylovaných povrchoch mikročastíc. Pretože nemodifikované oligonukleotidy nemôžu byť spojené priamo so silanolovými skupinami, povrch môže byť ďalej uvádzaný do funkcie NHS-biotínom, ktorým je N-hydroxysukcimididester-biotínový komplex. Ten spája povrch s aminoskupinou, ktorá je reprezentovaná silanovým filmom. Biotínová molekula potom reaguje so streptavidínom a proteínom. Streptavidín je potom použitý na viazanie biotinylovanej DNA, tvoriacej silnú nekovalentnú interakciu. Interakcia je dostatočne silná, aby odolala dôkladnému premývaniu vyžadovanému v neskorších krokoch na minimalizáciu nešpecifickej hybridizácie.

Presnejšie, ukladanie silanu môže byť uskutočňované prepláchnutím zrní v HMDS a vytvrdzovaním počas 30 minút pri teplote 50 °C. Počas približne 2 minút sa pridáva 2% TMS (N-2-aminoetyl-3-aminopropyl-trimetoxyasilan) v suchom acetóne. Zrnká sú prepláchnuté v suchom acetóne a vysušené.

V kroku uvádzania do funkčného stavu biotínom sú častice ponorené v 1 mg NHS-biotíne v 250 μl dimetylsulfoxidu (DMSO) a jemne pretrepané. Po štyroch

hodinách sú častice dvakrát premyté v DMSO nasledovanom fosfátom pufrovaným soľným roztokom.

Po dodržaní vyššie uvedenej procedúry, viazanie chemikálie bolo posúdené prostredníctvom pripojenia konjugovaného FITC-streptavidínu. 100 µg/l roztok streptavidínu bol nesuspendovaný vo fosfátom pufrovanom soľnom roztoku s 0,5 % pridaného Tween-20. Tween-20 je zmáčadlo. Streptavidínový roztok bol inkubovaný počas dvoch hodín s časticami. Nešpecificky viazaný streptavidín bol potom odstránený pretrepávaním častíc počas ďalších dvoch hodín vo fosfátovanom pufrovanom soľnom roztoku s 0,5 % pridaného Tween-20 (PBST).

Na skúšku hybridizácie bol streptavidín viazaný k biotinylatovanému povrchu. Ako vo fluorescenčnej streptavidínovej skúške opísanej vyššie, 100 µg/ml streptavidínový roztok v 0,05 % PBST bol inkubovaný s časticami počas dvoch hodín pri izbovej teplote s pretrepávaním. Potom nasledovalo dvojhodinové premývanie PBST na odstránenie nešpecificky viazaného streptavidínu.

Alternatívnym spôsobom pripojenia aminomodifikovaného oligonukleotidu je použitie homobifunkčného zosieťovadla ako je kyanurchlorid. Tieto spôsoby slúžia iba ako príklady a existujú ďalšie spôsoby dosiahnutia pripojenia molekúl k časticiam.

Po uvedení častíc do funkčného stavu s pomocou NHS-biotínu a streptavidínu bola pripojená biotinylatovaná DNA. Boli pripravené dve sady oligonukleotidov, pričom každá súprava presne odpovedá druhej. Oligonukleotidové sady mali dĺžku 12 nukleotidov. Jedna súprava obsahovala biotinylatovaný oligonukleotid, ktorý bol zakotvený k častici, zatiaľ čo druhá súprava obsahujúca komplementárne oligonukleotidy bola označená fluoresceínom. Obidve sady boli potom navzájom zmiešané v roztoku, ktorého podmienky boli vhodné pre hybridizáciu na otestovanie životaschopnosti systému.

Presnejšie, biotinylatované oligonukleotidy jednej sady boli inkubované s časticami pri koncentrácii 100 pM v 10 mM tris HCl, 1 mM a 2M NaCl počas 20 minút pri 30 °C. Potom nasledovali dva kroky premývania, jedným v tris pufre použitým na viazanie, nasledovaným premývaním v deionizovanej vode.

Druhá súprava oligonukleotidov, nesúca fluorescenčné označenie, bola inkubovaná s oligonukleotidmi viazanými na častice v 20 mM tris, 18 mM EDTA a 0,1 % Triton pri pH 8,5 počas 30 minút pri teplote 29 °C. To bolo optimálne pre hybridizáciu oligonukleotidových súprav.

Častice boli dvakrát premývané na odstránenie akejkoľvek neviazanej DNA a na zníženie fluorescence pozadia. Častice boli zviditeľnené pod fluorescenčným mikroskopom a fluorescencia bola detekovaná použitím nižšie uvedeného nastavenia pre umožnenie určenia prítomnosti viazanej DNA. Prítomnosť fluorescence na povrchu častíc indikuje, že hybridizácia, ktorá nastala potvrdzuje životaschopnosť tohto prístupu.

Florescenčné zobrazenie mikročastíc bolo dosiahnuté mikroskopom, 25 Mw nm argónovým iónovým laserom a CCD kamerou. Laserový lúč bol rozptýlený optickou šošovkou s ohniskovou dĺžkou 50cm a zapojený do epi-iluminačného systému mikroskopu s nastaviteľnými zrkadlami. Okuláry boli z bezpečnostných dôvodov vybrané a nahradené integračnou CCD kamerou Cohu so sedemvrstevným interferenčným filtrom pre priechod pásma 550 nm v dráhe na odstránenie hlavného lúča 488 nm. Kamera bola spojená s Scion LG-3 Nubus grabber v počítači Macintosh Quadra 800, ktorý obsahuje prostriedky pre riadenie integračných vlastností kamery. Systém manipulácie s časticami a ich detekcia používa mikroskop na zobrazenie kyvety. Prietokový cytometer bol modifikovaný pre manipuláciu so zrnkami a zrnká boli vedené systémom pri rýchlosti prúdu približne 1 meter za sekundu. Hoci môže byť použitý akýkoľvek osvetľovací bodový zdroj s veľkosťou bodu menšou ako najmenší znak v bunkách, bol v tomto prípade použitý lúč argónového iónového laseru (488 nm). Dopredu a postranné rozptýlené signály od zrní boli detekované použitím usporiadania fotodióda-fotonásobič.

Na obr. 8 pohľady (a) a (b) znázorňujú výstupné krivky získané od dvoch odlišne kódovaných častíc. Sú to absorpčné krivky, takže priehlbiny v krivke zodpovedajú výstupkom na povrchu mikročastice.

Pri modifikácii mikročastíc opísanej vyššie, sú vyrábané častice nesúce NiCr alebo iný odrazový povlak. Ak častice s odrazovým povlakom mali byť detekované použitím tu opísaného detekčného systému, môže byť sledovaný obrázok odrážania namiesto obrázku absorpcie. V obrázku odrážania vrcholy na krivke odpovedajú výstupkom na povrchu mikročastice, zatiaľ čo priehlbiny v krivke odpovedajú priehlbeninám v povrchu mikročastice.

Vhodná fotolitografická maska na použitie vo vyššie uvedenom postupe je rozdelená do množiny oblastí, z ktorých každá obsahuje množinu kódov. Každý vzor zrnka pozostáva zo 14 bitov a 7 μm znakov. Dĺžka typického zrnka je potom približne

98 μm . Hoci 14 bitov vedie k celkovému kódovému priestoru 16 384 kódov, existuje množstvo zlepšovacích znakov, ktoré znižujú počet kódov. Hoci to končí zmenšeným kódovaným priestorom, sú dosiahnuté jasné výhody.

Nasledujúce tri zlepšenia prepožičiavajú jasné výhody v oblasti zníženej možnosti chýb v detekcii :

- Maximálny počet po sebe idúcich bitov bol zvolený na štyri, to znižuje pôvodný kódový priestor zo 16 384 na 11 072.
- Používa sa paritné obmedzenie. To znamená, že zmena ktoréhokoľvek jedného z bitov na jeho doplnok má za následok neplatnosť kódu. To nastavuje takéto obmedzenie na buď párný alebo nepárny počet núl alebo jednotiek v každom platnom kóde. Vybrali sme párnú paritu jednotkového bitu tak, že počet jednotiek je vždy párný. To má ten účinok, že znižuje kódový priestor z 11 072 na 5 536.
- Odstránenie reverzných kódov pre zavedenie smeru čítania. Pre každý daný kód v sade je rezervný kód vypustený, tak ak je kód 321, môže to byť iba 321, pretože kód 123 bol vypustený z kódového priestoru. Tieto odstránenia znižujú kódový priestor z 5536 na 2724.

V nasledujúcom sú uvedené jasné výhody v oblasti manipulácie a detekcii chýb :

- Redundancia – počet duplicitných kódov. Usporiadanie zrníkov môže byť označené tak, že 2724 oddelených a po sebe nasledujúcich kódov je ohraničené v obdĺžnikoch s rozmerom nejakých 5 mm x 12 mm. Táto veľkosť bola zvolená s ohľadom na manipuláciu – po výrobe zrníkov a delení doštičky, tento obdĺžnik môže byť umiestnený do 1,2 ml skúmavky (napr. Eppendorf alebo podobne). Zavedenie tohto znaku znamená, že kompletná súprava zrníkov môže teraz byť obsiahnutá v malom objeme prístupnom na odstred'ovanie. Je možné uložiť 13 620 zrníkov do tohto obdĺžnika 5 mm x 12 mm a tak zaistiť redunďačné číslo 5 na kód.
- Kód taktiež vytvára 88 „palindrómov“, tj. kód sa číta rovnako, ak sa číta zľava doprava alebo sprava doľava. Príkladom toho je 00001000010000. Týchto 88 palindrómov bolo oddelených z kódovaného priestoru a použitých na ciele testovania a overovania chýb.

Hoci bol vynález vyššie opísaný s odkazom na určité uskutočnenia, bude odborníkom v odbore zrejmé, že sú možné jeho variácie a modifikácie bez toho, aby sa vybočilo z rozsahu nárokov, ktoré nasledujú.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Spôsob výroby kódovaných častíc, **vyznačujúci sa tým**, že obsahuje:
vytvorenie fólie z polymérneho materiálu na podklade ;
rozrysovania fólie do množiny častíc bez porušenia integrity podkladu ;
strojovo čitateľné kódovanie častíc a
odoberanie častíc z podkladu.
2. Spôsob podľa nároku 1, **vyznačujúci sa tým**, že častice sa morfológicky kódujú počas rozrysovania.
3. Spôsob podľa nároku 1, **vyznačujúci sa tým**, že častice sa kódujú po rozrysovaní, ale pred odobratím z podkladu.
4. Spôsob podľa nároku 1, **vyznačujúci sa tým**, že adhézia medzi fóliou a podkladom sa vytvorí na žiarení citlivej stratenej vrstvy, ktorej vlastnosti sa modifikujú na zníženie pevnosti adhézie pre uvoľnenie častíc.
5. Spôsob podľa akéhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, **vyznačujúci sa tým**, že častice sa rozrysujú laserovým obrábaním.
6. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, **vyznačujúci sa tým**, že kódovanie obsahuje vytvorenie množiny pripínateľných prvkov po obvode každej častice.
7. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, **vyznačujúci sa tým**, že každá častica sa vytvorí aspoň s jedným identifikátorom zmyslu čítania.
8. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, **vyznačujúci sa tým**, že strojom čitateľný kód sa vytvára bielením fluorescencie zložky každej častice.
9. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, **vyznačujúci sa tým**, že na príslušne kódované častice sa definované členy chemickej alebo biologickej knižnice naniesú pred odobratím z podkladu.
10. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 9, **vyznačujúci sa tým**, že na častice sa definované členy chemickej alebo biologickej knižnice naniesú v jamke mikrotitrovej dosky.

11. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 8, **vyznačujúci sa tým**, že na každú časticu sa naniesie alebo syntetizuje definovaný člen chemickej alebo biologickej knižnice po uvoľnení častice z podkladu.
12. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 9 až 11, **vyznačujúci sa tým**, že každá častica sa opatrí aspoň dvoma definovanými členmi chemickej knižnice, pričom každý člen zaberá svoj vlastný príslušný priestor na danej častici oddelene od priestoru zaberaného druhým členom.