SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**

ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA

(22) Dátum podania prihlášky: **19. 10. 2001**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **0003841-4**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **20. 10. 2000**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **SE**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **2. 3. 2004**
Vestník ÚPV SR č.: **3/2004**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/SE01/02301**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO02/33066**

(11), (21) Číslo dokumentu:

438-2003

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[7] :

C12N 13/00
//C12N 15/89

(71) Prihlasovateľ: **CELLECTRICON AB, Göteborg, SE;**

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

(74) Zástupca: **Žovicová Viera, Mgr., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Spôsob penetrácie lipidových dvojvrstvových membrán a mikroinjekčná metóda**

(57) Anotácia:
Uvádza sa spôsob penetrácie lipidových dvojvrstvových membrán s cieľom zaviesť špičku dutého ihlovitého predmetu, napríklad mikropipety, do priestoru ohraničeného lipidovou dvojvrstvovou membránou, kde sa tento priestor umiestni medzi ihlovitý predmet, ktorý je vybavený prvou, s výhodou vnútornou elektródou, pričom špička tohto ihlovitého predmetu sa umiestni do kontaktu s týmto priestorom tak, že aplikuje mechanickú silu na lipidovú membránu tohto priestoru, čím ju mechanicky deformuje, a druhú elektródu, po čom sa medzi elektródami aplikuje prechodný elektrický impulz 1 až 10^3 V/cm, čoho výsledkom je sústredené elektrické pole cez tento priestor, ktoré indukuje dielektrický rozklad lipidovej membrány, čo spôsobí pentráciu ihlovitého predmet do priestoru. Uvádza sa aj spôsob elektroinjekcie na báze vyššie uvedeného spôsobu, kde sa látky zavádzajú cez ihlovitý predmet a do priestor po penetrácii ihlovitého predmetu.

SK 438-2003 A3

Spôsob penetrácie lipidových dvojvrstvových membrán a mikroinjekčná metóda

Oblasť techniky

Predložený vynález sa týka spôsobu penetrácie lipidových dvojvrstvových membrán s cieľom zasunúť špičky ihlovitých predmetov do priestorov uzavretých v lipidových membránach, ako sú bunky a lipozómy. Vynález sa týka aj spôsobu vstrekovania látky do lipidového dvojvrstvového uzavretého priestoru, ako je napríklad bunka, alebo presnejšie mikroinjekčnej metódy využívajúcej koncepciu elektromechanickej destabilizácie v záujme efektívneho zavádzania látok, ako sú biopolyméry, koloidné častice a iné biologicky relevantné molekuly do jednotlivých, lipidovou dvojvrstvou uzavretých priestorov veľkosti bunky.

Doterajší stav techniky

V súčasnosti sa prejavuje rastúci záujem o zasúvanie mikroelektród, mikrokapilár a mikropipetových senzorov do jednotlivých buniek. Existuje tiež rastúci záujem o zabudovanie takých prostriedkov submikrónového snímania, odberu vzoriek a zosilňovania signálu ako aj veľkých biopolymérov do jednotlivých buniek a lipozómov. Niekoľko ultracitlivých metód detekcie a snímania je založených priamo alebo nepriamo na použití koloidných častíc. Medzi príklady patria kvantové bodové biokonjugátové senzory[1,2], rodina senzorov Probes Encapsulated By Biologically Localized Embedding (PEBBLE)[3] a koloidy striebra (Ag) a zlata (Au) na použitie pri meraniach metódou Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS)[4-6]. Jedným z hlavných obmedzení praktického využitia týchto techník je náročnosť neinvazívneho a kvantitatívneho zavedenia koloidných častíc do interiéru bunky[7]. Navyše by bolo atraktívne zamerať zavedenie častíc do špecifických subcelulárnych priestorov, ako je cytosól, jadro alebo dokonca organely jednotlivých buniek.

GUV sú lipozómy veľkosti bunky pozostávajúce z jednej lipidovej dvojvrstvy s uzavretým vodným priestorom[8]. Také lipozómy sú vhodné na použitie ako ultramalé reakčné nádoby, v ktorých je študovaná reakcia obmedzená a oddelená od vonkajšieho prostredia. Ako také ich možno použiť na štúdie dynamiky biochemických reakcií

PP 439-2003

v priestoroch napodobňujúcich prírodné vnútrobunkové alebo vnútroorganelové prostredie[9-12].

Ak sa majú vezikuly použiť ako reakčné nádoby, je potrebné do nich zaviesť reaktanty, ktoré zahŕňajú biopolyméry ako DNA a koloidné častice alebo organely (syntetického alebo prírodného pôvodu). Zavedenie lipozómov možno v zásade uskutočniť pridaním častíc počas prípravy vezikúl, keďže pri vytváraní uzavrú časť média, v ktorom sa vytvárajú. Účinnosť takého zachytávania je však pre malé lipozómy obmedzená dokonca aj pre nízkomolekulové zlúčeniny a zachytenie väčších štruktúr, ako sú koloidy, má veľmi nízku pravdepodobnosť[13,14].

Ďalším prístupom pre zavádzanie látok do lipozómov je zavedenie materiálov do vopred vytvorených vezikúl pomocou mikromanipulačných techník vyvinutých na zavádzanie látok do jednotlivých buniek. Jednou takou technikou, ktorá je vhodná na použitie, je mikroinjekčná technika[15].

Použitím mikroihiel vyrobených z kapilár z vyťahovaného skla s vonkajšími priemermi špičky v rozmedzí 200 – 500 nm je možné penetrovať membránovú stenu lipozómu alebo bunky a vytlačiť kontrolované objemy požadovaného reagentu do vezikuly[16]. Injekčné objemy sú spravidla v rozmedzí pikolitrov až attolitrov a riadia sa reguláciou injekčného času a injekčného tlaku. Tlak sa obyčajne vytvára použitím vzduchotlakových alebo olejovo-hydraulických systémov.

Všetky mikroinjekčné techniky sú založené na mechanickej permeabilizácii lipidových membrán. Keď sa aplikuje mechanická bodová záťaž, napr. kapilárou, na membránu lipozómu alebo bunky, membrána je nútená roztiahnuť sa a izotropické membránové napätie fungujúce v rovine membrány sa zvýši. Pri dostatočné vysokom membránovom napätí sa štruktúrna integrita lipozómu alebo bunky na moment stratí a v membráne sa vytvoria diery, cez ktoré sa uvoľňuje vnútorná tekutina, aby sa vyrovnalo zvýšenie membránového napätia. K tomuto narušeniu membrány dochádza v mieste najvyššej mechanickej záťaže, čo je miesto, kde sa aplikuje bodová záťaž, čo umožňuje zasunutie mikroinjekčnej kapiláry do interiéru lipozómu alebo bunky.

Zatiaľ čo mikroinjekcia dobre funguje pri istých typoch buniek a multilamelárnych lipozómov, existuje niekoľko nedostatkov mikroinjekčných techník pri unilamelárnych vezikulách a mnohých typoch buniek. Lipidové membránové dvojvrstvy sú spravidla veľmi elastické a neprítomnosť vnútorných nosných štruktúr v unilamelárnych lipozómoch spôsobuje, že sa veľmi ťažko penetrujú mechanickými prostriedkami. Vonkajší priemer špičky vhodnej na injekciu do tenkostenných lipozómov a menších buniek je približne 200 nm a vnútorný priemer je spravidla v rozmedzí len 100 nm[16,17]. Také špičky sú veľmi krehké a mimoriadne ťažko pozorovateľné vo svetelnom mikroskope, čo sťažuje ich umiestnenie. Hlavným nedostatkom použitia injekčných špičiek s malým vnútorným priemerom je však požiadavka na použitie ultračistých injekčných kvapalín, aby sa predišlo upchaniu, čo obmedzuje injektované látky na roztoky nízko- a strednomolekulových zlúčenín. Mikroinjekčné techniky sa považujú za pomerne invazívne v dôsledku veľkých aplikovaných mechanických síl vrátane trvalého poškodenia membrány a dokonca lýzy buniek a lipozómov.

Alternatívnym prístupom k zavádzaniu látok do jednotlivých lipozómov alebo jednotlivých buniek je použitie mikroelektroporácie[18]. Táto technika je založená na teórii elektropermeabilizácie. Keď sa lipozóm alebo bunka vystaví pôsobeniu elektrického poľa, na membráne sa vytvorí potenciálový spád. Pri dostatočne vysokej intenzite poľa sa prekročí kritický transmembránový potenciál V_c membrány a v lipozómovej alebo bunkovej membráne sa vytvoria sa malé póry v dôsledku dielektrického rozpadu membrány. Transmembránový potenciál V_m na rôznych miestach na membráne guľovitej vezikuly počas vystavenia pôsobeniu homogénneho elektrického poľa s trvaním t možno vypočítať z nasledujúceho vzorca:

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

kde E je intenzita elektrického poľa, r_s je polomer gule, α je uhol vzhľadom na smer elektrického poľa a τ je kapacitno-odporová časová konštanta. K tvorbe pórov dôjde na sférických súradniciach vystavených najväčšiemu potenciálovému posunu, ktorý je na póloch obrátených k elektródam. Typická hodnota pre V_c pre vezikulu veľkosti bunky je ~1V a zodpovedajúca intenzita elektrického poľa potrebná na prekročenie kritického transmembránového potenciálu V_c je v rozmedzí od 1 do 10 kV/cm.

Pri mikroelektroporácii sa analyt, ktorý sa má enkapsulovať, pridáva do vonkajšieho roztoku lipozómov alebo buniek a potom sa lokálne aplikuje elektrické pole pomocou mikroelektród. Množstvo analytu, ktoré sa dostane do vezikuly, závisí od koncentračného gradientu analytu, membránového potenciálu, trvania aplikovaného poľa a rýchlosti difúzie analytu[19]. Nedostatkami elektroporačnej techniky sú ťažkosti kvantitatívneho zavedenia a zavádzanie štruktúr veľkostí väčších ako účinný priemer pórov, ktorý je pre elektropermeabilizované erytrocyty v rozmedzí od 1 do 240 nm[20,21]. Aby sa zlepšilo kvantitatívne zavedenie, kontrolované množstvá analytov možno zavádzať cez malú špičku mikropipety zavedenú cez otvor vytvorený elektroporáciou (ako je opísané napríklad v JP 8322548). Tento prístup však má niekoľko nevýhod vrátane potreby aplikovať pomerne silné elektrické pole (~ 1V), aby sa vytvoril otvor na zavedenie špičky.

Kombináciou elektroporácie a aplikácie mechanickej sily na membránovú vezikulu možno silu aplikovaného elektrického poľa potrebného na permeabilizáciu membrány podstatne znížiť[25]. Tento jav sa niekedy označuje ako elektromechanická destabilizácia. Ukázalo sa, že elektrické polia vytvorené cez lipidové dvojvrstvové membrány vyvolávajú elektrokompresívne mechanické napätie σ_e, ktoré pôsobí na lipidovú membránu. Táto sila pôsobí kolmo na rovinu membrány a vedie k zníženiu hrúbky membrány. Keď predpokladáme, že lipidová membrána sa správa ako kondenzátor, potom je elektrokompresívna sila priamo úmerná spádu napätia V cez membránu a tým intenzite aplikovaného elektrického poľa

$$?_e = \frac{1}{2}??_o \cdot \left(\frac{V}{h_e}\right)$$

kde ε je relatívna dielektrická konštanta, ε_0 je permitivita a h_e je dielektrická hrúbka membrány. Diferenciálna celková mechanická práca dW vykonaná na lipidovej membráne je potom jednoducho sumou elektrokompresívneho napätia σ_e a izotropického membránového napätia $\overline{T}$, čo je riadené množstvom mechanickej deformácie aplikovanej na membránu

$$dW = \left[\overline{T} + \frac{1}{2}??_o\left(\frac{V}{h_e}\right)\cdot h\right]dA$$

kde *h* je celková hrúbka lipidovej dvojvrstvovej membrány a *dA* je zmena v ploche membrány. V dôsledku toho keď sa na membránovú vezikulu aplikuje mechanická deformácia, transmembránový potenciál potrebný na dosiahnutie permeabilizácie možno výrazne znížiť. Preto tento prístup k membránovej permeabilizácii môže byť ešte menej invazívny ako elektroporácia, keďže možno použiť nižšie elektrické polia, čo minimalizuje riziko nežiaducich elektrochemických reakcií na povrchu membrány bunky alebo lipozómu.

Podstata vynálezu

Predložený vynález sa týka nového prístupu na zasúvanie mikropipetových špičiek alebo akýchkoľvek iných valcovitých alebo dutých ihlovitých predmetov, ako sú napríklad mikroelektródy, do priestorov vytvorených lipidovými dvojvrstvovými membránami, ako sú napríklad bunky alebo lipozómy. Základnou myšlienkou je destabilizácia mechanicky deformovaného priestoru uzavretého lipidovou membránou pomocou elektrických pulzov, čo uľahčuje penetráciu mikropipety.

Vynález sa týka aj spôsobu zavádzania látok, napríklad vysokomolekulových zlúčenín ako aj koloidných častíc, do priestorov vytvorených lipidovými dvojvrstvovými membránami, ako sú GUV, bunky a iné podobné štruktúry uzavreté membránami, aplikovaním koncepcie elektromechanickej destabilizácie membrány na mikropipetovú injekčnú techniku. Jedinečná výhoda takého usporiadania vyplýva z kombinácie vysokého stupňa priestorovej a objemovej kontroly mikroinjekcie a účinnej a neinvazívnej premeabilizácie membrány elektromechanickou destabilizáciou, čím sa umožňuje kvantitatívne zavedenie analytov, biologicky relevantných molekúl a častíc vrátane koloidov do unilamelárnych lipozómov a buniek.

Vynález sa konkrétnejšie týka spôsobu penetrácie priestoru vytvoreného alebo obkoleseného aspoň jednou lipidovou dvojvrstvovou membránou s cieľom zasunúť špičku aspoň jedného dutého ihlovitého predmetu do tohto priestoru, pričom sa tento priestor umiestni medzi tento aspoň jeden ihlovitý predmet, napríklad mikropipetu naplnenú elektrolytom, vybavený prvou elektródou, ktorá je s výhodou internou elektródou, a druhú elektródu, kde špička tohto aspoň jedného ihlovitého predmetu je umiestnená do kontaktu s týmto priestorom tak, že táto špička aspoň jedného ihlovitého predmetu aplikuje

mechanickú silu na lipidovú dvojvrstvovú membránu tohto priestoru, čím mechanicky deformuje tento priestor, pričom sa aplikuje dočasný elektrický impulz 1 až 10^3 V/cm medzi prvou elektródou a druhou elektródou, výsledkom čoho je sústredené elektrické pole cez tento priestor, ktoré elektrické pole indukuje dielektrický rozpad lipidovej dvojvrstvy, čo spôsobí, že špička uvedeného aspoň jedného ihlovitého predmetu penetruje membránou uvedeného priestoru. Tento aspoň jeden ihlovitý predmet je dutý a s výhodou konštruovaný z izolačného materiálu a je vyplnený elektricky vodivým roztokom alebo disperziou látky.

Prvá elektróda je s výhodou interná elektróda, t.j. nachádza sa vnútri tohto dutého ihlovitého predmetu. Elektróda je s väčšou výhodou pripojená na tento aspoň jeden ihlovitý predmet, ktorý je v tomto prípade naplnený elektrolytom, v ktorom je umiestnená elektróda. Toto uskutočnenie má niekoľko výhod. Napríklad na špičke uvedeného aspoň jedného ihlovitého predmetu neprebieha žiadna elektrochemická reakcia, pretože elektróda sa nachádza v určitej vzdialenosti od špičky tohto aspoň jedného ihlovitého predmetu. Prítomnosť takej elektrochemickej reakcie by inak mala nepriaznivý vplyv na priestor najmä v prípadoch, kedy je priestorom bunka, keďže by sa potom narušilo zdravie a prežitie bunky.

Keď špička ihlovitého predmetu, napríklad špička mikropipety, penetruje do priestoru, možno doň injektovať akýkoľvek roztok alebo disperziu obsiahnutú v mikropipete radom spôsobov vrátane tlakom indukovaného a elektroosmotického toku, načo možno mikropipetu vybrať, a toto sa používa ako základ mikroinjekčnej alebo elektroinjekčnej metódy podľa vynálezu.

Tu opísaná elektroinjekčná technika má niekoľko jednoznačných výhod v porovnaní s tradičnými vpichovými mikroinjekčnými protokolmi. Predovšetkým táto technika je menej invazívna. Keďže membrána je elektricky destabilizovaná, je potrebná menšia mechanická sila na penetrovanie lipidovej membrány mikropipetou alebo akýmkoľvek iným ihlovitým predmetom mikroskopických rozmerov. V dôsledku toho je tu menší pohyb injekčnej kapiláry počas jej umiestnenia vnútri lipozómu alebo bunky. Také pohyby môžu vyvolať ťažkú traumu bunky spôsobenú poškodeniami bunkového matrixu.

V porovnaní s elektroporačnými protokolmi sú na dosiahnutie destabilizácie membrány potrebné oveľa nižšie transmembránové potenciály. Často je generovaný transmembránový potenciál len niekoľko mV (čo je ďalej vysvetlené v nižšie uvedených príkladoch) dva až tri poriadky nižší ako V_m používaný pri elektroporácii. Oveľa nižšie elektrické polia znamenajú menšiu elektricky indukovanú traumu bunky ako aj minimalizáciu rizika nežiaducich elektrochemických reakcií na povrchu membrány bunky alebo lipozómu. Použitie veľmi nízkej intenzity elektrického poľa je popri skutočnosti, že membrána je pod mechanickou deformáciou, tiež efektom vysoko sústredeného elektrického poľa, ktoré sa používa. Keď sa medzi prvou a druhou elektródou aplikuje napätie, nevodivý materiál ihlovitého predmetu, napríklad mikropipety, smeruje celé vytvorené elektrické pole cez otvor konca špičky pipety. V dôsledku tá časť lipidovej membrány, ktorá je v kontakte s koncom špičky ihlovitého objektu, je vystavená pôsobeniu celého elektrického poľa. Koordináty maximálnej elektrokompresívnej sily sa takto priestorovo zhodujú s miestom, kde sa aplikuje maximálna mechanická sila.

Prezentovaný spôsob zasúvania špičky ihlovitého predmetu, napríklad mikropipety, do priestorov, ako sú lipozómy a bunky, je oveľa účinnejší ako štandardné vpichové mikroinjekčné protokoly. V dôsledku toho možno použiť mikropipety väčších priemerov, čo umožňuje injekcie veľkých štruktúr do unilamelárnych vezikúl ako aj buniek. Z tohto vyplýva niekoľko možností. Jednou z atraktívnych aplikácií je kvantitatívne zavedenie nanosenzorov[1-3] alebo koloidov na merania SERS[4-6] do buniek na detekciu molekúl alebo na sondovanie vnútrobunkových štruktúr. Ďalšou aplikáciou je zavádzanie týchto častíc do lipozomálnych reakčných nádob. Taký postup by umožnil štúdie zložitých biochemických reakcií, kde by bolo možné monitorovať vznik niekoľkých produktov a intermediátov súčasne. Zavedením organel (prírodného alebo syntetického pôvodu) alebo dokonca baktérií do unilamelárnych vezikúl je možné vytvoriť vysoko progresívne bunkové modely. Toto je veľmi atraktívne pre štúdie napríklad zložitých biochemických signalizačných systémov, ktoré sa translokujú medzi rôznymi vnútrobunkovými priestormi.

Tu opísanú elektroinjekčnú techniku možno uskutočňovať s veľmi vysokými mierami úspešnosti a táto technika umožňuje sekvenčnú injekciu viacerých reagentov do jednotlivých lipozómov a buniek bez pozorovateľného unikania. Preto možno praktizovať iniciáciu zložitých biochemických reakcií vnútri priestoru lipozómu alebo bunky. To tiež

umožňuje vykonávať derivatizačnú chémiu na ultramalej škále vnútri lipozómu alebo bunky s cieľom označiť analyt pred mikrochemickými separáciami.

V kombinácii s ultratenkými injekčnými ihlami používanými na konvenčné mikroinjekcie[17] je spôsob podľa predloženého vynálezu výkonnou technikou na zavádzanie nízko- a strednomolekulových zlúčenín do menších buniek alebo dokonca organel. Je to dôsledkom účinnej schopnosti elektroinjekčnej techniky penetrovať cez membránu.

Ďalšia aplikácia je v oblasti takzvaných injekcií čipového poľa. Keďže je tu prezentovaná technika vysoko účinná vzhľadom na schopnosť penetrácie membránou, je praktické skonštruovať systém poľa injektorov, kde je zoskupených viacero špičiek injekčných ihiel, čo umožňuje paralelnú injekciu veľkého počtu buniek súčasne.

Podrobný opis vynálezu

Ako je uvedené vyššie, predložený vynález sa týka spôsobu penetrácie lipidových dvojvrstvových membrán s cieľom zasunúť aspoň jednu špičku aspoň jedného ihlovitého predmetu, napríklad špičky mikropipety, do priestorov uzavretých v lipidových membránach. Spôsob sa konkrétnejšie používa na penetráciu do priestoru obaleného aspoň jednou lipidovou dvojvrstvou, kde sa tento priestor najprv umiestni medzi dutý, elektrolytom naplnený nevodivý ihlovitý predmet, napríklad mikropipetu, vybavený prvou elektródou, s výhodou vnútornou elektródou, t.j. elektródou umiestnenou vnútri tohto ihlovitého predmetu, pričom špička tohto aspoň jedného ihlovitého predmetu sa umiestni do kontaktu s týmto priestorom tak, že tento ihlovitý predmet aplikuje mechanickú silu na lipidovú membránu tohto priestoru, čím mechanicky deformuje tento priestor, a druhú elektródu, načo sa použitím nízkonapäťového zdroja aplikuje dočasný elektrický impulz 1 až 10^3 V/cm medzi prvou elektródou a druhou elektródou, čím sa vytvorí elektrické pole medzi prvou a druhou elektródou prechádzajúce cez koniec špičky ihlovitého predmetu, výsledkom čoho je vysoko sústredené elektrické pole cez membránovú časť tohto priestoru, ktorá je v kontakte s ihlovitým predmetom, pričom toto elektrické pole indukuje lokálny dielektrický rozpad časti mechanicky deformovanej lipidovej dvojvrstvy, ktorá je v kontakte s týmto ihlovitým predmetom, čo spôsobí, že špička ihlovitého predmetu penetruje membránu priestoru.

Ďalej sa namiesto pojmu ihlovitý predmet používa pojem mikropipeta, avšak čo je uvedené pre mikropipetu, je platné aj pre iné ihlovité predmety, ako sú iné valcovité alebo duté ihlovité predmety vhodnej veľkosti, napríklad kapiláry, ultratenké injekčné ihly a mikroelektródy. Ďalej tento pojem zahŕňa aj polia takých ihlovitých predmetov, ktoré môžu byť napríklad inštalované na čipe. Navyše mikropipeta bude naplnená vodivým médiom, aby sa umožnil elektrický kontakt medzi prvou elektródou a druhou elektródou.

Uvedená dutá nevodivá mikropipeta je naplnená elektricky vodivým roztokom alebo disperziou látky. Keď mikropipeta penetruje do priestoru, akýkoľvek roztok alebo disperziu látky obsiahnutú v mikropipete možno injektovať do priestoru, po čom možno mikropipetu vybrať. Okrem toho mikropipeta a mikroelektróda tvorí pinzetu umožňujúcu manipuláciu a následnú injekciu do voľne sa vznášajúcich buniek a lipozómov.

Látkou obsiahnutou v mikropipete a injektovanou do bunky alebo lipozómu môže byť napríklad nízko- alebo strednomolekulová látka, napríklad farbivo, biolpolymér, napríklad DNA, RNA alebo proteín, koloidná častica, napríklad koloidná granula, nanosenzor, organela alebo baktéria. Výraz „nízko- alebo strednomolekulová látka" označuje látku s molekulovou hmotnosťou do niekoľkých kDa, napríklad do 3 kDa. Látka sa s výhodou injektuje do priestoru vo forme roztoku alebo disperzie. Do bunky alebo iného unilamelárneho priestoru sa injektuje malý objem, spravidla 50 až 500 x 10^{-15} l roztoku alebo disperzie.

Uvedený priestor bude vytvorený alebo obkolesený aspoň jednou lipidovou dvojvrstvovou membránou. Môže to byť napríklad lipozóm, vezikula, organela, bunka, multilamelárny lipozóm (MLV) alebo gigantická unilamelárna vezikula (GUV). Spôsob podľa vynálezu je osobitne zaujímavý pre gigantické unilamelárne vezikuly a bunky. Veľkosť týchto unilamelárnych priestorov môže byť veľkosť organely alebo bunky, t.j. s priemerom 0,1 až 10^3 μm.

Mikropipeta by mala byť vyrobená z nevodivého materiálu, aby obsiahla a sústredila aplikované elektrické pole cez otvor konca špičky (konca najbližšie k priestoru) tejto mikropipety a môže to byť napríklad sklenená, kremenná alebo plastová mikropipeta. Mikropipeta bude mať s výhodou vonkajší priemer na špičke 10 nm až 100 μm a vnútorný priemer, t.j. priemer dutého priestoru vnútri mikropipety, 0,05 až 95 μm.

Navyše mikropipeta bude naplnená vodivým médiom, aby sa umožnil elektrický kontakt medzi prvou elektródou a druhou elektródou. Mikropipeta bude vybavená prvou elektródou, s výhodou vnútornou, vysokovodivou elektródou, napríklad Pt-, Ag-, Au- alebo uhlíkovláknovou elektródou; možno však použiť elektródu z akéhokoľvek vhodného vodivého materiálu. Špička prvej elektródy umiestnená vnútri mikropipety by mala byť umiestnená v určitej vzdialenosti, s výhodou 0,5 až 1 cm od špičky mikropipety, aby sa zabránilo priamemu kontaktu medzi touto prvou elektródou a lipidovou dvojvrstvovou membránou priestoru, čím sa membrána chráni pred elektrochemicky generovanými reaktívnymi časticami a/alebo plynovými bublinkami, ktoré by sa mohli tvoriť na povrchu prvej elektródy.

Táto druhá elektróda môže pozostávať z akéhokoľvek vhodného vodivého materiálu. Môže to byť uhlíkovláknová, kovová alebo sklenená mikroelektróda. Druhá elektróda bude mať s výhodou priemer na konci umiestnenom pri priestore približne 1 až 10^3 μm. Prvá a druhá elektróda môžu byť podobné alebo rôzne. Je tiež praktické nahradiť druhú elektródu typu uzemňovacieho kúpeľa.

Napäťový impulz použitý na získanie vysoko sústredeného elektrického poľa medzi prvou a druhou elektródou indukujúceho dielektrický rozklad lipidovej dvojvrstvy bude dočasný elektrický impulz intenzity poľa 1 až 10^3 V/cm. S výhodou sa používa dočasný 0,01 až 10 ms, impulz jednosmerného prúdu s pravouhlou vlnou 10 až 60 V/cm, ale možno použiť aj iný tvar impulzu ako aj striedavé napätie.

Keď sa špička mikropipety vloží do priestoru ohraničeného lipidovou membránou, mikropipetu možno použiť na niekoľko rôznych účelov. Mikropipetu možno použiť napríklad na odber vzoriek látok vnútri priestoru, možno ju použiť aj ako senzor, napríklad optovláknový alebo elektrochemický mikrosenzor používaný na vnútropriestorové merania alebo ako mikroelektródu. Mikropipetu možno napokon použiť na injekciu látky do priestoru.

Látku možno do priestoru zaviesť mnohými rôznymi spôsobmi. Možno napríklad použiť techniku na báze elektroforézy, elektroendoosmózy, gravitačného toku alebo mikroinjekciu pomocou stlačeného vzduchu alebo oleja, alebo teplocitlivého expanzného média.

Keď sa látka zavedie do priestoru ohraničeného lipidovou membránou, priestor možno použiť na mnoho rôznych účelov. Keď sú napríklad zavádzanou látkou koloidné častice, napríklad Ag alebo Au koloidy, kvantové bodové biokonjugátové senzory[1,2] alebo PEBBLE senzory[3], priestor možno použiť v spojení s ultracitlivou detekčnou alebo snímacou metódou, napríklad SERS alebo kvantitatívnymi fluorescenčnými meraniami, na detekciu konkrétnych látok.

Ďalšou zaujímavou aplikáciou je zavedenie materiálu do špecifických subcelulárnych priestorov, ako je cytosól, jadro alebo dokonca organely jednotlivých buniek.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Nižšie sú uvedené odkazy na pripojené výkresy, kde:

Obrázok 1 je schematický nákres kapilárneho držiaka pozostávajúceho z hlavného telesa (II) vybaveného Pt drôtenou elektródou pripojenou na pin konektora (III) a vstupom pre mikroinjektorový výstup (I). Injekčné špičky (VI) sú držané na mieste dvoma gumenými krúžkami (IV) a skrutkovacou čiapočkou (V).

Obrázok 2 ilustruje elektroinjekciu fluoresceínu do gigantického unilamelárneho lipozómu. (A) je obraz diferenciálneho interferenčného kontrastu (DIC) predstavujúci dva multilamelárne lipozómy s dvoma susednými unilamelárnymi lipozómami umiestnenými na povrchu krycieho sklíčka. Mikroelektróda a injekčná kapilára boli umiestnené v protiľahlej pozícii blízko cieľového lipozómu. (B) ilustruje, ako bol aplikovaný mechanický tlak na lipozóm pohybom injekčnej špičky smerom k mikroelektróde, čo lipozómu vnútilo obličkovitý tvar. (C) ilustruje, ako sa membrána permeabilizovala a lipozóm sa nasunul na injekčnú špičku a do lipozómu sa injektoval fluoresceín. (D) ukazuje, ako sa z lipozómu vybrala injekčná špička a protielektróda. (E) je fluorescenčný obraz lipozómov po injekcii. Lipozóm injektovaný fluoresceínom vykazuje silnú fluorescenciu, zatiaľ čo ostatné lipozómy boli neovplyvnené. Obrysové čiary unilamelárnych lipozómov boli digitálne zvýraznené.

Obrázok 3 ilustruje injekciu biopolyméru a koloidných častíc do GUV. Obrázok predstavuje fluorescenčné obrazy unilamelárnych lipozómov injektovaných vysoko koncentrovanými roztokmi (A) 30 nm fluorescenčných latexových guliek, (B) malých (100 nm) SBL-lipozómov (50 μg/ml) vyfarbených pomocou DiO a (C) pomocou YOYO-1 označenú T7 DNA (5 ng/ml).

Obrázok 4 ilustruje elektroinjekciu pomocou YOYO-1 vyfarbenej T7 fágovej DNA do buniek PC-12. (A) a (B) predstavujú obrazy z mikroskopu s jasným poľom a fluorescenčné obrazy buniek injektovaných fluorescenčnou DNA do cytosólu. V (C) a (D) je DNA injektovaná s výhodou do jadra bunky a cytosól vykazuje len slabú fluorescenciu.

Obrázok 5 predstavuje unilamelárny lipozóm ako reakčnú nádobu na interkalačnú reakciu medzi T2 DNA a YOYO-1. (A) ukazuje unilamelárnu protrúziu z multilamelárneho lipozómu použitého ako cieľ. (B) ukazuje injekciu roztoku obsahujúceho T2 DNA do lipozómu. (C) je fluorescenčný obraz vezikuly s injektovanou DNA nevykazujúcou žiadnu fluorescenciu. (D) ukazuje, ako bola injekčná kapilára vytiahnutá a nahradená tenšou kapilárou s YOYO-1 na druhú injekciu. (E) je fluorescenčný obraz po inkubácii odhaľujúci prítomnosť fluorescenčných molekúl DNA inetrkalovaných pomocou YOYO-1 vnútri lipozómu. V mikroskope bolo možné pozorovať Brownov pohyb mikrometrových štruktúr, čo presvedčivo naznačuje, že fluorescencia pochádzala najmä z DNA interkalovanej pomocou YOYO. Farbivo YOYO-1 však malo aj afinitu pre lipidové membrány, ako to ukazuje silná fluorescencia pochádzajúca z multilamelárneho lipozómu.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Materiály a metódy

Chemikálie

FM 1-43, DiO, YOYO-1 a FluoSpheres (s priemerom 30 nm a 200 nm) boli od firmy Molecular probes. Fluoresceín (GC-Grade), T2 DNA (168 000 bp[22]), T7 DNA (39936 bp[23]), L-α-fosfatidylcholín (typ II-S), fosforečnan draselný (>98 %), báza Trizma (>99,9 %) boli zakúpené od firmy SIGMA. Chloroform, EDTA (titriplex III), síran horečnatý

a dihydrogenfosforečnan draselný (všetko čistoty p.a.) boli získané od firmy MERCK. Použil sa glycerol (>99,5 %) od firmy J. T. Baker a deionizovaná voda od Milli-Q system (Millipore).

Vytváranie malých unilamelárnych vezikúl (SUV)

Použil sa acetónom vyčistený asolektínový prípravok rozpustený v chloroforme[24]. Pri príprave SUV sa lipidy zriedili chloroformom na koncentráciu lipidov 10 mg/ml. Pri štandardnej príprave sa 300 μl tohto roztoku premiestnilo do banky s okrúhlym dnom. Rozpúšťadlo sa odparilo na rotačnej odparke v priebehu približne 6 h pri laboratórnej teplote. Na stenách banky sa vytvoril tenký, úplne suchý lipidový film. K tomuto filmu sa opatrne pridal tlmivý roztok PBS (báza Trizma 5 mM, K_3PO_4 30 mM, KH_2PO_4 30 mM, $MgSO_4$ 1 mM, EDTA 0,5 mM, pH 7,8) obsahujúci 1 % objemové glycerolu až do koncentrácie lipidov 1 mg/ml. Lipidový film sa nechal napučiavať cez noc pri 4 °C. Nakoniec sa vzorka podrobila pôsobeniu ultrazvuku v ultrazvukovom kúpeli naplnenom ľadovou vodou. Bežne bol potrebný čas sonikácie približne 10 minút, kým sa celý lipidový film rozpustil a vytvorila sa belavá opalescentná zmes. Suspenzia SUV sa skladovala pri 4 °C a bola stabilná niekoľko dní.

Tvorba GUV

Tvorba GUV sa uskutočnila v dvojstupňovom postupe; dehydratáciou lipidovej disperzie s nasledujúcou rehydratáciou.

Pri dehydratácii sa malý objem (5 μl) suspenzie SUV opatrne umiestnil na borosilikátové krycie sklíčko a dal sa do vákuového exsikátora pri 4 °C. Keď bola vzorka úplne suchá (žiadne príznaky „fluidity" v mikroskope), dehydratácia sa ukončila a vzorka sa pred rehydratáciou nechala dosiahnuť teplotu miestnosti.

Suchá vzorka sa rehydratovala pomocou 5 μl tlmivého roztoku. Po 3 – 5 min sa vzorka ďalej zriedila tlmivým roztokom, čo sa robilo veľmi opatrne, aby sa minimalizovala turbulencia vo vzorke. Všetky rehydratačné kvapaliny mali teplotu miestnosti.

Mikromanipulácia a elektroinjekcia

Všetky injekčné experimenty sa uskutočnili na inverznom mikroskope (Leica DM IRB, Wetzlar, Nemecko) vybavenom objektívom Leica PL Fluotar 40x a vodnohydraulickým manipulačným systémom (jemný manipulátor: Narishige MWH-3, Tokio, hrubý manipulátor: Narishige MC-35A, Tokio).

Fluorescenčné zobrazovanie sa dosiahlo posielaním výstupu Ar^+ lasera (Spectra-Physics 2025-05, 488 nm) cez 488 nm čiarový interferenčný filter, za ktorým nasledoval točiaci sa disk na zrušenie koherencie a rozptyl laserového svetla. Laserové svetlo bolo zachytené šošovkou a poslané cez fluoresceínový filter (Leica I-2) do objektívu, aby sa excitovali fluorescenčné farbivá. Fluorescencia sa zachytávala objektívom a detekovala trojčipovou farebnou CCD kamerou (Hamamatsu, Kista, Švédsko) a zaznamenávala sa na VHS (Panasonic S-VHS AG-5700). Digitálne obrazy sa upravili pomocou systému Argus-20 (Hamamatsu, Kista, Švédsko) a grafického softvéru Adobe Photoshop.

Elektroinjekcie sa ovládali mikroinjekčným systémom (Eppendorf Transjector 5246, Hamburg, Nemecko) a generátorom impulzov (Digitimer Stimulator DS9A, Welwyn Garden City, Spojené kráľovstvo) pripojeným k injekčnej kapiláre.

Na transláciu lipozómov na rôzne miesta počas experimentov sa použili uhlíkovláknové mikroelektródy (ProCFE, Axon Instruments, Foster City, USA) riadené mikromanipulačným systémom. Jednoduchým tlačením vezikúl mikroelektródami sa tieto odpojili od povrchu a priľnuli k špičkám elektród a bolo možné nimi pohybovať na dlhé vzdialenosti do požadovaného cieľa. Touto technikou bolo tiež možné odpojiť unilamelárne protrúzne vezikuly, ktoré priľnuli na multilamelárne lipozómy.

Príprava injekčných špičiek

Injekčné špičky sa pripravili z borosilikátových kapilár (dĺžka: 10 cm, vonkajší priemer: 1 mm, vnútorný priemer: 0,78 mm; Clark Electromedical Instruments, Reading, Spojené kráľovstvo), ktoré sa opatrne otavili plameňom na zadných koncoch, aby sa ľahšie zasúvali do držiaka kapilár. Kapiláry sa pred použitím vypláchli prúdom plynného dusíka. Špičky sa vytiahli na CO_2-laserovom vyťahovacom prístroji (Model P-2000, Sutter instrument Co., Novato, USA). Vonkajší priemer injekčných špičiek sa pohyboval medzi

0,5 – 2,5 μm. Aby sa zabránilo kontaminácii, špičky sa vytiahli bezprostredne pred použitím.

Výsledok a diskusia

Mikroinjekčné postupy

Injekčné špičky sa spätne vyplnili vybraným médiom a namontovali sa na držiak pipiet vlastnej konštrukcie zobrazený schematicky na obrázku 1. Hlavným účelom držiaka kapilár je upevniť injekčnú špičku a pôsobiť ako rozhranie medzi mikroinjekčným systémom a generátorom impulzov. Zariadenie je v podstate štandardným svorkovým držiakom pipiet nasadeným na výstup mikroinjekčného systému. Hlavné teleso držiaka pipiet (II) v tomto príklade bolo skonštruované z plexiskla a vybavené elektródou z Pt drôtu pripojenou k nízkonapäťovému generátoru impulzov cez pin konektora (III). Zahŕňa aj vstup pre výstup mikroinjektora (I). Injekčné špičky (VI) sú pevne držané na mieste dvoma gumenými krúžkami (IV) pripevnenými skrutkovacou čiapočkou Delrin (V). Držiak pipiet bol namontovaný na vyššie opísaný mikromanipulačný systém. Ako protielektróda sa použila uhlíkovláknová mikroelektróda s priemerom špičky 5 μm. Po výbere vhodnej GUV alebo bunky sa injekčná špička a mikroelektróda umiestnili proti sebe v úzkom kontakte s vezikulou v uhle 10 – 30° a 150 – 170° vzhľadom na rovinu objektu (pozrite obrázok 2). Opatrným umiestnením elektród bolo možné zachytiť voľne sa vznášajúce vezikuly a následne uskutočniť injekcie. Aplikovaním mechanického tlaku pohybom injekčnej špičky smerom k mikroelektróde, čím sa vezikule vnútil obličkovitý tvar (obrázok 2B), bolo možné penetrovať membránu aplikovaním elektrického poľa (pravouhlý impulz jednosmerného prúdu 40 V/cm, 3 ms). Po permeabilizovaní sa vezikula navliekla na injekčnú špičku a znova získala svoju guľovitú formu (obrázok 2C). V tomto režime bolo možné injektovať do lipozómu kontrolované objemy materiálov obsiahnutých v mikropipete. Na obrázku 2C sa do jediného lipozómu injektoval 25 μM roztok fluoresceínu. Injekčné objemy sa ovládali pomocou mikroinjekčného systému (injekčný tlak: 250 – 1000 hPa, čas: 0,1 – 1,5 s). Do lipozómov s priemerom 10 až 20 μm sa spravidla injektoval objem 50 až 500 fl. Injekčné objemy pre bunky sa udržiavali na čo najnižšej hodnote, aby sa zabránilo traume bunky. Po dokončení injekcie sa špička

vytiahla z interiéru vezikuly bez pozorovateľných známok poškodenia vezikuly (obrázok 2D) alebo úniku (obrázok 2E).

GUV ako aj bunky boli permeabilizované jednoimpulzovým režimom aplikovaním jedného alebo niekoľkých prechodných pravouhlých impulzov jednosmerného napätia s trvaním impulzu 1 až 10 ms. Intenzita elektrického poľa bola spravidla v rozmedzí 10 až 40 V/cm. Membránové napätie V_m na rôznych miestach na membráne vezikuly počas vystavenia pôsobeniu homogénneho elektrického poľa s trvaním t možno vypočítať z nasledujúceho vzorca:

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

kde E je intenzita elektrického poľa, r_s je polomer gule, α je uhol vzhľadom na smer elektrického poľa a τ je kapacitno-odporová časová konštanta. Hoci táto rovnica nevyhovuje presne podmienkam pre elektroinjekčnú techniku, možno ju použiť na hrubý odhad vytvoreného transmembránového potenciálu. Za predpokladu, že napäťový impulz 40 V/cm sa aplikuje v pravých uhloch na guľový membránový priestor s polomerom 10 μm, vytvorí sa transmembránový potenciál len 60 mV. Taký malý spád napätia cez membránu samozrejme nevytvorí dostatočné elektrokompresívne napätie, aby sa dosiahla permeabilizácia membrány. Keďže primárna elektróda je umiestnená vnútri injekčnej kapiláry, koordináty elektrickej destabilizácie sa priestorovo zhodujú s miestom, kde je aplikovaná maximálna mechanická sila. Ukázalo sa, že táto elektromechanická permeabilizácia je výkonnou technikou na penetráciu lipidových membrán umožňujúcou použitie hrubých mikropipetových špičiek.

Výsledky

Pri použití tohto postupu bolo možné injektovať reagenty do jednotlivých buniek a GUV s priemermi 5 až 25 μm pomocou mikropipetových špičiek s vonkajším priemerom približne 2 μm alebo až do 3 μm. Injekciu do väčších buniek teda možno uskutočniť ľahko. Takto hrubé kapiláry majú tiež dostatočne veľké vnútorné priemery na injekciu väčších štruktúr a koloidných častíc vo vysokých koncentráciách do vezikúl alebo buniek. Toto ilustruje skutočnosť, že do unilamelárnych vezikúl sa injektovali pomocou YOYO-1

označené T7 fágové molekuly DNA (R_G = 0,56 μm), 30 nm latexové guľky ako aj SUV s priemerom 100 nm (pozrite obrázok 3).

Jednotlivé bunky PC12 sa úspešne injektovali fluoresceínom (údaje nezobrazené) ako aj T7 fágovou DNA označenou pomocou YOYO-1 (ako je zobrazené na obrázku 4). Navyše bolo možné uskutočniť preferenčnú ale nie výlučnú injekciu materiálov do cytoplazmy (obrázok 4 B) a jadra (obrázok 4 D) jednotlivých buniek. V oboch experimentoch je fluorescencia koncentrovaná lokálne na mieste injekcie, čo indikuje, že difúzia komplexu DNA-farbivo cez bunku bola obmedzená. Toto ukazuje, že tu prezentovaná technika by umožnila cielenú dodávku napríklad liečiv, genetického materiálu (napríklad DNA alebo RNA), proteínov, farbív a častíc do špecifických priestorov bunky.

Keďže tu opísanú elektroinjekčnú techniku možno uskutočňovať s veľmi vysokými mierami úspešnosti, môže byť výkonným nástrojom na iniciáciu chemických reakcií vnútri vezikúl a buniek. To ilustruje experiment zobrazený na obrázku 5. Uskutočnením dvoch po sebe nasledujúcich injekcií reagentov do jedinej vezikuly sa iniciovala interkalačná reakcia medzi T2 fágovou DNA (R_G = 1,1 μm) a YOYO-1. (A) Ako cieľ sa vybrala unilamelárna protrúzia z multilamelárneho lipozómu usadeného na krycom sklíčku. (B) Najprv sa do vezikuly injektoval roztok obsahujúci T2 DNA (1 ng/ml) pomocou mikropipetovej špičky s vonkajším priemerom 2 μm (40 V/cm, 4 ms). (C) Fluorescenčný obraz vezikuly s injektovanou DNA nevykazoval žiadnu fluorescenciu. (D) Injekčná kapilára bola vytiahnutá a nahradená tenšou kapilárou s vonkajším priemerom 1 μm naplnená farbivom YOYO1 (50 μM) a uskutočnila sa druhá injekcia (20 V/cm, 4 ms). (E) Fluorescenčný obraz po 10 min inkubácie odhalil prítomnosť fluorescenčných molekúl DNA inetrkalovaných pomocou YOYO-1 vnútri vezikuly. V mikroskope bolo možné pozorovať Brownov pohyb mikrometrových štruktúr, čo presvedčivo naznačuje, že fluorescencia pochádzala najmä z DNA interkalovanej pomocou YOYO. Tento experiment ilustruje popri skutočnosti, že týmto spôsobom možno iniciovať chemické reakcie, že je možné tiež postupne injektovať viacero reagentov do jedinej vezikuly bez pozorovateľného úniku. Preto možno praktizovať iniciáciu zložitých biochemických reakcií vnútri priestoru lipozómu alebo bunky.

Použitá literatúra

(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

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Spôsob penetrácie lipidových dvojvrstvových membrán s cieľom zasunúť aspoň jednu špičku aspoň jedného dutého ihlovitého predmetu do priestoru vytvoreného aspoň jednou lipidovou dvojvrstvou, vyznačujúci sa tým, že tento priestor sa umiestni medzi uvedený ihlovitý predmet, ktorý je vybavený prvou elektródou, a druhú elektródu, pričom uvedená aspoň jedna špička aspoň jedného ihlovitého predmetu sa umiestni do kontaktu s uvedeným priestorom tak, že táto aspoň jedna špička aplikuje mechanickú silu na lipidovú dvojvrstvu priestoru a tak mechanicky deformuje tento priestor, po čom sa aplikuje prechodný elektrický impulz s intenzitou poľa 1 až 10^3 V/cm medzi uvedenou prvou elektródou a uvedenou druhou elektródou, čoho výsledkom je sústredené elektrické pole cez tento priestor spôsobujúce dielektrický rozklad lipidovej dvojvrstvy, vďaka čomu uvedená aspoň jedna špička uvedeného aspoň jedného ihlovitého predmetu penetruje cez lipidovú dvojvrstvovú membránu priestoru.

2. Spôsob podľa nároku 1, vyznačujúci sa tým, že prvá elektróda je umiestnená vnútri ihlovitého predmetu.

3. Spôsob podľa nároku 1 alebo 2, vyznačujúci sa tým, že uvedeným ihlovitým predmetom je mikropipeta.

4. Spôsob podľa nároku 3, vyznačujúci sa tým, že uvedenou mikropipetou je sklenená mikropipeta.

5. Spôsob podľa nároku 3, vyznačujúci sa tým, že uvedenou mikropipetou je kremenná mikropipeta.

6. Spôsob podľa nároku 3, vyznačujúci sa tým, že uvedenou mikropipetou je plastová mikropipeta.

7. Spôsob podľa nároku 1 alebo 2, vyznačujúci sa tým, že uvedeným ihlovitým predmetom je mikroelektróda, ktorá teda predstavuje uvedenú prvú elektródu.

8. Spôsob podľa nároku 1 alebo 2, vyznačujúci sa tým, že uvedeným ihlovitým predmetom je kapilára.

9. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 8, vyznačujúci sa tým, že priemer uvedeného priestoru je 0,1 až 10^3 μm.

10. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 9, vyznačujúci sa tým, že vonkajší priemer špičky ihlovitého predmetu je 10 nm až 100 μm za predpokladu, že je vždy menší ako priemer priestoru.

11. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 10, vyznačujúci sa tým, že vnútorný priemer špičky ihlovitého predmetu je od 50 nm až do 95 μm za predpokladu, že je vždy menší ako priemer priestoru a vždy menší ako vonkajší priemer špičky ihlovitého predmetu.

12. Spôsob mikroinjekcie zahŕňajúci uskutočnenie spôsobu penetrácie lipidových dvojvrstvových membrán podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 11, vyznačujúci sa tým, že roztok alebo disperzia aspoň jednej látky sa dodáva cez uvedený ihlovitý predmet do uvedeného priestoru po penetrovaní špičky ihlovitého predmetu do priestoru.

13. Spôsob podľa nároku 12, vyznačujúci sa tým, že uvedenou látkou je nízko- alebo strednomolekulová látka.

14. Spôsob podľa nároku 12, vyznačujúci sa tým, že uvedenou látkou je biopolymér.

15. Spôsob podľa nároku 12, vyznačujúci sa tým, že uvedenou látkou je koloidná častica.

16. Spôsob podľa nároku 12, vyznačujúci sa tým, že uvedenou látkou je nanosenzor.

17. Spôsob podľa nároku 12, vyznačujúci sa tým, že uvedenou látkou je organela.

18. Spôsob podľa nároku 12, vyznačujúci sa tým, že uvedenou látkou je baktéria.

19. Spôsob podľa nároku 12, vyznačujúci sa tým, že uvedenou látkou je bunka.

20. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 19, vyznačujúci sa tým, že uvedená mikropipeta je tvorená poľom niekoľkých ihlovitých predmetov.

21. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 20, vyznačujúci sa tým, že uvedenou prvou elektródou je Pt elektróda.

22. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 20, vyznačujúci sa tým, že uvedenou prvou elektródou je Ag elektróda.

23. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 20, vyznačujúci sa tým, že uvedenou prvou elektródou je Au elektróda.

24. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 20, vyznačujúci sa tým, že uvedenou prvou elektródou je uhlíkovláknová elektróda.

25. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 24, vyznačujúci sa tým, že priemer druhej elektródy na konci blízkom k priestoru je približne 1 až 10^3 μm.

26. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 25, vyznačujúci sa tým, že uvedenou druhou elektródou je uhlíkovláknová elektróda.

27. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 25, vyznačujúci sa tým, že uvedenou druhou elektródou je kovová elektróda.

28. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 25, vyznačujúci sa tým, že uvedenou druhou elektródou je sklenená mikroelektróda.

29. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 28, vyznačujúci sa tým, že uvedeným priestorom je lipozóm.

30. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 28, vyznačujúci sa tým, že uvedeným priestorom je vezikula.

31. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 28, vyznačujúci sa tým, že uvedeným priestorom je organela.

32. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 28, vyznačujúci sa tým, že uvedeným priestorom je bunka.

33. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 28, vyznačujúci sa tým, že uvedeným priestorom je takzvaná gigantická unilamelárna vezikula (GUV).

34. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 28, vyznačujúci sa tým, že uvedeným priestorom je takzvaná multilamelárna vezikula (MLV).

35. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 12 až 34, vyznačujúci sa tým, že sa opakuje raz alebo niekoľkokrát s cieľom zaviesť do daného priestoru rôzne látky.

36. Priestor spracovaný spôsobom podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 35.

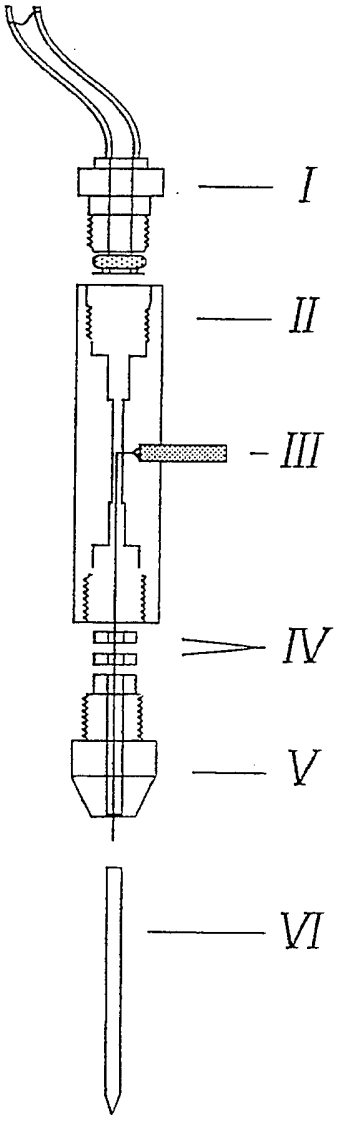
37. Použitie priestoru podľa nároku 36 pri detekcii špecifických molekúl.

38. Použitie priestoru podľa nároku 36 pri sondovaní vnútrobunkových štruktúr.

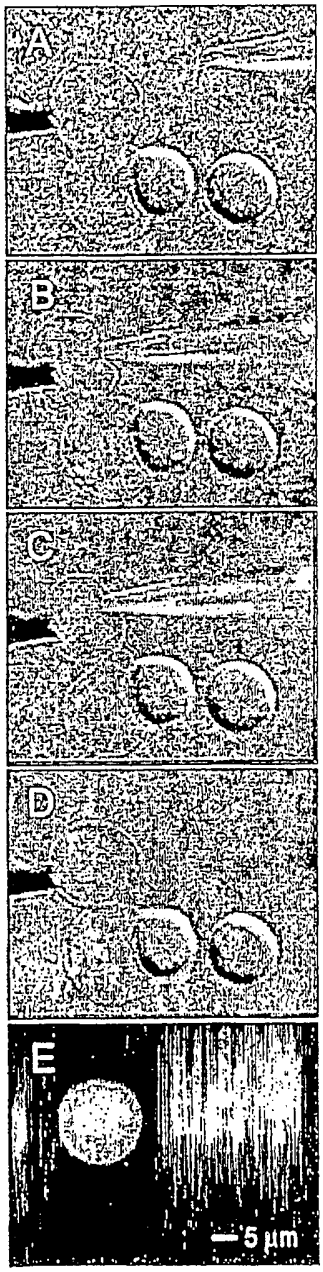
39. Použitie priestoru podľa nároku 36 pri štúdiu biochemických reakcií.

40. Použitie priestoru podľa nároku 36 ako nádoby na chemickú derivatizáciu v miniaturizovanej separačnej technike.

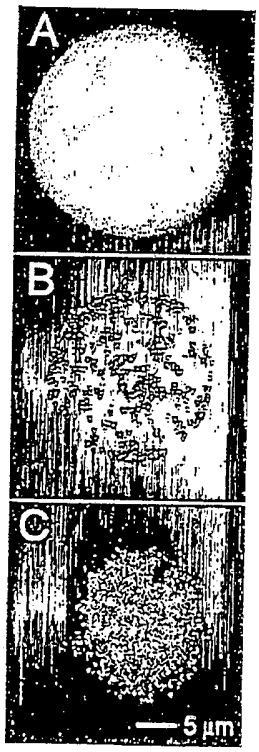
41. Použitie priestoru podľa nároku 36 v biologickom počítači.



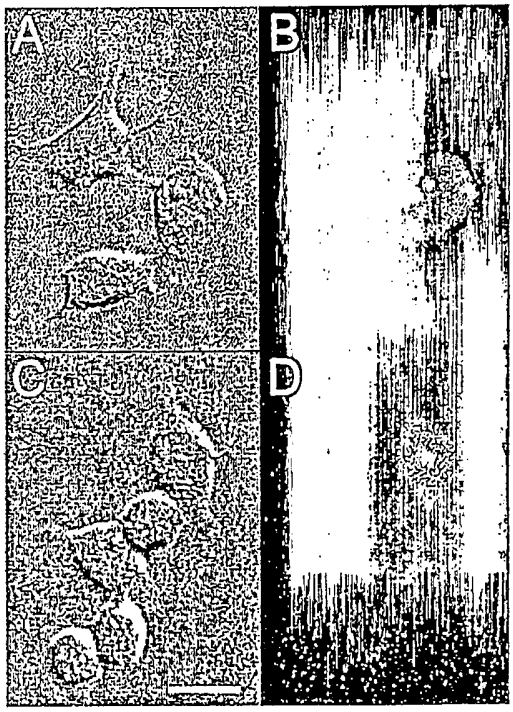
Obr. 1



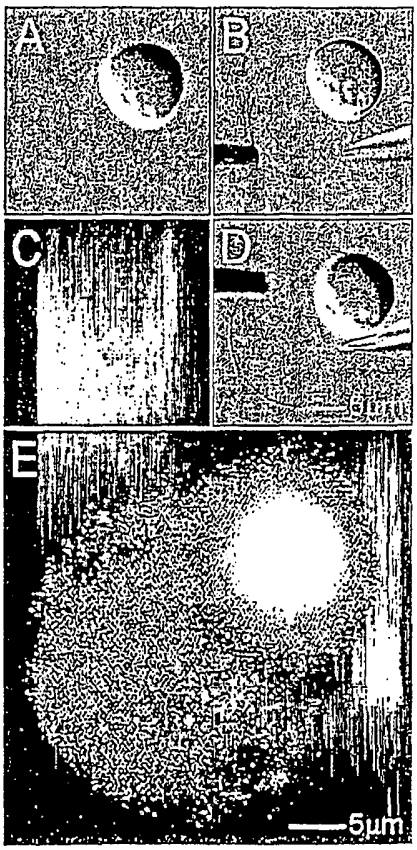
Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5