

Изобретение касается устройства для введения биологического материала в живые клетки, содержащее резервуар для внедрения в клетку материала с входным и выходным отверстиями и источник газа под давлением с выходным отверстием для газа, сообщенным с резервуаром.

Изобретение также касается соответствующего способа введения биологического материала в растительные клетки, предусматривающего предварительное культивирование клеток и внедрение биологического материала, связанного с частицами носителя, в клетку.

Поскольку значительное количество современных исследований направлено на генетическую трансформацию клеток, биологам требуется вводить в живые клетки самые разнообразные материалы. Известные технологии введения биологических материалов в живые клетки используют электропорацию, прямое поглощение ДНК, механизмы слияния, использование инфицирующих агентов, а также микроинъекции. Все эти технологии однако очень сложны, недостаточно эффективны и их трудно контролировать. Кроме того, не все эти технологии пригодны для введения биологических материалов в растительные клетки, которые обычно имеют значительно более прочную оболочку.

Поэтому сравнительно недавно Сэнфорд и др. предложили способ доставки биологического материала в живые клетки с использованием газа под давлением [см. Klein et al. (1987), Nature, 337, а также Sanford et al. (1988), Particular Sci. and Technol, (5 : 27 - 37)]. По технологии Сэнфорда, небольшие частицы высокой плотности (вольфрам) ускоряют до высокой скорости с помощью стреляющей частицами "пушки". Это позволяло обеспечить проникновение биологического материала на частицах в растительные клетки. Применялось несколько вариантов выполнения "пушки": 1) со стрельбой пластиковыми микроснарядами в мишенную пластину; 2) с использованием механического импульса; 3) с использованием центростремительного ускорения и 4) с использованием газового (воздушного) разряда. Последний вариант, в котором стрельба ведется нагруженными суспензиями биологического материала вольфрамовыми частицами посредством газового разряда, представляет наибольший интерес. При этом используют описанное во вступительном абзаце устройство, включающее резервуар для внедрения в клетку материала с входным и выходным отверстиями для газа, сообщенным с резервуаром.

Несмотря на то, что эта технология представляет собой значительный шаг вперед в данной области, она также не лишена некоторых недостатков. Так, трудно регулировать количество суспензии, которой нагружаются вольфрамовые частицы, чем затрудняется воспроизведение результатов эксперимента и повторная прививка культур является весьма трудоемкой процедурой. Кроме того, скорость должна варьироваться для изменения, при необходимости, характеристик стрельбы, но при этом скорость суспензии не может быть измерена непосредственно.

Изобретение предлагает усовершенствованную технологию введения в живые клетки, а именно в первом своем аспекте предлагает устройство указанного типа, отличающееся тем, что оно содержит три контейнера, первый - служащий источником газа, второй - служащий средством подачи внедряемого материала и третий - служащий резервуаром для внедряемого материала, трубку для макроприцеливания с входным и выходным отверстиями, первое из которых сообщено с выходным отверстием третьего контейнера, двойной трехходовой клапан с двумя вспомогательными клапанами, первый из которых служит для селективной пневматической связи между выходным отверстием первого контейнера или выходным отверстием из второго контейнера с входным отверстием третьего контейнера и для обеспечения селективного сообщения между входным отверстием трубки макроприцеливания и выходным отверстием третьего контейнера.

Во втором аспекте изобретение предлагает способ введения биологического материала в растительные клетки, предусматривающий предварительное культивирование клеток и внедрение биологического материала, связанного с частицами носителя, в клетки, усовершенствованный тем, что связывание биологического материала осуществляют посредством фиксирования его в объеме от 0,5 до 1000мкл на частицах носителя диаметром от 0,1 до 100мкм и плотностью от 1 до 25г/кв.см, а внедрение проводят посредством подачи связанного материала к клеткам с потоком газа объемом от 1 до 100мл и молекулярным весом от 2 до 40ат.ед. под давлением 15 - 150атм, обеспечивающим ускорение со скоростью, достаточной для проникновения внедряемого материала внутрь клетки.

Следует учитывать, что изобретение может использоваться для ускорения самых разнообразных материалов, хотя создано оно конкретно для ускорения суспензии биологического материала.

Используемый биологический материал может быть как клеточным, так и неклеточным. Частицы (клетки) этого материала могут быть сравнительно небольшого размера, предпочтительно, менее одного микрона, еще более предпочтительно - менее 0,1мкм. В общем случае количество используемого биологического материала будет составлять до 5мкг, хотя конкретные количества могут варьироваться в зависимости от типа используемого клеточного материала.

Под термином "неклеточный биологический материал" подразумевается такой материал, как вирусы (вирус табачной мозаики (ТМВ), вирус мозаики цветной капусты (ВМЦК), вирус полосатости маиса (ВПМ) и т.д.), органеллы (например, митохондрии, ядра, хлоропласта или плазмиды), генетический материал (например, либо РНК, либо ДНК или в форме плазмид, или одонитевой, или двухнитевой), протеины (антитела или ферменты) или красители.

Когда в качестве неклеточного биологического материала используют ДНК, то ДНК может встраиваться в вектор, приспособленный для экспрессии экзогенного гена в клетках. Соответствующие векторы трансформации включают векторы экспрессии.

Векторы, пригодные для экспрессии, в общем случае должны включать, помимо кодирующей последовательности необходимого экзогенного гена, соответствующие боковые регулирующие последовательности. Такие боковые последовательности включают соответствующий промотор, способный промотировать транскрипцию и экспрессию "ин-виво" в клетках, а также терминатор трансляции, способный сообщать о конце транскрипции или обеспечивать соответствующую обработку РНК таким образом, чтобы осуществлялась соответствующая трансляция информационной РНК для синтеза протеина.

Когда ДНК-инсерт вставляют в живую клетку, в предпочтительном варианте на отдельной стадии просеивают потомство, чтобы отобрать трансформированные клетки, так как не все клетки будут иметь инсерты, и не все

клетки или потомство будут принимать ДНК-инсерт в свой геном. Наличие целевого ДНК-инсера в клетках может быть затем установлено при помощи самых разнообразных приемов, в зависимости от природы ДНК.

Вектор трансформации может содержать маркер, позволяющий проводить отбор трансформированных клеток. Селекционный маркер может содержать либо признак, который можно определить биохимически, либо фенотипный признак, который устанавливается визуально.

Альтернативой использованию таких маркеров могут быть соответствующие морфологические или биохимические испытания для выявления трансформированного потомства. Морфологическое просеивающее испытание может быть проведено для основного фенотипного признака в потомстве. Соответствующим биохимическим методом селекции является блоттинг по Саузерну с зондом, гибридизирующимся с самой трансформирующей ДНК в геноме микроорганизма, растительных или животных клетках.

Присутствие гена, который продуцирует экзогенный продукт, может также обнаруживаться путем выделения и лизиса клетки и анализа их цитоплазмы на экзогенный продукт, или анализа их ядер на экзогенный ген. Экзогенный продукт может быть обнаружен при помощи электрофореза, хроматографии, иммуноанализа, блоттингом по Саузерну и т.п.

Под термином "клеточный биологический материал" подразумеваются отдельные или многоклеточные массы клеточных микроорганизмов, растительных или животных клеток.

В настоящем описании выражение "клеточные микроорганизмы" включает бактерии и простейшие.

В настоящем описании выражение "растительные клетки" включает клетки, которые являются интактными в растении, или части растения, такие как, например, цветы, зерна, колосья, орехи, листья, шелуха, стебли, растительные клеточные или тканевые культуры, которые содержат или не содержат клеточные оболочки или другие естественные защитные покрытия, например, протопласты, растительные наплывы, растительные ткани побегов или стволов, субклеточные структуры, зерна пыльцы, растительные меристемы, яйцеклетки, зиготы, семена, способные к прорастанию.

Растительные клетки могут быть получены из любых растительных видов. Термин "растительный вид" включает однодольные растения (например, травы и злаковые сельскохозяйственные культуры, такие как маис, рожь, ячмень, пшеница, сорго, овес, просо и рис), и двудольные растения (например, широколиственные растения, такие как табак, картофель и люцерна).

Как используется здесь, термин "животные клетки" включает ткани млекопитающих, рыбы, птицы, рептилий и амфибий.

Биологический материал может быть адсорбирован на поверхности несущей частицы при помощи самых разнообразных приемов. Например, биологический материал может быть получен при помощи простой сушки на соответствующих несущих частицах, как описано ниже.

Несущие частицы должны иметь размеры, форму и плотность, достаточные для проникновения через клеточную мембрану и/или клеточную оболочку, не нанося существенного физического ущерба самой клетке. Несущие частицы, которые являются слишком малыми или недостаточно плотными, могут оказаться неспособными к проникновению в некоторые клетки, в то время как несущие частицы, которые являются слишком большими или слишком плотными, могут оказаться губительными для других. Факторы, отличные от размера частиц, такие как присутствие клеточной оболочки или избыток внутриклеточных ядер, могут также влиять на зависимость эффективности трансформации от выбранных размеров или плотности "снарядов".

В общем случае несущие частицы имеют диаметр 0,1 - 100 мкм, в предпочтительном варианте - 0,5 - 5 мкм. В общем случае несущие частицы имеют плотность в области от 1 до 25 г/см³, в предпочтительном варианте - 1 - 25 г/см³.

Несущие частицы могут быть изготовлены из биологически инертного плотного материала. Такие примеры материалов включают некоторые металлы, например вольфрам, золото, платину, палладий, серебро и никель, латекс, стекло, керамику, хирургические сплавы и кристаллы феррита.

В соответствии с другим вариантом выполнения несущие материалы могут быть биологическими материалами, заключенными в инертные материалы. Примерами образующих капсулу агентов является полилизин (молекулярный вес 200000). Агент, образующий капсулу, наносит на частицы при помощи увлажнения частиц раствором такого агента, а затем сушки воздухом или нагревания таким образом покрытых частиц. После того как несущие частицы покрыты агентом, образующим капсулу, и соответствующим образом высушены, затем частицы носителя могут быть нагружены биологическим материалом. В качестве альтернативы заключение в капсулу биологического материала может быть осуществлено вместе с осаждением материала на частицы.

Кроме того, клеточный биологический материал (прокариотный или эукариотный) может быть заморожен, суспендирован в несущей среде и использован в качестве снарядов для ускорения непосредственно в субстанцию-мишень.

Любая среда, которая не представляет опасности для внедряемого биологического материала, пригодна для использования в качестве носителя.

Биологический материал может быть культивирован в любой среде, пригодной поддерживать метаболизм и рост субстанций и/или клеток. Примеры культур приведены у Мурашига и Скуга (1962) (*Physiol. Plantarum*. - Т.15 - С.473 - 496) и Шенка и Хилдебрандта (1972) (*Canadian Journal of Botany*. - Т.50 - С.199 - 204).

Несущую среду необходимо выбирать так, чтобы она имела достаточную текучесть для переноса несущих частиц внутри нее. Текучесть несущей среды зависит от плотности, поверхностного натяжения, эффективного объема и вязкости внедряемого материала. В предпочтительном варианте несущая среда должна быть способной суспендировать клеточный или неклеточный биологический материал и, необязательно, несущие частицы.

В общем случае несущая среда должна иметь плотность, которая эффективна с точки зрения поддержания частиц внутри себя, когда она движется. В предпочтительном варианте плотность несущей среды должна содержаться в области от 0,5 до 2,0 г/см³.

В общем случае несущая среда должна иметь поверхностное натяжение, которое эффективно с точки зрения поддержания своего когезионного внедряемого объема. В предпочтительном варианте поверхностное натяжение

несущей среды должно изменяться в области от 20 до 80дин/см.

В общем случае несущая среда должна иметь объем, который эффективен с точки зрения суспендирования необходимого количества несущих частиц. В предпочтительном варианте объем несущей среды должен изменяться от 0,5 до 1000мкл.

В общем случае несущая среда должна иметь вязкость, которая эффективна с точки зрения поддержания когезионного внедряемого объема и суспендирования частиц. В предпочтительном варианте вязкость несущей среды должна изменяться в области от 0,1 до 10сПз, в самом предпочтительном варианте - от 0,5 до 2сПз.

Примеры несущих сред включают жидкости, такие как вода, этанол; буферные растворы, включая фосфатные, цитратные и ацетатные буферы; растворы солей, включая хлориды калия, натрия и кальция; гликоли, глицерины и фторированные углеводороды; и жидкий азот, когда клеточный или неклеточный биологический материал заморожен.

Соответствующая субстанция-мишень может быть клеточным биологическим материалом; или неклеточным биологическим материалом, каждый из которых описан выше. Биологический материал может быть культивирован/внесен в любую среду, способную поддерживать биологический материал во время удара микрочастиц.

На клетки может быть нанесен слой масла, чтобы регулировать гидравлическое давление среды и улучшить живучесть клеток, способствуя закрытию повреждения, возникающего во время проникновения. Например, живые клетки могут быть промыты в изотонном растворе с тем, чтобы поддержать в момент прокалывания мембраны баланс осмотического давления внутриклеточной субстанции внеклеточного раствора в зоне "прокола" мембраны клетки. Здесь могут присутствовать ионы кальция в качестве стабилизирующего мембрану агента так, что поврежденная часть мембраны может быть быстро восстановлена. Примеры изотонных растворов включают растворы, которые в общем случае используют в различных приемах микроинъекций в растительные клетки, раствор Рингера для клеток холоднокровных животных, простейших и микроорганизмов, растворы Рингера - Лока, Рингера - Тирода и другие растворы для клеток животных.

Бомбардировка субстанции-мишени может приводить к тому, что часть пробы теряется из-за рассеяния при соударении внедряемого материала и субстанции-мишени. Примеры удерживающих средств для удерживания субстанции-мишени на месте включает фильтрующую бумагу, среду агара, металлические сита и клетки из металлических сеток. Например, последующие инкубирование и окрашивание клеточного биологического материала может быть осуществлено непосредственно на фильтрующей бумаге. В соответствии с другим вариантом выполнения, как субстанция-мишень, так и внедряемый материал могут быть помещены в раствор, а затем их можно бомбардировать непокрытыми несущими частицами, которые суспендированы в несущей среде. Такие несущие частицы могут притягивать к себе заданный объем внешнего раствора, содержащего неклеточный биологический материал в клеточном биологическом материале.

Устройство, являющееся предметом настоящего изобретения, может иметь любую соответствующую конструкцию, позволяющую заранее определенному выбранному объему газа, имеющему выбранное давление газа, контактировать и ускорять заранее определенное количество внедряемого в клетку материала в направлении выбранной субстанции-мишени.

На фиг.1 схематически изображено устройство; на фиг.2 - схема клапана, используемого с устройством на фиг.1; на фиг.3 - схема варианта выполнения источника газа под давлением для использования с устройством по изобретению; на фиг.4 и 5 - варианты выполнения резервуара для внедряемого материала, используемого с устройством на фиг.1 по изобретению; на фиг.6 и 7 - варианты выполнения средства подачи внедряемого материала с трубкой макроприцеливания; на фиг.8 - схематическое представление варианта выполнения средства измерения скорости для использования с устройством по изобретению; на фиг.9 - схема синхронизирующего средства для использования с устройством по изобретению; на фиг.10 и 11 - электрические схемы для средства измерения скорости на фиг.6; на фиг.12 - график необработанных данных, использованных для измерения времени полета внедряемого материала при помощи электрической схемы, описанной ниже в параграфе "Примеры".

На фиг.1 схематически изображено устройство 1, которое содержит многоцелевой клапан 2, источник газа под давлением 3, источник 4 подлежащего внедрению в клетку материала, резервуар 5 для внедряемого материала, имеющий входное и выходное отверстие, средство подачи и средство для извлечения 7.

Многоцелевой клапан 2 выбирают таким образом, чтобы он имел конструкцию, допускающую возможность селективной связи между либо источником под давлением 3, либо, необязательно, источником 4 внедряемого материала и резервуаром 5 для внедряемого материала. Многоцелевой клапан 2 также выбирают так, чтобы он имел конструкцию, способную обеспечить селективную связь между резервуаром 5 для внедряемого в клетку материала, и либо средством подачи 6, либо необязательно, средством для извлечения 7.

Как показано на фиг.2, одно из осуществлений многоцелевого клапана 2 может содержать первый подклапан 8 и второй подклапан 9. Первый подклапан 8 обеспечивает селективную связь между либо выходным отверстием источника газа под давлением 3, либо выходным отверстием источника 4 внедряемого в клетку материала, и входным отверстием резервуара 5 для внедряемого материала. Второй подклапан 9 обеспечивает селективную связь между выходным отверстием резервуара 5 для внедряемого в клетку материала и либо входным отверстием средства подачи 6, либо входным отверстием средства 7 для извлечения.

Примерами выполнения первого подклапана 8 и второго подклапана 9 могут быть отдельно один трехканальный клапан или два двухканальных клапана при условии, что двухканальные клапаны могут находиться в оперативной взаимосвязи через соответствующее средство. Примеры средств для поддержания двухканальных клапанов в оперативной связи включают общий привод 10 или отдельные приводы (не показаны).

Приводы первого 8 и второй 9 подклапанов выбирают таким образом, чтобы обеспечить переключение подач под давлением на клапан. В общем случае, любой привод, способный осуществить линейное или вращательное движение, можно использовать. Примеры приводов включают пневматическое средство двойного действия, функционирующее при помощи зубчато-шестеренной передачи. Когда используют различные приводы, эти приводы могут быть синхронизированы при помощи средства типа таймера (не показан). Примеры таймерных

средств включают многополюсные переключатели в комбинации с вспомогательными соленоидами или общими, приводящими в движение, валами.

В предпочтительном варианте, приводы находятся в оперативной комбинации с ножной педалью (не показана), что упрощает функционирование и увеличивает производительность устройства.

В общем случае, резервуар 5 для внедряемого в клетку материала может быть выбран из любого количества контейнеров, таких как трубы. Резервуар 5 для внедряемого материала может в предпочтительном варианте иметь внутреннюю поверхность, выбранную с тем, чтобы установить внутреннее пространство с относительным удлинением, достаточным для того, чтобы обеспечить равномерное впрыскивание внедряемого в клетку материала и обеспечить минимальное замедление, т.е. такое, которое прилипает или смачивает внутренние стенки резервуара 5 для внедряемого в клетку материала. Примеры резервуара 5 для внедряемого материала способны удерживать от 0,005мл до 100мл внедряемого материала.

В общем случае резервуар 5 для внедряемого материала изготавливают из материала, физически достаточно прочного для загрузки внедряемого материала из источника 4 внедряемого материала и/или газа из источника газа под давлением 3 без физических деформаций. В предпочтительном варианте резервуар 5 для внедряемого в клетку материала может быть изготовлен из материала, способного выдержать давление по меньшей мере 1000фт/кв.дм (70,3кг/см) при физиологических температурах. Примером материала, который используют при изготовлении резервуара 5, является нержавеющая сталь.

Как можно видеть на фиг.2, температуру внутри резервуара 5 можно регулировать при помощи средства для регулирования температуры 11. Примеры средств для регулирования температуры включают термодары, установленные в нагревательном блоке, окружающем резервуар 5 для внедряемого материала.

Хотя схемы, показанные на фиг.1 и 2, демонстрируют использование только одного источника внедряемого материала, принципы, изложенные при описании работы устройства 1, могут быть легко применены к случаю использования двух или более типов внедряемого материала из нескольких источников внедряемого материала.

В общем случае объем внедряемого материала можно регулировать при помощи любого средства, которое обеспечивает измеримые, воспроизводимые пробы внедряемого материала. Если используют трубку или что-либо подобное, то трубка, способная удерживать один объем, может быть заменена на другую трубку, способную удерживать другой объем. Однако вышеупомянутое устройство не ограничивается таким образом. Например, датчик уровня (не, показан) может быть установлен в любом месте, эффективном с точки зрения обеспечения точных воспроизводимых измерений объема иметь возможность обеспечить выбранный объем внедряемого материала в резервуаре 5 для внедряемого материала. Примеры средств 18 регулирования внедряемого материала включают клапаны и насосы.

Как было указано ранее, примеры вариантов осуществления источника 4 внедряемого материала приведены на фиг.4 и 5. Эти варианты показывают источники 4 внедряемого в клетки материала, способные выдавать заданный объем внедряемого материала.

В соответствии с одним из вариантов осуществления, как это показано на фиг.4, источник 4 внедряемого материала содержит средство 17 подачи внедряемого материала в форме шприца 17а, имеющего выходное отверстие, и трубопровод 19 для подачи внедряемого материала, имеющий входное и выходное отверстие. Выходное отверстие шприца 17а находится в селективной жидкостной связи с входным отверстием трубопровода 19 для подачи внедряемого материала. Выходное отверстие трубопровода 19 для подачи внедряемого материала находится в свою очередь в жидкостной связи с входным отверстием многоцелевого клапана 2, ведущим к резервуару 5 для внедряемого материала.

В соответствии с еще одним вариантом выполнения, как это можно видеть на фиг.5, источник внедряемого в клетку материала содержит средство 17 для подачи внедряемого материала в форме емкости 17б для подачи внедряемого материала, имеющей выходное отверстие, средство 18 для регулирования внедряемого материала в форме клапана для внедряемого материала 18а, и трубопровод 19 для подачи внедряемого материала, имеющий входное и выходное отверстие. Выходное отверстие из емкости 17б находится в селективной жидкостной связи через клапан 18 для внедряемого материала с входным отверстием трубопровода 19 для подачи внедряемого материала. Выходное отверстие трубопровода 19 для подачи внедряемого материала, в свою очередь, находится в связи с входным отверстием клапана 2, ведущим к резервуару 5 для внедряемого материала.

В зависимости от времени, в течение которого внедряемый материал выдерживают в емкости 17б подачи внедряемого материала, емкость 17б для подачи внедряемого материала может находиться в оперативной комбинации со средством 11 для регулирования температуры, как это показано в альтернативном осуществлении на фиг.5, чтобы поддержать внедряемый материал при заданной температуре. Примеры средств регулирования температуры включают термодары 11, вставленные в блок нагревания, окружающий емкость 17б для подачи внедряемого материала.

В зависимости от относительной вязкости несущей среды емкость 17б для подачи внедряемого материала может находиться в оперативной комбинации со средством 20 для перемешивания, чтобы поддержать частицы в суспензии в несущей среде. Примеры средств 20 для перемешивания включают насосы типа шприца с возвратно-поступательным ходом поршня, пластину для магнитного перемешивания, клапанно-насосную конструкцию, создающую изменяющиеся направления потока внутри емкости 17б для подачи внедряемой жидкости. В предпочтительном варианте, средство 20 для перемешивания выбирают таким образом, чтобы обеспечить изменяющиеся направления потока внутри резервуара 5 для внедряемого материала, например, насос типа шприца с возвратно-поступательным ходом поршня.

Как можно видеть на фиг.1 и 2, выходное отверстие резервуара 5 для внедряемого материала может находиться в селективной связи через многоцелевой клапан 2 с входным отверстием средства 7 для извлечения.

Средство 7 для извлечения дает возможность сбить избыточный внедряемый материал из резервуара 5. Средство 7 включает любое средство для отбора внедряемого материала. Предпочтительно средство 7 представляет собой закрываемую трубку, из которой можно извлечь материал. Такая конструкция позволяет, кроме того, создать открытую систему, в которой средство 7 для перемешивания, например, шприц-насос с

возвратно-поступательным ходом поршня может быть селективно подключен таким образом, чтобы обеспечить изменяющиеся направления потока внутри резервуара 5 для внедряемого материала.

Средство 7 для извлечения может быть изготовлено из любого материала, который способен удерживать и не наносить какого-либо ущерба внедряемому материалу. В предпочтительном варианте, чтобы избежать значительного перелива соответствующего внедряемого материала из резервуара для внедряемого материала, средство 7 для извлечения может быть изготовлено из прозрачного материала, чтобы иметь возможность легко измерить содержание в нем материала. Примеры материалов, способных обеспечить визуальную проверку перелива, включают политетрафторэтилен (ПТФЭ).

Средства доставки.

Как можно видеть на фиг.1, 2 и 9, выходное отверстие резервуара 5 для внедряемого материала может находиться в селективной связи через многоцелевой клапан 2 с входным отверстием средства доставки 6.

Средство для доставки 6, в частности, показанное на фиг.6 и 7, обеспечивает относительно точное "наведение на цель" внедряемого в клетку материала. Средство 6 может содержать средство 21 для макроприцеливания и/или средство 22 для микроприцеливания. Ввиду сопротивления внедряемого материала, поступающего из резервуара 5 для внедряемого материала (показано на фиг.1 и 2), в предпочтительном варианте, если средство 6 для высвобождения содержит средство микроприцеливания 22, оно также содержит средство для макроприцеливания.

Как можно видеть на фиг.6, средство для макроприцеливания 21, в свою очередь, находится в жидкостной связи со средством для микроприцеливания 22.

В общем случае средство для макроприцеливания 21 выбирают таким образом, чтобы оно имело внутреннюю поверхность, которая определяет канал с длиной, геометрией и диаметром, достаточными для того, чтобы предотвратить существенное снижение ускорения внедряемого материала из-за газа, обходящего внедряемый материал. В предпочтительном варианте средством для макроприцеливания 21 является трубка, выбранная таким образом, чтобы она имела внутреннюю поверхность, определяющую в общем случае цилиндрический канал с внутренним диаметром в области от 500 до 2000 мкм, в предпочтительном варианте - от 750 до примерно 1250 мкм.

Средство для макроприцеливания 21 может быть изготовлено из любого материала, способного поддерживать свою форму при условиях доставки. Примеры материалов включают стекло, пластик и нержавеющую сталь.

Если средство доставки состоит только из средства для макроприцеливания 21, оно может быть использовано для ускорения внедряемого материала в так называемом режиме стрельбы из "дробовика". Если средство для доставки содержит средство для микроприцеливания 22, то оно обеспечивает относительно более точное прицеливание для внедряемого материала.

В соответствии с первым вариантом осуществления, как это можно видеть на фиг.6, средство для микроприцеливания 22 содержит пипетку 23, которая находится в жидкостной связи со средством для макроприцеливания 21, микроинструмент 24 расположен в захвате 25, жестко соединенном с подвижным средством 26 микроманипулятора 27 с тремя степенями свободы. Микроманипулятор 27 может содержать ручку управления (не показана), которая регулирует положение пипетки 23.

Пипетку 23 необходимо выбирать таким образом, чтобы она имела внутренний диаметр с просветом достаточного размера для прохода внедряемого материала. Внутренний диаметр пипетки в общем случае изменяется от примерно 10 до примерно 500 мкм, в предпочтительном варианте от примерно 100 до примерно 250 мкм. Пипетки получают известным способом из капиллярной трубки в соответствии с хорошо известными приемами (смотри, в общем случае, Graessman и др. (1980), *Methods in Enzymology*, 65 : 816 - 825).

Примеры средств 22 для микроприцеливания предпочтительно сконструировать из известных устройств для микроинъекций, которые после изучения настоящего описания могут быть очень легко модифицированы, чтобы получить средство для микроприцеливания, необходимое специалисту.

Известные средства и приемы для микроинъекций изложены в следующих публикациях: Патент №4743548; Jamamoto et al. (1982), *Exp. Cell Res.*, 142 : 79 - 84, Purres (1981), *Methods for Intracellular Recording* Jonoporesis; Ocho et al. (1981), *Acta Med*, Okayama 35 : 381 - 384, Lawrence and Davies (1985), *Plant Cell Rep.* 4 : 33 - 35, Steinbiss, et al. (1984), In: *Proceedings of the 1984 Wye International Symposium, Experimental Manipulation of Ovule Tissue: Theur Micromanipulation, Tissue Culture and Physiology*, Steinbiss and Stabel (1983), *Protoplasma*, 116 : 223 - 227, Morikawa and Yamade (1981), *Plant Cell Physiol*, 26 : 229 - 236, Grassman, et al. (1980) In: *Methods in Enzymology*, 65 : 816 - 825, and Zin and Ruddle (1981), *Exp. Cell Res.*, 134 : 485 - 488.

Кроме того, несмотря на возможность визуального наблюдения, средство доставки в предпочтительном варианте содержит средство для наблюдения 28. Средство для наблюдения должно обеспечивать увеличение, эффективное с точки зрения фокусировки на субстанцию-мишень, в предпочтительном варианте от 10X до 200X. Примеры средств наблюдений включают разборные микроскопы и бороскопы.

В соответствии со вторым вариантом осуществления, как это показано на фиг.7, средство для прицеливания 22 содержит пипетку 23 в оперативной комбинации со средством наблюдения 28.

Как можно видеть на фиг.1, 6, 7, 9, выходное отверстие средства доставки открыто со стороны зоны выталкивания 29, в которую может быть помещена субстанция-мишень.

Субстанция-мишень может быть помещена на соответствующую платформу. Например, можно использовать чашку Петри 30, которая содержит субстанцию-мишень. Чтобы способствовать прицеливанию средства доставки 21, субстанция-мишень может быть в предпочтительном варианте помещена на площадку 31, сдвигающуюся по плоскости X-Y.

В предпочтительном варианте зону выталкивания 29 регулируют извне. В общем случае, зону выталкивания можно ограничить камерой.

Например, в зоне выталкивания может быть создан вакуум. Степень вакуума должна быть достаточной для того, чтобы избежать снижения скорости частиц из-за торможения, вызванного сопротивлением воздуха, и предотвратить отскакивание внедряемого материала. В предпочтительном варианте степень вакуума в зоне

выталкивания может изменяться от 0 до 0,5 атм.

Соответствующая, с регулируемыми условиями, камера раскрыта в каталоге "Fisher 88", Laboratory Experiment Catalog of Fisher Scientific Inc., Pittsburgh, PA.

Средство для измерения скорости.

В соответствии с еще одним вариантом выполнения, устройство 1 содержит средство для измерения скорости 32, как это можно видеть на фиг.1, 8, 9. В качестве средства для измерения скорости внедряемого материала пригодно для использования любое средство, способное фиксировать скорость материала.

В общем случае, средство для измерения скорости может быть размещено в любом месте, из которого можно воспроизводимо измерять скорость ускоряемого материала. В предпочтительном варианте средство для измерения скорости 32 может быть помещено на средстве доставки 6.

Как можно видеть на фиг.8, одно из средств для измерения скорости 32 содержит первый датчик скорости 33 и второй датчик скорости 34, вышеупомянутые датчики установлены в последовательных точках вдоль средства доставки 6.

Первый датчик скорости 33 содержит излучающее средство 35 и чувствительный элемент 36. Второй датчик скорости 34 содержит излучающее средство 37 и чувствительный элемент 38.

Примеры средств излучения 35 и 37 включают инфракрасные эмиттеры, такие как диоды-эмиттеры инфракрасного света (ДЭС) или другие аналогичные источники света. Если схема включения излучателя содержит инфракрасные излучатели, средство доставки в предпочтительном варианте изготавливают из прозрачного материала, такого как стекло или прозрачный пластик.

Примеры чувствительных элементов 36 и 38 включают фотодиоды, фототранзисторы или фотоэлектрические ячейки.

В общем случае первый и второй чувствительные элементы могут находиться в оперативной связи с многоцелевым клапаном 2 через электрическую цепь.

В общем случае цепь должна обеспечивать измерение времени полета (как можно видеть в разделе "Примеры, см. ниже, и фиг.12 между первым и вторым излучателями). В предпочтительном варианте эта цепь может обеспечивать "последовательное измерение времени", чтобы гарантировать, что все части средства для измерения скорости 32 синхронизированы с ускорением внедряемого материала. После того как электрическая цепь уже обеспечивает установку времени, эта электрическая цепь должна обеспечивать оперативную связь между средством для измерения скорости 32 и многоцелевым клапаном 2, при этом предварительно выбранный временной интервал подачи электроэнергии на многоцелевой клапан 2 обеспечивает связь между источником газа под давлением и резервуаром 5 для внедряемого материала.

Любой специалист в этой области техники может создать любое число электросхем, удовлетворяющих требованиям, перечисленным выше. Примеры электрических цепей для средств фиксации скорости, показанные на фиг.10 и 11, обсуждаются ниже.

Синхронизирующие средства.

В соответствии с еще одним вариантом выполнения, представленным на фиг.9, устройство 1 может находиться в оперативной комбинации со средством, эффективным с точки зрения синхронизации по меньшей мере некоторых элементов для загрузки и ускорения внедряемого материала. Синхронизация по меньшей мере некоторых элементов устройства служит для того, чтобы уменьшить количество стадий, которое оператор должен выполнить, последовательно снижая время, необходимое между запусками, и увеличивая производительность.

Пример выполнения средства синхронизации приведен на фиг.7. Синхронизирующее средство 39 содержит компьютер 40, находящийся в оперативной комбинации с устройством 1.

Компьютер 40 находится в связи через линию 41 с ящиком 42, содержащим серию датчиков и проводников (43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 и 51). Проводник 43 может быть связан со средством регулирования температуры 11, при этом осуществляют автоматическое регулирование температуры в емкости для подачи внедряемого материала 17б.

Второй проводник 44 может находиться в принимающей и выдающей команды связи со средством для перемешивания 20, при этом внедряемый материал перемешивают с необходимой скоростью.

Третий проводник 45 находится в выдающей команды связи со средством для регулирования внедряемого материала 18. Этот проводник 45 поддерживает источник внедряемого материала в открытом или замкнутом положении.

Четвертый проводник 46 находится в принимающей сигналы связи с третьим проводником 45 и в выдающей команды связи с многоцелевым подклапаном 8. Если источник внедряемого материала поддерживают в открытом состоянии, то многоцелевой клапан 2 обеспечивает селективную жидкостную связь между источником внедряемого материала 4 и резервуаром 5 для внедряемого материала, и селективную жидкостную связь между резервуаром 5 для внедряемого материала и средством извлечения 7.

Пятый проводник 47 находится в принимающей и выдающей команды связи со средством для регулирования температуры 52, с помощью которого регулируют температуру в резервуаре 5 для внедряемого материала.

Шестой проводник 48 находится в принимающей сигналы связи с четвертым проводником 46 и выдающей команды связи со средством для измерения скорости 32. Если выбранный объем внедряемого в клетку материала содержится в резервуаре 5 для внедряемого материала, начинается временной цикл "стрельбы" из устройства 1.

Седьмой проводник 49 находится в принимающей сигналы связи с шестым проводником 48 и газовым клапаном 15. Если гарантируется временной цикл для средства измерения скорости, средство для регулирования газа поддерживают в открытом состоянии.

Восьмой проводник 50 находится в принимающей сигналы связи с седьмым проводником 49 и многоцелевым подклапаном 9. Если источник 12 газа под давлением находится в открытом положении, многоцелевой клапан 2 обеспечивает селективную пневматическую связь между источником газа под давлением 3 через резервуар 5 для внедряемого материала и средством подачи 6.

Девятый проводник 51 находится в принимающей сигналы связи со средством для измерения скорости 32.

После того, как выбранный объем газа под давлением "выпущен" в резервуар 5 для внедряемого материала и ускоренный объем внедряемого материала проходит устройство для измерения скорости 32, наблюдают скорость внедряемого в клетку материала.

В общем случае синхронизирующим средством может быть любая система управления процессом, которая способна воспринимать данные, поступающие по различным проводникам от датчиков, и управлять устройством через различные управляющие проводники. Примеры синхронизирующих средств включают пулы микроконтроллера или систему сбора данных и управления процессом типа КАМИЛ (Торговое наименование фирмы Доу Кемикэл Компани), производимую фирмой Доу Кемикэл Компани.

Устройство работает следующим образом.

Устройство, показанное на фиг.1, работает следующим образом. Субстанцию-мишень селективно устанавливают в зоне выталкивания на заранее определенном расстоянии от средства доставки.

Если внедряемый в клетку материал или субстанция-мишень включает клеточный биологический материал, то субстанция-мишень может быть селективно установлена на расстоянии, эффективным с точки зрения обеспечения контакта с внедряемым материалом, который не является губительным для подавляющего числа клеточного биологического материала (хотя некоторые клетки могут погибать).

В общем случае субстанция-мишень может быть помещена на расстоянии от 1 см до 100 см от выходного отверстия средства доставки.

Если средство доставки содержит только средство макроприцеливания, т.е. не содержит средства микроприцеливания, то субстанцию-мишень можно расположить на расстоянии от 5 см до 20 см от выходного отверстия средства доставки. Если средство доставки содержит средство микроприцеливания, то субстанция-мишень может быть помещена на расстоянии от 1 миллиметра (мм) до 100 см от выходного отверстия средства доставки.

Устройство, как оно в общем случае представлено на фиг.1 и в некоторых частных случаях изображено на некоторых других чертежах, может функционировать следующим образом. Как можно видеть на фиг.1, 2 и 5, многоцелевой клапан 2 и средство 18 для регулирования внедряемого материала установлены так, чтобы обеспечить жидкостную связь между средствами 17 для подачи внедряемого материала и резервуаром 5 для внедряемого материала. Следовательно, у внедряемого в клетку материала имеется возможность проследить из источника внедряемого материала в резервуар 5 для внедряемого материала.

Как можно видеть на фиг.1 и 2, многоцелевой клапан 2 устанавливают, кроме того, с тем, чтобы обеспечить жидкостную связь между резервуаром 5 для внедряемого материала и средством извлечения 7. Любой объем внедряемого материала, избыточный относительно объема резервуара 5 для внедряемого материала, удаляют с помощью средства извлечения 7.

Как можно видеть на фиг.1, 2 и 3, многоцелевой клапан 2 и средство 15 для регулирования газа затем устанавливают таким образом, чтобы обеспечить пневматическую связь между средством 12 для подачи газа и резервуаром 5 для внедряемого материала. Следовательно, выбранный объем газа под давлением, достаточным для того, чтобы ускорить внедряемый материал до необходимой скорости, проходит из источника 3 газа под давлением в резервуар 5 для внедряемого в клетку материала.

Многоцелевой клапан 2, кроме того, устанавливают таким образом, чтобы обеспечить пневматическую связь между резервуаром 5 для внедряемого материала и средством подачи 6. После того как газ загружается в резервуар 5 для внедряемого материала, он воздействует на внедряемый материал, который разгоняется в средстве подачи 6, если оно имеется.

Как можно видеть на фиг.1 и 8, в средстве подачи 6 внедряемый материал будет проходить через первый датчик 33 и второй датчик 34. Первый и второй датчики 33 и 34 обеспечивают средство для измерения скорости внедряемого материала, давая возможность ускорить репродуцируемым образом внедряемый материал.

В предпочтительном варианте внедряемый в клетку материал будет ускоряться до эффективной скорости. "Эффективная" скорость будет варьироваться в зависимости от поставленной цели.

В общем случае для целей введения биологического материала в клеточный биологический материал скорость внедряемого материала должна быть эффективной, чтобы обеспечить проникновение биологического материала через клеточную мембрану и оболочку, если она присутствует. В предпочтительном варианте для таких систем внедряемый материал должен иметь скорость в точке выброса средства доставки от 200 миль/ч (322 км/ч) до 1200 миль/ч (1931 км/ч).

Как должно быть очевидным, скорость внедряемого материала зависит от многочисленных известных параметров. Такие параметры включают (но ими не исчерпывается полный список) длину и внутренний диаметр средства доставки, давление газа, свойства потока газа, свойства потока внедряемого материала, физические свойства внедряемого материала, расстояние между выходным отверстием средства доставки и субстанцией-мишенью, и объем и свойства потока среды, в которой культивируют субстанцию-мишень.

Характеристики потока, внедряемого в клетку материала, не являются особенно критичными. Так, внедряемый материал может быть ускорен поршневым потоком или турбулентным потоком. Под "поршневым потоком" подразумевается, что внедряемый материал течет как непрерывная масса, и зоны газа и внедряемого материала не могут существенно перемешиваться. Под "турбулентным потоком" подразумевается поток жидкости, в котором скорость в заданной точке изменяется беспорядочно как по величине, так и направлению, и, следовательно, имеет место некоторое перемешивание газа и внедряемого в клетку материала. Если имеет место турбулентный поток, внедряемый материал и газ будут взаимодействовать с образованием дисперсии и, следовательно, обеспечивать более широкий стебельчатый пучок внедряемого материала, когда он поступает из устройства.

Ввиду того, что газ под давлением контактирует непосредственно с внедряемым материалом и сам высвобождается в зону выталкивания, внедряемый материал, загруженный в резервуар, воспроизводимо поступает в зону выталкивания. Небольшая, но воспроизводимая доза внедряемого материала остается в средстве доставки. В основном, только внедряемый материал, который не попадает в зону выталкивания, является тем материалом, который прилипает или увлажняет внутренние стенки клапанов и средство для

выпуска. Такой внедряемый материал именуется "висячим". Количество висячего материала будет зависеть и варьироваться от вязкости конкретного внедряемого материала.

Скорость внедряемого в клетку материала измеряют, когда он проходит через средство для измерения скорости. Более конкретно, время полета между первым и вторым датчиками средства для измерения скорости, расположенного на средстве доставки, указывает на скорость внедряемого материала.

Зная воспроизводимые измерения времени полета внедряемого материала, специалист в этой области техники может отрегулировать различные параметры, которые влияют на скорость внедряемого материала. Регулируя эти параметры, специалист в этой области техники может выбрать оптимальную скорость внедряемого материала.

Необходимый объем внедряемого материала поступает из средства подачи 6 в зону выталкивания 29.

Работа завершается при помощи селективной установки многоцелевого клапана 2 с тем, чтобы блокировать поток газа из резервуара 12 для газа в резервуар 5 для внедряемого материала.

Предыдущее обсуждение предназначено для того, чтобы предоставить общую идею критерия, который имеется в виду при функционировании устройства, являющегося предметом настоящего изобретения. После того, как выше приведено подробное описание, выбор условий функционирования для каждой используемой системы будет очевидным любому специалисту в этой области техники.

Настоящее изобретение может быть использовано в различных областях биологических исследований, включая трансформацию растительных клеток, животных клеток и микроорганизмов.

Важным отличительным свойством настоящего изобретения является то, что оно позволяет осуществить обработку растительных клеток, оболочки которых являются интактными. Так как при этом может быть преодолено препятствие к регенерации полного растения из протопластов, упрощаются приемы генной инженерии для важных злаковых видов.

Двумя важными мишенями в трансформации растительных зерновых линий являются пыльца или яйцеклетки, и куполы меристемы или клетки культуры ткани (из интактных растений и зародышей или из культуры ткани). Трансформации пыльцы, яйцеклетки или куполов меристемы представляют собой возможные приемы для сельскохозяйственных культур, которые размножаются половым методом, в то время как трансформации клеток культуры ткани или куполов меристемы являются возможными приемами для сельскохозяйственных культур, размножающихся неполовым путем. Каждый из этих подходов способен продуцировать трансформированные полные растения.

Клетки культуры ткани могут быть трансформированы, а затем культивированы с тем, чтобы получить соматические зародыши или куполы меристемы, которые, в свою очередь, регенерируются в трансформированные растения.

Трансформация меристемы, например, может быть осуществлена при помощи "хирургического" вскрытия купола меристемы и бомбардировки ее несущими ДНК частицами, что позволяет трансформировать большое число, клеток меристемы. Трансформированные меристемы способны вырасти в химерные побеги, из которых выбирают стабильно трансформированные секторы.

По поводу общего обсуждения процедуры, в соответствии с которой гены вставляют в сечения незрелого зародыша, которые затем используют для регенерации растений, смотри МакГабе и др., (1988), Bio/Technology, т.6, стр.923 - 926.

Наконец, трансформация хлоропласта в *Chlamydomonas*, одноклеточной водоросли, с использованием бомбардировки микроснарядами описана также Бойнтоном и др. (1986), Science, т.240, стр.1543 - 1547. Три мутанта гена *atpb* хлоропласта культуры *Chlamydomonas reinhardtii* были трансформированы ДНК хлоропласта, содержащей ген дикого типа. В трансформированных клетках восстанавливали фотосинтетическую способность.

Генетическая трансформация небольших групп клеток в животной ткани возможна теперь с использованием способа и устройства настоящего изобретения. Такая терапия обеспечивает неинфекционный, но высокоэффективный механизм трансформации животных тканей на месте. По поводу общего обсуждения смотри Сэнфорд и др., см. выше.

Трансформация митохондрий у дрожжей при помощи бомбардировки "снарядами" описана Джонстоном и др., (1988), Science, т.240, стр.1538 - 1541. В этой работе описана трансформация невозвратного штамма дрожжей, у которых отсутствует дыхание ввиду того, что отсутствует митохондриальный ген *3 oxi*. При помощи ДНК-последовательностей, которые могут восстановить пробел *oxi 3*, были получены трансформанты, компетентные с точки зрения дыхания, которые содержали гомологическую замену дефектного гена *3 oxi*.

Метаболический путь чужеродных биополимеров, таких как РНК, протеин, липиды и органические и неорганические химические агенты, может быть проанализирован при помощи бомбардировки частицами, покрытыми этими молекулами или комбинациями молекул.

Кроме того, могут быть трансформированы изолированные субклеточные органеллы, такие как митохондрии или хлоропласты, а затем трансформированные органеллы могут быть снова вставлены в растительные клетки или протопласты.

Примеры.

Приводимые ниже примеры представлены для дальнейшей иллюстрации, и они не являются ограничивающими настоящее изобретение. Все части и проценты являются весовыми, если не указано противное.

Внедряемый материал получали следующим образом.

Несущие частицы, покрытые ДНК-содержащими плазмидами, суспендировали в несущей среде. Более конкретно, плазмиды адсорбировали на поверхность золотых частиц. Плазмида содержала ген, который кодирует фермент бета-глюкуронидазы (IVC-ген) и который контролируется промотором Вируса Калифорнийской Мозаики 35s (Ca-MV) (ген, промотор и регулирующие последовательности получали от фирмы Клонтек Лэбораториз, Инк., Пало Альто, Калифорния, США). Золотые частицы представляли собой сферический порошок с размерами от 1,5 до 3,0 микрон в диаметре (производится фирмой Альфа Продактс, Дэнверс, МА).

Чтобы осуществить адсорбцию, 50μл раствора плазмиды (1,8 микрограмм (μg) ДНК на микролитр (μl) 0,01

молярного Трис-буфера, pH 8,0 с 0,001М этилен диамин тетрауксусной кислоты (ЭДТК) добавляли в 400μл суспензии золотых несущих частиц (300 миллиграмм (мг) золотых несущих частиц на миллилитр (мл) дистиллированной воды). ДНК осаждали добавлением 74μл 2,5М раствора хлорида кальция и 30μл 0,1М раствора спермидина. Покрытым несущим частицам давали возможность отстояться и выпасть на дно пробирки Эппендорфа, а полученную после этого прозрачную жидкость полностью сбрасывали. Несущие частицы снова суспендировали в 500μл этанола (100%) (несущую среду). Одну несущую частицу покрывали приблизительно 10 копиями плазмиды.

Субстанцию-мишень получали следующим образом. Брали суспензионные культуры клеток гороха (черный Мексиканский сладкий (ЧМС), полученные от профессора Вирджинии Уолбот (Стэнфордский университет). ЧМС описан Шериданом (1975), J. Cell Biol., т.67, стр.3969. Эти культуры известным образом поддерживали в жидкой среде Мурашига и Скуга (МС) (Physiol. Plantanim, 1962, т.15, стр.473 - 496), дополненной 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (2мг/литр).

При подготовке бомбардировки несущими частицами собирали пробы в 100мг клеток из суспензии на 7см фильтровальной бумаге типа Ватман N 1 при помощи вакуумной фильтрации на воронке Бухнера. Фильтровальную бумагу с клетками помещали в 9см чашку Петри 59а, которая содержит МС-среду, описанную выше, в твердой форме.

Устройство, используемое для ускорения покрытых золотых частиц в клетки ЧМС-гороха, состояло из следующих элементов, которые ранее были описаны на фиг.1, 2, 3, 4:

1. Газовый цилиндр размером 1А (т.е. средство для подачи газа 12), заполненный газообразным гелием, находился в жидкостной связи с капиллярной трубкой из нержавеющей стали, имеющей размеры 7' × 0,02" внутренний диаметр (т.е. линия подачи газа 14). Эта линия подачи газа находилась в оперативной комбинации со стандартным двухстадийным клапаном для регулирования давления, производимым фирмой Виктор Эквипмент Ко (т.е. клапаном 15, регулирующим подачу газа). Линия подачи газа, в свою очередь, находилась в связи с газовой камерой из нержавеющей стали высокого давления, имеющей размеры 1/8" (внешний диаметр) × 3" длина (т.к. емкостью 16 для газа).

2. Стерильный шприц Луер Лок емкостью 3 кубических сантиметра (см³) (средство 17а для подачи внедряемого материала) находился в жидкостной связи с ФЭП трубкой из Тefлона 1/10" (торговое наименование фирмы Е.И. Дюпон де Немюрз Ко., Уилмингтон, ДЕ) (т.е. трубопровод для подачи внедряемого материала). Эта трубка находилась в оперативной комбинации с 3-позиционным клапаном Редлайн Модели 7030 (т.е. многоцелевым клапаном 2).

3. Прозрачная трубка ФЭП, 1/10" - внешний диаметр (т.е. средство извлечения 7).

4. Трубка из стекла пирекс, имеющая размеры 10см × 1,2мм - внешний диаметр × 0,8мм - внутренний диаметр (т.е. средство доставки 6).

5. Средство для измерения скорости, состоящее из двух датчиков, последовательно расположенных относительно друг друга на средстве доставки 6. Каждый датчик (т.е. первый датчик 33 и второй датчик 34) содержал фотодиод и инфракрасный эмиттер. Фотодиоды производятся фирмой Моторола Семикондактор Продактс, Инк. (Фоеникс, АЗ, США) под торговым наименованием МРД500, а инфракрасные эмиттеры производятся фирмой Джeneral Электрик под торговым наименованием ЛЕД55с.

Первый и второй датчики 33 и 34 находились в оперативной комбинации через электрическую цепь, имеющую схему, приведенную на фиг.10 и 11.

Ниже приведено подробное объяснение фиг.10 и 11, на которых представлена оперативная комбинация между средством для измерения скорости 32 и многоцелевым клапаном 2.

Блок 53 обеспечивает последовательный отсчет времени, чтобы гарантировать, что после нажатия средства приведения в действие (т.е. "гашетки" 54), все другие части цепи уже подготовлены для начала временного цикла. Блок 53 посылает сигнал 55 одновременно в обход через блок 56 (получаемый, как сигнал 57), и далее в виде сигнала 58, необходимого блоку 59, чтобы остановился таймер, и сигнал 55, поступающий непосредственно к блоку 60 (в виде сигнала 57), чтобы возвратиться в исходное положение узел 61, чтобы он принимал только один стартовый сигнал 62 и очищал блок отсчета времени 63 до нуля. "Обходной" сигнал обеспечивается для того, чтобы гарантировать остановку таймера в случае, если оптика второго датчика 34 (изображенного как средство излучения 37 и чувствительный элемент 38) не зарегистрировала прохождение внедряемого в клетку материала. Далее, блок 53 подает сигнал 64, чтобы инициировать запуск таймера (т.е. 65 на фиг.10 в блоке 66).

Блок 66 принимает сигнал 64 от блока 53 и затем обеспечивает заранее выбранный интервал через реле твердого состояния (т.е. на фиг.10), приводя в действие 4-позиционный клапан (т.е. 68 на фиг.10), который посылает выбранный объем воздуха под давлением в пневматический привод (не показан) на многоцелевом клапане 2. Этот задействованный клапан 2 предназначен для того, чтобы обеспечить связь между источником газа под давлением и резервуаром 5 для внедряемого материала.

Блок 69 принимает сигнал 70, выработанный внедряемым материалом, проходящим между средством излучения и чувствительным элементом первого датчика скорости 33 (как это изображено в виде средства излучения 35 и чувствительного элемента 36), обрабатывает этот сигнал и продуцирует сигнал на резкий подъем напряжения, соответствующий по времени снижению напряжения сигнала 70, т.е. сигнала "старт" 62, способного запустить таймер (блок 63 на фиг.11).

Блок 56 принимает сигнал 71, выработанный внедряемым материалом, проходящим между комбинацией средства излучения и чувствительного элемента второго датчика скорости 34, и продуцирует сигнал резкого подъема напряжения, соответствующий по времени снижению напряжения сигнала 71 (т.е. сигнала "стоп" 58, способного остановить таймер (блок 63 на фиг.11)).

Блок 59 принимает сигнал "старт" 62 от блока 69, сигнал "стоп" 58 от блока 56, а блок 60 принимает сигнал 57 "очистка таймера" от последовательного блока 53, и поддерживает статус таймера, т.е. допускает только один временной цикл на один цикл доставки внедряемого материала. Блок 59 вырабатывает сигнал 72, который поступает в блок 63.

Блок 63 содержит стабилизированный кварцевым кристаллом таймер, содержащий цепь 73, обеспечивающую

часы, и цифровой счетчик 74. Блок 75 содержит мультиплексный декодер десятичных чисел в двоичном коде (ДДК) в семь сегментов на дисплее (т.е. 76 на фиг.11) и дисплей ЛЭД (77 на фиг.11). Блок 75 таким образом указывает время полета самого последнего внедряемого в клетку материала.

Цифровой счетчик 74 принимает сигналы состояния таймера 57 и 72 от блока 61. Такими сигналами таймера являются "таймер запущен" (т.е. 72) и "таймер очищен" (т.е. 57). Если сигналом запуска таймера был 0 вольт, то блок таймера отсчитывает микросекунды от нуля. Если сигналом запуска таймера было 12 вольт, то таймер останавливается и сохраняет последний отсчет. Если сигналом очистки таймера было 0 вольт, то таймер запускается. Если сигналом очистки таймера было 12 вольт, то таймер очищается в нуль. Дисплейный блок 77 принимает ДДК-числовые сигналы от блока 63 и, таким образом, показывает самое последнее время пролета внедряемого материала в микросекундах на передней панели дисплея.

Хотя была приведена вполне конкретная цепь, самые разнообразные цепи могут обеспечивать тот же результат.

6. Двойственный трехпозиционный клапан (многоцелевой клапан 2), содержащий два подклапана (подклапаны 8 и 9), производится фирмой Реодайн, Инк., Котати, КА под торговым наименованием модель 7030 ARY. Подклапаны двойственного трехпозиционного клапана 2 находятся в оперативной комбинации с пневматическим приводом, набор инструментов # 41687, производимым фирмой Анспек Ко., Анн Арбор, МИ. Пневматический привод приводится в движение воздухом, подаваемым из четырехпозиционного соленоидного клапана, производимого фирмой Отоматик Свитч Компани (АСКО), Флорэм Парк, Нью Джерси.

7. Внешняя петля 5, изготовленная из нержавеющей стали, 1/16" - внешний диаметр (резервуар для внедряемого материала), находится в оперативной комбинации с первым и вторым трехканальными клапанами.

Первый трехканальный клапан обеспечивает селективную жидкостную связь между средством для подачи внедряемого материала или резервуаром для газа и резервуаром для внедряемого материала.

Второй трехканальный клапан обеспечивает селективную жидкостную связь между резервуаром для внедряемого материала и средством извлечения или средством доставки.

Многоцелевой клапан первоначально устанавливали с тем, чтобы обеспечить жидкостную связь между шприцем и внедряемым материалом и заблокировать пневматическую связь между резервуаром для газа и резервуаром для внедряемого материала.

Шприц, который способен доставлять 1мл внедряемого материала (суспензии несущей среды и покрытых частиц), помещали в жидкостную связь с трубопроводом для подачи внедряемого материала. Трубопровод для подачи внедряемого материала находился в жидкостной связи с резервуаром для внедряемого материала.

Клапан 18 для регулирования внедряемого материала открывали с тем, чтобы обеспечить жидкостную связь между средством для подачи внедряемого материала и резервуаром для внедряемого материала. После того, как выбранный объем внедряемого материала выпущен в резервуар для внедряемого материала, клапан для внедряемого материала закрывали.

Любой объем внедряемого материала, избыточный относительно объема резервуара для внедряемого материала, удаляли через средство извлечения.

Клапан 15 для регулирования газа открывали для того, чтобы обеспечить пневматическую связь между средством для подачи газа и резервуаром для газа. В резервуаре для газа получали давление в примерно 1000 фунтов на кв.дюйм ($70,3 \text{ кг/см}^2$). Затем клапан, регулирующий подачу газа, закрывали.

Остальную часть работы регулировали через цепь, изображенную на фиг.10 и 11. Цепь работает следующим образом.

После того, как нажимали на "гашетку" 54, блок 53 вырабатывал временную последовательность в 0,05 секунды, чтобы остановить цифровой таймер блока 63. Блок 61 сохраняет состояние блока 63, т.е., если в результате ошибки цифровой таймер по-прежнему отсчитывает время после предыдущего запуска устройства, то цифровой таймер очищается в нуль при подготовке следующего временного цикла. После того, как цифровой таймер останавливался, положение таймера блока 61 устанавливалось так, чтобы он принимал только один стартовый сигнал от блока 69.

Далее, запускали блок 66 таймера интервалов. Блок 66 таймера интервалом подавал текущий временной интервал в 0,8с в 120В переменного тока, чтобы задействовать клапан 68, подающий воздух под давлением от 65 до 75 фунтов на кв.дюйм (от 4,57 до $5,27 \text{ кг/см}^2$), чтобы привести в движение пневматический привод (не показан) на многоцелевом клапане 2, чтобы установить многоцелевой клапан в положение, обеспечивающее селективную связь между источником газа и резервуаром для внедряемого материала, что приводило к ускорению газа под давлением и внедряемого материала после первого и второго датчиков.

Когда передний фронт внедряемого материала проходил через первый датчик средства для измерения скорости, подавался электрический сигнал (70). После переработки блоком 69 электрический сигнал представлял собой сигнал, используемый блоком 61 для запуска блока цифрового таймера 63.

Точно так же, когда передний фронт внедряемой жидкости проходил через второй датчик средства для измерения скорости, то вырабатывался электрический сигнал 71. После обработки блоком 61 электрический сигнал представлял собой сигнал, используемый блоком 61 для остановки блока цифрового таймера 63. Время полета переднего фронта внедряемого в клетку материала между первым датчиком и вторым датчиком высвечивали на (3 цифры, 7 сегментов) дисплее ЛЭД (т.е. 77) блока 75, многосегментного ЛЭД-индикатора.

Фиг.12 представляет необработанные данные, полученные при функционировании устройства. Электрический сигнал 70 получали от датчика 33, а электрический сигнал 71 получали от датчика 34. Датчики расположены на расстоянии 2,8 сантиметров друг от друга. Когда внедряемый материал проходил между тем или другим датчиком, электрический сигнал сдвигался от линии отсчета. Для электрического сигнала 70 такой сдвиг приведен в точке кривой А, а для электрического сигнала 71 этот сдвиг показан в точке кривой В. Время прохождения между первым и вторым датчиками, что показано в виде расстояния между точками А и В кривых 70 и 71, которое составило 60 микросекунд. Это указывает на то, что внедряемый материал пролетал со скоростью примерно 1044 миль в час (1680 км/ч).

Внедряемый материал выпускали из средства доставки в направлении ЧМС-клеток в зону выталкивания. Зону

выталкивания ограничивали вакуумной камерой, конструкция которой описана в упомянутом выше каталоге "Фишер 88" (стр.114). Давление в зоне выталкивания составило примерно 0,1 атмосферы (абс.).

Работу завершали при помощи селективной установки клапана так, чтобы блокировать поступление газа из резервуара для газа через этот клапан в средство доставки и чтобы обеспечить жидкостную связь между шприцем и резервуаром слива внедряемого материала.

Монослои ЧМС-клеток на чашках Петри (т.е. чашке Петри 30) с МС-средой бомбардировали одновременно. Содержалось 100мг ЧМС-клеток на каждой чашке Петри. Несущие частицы, покрытые ГУС-содержащей плазмидой, доставлялись в ЧМС-клетки.

После бомбардировки ЧМС-клеток культуру инкубировали в темноте в течение 2 дней при температуре 27°C. Спустя два дня клетки анализировали на ГУС-активность.

Экспрессию ГУС-гена в ЧМС-клетках наблюдали с использованием ГУС-гистохимического анализа (субстрат 5-Br-4-Cl-3 индолил-бета-0-глюкуроновой кислоты [Х-глюк] и процедура получены от фирмы Клонтек Лэбораториз, Инк., Пало Альто, КА). ЧМС-клетки и клеточные ростки инкубировали при 37°C в течение от 24 до 48 часов в растворе 1 миллимоля (мМ) Х-глюка, содержащем 0,5мМ феррицианида калия, 0,5мМ ферроцианида калия и 10мМ ЭДТК. Клетки и клеточные ростки, которые становились голубыми во время анализа, рассматривались как положительные на ГУС-активность.

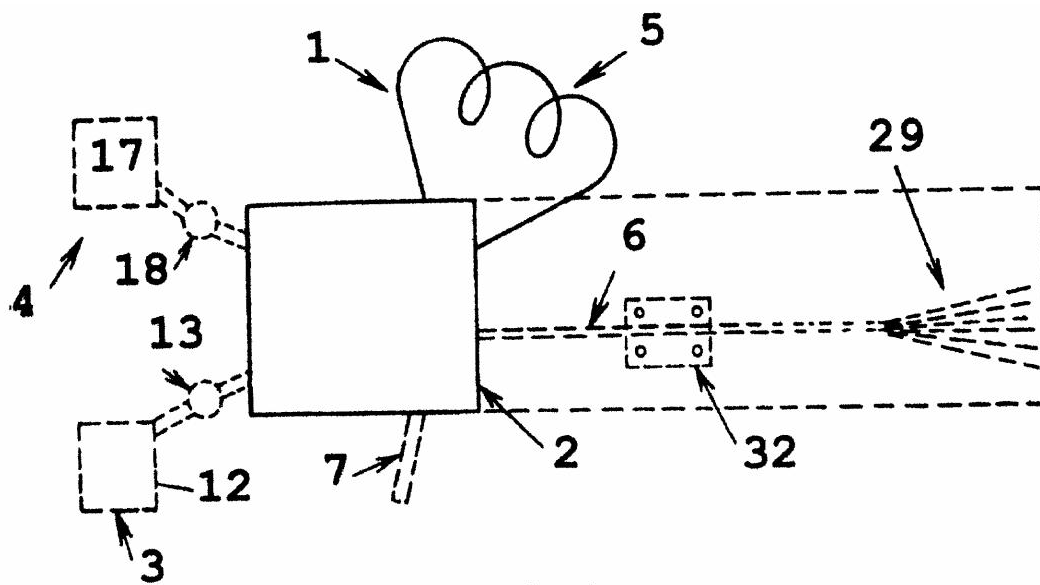
Полученные результаты приведены в таблице.

Эти данные указывают на то, что бомбардировку частицами использовали для того, чтобы доставить ДНК в интактные растительные клетки одновременно и что ген, введенный в результате этой процедуры, может в последующем экспрессировать.

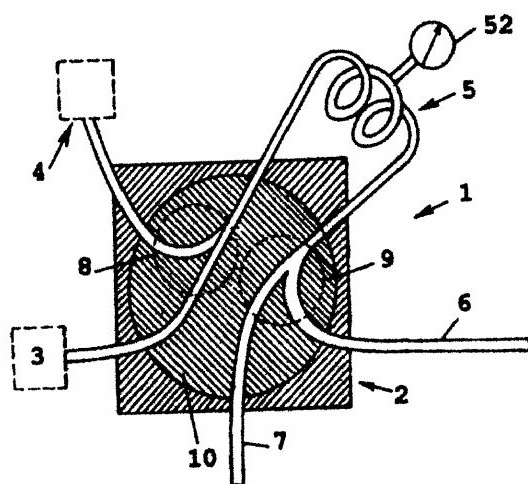
Таким образом, возможны различные модификации настоящего изобретения в дополнение к тем вариантам, которые описаны в тексте и показаны на чертежах. По этой причине объем настоящего изобретения определяется исключительно патентной формулой.

Таблица

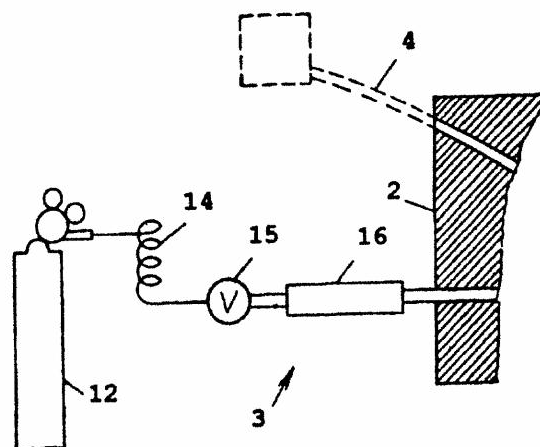
Режим бомбардировки	Количество ЧМС-клеток или клеточных ростков с ГУС-активностью/чашку Петри
Клетки, бомбардируемые золотыми частицами, покрытыми плазмидой, содержащей ГУС-ген повторно	4
"	5
"	6
"	4
"	5
"	2
"	10
"	8
"	9



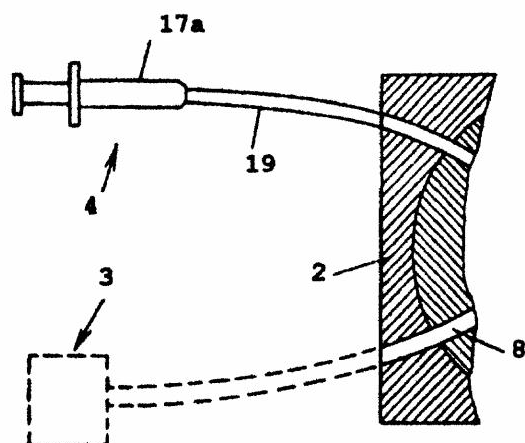
Фиг. 1



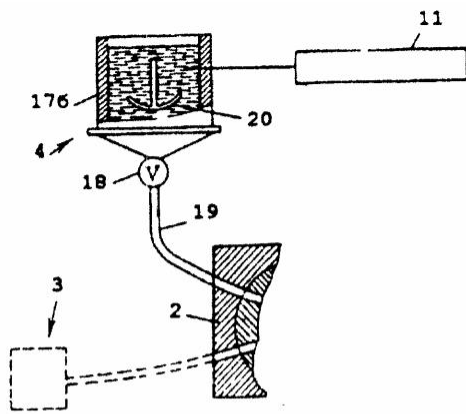
Фиг. 2



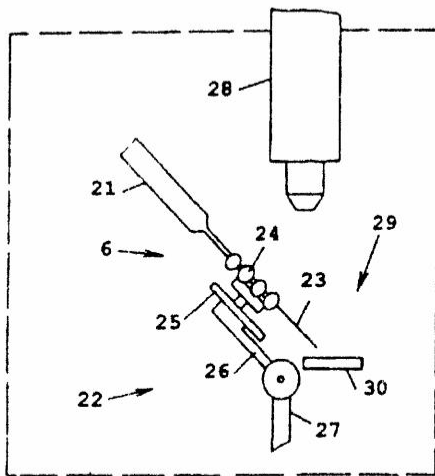
Фиг. 3



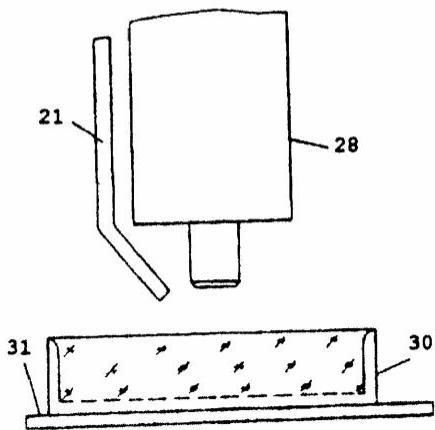
Фиг. 4



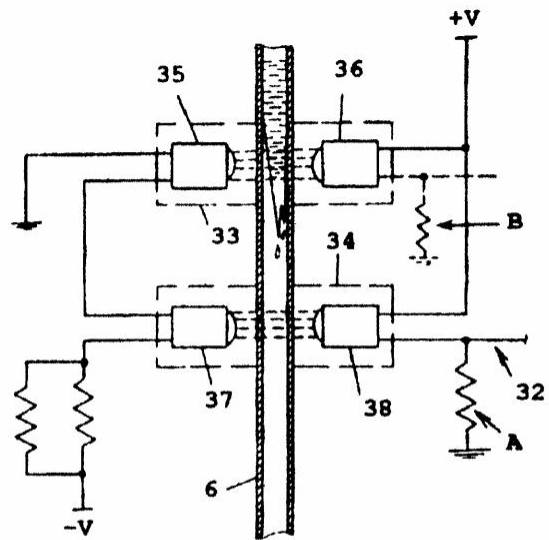
Фиг. 5



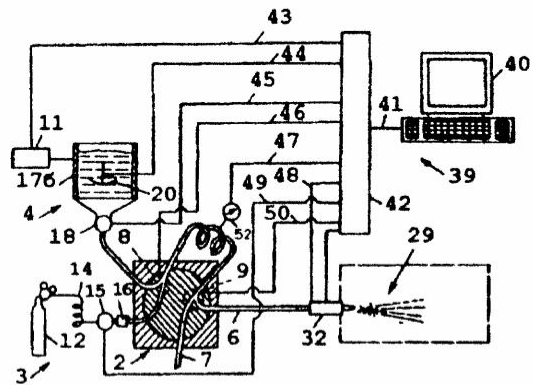
Фиг. 6



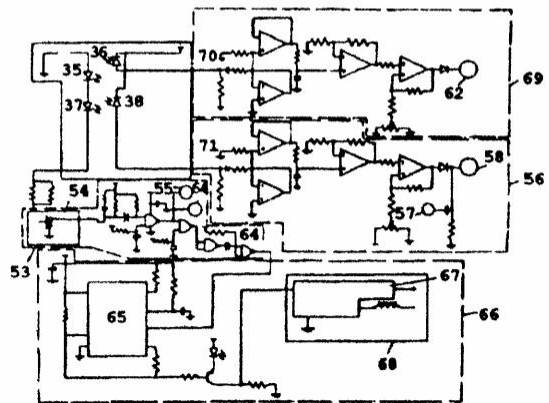
Фиг. 7



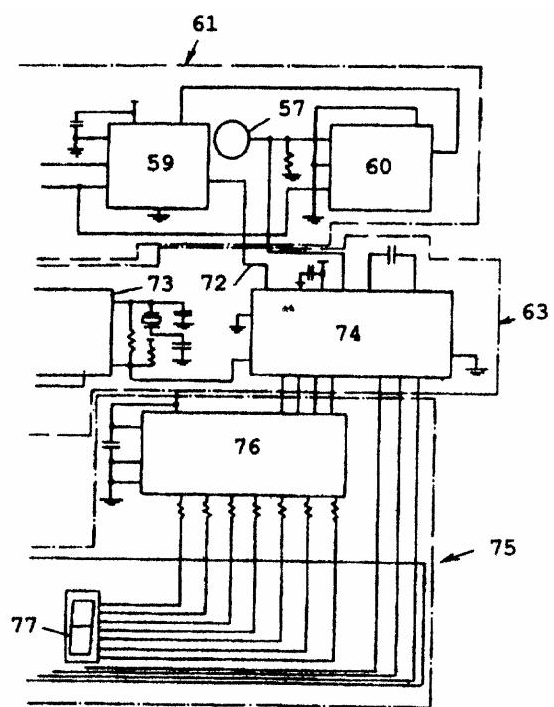
Фиг. 8



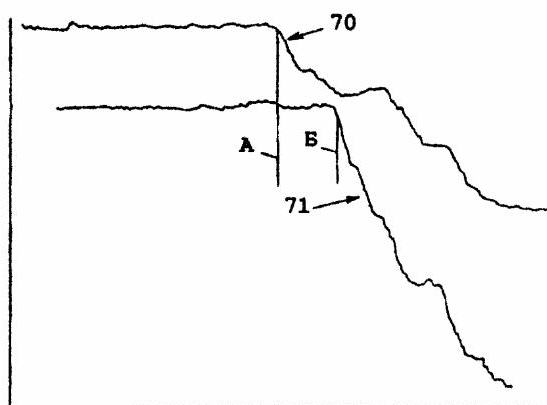
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12