PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2003-1119

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[7]:
C12N 13/00
C12N 15/89

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA

ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **19.10.2001**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **20.10.2000**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **2000/0003841**
(33) Země priority: **SE**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu:
(Věstník č: 3/2004)
(86) PCT číslo: **PCT/SE2001/002301**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2002/033066**

(71) Přihlašovatel:
CELLECTRICON AB, Göteborg, SE

(72) Původce:
Orwar Owe, Hovas, SE
Karlsson Mattias, Göteborg, SE
Chiu Daniel, Seattle, WA, US

(74) Zástupce:
Čermák Karel jr., JUDr. Ph.D., Národní 32, Praha 1, 11000

(54) Název přihlášky vynálezu:

Způsob penetrace lipidových dvouvrstvých membrán a mikroinjekční metoda

(57) Anotace:

Uvádí se způsob penetrace lipidových dvouvrstvých membrán s cílem zavést špičku dutého jehlovitého předmětu, například mikropipety, do prostoru ohraničeného lipidovou dvouvrstvou membránou, kde se tento prostor umístí mezi jehlovitý předmět, který je opatřen první, výhodně vnitřní elektrodou, přičemž špička tohoto jehlovitého předmětu se umístí do kontaktu s tímto prostorem tak, že aplikuje mechanickou sílu na lipidovou membránu tohoto prostoru, čímž ji mechanicky deformuje, a druhou elektrodu, načež se mezi elektrodami aplikuje přechodný elektrický impuls 1 až 10^3 V/cm. Čehož výsledkem je soustředěné elektrické pole přes tento prostor, které indukuje dielektrický rozklad lipidové membrány, což způsobí penetraci jehlovitého předmětu do prostoru. Uvádí se i způsob elektroinjekce na bázi výše uvedeného způsobu, kde se látky zavádějí přes jehlovitý předmět a do prostoru po penetraci jehlovitého předmětu.

CZ 2003 - 1119 A3

13.05.03
PV 2003-1119
36688

Způsob penetrace lipidových dvouvrstvých membrán a mikroinjekční metoda

Oblast techniky

Předložený vynález se týká způsobu penetrace lipidových dvouvrstvých membrán s cílem zasunout špičky jehlovitých předmětů do prostorů uzavřených v lipidových membránách, jako jsou buňky a lipozomy. Vynález se týká i způsobu vstřikování látky do lipidového dvouvrstvého uzavřeného prostoru, jako je například buňka, nebo přesněji mikroinjekční metody využívající koncepci elektromechanické destabilizace v zájmu efektivního zavádění látek, jako jsou biopolymery, koloidní částice a jiné biologicky relevantní molekuly do jednotlivých, lipidovou dvouvrstvou uzavřených prostorů velikosti buňky.

Dosavadní stav techniky

V současnosti se projevuje rostoucí zájem o zasouvání mikroelektrod, mikrokapilár a mikropipetových senzorů do jednotlivých buněk. Existuje též rostoucí zájem o zabudování takových prostředků submikronového snímání, odběru vzorků a zesilování signálu jakož i velkých biopolymerů do jednotlivých buněk a lipozomů. Několik ultracitlivých metod detekce a snímání je založených přímo nebo nepřímo na použití koloidních částic. Mezi příklady patří kvantové bodové biokonjugátové senzory[1,2], rodina senzorů Probes Encapsulated By Biologically Localized Embedding (PEBBLE)[3] a koloidy stříbra (Ag) a zlata (Au) na použití při měřeních metodou Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS)[4-6]. Jedním z hlavních omezení praktického využití těchto technik je náročnost neinvazivního a kvantitativního zavedení

koloidních částic do interiéru buňky[7]. Bylo by atraktivní zaměřit zavedení částic do specifických subcelulárních prostorů, jako je cytosol, jádro nebo dokonce organely jednotlivých buněk.

GUV jsou lipozomy velikosti buňky sestávající z jedné lipidové dvouvrstvy s uzavřeným vodním prostorem[8]. Takové lipozomy jsou vhodné na použití jako ultramalé reakční nádoby, ve kterých je studovaná reakce omezená a oddělená od vnějšího prostředí. Jako takové je jich možné použít na studie dynamiky biochemických reakcí v prostorách napodobujících přírodní vnitrobuňkové nebo vnitroorganelové prostředí[9-12].

Když se mají vezikuly použít jako reakční nádoby, je potřeba do nich zavést reaktanty, které zahrnují biopolymery jako DNA a koloidní částice nebo organely (syntetického nebo přírodního původu). Zavedení lipozomů lze v zásadě uskutečnit přidáním částic během přípravy vezikul, poněvadž při vytváření uzavřou část média, v kterém se vytvářejí. Účinnost takového zachytávání je ale pro malé lipozomy omezená dokonce i pro nízkomolekulové sloučeniny a zachycení větších struktur, jako jsou koloidy, má velmi nízkou pravděpodobnost[13,14].

Dalším přístupem pro zavádění látek do lipozomů je zavedení materiálů do napřed vytvořených vezikul pomocí mikromanipulačních technik vyvinutých pro zavádění látek do jednotlivých buněk. Jednou takovou technikou, která je vhodná pro použití, je mikroinjekční technika[15].

Použitím mikrojehel vyrobených z kapilár z vytahovaného skla s vnějšími průměry špičky v rozmezí 200 - 500 nm lze penetrovat membránovou stěnu lipozomu nebo buňky a vytlačit kontrolované objemy požadovaného reagentu do vezikuly[16]. Injekční

objemy jsou zpravidla v rozmezí pikolitrů až attolitrů a řídí se regulací injekčního času a injekčního tlaku. Tlak se obyčejně vytváří použitím vzduchotlakových nebo olejovo-hydraulických systémů.

Všechny mikroinjekční techniky jsou založené na mechanické permeabilizaci lipidových membrán. Když se aplikuje mechanická bodová zátěž, např. kapilárou, na membránu lipozomu nebo buňky, membrána je nucena roztáhnout se a izotropické membránové napětí fungující v rovině membrány se zvýší. Při dostatečně vysokém membránovém napětí se strukturní integrita lipozomu nebo buňky na moment ztratí a v membráně se vytvoří díry, přes které se uvolňuje vnitřní tekutina, aby se vyrovnalo zvýšení membránového napětí. K tomuto narušení membrány dochází v místě nejvyšší mechanické zátěži, což je místo, kde se aplikuje bodová zátěž, což umožňuje zasunutí mikroinjekční kapiláry do interiéru lipozomu nebo buňky.

Zatím co mikroinjekce dobře funguje při jistých typech buněk a multilamelárních lipozomů, existuje několik nedostatků mikroinjekčních technik při unilamelárních vezikulech a mnohých typech buněk. Lipidové membránové dvouvrstvy jsou zpravidla velmi elastické a nepřítomnost vnitřních nosných struktur v unilamelárních lipozomech způsobuje, že se velmi těžko penetrují mechanickými prostředky. Vnější průměr špičky vhodné pro injekci do tenkostěnných lipozomů a menších buněk je přibližně 200 nm a vnitřní průměr je zpravidla v rozmezí jen 100 nm[16,17]. Takové špičky jsou velmi křehké a mimořádně těžko pozorovatelné ve světelném mikroskopu, což zhoršuje jejich umístění. Hlavním nedostatkem použití injekčních špiček s malým vnitřním průměrem je však požadavek na použití ultračistých

injekčních kapalin, aby se předešlo ucpání, což omezuje injektované látky na roztoky nízko- a středněmolekulových sloučenin. Mikroinjekční techniky se považují za poměrně invazivní v důsledku velkých aplikovaných mechanických sil včetně trvalého poškození membrány a dokonce lýzy buněk a lipozomů.

Alternativním přístupem pro zavádění látek do jednotlivých lipozomů nebo jednotlivých buněk je použití mikroelektroporace[18]. Tato technika je založená na teorii elektropermeabilizace. Když se lipozom nebo buňka vystaví působení elektrického pole, na membráně se vytvoří potenciálový spád. Při dostatečně vysoké intenzitě pole se překročí kritický transmembránový potenciál V_c membrány a v lipozomové nebo buňkové membráně se vytvoří malé póry v důsledku dielektrického rozpadu membrány. Transmembránový potenciál V_m na různých místech na membráně kulové vezikuly během vystavení působení homogenního elektrického pole s trváním t lze vypočítat z následujícího vzorce:

$$V_m = 1,5\ r_s\ E \cos \alpha (1-\exp(-t/\tau))$$

kde E je intenzita elektrického pole, r_s je poloměr koule, α je úhel vzhledem na směr elektrického pole a τ je kapacitně-odporová časová konstanta. Pro tvorbu pórů dojde na sférických souřadnicích vystavených největšímu potenciálovému posunu, který je na pólech obrácených k elektrodám. Typická hodnota pro V_c pro vezikulu velikosti buňky je ~1V a odpovídající intenzita elektrického pole potřebná na překročení kritického transmembránového potenciálu V_c je v rozmezí od 1 do 10 kV/cm.

Při mikroelektroporaci se analyt, který se má enkapsulovat, přidává do vnějšího roztoku lipozomů nebo buněk a potom se

lokálně aplikuje elektrické pole pomocí mikroelektrod. Množství analytu, které se dostane do vezikuly, závisí na koncentračním gradientu analytu, membránovém potenciálu, trvání aplikovaného pole a rychlosti difuze analytu[19]. Nedostatky elektroporační techniky jsou těžkosti kvantitativního zavedení a zavádění struktur velikostí větších jako účinný průměr pórů, který je pro elektropermeabilizované erytrocyty v rozmezí od 1 do 240 nm[20,21]. Aby se zlepšilo kvantitativní zavedení, kontrolovaná množství analytů lze zavádět přes malou špičku mikropipety zavedenou přes otvor vytvořený elektroporací (jako je popsáno například v JP 8322548). Tento přístup však má několik nevýhod včetně potřeby aplikovat poměrně silné elektrické pole (~ 1V), aby se vytvořil otvor pro zavedení špičky.

Kombinací elektroporace a aplikace mechanické síly na membránovou vezikulu lze sílu aplikovaného elektrického pole potřebného na permeabilizaci membrány podstatně snížit[25]. Tento jev se někdy označuje jako elektromechanická destabilizace. Ukázalo se, že elektrické pole vytvořené přes lipidové dvouvrstvé membrány vyvolávají elektrokompresivní mechanické napětí σ_e, které působí na lipidovou membránu. Tato síla působí kolmo na rovinu membrány a vede ke snížení tloušťky membrány. Když předpokládáme, že lipidová membrána se chová jako kondenzátor, potom je elektrokompresivní síla přímo úměrná spádu napětí V přes membránu a tím intenzitě aplikovaného elektrického pole

$$\sigma_e = \frac{1}{2}\varepsilon\varepsilon_0 \cdot \left(\frac{V}{h_e}\right)$$

kde ε je relativní dielektrická konstanta, ε_0 je permitivita a h_e je dielektrická tloušťka membrány.

Diferenciální celková mechanická práce dW vykonaná na lipidové membráně je potom jednoduše sumou elektrokompresivního napětí σ_e a izotropického membránového napětí $\bar{T}$, což je řízeno množstvím mechanické deformace aplikované na membránu

$$dW = \left[\bar{T} + \frac{1}{2}\varepsilon\varepsilon_0\left(\frac{V}{h_e}\right)\cdot h\right]dA$$

kde h je celková tloušťka lipidové dvouvrstvé membrány a dA je změna v ploše membrány. V důsledku toho když se na membránovou vezikulu aplikuje mechanická deformace, transmembránový potenciál potřebný na dosáhnutí permeabilizace lze výrazně snížit. Proto tento přístup k membránové permeabilizaci může být ještě méně invazivní jako elektroporace, protože lze použít nižší elektrická pole, což minimalizuje riziko nežádoucích elektrochemických reakcí na povrchu membrány buňky nebo lipozomu.

Podstata vynálezu

Předložený vynález se týká nového přístupu na zasouvání mikropipetových špiček nebo jakýchkoli jiných válcovitých nebo dutých jehlovitých předmětů, jako jsou například mikroelektrody, do prostorů vytvořených lipidovými dvouvrstvými membránami, jako jsou například buňky nebo lipozomy. Základní myšlenkou je destabilizace mechanicky deformovaného prostoru uzavřeného lipidovou membránou pomocí elektrických pulsů, což ulehčuje penetraci mikropipety.

Vynález se týká také způsobu zavádění látek, například vysokomolekulových sloučenin jako i koloidních částic, do prostorů vytvořených lipidovými dvouvrstvými membránami, jako

jsou GUV, buňky a jiné podobné struktury uzavřené membránami, aplikováním koncepce elektromechanické destabilizace membrány na mikropipetovou injekční techniku. Jedinečná výhoda takového uspořádání vyplývá z kombinace vysokého stupně prostorové a objemové kontroly mikroinjekce a účinné a neinvazivní premeabilizace membrány elektromechanickou destabilizací, čím se umožňuje kvantitativní zavedení analytů, biologicky relevantních molekul a částic včetně koloidů do unilamelárních lipozomů a buněk.

Vynález se konkrétněji týká způsobu penetrace prostoru vytvořeného alespoň jednou lipidovou dvouvrstvou membránou s cílem zasunout špičku alespoň jednoho dutého jehlovitého předmětu do tohoto prostoru, přičemž se tento prostor umístí mezi tento alespoň jeden jehlovitý předmět, například mikropipetu naplněnou elektrolytem, opatřený první elektrodou, která je s výhodou interní elektrodou, a druhou elektrodou, kde špička tohoto alespoň jednoho jehlovitého předmětu je umístěna do kontaktu s tímto prostorem tak, že tato špička alespoň jednoho jehlovitého předmětu aplikuje mechanickou sílu na lipidovou dvouvrstvovou membránu tohoto prostoru, čímž mechanicky deformuje tento prostor, přičemž se aplikuje dočasný elektrický impuls 1 až 10^3 V/cm mezi první elektrodou a druhou elektrodou, výsledkem čehož je souštředěné elektrické pole přes tento prostor, kteréžto elektrické pole indukuje dielektrický rozpad lipidové dvouvrstvy, což způsobí, že špička uvedeného alespoň jednoho jehlovitého předmětu penetruje membránou uvedeného prostoru. Tento alespoň jeden jehlovitý předmět je dutý a s výhodou konstruovaný z izolačního materiálu a je vyplněný elektricky vodivým roztokem nebo disperzí látky.

První elektroda je s výhodou interní elektroda, to je nachází se uvnitř tohoto dutého jehlovitého předmětu. Elektroda je s větší výhodou připojena na tento alespoň jeden jehlovitý předmět, který je v tomto případe naplněný elektrolytem, ve kterém je umístěná elektroda. Toto vytvoření má několik výhod. Například na špičce uvedeného alespoň jednoho jehlovitého předmětu neprobíhá žádná elektrochemická reakce, protože elektroda se nachází v určité vzdálenosti od špičky tohoto alespoň jednoho jehlovitého předmětu. Přítomnost takové elektrochemické reakce by jinak měla nepříznivý vplyv na prostor především v případech, kdy je prostorem buňka, protože by se potom narušilo zdraví a přežití buňky.

Když špička jehlovitého předmětu, například špička mikropipety, penetruje do prostoru, lze do něj injikovat jakýkoliv roztok nebo disperzi nacházející se v mikropipetě řadou způsobů včetně tlakem indukovaného a elektroosmotického toku, načež lze mikropipetu vybrat, a toto se používá jako základ mikroinjekční nebo elektroinjekční metody podle vynálezu.

Zde popsaná elektroinjekční technika má několik jednoznačných výhod v porovnání s tradičními vpichovými mikroinjekčními protokoly. Především tato technika je méně invazivní. Protože membrána je elektricky destabilizovaná, je potřebná menší mechanická síla pro penetrování lipidové membrány mikropipetou nebo jakýmkoliv jiným jehlovitým předmětem mikroskopických rozměrů. V důsledku toho je zde menší pohyb injekční kapiláry během jejího umístění uvnitř lipozomu nebo buňky. Takové pohyby můžou vyvolat těžké trauma buňky způsobené poškozeními buněčného matrixu.

V porovnání s elektroporačními protokoly jsou na dosáhnutí destabilizace membrány potřebné mnohem nižší transmembránové potenciály. Často je generovaný transmembránový potenciál jen několik mV (což je dále vysvětleno v níže uvedených příkladech) dva až tři nižší jako V_m používaný při elektroporaci. Mnohem nižší elektrická pole znamenají menší elektricky indukované trauma buňky jako i minimalizaci rizika nežádoucích elektrochemických reakcí na povrchu membrány buňky nebo lipozomu. Použití velmi nízké intenzity elektrického pole je při skutečnosti, že membrána je pod mechanickou deformací, taktéž efektem vysoko soustředěného elektrického pole, které se používá. Když se mezi první a druhou elektrodou aplikuje napětí, nevodivý materiál jehlovitého předmětu, například mikropipety, směřuje celé vytvořené elektrické pole přes otvor konce špičky pipety. V důsledku ta část lipidové membrány, která je v kontaktu s koncem špičky jehlovitého objektu, je vystavená působení celého elektrického pole. Koordináty maximální elektrokompresivní síly se takto prostorově shodují s místem, kde se aplikuje maximální mechanická síla.

Prezentovaný způsob zasouvání špičky jehlovitého předmětu, například mikropipety, do prostorů, jako jsou lipozomy a buňky, je mnohem účinnější než standardní vpichové mikroinjekční protokoly. V důsledku toho lze použít mikropipety větších průměrů, což umožňuje injekce velkých struktur do unilamelárních vezikul jako i buněk. Z tohoto vyplývá několik možností. Jednou z atraktivních aplikací je kvantitativní zavedení nanosenzorů[1-3] nebo koloidů pro měření SERS[4-6] do buněk na detekci molekul nebo na sondování vnitrobuněčných struktur. Další aplikací je zavádění těchto částic do lipozomálních reakčních nádob. Takový

postup by umožnil studie složitých biochemických reakcí, kde by bylo možné monitorovat vznik několika produktů a intermediátů současně. Zavedením organel (přírodního nebo syntetického původu) nebo dokonce bakterií do unilamelárních vezikul lze vytvořit vysoko progresivně buněčné modely. Toto je velmi atraktivní pru studie například složitých biochemických signalizačních systémů, které se translokují mezi různými vnitrobuněčnými prostory.

Zde popsanou elektroinjekční techniku lze uskutečňovat s velmi vysokými mírami úspěšnosti a tato technika umožňuje sekvenční injekci vícero reagentů do jednotlivých lipozomů a buněk bez pozorovatelného unikání. Proto lze praktikovat iniciaci složitých biochemických reakcí uvnitř prostoru lipozomu nebo buňky. To též umožňuje vykonávat derivatizační chemii na ultramalé škále uvnitř lipozomu nebo buňky s cílem označit analyt před mikrochemickými separacemi.

V kombinaci s ultratenkými injekčními jehlami používanými pro konvenční mikroinjekce[17] je způsob podle předloženého vynálezu výkonnou technikou pro zavádění nízko- a středněmolekulových sloučenin do menších buněk nebo dokonce organel. Je to důsledkem účinné schopnosti elektroinjekční techniky penetrovat přes membránu.

Další aplikace je v oblasti takzvaných injekcí čipového pole. Jelikož je zde prezentovaná technika vysoko účinná vzhledem na schopnost penetrace membránou, je praktické zkonstruovat systém pole injektorů, kde je seskupeno vícero špiček injekčních jehel, což umožňuje paralelní injekci velkého počtu buněk současně.

Podrobný popis vynálezu

Jak je uvedeno výše, předložený vynález se týká způsobu penetrace lipidových dvouvrstvých membrán s cílem zasunout alespoň jednu špičku alespoň jednoho jehlovitého předmětu, například špičky mikropipety, do prostorů uzavřených v lipidových membránách. Způsob se konkrétněji používá pro penetraci do prostoru obaleného alespoň jednou lipidovou dvouvrstvou, kde se tento prostor nejdříve umístí mezi dutý, elektrolytem naplněný nevodivý jehlovitý předmět, například mikropipetu, vybavený první elektrodou, s výhodou vnitřní elektrodou, to je elektrodou umístěnou uvnitř tohoto jehlovitého předmětu, přičemž špička tohoto alespoň jednoho jehlovitého předmětu se umístí do kontaktu s tímto prostorem tak, že tento jehlovitý předmět aplikuje mechanickou sílu na lipidovou membránu tohoto prostoru, čímž mechanicky deformuje tento prostor, a druhou elektrodu, načež se použitím nízkonapěťového zdroje aplikuje dočasný elektrický impuls 1 až 10^3 V/cm mezi první elektrodou a druhou elektrodou, čímž se vytvoří elektrické pole mezi první a druhou elektrodou procházející přes konec špičky jehlovitého předmětu, výsledkem čehož je vysoko soustředěné elektrické pole přes membránovou část tohoto prostoru, která je v kontaktu s jehlovitým předmětem, přičemž toto elektrické pole indukuje lokální dielektrický rozpad části mechanicky deformované lipidové dvouvrstvy, která je v kontaktu s tímto jehlovitým předmětem, což způsobí, že špička jehlovitého předmětu penetruje membránu prostoru.

Dále se místo pojmu jehlovitý předmět používá pojem mikropipeta, ale co je uvedené pro mikropipetu, je platné i pro jiné jehlovité předměty, jako jsou jiné válcovité nebo duté

jehlovité předměty vhodné velikosti, například kapiláry, ultratenké injekční jehly a mikroelektrody. Dále tento pojem zahrnuje i pole takových jehlovitých předmětů, které mohou být například instalovány na čipu. Navíc mikropipeta bude naplněna vodivým médiem, aby se umožnil elektrický kontakt mezi první elektrodou a druhou elektrodou.

Uvedená dutá nevodivá mikropipeta je naplněna elektricky vodivým roztokem nebo disperzí látky. Když mikropipeta penetruje do prostoru, jakýkoliv roztok nebo disperzi látky obsaženou v mikropipetě lze injikovat do prostoru, načež lze mikropipetu vybrat. Kromě toho mikropipeta a mikroelektroda tvoří pinzetu umožňující manipulaci a následnou injekci do volně se vznášejících buněk a lipozomů.

Látkou obsaženou v mikropipetě a injikovanou do buňky nebo lipozomu může být například nízko- nebo středněmolekulová látka, například barvivo, biolpolymer, například DNA, RNA nebo protein, koloidní částice, například koloidní granule, nanosenzor, organela nebo baktérie. Výraz „nízko- nebo středněmolekulová látka" označuje látku s molekulovou hmotností do několika kDa, například do 3 kDa. Látka se s výhodou injikuje do prostoru ve formě roztoku nebo disperze. Do buňky nebo jiného unilamelárního prostoru se injikuje malý objem, zpravidla 50 až 500 x 10^{-15} l roztoku nebo disperze.

Uvedený prostor bude vytvořen nebo ohraničen alespoň jednou lipidovou dvouvrstvou membránou. Může to být například lipozom, vezikula, organela, buňka, multilamelární lipozom (MLV) nebo gigantická unilamelární vezikula (GUV). Způsob podle vynálezu je zajímavý pro gigantické unilamelární vezikuly a buňky. Velikost

těchto unilamelárních prostorů může být velikost organely nebo buňky, to je s průměrem 0,1 až 10^3 μm.

Mikropipeta by měla být vyrobena z nevodivého materiálu, aby obsáhla a soustředila aplikované elektrické pole přes otvor konce špičky (konce nejblíže k prostoru) této mikropipety a může to být například skleněná, křemenná nebo plastová mikropipeta. Mikropipeta bude mít s výhodou vnější průměr na špičce 10 nm až 100 μm a vnitřní průměr, to je průměr dutého prostoru uvnitř mikropipety, 0,05 až 95 μm. Navíc mikropipeta bude naplněna vodivým médiem, aby se umožnil elektrický kontakt mezi první elektrodou a druhou elektrodou. Mikropipeta bude vybavena první elektrodou, s výhodou vnitřní, vysokovodivou elektrodou, například Pt-, Ag-, Au- nebo uhlíkovláknovou elektrodou; lze však použít elektrodu z jakéhokoliv vhodného vodivého materiálu. Špička první elektrody umístěna uvnitř mikropipety by měla být umístěna v určité vzdálenosti, s výhodou 0,5 až 1 cm od špičky mikropipety, aby se zabránilo přímému kontaktu mezi touto první elektrodou a lipidovou dvouvrstvou membránou prostoru, čím se membrána chrání před elektrochemicky generovanými reaktivními částicemi a/nebo plynovými bublinkami, které by se mohly tvořit na povrchu první elektrody.

Tato druhá elektroda může sestávat z jakéhokoliv vhodného vodivého materiálu. Může to být uhlíkovláknová, kovová nebo skleněná mikroelektroda. Druhá elektroda bude mít s výhodou průměr na konci umístěném u prostore přibližně 1 až 10^3 μm. První a druhá elektroda mohou být podobné nebo různé. Je též praktické nahradit druhou elektrodu typu uzemňovací lázně.

Napěťový impuls použitý na získání vysoko soustředěného elektrického pole mezi první a druhou elektrodou indukujícího dielektrický rozklad lipidové dvouvrstvy bude dočasný elektrický impuls intenzity pole 1 až 10^3 V/cm. S výhodou se používá dočasný 0,01 až 10 ms, impuls jednosměrného proudu s pravoúhlou vlnou 10 až 60 V/cm, ale lze použít i jiný tvar impulsu jako i střídavé napětí.

Když se špička mikropipety vloží do prostoru ohraničeného lipidovou membránou, mikropipetu lze použít na několik různých účelů. Mikropipetu lze použít například na odběr vzorků látek uvnitř prostoru, lze ji použít i jako senzor, například optovláknový nebo elektrochemický mikrosenzor používaný na vnitroprostorová měření nebo jako mikroelektrodu. Mikropipetu lze dokonce použít pro injekci látky do prostoru.

Látku lze do prostoru zavést mnoha různými způsoby. Lze například použít techniku na bázi elektroforézy, elektroendoosmózy, gravitačního toku nebo mikroinjekci pomocí stlačeného vzduchu nebo oleje, nebo teplocitlivého expanzního média.

Když se látka zavede do prostoru ohraničeného lipidovou membránou, prostor lze použít na mnoho různých účelů. Když jsou například zaváděnou látkou koloidní částice, například Ag nebo Au koloidy, kvantové bodové biokonjugátové senzory[1,2] nebo PEBBLE senzory[3], prostor lze použít v spojení s ultracitlivou detekční nebo snímací metodou, například SERS nebo kvantitativními fluorescenčními měřeními, na detekci konkrétních látek.

Další zajímavou aplikací je zavedení materiálu do specifických subcelulárních prostorů, jako je cytosol, jádro nebo dokonce organely jednotlivých buněk.

Přehled obrázků na výkresech

Níže jsou uvedeny odkazy na připojené výkresy, kde:

Obrázek 1 je schematický nákres kapilárního držáku sestávajícího z hlavního tělesa (II) opatřeného Pt drátěnou elektrodou připojenou na pin konektoru (III) a vstupem pro mikroinjektorový výstup (I). Injekční špičky (VI) jsou drženy na místě dvěma gumovými kroužky (IV) a šroubovací čepičkou (V).

Obrázek 2 ilustruje elektroinjekci fluoresceínu do gigantického unilamelárního lipozomu. (A) je obraz diferenciálního interferenčního kontrastu (DIC) představující dva multilamelární lipozomy s dvěma sousedními unilamelárními lipozomy umístěnými na povrchu krycího sklíčka. Mikroelektroda a injekční kapilára byly umístěny v protilehlé pozici blízko cílového lipozomu. (B) ilustruje, jak byl aplikovaný mechanický tlak na lipozom pohybem injekční špičky směrem k mikroelektrodě, což lipozomu vnutilo ledvinovitý tvar. (C) ilustruje, jak se membrána permeabilizovala a lipozom se nasunul na injekční špičku a do lipozomu se injikoval fluoresceín. (D) ukazuje, jak se z lipozomu vybrala injekční špička a protielektroda. (E) je fluorescenční obraz lipozomů po injekci. Lipozom injikovaný fluoresceinem vykazuje silnou fluorescenci, zatím co ostatní lipozomy byly neovlivněny. Obrysové čáry unilamelárních lipozomů byly digitálně zvýrazněny.

Obrázek 3 ilustruje injekci biopolymeru a koloidních částic do GUV. Obrázek představuje fluorescenční obrazy unilamelárních lipozomů injikovaných vysoce koncentrovanými roztoky (A) 30 nm fluorescenčních latexových kuliček, (B) malých (100 nm) SBL-lipozomů (50 μg/ml) vybarvených pomocí DiO a (C) pomocí YOYO-1 označenou T7 DNA (5 ng/ml).

Obrázek 4 ilustruje elektroinjekci pomocí YOYO-1 vybarvené T7 fágové DNA do buněk PC-12. (A) a (B) představují obrazy z mikroskopu s jasným polem a fluorescenční obrazy buněk injikovaných fluorescenční DNA do cytosolu. V (C) a (D) je DNA injikovaná s výhodou do jádra buňky a cytosol vykazuje jen slabou fluorescenci.

Obrázek 5 představuje unilamelární lipozom jako reakční nádobu pro interkalační reakci mezi T2 DNA a YOYO-1. (A) ukazuje unilamelární protruzi z multilamelárního lipozomu použitého jako cíl. (B) ukazuje injekci roztoku obsahujícího T2 DNA do lipozomu. (C) je fluorescenční obraz vezikuly s injikovanou DNA nevykazující žádnou fluorescenci. (D) ukazuje, jak byla injekční kapilára vytáhnuta a nahrazena tenčí kapilárou s YOYO-1 na druhou injekci. (E) je fluorescenční obraz po inkubaci odhalující přítomnost fluorescenčních molekul DNA inetrkalovaných pomocí YOYO-1 uvnitř lipozomu. V mikroskopu bylo možné pozorovat Brownův pohyb mikrometrových struktur, což přesvědčivě naznačuje, že fluorescence pocházela zejména z DNA interkalované pomocí YOYO. Barvivo YOYO-1 ale mělo i afinitu pro lipidové membrány, jak to ukazuje silná fluorescence pocházející z multilamelárního lipozomu.

Příklady uskutečnění vynálezu

Materiály a metody

Chemikálie

FM 1-43, DiO, YOYO-1 a FluoSpheres (s průměrem 30 nm a 200 nm) byly od firmy Molecular probes. Fluorescein (GC-Grade), T2 DNA (168 000 bp[22]), T7 DNA (39936 bp[23]), L-α-fosfatidylcholin (typ II-S), fosforečnan draselný (>98 %), báze Trizma (>99,9 %) byly zakoupeny od firmy SIGMA. Chloroform, EDTA (titriplex III), síran hořečnatý a dihydrogenfosforečnan draselný (všechno čistoty p.a.) byly získány od firmy MERCK. Použil se glycerol (> 99,5 %) od firmy J. T. Baker a deionizovaná voda od Milli-Q system (Millipore).

Vytváření malých unilamelárních vezikul (SUV)

Použil se acetonem vyčištěný asolektinový přípravek rozpuštěný v chloroformu[24]. Při přípravě SUV se lipidy zředily chloroformem na koncentraci lipidů 10 mg/ml. Při standardní přípravě se 300 µl tohoto roztoku přemístilo do baňky s kulatým dnem. Rozpouštědlo se odpařilo na rotační odparce v průběhu přibližně 6 h při laboratorní teplotě. Na stěnách baňky se vytvořil tenký, úplně suchý lipidový film. K tomuto filmu se opatrně přidal tlumivý roztok PBS (báze Trizma 5 mM, K_3PO_4 30 mM, KH_2PO_4 30 mM, $MgSO_4$ 1 mM, EDTA 0,5 mM, pH 7,8) obsahující 1 % objemové glycerolu až do koncentrace lipidů 1 mg/ml. Lipidový film se nechal nabobtnat přes noc při 4 °C. Nakonec se vzorek podrobil působení ultrazvuku v ultrazvukové lázni naplněné ledovou vodou. Běžně byl potřebný čas sonikace přibližně 10 minut, než se celý lipidový film rozpustil a vytvořila se bělavá

opalescenční směs. Suspenze SUV se skladovala při 4 °C a byla stabilní několik dnů.

Tvorba GUV

Tvorba GUV se uskutečnila v dvoustupňovém postupu; dehydratací lipidové disperze s následující rehydratací.

Při dehydrataci se malý objem (5 µl) suspenze SUV opatrně umístil na borosilikátové krycí sklíčko a dal se do vakuového exsikátoru při 4 °C. Když byl vzorek úplně suchý (žádné příznaky „fluidity" v mikroskopu), dehydratace se ukončila a vzorek se před rehydratací nechal dosáhnout teplotu místnosti.

Suchý vzorek se rehydratoval pomocí 5 µl tlumivého roztoku. Po 3 - 5 min se vzorek nadále zředil tlumivý roztokem, což se dělalo velmi opatrně, aby se minimalizovala turbulence ve vzorku. Všechny rehydratační kapaliny měly teplotu místnosti.

Mikromanipulace a elektroinjekce

Všechny injekční experimenty se uskutečnily na inverzním mikroskopu (Leica DM IRB, Wetzlar, Německo) opatřeném objektivem Leica PL Fluotar 40x a vodohydraulickým manipulačním systémem (jemný manipulátor: Narishige MWH-3, Tokio, hrubý manipulátor: Narishige MC-35A, Tokio).

Fluorescenční zobrazování se dosáhlo posíláním výstupu Ar^+ laseru (Spectra-Physics 2025-05, 488 nm) přes 488 nm čárový interferenční filtr, za kterým následoval točící se disk na zrušení koherence a rozptyl laserového světla. Laserové světlo bylo zachyceno čočkou a posláno přes fluoresceinový filtr (Leica I-2) do objektivu, aby se excitovaly fluorescenční barviva.

Fluorescence se zachytávala objektivem a detekovala tříčipovou barevnou CCD kamerou (Hamamatsu, Kista, Švédsko) a zaznamenávala se na VHS (Panasonic S-VHS AG-5700). Digitální obrazy se upravily pomocí systému Argus-20 (Hamamatsu, Kista, Švédsko) a grafického softwaru Adobe Photoshop.

Elektroinjekce se ovládaly mikroinjekčním systémem (Eppendorf Transjector 5246, Hamburg, Německo) a generátorem impulsů (Digitimer Stimulator DS9A, Welwyn Garden City, Spojené království) připojeným k injekční kapiláře.

Na translaci lipozomů na různé místa během experimentů se použily uhlíkovláknové mikroelektrody (ProCFE, Axon Instruments, Foster City, USA) řízené mikromanipulačním systémem. Jednoduchým tlačením vezikul mikroelektrodami se tyto odpojily od povrchu a přilnuly ke špičkám elektrod a bylo možné jimi pohybovat na dlouhé vzdálenosti do požadovaného cílu. Touto technikou bylo též možné odpojit unilamelární protruzní vezikuly, které přilnuly na multilamelární lipozomy.

Příprava injekčních špiček

Injekční špičky se připravily z borosilikátových kapilár (délka: 10 cm, vnější průměr: 1 mm, vnitřní průměr: 0,78 mm; Clark Electromedical Instruments, Reading, Spojené království), které se opatrně otavily plamenem na zadních koncích, aby se jednodušeji zasouvaly do držáku kapilár. Kapiláry se před použitím vypláchly proudem plynného dusíku. Špičky se vytáhly na CO_2-laserovém vytahovacím přístroji (Model P-2000, Sutter instrument Co., Novato, USA). Vnější průměr injekčních špiček se pohyboval mezi 0,5 - 2,5 μm. Aby se zabránilo kontaminaci, špičky se vytáhly bezprostředně před použitím.

Výsledek a diskuse

Mikroinjekční postupy

Injekční špičky se zpětně vyplnily vybraným médiem a připevnily se na držák pipet vlastní konstrukce zobrazený schematicky na obrázku 1. Hlavním účelem držáku kapilár je upevnit injekční špičku a působit jako rozhraní mezi mikroinjekčním systémem a generátorem impulsů. Zařízení je v podstatě standardním svorkovým držákem pipet nasazeným na výstup mikroinjekčního systému. Hlavní těleso držáku pipet (II) v tomto příkladu bylo zkonstruováno z plexiskla a vybaveno elektrodou z Pt drátu připojenou k nízkonapěťovému generátoru impulsů přes pin konektor (III). Zahrnuje i vstup pro výstup mikroinjektoru (I). Injekční špičky (VI) jsou pevně drženy na místě dvěma gumovými kroužky (IV) připevněnými šroubovací čepičkou Delrin (V). Držák pipet byl připevněný na výše popsaný mikromanipulační systém. Jako protielektroda se použila uhlíkovláknová mikroelektroda s průměrem špičky 5 μm. Po výběru vhodné GUV nebo buňky se injekční špička a mikroelektroda umístily proti sobě v úzkém kontaktu s vezikulou v úhlu 10 - 30° a 150 - 170° vzhledem na rovinu objektu (viz Obrázek 2). Opatrným umístěním elektrod bylo možné zachytit volně se vznášející vezikuly a následně uskutečnit injekce. Aplikováním mechanického tlaku pohybem injekční špičky směrem k mikroelektrodě, čímž se vezikule vnutil ledvinový tvar (Obrázek 2B), bylo možné penetrovat membránu aplikováním elektrického pole (pravoúhlý impuls jednosměrného proudu 40 V/cm, 3 ms). Po permeabilizování se vezikula navlekla na injekční špičku a znovu získala svojí kulovou formu (Obrázek 2C). V tomto režimu bylo možné injikovat do lipozomu

kontrolované objemy materiálů obsažených v mikropipetě. Na obrázku 2C se do jediného lipozomu injikoval 25 μM roztok fluoresceinu. Injekční objemy se ovládaly pomocí mikroinjekčního systému (injekční tlak: 250 - 1000 hPa, čas: 0,1 - 1,5 s). Do lipozomů s průměrem 10 až 20 μm se zpravidla injikoval objem 50 až 500 fl. Injekční objemy pro buňky se udržovaly na co nejnižší hodnotě, aby se zabránilo traumatu buňky. Po dokončení injekce se špička vytáhla z interiéru vezikuly bez pozorovatelných známek poškození vezikuly (Obrázek 2D) nebo úniku (Obrázek 2E).

GUV jakož i buňky byly permeabilizovány jednoimpulsním režimem aplikováním jednoho nebo několika přechodných pravoúhlých impulsů jednosměrného napětí s trváním impulsu 1 až 10 ms. Intenzita elektrického pole byla zpravidla v rozmezí 10 až 40 V/cm. Membránové napětí V_m na různých místech na membráně vezikuly během vystavení působení homogenního elektrického pole s trváním t lze vypočítat z následujícího vzorce:

$$V_m = 1,5\ r_s\ E \cos \alpha\ (1-\exp(-t/\tau))$$

kde E je intenzita elektrického pole, r_s je poloměr koule, α je úhel vzhledem na směr elektrického pole a τ je kapacitně-odporová časová konstanta. I když tato rovnice nevyhovuje přesně podmínkám pro elektroinjekční techniku, lze ji použít na hrubý odhad vytvořeného transmembránového potenciálu. Za předpokladu, že napěťový impuls 40 V/cm se aplikuje v pravých úhlech na kulový membránový prostor s poloměrem 10 μm, vytvoří se transmembránový potenciál jen 60 mV. Takový malý spád napětí přes membránu samozřejmě nevytvoří dostatečné elektrokompresivní napětí, aby se dosáhla permeabilizace membrány. Protože primární elektroda je umístěna uvnitř injekční kapiláry, koordináty

elektrické destabilizace se prostorově shodují s místem, kde je aplikovaná maximální mechanická síla. Ukázalo se, že tato elektromechanická permeabilizace je výkonnou technikou na penetraci lipidových membrán umožňující použití hrubých mikropipetových špiček.

Výsledky

Při použití tohoto postupu bylo možné injikovat reagenty do jednotlivých buněk a GUV s průměry 5 až 25 μm pomocí mikropipetových špiček s vnějším průměrem přibližně 2 μm nebo až do 3 μm. Injekci do větších buněk lze teda uskutečnit jednoduše. Takto hrubé kapiláry mají též dostatečně velké vnitřní průměry na injekci větších struktur a koloidních částic ve vysokých koncentracích do vezikul nebo buněk. Toto ilustruje skutečnost, že do unilamelárních vezikul se injikovaly pomocí YOYO-1 označené T7 fágové molekuly DNA (R_G = 0,56 μm), 30 nm latexové kuličky jako i SUV s průměrem 100 nm (viz Obrázek 3).

Jednotlivé buňky PC12 se úspěšně injikovaly fluoresceinem (údaje nezobrazeny) jako i T7 fágovou DNA označenou pomocí YOYO-1 (jak je zobrazeno na obrázku 4). Navíc bylo možné uskutečnit preferenční ale ne výlučnou injekci materiálů do cytoplazmy (Obrázek 4 B) a jádra (Obrázek 4 D) jednotlivých buněk. V obou experimentech je fluorescence koncentrovaná lokálně na místě injekce, což indikuje, že difuze komplexu DNA-barvivo přes buňku byla omezena. To ukazuje, že zde prezentovaná technika by umožnila cílenou dodávku například léčiv, genetického materiálu (například DNA nebo RNA), proteinů, barviv a částic do specifických prostorů buňky.

Jelikož zde popsanou elektroinjekční techniku lze uskutečňovat s velmi vysokými mírami úspěšnosti, může být výkonným nástrojem na iniciaci chemických reakcí uvnitř vezikul a buněk. To ilustruje experiment zobrazený na obrázku 5. Uskutečněním dvou po sobě následujících injekcí reagentů do jediné vezikuly se iniciovala interkalační reakce mezi T2 fágovou DNA (R_G = 1,1 μm) a YOYO-1. (A) jako cíl se vybrala unilamelární protruze z multilamelárního lipozomu usazeného na krycím sklíčku. (B) Nejdříve se do vezikuly injikoval roztok obsahující T2 DNA (1 ng/ml) pomocí mikropipetové špičky s vnějším průměrem 2 μm (40 V/cm, 4 ms). (C) Fluorescenční obraz vezikuly s injikovanou DNA nevykazoval žádnou fluorescenci. (D) Injekční kapilára byla vytáhnuta a nahrazena tenčí kapilárou s vnějším průměrem 1 μm naplněna barvivem YOYO1 (50 μM) a uskutečnila se druhá injekce (20 V/cm, 4 ms). (E) Fluorescenční obraz po 10 min inkubace odhalil přítomnost fluorescenčních molekul DNA inetrkalovaných pomocí YOYO-1 uvnitř vezikuly. V mikroskopu bylo možné pozorovat Brownův pohyb mikrometrových struktur, co přesvědčivě naznačuje, že fluorescence pocházela zejména z DNA interkalované pomocí YOYO. Tento experiment ilustruje při skutečnosti, že tímto způsobem lze iniciovat chemické reakce, že lze též postupně injikovat vícero reagentů do jediné vezikuly bez pozorovatelného úniku. Proto lze praktikovat iniciaci složitých biochemických reakcí uvnitř prostoru lipozomu nebo buňky.

13.05.03

Použitá literatura

(1) Bruchez Jr, M.; Moronne, M.; Gin, P.; Weiss, S.; Alivisatos, A. P. *Science* **1998,** *281,* 2013-2016.

(2) Chan, W. C. W.; Nie, S. *Science* **1998,** *281,* 2016-2018.

(3) Clark, H. A.; Kopelman, R.; Tjalkens, R.; Philbert, M. A. *Anal. Chem.* **1999,** *71,* 4837-4843.

(4) Chourpa, I.; Morjani, H.; Riou, J.-F.; Manfait, M. *FEBS lett.* **1996,** *397,* 61-64.

(5) Sharonov, S.; Nabiev, I.; Chourpa, I.; Feofanov, A.; Valisa, P.; Manfait, M. *J. Raman Spectrosc.* **1994,** *25,* 699-707.

(6) Beljebbar, A.; Morjani, H.; Angiboust, J. F.; Sockalingum, G. D.; Polissiou, M.; Manfait, M. *J. Raman Spectrosc.* **1997,** *28,* 159-163.

(7) Clark, H. A.; Hoyer, M.; Philbert, M. A.; Kopelman, R. *Anal. Chem.* **1999,** *71,* 4831-4836.

(8) Lasic, D. D. *Liposomes: from physics to applications.* Elsevier Science B. V., Amsterdam, Nederlands, ed. 1, 1993.

(9) Bucher, P.; Fisher, A.; Luisi, P. L.; Oberholzer, T.; Walde, P. *Langmuir* **1998,** *14,* 2712-2721.

(10) Chiu, D. T.; Wilson, C. F.; Ryttsén, F.; Strömberg, A.; Farre, C.; Karlsson, A.; Nordholm, S.; Gaggar, A.; Modi, B. P.; Moscho, A.; Garza-López, R. A.; Orwar, O.; Zare, R. N. *Science* **1999,** *283,* 1892-1895.

(11) Chiu, D. T.; Wilson, C. F.; Karlsson, A.; Danielsson, A.; Lundqvist, A.; Strömberg, A.; Ryttsén, F.; Davidson, M.; Nordholm, S., Orwar, O.; Zare, R. N. *Chem. Phys.* **1999,** *247,* 133-139.

(12) Oberholzer, T.; Nierhaus, K. H.; Luisi, P. L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999,** *261,* 238-241.

(13) Monnard, P.-A.; Oberholzer, T.; Luisi, P. L. *Biochim. Biophys. Acta* **1997,** *1329*, 39-50.

(14) Shew, R. L.; Deamer, D. W. *Biochim. Biophys. Acta* **1985,** *816*, 1-8.

(15) Graessmann, A.; Graessmann, M.; Mueller, C. *Methods Enzymol.* **1980,** *65*, 816-825.

(16) Wick, R.; Angelova, M. I.; Walde, P.; Luisi, P. L. *Chem. Biol.* **1996,** *3*, 105-111.

(17) Davis, B. R.; Yannariello-Brown, J.; Prokopishyn, N. L.; Luo, Z.; Smith, M. R.; Wang, J.; Carsrud, N. D. V.; Brown, D. B. *Blood* **2000,** *95*, 437-444.

(18) Lundqvist, J. A.; Sahlin, F.; Åberg M. A. I.; Strömberg A.; Eriksson P. S.; Orwar O. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1998,** *95*, 10356-10360.

(19) Weaver, J. C. *J. Cell. Biochem.* **1993,** *51*, 426-435.

(20) Chang, D. C.; Reese, T. S. *Biophys. J.* **1990,** *58*, 1-12.

(21) Kinosita, K. Jr.; Tsong, T. Y. *Nature* **1990,** *268*, 438-441.

(22) Harpst, J. A.; Dawson, J. R. *Biophys. J.* **1989,** *55*, 12371249.

(23) Oakley, J. L.; Coleman, J. E. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **1977**, *74*, 4266-4270.

(24) Miller, X. *J. Membr. Biol.* **1976,** *26*, 319-333.

(25) Needham, D.; Hochmuth, R. M. *Biophys. J.* **1989**, 55, 1001-1009

13.05.03

PV 2003-1119

33688

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob penetrace lipidových dvouvrstvých membrán s cílem zasunout alespoň jednu špičku alespoň jednoho dutého jehlovitého předmětu do prostoru vytvořeného alespoň jednou lipidovou dvouvrstvou, **vyznačující se tím, že** tento prostor se umístí mezi uvedený jehlovitý předmět, který je opatřen první elektrodou, a druhou elektrodu, přičemž uvedená alespoň jedna špička alespoň jednoho jehlovitého předmětu se umístí do kontaktu s uvedeným prostorem tak, že tato alespoň jedna špička aplikuje mechanickou sílu na lipidovou dvouvrstvu prostoru a tak mechanicky deformuje tento prostor, načež se aplikuje přechodný elektrický impuls s intenzitou pole 1 až 10^3 V/cm mezi uvedenou první elektrodou a uvedenou druhou elektrodou, čehož výsledkem je soustředěné elektrické pole přes tento prostor způsobující dielektrický rozklad lipidové dvouvrstvy, díky čemu uvedená alespoň jedna špička uvedeného alespoň jednoho jehlovitého předmětu penetruje přes lipidovou dvouvrstvou membránu prostoru.

2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím, že** první elektroda je umístěna uvnitř jehlovitého předmětu.

3. Způsob podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím, že** uvedeným jehlovitým předmětem je mikropipeta.

4. Způsob podle nároku 3, **vyznačující se tím, že** uvedenou mikropipetou je skleněná mikropipeta.

5. Způsob podle nároku 3, **vyznačující se tím, že** uvedenou mikropipetou je křemenná mikropipeta.

6. Způsob podle nároku 3, **vyznačující se tím, že** uvedenou mikropipetou je plastová mikropipeta.

7. Způsob podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím, že** uvedeným jehlovitým předmětem je mikroelektroda, která tedy představuje uvedenou první elektrodu.

8. Způsob podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím, že** uvedeným jehlovitým předmětem je kapilára.

9. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 8, **vyznačující se tím, že** průměr uvedeného prostoru je 0,1 až 10^3 μm.

10. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 9, **vyznačující se tím, že** vnější průměr špičky jehlovitého předmětu je 10 nm až 100 μm za předpokladu, že je vždy menší než průměr prostoru.

11. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 10, **vyznačující se tím, že** vnitřní průměr špičky jehlovitého předmětu je od 50 nm až do 95 μm za předpokladu, že je vždy menší než průměr prostoru a vždy menší než vnější průměr špičky jehlovitého předmětu.

12. Způsob mikroinjekce zahrnující uskutečnění způsobu penetrace lipidových dvouvrstvých membrán podle kteréhokoliv z nároků 1 až 11, **vyznačující se tím, že** roztok nebo disperze alespoň jedné látky se dodává přes uvedený jehlovitý předmět do uvedeného prostoru po penetrování špičky jehlovitého předmětu do prostoru.

13. Způsob podle nároku 12, **vyznačující se tím, že** uvedenou látkou je nízko- nebo středněmolekulová látka.

14. Způsob podle nároku 12, **vyznačující se tím, že** uvedenou látkou je biopolymer.

15. Způsob podle nároku 12, **vyznačující se tím, že** uvedenou látkou je koloidní částice.

16. Způsob podle nároku 12, **vyznačující se tím, že** uvedenou látkou je nanosenzor.

17. Způsob podle nároku 12, **vyznačující se tím, že** uvedenou látkou je organela.

18. Způsob podle nároku 12, **vyznačující se tím, že** uvedenou látkou je baktérie.

19. Způsob podle nároku 12, **vyznačující se tím, že** uvedenou látkou je buňka.

20. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 19, **vyznačující se tím, že** uvedená mikropipeta je tvořena polem několika jehlovitých předmětů.

21. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 20, **vyznačující se tím, že** uvedenou první elektrodou je Pt elektroda.

22. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 20, **vyznačující se tím, že** uvedenou první elektrodou je Ag elektroda.

23. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 20, **vyznačující se tím, že** uvedenou první elektrodou je Au elektroda.

24. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 20, **vyznačující se tím, že** uvedenou první elektrodou je uhlíkovláknová elektroda.

25. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 24, **vyznačující se tím, že** průměr druhé elektrody na konci blízkém k prostoru je přibližně 1 až 10^3 μm.

26. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 25, **vyznačující se tím, že** uvedenou druhou elektrodou je uhlíkovláknová elektroda.

27. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 25, **vyznačující se tím, že** uvedenou druhou elektrodou je kovová elektroda.

28. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 25, **vyznačující se tím, že** uvedenou druhou elektrodou je skleněná mikroelektroda.

29. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 28, **vyznačující se tím, že** uvedeným prostorem je lipozom.

30. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 28, **vyznačující se tím, že** uvedeným prostorem je vezikula.

31. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 28, **vyznačující se tím, že** uvedeným prostorem je organela.

32. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 28, **vyznačující se tím, že** uvedeným prostorem je buňka.

33. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 28, **vyznačující se tím, že** uvedeným prostorem je tzv. gigantická unilamelární vezikula (GUV).

34. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 28, **vyznačující se tím, že** uvedeným prostorem je tzv. multilamelární vezikula (MLV).

35. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 12 až 34, **vyznačující se tím, že** se opakuje jednou nebo několikrát s cílem zavést do daného prostoru různé látky.

36. Prostor zpracovaný způsobem podle kteréhokoliv z nároků 1 až 35.

37. Použití prostoru podle nároku 36 při detekci specifických molekul.

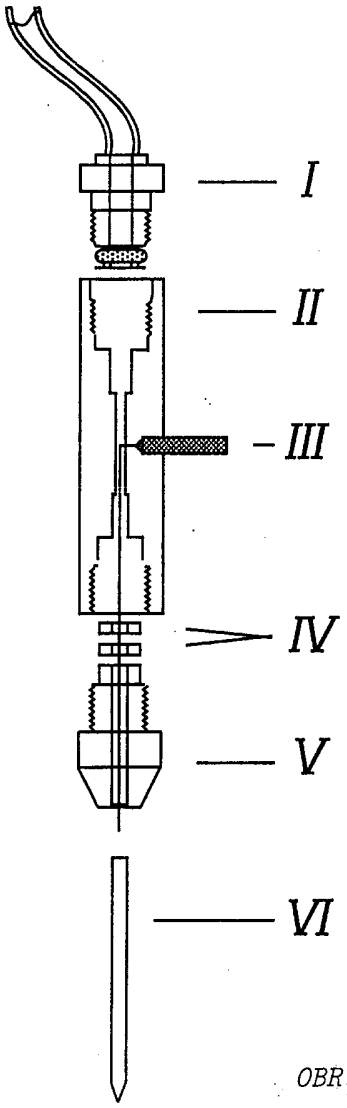
38. Použití prostoru podle nároku 36 při sondování vnitrobuněčných struktur.

39. Použití prostoru podle nároku 36 při studiu biochemických reakcí.

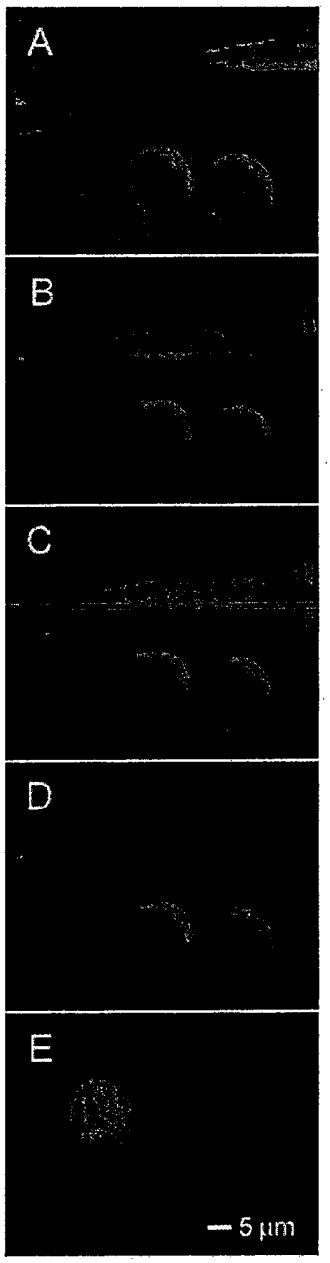
40. Použití prostoru podle nároku 36 jako nádoby na chemickou derivatizaci v miniaturizované separační technice.

41. Použití prostoru podle nároku 36 v biologickém počítači.

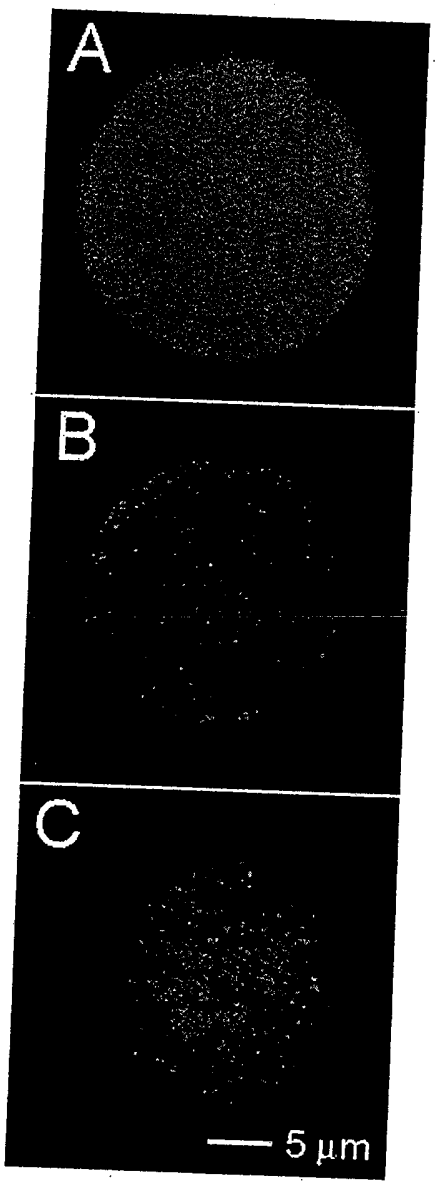
13.05.03
PV2003-1119
38688



OBR. 1



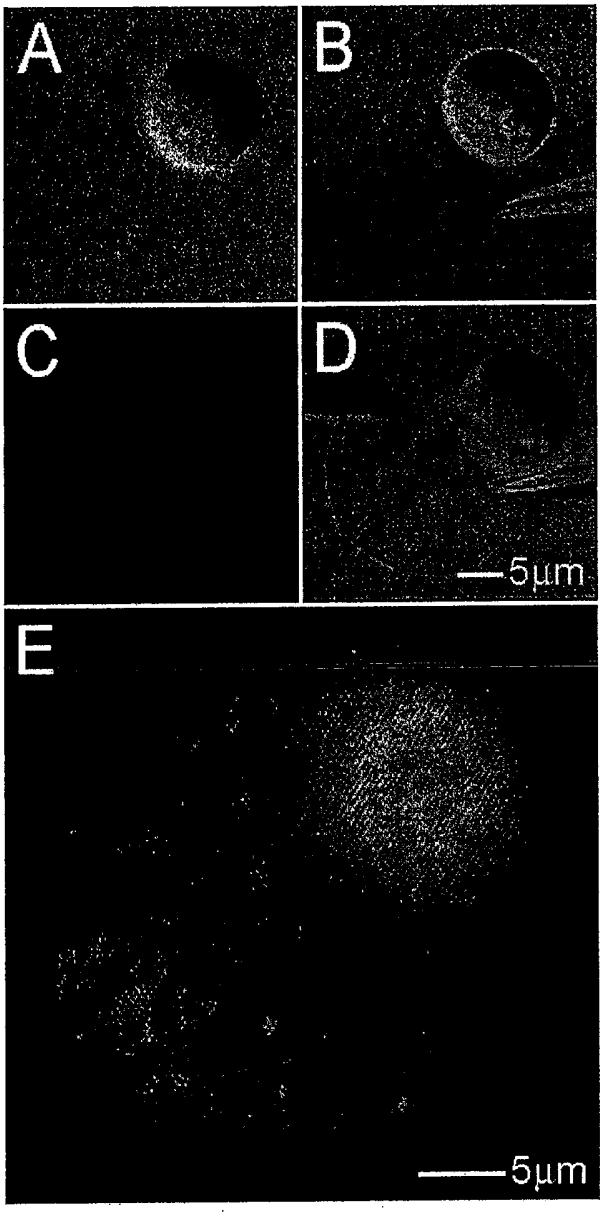
OBR. 2



OBR. 3



OBR. 4



OBR. 5