
**ИССЛЕДОВАНИЯ, ПРИБОРЫ, МОДЕЛИ
И МЕТОДЫ АНАЛИЗА**

УДК 576.52–82

**© А. М. Хохлов, В. В. Шугайло, В. В. Кононенко,
С. А. Костенко, Е. Л. Аренбаум****ПРИБОР ДЛЯ ЭЛЕКТРОСТИМУЛИРУЕМОГО
СЛИЯНИЯ КЛЕТОК**

В Институте биологического приборостроения разработан прибор для электростимулируемого слияния клеток, использующийся в клеточной инженерии и биологии. Прибор состоит из двух частей — камеры и контроллера электрослияния. Камера представляет собой пластмассовый корпус с системой электродов, к которому подключается контроллер. Внутри камеры помещают биологический объект. Контроллер является генератором сигналов специальной формы для воздействия на био-объект в заданные интервалы времени. Он выдает синусоидальный сигнал выравнивания клеток, частотой от 150 кГц до 2 МГц и амплитудой до 25 В. Синусоидальный сигнал может быть сформирован в интервале от 1 до 999 с. Импульс пробоя мембраны клетки длится от 5 до 9999 мкс с периодом повторения от 0.1 до 9.9 с. Амплитуда импульса до 300 В, число импульсов от 1 до 9. После пробоя на электроды камеры подается сигнал заживления с теми же параметрами, что и сигнал выравнивания, амплитуда которого уменьшается с течением времени от амплитуды выравнивания до нуля. Изготовлено несколько образцов прибора, испытанных в условиях реального эксперимента.

ВВЕДЕНИЕ

За последнее десятилетие работы по реконструкции клетки нарастают лавинообразно. Это понятно, т. к. реконструируемые клетки используются для важнейших биологических исследований, а также для практических задач с целью получения клеток с заданными генетическими характеристиками. Реконструкция клеток стала гораздо более удобной благодаря разработке эффективного физического метода — электростимулируемого слияния клеток.

Суть метода [1] заключается в том, что клетки, предназначенные для слияния, размещаются вдоль электродов камеры в непосредственной близости друг от друга с целью создания между ними электрического контакта: происходит выравнивание клеток с помощью высокочастотного поля. Подаваемый на электроды камеры высоковольтный импульс прорывает мембраны клеток, и они сливаются. Для обеспечения жизнедеятельности слившихся клеток нужно провести заживление разорванных мембран при помощи высокочастотного поля, приложенного между электродами камеры.

Частота высокочастотного напряжения зависит от типов и размеров сливаемых клеток; амплитуда импульсов пробоя, их длительность и число импульсов в серии зависят от расстояния между электродами камеры слияния и прочности мембран сливаемых клеток. Параметры слияния подбирают индивидуально для каждого типа клеток.

Слияние клеток с помощью электрического импульса является альтернативным методом, не требующим длительного и трудоемкого процесса

обработки клеток, что наблюдается при химическом слиянии и слиянии с использованием вирусов [2, 3, 4]. Учитывая широкое применение метода, некоторые западные фирмы (Kruss, Германия; ВТХ, США) [5, 6] разработали и выпускают приборы для электростимулируемого слияния клеток, которые весьма дороги. Отечественной аппаратуры аналогичного назначения до настоящего времени не было. Требовалось создать прибор, позволяющий производить электростимулируемое слияние большинства клеток. Такой прибор был разработан и изготовлен малой серией в Институте биологического приборостроения РАН. Поскольку назначение зарубежных приборов и отечественного одно и то же, параметры прибора получились близкими. Наш прибор отличается оригинальной конструкцией камеры слияния, более удобной, по нашему мнению, чем зарубежные образцы, и возможностью проводить слияние клеток не только автоматически (в рамках заданного цикла), но и в любой момент времени, удобный оператору, до окончания полного цикла выполнения заданий программы слияния. Этот момент определяется визуально при наблюдении в микроскоп за поведением клеток в камере слияния.

**КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ РАЗРАБОТАННОГО
ПРИБОРА**

Конструктивно прибор состоит из двух частей: камеры для электрослияния и генератора (контроллера).

Камера для слияния эмбриональных клеток с параллельными проволочными электродами имеет

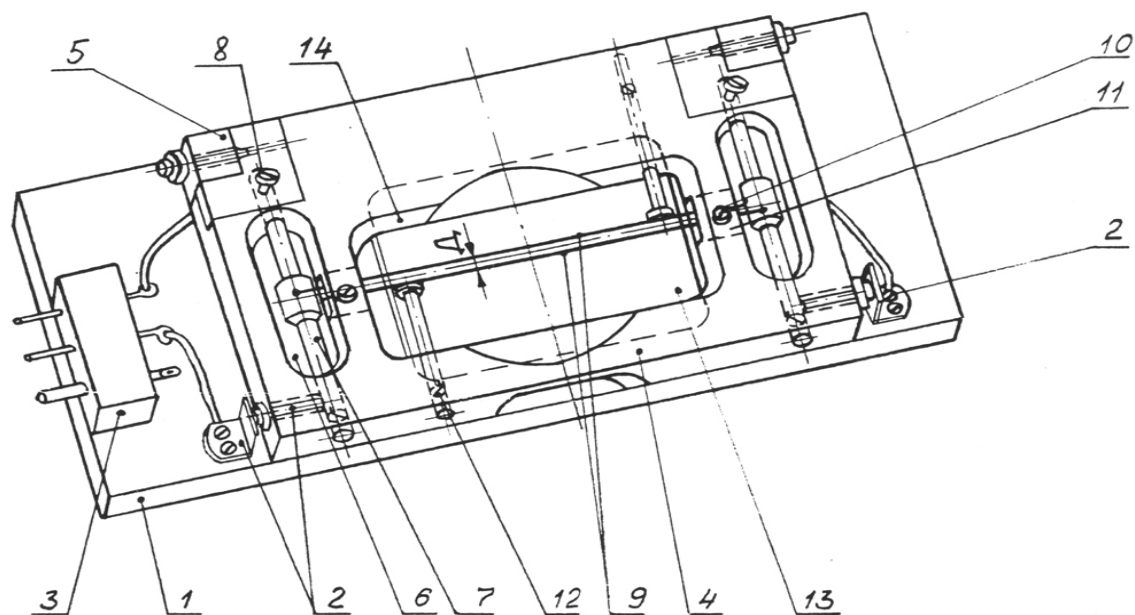


Рис. 1. Камера для электрослияния.

1 — корпус камеры; 2 — электроконтакт; 3 — электроразъем; 4 — поворотная крышка; 5 — петля; 6 — окно для установки электродов; 7 — ось для установки электродов; 8 — стопорный винт; 9 — электроды; 10 — винт для крепления электродов; 11 — прокладка для электродов; 12 — винт для установки расстояния между электродами; 13 — предметное стекло; 14 — окно в крышке для микроскопического наблюдения; Д — зазор между электродами

оригинальную конструкцию [7], которая обеспечивает надежное слияние клеток, быструю подготовку камеры к работе, удобную промывку, стерилизацию и микроскопирование (рис. 1).

Работа с камерой осуществляется следующим образом. В простерилизованную камеру устанавливают сменное стерилизованное стекло и, поворачивая рамку на шарнирах 5, фиксируют последнюю прижимными контактами 2. При этом проводочные электроды через эластичную прокладку 11 должны плотно прижиматься к предметному стеклу. Затем камеру устанавливают на предметный столик микроскопа, где проверяются достаточность прижатия проводочных электродов 9 к предметному стеклу 13 и соответствие требуемого зазора между ними. В случае неудовлетворительного прижатия проволок 9 отпускается стопор 8 и с помощью отвертки поворачивается вороток 7 до получения необходимого прижатия. Зазор Д между проводочными электродами 9 устанавливается с помощью винтов-прижимов 12. После этого на предметное стекло 13 микропипеткой наносится раствор. Затем между электродами в каплю раствора вносятся клетки через окно 14 в рамке 4. Камеру соединяют с генератором разъемом 3 и осуществляют электрослияние, визуально наблю-

дая за процессом через микроскоп. Электроды изготавливаются из любого нержавеющей металла.

Генератор формирует всю гамму электрических сигналов, которые необходимы для процесса слияния. Он выдает гармонический сигнал для выравнивания и слияния клеток частотой от 150 кГц до 2 МГц и действующей амплитудой U_v до 25 В. Длительность сигнала $t_{вр}$ устанавливается от 1 до 999 с. За время $0.1 t_{вр}$ до окончания процесса выравнивания клеток амплитуда сигнала увеличивается на 50 % для плотного прижатия клеток друг к другу. Далее прибор формирует импульсы пробоя мембраны клеток в зоне контакта амплитудой $U_{имп}$ до 300 В, длительностью $T_{и}$ от 5 до 9999 мкс; количество импульсов N от 1 до 9, паузы в следовании импульсов $T_{п}$ устанавливаются от 0.1 до 9.9 с. После пробоя прибор формирует гармонический затухающий сигнал с частотой и амплитудой сигнала выравнивания, который спадает до нуля за время $t_{зж} = t_{вр}$. Это обеспечивает наилучшие условия электростимулируемого слияния клеток. Прибор управляется микропроцессором, индикация режимов отображается на ЖК-дисплее. Временная диаграмма сигналов, вырабатываемых генератором, показана на рис. 2, блок-схема прибора изображена на рис. 3.

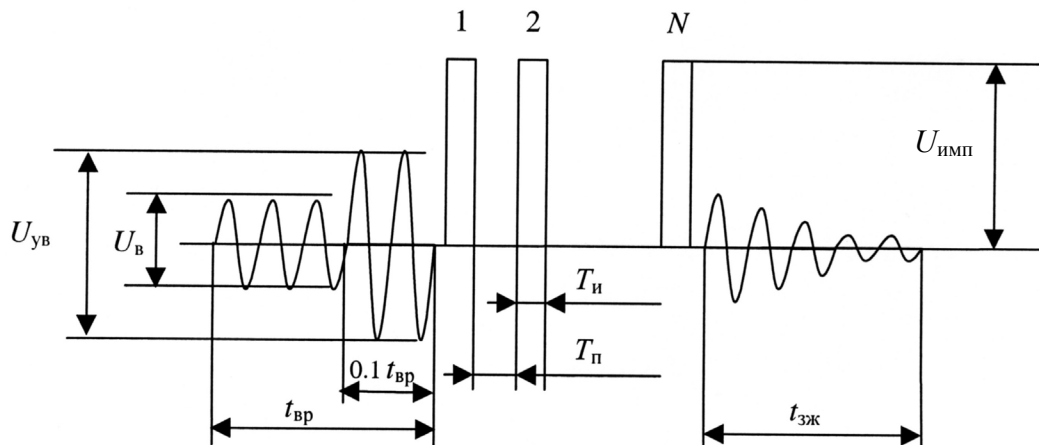


Рис. 2. Последовательность напряжений генератора для слияния клеток.

U_B — напряжение выравнивания клеток, до 25 В эфф.; $U_{ув}$ — увеличение напряжения выравнивания на 50% перед подачей импульсов пробоя; $U_{имп}$ — напряжение импульсов пробоя, до 300 В; $t_{вp}$ — время действия сигнала выравнивания, от 1 до 999 с; $t_{зж}$ — время заживления клеток. ($t_{зж} = t_{вp}$); $0.1 t_{вp}$ — время увеличения амплитуды сигнала выравнивания на 50%; $T_п$ — длительность паузы между импульсами, от 0.1 до 9.9 с; $T_и$ — длительность импульса пробоя, от 5 до 9999 мкс; N — число импульсов слияния, от 1 до 9

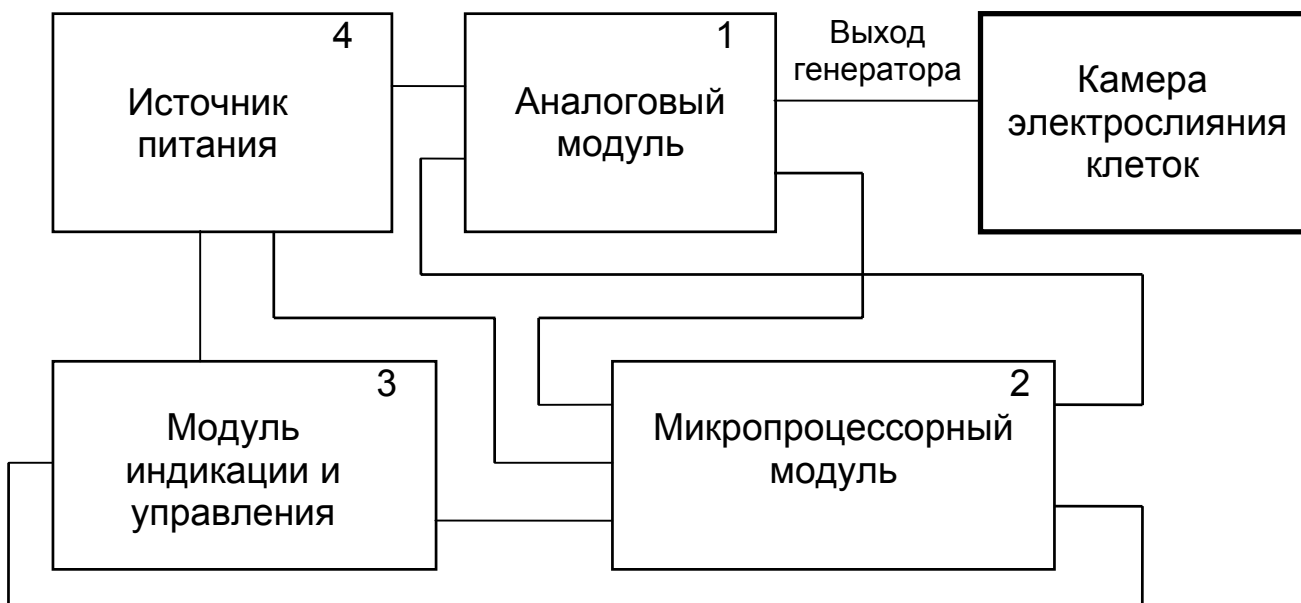


Рис. 3. Блок-схема прибора для слияния клеток

Аналоговый модуль 1 предназначен для формирования необходимой последовательности импульсов. В него входят:

1) генератор, осуществляющий формирование сигнала синусоидальной формы с возможностью установки частоты в диапазоне частот от 150 кГц

до 2 МГц;

2) модулятор, осуществляющий модуляцию амплитуды синусоидального сигнала выравнивания под управлением команд микропроцессора;

3) усилитель, усиливающий выходной сигнал до 25 вольт эффективного напряжения;

4) коммутатор, разделяющий импульсные и синусоидальные сигналы;

5) формирователь высоковольтных импульсов пробоя.

Микропроцессорный модуль 2 предназначен для контроля и управления работой генератора. Основа модуля — микропроцессор фирмы Atmel.

Модуль индикации и управления 3 предназначен для установки значений необходимых параметров перед запуском прибора и последующей индикации этих параметров. В конце цикла слияния прибор выдает звуковой сигнал.

Источник питания 4 обеспечивает необходимые напряжения питания для модулей.

РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

Институт биологического приборостроения РАН выпустил несколько экземпляров приборов для электростимулируемого слияния клеток. Прибор тестировался на эффективность процесса слияния с последующим наблюдением развития партеногенетических эмбрионов мышей.

Для слияния использовались интактные ооциты от гибридных мышей — F1 (CBA×C57BL). В качестве среды для слияния использовалась среда Циммермана (манитол — 200 мМ; MgSO₄ — 0.1 мМ; CaCl₂ — 0.05 мМ; BSA — 0.05 %). В процессе эксперимента было взято 100 ооцитов от 4 мышей. Процент слияния составил 84 %. Процент партеногенетического развития эмбрионов до стадии бластоцисты — 16 %. Прибор используется также во ВНИИ физиологии, биохимии и питания сельскохозяйственных животных РАСХН (г. Боровск Калужской обл.) в лаборатории д.б.н. проф. В.П. Рябых для получения клонированных эмбрионов крупного рогатого скота и реконструирования мышечных эмбрионов. Прибор показал хорошие результаты, изложенные в [8, 9].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hofman G.A., Evens G.A. Electronic Genetic — Physical and Biological Aspects of Cellular Electromanipulation // IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine. December 1986.

2. Tesarik J., Nagy Z.P., Mendoza C., Greco E. Chemically and mechanically induced membrane fusion: non-activating methods for nuclear transfer in mature human oocytes // Hum. Reprod. 2000. V. 15, N 5. P. 1149–1154.
3. Tsunoda Y., Kato Y. Full-term development after transfer of nuclei from 4-cell and compacted morula stage embryos to enucleated oocytes in the mouse // The Journal of Experimental Zoology. 1997. V. 278. P. 250–254.
4. Katsutoshi Niwa, Riya Takano, Yayoi Obata et al. Nuclei of Oocytes Derived from Mouse Parthenogenetic Embryos Are Competent to Support Development to Term // Biology of reproduction. 2004. V. 71. P. 1560–1567.
5. Electro Cell Fusion System CFA400. Kruss. Инструкция по эксплуатации и описание. Германия, 1984.
6. Electroporation and Electrofusion. Instruments and Accessories. Проспект фирмы ВТХ. США.
7. Патент РФ № 2147315. БИ № 10 от 10.04.2000.
8. Кириенко К.В., Логинов А.Г., Алгулян А.С., Рябых В.П. Развитие партеногенетических и реконструированных мышечных эмбрионов при разных вариантах активации // Материалы Международной научно-практической интернет-конференции "Управление функциональными системами организма". Ставрополь, 2006. С. 28–32.
9. Кириенко К.В., Логинов А.Г., Рябых В.П. Получение клонированных эмбрионов крупного рогатого скота при использовании в качестве цитопластов ооцитов, созревающих in vitro // Материалы 4-й Международной конференции "Актуальные проблемы биологии в животноводстве", Боровск, 2006. Россия, Боровск, ВНИИ физиологии, биохимии и питания с.-х. животных РАСХН.

*Институт биологического приборостроения РАН,
Пушино.*

Материал поступил в редакцию 5.03.2007.

INSTRUMENT FOR ELECTRICALLY STIMULATED CELL FUSION

**A. M. Khokhlov, V. V. Shugaylo, V. V. Kononenko,
S. A. Kostenko, E. L. Arenbaum**

Institute for Biological Instrumentation of the RAS, Pushchino, Moscow region

Institute of Biological Instrumentation has developed an instrument for electrically stimulated cell fusion, which can be used in gene engineering and biology. The instrument comprises two units: a chamber and controller. The chamber has a plastic body with a system of electrodes whereto the controller is connected. A biological object will be put into the chamber. The controller generates signals of special shape that act upon the biological object at the preset time intervals. It emits a cell-aligning sinusoidal signal with frequency of 150 kHz to 2 MHz and amplitude of up to 25 V. The sinusoidal signal can be generated within a time interval of 1 to 999 seconds. The duration of cell membrane punching pulse is 1 to 999 μ s, its repetition period is 0.1 to 9.9 seconds. The pulse amplitude amounts up to 300 V, the number of pulses is 1 to 9. After punching, a healing signal is fed to the chamber electrodes; parameters of this signal are the same as those of the aligning signal whose amplitude decreases with time from that of the aligning signal to zero. Several specimens of the instrument have been manufactured and tested under real experimental conditions.