



H U 0 0 0 2 1 4 8 3 4 B

(19) Országkód

HU

MAGYAR
KÖZTÁRSASÁGMAGYAR
SZABADALMI
HIVATALSZABADALMI
LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

214 834 B

(21) A bejelentés ügyszáma: 4039/90

(22) A bejelentés napja: 1990. 06. 29.

(30) Elsőbbségi adatok:

07/374,406 1989. 06. 30. US

07/477,688 1990. 02. 09. US

(51) Int. Cl.⁶

C 12 N 15/87

C 12 M 1/00

C 12 M 3/00

A 61 K 47/48

(40) A közzététel napja: 1992. 06. 29.

(45) A megadás meghirdetésének a dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1998. 06. 29.

(72) Feltalálók:

Gould, Alan R., Midland, Michigan (US)

Miller, Theodore E., Midland, Michigan (US)

Schuchardt, Bradley C., Midland, Michigan (US)

Skokut, Thomas A., Midland, Michigan (US)

(73) Szabadalmaz:

DowElanco, Indianapolis, Indiana (US)

(74) Képviseelő:

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.,
Budapest

(54)

Berendezés és eljárás anyag bevitelére sejtekbe

KIVONAT

A találmány tárgya berendezés anyag bevitelére sejtekbe, mely tartalmaz

(a) egy gázkivezető nyílással rendelkező nagynyomású gázforrást;

(b) egy a gázkivezető nyílással összekötött, bevezetőnyílással és kivezetőnyílással rendelkező hajtható anyagtartályt.

A nagynyomású gázforrás (30) kivezető nyílása és a hajtható anyagtartály (40) bevezetőnyílása között elrendezett többutas szelepet (70) tartalmaz.

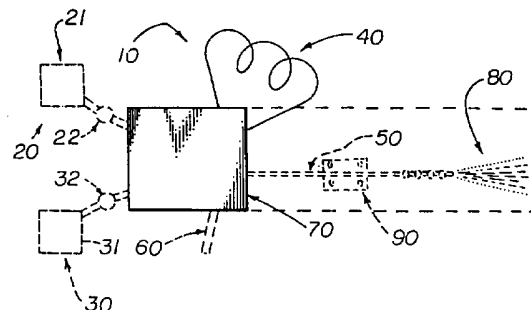
A találmány tárgya továbbá eljárás nem sejtes biológiai anyagnak élő sejtekbe történő bevitelére, melynek során

(a) egy előre megválasztott, 15–150 atm ($1,47 \times 10^6$ – $1,47 \times 10^7$ Pa) nyomású gázból előre meghatározott térfogatnyit alkalmaznak;

(b) hajtható anyagból előre meghatározott mennyiséget vesznek, mely hajtható anyag sejtes vagy nem sejtes biológiai anyag, mely hordozóközegben van szuszpendálva; és

(c) a hajtható anyagot kontaktálják a meghatározott mennyiségű gázzal, és a hajtható anyagot egy kiválasztott cél irányában gyorsítják 200 mph–1200 mph (89,41–536,45 m/s) közötti sebességgel.

1. ábra



HU 214 834 B

A találmány tárgya berendezés és eljárás biológiai anyag bevitelére biológiai célanyagba. Pontosabban, a találmány egy olyan berendezésre és eljárásra vonatkozik, melyben egy előre meghatározott térfogatú nagy nyomású gázt érintkeztetünk egy előre meghatározott mennyiségű hajtható anyag szuszpenziójával, és ezt követően a szuszpenziót egy kiválasztott célanyagra irányítva gyorsítjuk.

A biológusok rendszerint a biológiai anyagok széles tartományát kívánják élő sejtekbe bevinni. Jelenleg is sok olyan kutatás van folyamatban, mely élő sejteknek genetikai átalakítására irányul. A biológiai anyagnak élő sejtekbe történő bevitelére szolgáló hagyományos technológiák magukba foglalják az elektroporációt, a közvetlen DNS abszorpciós mechanizmusokat, a fúziós mechanizmusokat, a mikroinjekciós mechanizmusokat, valamint a fertőzőszerek használatát. Ezen módszerek mindegyike azonban bizonyos gyakorlati hátránnyal rendelkezik.

Az elektroporáció egy olyan eljárás, mellyel különböző molekulákat visznek be sejtekbe, melyeket rövid nagyfeszültségű villamos impulzusoknak tesznek ki. Az elektroporáció általános ismertetését lásd Shigekawa és társai (1988), *Biotechniques*, 6:742; Miller és munkatársai (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:856–860; valamint Powel és munkatársai (1988), *Appl. Environ. Microbiol.*, 54:655–660 című kiadványokban.

Az elektroporáció alkalmazásának korlátai általánosságban magukba foglalják i az alkalmazott nagyfeszültség miatt a sejt életképesség általános csökkenését és ii azt, hogy nem lehet pontosan megcélozni bizonyos sejteket, különösen egy bonyolult többsejtes szervben.

Ezenkívül, miközben az elektroporációs eljárások nagymértékben növelték a kiméra génszerkezetek felvételének hatékonyságát, ezek az eljárások, ha azokat növényeknél alkalmazzák, a növényekben *in vitro* szuszpenziós rendszerekre korlátozódnak. Továbbá, jóllehet sikeresen használták egyszikűek, valamint kétszikűek átalakításában (lásd Fromm és munkatársai (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:5824–5828), az elektroporációs eljárásokban általában szükség van a növény sejtfalainak eltávolítására szolgáló viszonylag munkaigényes és időrabló lépésre.

A génfelvételi mechanizmusok rendszerint különálló sejtek szuszpenziójára vonatkoznak, és különösen akkor, ha növényi sejteknél alkalmazzák, a sejtfalanyagokat enzimmal el kell távolítani. Következésképpen, a génfelvételi mechanizmusok időigényesek és viszonylag kicsi a hatékonyságuk.

A génfelvétel egyik technikája az, hogy megnövelik a membrán permeabilitását, például kalcium (Ca) használatával (lásd Mandel és munkatársai (1972), *J. Mol. Biol.*, 53:159–162); és hőshokot használnak (Dityatkin és munkatársai (1972), *Biochimica et Biophysica Acta*, 281:319–323).

Egy második génfelvételi technika szerint felületi kötődésű hatóanyagokat, például polietilén-glikolt (PEG) használnak. A felületi kötődésű hatószerek használatának általános ismertetését lásd Chang és munkatársai (1972), *Mol. Gen. Genet.*, 168:111–115; Krens és munkatársai (1982), *Nature*, 296:72) című kiadványok-

ban; vagy például kalcium-foszfátot használnak (lásd Graham és munkatársai (1973), *Virology*, 52:456); Wigler és munkatársai (1979), *Cell*, 16:777 című kiadványban).

5 A génfelvételre egy harmadik technika szerint egy sejtbe fagocitózissal visznek be részecskéket. Megfelelő részecskék a liposzómák (Uchimiya és munkatársai (1982), *Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture*, Fujiwara (ed.), 507–508); organellumok (Potrykus (1973), *Z. Pflanzenphysiol.*, 70:364–366); vagy baktériumok (lásd Cocking (1972), *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 23:29–50).

A fúziós mechanizmusok során új genetikai anyagot úgy juttatnak be egy sejtbe, hogy a sejt membránját egy másik sejt membránjával olvasztják egybe, mely másik sejt lehet egy organellum vagy egy liposzóma. A génfelvételi mechanizmushoz hasonlóan a növényi sejtfúziós technológiák *in vitro* szuszpenziós rendszerek használatára alapulnak, ahol a sejtekről enzim alkalmazásával minden sejtfalanyagot leválasztanak.

A fúziót villamos áramok, PEG, valamint Sendai vírusrészecskék alkalmazásával lehet előidézni. A sejt-fúzió általános ismertetését lásd Uchidaz és munkatársai (1980), *Introduction of Macromolecules Into Viable Mammalian Cells*, Baserga és munkatársai (eds.), 1:169–185; és Harris (1970), *Cell Fusion: The Dunham Lectures* című kiadványokban.

Jóllehet a fúziós technológiákkal viszonylag jó hatékonyságot lehet elérni a befolyásolt sejtek számát tekintve, a sejtek kiválasztásának problémája bonyolult lehet. Például a sejt–sejt fúzió esetében az így kapott sejtek ploiditása gyakran megemelkedett, ami azok használhatóságát korlátozhatja.

A mikroinjektálás egy közvetlen módszer kromoszómáknak mikroinjektálással történő átvitelére. A mikroinjektálási technikák különlegesen finom, kihúzott kapilláris csöveket alkalmaznak, melyeket injekciós tűként lehet használni biológiai részecskéknek bizonyos típusú egyedi sejtekbe való közvetlen befecskendezésére. Ha kis sejtekbe kell befecskendezni, nagyon éles kapillárisokra van szükség, amelyeknek hegye nagyon könnyen letörik vagy eldugul. Ezenkívül nagyon nagy nyomásokra van szükség a nagy mennyiségű anyag átáramoltatására az 1 μm -nél kisebb kapilláris nyílásokon keresztül, és az ilyen nagy anyag-áram szabályozása bonyolult lehet. A teljes folyamat nagyon empirikus, és a különböző sejtípusoknál különböző módosításokra van szükség.

A mikroinjektálási technikák általános leírását lásd Diacumakos (1973), *Methods in Cell Biology*, Prescott (ed.), 287–311; Graessman és Graessman, *Methods in Enzymology*, 101:482–492; Crossway és munkatársai (1986), *Mol. Gen. Genet.*, 202:179–185; Crossway és munkatársai (1986) *Biotechniques*, 4:320–334; Reich és munkatársai (1986), *Can. J. Bot.*; valamint Reich és munkatársai (1986) *Bio/Technology*, 4:1001–1004 kiadványokban.

A mikroinjektálási technikák hátránya, hogy a sejtek túlélési aránya kicsi. Ezenkívül a növényi sejtek közvetlen mikroinjektálását a merev sejtfal jelenléte tovább bonyolítja. Jóllehet ki lehet alakítani olyan protoplasz-

tokat, melyeknek nincsen sejtfa, a növényi sejt protoplasztok mikroinjektálását azok rendkívül nagy törekenysége bonyolulttá teszi.

Tehát a mikroinjektálás hátránya az, hogy egyetlen sejt manipulációjára van szükség, és emiatt nem megfelelő sejtek tömegének kezelésére. Az eljárás általában nagyon fárasztó és bonyolult. Következésképpen, általában nagyon kicsi a hatékonysága és a termelékenység.

A fent említett rendszereken kívül van néhány fertőző ágens, melyek nukleinsavakat képesek sejtekbe bevinni. Az *Agrobacterium tumefaciens*-nek megvan az a benne rejlő képessége, hogy az abban lévő Ti (tumorkeltő) plazmidból egy DNS-részt átvigyen egy fertőzött növényi sejtbe. Azáltal, hogy az *Agrobacterium*ban lévő plazmidban idegen géneket építünk be, mely *Agrobacterium*ok bizonyos szekvenciákat tartalmaznak a Ti plazmidokból, a bakteriális transzformációs mechanizmust fel lehet használni arra, hogy idegen géneket juttassunk a fertőzött növényi sejtek genomjába.

Elsődleges fontosságúak a kétszikű növényi sejtek szempontjából az *Agrobacterium* vektorok (lásd Fralex és munkatársai (1986/, CRC Crit. Rev. Plant. Sci., 4:1–46) és az állati sejteknél a retrovirális vektorok (lásd Anderson (1984/, Science, 226:401–409).

A retrovírusok (RN-vírusok) arra használhatók, hogy azokkal géneket vigyenek be állati sejtekbe. Amikor a vírus belép a sejtbe, annak RNS-e templátként szolgál a komplementer DNS fordított átírására, mely a gazdasejt genomjába be fog épülni. Ezt a DNS-t izolálni lehet és be lehet vinni egy plazmidba. Ez a plazmid, hogyha további géneket adtak hozzá, használható segítő retrovírusok segítségével sejtek átalakítására.

Ezeket a rendszereket azonban gyakran nehéz ellenőrizni. A fertőző ágenseknek például DNS-szállítórendszerek formájában történő felhasználásával kapcsolatos probléma sokoldalú. Először is a fertőző ágenseknek korlátozott gazda-specifitása van. Az átadás csak egyedi sejt szintjén hajtható végre, tipikusan szomatikus szövetekkel, amelyeket azután mesterségesen kell egy teljes növényre regenerálni. Ez az *Agrobacterium*mal közvetített genetikai átalakítás alkalmazhatóságát azokra a gabonafajtákra korlátozza, amelyeket könnyen lehet olyan szövettípusokból regenerálni, melyek fogékonyak az *Agrobacterium* fertőzésre; az *Agrobacterium* természetes gazdasejtjeit tartalmazó növények csupán kétszikű növények lehetnek, valamint korlátozott számú egyszikű fajta a *Liliaceae* családból. Hasonlóképpen, a retrovírusok és az általuk hordozott DNS expressziója többé-kevésbé gazda- és szövetspecifikusak.

Másodszor, a fertőző hatóanyagok az átviteli eljárást tovább bonyolítják azáltal, hogy egy második élő rendszert visznek be annak minden velejáró komplikációjával. Például az *Agrobacterium* által közvetített transzformációk szomoklonális változatokat hozhatnak létre, ami spontán jön létre szövetkultúrában lévő növényi szövetekben, és ami bonyolulttá teheti az átalakító azonosítását. Ezenkívül a fertőző hatóanyagok, például a retrovírusok potenciálisan veszélyesek – a módosítandó szervezetet károsíthatják, vagy pedig, rekombináció révén, új kórokozók kifejlődéséhez vezethetnek.

Viszonylag nemrég Sanford és munkatársai kifejlesztettek egy olyan eljárást, mellyel anyagokat lehet bevinni ép, egészséges szövetek sejtjeibe (lásd Klein és munkatársai (1987/, Nature, 337; és Sanford és munkatársai (1988/, Particular Sci. and Technol., 5:27–37).

Ezek a dokumentumok azt a kitanítást tartalmazzák, hogy kicsi, nagy sűrűségű wolframrészcskéket (mikrolövedékeket) egy részecskeágyú-berendezéssel nagy sebességre lehet felgyorsítani. Sanford és munkatársai azt írják, hogy mikrolövedékeket elegendően nagy sebességekre felgyorsítottak, és ezzel növényi sejteken lehetővé tették azok áthatolását az alábbi változatokban: 1 egy makrolövedék (műanyag golyó) és egy leállító lemez, 2 egy átvitt mechanikus impulzus, 3 egy gáz (például levegő) -kibocsátás, és 4 egy centripetális gyorsítórendszer.

Jóllehet, a részecskeágyú-berendezés egy javasolt előrehaladást képvisel a technika állásában, annak különböző megvalósításaiban a részecskebombázó eljárások bizonyos hátrányokkal rendelkeznek. Például az összes különböző megvalósítási formában a wolfram-töltet szuszpenzió mennyisége nem könnyen reprodukálható; és nagyon munkaigényes eljárás a kultúrákat ismételtten beoltani.

Ezenkívül a makrolövedékes kiviteli alaknál 1 és a gázadagoló kiviteli alaknál 3 a sebesség mindenképpen változó lesz a kilövési paraméterek elkerülhetetlen különbségei miatt; és a szuszpenzió sebességét nem közvetlenül mérik. Végezetül, a mikrolövedékes kiviteli alaknak 3 a következő további hátrányai vannak: a műanyag golyó tehetetlensége hátrányosan befolyásolja a sebességet – erőteljes robbanást tesz szükségessé; a sebességeket nem könnyű megváltoztatni vagy ellenőrizni; és a lőporból származó robbanógázok is problémákat okozhatnak.

Emiatt előnyös lenne egy olyan technikának a kifejlesztése, mely hatékonyan képes nem sejtes biológiai anyagot közvetlenül élő sejtekbe és szövetekbe továbbítani.

A találmány szerint tehát egy olyan berendezést hoztunk létre anyagnak sejtekbe történő bevitelére, mely tartalmaz a egy kivezetőnyílással rendelkező nagynyomású gázforrást; b egy bevezető és kivezetőnyílással rendelkező hajtható anyag tartályt; és c egy többutas szelepet, mely egymástól elválasztva érintkezik a nagynyomású gáztartály kivezetőnyílásával és a hajtható anyag tartály bevezetőnyílásával.

A találmány szerint továbbá egy olyan eljárást dolgoztunk ki anyag bevitelére sejtekbe, célanyagba, mely eljárás a következő lépésekből áll: a egy gáztartályba előre meghatározott mennyiségű gázt viszünk be előre meghatározott nyomással; b egy hajtható anyag tartályba előre meghatározott mennyiségű hajtható anyagot viszünk be, mely egy biológiai anyag szuszpenzióját tartalmazza hordozóközegben, a tartálynak tartály bevezetőnyílása van, mely a gáztartály kivezetőnyílásával van összekötve, és egy tartály kivezetőnyílása van, mely az előbbi bevezetőnyílástól elválasztva összekötetésben áll a túlsordulás bevezetőnyílással és a továbbító bevezetőnyílással; c a hajtható anyagot érintkeztetjük egy előre meghatározott mennyiségű gázzal; és d a

hajtható anyagot egy továbbítóeszközön keresztül a célanyag felé irányítva gyorsítjuk.

A találmány szerinti berendezést és eljárást az alábbiakban kiviteli példa kapcsán, a mellékelt rajz alapján ismertetjük részletesebben, ahol az

1. ábra a találmány szerinti berendezés egyik kiviteli alakjának vázlatos rajza; a
2. ábra az 1. ábra és a találmány szerinti berendezésnél használható szelep vázlatos rajza; a
3. ábra az 1. ábra és a találmány szerinti berendezéshez használható nagynyomású gázforrás egy kiviteli alakjának vázlatos rajza; a
- 4a és 4b ábrák az 1. ábra és a találmány szerinti berendezésnél használható hajtható anyag forrás különböző kiviteli alakjainak vázlatos rajzai; az
- 5a és 5b ábrák az 1. ábrán látható és a találmány szerinti berendezésnél használható továbbító- és vizuális ellenőrzőeszközök vázlatos rajzai; a
6. ábra a találmány szerinti berendezésnél és eljárásnál használható sebességmérő eszköz egy példakénti kiviteli alakjának vázlatos rajza; a
7. ábra az 1. ábrán bemutatott és a találmány szerinti berendezésnél használható szinkronizálóeszköz egy vázlatos rajza; a
- 8a és 8b ábrák a 6. ábrán vázolt sebességmérő eszközénél használható villamos áramkörök vázlatos rajzai; a
9. ábra a nyers adatoknak a hajtható anyag repülési idejének mérésére használt grafikonja.

A találmány általánosságban véve egy hajtható anyag gyorsítására alkalmas berendezésre és eljárásra irányul. Meg kell azonban jegyezni, hogy a találmány nem korlátozódik egy speciális anyag továbbítására szolgáló berendezésre vagy eljárásra, hanem a találmány szerinti megoldást sok különböző típusú anyag továbbítására lehet használni. A találmány azonban főként egy olyan berendezésre és eljárásra alkalmazható, ahol biológiai anyag szuszpenziójának gyorsításáról van szó.

A biológiai anyag lehet sejttes vagy nem sejttes. A biológiai anyag lehet viszonylag kicsi, előnyösen 1 mikronnál kisebb, még előnyösebben 0,1 mikronnál kisebb. Általánosságban véve az alkalmazott biológiai anyag mennyisége maximálisan 5 mikrogramm (µg) lesz, a fajlagos mennyiségek pedig az alkalmazott sejttes anyag típusán alapulva változhat.

„Nem sejttes biológiai anyag” kifejezés alatt olyan anyagokat értünk, melyek magukba foglalják a vírusokat [dohány mozaik vírus (TMV), karfiol mozaik vírus (CAMV), kukoricászavírus (MSV) stb.]; az organellumokat (például a mitokondriumokat, sejtmagot, kloroplasztiszot vagy plasztidot); a genetikai anyagokat például vagy a ribonukleinsavat (RNS), vagy a dezoxi-ribonukleinsavat (DNS), mind plazmid, mind pedig egyszerű, mind kétszálú formában; proteinek (antitesteket vagy enzimeket) vagy festőanyagokat.

Ha a DNS a nem sejttes biológiai anyag, akkor a DNS-t egy vektorban lehet felépíteni, mely a sejtekben lévő exogén gének kifejeződésére alkalmas. A megfelelő transzformációs vektorok magukba foglalják a kifejeződésvektorokat.

A kifejeződésre alkalmas vektoroknak általában magukba kell foglalniuk, a kívánt exogén gén kódoló szekvenciája mellett, a megfelelő szegélyező szabályozó szekvenciákat. Ilyen szegélyező szekvenciák magukba foglalnak olyan alkalmas promotert, mely képes a transzkripció/expresszió *in vivo* elősegítésére a sejtekben, és egy transzkripció terminátort, mely képes a transzkripció vagy az RNS megfelelő feldolgozása végének jelzésére oly módon, ami lehetővé teszi a proteinszintézist a hívívó RNS megfelelő translációja útján.

Ha DNS-t viszünk be élő sejtekbe, előnyös, ha az utódsejteket kiválogatjuk egy bizonyos fázisban, hogy különválasszuk a transzformált sejteket, mivel nem mindegyik sejtnek lesznek olyan részecskéi, melyeket azokba bevittünk, és nem minden sejt vagy utód fogja a DNS-t felvenni a saját genomjába. Ekkor a kívánt DNS jelenlétét a sejtekben számos különböző módon lehet megállapítani, a DNS természetétől függően.

A transzformációs vektor tartalmazhat egy szelektálható markert, mely lehetővé teszi a transzformált sejtek kiválasztását. A szelektálható marker olyan jellegű lehet, amit biokémiai úton lehet elemezni, vagy pedig egy olyan fenotipikus jelleg, melyet vizsgálni lehet.

Az ilyen szelektálható markerek alkalmazása mellett egy másik lehetőség az, hogy megfelelő morfológiai vagy biokémiai vizsgálatokat végzünk a transzformált utódsejtek kiválogatásához. Egy morfológiai szelektálási vizsgálat irányulhat az utódban lévő valamely domináns fenotípus jellegre. Egy alkalmas biokémiai szkrínelési eljárás az úgynevezett Southern-blot eljárás, amely szerint egy a magával a transzformáló DNS-sel hibridizáló próba alkalmazásával mutatják ki a transzformáló DNS-t a mikroorganizmus, növényi vagy állati sejtek genomjában.

Egy olyan génnek a jelenléte, mely egy exogén terméket produkál, kimutatható továbbá a sejt izolálásával és lízisével, valamint az exogén terméknel a citoplazma, vagy az exogén géneknel a sejtnag analízisével. Az exogén terméket elektroforézissel, kromatográfiával, immunvizsgálattal, Southern-blot módszerrel vagy hasonlóval lehet detektálni.

„Sejttes biológiai anyag” kifejezés alatt sejttes mikroorganizmusok, növényi sejtek vagy állati sejtek egyedét vagy többsejttes tömegét értjük.

Mint a fentiekben azt használtuk, a „sejttes mikroorganizmusok” kifejezés magába foglalja a baktériumokat és a protozoákat.

A fentiekben a „növényi sejtek” kifejezés magába foglalja azokat a sejteket, melyek egy növényben vagy egy növény részében épek, például virágok, magbelek, kalászok, kukoricacsövek, levelek, szirmok, hüvelyek, szárazak; növényi sejt- vagy szövetkultúrák, melyek sejtfalakkal vagy más természetes védőbevonattal rendelkeznek, vagy nincsen sejtfaluk, illetve más természetes védőbevonatuk, például protoplasztok; növényi kalluszok; növényi szövetsomók; sejten belüli struktúrák; pollen szemcsék; növényi merisztémák; petesejtek; zigóták; olyan magok, melyekből csíráztatással növények állíthatók elő.

A növényi sejtek bármilyen növényfajtából származhatnak. A „növényfajták” kifejezés alatt olyan kifejezést

értünk, mely magába foglalja az egyszikűeket (például a fűféléket és a gabonaféléket, mint például a kukoricát, rozsot, árpat, búzát, cirokot, zabot, kölest és riszt); és a kétszikűeket (például a széles levelű növényeket, mint például dohány, burgonya és lucerna).

Az „állati sejtek” kifejezést a fentiekben olyan értelemben használtuk, mely magába foglalja az emlősökből, halakból, madarakból, hüllőkből és kételtűekből származó szövetet.

A biológiai anyagot számos különböző módon lehet adszorbeálni egy hordozórészecske felületén. Például a biológiai anyagot elő lehet készíteni egyszerűen úgy, hogy megfelelő hordozórészecskékre szárítjuk, mint azt az alábbiakban leírjuk.

A hordozórészecskéknél olyan méretűnek, alakúnak és sűrűségűnek kell lenniük, hogy az megfelelő legyen ahhoz, hogy áthatoljon a sejtmembránra és/vagy a sejtfalon anélkül, hogy a sejten nagy fizikai károsodást idézne elő. Azok a hordozórészecskék, melyek túlságosan kicsik vagy nem eléggé sűrűek, nem biztos, hogy be tudnak hatolni bizonyos sejtekbe, míg azok a hordozórészecskék, melyek túlságosan nagyok vagy túl sűrűek, halálosak lesznek más sejtek számára. A sejt méretén kívül más tényezők szintén befolyásolhatják a kiválasztott méretű vagy sűrűségű mikrolövedékek végrehajtott transzformálás hatékonyságát, ilyen tényezők lehetnek például a sejtfal jelenléte vagy a sejten belüli magok nagy száma.

Általánosságban véve a hordozórészecskék átmérője 0,1 mikron és 100 mikron között van; előnyösen 0,5 mikron és 5 mikron között. Általánosságban véve a hordozórészecskék sűrűsége 1 g/cm³ és 25 g/cm³, előnyösen 10 g/cm³ és 35 g/cm³ között.

A hordozórészecskéket biológiailag semleges, sűrű anyagból lehet kialakítani. Példakénti anyagok magukba foglalnak bizonyos fémeket, például a wolframot, aranyat, platínát, palládiumot, ezüstöt és nikkelt, latexet, üveget, kerámiát, sebészeti ötvözeteket és ferritkristályokat.

Egy más kiviteli példában a hordozórészecskék olyan biológiai anyagok lehetnek, melyek közömbös anyagokba vannak bezárva. Ilyen bezáró kapszula anyag például a polilizin (molekulásúlya 200 000). A kapszulaanyagot a részecskékre úgy visszük fel, hogy a részecskét a kapszulaanyag oldatában mossa, majd levegőn szárítjuk vagy forró levegővel szárítjuk, és így a részecskéket bevonjuk. Ha a hordozórészecskéket egy bevonó anyaggal bevontuk és megfelelően megszáritottuk, a biológiai anyagot fel lehet vinni a részecskére. Más megoldás szerint a biológiai anyag bevonását végre lehet hajtani úgy, hogy az anyagot a részecskére kicsapatjuk.

Ezenkívül a sejtes biológiai anyag, mely vagy prokarióta vagy eukarióta, fagyott lehet, a hordozóközegben szuszpendált, és lövedékként lehet használni úgy, hogy közvetlenül a célanyagra irányítva gyorsítjuk fel.

A találmány azonban nem korlátozódik a hajtott, biológiai anyagokat tartalmazó hordozórészecskék használatára. A hajtott, biológiai anyagok lehetnek fa-

gyottak, a hordozóközegben szuszpendáltak, és lövedékek formájában használhatjuk oly módon, hogy közvetlenül a célanyagra irányítva gyorsítjuk fel.

Minden olyan közeg megfelel hordozóként, mely a hajtott, biológiai anyagot nem károsítja.

A biológiai anyagot tenyésztetjük bármilyen tápközegben, mely képes az anyag és/vagy sejt anyagcseréjének és növekedésének fenntartására. Ilyen tenyészetek ismerhetők meg Murashige és Skoog (1962), *Physiol. Plantarum*, 15:473–496; és Schenk és Hildebrandt (1972), *Canadian Journal of Botany*, 50:199–204 című kiadványaiban.

A hordozóközeg úgy kell kiválasztani, hogy annak olyan áramlási tulajdonságai legyenek, hogy hatékonyan vigye magával a benne lévő hordozórészecskéket. A hordozóközeg áramlási tulajdonságai függenek annak sűrűségétől, felületi feszültségétől, effektív tömegétől és a hajtható anyag viszkozitásától. Előnyösen a hordozóközeg képes lesz arra, hogy a sejtes vagy nem sejtes biológiai anyagot és opcionálisan a hordozórészecskéket szuszpendálja.

Általánosságban véve a hordozóközegnek olyan sűrűségűnek kell lennie, mely hatékonyabból a szempontból, hogy fenntartsa a benne lévő részecskéket, amikor mozog. Előnyösen a hordozóközeg sűrűségének 0,5 g/cm³ (g/cc) és 2,0 g/cc között kell lennie.

Általánosságban a hordozóközeg felületi feszültségének olyannak kell lennie, hogy hatékonyan megtartsa saját kohéziós hajtható térfogatát. Előnyösen a hordozóközeg felületi feszültségének 20 és 80 din/cm (2–8×10⁻² N/m) között kell lennie.

Általánosságban a hordozóközegnek olyan térfogatúnak kell lennie, mely alkalmas arra, hogy a hordozórészecskék kívánt számát szuszpendálja. Előnyösen a hordozóközeg térfogatának 0,5 mikroliter (μl) és 1000 μl között kell lennie, előnyösen 5 μl és 100 μl között.

Általánosságban a hordozóközeg viszkozitásának olyannak kell lennie, mely hatékonyan fenntart egy kohézív hajtható tömeget és a részecskéket szuszpendálja. Előnyösen a hordozóközeg viszkozitásának 0,1 centipoise (cp) és 10 cp között kell lennie, még előnyösebben 0,5 cp és 2 cp között. (0,01 ÷, 1 Pa x s illetve 0,05 ÷, 0,2 Pa x s).

A hordozóközegek például magukba foglalhatják a folyadékokat, például a vizet, etanolt; pufferoldatokat, beleértve a foszfátokat, citrátokat és acetátpuffereket; sóoldatokat, beleértve a kálium-, nátrium- és kalcium-kloridokat; glikolokat, glicerineket és fluorozott szénhidrogéneket; és a folyékony nitrogént, ha a sejtes vagy nem sejtes biológiai anyag fagyott állapotú.

Megfelelő célanyag lehet valamilyen sejtes biológiai anyag; vagy valamilyen nem sejtes biológiai anyag, melyek mindegyikét ismertettük a fentiekben. A biológiai anyag lehet egy tenyészet, vagy felvihető bármilyen olyan közegre, mely a biológiai anyagot képes megtartani, mint azt a fentiekben leírtuk, és azt a mikrorészecskékkal való ütközés alatt meg tudja tartani.

Egy olajréteget lehet alkalmazni a sejteken, hogy azzal szabályozzuk a közeg hidraulika nyomását, és javítsuk a sejt életképességét azáltal, hogy elősegítjük a

behatolás után a sérülés betapasztását. Például az élő sejteket izotonikus oldatból álló fürdőbe lehet rakni abból a célból, hogy a sejten belüli anyag és a sejtmembrán átlukasztászonájában a sejten kívüli oldat ozmózis nyomásának egyensúlyát fenntartsuk abban a pillanatban, amikor a membránt átlukasztjuk. Kalcium-ionok lehetnek jelen, mint membránstabilizáló hatóanyagok, mindezen oldatokban, úgy hogy a membrán sértült részét gyorsan helyre lehet állítani. Az izotonias oldatok például magukba foglalják azokat az oldatokat, melyeket növényi sejtek mikroinjekciós technikáiban általában használnak; a hidegvérű állatok sejtjeihez, protozoákhoz és mikroorganizmusokhoz Ringer-oldatot; és állati sejtek sejtjeihez Ringer–Locke, Ringer–Tirode és más oldatokat lehet használni.

A célanyag bombázása a minta egy részének az elvesztését idézheti elő annak következtében, hogy a hajtható anyag és a célanyag ütközésekor az szétszóródik. A célanyagnak a helyén tartására szolgáló eszköz lehet például szűrőpapír, agarközeg, fémárnyékolások és fémárnyékoló kalickák. Például a sejtes biológiai anyag ezt követő inkubációját és festését közvetlenül a szűrőpapíron lehet elvégezni. Egy más kiviteli változatban a célanyagot és a hajtható anyagot egyaránt oldatba lehet behelyezni és bevonat nélküli hordozórészecskékkel lehet bombázni, melyek a hordozóközegben vannak szuszpendálva. Az ilyen hordozórészecskék magukkal sodorhatnak egy adott mennyiségű külső oldatot, mely nem sejtes biológiai anyagot tartalmaz, és azt a sejtes biológiai anyagba bevihetik.

A találmány szerinti berendezést és eljárást az alábbiakban a mellékelt rajzra való hivatkozással ismertetjük részletesebben. A találmány szerinti berendezés testőleges kialakítású lehet, mely képes arra, hogy lehetővé tegye egy meghatározott kiválasztott mennyiségű, és meghatározott gáznyomású gáz érintkeztetését, és egy meghatározott mennyiségű hajtható anyagnak egy kiválasztott célanyag irányába történő gyorsítását.

Az alábbiakban a berendezésnek a találmány oltalmi körén belül lévő különböző kiviteli változatait ismertetjük, melyeket a mellékelt rajzokon mutatunk be.

Az 1. ábrán egy olyan berendezés vázlatos rajza látható, mely berendezést 10 hivatkozási számmal jelölünk, mely tartalmaz egy bevezető- és kivezetőnyílásokkal ellátott 70 többutas szelepet; egy 30 nagynyomású gázforrást, mely kivezetőnyílással van ellátva; egy opcionális 20 hajtható anyag forrást, mely kivezetőnyílással van ellátva; egy bevezető- és kivezetőnyílással rendelkező 40 hajtható anyag tartályt, egy opcionális, bevezető- és kivezetőnyílással ellátott 50 szállítóeszközt, és egy bevezető és kivezetőnyílással ellátott, opcionális 60 visszanyerő eszközt.

A 70 többutas szelep úgy van kialakítva, hogy vagy a 30 nagynyomású gázforrással, vagy pedig, opcionálisan, a 20 hajtható anyag forrással és a 40 hajtható anyag tartállyal lehet összekötni. A 70 többutas szelep tehát úgy van kialakítva, hogy át lehet kapcsolni és ki lehet választani, hogy a 40 hajtható anyag tartállyal vagy az 50 szállítóeszközzel, vagy pedig, opcionálisan, a 60 visszanyerő eszközzel lehet összekötni.

Mint a 2. ábrán látható, a 70 többutas szelep egyik kiviteli alakjánál az tartalmazhat egy első 70a alszelepet és egy második 70b alszelepet. Az első 70a alszelep különválasztott összeköttetést biztosít vagy a 30 nagynyomású gázforrás kivezetőnyílása vagy a 20 hajtható anyag forrás kivezetőnyílása és a 40 hajtható anyag tartály bevezetőnyílása között. A második 70b alszelep különválasztott összeköttetést biztosít a 40 hajtható anyag tartály kivezetőnyílása és vagy az 50 szállítóeszköz bevezetőnyílása vagy a 60 visszanyerő bevezetőnyílása között.

Az első 70a alszelep és a második 70b alszelep állhat például egy-egy háromutas szelepből vagy pedig két kétutas szelepből, feltéve, hogy a kétutas szelepeket együttműködő kombinációban össze lehet egymással kapcsolni megfelelő eszközökön keresztül. A kétutas szelepek működtetésénél például egy közös működtető szervet vagy külön-külön működtető szerveket lehet használni (melyeket nem tüntettünk fel az ábrán).

Az első és második 70a és 70b alszelepek is működtethetők együtt, ha azokat megfelelő eszköz révén összekötjük egymással. A kétutas szelepekkel való működtetésre példaként egy 70c közös működtető szerkezetet mutatunk be, de lehet külön működtető szerkezeteket is alkalmazni (ezeket nem ábrázoltuk).

Az első és második 70a és 70b alszelepeket működtető szerkezeteket úgy választjuk meg, hogy azok a 70 többutas szelepet nagynyomású tartályokkal kapcsolják össze. Általában bármilyen olyan működtető szerkezetet lehet használni, mely egyenes vonalú vagy forgó mozgást végez. A működtető szerkezetek például kettős működésű pneumatikus egységeket foglalnak magukba, melyek fogasléc-fogaskerék áttétellel működnek. Ha különböző működtető szerkezeteket használunk, a működtető szerkezeteket valamilyen (nem ábrázolt) időzítő eszközzel szinkronizálni lehet. A szinkronizálóeszközök például többpólusú kapcsolókat foglalnak magukba, melyek segédtekerccsekkel vagy közös működtető tengelyekkel vannak kombinálva.

Előnyösen a működtető szerkezetek egy (nem ábrázolt) lámpedállal működnek együtt, ezáltal egyszerűbbé válik a működtetés, és megnövekszik a berendezés viszonylagos teljesítőképessége.

Általánosságban véve a 40 hajtható anyag tartály bármilyen tartály lehet, például egy cső. A 40 hajtható anyag tartálynak előnyösen olyan belső felülete van, mely olyan belső teret határol, mely biztosítja a hajtható anyag egyenletes kilövellését, és minimális fennakadást, késleltetést okoz az anyagáramlásban, vagyis abban, mely a 40 hajtható anyag tartály belső falához hozzátapad vagy azt nedvesíti. A 40 hajtható anyag tartály például 0,005 milliliter (ml) és 100 ml közötti mennyiségű hajtható anyag tárolására alkalmas.

Előnyösen a 40 hajtható anyag tartályt olyan anyagból alakítjuk ki, mely fizikailag elég erős ahhoz, hogy a 20 hajtható anyag forrásból és/vagy a 30 nagynyomású gázforrásból hajtható anyaggal illetve gázzal töltsük meg anélkül, hogy fizikailag deformálódna. Előnyösen a 40 hajtható anyag tartályt olyan anyagból állítjuk elő, mely legalább 1000 font/hüvelyk² (psi) ($6,9 \times 10^6$ Pa)

nyomásnak ellenáll fiziológiai hőmérsékleten. A 40 hajtható anyag tartály anyaga például rozsdamentes acél lehet.

Mint a 2. ábrán látható, a 40 hajtható anyag tartály belsejében lévő hőmérsékletet 42 hőmérséklet-ellenőrző eszköz segítségével ellenőrizni lehet. A 42 hőmérséklet-ellenőrző eszköz például hőelemeket foglal magába, melyek egy a 40 hajtható anyag tartályt körülvevő fűtőtömbbe vannak beépítve.

Jóllehet, az 1. és 2. ábrákon látható vázlatos kialakításoknál a 10 berendezés csak egy 40 hajtható anyag tartályt tartalmaz, a 10 berendezés működésének elvi leírásából ki fog tűnni, hogy két vagy több különböző típusú hajtható anyag alkalmazásához több hajtható anyag forrást is lehet használni.

Általánosságban véve a 40 hajtható anyag tartályba a 20 hajtható anyag forrásból bevitt anyagmennyiséget bármilyen olyan eszközzel lehet szabályozni, mely biztosítja, hogy mért, reprodukálható mintákat adagoljunk a 20 hajtható anyag forrásból. Ha cső alakú vagy hasonló tartályt alkalmazunk, akkor egy első mennyiség tárolására alkalmas csövet helyettesíteni lehet egy másik, második mennyiség tárolására alkalmas csővel. Nem szándékozunk azonban a berendezésre vonatkozó oltalmi igényünket erre korlátozni. Például egy (nem ábrázolt) szintérzékelőt lehet elhelyezni tetszőleges helyen, mely a 40 hajtható anyag tartályban lévő hajtható anyag mennyiségének pontos, reprodukálható mérésére szolgál.

Mint az 1. ábrán látható, a 30 nagynyomású gázforrás tartalmazhat egy 31 gázszolgáltató eszközt és, opcionálisan, egy 32 gázszabályozó eszközt. A 30 nagynyomású gázforrást úgy választjuk meg, hogy az előre meghatározott mennyiségű gázt adjon be a 40 hajtható anyag tartályba. A gáznyomás függ az alkalmazott gáz típusától és a gáz mennyiségétől. Általánosságban véve a gáznyomás 15 atm és 150 atm között van ($1,47 \times 10^6$ ÷ $1,47 \times 10^7$ Pa).

A 30 nagynyomású gázforrást bármilyen eszközzel lehet szabályozni, mely alkalmas arra, hogy kívánt nyomással továbbítsa gázt a 40 hajtható anyag tartályba. A gázszabályozó eszköz lehet kézi vagy automatikus működtetésű.

Előnyösen a 30 nagynyomású gázforrás alkalmas lehet meghatározott mennyiségű gáz folyamatos szolgáltatására a 40 hajtható anyag tartály felé, és ezzel lehetővé válik a 10 berendezés viszonylag gyors, ismételt működtetése.

A 30 nagynyomású gázforrásra egy példakénti kiviteli alakot a 3. ábrán mutatunk be. Mint a 3. ábrán látható, a 30 nagynyomású gázforrás tartalmaz 1 egy 31 gázszolgáltató eszközt, mely egy kivezetőnyílással ellátott 31a gázszolgáltató tartály formájában van kialakítva, 2 egy bevezető- és kivezetőnyílással rendelkező 33 gázvezeték, és 3 egy 32 gázszabályozó eszközt, mely egy 32a gázszelep formájában van kialakítva, és egy 32b gáztartályt, melynek egy bevezetőnyílása és egy kivezetőnyílása van.

A 31a gázszolgáltató tartály kivezetőnyílása pneumatikusan össze van kötve a 33 gázvezeték bevezetőnyí-

lásával. A 33 gázvezeték kivezetőnyílása viszont a 32a gázszelepen keresztül szelektíven pneumatikusan összeköttetésben áll a 32b gáztartály bevezetőnyílásával.

A 31 gázszolgáltató eszköz például gázhengereket és tartályokat foglal magába.

A 32b gáztartályt számos különböző típusú tartály közül választhatjuk ki, például csövek közül. A példakénti 32b gáztartályok 1 ml és 100 ml közötti mennyiségű gáz tárolására képesek.

Általánosságban véve a 32b gáztartályt olyan anyagból lehet előállítani, mely elegendően erős ahhoz, hogy a 30 nagynyomású gázforrásból gázzal töltsük meg anélkül, hogy ennek hatására fizikailag deformálódna. Előnyösen a 32b gáztartály 150 atm ($1,47 \times 10^7$ Pa) gáznyomásnak képes ellenállni. A gázszolgáltató elemek gyártásához például rozsdamentes acélt is lehet használni.

A gázt úgy kell megválasztani, hogy annak molekulásúlya elegendően alacsony legyen ahhoz, hogy elegendően gyors kiterjedést tegyen lehetővé, és a feltétlenül szükséges részecskesebbségeket el lehessen azzal érní. Általánosságban véve a gáz molekulásúlyának 2 és 40 atomtömegegység (atomic mass unit = amu) között kell lennie. A gáz lehet például hélium, hidrogén és levegő.

Mint az 1. és 2. ábrákra való hivatkozással a fentiekben már megállapítottuk, a 10 berendezés előnyösen egy 20 hajtható anyag forrást tartalmaz, mely szelektíven össze van kötve a 40 hajtható anyag tartállyal. Ha a 20 hajtható anyag forrás nem része a 10 berendezésnek, akkor a 40 hajtható anyag tartályt kézzel lehet feltölteni és azután a 10 berendezéshez csatlakoztatni.

Mint az az 1. ábrán jól, a 4a és 4b ábrákon pedig részben látható, a 20 hajtható anyag forrás úgy van kiválasztva, hogy előre meghatározott mennyiségű hajtható anyagnak a 40 hajtható anyag tartályba való továbbítására legyen alkalmas.

Előnyösen a 20 hajtható anyag forrás képes folyamatosan szolgáltatni kiválasztott mennyiségű hajtható anyagot a 40 hajtható anyag tartály számára, és a 10 berendezés viszonylag gyors, ismételt működtetését teszi lehetővé. A 20 hajtható anyag forrás tartalmaz egy 21 hajtható anyag szolgáltató eszközt. A 21 hajtható anyag szolgáltató eszköz például magába foglal injekciós tűket, tartályokat, csöveket vagy más vezetékeket.

Általánosságban véve a 21 hajtható anyag szolgáltató eszközt olyan anyagból állítjuk elő, mely sterilizálható. Anyaga például rozsdamentes acél és politetrafluor-etilén lehet.

A 21 hajtható anyag szolgáltató eszköz szabályozó kapacitásától függően a 10 berendezés tartalmazhat a hajtható anyag áramlásának szabályozására alkalmas eszközöket, például 22 hajtható anyag szabályozó eszközt. A 22 hajtható anyag szabályozó eszköz össze van kötve a 21 hajtható anyag szolgáltató eszközzel, és lehetővé teszi, hogy meghatározott mennyiségű hajtható anyagot továbbítsunk a 40 hajtható anyag tartályba. A 22 hajtható anyag szabályozó eszköz magába foglalhat szelepeket és szivattyúkat.

Mint a fentiekben már jeleztük, a 20 hajtható anyag forrás példakénti kiviteli alakjait a 4a és 4b ábrákon

mutatjuk be. Ezek a kiviteli alakok olyan hajtott anyag forrást tartalmaznak, melyek alkalmasak arra, hogy meghatározott mennyiségű hajtható anyagot vegyünk ki azokból.

Mint a 4a ábrán látható, az egyik kiviteli alaknál a 20 hajtható anyag forrás tartalmaz 1 egy kivezetőnyílással rendelkező 21a fecskendő formájában kialakított 21 hajtható anyag szolgáltató eszközt, és 2 egy bevezetőnyílással és egy kivezetőnyílással rendelkező 23 hajtható anyag vezetékét. A 21a fecskendő kivezetőnyílása össze van kötve a 23 hajtható anyag vezeték bevezetőnyílásával. A 23 hajtható anyag vezeték kivezetőnyílása viszont össze van kötve a 70 többutas szelep egyik bevezetőnyílásával, mely a 40 hajtható anyag tartályhoz vezet.

Egy másik kiviteli alaknál, mint az a 4b ábrán látható, a 20 hajtható anyag forrás tartalmaz 1 egy kivezetőnyílással rendelkező 21b hajtható anyag tartály formájában kialakított 21 hajtható anyag szolgáltató eszközt, 2 egy 22a hajtható anyag szelep formájában kialakított 22 hajtható anyag szabályozó eszközt, és 3 egy bevezetőnyílással és egy kivezetőnyílással rendelkező 23 hajtható anyag vezetékét. A 21b hajtható anyag tartály kivezetőnyílása össze van kötve a 22 hajtható anyag szabályozó eszközön keresztül a 23 hajtható anyag vezeték bevezetőnyílásával. A 23 hajtható anyag vezeték kivezetőnyílása viszont össze van kötve a 70 többutas szelep egyik bevezetőnyílásával, mely a 40 hajtható anyag tartályhoz vezet.

Attól az időtől függően, hogy a hajtható anyagot mennyi ideig tartjuk a 21b hajtható anyag tartályban, a 21b hajtható anyag tartályt össze lehet kötni egy 25 hőmérséklet-ellenőrző eszközzel, mint az a 4b ábrán bemutatott kiviteli változatnál látható, melynek segítségével a hajtható anyagot a kívánt hőmérsékleten tudjuk tartani. A 25 hőmérséklet-ellenőrző eszköz például hőelem lehet, melyet a 21b hajtható anyag tartályt körülvevő fűtőtömbbe lehet beültetni.

A hordozóközeg viszonylagos viszkozitásától függően a 21b hajtható anyag tartályt össze lehet kötni egy 24 keverővel, melynek segítségével a hordozóközegben a részecskéket szuszpenzióban lehet tartani. A 24 keverő magába foglalhat például fecskendőszivattyúkat, mágnesrudas keverő eszközt, szelepelrendezéseket és pumpákat, melyekkel a 21b hajtható anyag tartály belsejében váltakozó áramlási irányokat hozunk létre. Előnyösen a 24 keverőt úgy választjuk meg, hogy a 40 hajtható anyag tartály belsejében váltakozó áramlási irányokat állítsunk elő, például egy oda-vissza mozgó fecskendőszivattyút lehet alkalmazni erre a célra.

Mint az 1. és 2. ábrákon látható, a 40 hajtható anyag tartály kivezetőnyílását a 70 többutas szelepen keresztül össze lehet kötni a 60 visszanyerő eszköz bevezetőnyílásával.

A 60 visszanyerő eszköz lehetővé teszi, hogy a 40 hajtható anyag tartályból a fölösleges mennyiségű hajtható anyag túlsorduljon. A 60 visszanyerő eszköz bármilyen olyan eszközt tartalmazhat, mely alkalmas a hajtható anyag felfogására. Előnyösen a 60 visszanyerő eszköz tartalmaz egy csövet, mely el van szigetelve

attól az anyagtól, melyet a 40 hajtható anyag tartályból kiveszünk. Egy ilyen kialakítás lehetővé teszi azt is, hogy egy olyan nyitott rendszert alakítsunk ki, amelyhez egy 24 keverő, például egy előre-hátra mozgó fecskendőszivattyú csatlakoztatható, amellyel a 40 hajtható anyag tartály belsejében az áramlási irányt változtatjuk.

A 60 visszanyerő eszközt bármilyen olyan anyagból elő lehet állítani, mely alkalmas arra, hogy a hajtható anyagot magában tartalmazza, és amely erre az anyagra nem fejt ki káros hatást. Előnyösen a 60 visszanyerő eszközt átlátszó anyagból lehet készíteni, hogy elkerüljük a 40 hajtható anyag tartályból jelentős mennyiségű megfelelő hajtható anyag túlsordulását, mivel ezzel a benne lévő anyag mérése egyszerű. A túlsordulás vizuális ellenőrzésére megfelelő anyag például a politetrafluor-etilén (PTFE).

Az alábbiakban az 50 szállítóeszközzel lesz szó. Mint az 1., 2. és 7. ábrákon látható, a 40 hajtható anyag tartály kivezetőnyílását össze lehet kötni a 70 többutas szelepen keresztül az 50 szállítóeszköz bevezetőnyílásával.

Az 5a és 5b ábrákon bemutatott 50 szállítóeszköz alkalmas arra, hogy a hajtható anyagot viszonylag pontosan irányítsuk a kívánt helyre. Az 50 szállítóeszköz tartalmazhat egy 51 makroirányító eszközt és/vagy egy 52 mikroirányító eszközt. A 40 hajtható anyag tartályból (melyet az 1. és 2. ábrákon mutattunk be) kilépő hajtható anyag ereje miatt előnyös, hogy ha az tartalmaz egy 52 mikroirányító eszközt, akkor tartalmazzon egy 51 makroirányító eszközt is.

Mint látható az 5a ábrán, az 51 makroirányító eszköz össze van kötve az 52 mikroirányító eszközzel, és az összeköttetésen keresztül folyadék áramolhat.

Általánosságban véve az 51 makroirányító eszközt úgy választjuk meg, hogy annak belső felülete, mely egy adott hosszúságú, geometriájú és átmérőjű furatot határol, elegendő legyen ahhoz, hogy megakadályozzuk a hajtható anyag gyorsulásában fellépő lényeges veszteséget, mely annak következtében áll elő, hogy a hajtható anyagon gáz halad keresztül. Előnyösen az 51 makroirányító eszköz egy olyan cső, amelynek belső felülete egy lényegében hengeres furatot határol, amelynek belső átmérője 500 mikron és 2000 mikron, előnyösen 750 és kb. 1250 mikron között van.

Az 51 makroirányító eszközt bármilyen anyagból ki lehet alakítani, mely képes az anyagtovábbítás körülményei között alakjának megtartására. Ilyen anyag lehet például az üveg, műanyag és rozsdamentes acél.

Ha a 60 szállítóeszköz csupán egy 51 makroirányító eszközből áll, akkor azt a hajtható anyagnak úgynevezett „vadászpuskás” típusú célzással történő gyorsítására lehet használni. Ha a 60 szállítóeszköz tartalmaz egy 52 mikroirányító eszközt, az viszonylag pontosabb célzást tesz lehetővé a hajtható anyaggal.

Egy első kiviteli alaknál, mint az az 5a ábrán látható, az 52 mikroirányító eszközzel össze van kötve, és az összeköttetésen keresztül folyadékáramlás lehetséges; egy 52b mikrokészülék van behelyezve egy 52c tartóeszközbe, mely mereven hozzá van erősítve egy 52e háromutas mikromanipulátor 52d mozgó szerszámjához.

hoz. Az 52e háromutas mikromanipulátor tartalmazhat egy (nem ábrázolt) botkormányt, mely az 52a pipetta helyzetét szabályozza.

Az 52a pipettát úgy kell megválasztani, hogy annak belső átmérője elegendő lumen értékű ahhoz, hogy a hajtható anyag keresztül tudjon haladni. Az 52a pipetta belső átmérője általában kb. 10 és kb. 500 mikron, előnyösen kb. 100 és kb. 250 mikron között van. A pipettákat hagyományosan jól ismert módszereknek megfelelően kapilláris csövekből készítjük (lásd például Graessman és munkatársai (1980), *Methods in Enzymology*, 65:816–825).

Az 52 mikroirányító eszközt például előnyösen hagyományos mikrofecskendőkől lehet kialakítani, melyet a jelen leírás kitanítása alapján szakember könnyen tud módosítani oly módon, hogy abból a találmány szerinti 52 mikroirányító eszközt kialakítsa.

Hagyományos mikroinjekciós fecskendők és eljárások ismerhetők meg az alábbi dokumentumokból: az US 4 743 548 számú szabadalmi leírásból; Yamamoto és társai (1982) *Exp. Cell Res.*, 142:79–84; Purres (1981), *Methods for Intracellular Recording and Ionophoresis*; Ocho és munkatársai (1981), *Acta Med. Okayama*, 35:381–384; Lawrence és Davies (1985), *Plant Cell Rep.*, 4:33–35; Steinbiss és munkatársai (1984), *Proceedings of the 1984 Wye International Symposium, Experimental Manipulation of Ovule Tissue: Their Micromanipulation, Tissue Culture and Physiology*; Steinbiss és Stabel (1983), *Protoplasma*, 116:223–227; Morikawa és Yamada (1981), *Plant Cell Physiol.*, 26:229–236; Graesmann és munkatársai (1980), *Methods in Enzymology*, 65:816–825; és Lin és Ruddle (1981), *Exp. Cell Res.*, 134:485:488.

A fentiekén kívül, mivel vizuálisan is láthatónak kell lenni a hajtható anyagnak, az 50 szállítóeszköz előnyösen tartalmaz egy 58 vizuális mérőeszközt. Az 58 vizuális mérőeszköznek nagyító hatásúnak kell lennie, és a célanyagon hatékony fókuszálást kell biztosítani, előnyösen 10×-es és 200×-os nagyítással kell rendelkeznie. Az 58 vizuális mérőeszköz például magába foglalhat egy tárolómikroszkópot és boroszkópot.

Egy második kiviteli alaknál, mint az az 5a ábrán látható, az 52 mikroirányító eszköz tartalmaz egy az 58 vizuális mérőeszközzel együttműködő 52a pipettát.

Mint az 1., 5a, 5b és 7. ábrákon látható, az 50 szállítóeszköz kivezetőnyílása egy 80 előrehajtó zónába nyílik, amelybe a célanyagot lehet behelyezni.

A célanyagot egy megfelelő tárgylemezen lehet elhelyezni. Például egy 59a petricsészét lehet használni a tárganyag tárolására. Az 51 makroirányító eszköz működését azzal segítjük, hogy a célanyagot előnyösen egy 59b X–Y irányban mozgatható tárgyasztalra helyezzük.

Előnyösen a 80 előrehajtó zóna a környezettől el van szigetelve. Általában a 80 előrehajtó zónát egy kamra formájában lehet kialakítani.

A 80 előrehajtó zónában például vákuumot lehet létrehozni. A vákuum nagyságának elegendő nagynak kell lennie ahhoz, hogy elkerüljük a részecskének a légellenállás miatt bekövetkező sebességcsökkenését, valamint hogy megakadályozzuk a hajtható anyag szétszó-

ródását. Előnyösen a vákuum nagysága a 80 előrehajtó zónában 0 atm-tól 0,5 atm-ig (50662,5 Pa-ig) változhat.

Egy megfelelő szabályozott légkörű kamrát lehet megismerni a „Fisher 88” című kiadványban, *Laboratory Equipment Catalog of Fisher Scientific, Inc.*, Pittsburgh, PA.

A továbbiakban a sebességmérő eszközt ismertetjük. Egy más kiviteli változatban a 10 berendezés tartalmaz egy 90 sebességmérő eszközt, mint azt az 1., 6. és 7. ábrákon feltüntettük. Bármilyen eszköz használható 90 sebességmérő eszközként, mely alkalmas a hajtható anyag sebességének ellenőrzésére.

Általánosságban véve a 90 sebességmérő eszközt bármely olyan helyen el lehet helyezni, ahonnan a hajtható anyag sebességét reprodukálhatóan mérni lehet. Előnyösen a 90 sebességmérő eszközt az 50 szállítóeszközön helyezzük el.

Mint a 6. ábrán látható, egy példa szerinti 90 sebességmérő eszköz tartalmaz egy első 92 sebességérzékelőt és egy második 94 sebességérzékelőt, mely 92 és 94 sebességérzékelők az 50 szállítóeszközön keresztül egymást követő helyeken vannak elhelyezve.

Az első 92 sebességérzékelő 92a forráseszközt és 92b érzékelőeszközt foglal magába. A második 94 sebességérzékelő egy 94a forráseszközt és egy 94b érzékelőeszközt foglal magába.

A 92a és 94a forráseszközök például infravörös fénykibocsátó eszközöket foglalnak magukba, például infravörös fénykibocsátó diódákat (LED) vagy bármilyen más hasonló fényforrást. Ha a 92a és 94a forráseszközök infravörös fénykibocsátó eszközöket tartalmaznak, előnyösen az 50 szállítóeszköz átlátszó anyagból van felépítve, például üvegből vagy átlátszó műanyagból.

A 92b és 94b forráseszközök például fotodiódákat, fototranzisztorokat vagy fényérzékeny cellákat foglalnak magukba.

Általában a 92 és 94 sebességérzékelők összekapcsolhatók a 70 többutas szeleppel egy villamos áramkörön keresztül.

Általában az áramkörnek a repülési időt kell mérnie (lásd a „példák” részben az alábbiakban, valamint a 9. ábrát) az első és a második 92 és 94 sebességérzékelők között. Előnyösen az áramkör „szekvenciális időzítést” valósíthat meg, biztosítva ezzel, hogy a 90 sebességmérő eszköz minden része szinkronizálva legyen a hajtható anyag gyorsulásával. Miután az áramkör biztosította az időzítési állapotokat, az áramkör megvalósíthatja az összeköttetést a 90 sebességmérő eszköz és a 70 többutas szelep között, ezáltal a 70 többutas szelepet működtető effektív villamos teljesítmény egy előre kiválasztott időtartományát lehet használni a 30 nagynyomású gázforrás és a 40 hajtható anyag tartály közötti kommunikációra.

A fentiekben ismertetett követelmények kielégítésére alkalmas tetszőleges számú áramkört létre lehet hozni a szakember kötelező tudása alapján. A 8a és 8b ábrákon példakénti áramköröket mutatunk be a sebességérzékelő eszközökre, és azokat az alábbiakban részletezzük.

Egy más kiviteli alakban, mint az a 7. ábrán látható, a 10 berendezést össze lehet kötni olyan eszközökkel, melyek a hajtható anyag betöltésére és gyorsítására szolgáló elemek közül legalább néhányának a szinkronizálását biztosítják. A berendezés legalább néhány elemének szinkronizálásával az a célunk, hogy csökkentsük azoknak a lépéseknek a számát, melyeket a berendezés kezelőinek kell végrehajtania, következésképpen, hogy csökkentsük a működtetések között szükséges időket és növeljük a berendezés teljesítményét.

A szinkronizálóeszköz egy példakénti kiviteli alakját a 7. ábrán mutatjuk be, mely szinkronizálóeszközt 100 hivatkozási számmal jelöltünk. A 100 szinkronizálóeszköz tartalmaz egy 110 számítógépet, mely össze van kötve a 10 berendezéssel.

A 110 számítógép 101 vezetéken keresztül össze van kötve egy 102 dobozzal, mely egy sor abból kinyúló érzékelő- és parancsvezetékkel rendelkezik.

Egy első 102a vezetéket a 25 hőmérséklet-ellenőrző eszközzel van összekötve, ezáltal a 21b hajtható anyag tartály hőmérsékletét automatikusan lehet szabályozni.

Egy második 102b vezetéket szolgálhat a 24 keverővel való kapcsolatban az érzékelő és parancsjelek továbbítására, így a hajtható anyagot egy kiválasztott sebességgel tudjuk keverni.

Egy harmadik 102c vezetéket szolgál a 22 hajtható anyag szabályozó eszközzel való összeköttetésben a parancsjelek továbbítására. A 102c vezetéket tartja a 20 hajtható anyag forrást nyitott vagy zárt helyzetben.

Egy negyedik 102d vezetéket van összekötve egy harmadik 102c vezetékekkel, melyen érzékelő jelek haladnak át, valamint a 70a alszeleppel, melyen parancsjelek haladnak át. Ha a 20 hajtható anyag forrást nyitott állapotban tartjuk, a 70 többutas szelep a 20 hajtható anyag forrás és a 40 hajtható anyag tartály között tart fenn kapcsolatot, és egy másik kapcsolatot pedig a 40 hajtható anyag tartály és a 60 visszanyerő eszköz között.

Egy ötödik 102e vezetéket van összekötve a 42 hőmérséklet-ellenőrző eszközzel, melyen keresztül érzékelő és parancsjelek haladnak, és így a 40 hajtható anyag tartály hőmérsékletét lehet szabályozni.

Egy hatodik 102f vezetéket van összekötve a negyedik 102d vezetékekkel, melyen keresztül érzékelő jelek mennek, valamint a 90 sebességmérő eszközzel, melyen keresztül parancsjelek mennek.

Ha a 40 hajtható anyag tartályban egy előre meghatározott mennyiségű hajtható anyag van, a 10 berendezés lövedék kilövési időzítési ciklusát inicializáljuk.

Egy hetedik 102g vezetéket van összekötve a hatodik 102f vezetékekkel és a 32a gázszeleppel, melyen keresztül érzékelő jelek haladnak. Ha a 90 sebességmérő eszköz időzítési ciklusa biztosítva van, a 32 gázszabályozó eszközt nyitott helyzetben tartjuk.

Egy nyolcadik 102h vezetéket van összekötve a hetedik 102g vezetékekkel és a 70b alszeleppel, melyen keresztül érzékelő jelek mennek. Ha a 30 nagynyomású gázforrás nyitott helyzetben van, a 70 többutas szelep szelektív pneumatikus összeköttetést biztosít a 30 nagynyomású gázforrás és az 50 szállítóeszköz között, a 40 hajtható anyag tartályon keresztül.

Egy kilencedik 102i vezetéket van összekötve a 90 sebességmérő eszközzel, melyen keresztül érzékelő jelek haladnak. Miután a nagynyomású gáz kiválasztott mennyiségét bevittük a 40 hajtható anyag tartályba és a hajtható anyag felgyorsított tömege keresztülhalad a 90 sebességmérő eszközön, a hajtható anyag sebességét kijelezzük.

Általánosságban véve bármilyen olyan folyamatvezérlő rendszer alkalmas lehet szinkronizálóeszközként való felhasználására, mely képes a különböző érzékelő vezetékek által szolgáltatott adatok összehasonlítására, valamint a 10 berendezésnek a különböző parancsvezetéseken keresztül történő működtetésére. Például a szinkronizálóeszköz magába foglalhat egy egykártyás mikrovezérlőt vagy egy CAMILE (a The Dow Chemical Company védjegye) típusú adatgyűjtő és feldolgozó vezérlőrendszert, mely a The Dow Chemical Company-tól kereskedelmi úton beszerezhető.

Az 1. ábrán látható berendezés a következőképpen működtethető. A célanyagot egy meghatározott helyre helyezhetjük a 80 előrehajtó zónában meghatározott távolságban az 50 szállítóeszköztől.

Ha a hajtható anyag vagy a célanyag sejtes biológiai anyagot foglal magába, akkor a célanyagot olyan távolságban helyezük el, mely lehetővé teszi, hogy az a hajtható anyaggal érintkezésbe kerüljön, mely a sejtes biológiai anyag lényeges részére nézve nem lesz halálos (jöllehet néhány sejt elhalhat).

Általánosságban véve a célanyagot az 50 szállítóeszköz kivezetőnyílásától 1 cm és 100 cm közötti távolságban helyezük el.

Ha az 50 szállítóeszköz csak egy 51 makroirányító eszközt tartalmaz, vagyis nincsen 52 mikroirányító eszköze, a célanyagot az 50 szállítóeszköz kivezetőnyílásától 5–20 cm-es távolságban helyezük el. Ha az 50 szállítóeszköz tartalmaz 52 mikroirányító eszközt, a célanyagot az 50 szállítóeszköz kivezetőnyílásától 1 mm–100 cm-es távolságban helyezük el.

A találmány szerinti berendezést, melyet az 1. ábrán valamint további kiviteli alakjait a többi ábrán bemutatunk, a következőképpen lehet működtetni. Mint az 1., 2. és 4b ábrán látható, a 70 többutas szelep és a 22a hajtható anyag szelep feladata az, hogy a 21 hajtható anyag szolgáltató eszköz és a 40 hajtható anyag tartály között összeköttetést biztosítsanak. Következésképpen a hajtható anyagot keresztülmengedjük a 20 hajtható anyag forrásból a 40 hajtható anyag tartályba vezető úton.

Mint az 1. és 2. ábrán látható, a 70 többutas szelep szerepe továbbá az, hogy összeköttetést biztosítson a 40 hajtható anyag tartály és a 60 visszanyerő eszköz között. A 40 hajtható anyag tartály térfogatát meghaladó hajtható anyag mennyiségét a 60 visszanyerő eszközből vezettjük vissza.

Mint az 1., 2. és 3. ábrákon látható, a 70 többutas szelepet és a 32a gázszelepet ekkor olyan helyzetbe állítjuk, hogy azok pneumatikus összeköttetést biztosítsanak a 31 gázszabályozó eszköz és a 40 hajtható anyag tartály között. Következésképpen a hajtható anyagnak a kívánt sebességre történő felgyorsításához szükséges megfelelő nyomású gáz meghatározott mennyiségét a

30 nagynyomású gázforrásból átengedjük a 40 hajtható anyag tartályba.

A 70 többutas szelep feladata tehát az, hogy pneumatikus összeköttetést biztosítson a 40 hajtható anyag tartály és az 50 szállítóeszköz között. Ha a gázt már betöltöttük a 40 hajtható anyag tartályba, az érintkezik a hajtható anyaggal, melyet felgyorsítva továbbvittünk az 50 szállítóeszközbe, ha jelen volt.

Mint az 1. és 6. ábrákon látható, a hajtható anyag, miközben az 50 szállítóeszközben van, először a 92 sebességérzékelő előtt, majd a második 94 sebességérzékelő előtt halad el. Az első és második 92 és 94 sebességérzékelők szerepe az, hogy lehetővé tegyék a hajtható anyag sebességének érzékelését és rögzítését, lehetővé tegyék ezáltal a hajtható anyag reprodukálható gyorsítását.

Előnyösen a hajtható anyagot egy hatékony sebességre gyorsítjuk fel. A „hatékony sebesség” a kívánt eredménytől függően fog változni.

Általánosságban véve abból a célból, hogy biológiai anyagot sejtes biológiai anyagba vigyünk be, a hajtható anyag sebességének akkorának kell lennie, hogy annak hatására a biológiai anyag be tudjon hatolni a sejtmembránba és a falba, ha van fal. Előnyösen az ilyen rendszereknél a hajtható anyag sebességének az 50 szállítóeszközből való kilépési pontnál 200 mérföld/óra és 1200 mérföld/óra (mph) (89,4 m/s és 536,4 m/s) között.

Mint az belátható, a hajtható anyag sebessége számos ismert paramétertől függ. Ilyen paraméterek többek között: az 50 szállítóeszköz hosszúsága és belső átmérője; a gáz nyomása; a gáz áramlási tulajdonságai; a hajtható anyag áramlási tulajdonságai; a hajtható anyag fizikai jellemzői; az 50 szállítóeszköz kivezetőnyílása és a célanyag közötti távolság; a megcélzott anyag tenyésztéséhez használt tápközeg térfogata és folyási sajátságai.

A hajtható anyag áramlási paraméterei nem különösen kritikusak. Tehát a hajtható anyagot fel lehet gyorsítani úgy, hogy dugós áramlással vagy turbulens áramlással haladjon. A „dugós áramlás” alatt azt értjük, hogy a hajtható anyag úgy mozog, mint egy lényegében folytonos tömeg, és a gáz és a hajtható anyag zónák nem keverednek egymással lényegesen. A „turbulens áramlás” kifejezés alatt azt értjük, hogy a folyadék úgy áramlik, hogy annak sebessége egy adott pontnál kiszámíthatatlanul változik nagyságát és irányát tekintve, és következőképpen a gáz és a hajtható anyag bizonyos keveredése létrejön. Ha turbulens áramlás lép fel, a hajtható anyag és a gáz egymásra hat és egy diszperziót hoznak létre, következőképpen a hajtható anyag egy szélesebb oszlopszerű formát fog felvenni, amikor a 10 berendezésből kilép.

Mivel a nagynyomású gáz közvetlenül érintkezik a hajtható anyaggal, és azt magát engedjük a 80 előrehajtó zónába, a 40 hajtható anyag tartályba betöltött hajtható anyagot reprodukálhatóan lehet kiüríteni a 80 előrehajtó zónában. A hajtható anyag egy kisebb, de reprodukálható része az 50 szállítóeszközben marad. Alapjában véve csak azt a hajtható anyagot nem ürítjük ki a 80 előrehajtó zónába, mely a szelepek és az ürítő eszközök belső falaihoz hozzátapad vagy azokat nedvesíti.

Ezt a hajtható anyagot neveztük „feltapadt” anyagnak. A feltapadt anyag mennyisége az adott hajtható anyag viszkozitásától függ és azzal együtt változik.

A hajtható anyag sebességét akkor mérjük, amikor az elhalad a 90 sebességmérő eszközénél. Pontosabban az az idő jelzi a hajtható anyag sebességét, mely alatt az a 90 sebességmérő eszköznek az 50 szállítóeszközhöz elhelyezett első és második 92 illetve 94 sebességérzékelője között áthalad.

Azáltal, hogy a hajtható anyag haladási idejének reprodukálható mérését megvalósítottuk, a szakember be tudja állítani a különböző paramétereket, melyek a hajtható anyag sebességét befolyásolják. A paraméterek beállításával a szakember ki tudja választani a hajtható anyag optimális sebességét.

A hajtható anyag kívánt mennyisége az 50 szállítóeszközből kilép a 80 előrehajtó zónába.

A működést azzal fejezzük be, hogy a 70 többutas szelepet olyan helyzetbe állítjuk, hogy lezárja a gáznak a 32 gázszabályozó eszközéből a 40 hajtható anyag tartályba való áramlását.

A fenti leírás célja az volt, hogy egy általános áttekintést nyújtsunk azokról a feltételekről és körülményekről, melyeket figyelembe kell venni a találmány szerinti berendezés működtetésénél. A fenti kitanítás alapján a működtetési feltételek minden egyes alkalmazott rendszere nyilvánvalóakká válnak a szakember számára.

A találmányt különböző biológiai tudományágakban lehet használni, beleértve a növényi sejtek, állati sejtek és mikroorganizmusok transzformációját.

A találmány egyik vonzó tulajdonsága, hogy lehetővé teszi olyan növényi sejtek kezelését, melyeknek falai épek. Mivel megkerülhető az az akadály, hogy teljes növényeket regeneráljuk protoplasztokból, a fontos gabonafélék genetikai előállításuk könnyebbé válhat.

A növényi csíravonal-transzformáció két fontos célja lehet a pollen vagy petesejt, és a merisztémacsúcs vagy szövetkultúrarsejt (melyek ép növényekből és embriókból vagy szövetkultúrákból származnak). A pollen, petesejt vagy merisztémacsúcsok transzformációja a szexuálisan szaporított termények lehetséges eljárásai lehetnek, míg a növényi kultúra sejtek vagy merisztémacsúcsok transzformációja az aszexuálisan szaporított termények előállításának lehetséges módszerei. Mindezek az eljárások alkalmasak transzformált teljes növények előállítására.

A szövetkultúrarsejteket lehet transzformálni, és ezután tenyészteni, hogy szomatikus embriókat vagy merisztémacsúcsokat kapjunk, melyek viszont átalakított növényekké fejlődnek.

A merisztématranszformációt például úgy lehet végrehajtani, hogy a merisztémacsúcsot műteti úton tárjuk fel, és azt DNS-hordozórészecskékkal bombázzuk, és így lehetővé tesszük, hogy nagy számú merisztémasejt transzformálódjék. A transzformált merisztémák képesek arra, hogy kimérasarjakká növekedjenek, melyekből stabil transzformált részeket választunk le.

Azon eljárás általános ismertetését, ahol géneket vittek be éretlen embrióba, és amelyeket ezután növé-

nyek regenerálására használtak, például McCabe és munkatársai (1988) *Bio/Technology*, 6:923–926. című kiadványában ismerhetjük meg.

Végezetül *Chlamydomonas*-ban, egy egysejtű algában végzett szintest-transzformációt, ahol mikrolövedékes bombázást használtak, szintén leírtak [lásd Boynton és munkatársai (1988), *Sci.*, 240:1543–1537.] A *Chlamydomonas reinhardtii* szintest *atpB* génjének három mutánsát transzformálták vadon termő géneket tartalmazó szintest DNS-sel.

Most már lehetséges állati szövetekben lévő sejtek kis csoportjának genetikai transzformációja a találmány szerinti eljárás és berendezés alkalmazásával. Egy ilyen kezelés egy nem fertőző, de nagyon hatékony mechanizmust nyújt az állati szövetek, *in situ* transzformációjához. Ennek általános leírását lásd Sanford és társai fent említett munkájában.

Az élesztőben lévő mitokondrium transzformációját lövedékekkel történő bombázással ismertetik Johnston és munkatársai, (1988), *Sci.*, 240:1538–1541. A hivatkozás kitanítást ad egy olyan – mitokondriális *oxi-3* génben deléciót hordozó – nem revertáló, légzési sajátágaiban deficiens élesztőtörzs transzformálására olyan DNS-szekvenciákkal, melyek ki tudták javítani az *oxi-3* deléciót. Légzőkompetens transzformált sejteket kaptak, melyek a hibás *oxi-3* gének homológ helyettesítését tartalmazták.

Idegen biopolimerek, például RNS, protein, lipidek és szerves, valamint szervetlen vegyületek sorsát lehet vizsgálni úgy, hogy ezen molekulákkal vagy molekulák kombinációjával bevont részecskéket lövünk ki.

Ezenkívül izolált szubcelluláris organellumokat, például mitokondriumokat vagy szintesteket lehet transzformálni, és ezután a transzformált organellumokat vissza lehet helyezni a növényi sejtekbe vagy protoplastokba.

Példák

Az alábbi példákat a találmány bemutatása céljából mutatjuk be, melyekkel azonban nem kívánjuk korlátozni a találmány általános körét. Az összes rész és százalékos tömeg%-ban és tömegrészben értendő, hacsak nem jelezzük másként.

A hajtható anyagot a következőképpen készítettük el.

DNS-t tartalmazó plazmidokkal bevont hordozórészecskéket szuszpendáltunk egy hordozóközegben. Pontosabban a plazmidot aranyrészecskék felületén abszorbeáltuk. A plazmid egy olyan gént tartalmazott, mely a béta-glükuronidáz (GUS gén) enzimjét kódolja, és amelyet egy 35s Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) promotórral (gén, promotor és a Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, California, USA cégtől beszerzett szabályozó szekvenciák) szabályoztunk. Az aranyrészecskék gömbszemcsés porszemek voltak, melyeknek átmérője 1,5–3 mikron volt (kereskedelemben az Alfa Products, Danvers, MA cégtől kapható).

Az abszorpció végrehajtásához 50 µl plazmid oldatot (1,8 µg DNS) µl 0,01 M Tris puffer, 8,0 pH, 0,001 M etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA) adtunk hozzá 400 µl arany hordozórészecske szuszpenziójához

(300 mg aranyhordozórészecske/1 ml desztillált víz). A DNS-t 74 µl 2,5 M kalcium-klorid-oldat hozzáadásával és 30 µl 0,1 M spermidin-oldat hozzáadásával gyorsítottuk. A bevont hordozórészecskéket leüleptítettük egy Eppendorf-cső fenekén, és az így kapott tisztá folyadékot teljesen kiszívtuk. A hordozórészecskéket ismét szuszpendáltuk 500 µl etanolban (100%) (hordozóközeg). Egy hordozórészecskét kb. a plazmid 10 másolatával vontunk be.

A célanyagot a következőképpen készítettük el. Black Mexican Sweet – (BMS) borsó fajtájú kultúrnövényváltozat szuszpendált kultúráját szereztük be Virginia Walbot professzortól (Stanford University). A BMS borsót Sheridan (1975) *J. Cell Biol.*, 67:3969 munkájában ismerteti. Ezeket a kultúrákat a szokásos módon folyékony Murashige és Skoog (MS) közegben tartottuk (lásd *Physiol. Plantarum*, 1962, 15:473–496), melyet 2,4-diklór-fenoxi-ecetsavval egészítettünk ki (2 mg/l).

A hordozórészecskékkel való bombázáshoz előkészítésképpen a sejtekből 100 mg mintát gyűjtöttünk össze szuszpenzióból egy 7 cm-es Whatman no. 1 szűrőpapíron vákuumszűrővel egy Buchner-tölcséren. A szűrőpapírt a sejtekkel egy 9 cm-es 59a petricsészébe helyeztük, mely a fentiekben ismertetett MS közeget tartalmazta, szilárd formában.

A bevont aranyrészecskéknek a BMS borsó sejtek felé irányuló gyorsítására használt berendezés a következő elemekből állt, melyeket a fentiekben az 1., 2., 3. és 4a ábrákkal kapcsolatban leírtunk:

(1) Egy 1A méretű gázhengerből (egy 31 gázszolgáltató eszközből), mely héliumgázzal volt megtöltve, és ez egy 7" × 0,02" (177,8 mm hosszú 5,08 mm belső átmérőjű) méretű rozsdamentes acél kapilláris csővel (a 33 gázvezetékekkel) volt összekötve.

A 33 gázvezeték össze volt kötve egy szabványos kétfokozatú nyomásszabályozó szeleppel, mely kereskedelmi forgalomban a Victor Equipment cégtől kapható (vagyis a 32a gázszeleppel). A 33 gázvezeték viszont össze volt kötve egy nagynyomású rozsdamentes acél gázkamrával (a 32b gáztartállyal), melynek méretei 1/8" × 3" (0,00492 mm külső átmérő, 76,2 mm hosszúság) voltak.

(2) Egy 3 cm³-es (cc) Luer Lok steril fecskendő (a hajtható anyag továbbító 21a fecskendő) volt összekötve egy 1/10" (~0,004 mm-es) Teflon (az E.I. DuPont de Nemours Co. Wilmington védjegye) FEP csővel (a 23 hajtható anyag vezetékkel). A 23 hajtható anyag vezeték össze volt kötve egy Rheodyne 7030 típusú háromutas szeleppel (a 70 többutas szeleppel).

(3) A berendezés továbbá egy tiszta 1/10" (~0,004 mm) külső átmérőjű FEP csőből (a 60 visszanyerő eszköz);

(4) Egy pirex gázcsőből (az 50 szállítóeszköz), melynek méretei 10 cm × 1,2 mm külső átmérő × 0,8 mm belső átmérő voltak; és

(5) Egy gyorsulásérzékelő eszközből állt, mely két, egymáshoz képest az 50 szállítóeszközhöz eltolva elhelyezett érzékelőt tartalmazott. Az érzékelők (az első 92 sebességérzékelő és a második 94 sebességérzékelő)

fotodiódát és egy infravörös sugárzót tartalmaztak. A fotodiódák kereskedelmileg kaphatók a Motorola Semiconductor Products, Inc., Phoenix, AZ, USA cégtől, MRD500 típusszámon, és az infravörös sugárzók kereskedelmi forgalomban kaphatók a General Electric-től LED55C típusszám alatt.

Az első és második 92 és 94 sebességérzékelők egy a 8a és 8b ábrán vázlatosan bemutatott kialakítású villamos áramkör révén össze voltak kötve.

Az alábbiakban a 8a és 8. ábrákat ismertetjük részletesebben, melyeken a 90 sebességmérő eszköz és a 70 többutas szelep között elhelyezett eszköz rajza látható.

A 8a ábrán egy 113 áramkör látható, mely sorrendi időzítésjeleket állít elő, amellyel biztosítottuk, hogy ha a működtetőeszközt (azaz egy 113a indítógombot) lenyomtuk, a 8a ábrán látható áramkör összes többi része elő lett készítve az időzítési ciklusra. A 113 áramkör 113b' jelet küldött egyidejűleg közvetve egy 112 áramkörön keresztül (melyet 113b'' jel formájában vett), egy 115a flip-flopra (melyet 112b jel formájában vett), és azzal az időzítést leállította, és a 113b'' jelet közvetlenül egy 115b flip-flopra (melyet a 113b'' jel formájában vett), amellyel egy 115 áramkört alaphelyzetbe állítottunk, hogy csak egy indító jelet (111b jelet) fogadjon el, és hogy töröljünk egy 116 időzítő áramkört, hogy az nullát tartalmazzon. A közvetett jelet azért állítottuk elő, hogy legyen egy biztonsági tartalék az időzítés leállítására abban az esetben, hogyha a második 94 sebességérzékelő optikája (melyet 94a forráseszköznek és 94b érzékelőeszköznek nevezünk) nem rögzítené a hajtható anyag elhaladását. A 113 áramkör ekkor egy 113c jelet állított elő egy időzítési ciklus (vagyis a 8a ábrán a 114a jel) működésének megindítására egy 114 időzítő áramkörben.

A 114 időzítő áramkör a 113 áramkorról kapott egy 113c jelet, majd egy előre kiválasztott időintervallumban egy félvezető jelfogón (a 8a ábrán a 114c félvezető jelfogón) keresztül működtetett egy négyutas szelepet (a 8a ábrán a 114b négyutas szelepet), mely előre meghatározott mennyiségű nagynyomású levegőt továbbított a 70 többutas szelepen lévő (nem ábrázolt) pneumatikus működtetőszervhez. Ez a 70 többutas szelepet működtette, mely összeköttetést hozott létre a 30 nagynyomású gázforrás és a 40 hajtható anyag tartály között.

A 111 áramkör vette a 111a jelet, melyet az első 92 sebességérzékelő forrása és érzékelője (melyet 92a forráseszközként és 92b érzékelőeszközként jelöltünk) között elhaladó hajtható anyag állított elő, ezt a jelet formázta és egy meredeken emelkedő feszültségelet állított elő, mely időben megfelelt a 111a jel csökkenő feszültségének, vagyis egy 111b „start” jelet állított elő, mely a (8b ábrán 116 áramkörként feltüntetett) időzítő indítására volt képes.

Egy 112 áramkör egy második 94 sebességérzékelő 94a forráseszköze és 94b érzékelőeszköze között elhaladó hajtható anyag által előállított 112b jelet vette, és egy meredek emelkedő feszültségelet állított elő, mely az időben megfelelt a 112a jel csökkenő feszültségének, vagyis egy 112b „stop” jelet állított elő, mely képes volt az időzítő (a 8b ábrán a 116 áramkör) leállítására.

Egy 115a flip-flop vette a 111b „start” jelet a 111 áramkorról, a 112b „stop” jelet a 112 áramkorról, és egy 115b flip-flop vett egy „időzítő törlés” jelet (113b'' jel) a 113 áramkorról, és fenntartotta az időzítési állapotot, vagyis csupán egyetlen időzítési ciklust engedélyezett a hajtható anyag egy szállítási ciklusa alatt. A 115a flip-flop egy 115c jelet állított elő, melyet egy 116 áramkörre továbbított.

A 116 áramkör egy kvarckristállyal stabilizált időzítő áramkört tartalmazott, mely tartalmazott egy 116a órajel-előállító integrált áramkört és egy 116b digitális számlálót. Egy 117 áramkör tartalmazott egy multiplexelt binárisan kódolt decimális kijelzésű (BCD) hétszegmenses kijelződekódot (a 8b ábrán egy 117a kijelződekódot) és egy LED kijelzőt (a 8b ábrán a 117b fénydiódás kijelzőt). A 117 áramkör tehát a hajtható anyag pillanatnyi repülési idejét jelezte ki.

A 116b digitális számláló az időzítési állapotot jelző 113b'' jelet és egy 115 alaphelyzetbe állító áramkorról egy időzítési állapotot jelző 115c jelet vette. Ezek az időzítési állapot jelek az „időzítés megy” (a 115c jel) és az „időzítő törlés” (a 113b'' jel) voltak. Ha az időzítő futását jelző 115c jel nagysága nulla volt, a 116b digitális számláló mikroszekundumokat számolt nullától kezdve. Ha az időzítő futását jelző 115c jel nagysága 12 V volt, a 116a órajel-előállító integrált áramkör működött. Ha az időzítés törlést jelző 113b'' jel nagysága 12 V volt, a 116a órajel-előállító integrált áramkört töröltük, és annak tartalma nulla lett. Egy 117 kijelző áramkör vette a 116 időzítő áramkör BCD kódú jeleit, és így a hajtható anyag legfrissebb repülési idejét jelezte ki mikroszekundumokban az előlapon lévő kijelzőn.

Jóllehet egy példakénti áramkört mutattunk be, nagyon sok más áramkör lenne lehetséges, hogy ugyanezt az eredményt érjük el.

(6) A találmány szerinti berendezés tartalmazott továbbá egy kettős háromutas szelepet (a 70 többutas szelepet), melynek két darab alszelepe (a 70a és 70b alszelepek) volt, melyek kereskedelmi forgalomban kaphatók a Rheodyne, Inc., Cotati, CA cégtől 7030 ARV típusszám alatt. A 70 többutas szelep 70a és 70b alszelepei egy pneumatikus működtető szervvel működtek együtt, mely kereskedelmi forgalomban beszerezhető az Anspec Co., Ann Arbor, MI cégtől # 41687 típusszámú egység formájában. A pneumatikus működtető szerv levegővel volt meghajtva, melyet egy négyutas szolenoid szelep szolgáltatott, mely kereskedelmi forgalomban kapható az Automatic Switch Company (ASCO), Florham Park, NJ cégtől.

(7) A találmány szerinti berendezés tartalmazott továbbá egy rozsdamentes acélból készült külső hurkot, mely a 40 hajtható anyag tartályt képezi, külső átmérője 1/16" (~0,00246 mm) volt, mely az első és második háromutas szeleppel, azaz a 70 többutas szelep 70a és 70b alszelepeivel volt összekötve.

Az első háromutas 70a alszelep szelektív összeköttetést biztosított a 20 hajtható anyag forrás vagy a 30 nagynyomású gázforrás és a 40 hajtható anyag tartály között.

A második háromutas 70b alszelep szelektív összeköttetést biztosított a 40 hajtható anyag tartály és a 60 visszanyerő eszköz vagy az 50 szállítóeszköz között.

A 70 többutas szelepet először olyan helyzetbe állítottuk be, hogy összeköttetést biztosítson a 21a fecskendő és a hajtható anyag között, és ugyanakkor lezárta az összeköttetést a 30 nagynyomású gázforrás és a 40 hajtható anyag tartály között.

A 21a fecskendőt, mely 1 ml hajtható anyag továbbítására volt képes (bevont részecskék hordozóközeg szuszpenziója formájában), összeköttöttük a 23 hajtható anyag vezetékekkel. A 23 hajtható anyag vezetéket összeköttöttük a 40 hajtható anyag tartállyal.

A 22a hajtható anyag szelepet kinyitottuk, hogy összeköttetést biztosítson a 20 hajtható anyag forrás és a 40 hajtható anyag tartály között. Miután egy meghatározott mennyiségű hajtható anyagot vittünk be a 40 hajtható anyag tartályba, a 22a hajtható anyag szelepet elzártuk.

A 40 hajtható anyag tartály térfogatánál nagyobb mennyiségű hajtható anyag mennyiséget a 60 visszanyerő eszközön keresztül vezetjük el.

A 32a gázszelepet kinyitottuk, és összeköttetést hoztunk létre a 31a gázszolgáltatató tartály, valamint a 32b gáztartály között. A gáz nyomása a 32b gáztartály belsejében kb. 1000 psi ($6,9 \times 10^6$ Pa) volt. A gáznyomás-szabályozó 32a gázszelepet ezután elzártuk.

A további működést a 8a és 8b ábrákon bemutatott áramkörön keresztül vezéreltük. az áramkör a következőképpen működött.

Miután a 113a indítógombot megnyomtuk, a 113 áramkör egy 0,05 másodperces hosszúságú időzítő impulzust adott ki, amivel a 116 áramkör digitális időzítését leállította. A 115 alaphelyzetbe állító áramkör a 116 áramkör állapotát fenntartotta, vagyis ha valamilyen hiba következettben a 116 áramkör digitális időzítése még mindig továbbment, a berendezés előző működtetése után, a 116a órajel-előállító integrált áramkört töröltük és annak tartalma nulla lett, hogy előkészítsük a következő időzítési ciklusra. Miután a 116a órajel-előállító integrált áramkört leállítottuk, a 115 alaphelyzetbe állító áramkör időzítési állapotát úgy állítottuk be, hogy csak egy indító jelet fogadjon el a 111 áramkörtől.

Ezt követően a 114 időzítő áramkört indítottuk. A 114 időzítő áramkör egy 120 V-os váltakozó áramú (VAC) 0,8 sec-os hosszúságú alapjel-beállító időzítő jelet állított elő a 114b négyutas szelep működtetéséhez, mely 65–75 font/négyzetláb (psi) ($4,48 \cdot 5,17 \times 10^5$ Pa) nyomású levegőt szolgáltatott egy a 70 többutas szelepen lévő (nem ábrázolt) pneumatikus működtető szerv működtetéséhez, mellyel a 70 többutas szelepet olyan helyzetbe állítottuk, hogy szelektív összeköttetést biztosított a 30 nagynyomású gázforrás és a 40 hajtható anyag tartály között, melynek eredményeképp a nagynyomású gáz felgyorsult és a hajtható anyag elhaladt az első és második 92 és 94 sebességérzékelőknél.

Ahogy a hajtható anyag hullám felfutó éle elhaladt a 90 sebességmérő eszköz első 92b érzékelőeszközénél, egy villamos 111a jelet állítottunk elő. Ennek segítségével

vel a 111 áramkörrel a 115 alaphelyzetbe állító áramkört használva egy indító jelet adtunk a 116 áramkörre.

Hasonlóképpen, ahogy a hajtható anyag hullám felfutó éle elhaladt a 90 sebességmérő eszköz második 94b érzékelőeszközénél, egy villamos 112a jelet állítottunk elő. Ekkor a 112 áramkör segítségével a villamos 112a jelet használtuk a 115 alaphelyzetbe állító áramkörrel a 116 áramkör leállítására. a hajtható anyag hullám felfutó élének az első 92b érzékelőeszköz és a második 94b érzékelőeszköz közötti repülési idejét kijeleztük a 117 kijelző áramkör (3 digit, 7 szegmens) LED kijelzőjén (vagyis a 117b fénydiódás kijelzőn), mely 117 kijelző áramkör tehát egy többszegmenses LED kijelző volt.

A 9. ábrán mutatjuk be a találmány szerinti berendezés működtetésével kapott nyers adatokat. A 111a jelet, egy villamos jelet a 92 sebességérzékelőből, és a villamos 112a jelet pedig a 94 sebességérzékelőből kaptuk. A 92 és 94 sebességérzékelők egymástól 2,8 cm-es távolsággal voltak elválasztva. Ahogy a hajtható anyag elhalad bármelyik 92 vagy 94 sebességérzékelőnél, a villamos jel elcsúszik egy alapvonali értéktől. A villamos 111a jel esetében ez az elcsúszás a 9. ábrán az 1 vonal pontjánál van feltüntetve, a villamos 112a jel esetében pedig ez az elcsúszás a 2 vonal pontjában látható. Az első és második 92 illetve 94 sebességérzékelők közötti mozgás időtartama, melyet az 1 és 2 vonalak közötti távolsággal jeleztünk, 60 msec volt.

Ez azt jelenti, hogy a hajtható anyag kb. 1044 mérföld/óra ($466,7$ m/sec-os) sebességgel mozgott.

A hajtható anyag az 50 szállítóeszközből lépett ki és mozgott a 80 előrehajtó zónában lévő BMS sejtek irányába. A 80 előrehajtó zónát egy vákuumkamra formájában alakítottuk ki, amelynek kialakítása a fent említett „Fisher 88” című kiadványból, annak 114. oldaláról ismerhető meg. A 80 előrehajtó zónában a nyomás kb. 0,1 atm ($1,013 \times 10^5$ Pa) abszolútértékű volt.

A találmány szerinti berendezés működését azzal fejeztük be, hogy a 70 többutas szelepet szelektíven olyan helyzetbe állítottuk, hogy lezárja a gáz útját a 31a gázszolgáltatató tartályból a 70 többutas szelepen keresztül az 50 szállítóeszköz felé, és hogy összeköttetést biztosítson a 21a fecskendő és a túlsorduló hajtható anyag tartály között.

MS táptalajt (folyékony Murashige és Skoog kezeget) (lásd leírásunk 14 o. 1–3. sorát) tartalmazó petricsészékben (az 59a petricsészében) található BMS sejtretegeket bombáztunk egyidejűleg. Minden egyes 59a petricsészén 100 mg BMS sejt volt. GUS-t tartalmazó plazmáddal bevont hordozórészecskéket vittünk be a BMS sejtekbe.

A BMS sejtek bombázását követően a tenyészetet sötétben 2 napig 27 °C-on inkubáltuk. 2 nap után a sejteket GUS aktivitás szempontjából megvizsgáltuk.

A BMS sejtekben a GUS gén kifejeződését GUS hisztokémiai próba alkalmazásával vizsgáltuk meg (5-Br-4-Cl-3 indolil-béta-D-glükuronáz sav (X-gluc) szubsztátum és az eljárás a Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA-tól származik). A BMS sejteket és sejt-csoportokat 37 °C-on 24–28 óráig inkubáltuk X-gluc 1 mM oldatá-

ban, mely az alábbiakat tartalmazta: 0,5 mM potassium ferricianidot, 0,5 mM potassium ferrocianidot és 10 mM EDTA-t. A sejteket és sejtcsoportokat, melyek ezen kísérlettel megkékültek, úgy értékeltük, hogy a GUS aktivitás szempontjából pozitívak voltak.

Az eredményeket az 1. táblázatban mutatjuk be.

1. táblázat

Bombázási terv	1 petricsészében lévő GUS aktivitású BMS sejtek vagy sejt-csoportok száma
GUS gént tartalmazó plazmiddal bevont aranyrézecskekkel bombázott sejtek	4
ismétlés	5
ismétlés	6
ismétlés	4
ismétlés	5
ismétlés	2
ismétlés	10
ismétlés	8
ismétlés	9

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a részecske-bombázást használtuk DNS-nek ép növényi sejtekbe történő egyidejű bevitelére, és hogy az ezzel az eljárással bevitt gének azután kifejezhetők.

A fenti leírás alapján nyilvánvaló, hogy a találmány számos módosítást lehet végrehajtani azon túl, amit a fentiekben bemutatunk és leírtunk, ami a fenti leírás és a mellékelt rajz alapján a szakember számára nyilvánvaló. Emiatt hangsúlyozni kívánjuk, hogy a fentiekben leírtak mind bemutató jellegűek, és nem úgy lettek megfogalmazva és értelmezve, hogy azzal a találmány oltalmi körét bármilyen módon korlátozzuk, kivéve a jelen leíráshoz csatolt oltalmi igénypontokban megfogalmazottakat.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Berendezés anyag bevitelére sejtekbe, mely tartalmaz

(a) egy gázkivezető nyílással rendelkező nagynyomású gázforrást;

(b) egy a gázkivezető nyílással összekötött, bevezetőnyílással és kivezetőnyílással rendelkező hajtható anyagtartályt; *azzal jellemezve, hogy*

(c) a nagynyomású gázforrás (30) kivezetőnyílása és a hajtható anyagtartály (40) bevezetőnyílása között elrendezett többutas szelepet (70) tartalmaz. (Elsőbbsége: 1989. 06. 30.)

2. Az 1. igénypont szerinti berendezés, *azzal jellemezve, hogy*

(d) egy kivezetőnyílással rendelkező hajtható anyagforrást (20) tartalmaz, és

a többutas szelep (70) a nagynyomású gázforrás (30) kivezetőnyílása vagy a hajtható anyagforrás (20) kivezetőnyílása és a hajtható anyagtartály (40) bevezetőnyílása között képez összeköttetést. (Elsőbbsége: 1989. 06. 30.)

3. A 2. igénypont szerinti berendezés, *azzal jellemezve, hogy tartalmaz*

(e) egy bevezetőnyílással rendelkező visszanyerő eszközt (60), és

10 a többutas szelep (70) a nagy nyomású gázforrás (30) kivezetőnyílása vagy a hajtható anyagforrás (20) kivezetőnyílása és a hajtható anyagtartály (40) bevezetőnyílása között képez összeköttetést, és szelektív összeköttetést képez egy szállítóeszköz (50) bevezetőnyílása vagy a visszanyerő eszköz (60) bevezetőnyílása és a hajtható anyagtartály (40) kivezetőnyílása között. (Elsőbbsége: 1989. 06. 30.)

4. A 3. igénypont szerinti berendezés, *azzal jellemezve, hogy*

20 (f) a hajtható anyagtartály (40) kivezetőnyílásával egy bevezetőnyílással és kivezetőnyílással rendelkező szállítóeszköz (50) bevezetőnyílása folyadékvezető összeköttetésben áll;

a többutas szelep (70) szelektív összeköttetést képez a nagynyomású gázforrás (30) kivezetőnyílása vagy a hajtható anyagforrás (20) kivezetőnyílása és a hajtható anyagtartály (40) között, és szelektív összeköttetést képez a szállítóeszköz (50) bevezetőnyílása vagy a visszanyerő eszköz (60) bevezetőnyílása és a hajtható anyagtartály (40) kivezetőnyílása között. (Elsőbbsége: 1989. 06. 30.)

5. Az 1. igénypont szerinti berendezés, *azzal jellemezve, hogy a nagynyomású gázforrás (30)*

(a) egy kivezetőnyílással rendelkező gázszolgáltató eszközt (31) foglal magába, és

(b) a gázszolgáltató eszközzel (31) összekötött és a gázszolgáltató eszköz (31) kimenőnyílása és a hajtható anyagtartály (40) bemenőnyílása között szelektív összeköttetést képező gázszabályozó eszközt (32) tartalmaz. (Elsőbbsége: 1989. 06. 30.)

6. Az 5. igénypont szerinti berendezés, *azzal jellemezve, hogy a gázszabályozó eszköz (32) tartalmaz egy gázszelepet (32a) és egy bevezetőnyílással rendelkező gáztartályt (32b), a gázszelep (32a) szelektív pneumatikus összeköttetést képez a gázszolgáltató eszköz (31) kivezetőnyílása és a gáztartály (32b) bevezetőnyílása között. (Elsőbbsége: 1989. 06. 30.)*

7. Az 1. igénypont szerinti berendezés, *azzal jellemezve, hogy a hajtható anyag tartállyal (40) összekötött hőmérséklet-szabályozó eszközt (42) tartalmaz. (Elsőbbsége: 1989. 06. 30.)*

8. A 2. igénypont szerinti berendezés, *azzal jellemezve, hogy a hajtható anyagforrás (20)*

kivezetőnyílással rendelkező hajtható anyag szolgáltató eszközt (21) tartalmaz, és

a hajtható anyag szolgáltató eszközzel (21) egy – a hajtható anyag szolgáltató eszköz (21) kivezetőnyílása és a hajtható anyagtartály (40) bevezetőnyílása között szelektív összeköttetést képező – hajtható anyag szabályozó eszköz (22) van összekötve. (Elsőbbsége: 1989. 06. 30.)

9. A 8. igénypont szerinti berendezés, *azzal jellemezve*, hogy a hajtható anyagforrás (20) a hajtható anyag szolgáltató eszközzel (21) összekötött keverőt (24) tartalmaz. (Elsőbbsége: 1989. 06. 30.)

10. A 4. igénypont szerinti berendezés, *azzal jellemezve*, hogy a szállítóeszköz (50) tartalmaz egy makroirányító eszközt (51). (Elsőbbsége: 1989. 06. 30.)

11. A 4. igénypont szerinti berendezés, *azzal jellemezve*, hogy a szállítóeszköz (50) tartalmaz egy mikorirányító eszközt (52). (Elsőbbsége: 1989. 06. 30.)

12. A 4. igénypont szerinti berendezés, *azzal jellemezve*, hogy a szállítóeszközzel (50) sebességmérő eszköz (90) van társítva. (Elsőbbsége: 1989. 06. 30.)

13. A 12. igénypont szerinti berendezés, *azzal jellemezve*, hogy a sebességmérő eszköz (90) első sebességérzékelőt (92) és második sebességérzékelőt (94) foglal magába. (Elsőbbsége: 1989. 06. 30.)

14. Az 1. igénypont szerinti berendezés, *azzal jellemezve*, hogy a hajtható anyagtartály (40) folyadékvezető összeköttetésben áll egy – propulziós zónát (80) meghatározó – környezetszabályozott kamrával. (Elsőbbsége: 1989. 06. 30.)

15. Eljárás nem sejtes biológiai anyagnak élő sejtekbe történő bevitelére, célszerűen az 1–14. igénypontok bármelyike szerinti berendezés segítségével, *azzal jellemezve*, hogy

(a) egy előre megválasztott, 15–150 atm ($1,47 \times 10^6$ – $1,47 \times 10^7$ Pa) nyomású gázból előre meghatározott térfogatnyit alkalmazunk;

(b) hajtható anyagból előre meghatározott mennyiséget veszünk, mely hordozóközegben van szuszpendálva; és

(c) a hajtható anyagot kontaktáljuk a meghatározott mennyiségű gázzal, és a hajtható anyagot egy kiválasztott cél irányában gyorsítjuk 200 mph–1200 mph (89,41–536,45 m/s) közötti sebességgel. (Elsőbbsége: 1989. 06. 30.)

16. Eljárás biológiai anyag bevitelére biológiai célanyagba, *azzal jellemezve*, hogy

(a) egy előre meghatározott 15–150 atm ($1,47 \times 10^6$ – $1,47 \times 10^7$ Pa) nyomáson egy gáztartályban lévő gázból meghatározott térfogatnyit alkalmazunk;

(b) egy – bevezetőnyílással rendelkező, a nagynyomású gázforrás (30) kivezetőnyílásával szelektíven összekötött, kivezetőnyílásánál túlcordulás visszanyerő eszköz (60) bevezetőnyílásával és szállítóeszköz (50) bevezetőnyílásával szelektíven összekötött – hajtható anyagtartályban (40) lévő, előre meghatározott térfogatnyi hajtható anyagot alkalmazunk, mely biológiai anyagnak hordozóközegben lévő szuszpenzióját tartalmazza;

(c) a hajtható anyagot kontaktáljuk az előre meghatározott mennyiségű gázzal; és

(d) a hajtható anyagot a szállítóeszközön (50) keresztül 200 mph és 1200 mph (89,41 m/s és 536,45 m/s) közötti sebességgel a célanyag irányába gyorsítjuk. (Elsőbbsége: 1989. 06. 30.)

17. Berendezés anyag bevitelére sejtekbe, mely tartalmaz:

(a) bevezetőnyílással és kivezetőnyílással rendelkező hajtható anyagtartályt; és

(b) a hajtható anyagtartály kivezetőnyílásával összekötött, bevezetőnyílással és kivezetőnyílással rendelkező szállítóeszközt, *azzal jellemezve*, hogy

(c) a hajtható anyagtartály (40) bemenet és a szállítóeszköz (50) bemenete között – kivezetőnyílással ellátott első alszelepet (70a) és bevezetőnyílással és kivezetőnyílással rendelkező második alszelepet (70b) magába foglaló, az első alszelep (70a) kimenete által a hajtható anyagtartály (40) bemenetével szelektív összeköttetést képező, és a második alszelep (70b) által a hajtható anyagtartály (40) kimenete és a szállítóeszköz (50) bemenete között szelektív összeköttetést képező – többutas szelep (70) van elrendezve. (Elsőbbsége: 1989. 06. 30.)

18. A 17. igénypont szerinti berendezés, *azzal jellemezve*, hogy

(d) nagynyomású gázforrást (30) tartalmaz; és a többutas szelep (70) első alszelepe (70a) szelektív pneumatikus összeköttetést képez a nagynyomású gázforrás (30) kimenete és a hajtható anyagtartály (40) bemenete között.

19. A 17. igénypont szerinti berendezés, *azzal jellemezve*, hogy

(e) kimenettel rendelkező hajtható anyagforrást (20) tartalmaz; és

a többutas szelep (70) első alszelepe (70a) szelektív összeköttetést képez a hajtható anyagforrás (20) kimenete és a hajtható anyagtartály (40) bemenete között. (Elsőbbsége: 1989. 06. 30.)

20. A 15. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hajtható anyagot 0,1 mikron és 100 mikron közötti átmérőjű és 1 g/cm³ és 25 g/cm³ közötti fajsúlyú hordozórészecskékkel adszorbeáljuk. (Elsőbbsége: 1989. 06. 30.)

21. A 20. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hordozórészecskéket a wolframot, aranyat, platinát, palládiumot, ezüstöt, nikkelt, latexet, üveget, kerámiát, sebészeti ötvözeteket és ferritkristályokat tartalmazó csoportból választjuk ki. (Elsőbbsége: 1989. 06. 30.)

22. A 15. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hajtható anyagként biológiai anyagot használunk, legfeljebb 5 µg mennyiségben. (Elsőbbsége: 1989. 06. 30.)

23. A 22. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy biológiai anyagként nem sejtes anyagot használunk. (Elsőbbsége: 1989. 06. 30.)

24. A 15. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a biológiai anyag DNS. (Elsőbbsége: 1989. 06. 30.)

25. A 15. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hajtható anyagot hordozóközegben szuszpendáltatjuk. (Elsőbbsége: 1989. 06. 30.)

26. A 25. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hordozóközeg víz. (Elsőbbsége: 1989. 06. 30.)

27. A 25. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hordozórészecskéket, az előre meghatározott térfogatú gázzal való kontaktálást megelőzően fecskendőszivattyút magába foglaló keverővel (24) szuszpenzióban tartjuk. (Elsőbbsége: 1990. 06. 29.)

28. A 15. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a gáz nyomását 15 atm és 150 atm ($1,47 \times 10^6$ és $1,47 \times 10^7$ Pa) közötti nyomáson tartjuk. (Elsőbbsége: 1989. 06. 30.)

29. A 15. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a gáz molekulatömege 2 és 40 atomi tömegegység (amu) között van. (Elsőbbsége: 1989. 06. 30.)

30. A 15. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a gáz hélium. (Elsőbbsége: 1989. 06. 30.)

31. A 15. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a célanyag legalább egy növényi sejt. (Elsőbbsége: 1989. 06. 30.)

32. A 31. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a növényi sejt kukoricasejt. (Elsőbbsége: 1989. 06. 30.)

33. A 32. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a kukoricasejtet teljes növényre regeneráljuk. (Elsőbbsége: 1989. 06. 30.)

34. A 33. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a regenerált kukoricánövényt heterológ DNS szekvenciával stabilan transzformáljuk. (Elsőbbsége: 1989. 06. 30.)

35. A 15. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a célanyagot fémszita segítségével tartjuk a helyén. (Elsőbbsége: 1989. 06. 30.)

36. A 15. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hajtható anyagot vizuális mérőműszer (58), célszerűen mikroszkóp alkalmazásával a célanyagra ráirányított szállítóeszközön (50) hajtjuk keresztül. (Elsőbbsége: 1989. 06. 30.)

37. A 15. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hajtható anyagot kimenettel rendelkező szállítóeszközön (50) keresztül hajtjuk, és a célanyagot a szállítóeszköz (50) kimenetétől 1 cm és 100 cm közötti távolságban helyezük el. (Elsőbbsége: 1990. 02. 09.)

38. Eljárás biológiai anyagnak célanyagba való bejuttatására, *azzal jellemezve*, hogy

(a) kialakítunk egy berendezést (10), melynek

(i) gázkivezető nyílással rendelkező nagynyomású gázforrása (30) és kivezetőnyílással rendelkező hajtható anyagforrása (20) van; és

(ii) bevezetőnyílással és kivezetőnyílással rendelkező hajtható anyagtartálya (40) van;

(iii) a hajtható anyagtartályhoz (40) bevezetőnyílással és kivezetőnyílással rendelkező szállítóeszközt (50) csatlakoztatunk; és

(iv) a nagynyomású gázforrás (30) kimenőnyílása és a hajtható anyagtartály (40) bevezetőnyílása között szelektív összeköttetést képező többutas szelepet (70) alkalmazunk; és

10 (b) a célanyagot a szállítóeszköz (50) kilépőnyílásától alkalmasan megválasztott hatásos távolságban helyezük el; és

(c) a szállítóeszközt (50) a célanyagra ráirányítjuk; és

15 (d) a többutas szelepet (70) úgy állítjuk be, hogy folyadék-összeköttetést képez a hajtható anyagforrás (20) és a hajtható anyagtartály (40) között, és kiválasztott mennyiségű hajtható anyagot viszünk át a hajtható anyagtartályba (40); és

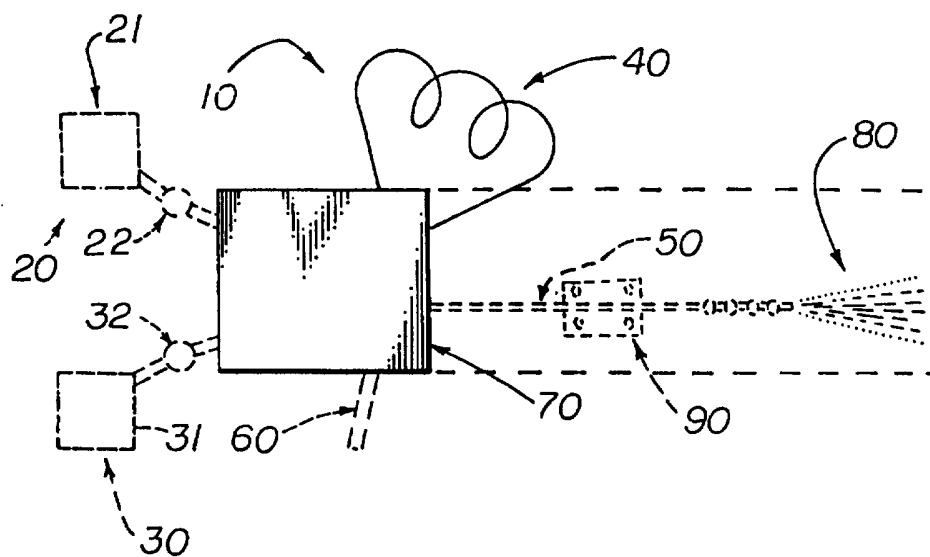
20 (e) a többutas szelepet (70) úgy állítjuk be, hogy pneumatikus összeköttetést képez a nagynyomású gázforrás (30) kilépőnyílása és a hajtható anyagtartály (40) belépőnyílása között, valamint a hajtható anyagtartály (40) kilépőnyílása és a szállítóeszköz (50) belépőnyílása között, és kiválasztott térfogatú gázt kontaktálunk a hajtható anyagtartályban (40) lévő hajtható anyaggal. (Elsőbbsége: 1989. 06. 30.)

39. A 38. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hajtható anyagtartályból (40) kilépő hajtható anyag sebességét sebességmérő eszközzel (90) mérjük. (Elsőbbsége: 1989. 06. 30.)

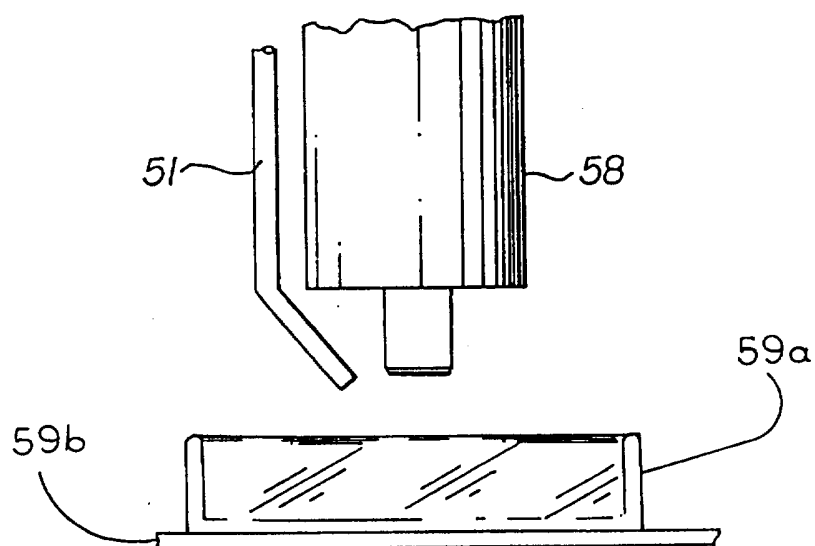
40. A 38. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy

(f) a többutas szelepet (70) úgy állítjuk be, hogy a gáznak a nagynyomású gázforrásból (30) való áthaladását a többutas szelepen (70) keresztül a szállítóeszközbe (50) leblokkoljuk, és folyadékvezető összeköttetést létesítünk a fecskendő (21a) és a hajtható anyag túlcserélés tartály között. (Elsőbbsége: 1989. 06. 30.)

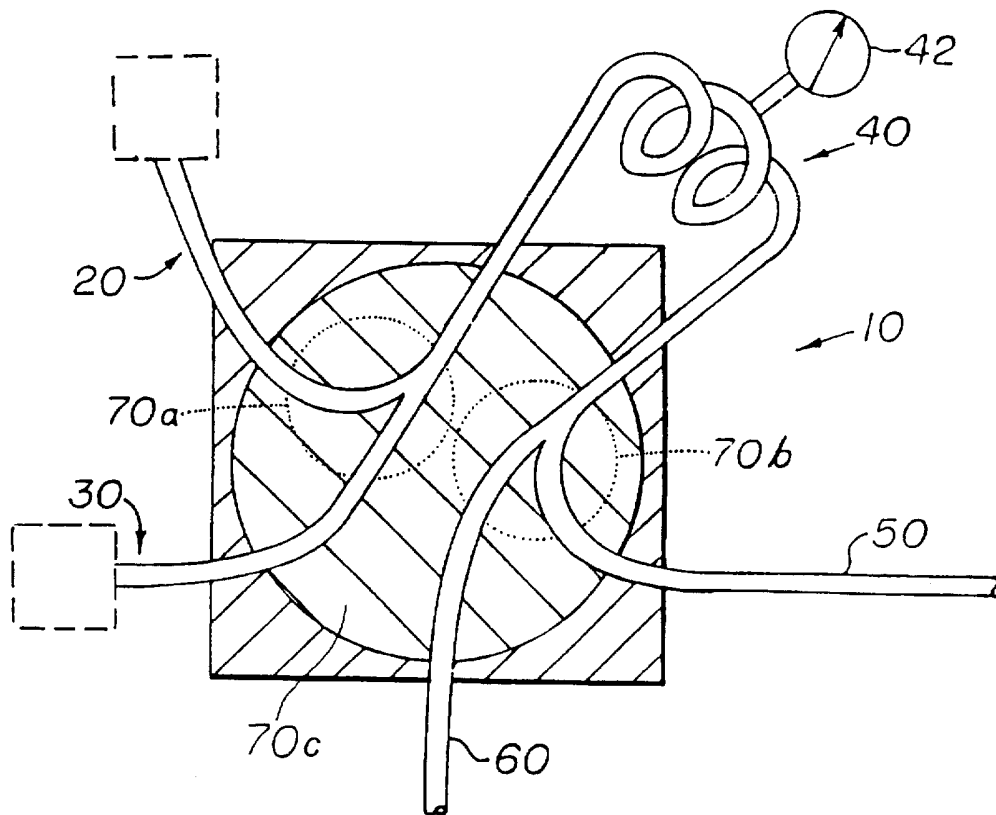
1. ábra



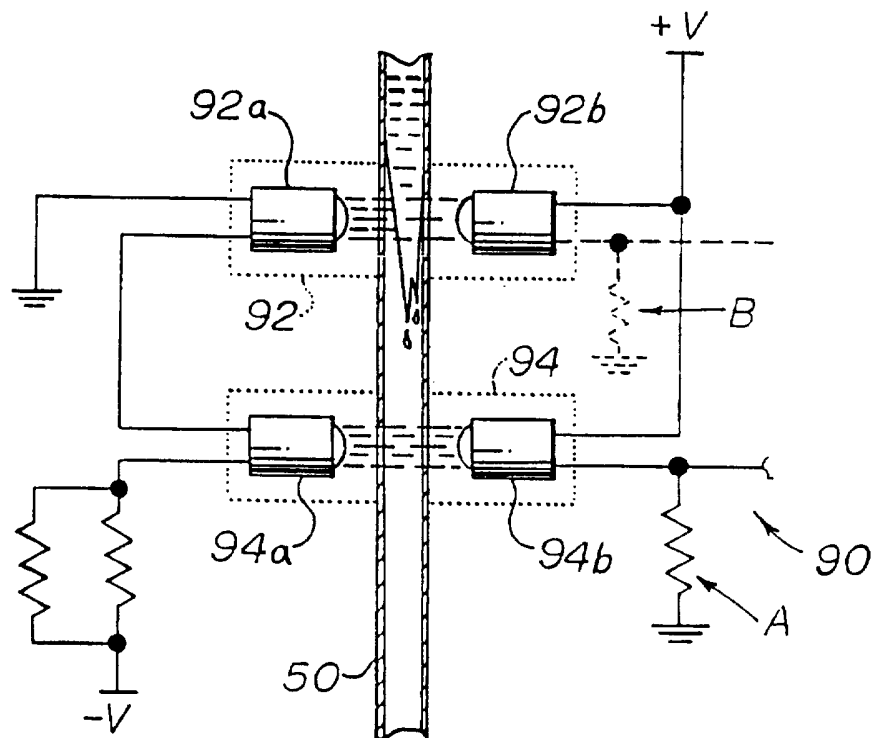
5b. ábra



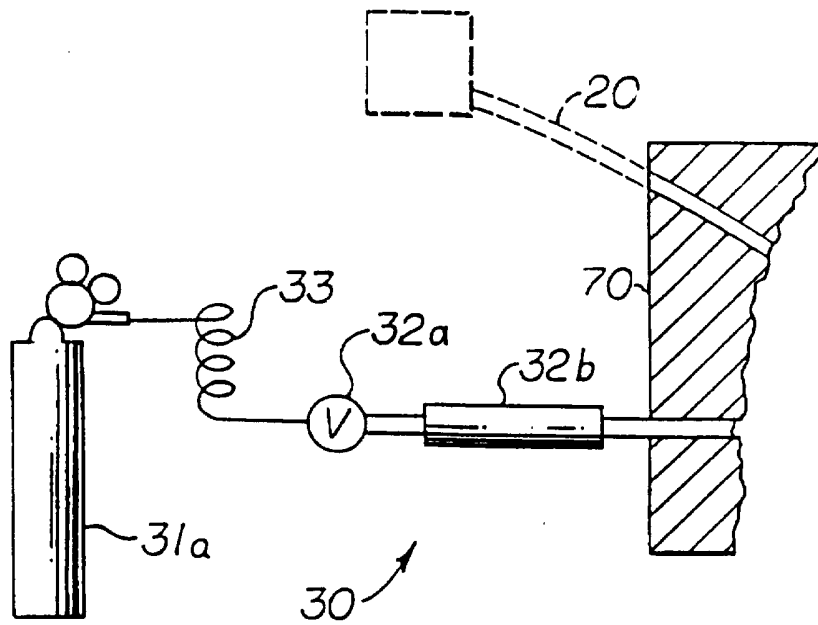
2. ábra



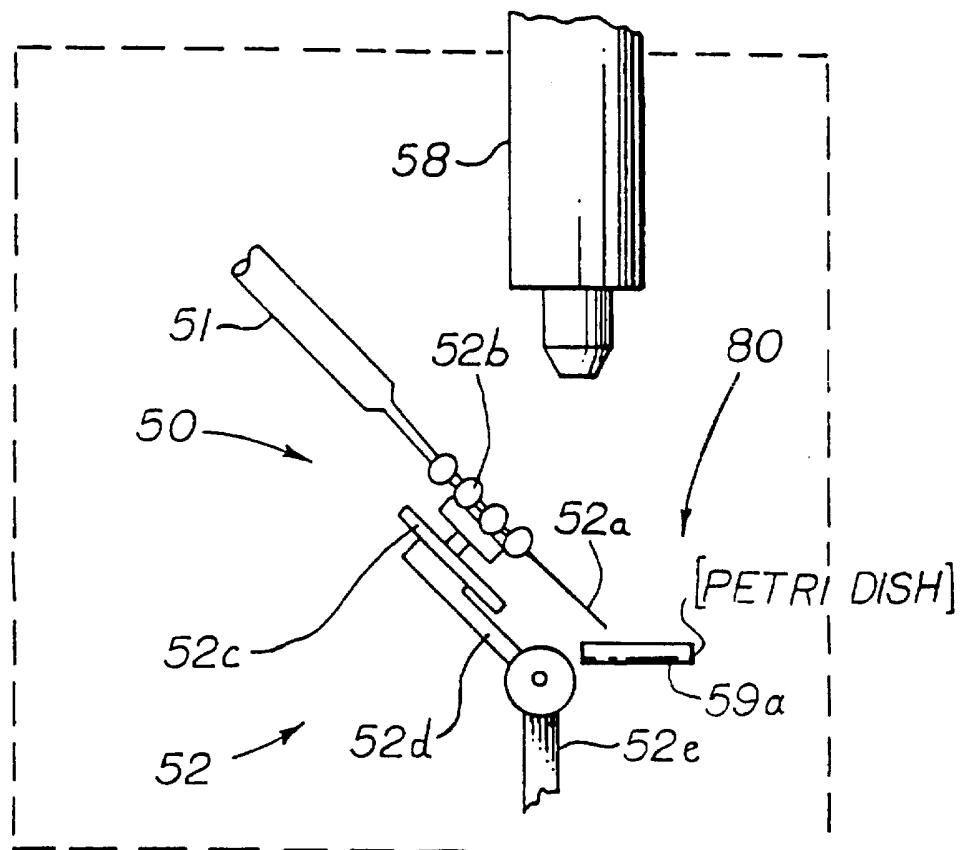
6. ábra



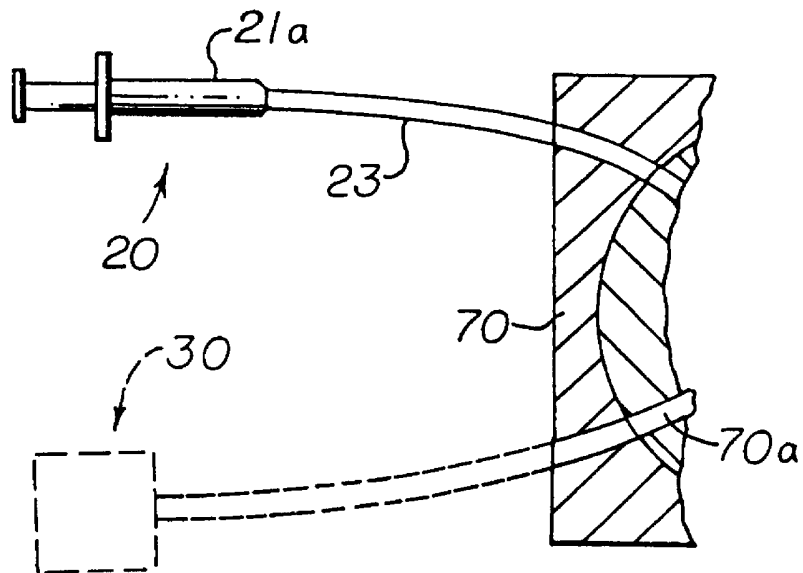
3. ábra



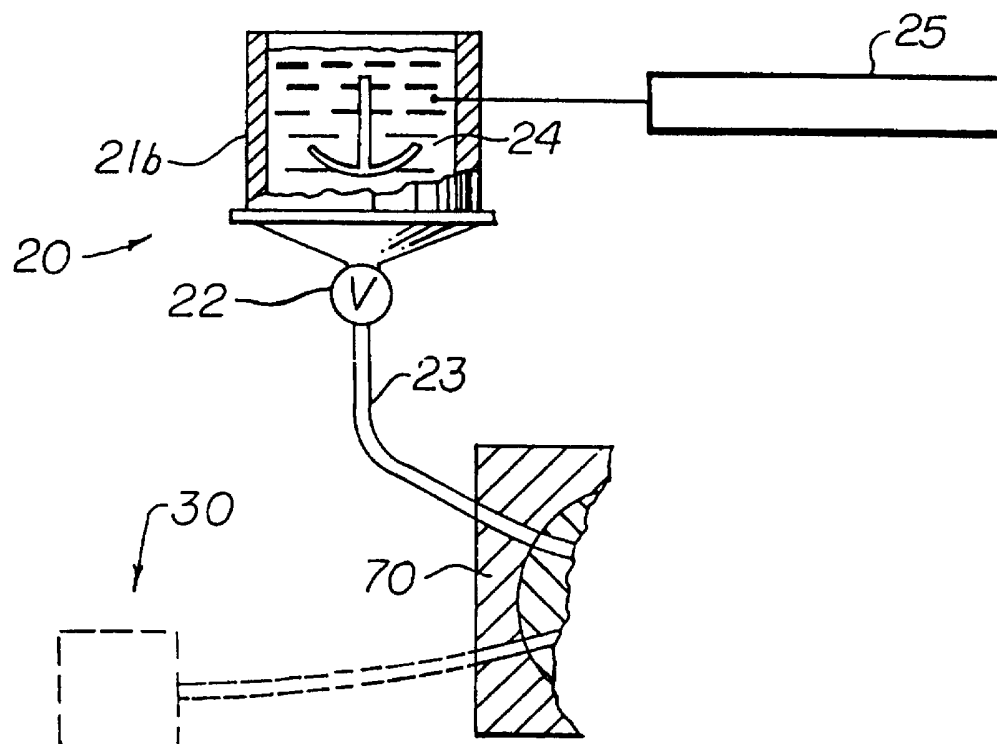
5a. ábra

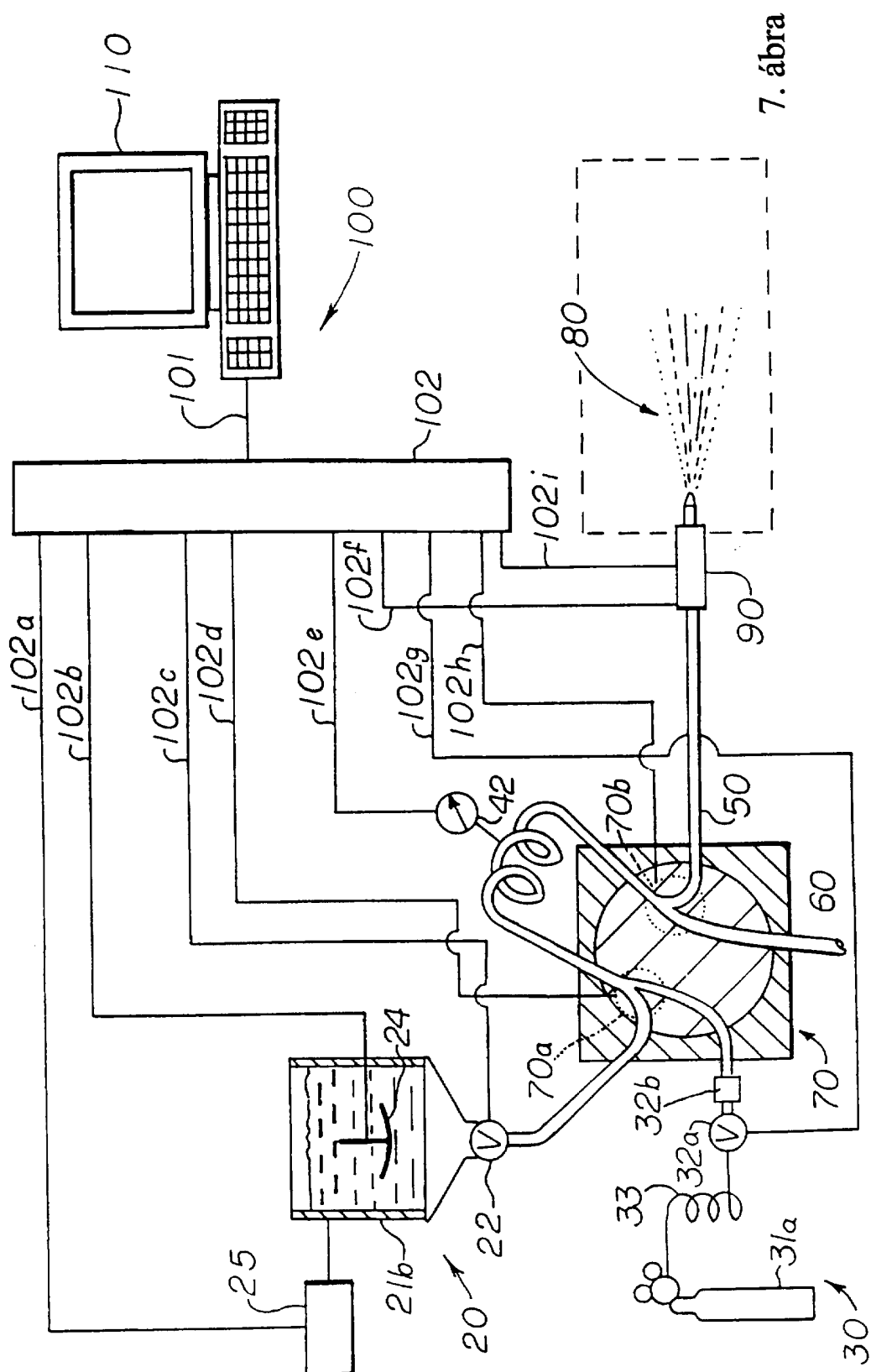


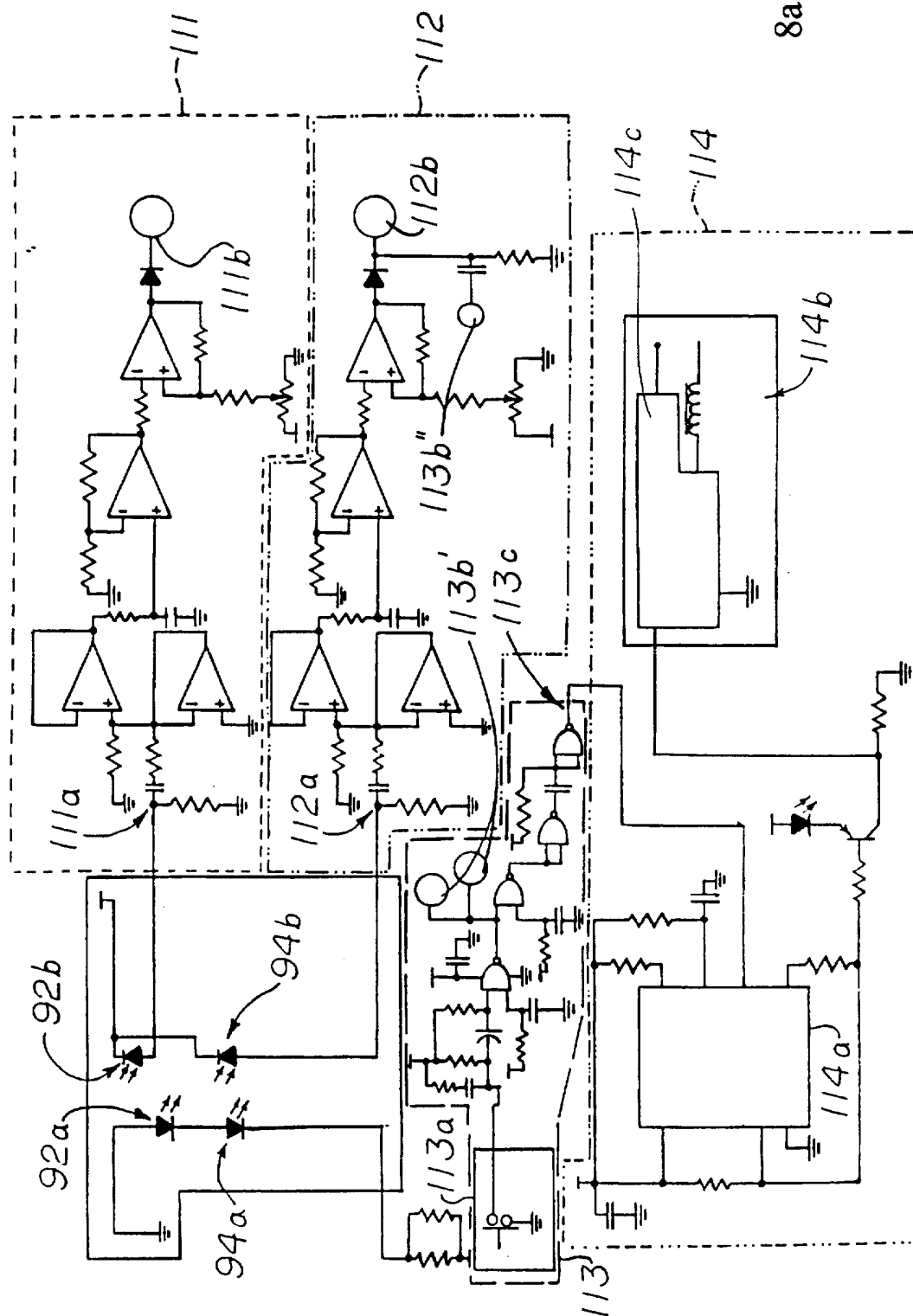
4a. ábra



4b. ábra

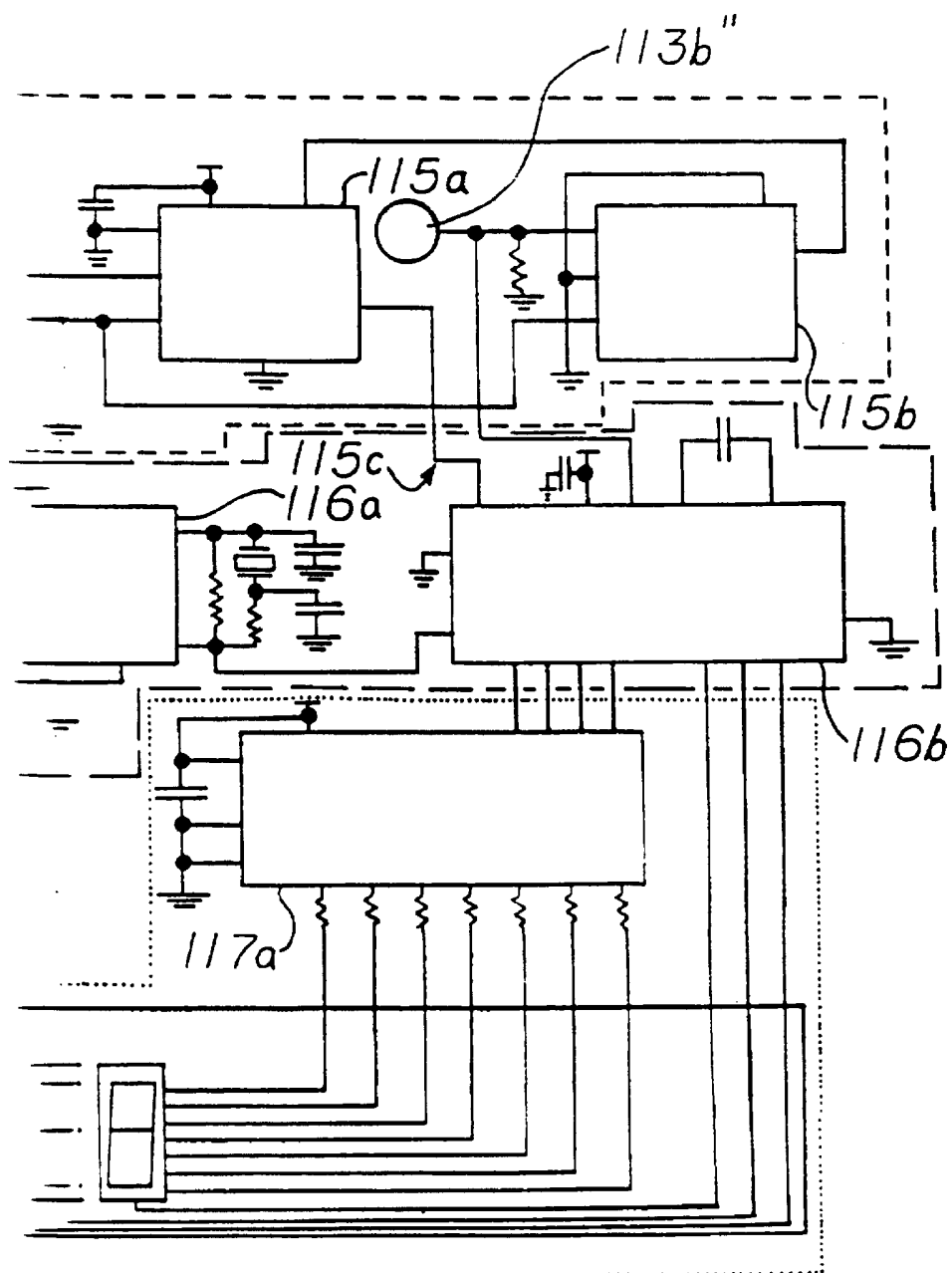






8a. ábra

8b. ábra



9. ábra

