

УДК 576.08

© А. М. Хохлов, В. В. Шугайло, В. В. Кононенко, С. А. Костенко

УСТРОЙСТВО ДЛЯ ЭЛЕКТРОПОРАЦИИ КЛЕТОК

В Институте биологического приборостроения РАН разработан прибор для электропорации клеток, использующейся в клеточной инженерии, биотехнологии и биологии. Электропоратор состоит из двух электрически связанных блоков — контроллера и камеры. Контроллер формирует электрические сигналы, необходимые для процесса электропорации. Одиночный импульс или серия импульсов генерируются в двух диапазонах. В 1-м диапазоне амплитуда импульсов от 100 до 500 В при длительности от 300 мкс до 99 мс. Во 2-м диапазоне — от 500 до 3000 В длительностью от 5 до 99 мкс. Число импульсов в серии от 1 до 99. После окончания серии импульсов раздается звуковой сигнал. Камера выполнена на стандартной чашке Петри диаметром 90 мм. Electroды из нержавеющей стали обеспечивают наибольшую равномерность электрического поля. Расстояние между электродами можно изменять с шагом 2 мм. Обеспечена полная безопасность от поражения электрическим током. Изготовлены образцы приборов и проведены испытания на соответствие техническим условиям.

ВВЕДЕНИЕ

Технологии генной модификации клеток требуют создания приборов, доступных исследователям как по цене, так и по надежности получения модифицированного материала и удобству работы с ними. К таким технологиям относятся электропорация для стимулирования слияния клеток [1], а также технологии временного расширения пор на мембране клетки для введения в клетку макромолекул (ДНК, белки, антитела, красители) — электропорация.

Технология электропорации заключается в том, что на клетки, находящиеся в растворе, содержащем вводимые макромолекулы, накладывается высоковольтное электрическое поле на короткий период времени (от нескольких микросекунд до нескольких миллисекунд), при этом поры в мембране клетки открываются и остаются открытыми до 30 с, что достаточно для проникновения в клетку вводимого материала. Схематически это показано на рис. 1. Энергия воздействия определяется амплитудой и длительностью электрического импульса и зависит от электрических и механических характеристик клеточной мембраны.

Приборы для электропорации выпускает ряд зарубежных фирм [3, 4], в России подобной аппаратуры не выпускается.

В Институте биологического приборостроения РАН (ИБП РАН) разработан и изготовлен прибор для электропорации клеток (электропоратор) с параметрами, обеспечивающими работу с широким набором биологических объектов.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЭЛЕКТРОПОРАТОРА

Электропоратор (рис. 2) состоит из двух конструктивно независимых электрически связанных частей — контроллера и камеры.

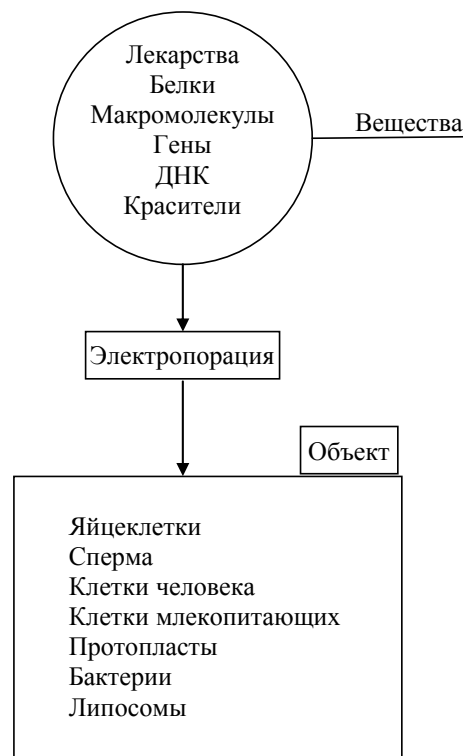


Рис. 1. Принцип электропорации



Рис. 2. Электропоратор

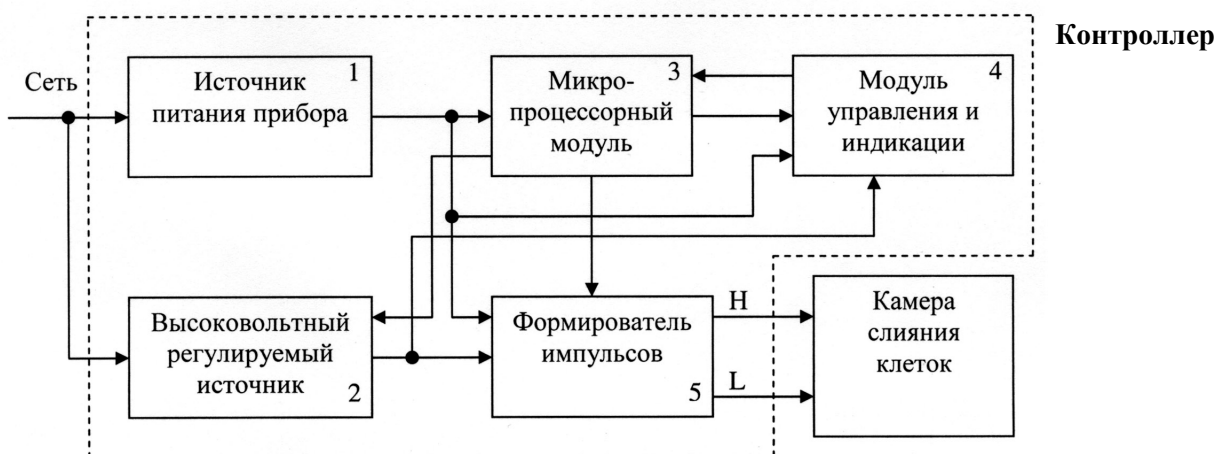


Рис. 3. Блок-схема электропоратора

Контроллер (рис. 3) содержит 5 модулей: источник питания прибора 1, высоковольтный регулируемый источник 2, микропроцессорный модуль 3, модуль управления и индикации 4 и формирователь импульсов 5.

Модуль 1 питается от сети 220 В, 50 Гц и формирует все напряжения для модулей 3, 4 и 5. Модуль 2 предназначен для получения высоких напряжений электропорации, плавно регулируемых от 50 до 3000 В при максимальной мощности до 200 ВА.

Учитывая, что длительности относительно низковольтных импульсов (до 500 В) должны быть существенно больше длительности высоковольтных (от 500 до 3000 В), нами предусмотрены в

приборе два выхода на камеру слияния — высоковольтный Н и низковольтный L.

Микропроцессорный модуль 3 управляется микроконтроллером Atmega и формирует все необходимые длительности выходных импульсов, их число и паузу между ними и измеряет их амплитуду, отображая всю эту информацию на ЖКИ модуля 4. Все необходимые установки для модуля 3 задаются кнопками управления модуля 4.

Формирователь импульсов 5 формирует электрические сигналы, необходимые для процесса электропорации: одиночный импульс или серию импульсов в двух диапазонах. В 1-м диапазоне амплитуда импульсов от 100 до 500 В при длительности от 300 мкс до 99 мс — выход L. Во 2-м

диапазоне амплитуда импульсов от 500 до 3000 В длительностью от 5 до 99 мкс — выход Н. Число импульсов от 1 до 99. После окончания серии импульсов раздается звуковой сигнал. Выходные каскады модуля выполнены на мощных высоковольтных транзисторах MOSFET.

Камера для электропорации (рис. 2) выполнена на стандартной стеклянной чашке Петри диаметром 90 мм. Electrodes из нержавеющей стали собраны так, чтобы обеспечить наибольшую равномерность электрического поля. Расстояние между электродами можно изменять с шагом 2 мм. Обеспечена полная безопасность от поражения электрическим током.

РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

В ИБП РАН разработан комплект технической документации для изготовления электропоратора, изготовлены образцы и проведены испытания на соответствие требованиям технического задания. Предполагается выпуск малой серии прибора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хохлов А.М., Шугайло В.В., Кононенко В.В. и др. Прибор для электростимулируемого слияния клеток // Научное приборостроение. 2007. Т. 17, № 2. С. 62–66.
2. Hofmann G.H., Evans G.A. Electronic Genetic-Physical and Biological Aspects of Cellular Electromanipulation // IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine. Dec. 1986. стр. 6–23.
3. Electro Cell Fusion System CFA 400. Intruction and Protocol Manual. Hamburg Kruss GmbH, 1994.
4. Electroporation and Electrofusion. Instruments and Accessories. Проспект фирмы ВТХ. США. (<http://www.btxonline.com/products/>).

*Институт биологического приборостроения РАН,
г. Пушкино, Моск. обл.*

Материал поступил в редакцию 3.10.2007.

CELL ELECTROPORATOR

A. M. Khokhlov, V. V. Shugaylo, V. V. Kononenko, S. A. Kostenko

*Institute for Biological Instrumentation of the Russian Academy of Sciences,
Pushchino, Moscow region*

The Institute for Biological Instrumentation has developed a device for cell electroporation that can be used in cellular engineering, biotechnology and biology. The electroporator comprises two electrically connected units: controller and chamber. The controller generates electric signals necessary for the electroporation process. A single pulse or a series of pulses are formed within two ranges. In the first range, the pulse amplitude is 100 to 500 V for the length of 300 μ s to 99 ms. In the other one, the amplitude is 500 to 3000 V for the length of 5 μ s to 99 μ s. Number of pulses in a series varies from 1 to 99. An acoustic warning signal is generated at the end of each pulse train. The chamber is constructed based on a standard Petri dish 90 mm dia. Stainless steel electrodes ensure the best uniformity of electric field. The distance between the electrodes can be varied with a 2-mm step. Total protection against electric shock is provided. The electroporator specimens have been manufactured and tested for compliance with the specifications.