



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103221091 B

(45) 授权公告日 2015. 12. 16

(21) 申请号 201180051218. 4

G01N 33/53(2006. 01)

(22) 申请日 2011. 09. 28

C12N 5/00(2006. 01)

B82Y 5/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/387, 604 2010. 09. 29 US

61/452, 283 2011. 03. 14 US

(56) 对比文件

US 2006214156 A1, 2006. 09. 28, 全文.

WO 2009050168 A1, 2009. 04. 23, 摘要, 说明书第 44-127 段及附图.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 04. 24

审查员 夏雪

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/053646 2011. 09. 28

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/050881 EN 2012. 04. 19

(73) 专利权人 哈佛学院院长等

地址 美国马萨诸塞

(72) 发明人 H·朴 J·鲁宾逊 A·苏滕

M·佐治理 A·K·沙勒克

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

(51) Int. Cl.

A61N 1/32(2006. 01)

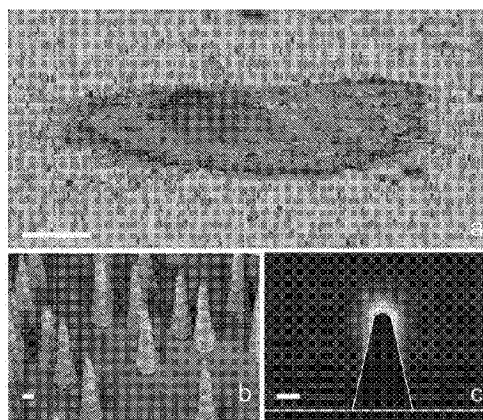
权利要求书2页 说明书7页 附图4页

(54) 发明名称

用纳米线的分子递送

(57) 摘要

本发明提供分子递送装置,其包括用导电层包被的多个纳米线(例如, Si NW)。也公开的是由纳米线-介导的电穿孔递送分子的方法。



1. 分子递送装置,其包含:

具有表面的基体,以及

附接于表面的多个纳米线;

其中基体导电,至少一部分所述纳米线具有 20 ~ 10,000nm 的高度和 10 ~ 500nm 的直径,并且至少一部分所述纳米线包含半导体或绝缘物质且用导电层包被,所述导电层由金属形成,其中所述导电层与所述纳米线直接接触。

2. 权利要求 1 的装置,其中各纳米线沿着与表面基本上垂直的方向附接于表面。

3. 权利要求 1 的装置,其中各纳米线由下列物质形成:半导体,化合物半导体,金属氧化物,金属,碳,氮化硼,或其组合。

4. 权利要求 3 的装置,其中半导体是硅。

5. 权利要求 1 的装置,其中各纳米线高度是 20 ~ 10,000nm,且直径是 10 ~ 500nm。

6. 权利要求 5 的装置,其中高度是 100 ~ 5,000nm 和直径是 50 ~ 250nm。

7. 权利要求 6 的装置,其中高度是 800 ~ 1,200nm 和直径是 70 ~ 180nm。

8. 权利要求 1 的装置,其中纳米线的密度是 $0.05 \sim 10 \mu\text{m}^{-2}$ 。

9. 权利要求 8 的装置,其中密度是 $0.1 \sim 5 \mu\text{m}^{-2}$ 。

10. 权利要求 9 的装置,其中密度是 $0.2 \sim 2 \mu\text{m}^{-2}$ 。

11. 将分子递送到细胞的方法,方法包括:

提供具有表面的基体和附接于表面的多个纳米线,其中所述基体导电,其中至少一部分所述纳米线包含半导体或绝缘物质,并且用导电层包被;

使纳米线与细胞接触以使一个或更多纳米线穿透进细胞,其中将细胞浸入含有分子的浴溶液;以及

在浴溶液中基体和电极之间施加电流或电压波形,从而分子通过细胞膜上瞬时形成的孔隙进入细胞,

其中所述方法不用于诊断或治疗有生命的人或动物体中的疾病。

12. 权利要求 11 的方法,其中分子是 DNA, RNA, 蛋白, 多糖, 或小分子。

13. 权利要求 11 的方法,其中细胞是原核生物细胞或真核生物细胞。

14. 权利要求 13 的方法,其中真核生物细胞是原代细胞,转化的细胞或癌细胞。

15. 权利要求 14 的方法,其中原代细胞是神经元,成神经细胞, β 细胞,肌细胞,成骨细胞,成纤维细胞,角质形成细胞,单核细胞,免疫细胞,干细胞,或卵母细胞。

16. 权利要求 11 的方法,其中电压波形幅度是 0.1 ~ 10V。

17. 权利要求 16 的方法,其中幅度是 3 ~ 7V。

18. 权利要求 17 的方法,其中幅度是 4 ~ 6V。

19. 将分子递送到细胞的方法,所述方法包括:

提供具有表面的基体和多个纳米线,各纳米线具有第 1 端和第 2 端,其中基体和各纳米线除了各纳米线的第 1 和第 2 端之外用电绝缘层包被,第 1 端附接于表面,及第 2 端用导电层包被,其中至少一部分所述纳米线包含半导体或绝缘物质;

使纳米线与含有分子的浴溶液中浸渍的细胞接触以使一个或更多纳米线穿透进细胞;以及

在 2 电极之间施加电流或电压波形,一个连接到各纳米线的第 1 端和其他放进浴溶液,

从而分子通过细胞膜上瞬时形成的孔隙进入细胞，

其中所述方法不用于诊断或治疗有生命的人或动物体中的疾病。

20. 权利要求 19 的方法，其中分子是 DNA, RNA, 蛋白, 多糖, 或小分子。

21. 权利要求 19 的方法，其中细胞是原核生物细胞或真核生物细胞。

22. 权利要求 21 的方法，其中真核生物细胞是原代细胞, 转化的细胞或癌细胞。

23. 权利要求 21 的方法，其中原代细胞是神经元, 成神经细胞, β 细胞, 肌细胞, 成骨细胞, 成纤维细胞, 角质形成细胞, 单核细胞, 免疫细胞, 干细胞, 或卵母细胞。

24. 权利要求 19 的方法，其中电压波形幅度是 0.1 ~ 10V。

25. 权利要求 24 的方法，其中幅度是 3 ~ 7V。

26. 权利要求 25 的方法，其中幅度是 4 ~ 6V。

用纳米线的分子递送

【0001】 【相关申请】

【0002】 本申请要求 2010 年 9 月 29 日提交的美国临时申请 61/387,604 和 2011 年 3 月 14 日提交的美国临时申请 61/452,283 的优先权。这些现有申请通过引用以其整体并入本文。

【0003】 【联邦资助的研究声明】

【0004】 本发明在国家健康学会合同号 1DP10D003893-01 资助下政府支持下完成。政府在本发明中具有特定权利。

【背景技术】

【0005】 外源遗传物质递送进细胞可以病毒(例如,使用腺伴随或慢病毒载体)方式,化学(例如,使用磷酸钙,脂质体或聚阳离子)方式,机械(例如,微注射)方式,及或物理学(例如,电穿孔)方式达到。

【0006】 在这些输送递送方法中,通过在 2 个平行电极之间形成的均一的电场中放置细胞来实现 AAA 电穿孔。当跨膜电势超过阈值水平约 0.25 ~ 1V 时,细胞膜的脂质双层重排列而形成亲水孔隙(一般直径在 20 ~ 120nm 之间)。小于孔径的任何分子,可由电泳或扩散流入细胞。一般而言,为电穿孔溶液中悬浮的细胞,需要延续几 μs ~ ms 的约 1000V(随细胞尺寸改变)的脉冲。

【0007】 虽然此方法对于特定细胞工作有效,小免疫细胞和神经元的电穿孔是欠成功的。当将均一的电场应用于电穿孔用小细胞或神经元时,细胞膜的大级分上的电势在破断电势以上,导致低细胞活力。需要开发用于这些细胞的改善的电穿孔方法。

【0008】 【发明概述】

【0009】 本发明基于如下预料不到的发现,使用一组导电纳米线共同作为细胞内电极,幅度小于 10V 的电压波形可有效电穿孔细胞。

【0010】 一方面,本发明涉及分子递送装置,其包括(i)基体及(ii)附接于表面的多个纳米线。基体导电,且纳米线用导电层包被。

【0011】 上述装置中使用的导电基体可为由具有用导电材料包被的表面的非-导电或半导体材料制造的基体和表面与纳米线通电。或者,其可由导电材料制造。用于基体的材料的例包括半导体(例如,Si 和 Ge),化合物半导体(例如,InP 和 GaA),金属氧化物(例如,ZnO,ITO 和 Ir 氧化物),及金属(例如,Au,Pt,Ag,Ir 和 Cr)。

【0012】 术语“纳米线”(或在本文称为“NW”)指称具有 1nm ~ 1 μm 范围的直径的线,杆或锥的形状的物质。在本文中,锥具有 0 ~ 90 度(例如,0-15 度)范围的半角。NW 优选沿着与表面基本上垂直方向(即,60-90 度)附接于表面。它们可具有 20 ~ 10,000nm(例如,100-5,000nm 和 800-1,200nm)的高度,10 ~ 500nm(例如,50 ~ 250nm 和 70 ~ 180nm)的直径,及 0.05-10 线 μm^2 (例如,0.1-5 线 μm^2 和 0.2-2 线 μm^2)的密度。它们可由半导体(例如,Si 和 Ge),化合物半导体(例如,GaA 和 InP),金属氧化物(例如,ZnO),金属(例如,Au,Ag,Ir,Pt),碳,氮化硼,或其组合形成。

【0013】 包被在 NW 和基体的导电层可由金属(例如,Au,Ag,Pt,Pd,Cr,Ni,Ir,Al,W,Ti 和

Fe), 金属氧化物(例如, Ir 氧化物, ITO 和 ZnO), 半导体(例如, Si 和 Ge), 化合物半导体(例如, GaAs, GaP, InP, InAs, InGaAs 和 GaN), 金属氮化物(例如, TiN, ZrN 和 TaN), 或其组合形成。

[0014] 化合物半导体可由 2 个或多个元件形成, 诸如 IV-IV 半导体(例如, SiC 和 SiGe), III-V 半导体(例如, AlN, AlP, AlGaAs, GaN, GaAs, InP 和 InGaAs), II-V 半导体(例如, Zn₃Sb₂ 和 Cd₃As₂), II-VI 半导体(例如, CdS, CdSe 和 CdTe), IV-VI 半导体(例如, SnS 和 PbSnTe), I-VI 半导体(例如, Cu₂S), I-VII 半导体(例如, CuCl), 及氧化物半导体(例如, SnO₂, CuO 和 Cu₂O)。除非另外陈述, 用于本发明的电装置的半导体包括其固有形式(即, 纯形式)及掺杂的形式(即, 含有一种或更多掺杂物)。术语“组合”指称 2 种或更多组分的混合物, 合金, 或适合的反应产物。例如, “硅和金属的组合”可为硅和金属的混合物或金属硅化物。

[0015] 在另一方面, 本发明涉及将外源分子递送进细胞的方法。方法包括提供(i)具有表面的基体和多个附接于表面的 NW, 基体和各 NW 导电;(ii)使 NW 与细胞接触以使 NW 穿透进细胞;及(iii)在浴溶液中基体和电极之间施加电流或电压波形。结果, 分子通过细胞膜中瞬时形成的孔隙进入细胞。导电 NW 可(1)由具有用导电材料包被的表面的非-导电或半导电材料制造和 NW 附接的表面与基体表面通电;或(2)由导电材料制造。

[0016] 此方法中使用的装置与上述的相同, 除了在此方法中使用的 NW 可用导电层包被或不包被之外。

[0017] 待递送的分子可为核酸(例如, DNA 和 RNA 包括 siRNA 和微 RNA), 蛋白, 多糖, 或小分子。术语“小分子”指称具有 1000Da 以下的分子量的任何分子, 包括各种药物分子, 荧光染料, 寡糖, 寡核苷酸和肽。

[0018] 细胞可为原核生物细胞(例如, 大肠埃希氏菌(E. coli))或真核生物细胞(例如, 酵母细胞和人细胞)。人细胞可为原代细胞, 转化的细胞(例如, HEK 细胞), 或癌细胞(例如, HeLa 细胞)。原代细胞可为卵母细胞, 神经元, 成神经细胞, β 细胞, 肌细胞, 成骨细胞, 成纤维细胞, 角质形成细胞, 单核细胞, 免疫细胞, 或干细胞。免疫细胞可为巨噬细胞, 自然杀伤细胞, T 细胞, 及 B 细胞, 及树突细胞。干细胞可为胚胎干细胞或成年干细胞(例如, 造血干细胞和间叶干细胞)。优选地, 各生物学细胞由 2 种或更多 NW 穿透。

[0019] 电信号可为电流或电压信号。电压波形幅度是 0.1 ~ 10V (例如, 3 ~ 7V 和 4 ~ 6V)。术语“波形”是作为时间的函数的电压(或电流)幅度的标绘图。这是矩形, 三角形, 锯齿或窦状形状的脉冲的一般术语。

[0020] 本发明的再一方面涉及将外源分子递送进细胞的方法。方法包括(i)提供具有表面的基体, 其用绝缘的层, 及多个导电纳米线包被, 具有第 1 端和第 2 端的各导电纳米线除了第 1 和第 2 端之外用电绝缘层包被, 第 1 端附接于表面和第 2 端用导电层包被;(ii)使纳米线与含有分子的浴溶液中浸渍的细胞接触以使一个或更多纳米线穿透进细胞;及(iii)在 2 个电极之间施加电流或电压波形, 一个连接到各纳米线的第 1 端和其他放进浴溶液。结果, 分子通过细胞膜上瞬时形成的孔隙进入细胞。

[0021] 此方法中使用的基体可由半导体(例如, Si), 化合物半导体(例如, GaAs, InP, GaN 和 GaP), 或金刚石形成。其用电绝缘的层包被。在此方法中使用的 NW 与上述那些相同, 除了各 NW 的 2 端之间的区用电绝缘的层包被之外。此外, 各 NW 可由电压波形个别达到。电绝缘层由下列物质形成: 氧化物(例如, 氧化硅, 矾土和氧化铅), 氮化物(例如, 氮化硅)或其组合。或者, 电绝缘层由下列物质形成: 有机物质, 诸如 Parylene (例

如, Parylene C, N, AF-4, SF, HT, A, AM, VT-4 或 CF), 聚二甲基硅氧烷, 甲基丙烯酸甲酯, 光刻胶(例如, SU-8), 及电子光刻胶(例如, 聚甲基甲基丙烯酸酯, ZEP-520 和氢硅倍半氧烷)。

[0022] 细胞可为上述原核生物细胞和真核生物细胞。待递送的分子也可为核酸, 蛋白, 多糖, 或小分子。电信号可为电流或电压信号。电压波形幅度是 0.1 ~ 10V。

[0023] 2 种上述基于 NW 的电穿孔方法的一个优势是达到分子递送需要的低电压波形, 即在 10V 幅度下。其是约 100 倍少于由商业电穿孔系统使用的那些。降低需要的电压不仅使仪表更能承受, 其也降低可导致细胞死亡的弯曲的似然性。而且, 这些方法可用于通过改变它们的几何(例如, 尺寸)或电压脉冲(例如, 幅度及脉冲持续时间)将分子递送进几乎全部真核生物和原核生物细胞。

[0024] 转变为原核生物细胞致使包括大规模并行抗生素筛选的新应用的资源。硅晶片上的 NW 可大规模产生。此高-通量, 低-花费的产生允许本发明的递送方法的宽-范围应用。

[0025] 随后描述一个或更多实施方式的细节。其他方面, 特征和优势会从以下图, 实施方式的详述, 及随附的权利要求显而易见。

【附图说明】

[0026] 图 1a 是垂直 Si NW 阵列上部培养的及固定的人成纤维细胞的扫描电子显微镜 (SEM) 像; 图 1b 是铂包被的 Si NW 的 SEM 像; 及图 1c 是显示在导电 NW 的端电场增强的有限元件模拟的图像。比例尺: (a) 10 μ m, (b) 200nm, 及 (c) 200nm。

[0027] 图 2a 和 b 是显示分别不应用任何脉冲(对照)及应用一系列具有 5.75V 的幅度的电压脉冲的 HEK293 细胞的 Hoescht 核标记的 2 个荧光像; 图 2c 和 d 是显示在分别应用无脉冲(对照)和具有 5.75V 的幅度的一系列电压脉冲之后 HEK293 细胞中非-膜-可渗透性绿色荧光染料(cecein)的缺失和存在的 2 个荧光像; 图 2e 和 f 是显示在分别应用无脉冲(对照)和具有 5.75V 的幅度的一系列电压脉冲之后死细胞的染色的 2 个荧光像; 图 2g 是显示细胞荧光强度的直方图; 及图 2h 是显示转染效率和细胞活力的条形图。

[0028] 图 3a 是在绝缘体上的硅中制造的一组镶 Pt 的 NW 电极的扫描电子图像(插图是 NW 电极的放大视图, 其中在 NW 基部可见绝缘氧化物的终止); 图 3b 是在 NW 电极上部培养的 HEK293 细胞的差示式干涉相差像。见于左下部的贴附移液管用于监测经电穿孔注射入细胞的电流; 图 3c 是显示施加到 Si NW 电极的电压波形的图; 及图 3d 及 e 是显示响应分别具有 4.5V 和 5.5V 的幅度的电压波形而注射进细胞的电流的幅度的图。

[0029] 图 4a 是显示具有在其上部培养的 HEK293 细胞的 Si NW 电极的明视场像; 图 4b 是在将红色荧光染料经电穿孔递送到单细胞之后相同的区的荧光像; 图 4c 是核的对应荧光像; 及图 4d 是以上 3 个像的重叠。箭标表示 Si NW 的位置。

【发明详述】

[0031] 本发明涉及基于 NW 的电穿孔装置和将外源分子电穿孔进细胞的方法。

[0032] 在本发明中使用的 NW 导电及, 优选以垂直方式与基体附接。为体外电穿孔, 细胞可直接在该 NW 基体上培养或在另一基体上培养及使与 NW 紧密接触。或者, 可为体内或原位生物分子递送移植该 NW 基体。

[0033] 一个或更多 NW 的一端穿透细胞基底膜及位于其内。它们的端在细胞之内的一组这些 NW 在细胞所浸渍的浴溶液中共同发挥与细胞外电极配对的细胞内或近细胞电极的作

用。当过此对电极施加电势或电流时,各 NW 的细胞内端可将电场聚集于与在 NW 端的曲率半径相当的区(一般直径 <100nm)。此电场的纳米尺度聚焦给电穿孔流程的开发添加额外自由度。电场分布可通过石版印刷地调整垂直 NW 的密度,长宽比,及曲率半径来控制。可测定超过阈值电势的细胞膜的分区,由此致使细胞,尤其对于难转染的细胞(例如,干细胞和免疫细胞)的有效和低毒性电穿孔。此外,可优化电压和电流水平,脉冲持续时间和脉冲数,以达到期望的水平的效率和活力。

[0034] 在一实施方式中, NW 和它们的基体均导电。NW 均匀地在基体上扩展。NW 可以高通量样式在导电 Si 晶片上制造,如描述于(Shalek, et al., 2010, Proceedings of the National Academy of Sciences, 107, 1870-1875)。这些 NW 可然后用金属包被,其增强它们的导电性。分子递送可通过在 NW 基体上部培养细胞及在浴溶液中基体和电极之间施加电流或电压波形来达到。生物分子递送需要的幅度仅几伏特。将在基体上部的几乎全部细胞电穿孔及保持有活力。

[0035] NW 和基体可由任何物质形成,包括导电,半导体及绝缘物质,诸如硅,氧化硅,氮化硅,碳化硅,氧化铁,氧化铝,氧化铌,钨,不锈钢,银,铂,金和玻璃。电导层由低细胞毒性的物质(例如,金,银和铂)形成。

[0036] 在另一实施方式中, Si NW 作为个体组在基体上生长以使生物分子定点递送进细胞。各个体组电绝缘自其他组。将在相同的组中的仅 NW 电连接及可与自其他组由电压波形独立地达到。在细胞簇之中,仅一个细胞在垂直 NW 的个别-可达到的组上部及经电穿孔接收荧光染料。以此方式,可通过在相互作用系统之中给个体细胞提供特定扰动来研究细胞间或细胞-网络相互作用。

[0037] 在 NW 上包被的绝缘层由低细胞毒性的材料(例如,氧化硅,氧化铝和氮化硅)形成。

[0038] 在基体上获得 NW 阵列广泛使用 2 种方法。一种是所谓的自下而上方法,其基本上涉及自前体物质生长 NW。以化学汽相沉积(CVD)为例, NW 生长过程开始通过在基体上部放置或图案化催化剂或接种粒子(通常具有 1nm ~ 几百 nm 的直径);接下来,将前体物质加入催化剂或接种粒子;及当粒子变得用前体饱和时, NW 开始以最小化装置的能量形状生长。通过改变前体,基体,催化剂/接种粒子(例如,尺寸,密度和在基体上的沉积方法),及生长条件, NW 可在选择的位点以各种材料,尺寸和形状制造。另一方法,自上而下过程,基本上涉及自支持基体移出(例如,通过蚀刻)预先定义的结构。例如,待形成 NW 的位点首先图案化为软掩罩(例如,光刻胶),其用于保护 NW 会在随后蚀刻期间形成的位点或用于图案化硬质掩罩;随后实施蚀刻步骤(湿或干)以将图案化的位点开发为 3- 维线。

[0039] 分子递送进不同细胞类型的效率可通过改变 NW 尺寸或密度来控制。

[0040] 上述电穿孔方法的涵盖的使用包括:

[0041] (1)高通量生物分子递送,尤其是,对于难以转染的细胞。应用包括转染,细胞重编程,干细胞分化及探查细胞内和细胞间信号传导级联。

[0042] (2)相互作用细胞的网络或系统之内的生物分子的细胞-特异性递送。

[0043] (3)难以重悬浮的附着的细胞(诸如神经元)的电穿孔。

[0044] (4)在不同时间点以不同剂量的相同的分子或各种剂量的不同分子给相同的细胞重复的电穿孔。这些细胞可保持在电穿孔之间的 NW 基体,由于 NW, 穿透作为细胞内电极的

细胞膜,不缓和细胞活力。

[0045] 还明细,认为,以上描述充分公开了本发明。因此,下列实施例仅为例证性的,及不得以任何方式限制其余公开。本文引用的出版物在此通过引用以其整体合并。

【实施例】

【实施例 1 :用于电穿孔的 NW 电极基体的制造】

[0047] 硅基体上的 NW 阵列由用 200nm 厚热包衣氧化硅层包被的干 - 蚀刻硅晶片形成。为了在大面积上制造 NW,将胶体金纳米粒子(平均直径 100nm, 购自 Ted Pella,在浓缩购买的样品由约 17 倍后使用)重悬浮于氯苯中的 3% 聚甲基 - 甲基丙烯酸酯(PMMA)溶液中,以形成悬浮液。然后将硅晶片以 3000RPM 用悬浮液旋转包被以在晶片的表面产生 100nm 厚 PMMA- 纳米粒子膜。然后将晶片在反应性离子蚀刻(RIE)装置(NEXX DEVICES CIRRU150)中用 CF_4 血浆处理 3 分钟以在不直接在金纳米粒子下的区中蚀刻氧化硅。然后将金纳米粒子用 TFA 金蚀刻剂蚀刻去以产生断开的氧化硅点图案。覆盖硅晶片的图案发挥用于蚀刻晶片以形成垂直 NW 的掩罩的作用。将晶片在另一 RIE 装置(SURFACE TECHNOLOGY DEVICES ICP RIE)中用诱导地 - 偶联的 $HBr:O_2$ 血浆蚀刻 10 分钟以形成垂直地对齐的 Si NW 阵列(平均长度 :1000nm; 平均直径 :150nm; 密度 :0.5 线 / μm^2)。通过将晶片浸入 5:1 缓冲的氧化物蚀刻剂中来移去氧化硅掩罩。将晶片立即装载进电子束蒸发器,其中 NW 和基体表面用 100nm 的 Pt 包被。以类似样式制造晶片背面的金属接触。

【实施例 2 :在 NW 阵列上平铺细胞】

[0049] 从培养瓶由 5 分钟胰蛋白酶处理除去 80 ~ 100% 汇合之间的 HEK293 细胞或成纤维细胞。在用培养基猝灭酶之后,将细胞重悬浮到 1 百万细胞 /mL 的浓度。接下来,将 200 μL 的细胞悬浮液加入含有具有在实施例 1 中制备的垂直地蚀刻的 NW 的硅基体的 48 孔细胞培养板的各孔。将细胞培养板放入温育器(5% CO_2 , 90% 相对湿度)。在 15 分钟的温育之后,添加 150 μL 的另外的培养基。在 18 小时的另外的温育之后,将样品成像。如显示于图 1a,将人成纤维细胞附接于基体及作为活细胞扩展,尽管其被多种 NW 穿透。

【实施例 3 :经 NW 电穿孔的分子递送】

[0051] 使用上述方法,将 HEK293 细胞在具有在实施例 1 中制备的垂直地蚀刻的 NW 的硅基体上部平铺及培养。通过形成与基体背侧电接触来将 NW 电极接地。良好包围细胞培养物的 PDMS 用于限制含有 1nM 的膜非渗透染料(钙黄绿素)的磷酸盐缓冲液(PBS)溶液。将 Ag/AgCl 对电极放入 PBS 在 NW 基体以上约 0.5cm。在对电极和 NW 基体之间施加两相 100Hz 矩形波电压串 0.4s,在 30s 之后将电压串重复。在 30s 后将基体从染料 - 装载的 PBS 除去及通过清洁 PBS 洗涤及成像。电压脉冲的幅度对于对照和递送实验分别是 0 和 5.75V。为了检定细胞活力,在电穿孔之后,将细胞在 EthD-1 中于室温温育 20 分钟及荧光成像。由于 EthD-1 与核 DNA 结合,膜未自电穿孔恢复或另外多孔的细胞显示强核荧光。经 Hoescht 核标记,相比计数的细胞总数,将这些死亡细胞计数。

[0052] 如显示于图 2,此 NW 电穿孔方法在膜 - 不通透染料(钙黄绿素)递送进 HEK293 细胞中呈现大于 97% 效率及维持大于 85% 细胞活力。而且,NW 基体上部的细胞保持有活力和如果必需可重复电穿孔。

【实施例 4 :个别 - 可到达的 NW 电极的制造】

[0054] 经几个光刻,蚀刻及沉积步骤形成硅基体上的 Si NW 阵列。

[0055] 经电子束光刻(EBL)定义第 1 蚀刻掩罩。绝缘体晶片上的硅用 XR-15416% 固体阴性 E-光刻胶(Dow Corning)以 2000RPM 包被以产生大致 200nm 厚的抗蚀剂层。然后在电子束暴露之前将晶片于 225°C 烘烤 2 分钟。使用 Raith-150EBL 工具来在 NW 形成期望的位置限定 100nm 直径圆形。在以 $1000 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ 的剂量暴露之后,将晶片再次于 225°C 烘烤 4 分钟。然后将图案在 25% 四甲基铵氢氧化物(TMAH)中显影 15s。在显影之后留下的抗蚀剂发挥用于随后蚀刻过程的硬质掩罩的作用。在 ICP-RIE 系统(SURFACE TECHNOLOGY SYSTEMS)中应用 HBr: O_2 的诱导地-偶联的血浆(ICP)10 分钟以承担 Si NW 阵列(平均长度:1000nm;平均直径:150nm;密度:0.5 个线/ μm^2)。然后通过将晶片浸入 49% 氢氟酸来移出抗蚀剂掩罩。然后将 NW 通过于 800°C 使用 SiO_2 低压化学汽相沉积(LPCVD)来绝缘。为了移出 NW 端的 SiO_2 ,将 S1818 光刻胶(Microchem)以 3000RPM 旋转然后使用 O_2 血浆(Unaxis RIE)剥离回以在 Si 基体上留下 500nm 膜。然后使用 CF_4 血浆蚀刻(STS ICP-RIE)突出此层的 NW 端以移出 SiO_2 覆盖端。然后将装置用 1min O_2 血浆 descum 处理,之后在缓冲的氧化物蚀刻(BOE)5:1 中浸 10s。然后将基体装载进热蒸发器,其中通过使用电子束蒸发器蒸发 70nm。然后将抗蚀剂使用 Remover PG (MicroChem)于 80°C 溶解几小时,仅在 NW 端留下金属层。

[0056] 为了使 NW 电极个别可达到,然后将电极段通过在晶片上以 3000PRM 旋转 S1818 光刻胶(Microchem)来图案化。在将晶片于 115°C 烘烤 1 分钟之后,使用 UV 接触光刻来暴露电极之间的区。然后将暴露的抗蚀剂使用 MF-319 (Microchem)显影去。余下抗蚀剂使用 $\text{C}_4\text{F}_8:\text{SF}_6$ 血浆作为用于 Si 基体的 ICP-RIE 蚀刻(STS)的掩罩。在用 Remover PG 剥离抗蚀剂之后,将基体用 100nm 的 Al_2O_3 使用原子层沉积(ALD) (Cambridge Nano Tech)包被。使用接触光刻,围绕 NW 暴露 20 μm -直径区,以及用于接触垫的 $1 \times 0.5\text{mm}$ 区。显影后,通过使用 TransEtch (Transene)移出这些区中的 Al_2O_3 。移出光刻胶及再应用及单独暴露及显影接触区。在使用 BOE5:1 剥离这些区中的 SiO_2 之后,如前蒸发 Pt 层和剥离光刻胶。

[0057] 【实施例 5:经电穿孔注射的离子电流】

[0058] 在具有在实施例 4 中制备的个别-可达到的垂直 NW 组的硅基体上部平铺及培养 HEK293 细胞。通过以电压钳模式实施常规膜片钳测量来测量跨膜电流而电压脉冲施加到 NW 电极(离细胞外溶液中的 Ag/AgCl 电极大致 0.5cm)。如显示于图 3,具有低至 5.5V 的幅度的外部电压波形通过渗透化的细胞膜创建离子电流。

[0059] 【实施例 6:定点生物分子递送】

[0060] 在具有在实施例 4 中制备的个别-可达到的垂直 NW 组的硅基体上部平铺及培养 HEK293 细胞。用 4.5V 幅度的类似于图 3 的电压刺激实现细胞特定递送。额外细胞溶液是含有 1mg/mL 的膜非渗透荧光染料(alexa647)的 PBS。在电压脉冲之后,将细胞在荧光成像之前用 PBS 洗涤几次。如显示于图 4,在施加电压波形之后,将细胞非渗透荧光染料递送到个别-可达到的垂直 NW 组上部的个体 HEK293 细胞。

【其他实施方式】

[0061] 可将此说明书中公开的全部特征以任何组合合并。此说明书中公开的各特征可被用于相同的,相当或类似目的的替代性的特征取代。

[0062] 由此,除非明白地另外陈述,公开的各特征是一般系列的相当或类似特征的仅一

例。

[0063] 自以上描述,本领域技术人员可容易确定本发明的必要的特征,及不离开其精神和范围,可使本发明的各种变化和修饰将其适应于各种利用和条件。由此,其他实施方式也在以下权利要求的范围之内。

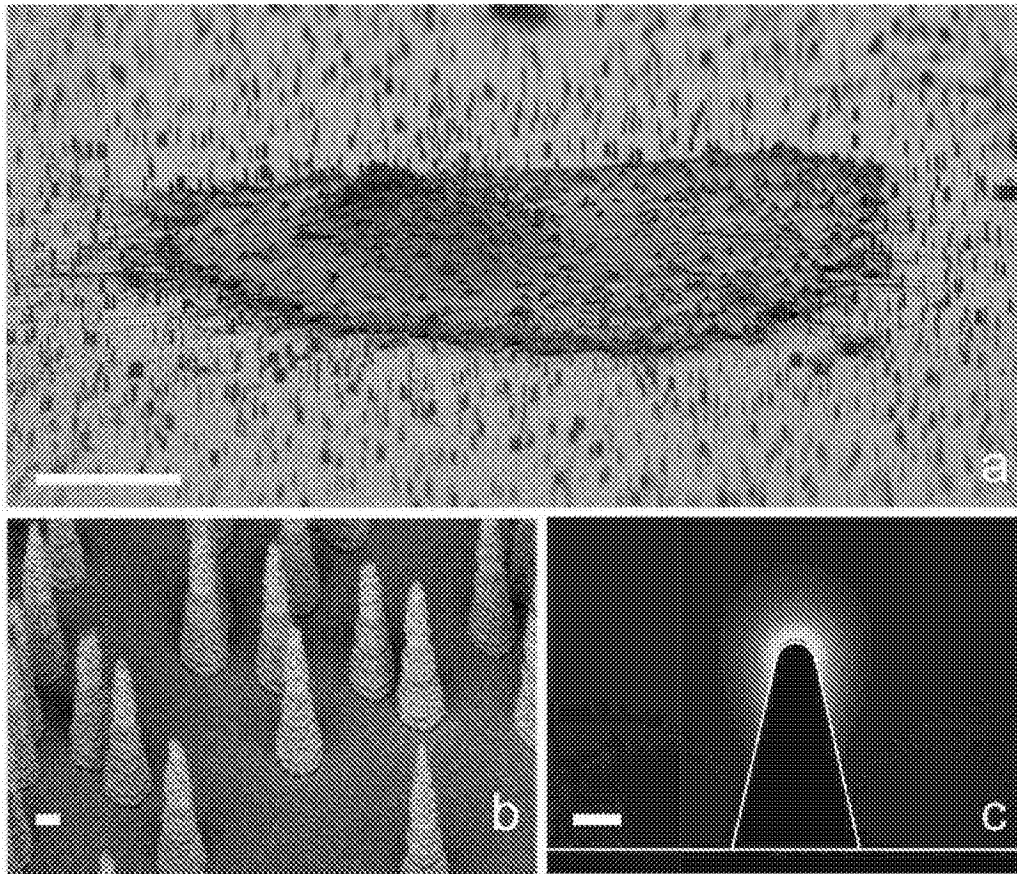


图 1

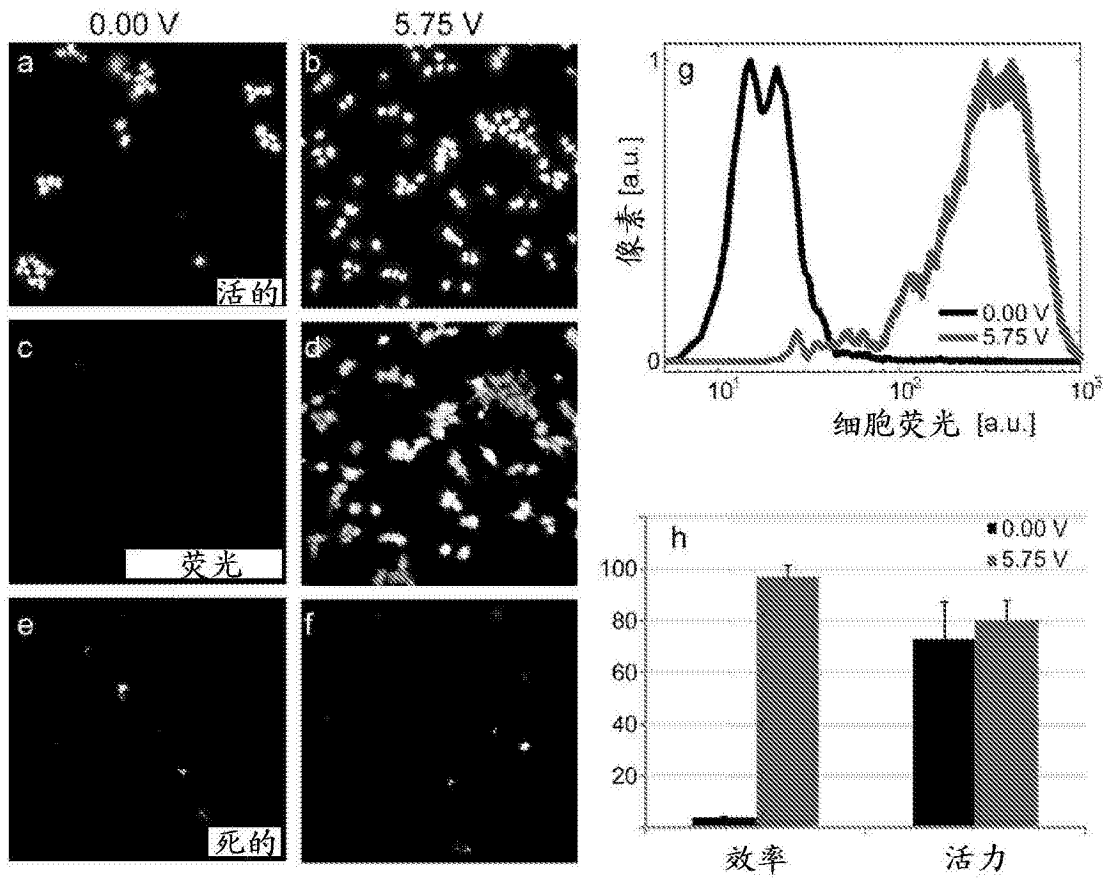


图 2

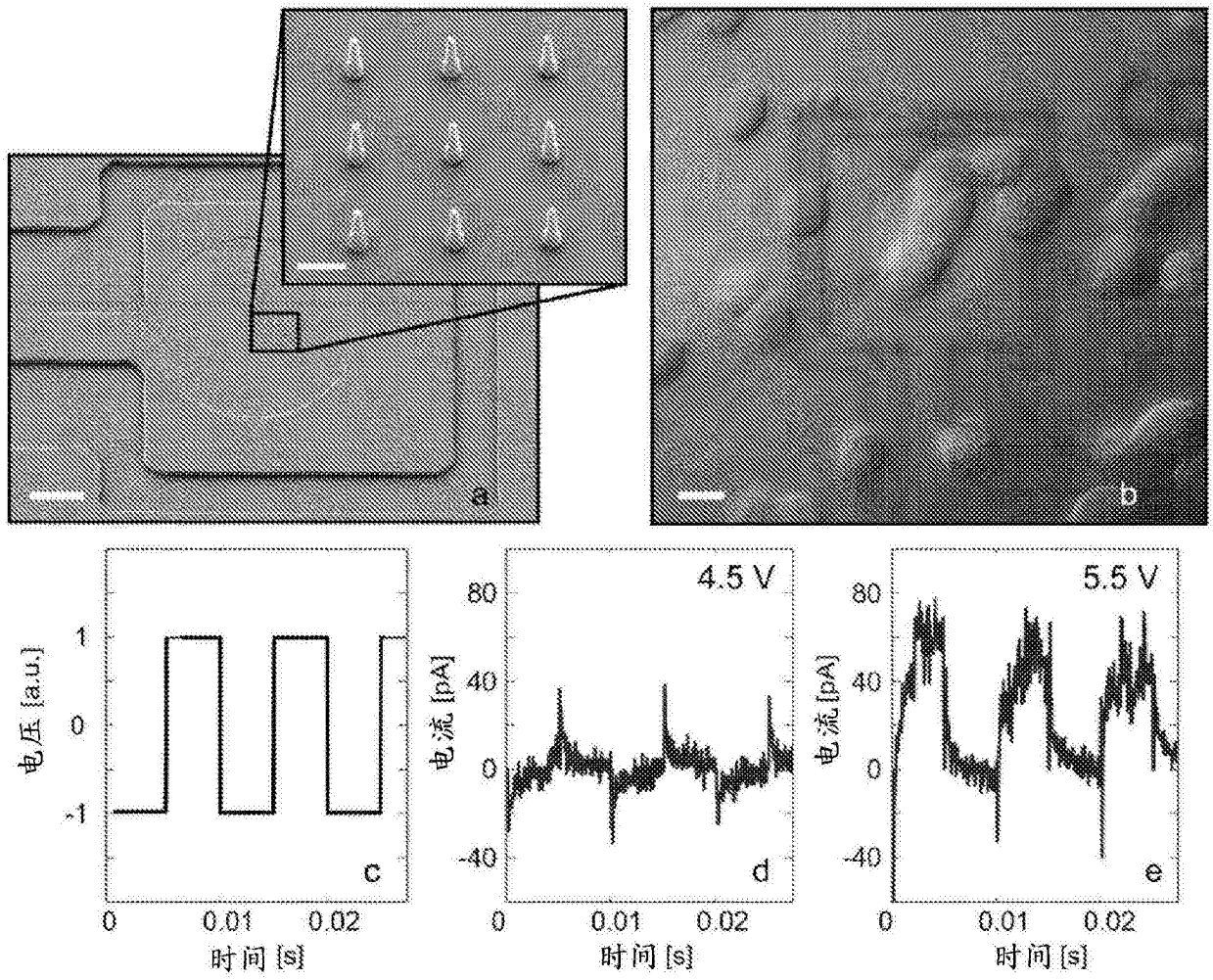


图 3

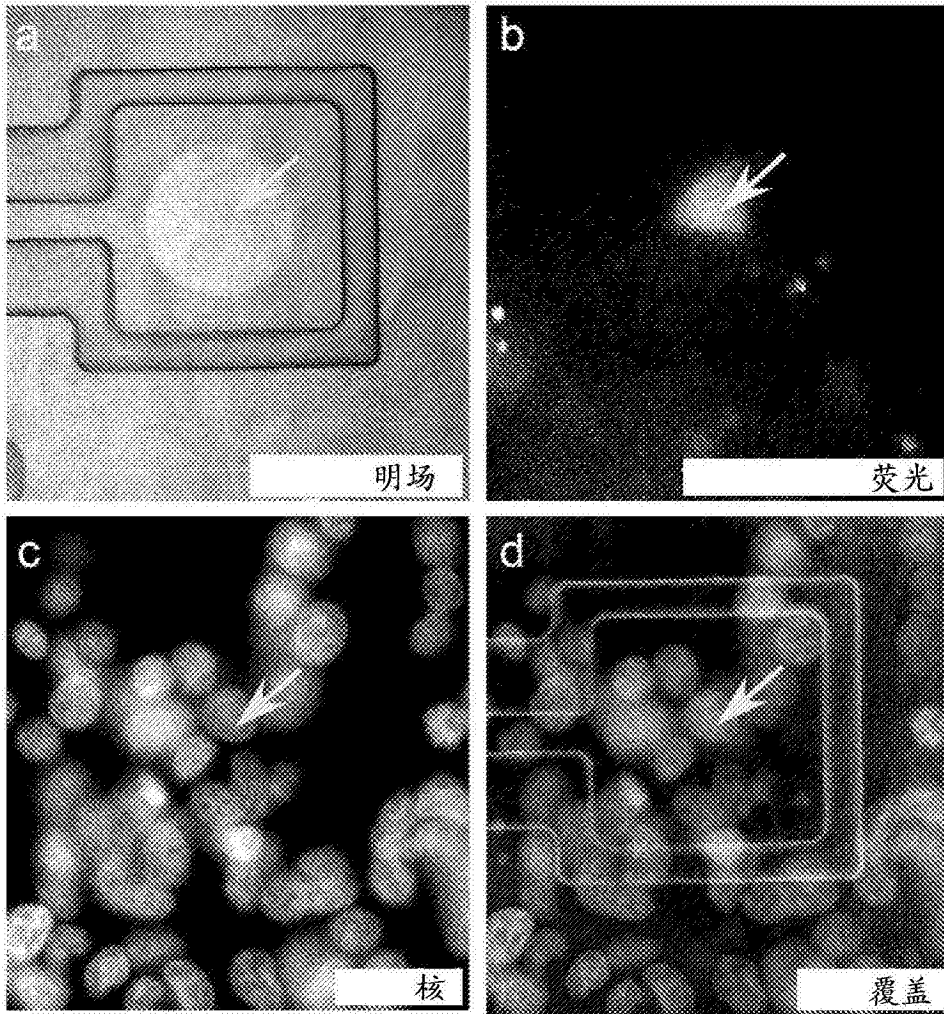


图 4

专利名称(译)	用纳米线的分子递送		
公开(公告)号	CN103221091B	公开(公告)日	2015-12-16
申请号	CN201180051218.4	申请日	2011-09-28
[标]申请(专利权)人(译)	哈佛大学校长及研究员协会		
申请(专利权)人(译)	哈佛学院院长等		
当前申请(专利权)人(译)	哈佛学院院长等		
[标]发明人	H朴 J鲁宾逊 A苏滕 M佐治理 AK沙勒克		
发明人	H·朴 J·鲁宾逊 A·苏滕 M·佐治理 A·K·沙勒克		
IPC分类号	A61N1/32 G01N33/53 C12N5/00 B82Y5/00		
CPC分类号	G01N27/26 A61B5/6877 A61B2562/0285 A61B2562/046 A61B2562/125 B82Y5/00 B82Y15/00 C12N13/00 G01N33/48728		
审查员(译)	夏雪		
优先权	61/387604 2010-09-29 US 61/452283 2011-03-14 US		
其他公开文献	CN103221091A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供分子递送装置，其包括用导电层包被的多个纳米线（例如，Si NW）。也公开的是由纳米线-介导的电穿孔递送分子的方法。

