



2004-2006 m. Bendrojo programavimo dokumento 2 prioriteto „Žmogiškųjų išteklių plėtra“

4 priemonė „Mokymosi visą gyvenimą sąlygų plėtra“

Projekto sutarties numeris: **ESF/2004/2.4.0-K01-160/SUT-261**

Projekto pavadinimas: **Inovatyvūs mokymo(si) metodai ir naujausios technologijos gamtos mokslų bakalauro rengimui**

Eppendorf multiporatoriaus NAUDOJIMO INSTRUKCIJA



| | | |
|----------|----------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 | Įvadas | 4 |
| 1.1 | Naudojimo instrukcijos tikslai..... | 4 |
| 2 | Multiporatoriaus Veikimo Principas | 5 |
| 3 | Parametrų optimizzavimas | 9 |
| 3.1 | Lauko stiprumo optimizzavimas..... | 9 |
| 3.2 | Lauko impulse trukmė..... | 10 |
| 3.3 | Impulsų skaičius | 10 |
| 3.4 | Elektroporacijos buferio paruošimas | 10 |
| 3.5 | DNA/RNA įtaka..... | 11 |
| 3.6 | Temperatūros įtaka..... | 12 |
| 3.7 | Ląstelių tankio įtaka | 12 |
| 4 | Electroporacijos sąlygos | 13 |
| 4.1 | Ląstelių paruošimas..... | 13 |
| 4.1.1 | Mikoplasma..... | 13 |
| 4.1.2 | Ląstelių kultūra..... | 13 |
| 4.1.3 | Electroporacinio buferio osmosinio slėgio nustatymas | 13 |
| 4.1.3.1 | Lipnių ląstelių derliaus nuėmimas | 13 |
| 4.1.3.2 | Tolerancijos į hypoosmolarinį buferį sąlygas išbandymas..... | 14 |
| 4.1.4 | Ląstelių diametro nustatymas | 14 |
| 4.1.5 | DNA paruošimas | 15 |
| 4.1.6 | Ttemperatūros pasirinkimas | 15 |
| 4.2 | Electroporacijos procedūra | 16 |
| 4.3 | Paskesnis ląstelių apdorojimas..... | 16 |
| 4.4 | Determination of transfection efficiency in the cells | 16 |
| 5 | Gedimai | 17 |
| 6 | Appendix | 21 |
| 6.1 | Minimalios įtampos Muitiporatoiumi nustatymas ® | 21 |
| 6.2 | Hypoosminiai ir isoosminiai buferiai elektroporacijos tirpalams gaminti .. | 22 |
| 6.3 | Electroporacijos buferių sudėtis | 22 |
| 6.4 | Electroporacija eukariotinių ląstelių sąlygos, pagrįstos Jurkat..... | 23 |

1. Įvadas

Šis reiškinys, kai naudojamas trumpas, intensyvus srovės impulsas, kad sukurtų (grįžtamąją) poros membranoje atidarymą buvo iš pradžių panaudotas 1970-aisiais tam, kad įvesti svetimias molekules į ląsteles. Šitos membranos poros leidžia mažai molekulinei medžiagai (tokiai kaip dažai ar peptidai) ir dideliai molekulinei medžiagai (tokiai kaip baltymai, DNR ir RNR) patekti į ląstelės vidų. Ši procedūra, kuri yra žinoma kaip elektroporacija, elektroinjekcija ar elektropermeabilizacija, vystėsi daugelyje laboratorijų kaip standartinis metodas, ir yra naudojamas pirmiausiai eukariotinių ląstelių ir bakterijų perdavimui.

Eppendorfo Multiporatorius® ir specialūs elektroporaciniai buferiai suformuoja sistemą, kurioje elektroporacija vyksta efektyviai ir švelniai su hypoosmolar sąlygomis. Hypoosmolar buferis priverčia ląsteles išsipūsti, kas plečia membraną ir atpalaiduoja citoskeletą. Tai savo ruožtu priveda prie įtampos sumažinimo, reikalingo membranos porų sudarymui. Elektroporacija gali tokiu būdu būti įvykdyta "draugiškesniame ląstelei" būdu be bet kokio nepalankaus perdavimo šalutinio padarinio.

1.1 Naudojimo instrukcijos tikslai

Šis aprašymas yra galiojantis eukariotiniam Multiporatoriaus moduliui, prie kurio eukariotų ląstelės (išskyrus mieles ir kai kuriuos mikroorganizmus) gali būti elektroporuojamos.

Metodas turi savyje glaustą bandomųjų sąlygų (impulso įtampa, laikas, temperatūra ir aplinkos sudėtis) apibūdinimą, kurie formuoja pagrindą šio novatoriško elektroporacijos proceso, atliekamo, naudojant Multiporatoriaus švelnaus impulso technologiją.

Bet kokia patirtis su paprastai anksčiau naudojamų milisekundės impulsų trukmės elektroporacijos technika, negali būti palyginta su technologija, naudodama Multiporator® su mikrosekundės trukmės impulsais.

Taikomosios sąlygos daugeliui skirtingų ląstelių gali būti surastos Eppendorfo svetainėje www.eppendorf.com. Jei yra panaudotos ląstelės, kurioms jokios taikomosios sąlygos nėra žinomos, reikia skaityti 3 Skyriuje "parametrų optimizavimas" ir bendros elektroporacijos sąlygos 4 Skyriuje. 5 skyrius, "Gedimai", aprašyta pagalba tiems atvejams, kai rezultatai nepasirodė kaip tikėtasi.

Bakterijos, mielės taip pat kaip kiti mikroorganizmai gali būti transformuojamos su laisvai pasirenkamu bakterijų moduliu. Taikomosios sąlygos yra pasiekiami www.eppendorf.com taip pat.

- Multiporatoriaus® elektroporacijos funkcijos yra iš esmės skirtingos nuo kitų komerciškai pasiekiamų prietaisų. Svarbiausi skirtumai yra šie:
- Sąlygos labai trumpo 15 - 100 mikrosekundžių impulso trukmės
- Elektroninis impulso reguliavimas, kuris leidžia vienodą, atkuriamą pulsą nepriklausomai nuo panaudotos terpės pasipriešinimo ypatybių.

Šių ypatybių kombinacija garantuoja aukštai transfekcijos lygį be didelio ląstelių pakenkimo, kas dažnai atsitinka elektroporuojant milisekundžių srityje.

Minkšti Impulsai

Per elektroporaciją, ląstelės membrana įkraunama iki įtampos, kurioje ląstelės membrana yra (grįžtama) pralaidi. Impulso trukmės (t.y. laikas pastovioji T) naudojama Multiporatoriumi ® augalų ir gyvulių ląstelėms yra paprastai tarp 15 - 100 μ s. Per šį periodą, pro membraną prasiskverbia, kai prasiskverbimo įtampa yra viršyta. Tai priveda prie didelio membranos pralaidumo padidėjimo, kurį galima nagrinėti kaip porų atsidarymą membranoje.

Jei išorinė įtampa yra tūkstantis kartai ilgesnė (kaip yra atvejais su milisekundžių trukmės impulsais), aukšta elektros srovė, tekanti per ląsteles, sukelia sunkius pakenkimus ląstelėms. Negrįžtamas pakenkimas membranos funkcijoms ir genomui gali būti sukeltas..

Papildomai Minkštas impulsas Multiporatoriuje® matuojamas be perstojo ir iš naujo reguliavo kiekvienas 5 μ s. Šis unikalus elektroninis reguliavimas įgalina nepaprastai aukštą atkuriamumą.

Todėl, Multiporatorius® garantuoja nepaprastai aukštai transfekcijos greičius.

Multiporatoriaus® buferio sistema

Impulso terpė su žemu elektriniu laidumu garantuoja, kad elektros srovė yra smarkiai sumažinta per elektroporaciją ir todėl sumažėjas ląstelių reikšmingo pakenkimui pavojus. Be to, tokia terpė garantuoja, kad elektriškai sukeltos "poros" yra daug didesnės negu tos kurios gaunamos impulso laidžiuose terpėse pagalba (1).

Multiporatorius® yra specialiai suprojektuotas tokioms žemo laidumo impulso terpėms.

pH reikšmių poslinkiai

Jei elektros srovė trunka ilgą laiką, vandens elektrolizė vyksta ant kiuvetės elektrodų. Kai paduodamas milisekundės impulsas, pH vertė tiesiogiai ant elektrodų pasikeičia labai. pH pokyčiai šarminiame ir rūgštiniame srityje yra nefiziologiniai ir gadina ląsteles. Priešingai, Multiporatorius® jokių reikšmingų pakeitimų pH verčių atžvilgiu aplink elektrodus nėra.

Išlaisvinimas aliuminio per elektroporaciją

Vienkartinės kiuvetės paprastai turi aliumininius elektrodus. Aliuminis yra apsaugo elektrodus ir rūgštinės ir šarminėmis sąlygomis. Bet pH poslinkis kiuvetėje, kuris gali įvykti po milisekundės trukmės impulso, priveda prie atsiradimo didelių kiekių citotoksinių aliuminio jonų impulso terpėje. Multiporatoriaus Minkštas Impulsas trukdo bet kokiam aliuminio koncentracijos padidėjimui kiuvetėje, kuris yra kenksmingas ląstelėm.

Hypoosmoliarinės sąlygos

Hypoosmoliarinio impulso terpė turi daug mažiau osmotiškai aktyvios medžiagos negu kultūros terpė ar fiziologiniai buferiniai, tokie kaip PBS. Hypoosmoliarinėje terpėje, ląstelė sugeria vandenį ir išsipučia. Ir ląstelė, ir jos branduolys įgauna ašapvalintą formą, ir ląstelės membrana tampa atskirta nuo citoskeleto, tuo būdu daug lengvina ląstelės elektroporaciją.

Na⁺/K⁺ jonų gradientas ląstelėje

Eukarijotinės ląstelės sukuria natrio ir kalio jonų gradientą koncentracijoje per ląstelės membraną. Kai elektroporacija priverčia membraną tapti labai laidžia, (ypatingai mažiems jonams), Na⁺/K⁺, gradientas išnyksta. Natrio jonų buvimas elektroporacijos buferyje (PBS, pavyzdžiui) sudaro blogesnę situaciją, kadangi Na⁺ jonai patenka į ląstelę. Su K⁺ jonais, kaip yra Multiporatoriaus® elektroporaciniai buferiai neleidžia natriui įeiti į ląstelę ir, be to, sustabdo K⁺ gradiento sumažėjimą.

Multiporatoriaus ® ir buferinės sistemos Bendra veikla

1. Multiporatoriaus eksploatacijos kokybė gaunama iš prietaiso ir impulso terpės kombinacijos. Multiporatoriumi ® išduoda Minkštą Impulsą, kuris priveda prie švelnaus ląstelės membranos prasiskverbimo. Elektronikos pagalba reguliuojama įtampos kreivė garantuoja aukštą eksperimentų atkuriamumą. Kombinacijoje su Multiporatoriumi ®, ypatingas elektroporacinis buferis įvykdo kelias skirtingas funkcijas.
2. Žemas elektrinis laidumas trukdo didelei elektros srovei ir iš to sekantiems pH verčių pasikeitimams, nes tai trukdo aliuminio jonų citotoksiniam padidėjimui.
3. Žemas impulso terpės osminis slėgis leidžia ląstelei išsipūsti ir suapvalėti, tokiu būdu sudaromos galimybės lengvesniai ir geriau vldomai elektroporacijai.

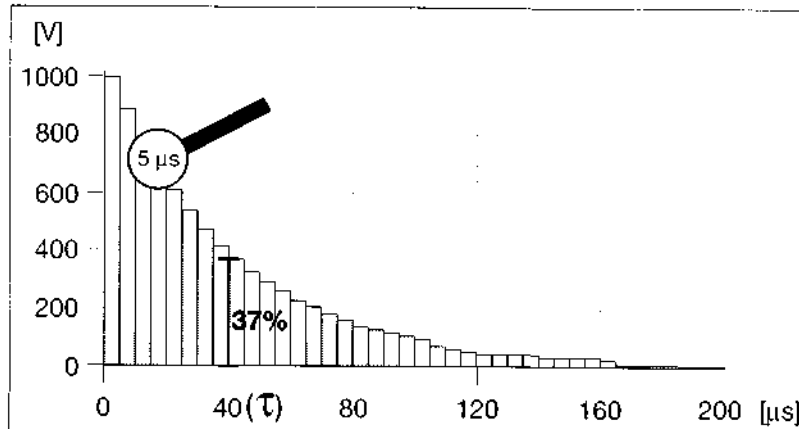
Buferio jono sudėtis palaiko Na⁺/K⁺ ląstelių gradientą.

Prietaiso ir terpės bendra veikla yra atsižvelgtas rezultatas visų šitų fundamentalių elektroporacijos faktorių.

Biofiziniai Multiporatoriaus technikos pagrindai

Svarbūs parametrai sėkmingai elektroporacijai yra įtampa ir impulso trukmė. Abu faktoriai gali būti nustatyti tiesiogiai Multiporatoriumi®. Parametrai pagrindinėms medžiagoms gali būti surasti gausiuose egzistuojančiuose sąlygose, pasiekiamose Eppendorf'o svetainėje www.eppendorf.com. Naujos sąlygos, rekomenduojamos vertės optimaliai impulso įtampai gali būti apskaičiuotos ar gali būti paimtos iš atitinkamų puslapių. (Žr, Sec 3.1 ir 4.1.4).

Įtampa ir impulse trukmė



Pav. 1: Valdoma eksponentinė Multiporatoriaus® mikrosekundės impulso įtampos gėsimas

Impulso įtampa koreguojama kas 5 μ s. Laiko pastovioji x (τ), impulso įtampa nukrenta žemyn į 37 % jos pradinės vertės. Pradinė impulso įtampa ir laiko pastovioji x yra vieninteliai parametrai, kurie apibrėžia Multiporatoriaus mikrosekundės impulsą.

Multiporatoriaus® nustatyta įtampa atitinka pradinę įtampą (V_0) krintančios kreivės Pav. 1. Laiko pastovioji (x) yra laiko tarpas reikalingas įtampai nukristi iki reikšmės V_e (= apytikriai 37 % nuo pradinės įtampos). Pvz, jei įtampa 1,000 V ir laiko pastovioji 40 μ s buvo nustatyta Multiporatoriumi®, pradinė įtampa minkšto impulso yra 1,000 V. Po 40 μ s, ši įtampa nukris iki apie 370 V. Per šias 40 ms, Multiporatoriaus® elektroninis valdymas bus reguliavęs įtampą 8 kartus (t.y. 5 μ s intervalais).

Tarpo plotis ir lauko jėga

Kadangi elektrinio lauko jėga priklauso nuo atstumo tarp elektrodų, elektroporavimo kiuvetės su tarpo pločiu 1 mm, 2 mm, ar 4 mm skirtinga lauko jėga (= impulso įtampa [V] / kiuvetės tarpo plotis [cm]). Kaip 100 μ l 1 mm apimties kiuvete yra nepaprastai maža, elektroporacija eukarijotinių ląstelių yra normaliai atliekama, naudodamas kiuvetes su tarpu 2 mm (400 μ l) ar 4 mm (800 μ l). Jei įtampa 800 V yra nustatyta Multiporatoriumi®, lauko 2 000 V/cm jėga yra pagaminta, kai 4 mm kiuvete yra panaudotos. Tačiau, jei kiuvete su tikrai 1 mm tarpo pločiu yra panaudotas tame pačiame nustatyme, lauko jėga yra 8 000 V/cm! Dėl šios priežasties, tam tikras dėmesys turi būti atkreiptas į tipą kiuvete, panaudoto bandymams.

Laiko stiprumo skaičiavimas

Kritiška lauko jėga, kuri yra būtina membranos elektropermeation gali būti apskaičiuota maždaug. Kad padarytų taip, grubus ląstelės skersmens nustatymas (d) turi būti padarytas. Pagrįstas nustatytu skersmeniu, kritiška lauko jėga gali būti apskaičiuota, naudodama kitą formulę:

$$E_c = V_c / (0.75 \times d)$$

E_c Kritinė lauko įtampa [V / cm]

V_c Membranos prasiskverbimo įtampa [1 V prie 20 °C/ 2 V prie 4 °C]

d ląstelės diametras [cm]

Sekančiame pavyzdyje 20 μm diametro (2×10^{-3} cm) ląstelei prie kambario temperatūros:

$$E_c = 1 \text{ V} / (0.75 \times 2 \times 10^{-3} \text{ cm}) E_c \\ = 667 \text{ V/cm}$$

Kad apskaičiuotų įtampą, kuri turi būti nustatyta Multiporatoriumi®, reikia padauginti lauko jėgą E_c iš kiuvetės tarpo pločio. Mūsų pavyzdyje, minimali įtampa $667 \text{ V/cm} \times 0.2 \text{ cm} = 133 \text{ V}$ turi būti nustatyta 2 mm kiuvetei. 4 mm kiuvetei, dukart ši vertė ($667 \text{ V/cm} \times 0.4 \text{ cm} = 267 \text{ V}$) yra reikalinga.

Kai elektroporacija yra atlikama 4 °C temperatūroje, E_c vertė bus dukart didesnė negu vertė kambario temperatūroje (todėl, kad $V_c = 2 \text{ V } 4 \text{ °C}$).

Prie kritiško lauko stiprumo E_c , porų formuojasi tarp ląstelių polių, orientuotų lauko kryptimi, per kuriuos mažos molekulės ar jonai gali praeiti. Galima išbandyti "poros susidarymą", nedelsiant naudojant propidium iodide. Raudona šių dažų fluorescencija gali būti aptikta, kai jis buvo įtrauktas į ląstelę ir surišo su nukleino rūgštimi. Tačiau, didelėms molekulėms, tokioms kaip nukleino rūgštis, panaudotos vertės turi būti aukštesnės negu kritiška lauko jėga E_c . Atveju sulaikymo ląstelių, ideali vertė tam, kad įvestų plasmid DNR į ląstelę yra normaliai 1 - 3 kart daugiau negu kaip E_c . Lipnioms ląstelėms, vertė 1 - 5 kart daugiau negu kaip E_c yra būtina, kad įvestų DNR į ląstelę.

! Eppendorfas kaupia žingsnis po žingsnio taikomasias Multiporatoriaus® sąlygas daugeliui dažnai panaudotų ląstelės linijų, kurios gali būti surastos Eppendorfo svetainėje www.eppendorf.com !

Minkšto impulse trukmė

Kaip anksčiau minėta, mikrosekundės impulsas yra idealus labai efektyviam, švelniam elektroporavimui. Bendra taisyklė yra tokia, kad didelių ląstelių prasiskverbimui reikalingas ilgesnis grįžtamasis membranos laikas. Multiporatoriumi®, impulsas su laiko pastoviaja tarp 5 us ir maksimumo 100 us, yra normaliai naudojami elektroporacijai. Šitie laikai pritaikyti, kad tiktų Multiporatoriaus® buferinei sistemai.

Naujų sąlygų optimizavimo strategija visiem tinkamiems parametrams (pavyzdžiui: lauko jėga, impulso ilgis), detaliam apibūdinti šitame skyriuje.

Kad garantuoti, kad maksimumas transfekcijos greitis yra pasiektas, elektroporacijos parametrai turi būti optimizuoti kiekvienai naujai ląstelės linijai. Šis skyrius - nurodymai tam, kad nustatyti idealius parametrus taip paprastai ir tiek greitai kiek galima.

3.1 Lauko stiprumo Optimizavimas

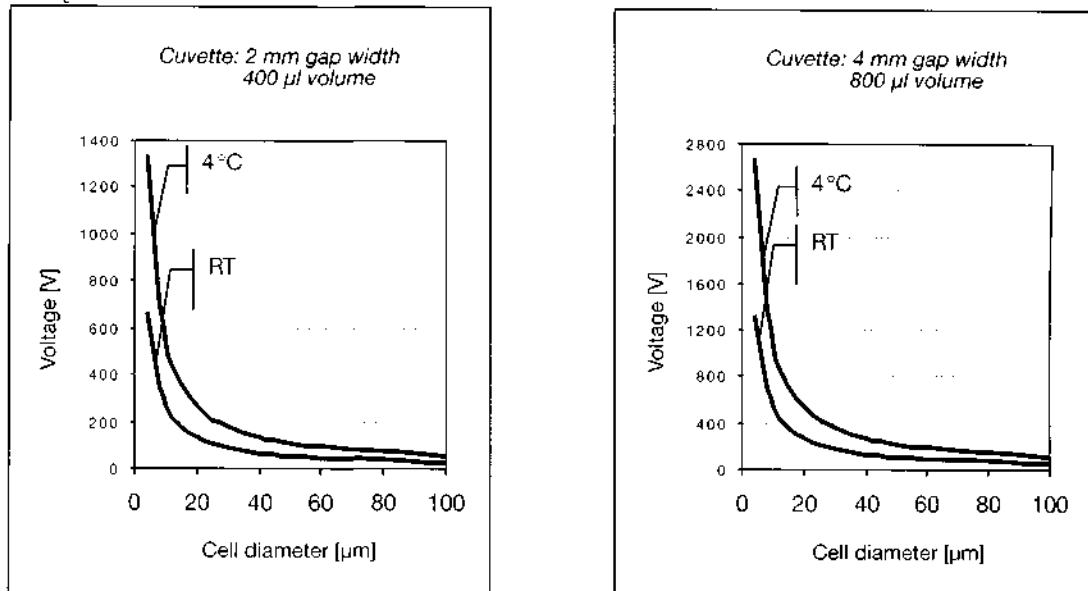
Impulso Elektrinio Lauko jėga (V/cm) yra būtinas faktorius kad nustatyti panaudotų ląstelių išlikimo kiekiui taip pat transfekcijos kiekiui.

Jei impulso lauko jėga viršija būdingą vertę (= kritiška išorinei lauko jėgai), grįžtamasis prasiskverbimas įvyksta ląstelės membranoje. Ši vadinamoji prasiskverbimo įtampa smarkiai priklauso nuo ląstelės skersmens ir temperatūros, kurioje elektroporacija vyksta. Diagramos 2 pav. rodo prasiskverbimo įtampą, kuri turi būti nustatyta priklausomai nuo ląstelės skersmens ir temperatūros, kurioje elektroporacija yra įvykdyta. Ląstelės skersmuo yra nustatytas po to, kai ląstelės buvo veistos elektroporacijos buferyje 10-15 minučių (žr. Sec. 3.4 + 7.1).

Be to, į kiuvetės tarpo plotį turi atsižvelgti, kai minimali impulso įtampa yra nustatyta. Jei tarpo plotis yra dvigubintas, impulso įtampa turi taip pat būti dvigubinta, kad gautų tą pačią lauko jėgą. Bendra taisyklė, nustatydami idealią lauko jėgą tokią, kad mažoms ląstelėms reikalingas aukštesnė lauko jėga, kad pasiektų membranos prasiskverbimą. Impulso

Įtampa 2 pav. ir 2 lentelė (16 puslapis) yra minimalios vertės, kuriose pro membraną gali prasiskverbti. Tačiau, priklausomai nuo ląstelės tipo panaudotas, optimalus transfekcijos efektyvumas dažnai pasiekiamas žymiai aukštesnėje įtampoje. Kad nustatyti optimalią impulso įtampą, patartina atlikti seriją bandymų, kuriuose minimali vertė, dviguba vertė ir paskui triguba vertė, parodyta 2 Lentelėj (16 puslapis), yra panaudoti sulaikymo ląstelėms, ir iki penkių kartų vertei lipnioms ląstelėms. Ląstelės, kurios neįgauna apvalintos formos elektroporacija buferyje dažnai reikalingas net aukštesnės impulso įtampos anksčiau, negu optimalus transfekcija galės įvykti.

Prašom atkreipti dėmesį, kad impulso įtampos didėjimas gali padidinti transfekcijos greitį, bet, tuo pačiu metu, gali taip pat padidinti ląstelės mirtingumo koeficientą.



Pav. 2: Minimali impulso įtampa, kada prasiskverbia pro ląstelės membraną

Minimali impulso įtampa priklauso nuo ląstelių diametro, elektroporacinio buferio temperatūros ir tarpo tarp kiuvetės elektrodų.

Pavyzdys

| | |
|-----------------------------------------------------|-----------------------|
| Ląstelių tipas: | ląstelių suspncija |
| Ląstelių diametras: | ~ 20 urn |
| Tarpas tarp kiuvetės elektrodų : | 2 mm |
| Temperatūra kiuvetėje: | kambario temperatūra |
| Minimali impulso įtampa pagal diagramas: | ~ 130 V |
| Serijs bandymų tam, kad optimizuoti impulso įtampą: | 130 V / 260 V / 390 V |

3.2 Lauko impulse trukmė

Be lauko jėgos, svarbus faktorius sėkmingam transfekcijai yra pulso ilgis.

Impulso ilgis priklauso pirmiausiai nuo ląstelės skersmens: kuo didesnė ląstelė, tuo ilgesnis impulsas, reikalingas membranos prasiskverbimui.

Patirties būdu, pasirodė, idealūs impulso ilgiai elektroporacijoje buvo 40 - 100 μ s kambario temperatūroje ir 15 - 40 μ s 4 °C. Kad optimizuoti impulso trukmę, trys skirtingi impulso ilgiai turi būti išrinkti aukščiau minėtų sričių viduje.

3.3 Impulsų skaičius

Daugumai ląstelių linijų, elektroporacija yra atlikama su vienu impulsu. Jei pasirodo, kad vieno impulso nepakanka, gali būti panaudoti du ar daugiau impulsai, kad pasiekti pageidaujamą rezultatą, su 60 sekundžių intervalu tarp impulsų, reikalingo kad leisti ląstelės membranai regeneruoti. Per daugkartinį impulsavimą, Multiporatorius® automatiškai palaiko šį intervalą tarp kiekvieno impulso. Nesugadinta ir iš atsinaujinusi ląstelės membrana yra būtina sąlyga membranos potencialo padidėjimui, kuris yra būtinas elektroporacijai. Be to, ląstelės pasisuka per šią regeneracijos fazę (Brauno judėjimas), kuris faktiškai atmeta tolimesnį "sužalojimo" pavojų, sukkelto kito impulso į tą pačią membranos sritį.

3.4. Elektroporacijos buferio paruošimas

Išankstinė sąlyga sėkmingai elektroporacinei su Multiporatoriumi® yra ypatinga buferinė sistema su žemu elektriniu laidumu. Geriausi transfekcijos rezultatai yra gauti vartojant originalius Eppendorfo buferius

Tačiau, vartotojai gali taip pat pasigaminti buferius patys. (žr.. 7.3).

Idealiai, elektroporacija turi būti atliktas hypoosminiame buferyje, kuriame ląstelė prieš impulsą sugeria vandenį ir paskui išsiučia. Tuo pasiekama sumažinta optimali prasiskverbimo įtampa pro plazminę membraną.

Daugumos ląstelės tipų, patalpintos 20-30 minučių inkubacijos laikui hypoosminiame buferyje. Tačiau, inkubacija hypoosminiame buferyje gali sukelti apoptozę labai jautriose ląstelėse. Todėl, smarkiai rekomenduojama išbandyti ląstelių į hypoosminį buferį sąlygas. Lengviausias būdas padaryti taip yra, patalpinti ląsteles 30 minučių hypoosminiame buferyje ir paskui nustatomas gyvybingumo žymės, tam naudojamas trypanas mėlynas ar propidio jodidas. Jei po mikroskopu atskleidžiamas suirimas daugiau kaip 10 % ląstelių, buferio osminis slėgis turi būti padidintas, prisidėdant isoosminio buferio. Kad nustatytų optimalų osminį slėgį, patartina laikyti ląsteles hypo-ir isoosminiuo buferio skirtingo sumaišymo santykiuose 30 minučių prieš bandymą (žr. 1 lentelė, 13 puslapis). Šis 30 minučių periodas yra maksimalus inkubacijos laikas elektroporacinio buferio ląstelėms sistemoje. Naujas gyvybingumo testas, atliekamas stebint po mikroskopu, nustato ląstelių osminį slėgį, kuris gali būti toleruotas.

Nepriklausomai nuo pasirinktos buferinės sistemos, būtina garantuoti, kad ląstelės nepaliekamos elektroporaciniam buferyje ilgiau negu 30 minučių.

Elektroporacijos transfekcijos efektyvumas priklauso nuo koncentracijos, grynumo ir panaudotų molekulių dydžio.

a) Nukleino rūgšties koncentracijos įtaka

Su optimaliais elektroporacijos parametrais (osminis slėgis, įtampa, impulso trukmė), rezultatų kokybė yra paprastai pakankama, gautų plazminėse 5 µg/ml - 20 µg/ml koncentracijose..

Transfekcijos efektyvumas gali būti pakeltas, didinant nukleino rūgšties koncentraciją, bet tikrai apribotos koncentracijos srityje. Testai su įvairiomis skirtingomis ląstelės linijomis parodė kad tikrai labai retais atvejais (pavyzdžiui, kai didelės plazmidės buvo panaudotos), plazmidžių, koncentracijos daugiau kaip 20 µg/ml priveda prie transfekcijos greičio padidėjimo (žr. 3 pav.) .

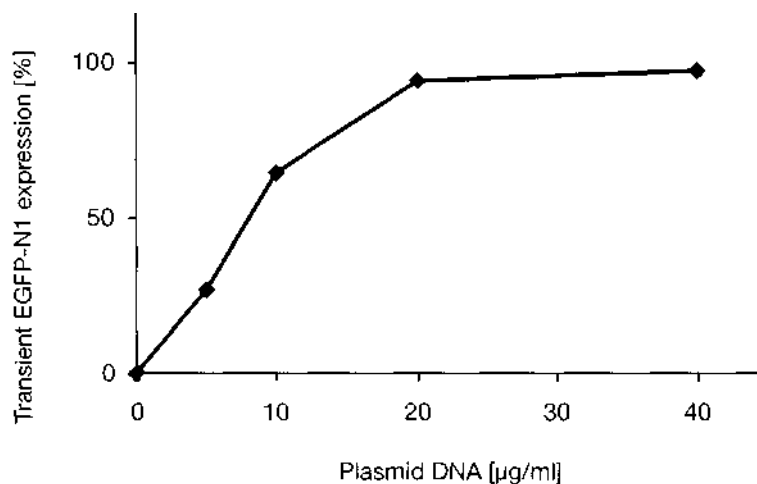


Fig. 3: Pav.3: Transfekcijos efektyvumas NIH-3T3 ląstelėse dėl DNR koncentracijos (ug/ml). Ląstelės buvo elektroporuotos su skirtingomis pEGFP-N1 koncentracijomis. Transfekcijos greitis (max. = 100 %), buvo nustatytas FACS analizės būdu..

b) Nukleino rūgšties grynumo įtaka

Empirinis studijavimas parodė, kad EDTA ir druskos tokios kaip HEPES, ar TRIS gali drastiškai sumažinti transfekcijos efektyvumą. Todėl rekomenduojame ištirpinti nukleino rūgšt distiliuotame vandenyje prieš pat transfekciją. Nepriklausomai nuo panaudoto pasiruošimo metodo, DNR/RNR turi būti ultragrynas (A260 nm/A280 nm > 1.8). Taip pat svarbu panaudoti endotoksina-laisvą DNR. Kitaip DNR koncentracijos padidėjimas prives prie endotoksinų padidėjimo ląstelių suspencijoje..

c) Plazmidžių dydžio įtaka

Transfekcijos efektyvumas taip pat priklauso nuo molekulos dydžio, kuri yra įvesta į ląstelę. Tai reiškia, kad optimalūs elektroporacijos parametrai, kurie buvo nustatyti tam tikrom plazmidėm, turi būti pakeisti, priklausomai ar didesnės ar mažesnės plazmidės yra naudojamos.

3.6 Temperatūros įtaka

Temperatūra turi tiesioginį poveikį ląstelės membranos prasiskverbimo įtampos dydžiui, o taip pat kaip membranos regeneracijos laikui po elektroporacijos.

a) Temperatūros įtaka ląstelės membranos prasiskverbimo įtampai

Kadangi prasiskverbimo įtampa prie 4 °C turi būt dukart didesnė, negu kambario temperatūroje, būtina atsižvelgti į temperatūrą, nustatant optimalią impulso lauko jėgą. Todėl, prie 4°C elektroporacijos, būtina impulso lauką padidinti taip pat beveik dukart, lyginant su įtampos reikšme esant kambario temperatūrai. Tačiau, žinduolių ląstelės yra paprastai elektroporuojamos kambario temperatūroje.

b) Temperatūros įtaka ląstelės membranos regeneracijai

Laikymas ląstelių po elektroporacijos žemoje temperatūroje (pavyzdžiui. 4 °C), lėtina atstatomąjį ląstelės membranos procesą. Eukaryotinių ląstelių atveju, membranos porų sandarinimas iš naujo gali užtrukti pusvalandį ir ilgiau su šiomis sąlygomis. Tam tikriems ląstelės tipams, tai gali privesti prie transfekcijos sugertos medžiagos kiekio padidėjimo.

Tačiau, kai kurios ląstelės yra nepaprastai jautrios žemai temperatūrai, ypačingai po prasiskverbimo, ir gali nukentėti po trumpo inkubacijos laiko šaltoje aplinkoje nuo negrįžtamo pakenkimo .

Tais atvejais, kur elektroporacijos prie 4 °C priveda prie didesnės transfekcijos greičio, ląstelių išlikimo galimybės gali būti pakeltos, jei jos yra patalpintos iš naujo elektroporacijos buferyje 37 °C ar kambario temperatūroje, atvėsinaamos iki 4 °C ir paskui perkeliamos į iš anksto atšaldytą kiuvetę. Po elektroporacijos, ląstelės yra paliekamos 4 °C maksimum dviem minutėm ir vėl atšildomos iki 37 °C.

Elektroporacija aukštesnėje temperatūroje (pavyzdžiui > 25 °C), priverčia membranos sritis, pro kurias prasiskverbiamas, regeneruoti ir tokiu būdu didina ląstelės išlikimo greitį. Tačiau, transfekcijos greitis gali būti žemesnis negu gautas, kai elektroporacijos atliktos žemoje temperatūroje

c) Temperatūros įtaka tirpalo laidumui

Temperatūra turi įtaką elektroporacijos buferio laidumui. Temperatūros didėjimas sukelia tirpalo laidumo didėjimą ir tuo mažina transfekcijos greitį. Dėl šios priežasties, patartina nedirbti prie temperatūros daugiau kaip 33 °C.

3.7 Ląstelių tankio įtaka

Ląstelės tankumas 1×10^6 ląstelės/ml yra rekomenduotas efektyviai elektrinio lauko elektroporacijai. Kai didelis ląstelių tankumas ($> 3 \times 10^6$) panaudotas, vienaarūšio lauko sąlygos negali būti garantuotos, t.y. ląstelės nėra daugiau vienodai sustatytos elektriniam laukui. Tai gali privesti prie ląstelių susiliejimo ir priversti transfekcijos greitį mažėti.

Tačiau, naudojant ląstelių tankumą $< 1 \times 10^6$ ląstelės/ml neturi turėti jokio neigiamo efekto transfekcijos greičiui.

Specifiniai ląstelių taikomos sąlygos yra pasiekiamos Eppendorf'o svetainėje www.eppendorf.com. Sąlygų sąrašas yra atnaujintas reguliariai. (Protokolas Jurkat yra įtrauktas į 8.4 Priedą).

Jei jokių taikomų elektroporacijai sąlygų nėra nagrinėtam ląstelės tipui, kitos bendrosios eukariotinių ląstelių gairės gali būti panaudotos.

Kad gautume geriausius transfekcijos rezultatus, mes rekomenduojame nustatyti optimalius bandymo elektroporacijos parametrus. Informacija apie kaip optimizuoti parametrus gali būti surasta Sec. 3, "Elektroporacijos parametrų optimizacija".

4 Electroporacijos sąlygos

4.1 Ląstelių paruošimas

4.1.1 Mycoplasma

Mycoplasma trukdo efektyviam ir atkuriamam ląstelių elektroporavimui. Todėl būtina išbandyti ląsteles mycoplasma buvimui. Yra keli pasiekiami testai. Vienas bendras metodas yra DNR fluorochrome dažymas. Šis testas yra pagrįstas DNR dažymu, naudodamas Hoechst dažus 33258 ar DAPI, kuris daro mycoplasma-specifinį DNR matomą po fluorescencijos mikroskopu. Jautriausias metodas kai aptiktų mycoplasma yra prie PCR. PCR detektavimo komplektai yra komerciškai pasiekiami, bet reikalauja daugiau laiko sąnaudų ir brangesnis negu anksčiau minėti metodai.

4.1.2 Ląstelių kultūra

Vygdant elektroporaciją, ląstelės turėjo jau kelis vystymosi ciklus. Ne naujai ištirpintos ar neseniai vežtos ląstelės turi būti panaudotos kadangi ši papildoma įtampa turėtų neigiamą efektą ant transfekcijos greičiui.

Transfekciją vygdant, reikia kad ląstelės turi būti eksponentinėje vystymosi fazėje..

4.1.3 Elektroporacinio buferio osmosinio slėgio nustatymas

Elektroporacijai su Multiporatoriumi® turi būti idealiai pagamintas hypoosmosinis elektroporacinis buferis. Ląstelių tolerancija į hypoosmosines sąlygas turi būti išbandyta parengiamajame bandyme (žr. Sec. 3.4).

4.1.3.1 Lipnių ląstelių derliaus nuėmimas

Ląstelės turi būti nuimtos tiek švelniai kiek galima. Pagal ląstelės tipą, kiti metodai gali būti panaudoti:

- Dispase (koncentracija: 0.01 į 0.1 % w/v). Pasirodė, tai buvo švelniausias metodas tam, kad imtų derlių.
- Trypsin (HPLC-rūšis, be EDTA, 0.1 į 0.25 % w/v). Ankščiau po trypsino pridėjimo, ląstelės turi būti išplautos mažiausiai dukart su PBS, be Ca²⁺ + ir Mg²⁺ +.
- Gramdykite ląsteles atsargiai nuo kultūros indo pagrindo.

4.1.3.2 Tolerancijos į hypoosmolarinį buferį sąlygas išbandymas

- Ląstelės yra augintos hypoosmolariniame elektroporacijos buferyje 30 minučių kambario temperatūroje. Po inkubacijos, ląstelių išlikimo greitis yra nustatomas gyvybingumo dažymu.
- Trypano mėlis: dažo negyvas ląsteles, stebima pro mikroskopą
- Propidio jodidas: dažo negyvas ląsteles, stebima pro florescentinį mikroskopą.

Jei ląstelių išlikimo greitis yra > 90 %, hypoosminis buferis gali būti panaudotas grynoje formoje elektroporacijai. Jei daugiau, negu 10 % ląstelių sujra, elektroporacinio buferio turi būti nustatytas optimalus osminis slėgis. Bandymų serijoje, ląstelės yra laikytos 30 minučių buferiuose su palaipsniui didėjimu osminiu slėgiu. Šitie buferiai yra pagaminti, sumaišant skirtingas apimtis hypoosmolar ir isoosmolar elektroporacinius buferius. Mes rekomenduojame pabandyti osminio slėgio buferius pagal 1 lentelę.

Lentelė 1 Eppendorfo Hypoosmolar ir Isoosmolar Elektroporacijos Bufferiai kad sureguliuotų pageidaujama osminį slėgį (galutinė apimtis: 10 ml).

| Desired osmolarity | Hypoosmolar Buffer (ml) | Isoosmolar Buffer (ml) |
|--------------------|-------------------------|------------------------|
| 90 mOsmol/kg | 10 | 0 |
| 150 mOsmol/kg | 6.8 | 3.2 |
| 200 mOsmol/kg | 4.2 | 5.8 |
| 250 mOsmol/kg | 1.6 | 8.4 |
| 280 mOsmol/kg | 0 | 10 |

Naudojant gyvybingumo dažymo nustatymo metodiką, gali būti nustatytas optimalus elektroporacinio buferio osminis slėgis. Žemiausias osminis slėgis, kuriame išlikimo reikšmė > 90 % yra pasiekiamas-gali būti panaudotas elektroporavimams.

4.1.4 Ląstelės skersmens nustatymas

Kadangi ląstelės dydis yra svarbus faktorius Multiporatoriui® parametru nustatymui, jis turi būti įvertintas po inkubacijos 10 - 15 minučių elektroporaciniame buferyje. Tiksliausi matmenys gali būti įvykdyti su elektroniniais instrumentais, tokiais kaip Coulter skaitykle ar Scharfe CASY. Kaip alternatyva, ląstelės skersmuo gali būti įvertintas po mikroskopu. Tai gali būti įvykdoma esančio okuliaro pagalba ar gali būti maždaug numatoma pagalba Neubauer skaičiavimo kameros ar mikrogrotelių pagalba.

Po to, kai ląstelės skersmuo buvo įvertintas, randama minimali impulso įtampa, kurioje pro ląstelės membraną gali prasiskverbti (žr. o 2 Lentelė). Optimali impulso įtampa elektroporacijos bandymui gali būti 2 - 3 kart aukštesnė ląstelių suspencijai ir 2 - 5 kart aukštesnė lipnioms ląstelėms.

Lentelė 2

Minimali impulso įtampa prie kurių ląstelės membranos atvertos, santykis su ląstelės skersmeniu po 10-15 minučių inkubacijos elektroporavimo buferyje, temperatūroje ir kiuvetės atstume tarp elektrodų. Priklausomai nuo ląstelės linijos, optimali impulso įtampa elektroporavimo bandymams gali skirtis dviem - penki kartais.

| Ląstelių diametras [Mm] | Įtampa 2-mm kiuvetė room temp. | Įtampa 4-mm kiuvetė room temp. | Įtampa 2-mm kiuvetė 4 °C | Įtampa 4-mm kiuvetė 4 °C |
|----------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 5 | 530 | 1100 | 1100* | - |
| 10 | 270 | 540 | 540 | 1100 |
| 15 | 180 | 360 | 360 | 710 |
| 20 | 130 | 260 | 260 | 530 |
| 25 | 110 | 220 | 220 | 430 |
| 30 | 90 | 180 | 180 | 360 |
| 35 | 80 | 160 | 160 | 310 |
| 40 | 70 | 140 | 140 | 270 |
| 45 | 60 | 120 | 120 | 240 |
| 50 | 50 | 100 | 100 | 210 |
| 60 | 40 | 80 | 80 | 160 |
| 80 | 30 | 60 | 60 | 120 |

* maksimali įtampa naudotina eukarijotiniam moduliui Multiporator® yra 1200 V.

4.1.5 DNA paruošimas

DNR turi būti ultragrynas (A260/A280 > 1.8) ir be endotoksino. Po paskutinio valymo žingsnio, jis turi būti <iš naujo ištirpintas tiesiogiai bidistiliuotame vandenyje.

4.1.6 Temperatūros pasirinkimas

Elektroporacija gali būti atlikama kambario temperatūroje ar 4 °C (žr. Sec. 3.6). Bandymai, kad nustatytų naujas sąlygas normaliai vyksta kambario temperatūroje.

Tačiau, jei elektroporacija vyksta 4 °C, kad pasiekti aukštesnes transfektijos reikšmes, ląstelės neturi pasilikti atšaldytos daugiau kaip dvi minutes prieš atšildymą iki 37 °C.

4.2 Electroporavimo procedūros

1. Electroporacijos sąlygos turi būti optimizuotos kiekvienai ląstelės linijai, kuriai joks specifinis taikomas protokolai nėra pasiekiamas. Kitas protokolai yra bendrosios gairės eukariotinių ląstelių electroporacija. Kad nustatytumėte optimalias electroporavimo sąlygas aukščiausiam transfekcijos efektyvumui, prašom kreiptis į 3 Skyrių.
2. Įsitinkite, kad ląstelės yra paimitos eksponentinėje vystymosi fazėje.
3. Atskieskite ląsteles kultūros terpėje 0.5 - 1 % FCS ir nustatykite ląstelių skaičių .
4. Iš naujo paruoškite ląsteles Eppendorfo Electroporacijos Buferyje (kamb.temp. ar 4 °C) su nustatytu osminiu slėgiu ir nustatykite ląstelių koncentraciją tarp 1 x 10⁶ ir 3 x 10⁶ ląstelės/ml, ar truputį žemiau..

Dėmesio: **Inkubacijos laikas Eppendorfo Electroporacijos Buferyje neturi viršyti 30 minučių, kad garantuotų sėkmingą electroporaciją!**

4. Įpilate ląstelės suspensiją (400 ul kiuvetė su 2 mm tarpu ir 800 ul kiuvetė su 4 mm tarpu) Eppendorf. Pridėkite DNR (galutinė koncentracija 5 iki 20 ug/ml) ar baltymų (galutinė koncentracija 10 iki 100 ug/ml) ir sumaišote. Vygdate atšaldytą electroporaciją 4 °C, iš anksto aušinkite kiuvetes ant ledo.
5. Rūpinkitės, kad jokie oro burbulai nebūtų kiuvetėje.
6. Electroporacija: (Multiporatorius® nustatymai)
Mode: ® Eukaryotic ląstelės
Įtampa (U): Kad naudoti optimalios įtampos impulsai Multiporatoriumi ®, patartina įvykdyti seriją bandymų su keliomis impulso įtampomis.
Lipnioms ląstelėms: tarp 1 iki 5 kartų minimali impulso įtampa išdėstyta 2 lentelėje.
Ląstelių suspensijai: tarp 1 iki 3 kartų minimali impulso įtampa išdėstyta 2 lentelėje.
Laiko pastovioji (X): kamb.temp. 40 - 100 μs
Prie 4 °C 15 - 40 μs

impulsų skaičius (n): 1

7. Po impulsų, leiskite ląstelės suspensijai pasilikti kiuvetėje 5 - 10 minučių. Jei electroporacija buvo atlikta 4 °C, kiuvetė turi būti padėtas ant ledo maksimumui 2 minutėms po impulso ir po to turi būti patalpinta vandeninėje vonioje 8 minutėms 37 °C.
8. Atsargiai perneškite ląstelės suspensiją iš kiuvetės naudojant Pasteur pipetes ir kultivuokite ją 3-5 ml kultūromis. Garantuokite, kad aliumininiai elektrodai nėra sugadinti, kad neužteršti aliumininii jonų citotoksinais .
Pastaba: Po impulse, kad atsistatytų membrana, prieš centrifugavimą, ląstelės inkubuojamos 2 - 3 valandom 37 °C .

4.3 Paskesnis ląstelių apdorojimas

Po to, kai ląstelės buvo transformuotos į kultūros terpę, jos neturi būti paveiktos purtymo ar ilgalaikio transportavimo..

4.4 Transfekcijos ląstelėse efektyvumo nustatymas

Priklausomai nuo ląstelės tipo ir plazmidžių naudojimo, poveikis gali būti aptiktas 24 - 48 valandų laikotarpiu, kai transfekcija įvyko. Kai kuriais atvejais (pavyzdžiui. pirminės ląstelės), gali būti ir ilgesnis laikas.

Jei transfekcijos bandymai pasirodo neokie kaip laukti, naudinga informacija gali būti surasta šiame gedimų aprašyme.

Specifinių problemų sąrašas, sukeltų įvairovės faktorių, nuo kurių tyrėjas gali lengvai atsiriboti, optimizuodamas specifines sąlygas, kurios yra trumpai apibūdintas čia žemiau ir bendrais bruožais aprašytos Sec. 3 ir 4.

5. Gedimai

| Problema | Galima priežastis | Sprendimas / komentaras |
|----------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Žemas išlikimo lygis | Impulsas per stiprus. | Tikrinkite ląstelės dydžio nustatymą (Sec. 4.1.4) ir minimalią lauko jėgą, pagrįsta šiuo dydžiu (2 Lentelė). Pažymėkite, kad elektroporacijai tarpo plotis kiuvetėje, temperatūra - turi būti atsižvelgta. |
| | Impulsas per ilgas. | Sutrumpinkite impulso trukmę, kad sumažintumėte ląstelės membranos prasiskverbimą. Tai gali padidinti ląstelių išlikimo rodiklį. Pažymėkite, kad optimali impulso trukmė yra paveiktas temperatūros, kurioje elektroporacija vykdoma (Sec. 3.6). |
| | per daug impulsų paduota. | Sumažinkite impulsų skaičių. Daugialypis tų pačių membranos sričių prasiskverbimas gali privesti prie negrįžtamo plazminės membranos pakenkimo. |
| | Buferio laidumas per didelis | Tikrinkite savo elektroporacinio buferio laidumą naudodamas tinkamą matavimo prietaisą. Buferiai su laidumu > 4 mS/cm gali privesti prie pažeminto inkorporacijos greičio. Žemas laidumas Eppendorfo elektroporacijos buferiui yra rekomenduotas. Pridėjimas plasmidžių DNR, ištirpinto buferiniame tirpale vietoj distiliuoto vandens, gali taip pat padidinti laidumą. |
| | Ląstelės per ilgai randasi elektroporacijos buferyje. | Jei ląstelių inkubacija elektroporacijos buferyje viršija 30 minučių, gali atsirasti apoptozė tam tikruose ląstelės tipuose. Sutrumpinkite bandymo trukmę, atlikdami konkrečius žingsnius skubiau, trumpindami plovimo procedūrą prieš impulsą, ar sutrumpinkite ląstelių inkubacijos laiką po impulso. (Dėmesio: inkubacijos laikas 5 - 10 minučių kambario temperatūroje turi būti išlaikytas. Tada perleiskite ląsteles į kultūrinę terpę ir auginkite 37 °C). Prieš bet kokią centrifugavimą po impulso, ląstelės turi būti laikomos 2 - 3 valandas 37 °C, kad užsigarantuoti ląstelės membranos atsistatymą. |

| Problema | Galima priežastis | Sprendimas / komentaras |
|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | Geno produktas turi turėti nuodingą ląstelėi poveikį. | Genai paruošti savarankiškai arba aukštas genų paruošimo greitis gali turėti nuodingą ląstelių poveikį. Palankiausias sąlygos! plamidžių koncentracija turi būti išbandyta individualiai kiekvienam ląstelės tipui ir kiekvienai plazmidei. |
| | Po impulso, ląstelės inkubuojamos per ilgai žemoje temperatūroje (4 °C). | Besaikis inkubacijos laikas ant ledo gali privesti prie ląstelės nekrozės. Inkubacijos laikas ant ledo neturi viršyti 2 min. |
| | Ląstelės pažeistos Auginimo procedūroje. | Naudojant tripsiną per didelės koncentracijos ar nepakankamo švarumo Ląstelių auginime auga jų mirtingumo lygis. Tripsinas HPLC- (žr. 4.1.3.1) rekomenduotinas. |
| | Osminis slėgis elektro- | Žemas elektroporacijos buferio lygis poracijos buferio per žemas. gali priversti jautrias ląsteles išsipūsti iki tokio lygio, kad jos sprogs per elektroporaciją. Šis padarinys gali būti pratestuotas gyvybingumo ląstelių dažymo metu 2-3 valandas po elektroporacijos (Sec. 4.1.3.2). Padidinkite elektroporacijos buferio isoosmoliarino slėgio kiekį, kad pakeltumėte osminį slėgį ir pakartotumėte gyvybingumo testą. |
| | Ląstelės stresuotos. | Per elektroporaciją, ląstelės turėjo likti kultūroje keliems ciklams. Naujai ištirpintos ar neseniai atvežtos ląstelės yra streso sąlygoje ir negali būti panaudotos nedelsiant. |
| Žemas transfekcijos lygis | Ląstelės užterštos | Mycoplasma trukdo sėkmingai ląstelių mycoplasma. elektroporacijai su Multiporatoriumi®. Ląstelių kultūros turi būti tikrintos mycoplasma vienodais intervalais. (Sec. 4.1.1). |
| | Impulsas per silpnas. | Impulsas su žema lauko jėga gali būti per silpnas, kad įvyktų prasiskverbimas pro ląstelės membraną. Tikrinkite ląstelės dydžio nustatymą (Sec. 4.1.4) ir minimalią lauko jėgą, pagrįsta šiuo dydžiu (2 Lentelė). Atsižvelgti į kiuvetės tarpo plotą ir elektroporacijos temperatūrą. |

Problema

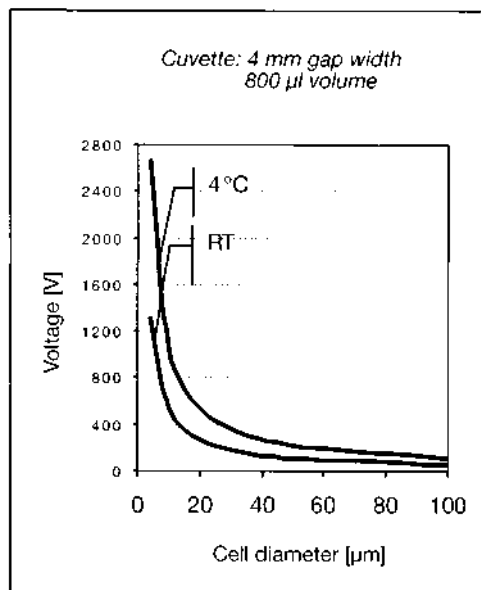
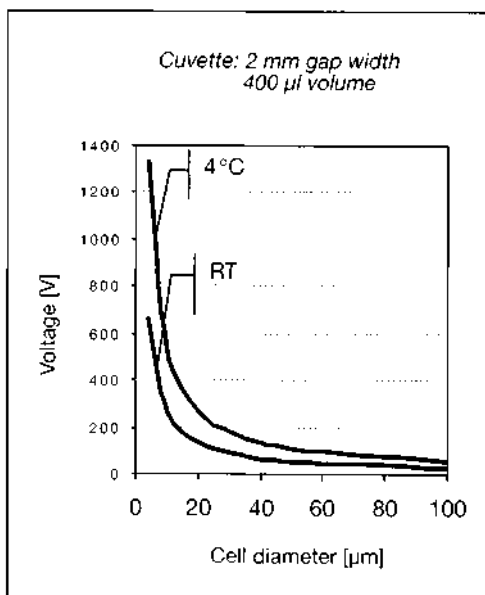
Galima priežastis

Sprendimas / komentaras

| | |
|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Impulsas per trumpas. | Padidinkite impulso trukmę, kad padidintumėte ląstelės membranos pralaidumą, kuri gali privesti prie aukštesnio transfekcijos greičio. Atkreipkite dėmesį, kad optimali impulso trukmė yra veikiama temperatūros. |
| DNA koncentracija | Jei transfekcijos greitis yra per žemas, Per žema / per didelė. ir ląstelių gyvybingumas yra aukštas, plazmidžių koncentracija gali būti padidinta. Atkreipkite dėmesį, kad padidinta plazmidžių koncentracija gali privesti prie aukštesnio transfekcijos greičio tikrai tam tikroje plazmidžių koncentracijos srityje viduje. |
| Didelės plasmidės buvo naudotos. | Plazmidžių dydis gali labai paveikti transfekcijos greitį. Kai didelės plasmidės yra panaudotos, gali prireikti padidinti membranos prasiskverbimą, pritaikant impulsus su aukštesne lauko jėga. Būkite atsargus, kadangi tai gali taip pat privesti prie aukštesnio ląstelės mirtingumo koeficiento. |
| Ląstelių tankis per aukštas. | Jei ląstelės tankumas per aukštas per elektroporaciją, elektrinio lauko tolygumas negali būti garantuotas. Sumažinkite ląstelių koncentraciją kiuvetėje į 1 - 3 x 10 ⁶ ląstelės/ml ar mažiau. |
| Elektroporacijos paruošime Naudotas EDTA ar endotoksinai. | EDTA ir endotoksinai turi cytotoksinių padarinių. Jie yra dažnai įvedami į elektroporacijos ruošimą, kai DNR yra pridėtas (pavyzdžiui. TE buferyje). Išimkite EDTA, atlikdami buferinį keitimą su bidistiliuotu H ₂ O. Endotoksinai gali būti išimti, naudojant "beendotoksinines" plasmides paruošimo kompleksus. |
| Inkubacijos periodas genų | Po transfekcijos, skirtingom ląstelės tipams ekspresijai per trumpas. reikalingi skirtingi inkubacijos laikai, kad pasiektų jų maksimalią ekspresiją. |
| Tyrimo problemos | Įtraukite teigiamas kontroles, kurios rodo kad tyrimo sistema dirba tinkamai. |
| Ne-reprodukuojami rezultatai | Plovimo procedūra prieš elektroporaciją buvo Terpės pėdsakai gali turėti įtaką elektroporacijos buferio laidumui, ne pakankama. ir tai tuo pačiu transfekcijos rezultatai. Todėl, terpės superplūduriuojančiame turi būti kruopščiai pernešama per plovimo procedūrą. |

| Problema | Galima priežastis | Sprendimas / komentaras |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | kiuветė buvo naudota keletą kartų. | Vartojant elektroporatoriaus kiuvetę kelis kart gali atsirasti nevienarūšis elektrinis laukas per elektroporaciją. Tikrai naujos kiuvetės rekomenduotinos svarbiems bandymams |
| | Ląstelės augintos | Ląstelių auginimas skirtingose terpėse skirtingose terpėse. priveda prie nepakartojamų transfekcijos rezultatų. Ląstelės turi visada būti imamos eksponentinėje vystymosi fazėje. |
| | Elektroporacinių buferių laidumas nepastovus | Patikrinkite laidumą savo ruošų buferių (naudodami tinkamą matavimo prietaisą). Apibrėžtas laidumas yra visada garantuojamas Eppendorfo elektroporacijos buferiuose. |
| Nėra transfekcijos | Impulso nebuvo tirpale, Blogas kontaktas tarp kiuvetės Elektrodo ir Multiporatoriaus | Patikrinkite kiuvetę ir kiuvetę lizdą ar gerai įstatyta |

6. Priedai



Pav. 4a:

6.1 Minimalios įtampos Muitiporatoriumi nustatymas ©

Minimali impulso įtampa, kurioje pro ląstelės membraną prasiskverbiamą

Minimali impulso įtampa priklauso nuo ląstelės skersmens po 10-15 minučių inkubacijos elektroporacijos buferyje. Taip pat ji priklauso ir nuo temperatūros ir kiuvetės tarpo pločio. Šitos savybės, parodytos kaip grafike (4a) ir kaip (4b) lentelėje, gali būti panaudotos, kad nustatyti optimalią impulso įtampą Muitiporatoriumi ©. Optimali impulso įtampa gali būti 2 - 3 kart aukštesnė ląstelių suspencijai ir 2 - 5 kart aukštesnė lipnioms ląstelėms.

| Ląst.Diametras l [urn] | Įtampa 2-mm kiuvete kamb. temp. | Įtampa 4-mm kiuvetė kamb. temp. | Įtampa 2-mm kiuvetė 4 °C | Įtampa 4-mm kiuvetė 4 °C |
|---------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 5 | 530 | 1100 | 1100* | * |
| 10 | 270 | 540 | 540 | 1100 |
| 15 | 180 | 360 | 360 | 710 |
| 20 | 130 | 260 | 260 | 530 |
| 25 | 110 | 220 | 220 | 430 |
| 30 | 90 | 180 | 180 | 360 |
| 35 | 80 | 160 | 160 | 310 |
| 40 | 70 | 140 | 140 | 270 |
| 45 | 60 | 120 | 120 | 240 |
| 50 | 50 | 100 | 100 | 210 |
| 60 | 40 | 80 | 80 | 160 |
| 80 | 30 | 60 | 60 | 120 |

* Maksimali įtampa naudojama eukarijotiniame modeliuje Muitiporator© yra 1,200 V. Pav. 4b

6.2 Hypoosminiai ir isoosminiai buferiai elektroporacijos tirpalams gaminti (10ml)

| Norimas osminis slėgis | ml hypoosminio buferio (ml) | ml isoosminio buferio |
|------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| 90 mOsmol/kg | 10 | 0 |
| 150 mOsmol/kg | 6.8 | 3.2 |
| 200 mOsmol/kg | 4.2 | 5.8 |
| 250 mOsmol/kg | 1.6 | 8.4 |
| 280 mOsmol/kg | 0 | 10 |

Lentelė 3

6.3 Elektroporacijos buferių sudėtis

Eppendorfo Elektroporacijos buferių sudėtis yra pratestuota sekantiems svarbiems kriterijams:

- Laidumas
- pH reikšmė
- Osminis slėgis
- Sterilumas
- Mycoplasma
- Endotoxinai
- Pyrogenai
- Cytotoxinai

| | Poration (hypoosmolar) | Poration (isoosmolar) |
|---------------------------------|------------------------|-----------------------|
| Sterilus bidestiliuotas vanduo | Fill up to 1000 ml | Fill up to 1000 ml |
| KCl | 25 mM | 25 mM |
| KH ₂ PO ₄ | 0.3 mM | 0.3 mM |
| K ₂ HP0 ₄ | 0.85 mM | 0.85 mM |
| myo-Inositol * | ad 90 mOsmol/kg | ad 280 mOsmol/kg |
| pH value | 7.2 ±0.1 | 7.2 ±0.1 |
| Laidumas 25 °C | 3.5 mS/cm ±10% | 3.5 mS/cm ±10% |

- Myo-Inositol grynumas gali kisti priklausomai nuo partijos. Jis turi būti gana grynas, kad garantuotų, 280 mOsmol/kg bidistiliuotame vandenyje, laidumas 10 mus/cm nėra viršytas. Individualių myo-Inositol partijų laidumas turi būti išmatuotas anksčiau, negu buferis yra paruoštas.

6.4 Electroporacija eukariotinių ląstelių sąlygos, pagrįstos Jurkat

Multiporator® Transfektijos Sąlygos

Jurkat

Ląstelių linija: Jurkat, T-lymphocyte, human leukemia (suspension cell line)

Transfektacija su: plasmid pEGFP-N1 (in bidistilled H₂O)

Electroporacijos buferis: Eppendorf hypoosmolar electroporation buffer (PH)

Kultūros terpė: RPMI 1640 / 10 % FCS

Kiuvetė: Eppendorf, 2-mm gap width, 400 ul

Temperatūra: RT (20 to 25 °C)

Reference: Prof. Ulrich Zimmermann phone: +49 931 888 4508
Lehrstuhl für Biotechnologie fax: +49 931 888 4509
Biozentrum Universität Würzburg e-mail:
Am Hubland, D-97074 Würzburg, zimmerma@biozentrum.uni-wuerzburg.de
Germany

1. Ląsteles paimamos eksponentinėje vystymosi fazėje ir centrifuguojamos (5 -10 minutčių, 200 x g, kambario temperatūroje).
2. Iš naujo sudėkite ląsteles RPMI 1640 / 0.5 % FCS, nustatykite ląstelių skaičių ir išplaukite jas. (5 -10 minutės, 200 x g, kambario temperatūroje).

Pastaba: **Inkubacijos laikas electroporacijos buferyje neturi viršyti 30 minučių, kad garantuotų sėkmingą electroporaciją.**

3. Iš naujo sudėkite ląsteles hypoosminio slėgio electroporacijos buferyje. Darydamas taip, nustato ląstelės koncentraciją prie 1×10^6 ląstelių/ml.
4. Įdėkite ir sumaišykite plazmidės DNA (5 - 20 µg/ml galutinė koncentracija, bidistiliuotame H₂O).
5. Transfer 400 ul cell suspension into electroporation kiuvetės (2-mm gap width).
The cell suspension must be free of air bubbles.
6. Electroporacija:
Mode: Eukaryotes " @ "
Įtampa (V) 240 V
Laiko pastovioji (T) 40 us
Impulsų skaičius (n) 1
7. Po impulso, palikite ląstelių suspensiją kiuvetėje 5 - 10 minučių kambario temperatūroje.
8. Atsargiai perneškite ląstelių suspensiją iš kiuvetės į 3 - 5 ml RPMI 1640 /10 % FCS ir auginkite 60-mm kultūros induose.
9. **Transfektijos detekcijos metodai:**

Plazmidžių ekspresija pEGFP-N1 aptinkama po 24 - 48 valandų pagalba FACS analizės; arba fluorescenciniu mikroskopu.

Rezultai

Gyvbingumo kiekis: 70 to 85 %

Transfektijos kiekis: 65 to 80 % pagrįstas išgyvenusių ląstelių skaičiumi .

55 % pagrįstas pradinio ląstelių panaudotų bandymui skaičiumi .

Resultai buvo matuoti po transfektijos praėjus 24 valandom.