

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**
(Н И У « Б е л Г У »)

ИНСТИТУТ ФАРМАЦИИ, ХИМИИ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА БИОЛОГИИ

**ИЗУЧЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ МАКРОФАГОВ ПРИ
ИЗМЕНЕНИИ ПРОНИЦАЕМОСТИ МЕМБРАН КЛЕТОК
РАЗЛИЧНЫМИ СПОСОБАМИ**

Выпускная квалификационная работа
обучающегося по направлению подготовки 06.03.01 Биология
очной формы обучения, группы 11001519
Ладоке Кайоде Бель Крист

Научный руководитель
к.б.н. Зубарева Е.В.

БЕЛГОРОД 2019

Оглавление

Введение.....	3
Глава 1. Обзор литературы	4
1.1. Биологический метод, вирус опосредованного трансфера гена.....	5
1.2. Методы невирусной доставки генов. Физические методы трансфекции...	6
1.2.1. Электропорация как наиболее эффективный физический метод трансфекции	9
1.3. Методы невирусной доставки генов. Химические методы трансфекции (липopleксы, полиплексы, катионные наночастицы)	15
1.3.1. Липофекция	17
1.3.2. Химическая трансфекция с помощью полиплексов	18
1.4. Трансфекция РНК	19
Глава 2. Материалы и методы исследования	20
Глава 3. Полученные результаты и их обсуждение	28
Выводы.....	33
Список использованных источников.....	34
Приложения.....	42

Введение

Исследование изменения проницаемости мембран клеток под влиянием электрических импульсов позволит подобрать оптимальные условия (характеристики электрических импульсов, компоненты среды, в которой выполняется электропорация, осмотическое давление) для проведения трансфекции эукариотических клеток.

Объектом исследования явились мононуклеарные клетки человека.

Предметом исследования – проницаемость мембран клеток.

Цель исследования: изучить жизнеспособность макрофагов при изменении проницаемости мембран клеток при использовании различных условий электропорации.

Задачи исследования:

1. Освоить методику выделения моноцитов из периферической крови доноров-добровольцев, культивирования и дифференцировки мононуклеарных клеток.
2. Выполнить электропорацию клеток с использованием различных режимов.
3. Изучить жизнеспособность клеток после выполнения электропорации различными способами.

Выпускная квалификационная работа изложена на 45 страницах. Она состоит из оглавления, введения, трех основных глав, выводов. Список использованных источников насчитывает 70 наименований. В работе используются 1 таблица, 12 рисунков, 1 приложение.

Глава 1. Обзор литературы

Трансфекция – это процедура, в ходе которой происходит введение чужеродных нуклеиновых кислот в клетки с целью их генетической модификации [Kim, Eberwine, 2010]. В соответствии с современными задачами, метод трансфекции расширяется, выходя за рамки переноса лишь нуклеиновых кислот, и включает также трансфер пептидов, белков и антител. Остаются нерешенными вопросы токсичности, иммуногенности, онкогенности генетического материала и кратковременности экспрессии генов [Соловьева и др., 2011].

Трансфекция является мощным аналитическим инструментом, предназначенным для решения ряда исследовательских задач и терапевтического применения [Kim, Eberwine, 2010; Hamm et al, 2002; Gresch, 2004]. Например, введение экзогенной ДНК в клетку млекопитающего представляет собой мощный механизм влияния на процессы сигнальной трансдукции [Cai et al, 2005], трансфер гена в клетки первичных культур имеет большое значение для функциональной геномики, разработки лекарственных препаратов, генно-опосредованной медицины [Gresch, 2004]. В связи с чем существует потребность совершенствования существующих технологий трансфекции нуклеиновых кислот в эукариотическую клетку. Для осуществления переноса используются преципитация фосфатом кальция, липофекция, электропорация, вирусные методы, DEAE-декстран трансфекция, введение плазмид с помощью нанотрубок [Hamm et al, 2002; Cai et al, 2005].

Интродуцированный генетический материал (ДНК и РНК) существует в клетке в виде стабильных или в виде временных структур, в зависимости от природы вводимого вещества [Kim, Eberwine, 2010]. При стабильной трансфекции, введенный генетический материал, который обычно имеет ген-маркер для селекции (трансгены), вводится в геном хозяина и поддерживает экспрессию трансгена даже после репликации клетки [Kim, Eberwine, 2010;

Recillas-Targa, 2006; Glover et al, 2005]. В отличие от стабильно трансфицированного генетического материала, временно трансфицированные гены экспрессируются в течение ограниченного периода времени и не включаются в геном. Временно трансфицированный материал может быть утрачен в результате действия факторов внешней среды или деления клеток, таким образом, выбор стабильного или временного способа трансфекции зависит от задач эксперимента. Основная цель трансфекции – изучение функции генов или продуктов генов, путем усиления или угнетения специфической экспрессии генов в клетках, а также производство рекомбинантных белков в клетках млекопитающих [Kim, Eberwine, 2010; Wurm, 2004]. Например, при генной терапии в клетку доставляется ген, который позволит вылечить заболевание или справиться с симптомами; индуцированная генерация плюрипотентных стволовых клеток путем трансфицирования трех или четырех факторов транскрипции; процедуры нок-дауна малых интерференционных РНК (siRNA); и производство человеческого тканевого активатора плазминогена яйцеклетками Китайского хомяка для терапевтических целей [Kim, Eberwine, 2010; Wurm, 2004; Pfeifer, Verma, 2001; Takahashi, Yamanaka, 2006; Hamilton, 1999].

Методы трансфекции в широком плане классифицируются на три группы: биологические, химические и физические [Kim, Eberwine, 2010].

1.1. Биологический метод, вирус опосредованный метод трансфера гена

Вирус опосредованная трансфекция также известна как трансдукция [Pfeifer, Verma, 2001]. Рекомбинантные векторы, полученные при использовании вирусов, чаще всего используются для переноса гена в клетки первичных культур. Вирусные векторы имеют преимущество высокой эффективности трансдукции, по сравнению с невирусными методами.

В то же время, данные методы страдают определенными ограничениями, такими как трудоемкий, отнимающий много времени,

процесс конструкции векторов, повышенные затраты на выполнение лабораторных работ, в связи с необходимостью обеспечения высокого уровня безопасности, ограничение размера вводимого элемента и возможность появления иммуногенных и онкогенных реакций. Таким образом, вирусные векторы, применяющиеся в настоящее время в клинических исследованиях, не соответствуют требованиям безопасного трансфера гена [Соловьева и др., 2011; Gresch, 2004; Thomas et al, 2003]. Так как вирусные векторы интегрируются в геном организма-хозяина случайно, что может привести к разрыву гена опухолевого супрессора, активации онкогенов или нарушению структуры генов, необходимых для обеспечения жизнедеятельности организма.

Примерами являются *Herpes simplex virus*, *Adeno virus*, *Adeno-associated virus*, *Sindbis virus* [Kim, Eberwine, 2010; Pfeifer, Verma, 2001; Hacein-Bey-Abina et al, 2002; Roesler et al, 2002; Woods et al, 2003].

Трансдукция клеток ретро-, ленти- или аденовирусами демонстрирует значительный потенциал, однако применение таких векторов имеет значительные ограничения [Helledie et al, 2008]. Известно, что технологии, разработанные с применением вирусов, характеризуются появлением отрицательного эффекта при применении *in vivo*. Было показано, что ретровирусы вызывают развитие онкологии у мышей; также сообщалось о гибели людей при аденовирусной терапии [Helledie et al, 2008; Bangari, Mittal, 2006; Bushman et al, 2005; Flotte, 2007; Li, 2002; Marshall, 1999].

1.2. Методы невирусной доставки генов. Физические методы трансфекции

Методы невирусной доставки генов включают физические и химические методы трансфекции [Gresch, 2004; Li, Ma, 2001; Niidome, Huang, 2002]. Физические методы являются наиболее новыми методами, которые включают использование различных устройств для доставки нуклеиновой кислоты.

Физические методы включают:

- Электропорацию – метод, при котором области клеточной мембраны повреждаются под действием электрического импульса, образуются отверстия в мембране, и нуклеиновая кислота входит в цитоплазму клетки. Наиболее широко распространенный физический метод. Однако точный механизм неизвестен;

- Биолистический трансфер гена – (биолистический – сокращенно от биологический и баллистический [Sanford, Smith, 1993; Mehierhumbert, Guy, 2005]) введение в клетку частиц, покрытых ДНК (используется «генная пушка»). Частицы должны быть нетоксичными, инертными, и иметь меньший размер, чем клетка-мишень (в основном, 1-1,3 мкм). Очищенная ДНК осаждается на этих микрочастицах, а затем постепенно высвобождается после бомбардировки [Mehierhumbert, Guy, 2005]. Метод требует наличия дорогостоящего оборудования, вызывает физическое повреждение образцов. Основным применением этой технологии является генетическая иммунизация, мишенью является кожа [Mehierhumbert, Guy, 2005; Wang et al, 2004; Eisenbraun et al, 1993; Larregina et al, 2001]. Подход также был использован для генной вакцинации, иммуномодуляции и терапии, уничтожающей гены, и использующейся для лечения рака [Mehierhumbert, Guy, 2005]. Эффективность метода определяется несколькими параметрами: загрузкой ДНК на частицы, размером частиц и временем доставки [Mehierhumbert, Guy, 2005].

- Микроинъекция (механический метод, непосредственное введение материала) – перенос ДНК в клетку (или в ядро клетки) с помощью микрокапилляров, АСМ зондов. Представляет собой микрохирургическую процедуру, которая выполняется на единичной клетке, с использованием точного позиционирующего устройства (микроманипулятора) для того, чтобы контролировать перемещение микропипетки и микроинъектора. Введение жидкости, содержащей генетический материал, через микропипетку происходит с использованием гидростатического давления. Инъекции обычно

выполняются при осуществлении непосредственного контроля экспериментатором с помощью микроскопа. Концептуально, микроинъекция является простым методом доставки гена, однако существует ряд трудностей при ее применении, в том числе, только одна клетка может быть трансфицирована в ходе выполнения процедуры [Mehierhumbert, Guy, 2005].

- Лазер опосредованная трансфекция (известная также как оптопорация или фототрансфекция) предполагает использование лазерного импульса для иррадиации клеточной мембраны и формирования временных пор [Shirahata et al, 2001; Barrett et al, 2006; Yao et al, 2008; Schneckenburger et al, 2002]. Когда лазер образует поры в мембране, нуклеиновые кислоты, которые находятся в среде, трансфицируются в клетку в связи с осмотической разностью, которая существует между средой и цитозолем. Лазерный метод позволяет наблюдать за трансфекцией одиночной клетки и формировать поры в определенных частях клетки. Метод может быть применен в отношении клеток, имеющих очень маленькие размеры, но требует дорогостоящей системы лазер-микроскоп.

- Сонопорация – трансфекция отдельной клетки с использованием ультразвука. Ультразвук охватывает широкий диапазон частот и форм волн, но внимание сфокусировано, в основном, на сонопорации с использованием синусоидальных волн мегагерцевых частот. Полагали, что акустическая кавитация является основным механизмом, опосредующим сонопорацию. Кавитация оказывает механическое воздействие и разрушение активных пузырьков и связанное с этим высвобождение энергии способно пермеабиллизировать примыкающие клеточные мембраны. Оптимизация опосредованного ультразвуком трансфера гена связана с несколькими факторами, включая частоту преобразователя, акустическое давление, длительность импульсов и длительность экспозиции [Mehierhumbert, Guy, 2005].

- Трансфекция с использованием магнитных наночастиц (магнетотрансфекция) [Shirahata et al, 2001; Barrett et al, 2006; Yao et al, 2008;

Schneckenburger et al, 2002; Mehier-Humbert, Guy, 2005; Martinou et al, 1995; Ikeda et al, 1995; Lo et al, 1994; O'Brien, Lummis, 2006; Inoue, Krumlauf, 2001; Kim et al, 1996; Dobson, 2006; Sherer et al, 2002].

1.2.1. Электропорация как наиболее эффективный физический метод трансфекции

Наиболее простым способом введения ДНК в клетку является электропорация, или электропермеабиллизация [Mehierhumbert, Guy, 2005]. Изначально электропорация разрабатывалась для переноса генов, однако сегодня данный метод используется для доставки множества молекул: ионов, лекарственных средств, красителей, меченных атомов, антител, олигонуклеотидов, РНК и ДНК [Gehl, 2003; Neumann et al, 1999; Prausnitz et al, 1993; Suzuki et al, 1998; Tsong, 1987; Chen, 2006].

В ходе данного метода мембрана клетки подвергается действию высокоинтенсивных электрических импульсов, которые способны вызвать временную и четко локализованную дестабилизацию барьера. В ходе такого воздействия мембрана клетки становится высокопроницаемой для экзогенных молекул, например, ДНК, присутствующих в окружающей среде [Mehierhumbert, Guy, 2005]. Это временное пермеабиллизованное состояние может быть использовано для того, чтобы загрузить клетку различными молекулами, либо путем простой диффузии, в случае с небольшими молекулами, либо путем процессов, движимых электрофоретически, в случае трансфера ДНК [Gehl, 2003].

Механизм электропорации на сегодняшний день до конца не выяснен. Непосредственное наблюдение электропорации затруднено в связи с небольшой пространственной локализацией и быстрым временным интервалом процесса. Теории электропорации делятся на две большие категории: те, которые характеризуют взаимодействие поля и мембраны, которое не включает формирование пор, и те, которые включают стохастическое описание формирования пор. При этом теории, включающие

стохастический компонент формирования пор, способны объяснить ключевые особенности электропорации и поэтому более широко распространены [Chen, 2006]. На сегодняшний день, модель формирования водных пор является наиболее общепринятой для объяснения электропорации.

Основными этапами электропорации являются следующие:

- 1) Действие электрических импульсов в микросекундном-миллисекундном диапазоне, которые являются достаточными для формирования временного повышенного транс-мембранного потенциала, обычно 200 мВ–1 В, и результирующего электрического поля через мембрану порядка 10^8 В/м (при средней толщине мембраны около 5 нм);
- 2) Зарядка мембраны в связи с потоком ионов;
- 3) Быстрая локальная перестройка молекулярной структуры мембраны;
- 4) Формирование пор, которые пронизывают мембрану и заполняются молекулами воды (так называемые водные или гидрофильные поры);
- 5) Повышение величины ионного и молекулярного транспорта через мембрану клетки на несколько порядков;
- 6) При некоторых обстоятельствах, и последующем удалении внешнего поля, восстановление мембраны.

При общем рассмотрении известно, что, чем меньше радиус клетки, тем более интенсивным должно быть внешнее поле, чтобы достичь пермеабилитации. По этой причине, электрические поля, необходимые для осуществления трансфекции клеток млекопитающих, значительно ниже, чем поля, необходимые для пермеабилитации, например, бактерий. Так же очевидно, что митохондрии, или другие внутриклеточные органеллы не будут пермеабилитованы теми электрическими полями, которые используются для пермеабилитации клеточных мембран [Gehl, 2003].

Основными механизмами молекулярного транспорта через мембрану в процессе электропорации являются диффузия, электрофорез и электроосмос. Показано, что диффузия играет ключевую роль при перемещении небольших

молекул, тогда как транспорт макромолекул, например ДНК, представляет собой многоступенчатый процесс электрофоретически опосредованного взаимодействия молекулы ДНК с дестабилизированной мембраной [Chen, 2006].

Особенностью современных методов электропорации является использование очень непродолжительных импульсов, в диапазоне нескольких наносекунд, при очень высоком напряжении. При таком подходе мембраны органелл клетки могут быть электропорированы без пермеабилзации клеточной мембраны. Это возможно в том случае, когда импульсы настолько короткие, что время перезарядки клеточной мембраны не достигается [Gehl, 2003]. Трансмембранный потенциал покоя клетки важен не только для порога пермеабилзации, он также определяет последовательность событий. Пермеабилзация будет происходить изначально на полюсе клетки, ориентированном к положительно заряженному электроду, в связи с отрицательным зарядом внутри клетки в этом месте емкость мембраны повысится в первую очередь при действии внешнего поля. Вторым событием будет пермеабилзация полюса клетки, обращенного к отрицательно заряженному электроду. Степень пермеабилзации (площадь мембраны, которая будет пермеабилзована) на полюсе клетки, ориентированном к положительному электроду, можно контролировать путем изменения амплитуды импульса, то есть, чем выше амплитуда импульса, тем большей будет площадь, через которую будет иметь место диффузия. Степень пермеабилзации может быть управляема за счет изменения длительности импульса (а также числа импульсов), то есть чем более длительным будет импульс, тем большими будут изменения мембраны в заданной области. Было показано, что область мембраны, которая подвергается пермеабилзации больше на части клетки, обращенной к положительно заряженному электроду, а степень пермеабилзации выше на полюсе клетки, обращенной к отрицательно заряженному электроду [Gehl, 2003; Tekle et al, 1990].

Электрофоретический эффект поля является причиной, по которой полианионные молекулы ДНК перемещаются к положительно заряженному электроду, исследования с использованием флуоресцентных меток показывают, что ДНК входят в клетку через полюс, ориентированный к отрицательно заряженному электроду, где мембрана является более дестабилизированной, и где поле способствует движению ДНК в сторону центра клетки [Gehl, 2003; Golzio et al, 2002]. После того, как ДНК попадает в клетку, клетка активно участвует в дальнейшей обработке ДНК, что происходит с затратой АТФ [Gehl, 2003].

Тогда как формирование в процессе электропорации пор происходит в микросекундном диапазоне, для запечатывания мембраны требуются минуты [Gehl, 2003]. После действия электрического импульса на мембрану, воздействие значительной электрической энергии (характеризующееся трансмембранной напряженностью около 1 В) сменяется электрической энергией, характеризующейся на несколько порядков меньшей величиной (потенциал покоя). Данный потенциал не снижается мгновенно до нуля за счет появления пор, так как сопротивление (импеданс) пор значительно повышается [Chen, 2006]. Время, необходимое для закрытия мембраны, зависит от параметров электрического поля, температуры и состава мембраны. Также было показано, что для закрытия образовавшихся пор необходимо участие цитоскелета [Gehl, 2003]. Существуют свидетельства, что гибель клеток в результате электропорации происходит чаще в условиях *in vitro*, чем в условиях *in vivo*, и причиной является большая потеря внутриклеточных молекул в условиях присутствия значительного внеклеточного пространства, по сравнению с ситуацией, когда клетка находится в составе ткани [Gehl, 2003].

В ходе метода используется пульсирующее электрическое поле, которое делает мембрану клеток проницаемой и позволяет ДНК проникать в делящиеся и не делящиеся клетки. В нескольких сообщениях было показано, что электропорация превосходит по качеству методы липофекции и является

сопоставимой с результатами, получаемыми при использовании вирусов [Hamm et al, 2002; Helledie et al, 2002; Aluigi et al, 2006; Haleem-Smith et al, 2005; Lakshmipathy, 2004].

Процедура электропорации обладает рядом преимуществ при введении в клетку ДНК. Так как ДНК имеет отрицательный заряд, инъецируемая плазмида движется к аноду в электрическом поле, что позволяет ей быть селективно интродуцированной в специфическую область, что затруднительно при использовании векторов, сконструированных на базе вирусов. Кроме того, в связи с тем, что технология электропорации основана на физическом явлении, инъецируемая ДНК может быть введена практически в любую клетку [Tabata, Nakajima, 2001].

Известен метод нуклеофакторной технологии, который является усовершенствованным способом электропорации. Специфическая комбинация электрических сигналов и растворов в зависимости от типа клеток делает технологию уникальной по возможности переноса полианионных макромолекул непосредственно в ядро клетки. Таким образом, клетки с ограниченным потенциалом к делению, в том числе множество высоко значимых с медицинской точки зрения клеток первичных культур, становятся доступными для эффективной трансфекции гена [Gresch, 2004].

Некоторые условия, которые следует соблюдать при выполнении электропорации:

1. Размер клеток обратно коррелирует с интенсивностью внешнего поля, необходимого для пермеабилзации. В связи с этим, необходима оптимизация параметров электропорации для каждого типа клеток. Из этого также следует, что положительный результат скорее будет достигнут в случае гомогенности клеточной популяции. Также расположение клеток имеет значение в том случае, когда клетки не имеют сферическую форму [Gehl, 2003].

2. Температура. Показано, что закрытие пор в мембране после электропорации зависит от температуры, при снижении температуры запечатывание мембраны замедляется. Показано, что снижение температуры

пермеабиллизации и последующее нагревание образцов в условиях CO₂-инкубатора опосредует эффективность трансфера ДНК и повышает жизнеспособность клеток [Gehl, 2003].

3. Пост-импульсные манипуляции. Клетки являются уязвимыми в пермеабиллизованном состоянии, и было показано, что 15 минутное ожидание после выполнения электропорации, в ходе которого происходит закрытие пор в мембране, перед последующим пипетированием клеток способствует повышению их жизнеспособности.

4. Состав электродов и среды. Некоторые исследователи отмечают, что использование среды с низкой электропроводностью для трансфера ДНК сопровождается повышением жизнеспособности клеток и увеличением эффективности трансфекции [Gehl, 2003]. Общепринято, что особое внимание необходимо обращать на содержание кальция в среде, чтобы в ходе электропорации не повысилось содержание этого иона в клетке. Однако некоторые авторы настаивают на использовании буферов, содержащих ионы кальция или магния, при проведении трансфера ДНК, так как это подействует как положительно заряженный «клей» между отрицательно заряженным внешним окружением клетки и полианионной ДНК, приведет к сближению молекул ДНК с мембраной до выполнения процедуры электропорации [Gehl, 2003].

5. Нагревание не является проблемой. Показано, что при использовании стандартных условий электропорации температура повышается менее чем на 1°C [Gehl, 2003].

Электропорация обеспечивает нехимический подход к доставке молекул через клеточную мембрану.

Клиническое применение электропорации может включать: введение ДНК, загрузку клеток лекарственными препаратами, доставку лекарств в опухолевые ткани, локальную генную терапию, слияние изолированных клеток, низко энергетический киллинг клеток, загрузку клеток красителем и

радиоактивно меченными атомами, высвобождение внутриклеточных компонентов, трансдермальную доставку лекарств [Chen, 2006].

1.3. Методы невирусной доставки генов. Химические методы трансфекции (липopleксы, полиплексы, катионные наночастицы)

Химические методы трансфекции являются наиболее широко используемыми методами, применяющимися в современных исследованиях. Были впервые использованы для введения чужеродных генов в клетки млекопитающих [Kim, Eberwine, 2010]. Химические методы включают использование катионных полимеров в комплексе с ДНК (полиплексы) (один из наиболее старых химических методов), фосфата кальция, катионных липидов в комплексе с ДНК (липopleксы) (наиболее популярный метод) и катионных аминокислот [Kim, Eberwine, 2010; Tros de Parduya et al, 2010].

Механизм, лежащий в основе химических методов, является общим для всех его разновидностей. Положительно заряженные химические вещества образуют комплекс с отрицательно заряженной нуклеиновой кислотой. Эти положительно заряженные комплексы, включающие нуклеиновую кислоту и химическое вещество, притягиваются к отрицательно заряженной мембране клеток за счёт электростатических взаимодействий. Точный механизм, характеризующий проникновение комплекса, нуклеиновая кислота/химическое вещество через клеточную мембрану, не до конца изучен, но предполагается, что он происходит за счёт процессов эндоцитоза/фагоцитоза. Трансфецируемая ДНК должна быть доставлена в ядро, механизм проникновения нуклеиновой кислоты в ядро также неизвестен [Kim, Eberwine, 2010]. Предполагается, что белки, пептиды, вирусы и ДНК-белковые комплексы проникают в клетки млекопитающих с помощью процесса рецептор-опосредованного эндоцитоза [Соловьева и др., 2011; Zelpathi, Szoka, 1996; Siczekarski, Whittaker, 2002]. Кроме того, проникновение макромолекул в клетки может происходить по пути клатрин-независимого

эндоцитоза, в том числе с помощью фагоцитоза, макропиноцитоза и кавеоллярных везикул. Ряд исследований показал, что некоторые пептиды способны пересекать мембрану клетки без участия эндоцитозного механизма [Соловьева и др., 2011].

Эффективность трансфекции с помощью химических методов во многом зависит от таких факторов как соотношение нуклеиновая кислота/химическое вещество, рН раствора, состояние клеточной мембраны. Также успешная доставка ДНК зависит от химической структуры катионного реагента, супрамолекулярной структуры липоплексов и полиплексов, особенностей их взаимодействия с клеточной мембраной [Tros de Parduya et al, 2010]. Однако данные методы характеризуются относительно низкой цитотоксичностью, отсутствием мутагенеза. Эффективность химической трансфекции варьирует в зависимости от типа клеток [Kim, Eberwine, 2010]. Широко используемые трансформированные клеточные линии могут быть трансфицированы коммерчески доступными трансфицирующими агентами, такими как Lipofectin[®] и Lipofectamine[®]. Однако другие типы клеток, например, первичные культуры клеток, трудно трансфицировать стандартными методами [Соловьева и др., 2011].

Основным химическим методом является:

- Липофекция – отрицательно заряженные молекулы ДНК связываются с катионными липидными частицами за счет электростатических взаимодействий. ДНК-липидные комплексы входят в клетку путем эндоцитоза/пиноцитоза [Gresch, 2004].

Использование катионных липидов, образующих комплексы с ДНК, широко используется для выполнения трансфекции множества линий клеток [Helledie et al, 2008; Helledie et al, 2002; Fontaine et al, 2003]. Липофекция – быстрый и простой способ, который, однако, может сопровождаться проявлением цитотоксических эффектов, которые потенциально способны влиять на фенотип клеток [Helledie et al, 2002; Uchida et al, 2002]. А также

метод характеризуется сложностью выполнения трансфекции специфических клеток мишеней.

Идеальный метод трансфекции должен характеризоваться высокой эффективностью трансфекции, низкой токсичностью для клеток, минимальным воздействием на физиологические характеристики клеток, а также должен быть прост в применении и легко воспроизводим [Kim, Eberwine, 2010].

1.3.1. Липофекция

Химические методы трансфекции являются широко распространенными, в связи с тем, что они относительно просты, недороги и безопасны. Наиболее эффективными среди реагентов являются катионные липидные реагенты. Химические вещества, предназначенные для выполнения трансфекции, действуют как упаковывающий механизм, который конденсирует и доставляет ДНК в ядро клетки, обычно путем эндоцитоза [Vijayanathan et al, 2002; Hunt et al, 2010]. Липосомальные реагенты, опосредующие химическую трансфекцию, имеют липидный бислой, который окружает ДНК, позволяя ей сливаться с мембраной клетки для доставки ДНК в клетку. Данные реагенты являются перспективными, так как могут быть достаточно легко произведены в больших количествах, используются быстро в ходе реализации высокопродуктивных методик, не приведут к инфицированию и могут трансфецировать ДНК различного размера [Ewert et al, 2008; Muller et al, 2001]. Однако они чувствительны к действию нуклеаз, потенциально губительны и обычно, но не всегда, зависят от стадии клеточного цикла. Было показано, что химическая трансфекция опосредует снижение роста клеток и уменьшает их жизнеспособность, по-видимому, в результате изменения прочности клеточной мембраны [Hunt et al, 2010].

Среди многочисленных систем доставки наибольшее внимание уделяется липосомам, в связи с тем, что в их состав входят встречающиеся в природе липиды, способности к биodeградации, высокой биосовместимости и

относительно низкой иммуногенности. Кроме того, липосомы могут служить для транспортировки различных типов биоактивных грузов в клетки, включая нуклеиновые кислоты, антигены, протеины и небольшие молекулы [Sork et al, 2016; Zuris et al, 2015].

1.3.2. Химическая трансфекция с помощью полиплексов

Одним из направлений развития полиплексных систем доставки нуклеиновых кислот является применение катионных пептидов и белков в качестве генетических векторов. К преимуществам использования пептидов и белков для доставки генов относят: простоту производства и использования рекомбинантных белков, высокую чистоту и однородность, способность направленного транспорта полиплексов (комплексы ДНК-белок) в определенные типы клеток за счет специфичных лиганд-рецепторных взаимодействий, а также отсутствие ограничений на размер и тип доставляемой в клетки нуклеиновой кислоты [Соловьева и др., 2011].

Известно, что ядерные белки, такие как гистоны, конденсируют ДНК и могут быть использованы для трансфекции клеток [Соловьева и др., 2011; Valicki et al, 2002].

Гистоны – положительно заряженные белки, которые взаимодействуют с ДНК путём электростатических взаимодействий, являются основным компонентом хроматина. У гистонов есть специфические сигнальные последовательности – сигналы ядерной локализации (NLS – nuclear localization signal), которые обеспечивают их проникновение в ядро. Таким образом, наличие NLS и значительный положительный заряд позволяет гистонам эффективно конденсировать и переносить рекомбинантные нуклеиновые кислоты [Соловьева и др., 2011].

1.4. Трансфекция РНК

Трансфекция мРНК имеет несколько преимуществ в сравнении с трансфекцией ДНК [Kim, Eberwine, 2010; Yamamoto et al, 2009]. Преимущества включают отсутствие риска интеграции генетического материала в геном хозяина, независимая от клеточного цикла эффективность трансфекции, отсутствие необходимости в векторах, запускающих иммунные реакции, регулируемая и быстрая экспрессия [Kim, Eberwine, 2010]. При использовании мРНК трансфекции, возможно введение любого числа мРНК в клетку, что позволяет преодолеть избыточную экспрессию генов. Эти особенности связаны с тем, что мРНК не требует введения в ядро для того, чтобы быть экспрессированной. Трансфецируемая ДНК должна нести промотер, специфичный клетке или ткани хозяина для того, чтобы быть транскрибированной в мРНК, и уровень экспрессии определяется силой промотера. В отличие от трансфекции ДНК, при трансфекции РНК возможно регулирование уровня экспрессии путем изменения количества вводимой мРНК и частоты трансфекции [Kim, Eberwine, 2010]. Другими преимуществами трансфекции мРНК являются:

- 1) трансфецированная мРНК может быть экспрессирована в течение нескольких минут после выполнения трансфекции, так как данный метод не требует транслокации материала в ядро и его транскрипции;
- 2) транскриптом (популяция мРНК) может быть использован для трансфекции, что практически трудно осуществимо при трансфекции ДНК [Kim, Eberwine, 2010; Barrett et al, 2006; Job, Eberwine, 2001; Sul et al, 2009].

В связи с чем трансфекция РНК является привлекательным методом для использования в терапевтических целях [Sullenger, Gilboa, 2002].

Глава 2. Материалы и методы

Исследование выполнено на базе опытно-производственного участка «Клеточные и вспомогательные репродуктивные технологии» У доноров-добровольцев (больных острым миелобластным лейкозом на стадии ремиссии), подписавших информированное добровольное согласие донора биологического материала на безвозмездное предоставление биологического материала для научно-исследовательской работы на тему: «Определение оптимальной технологии доставки белковых и мРНК антигенов в дендритные клетки человека» и Согласие на обработку персональных данных пациента (представителя) для ОГБУЗ «Белгородская областная клиническая больница Святителя Иоасафа», брали венозную кровь в объеме 5-6 мл в вакутейнер с литиевой солью гепарина и 9 мл в вакутейнер с активатором свертывания для получения аутосыворотки. Затем биологический материал – 4 пробы в термоконтейнере при температуре +4 °С доставляли в лабораторию НИУ «БелГУ» для проведения исследований.

Мононуклеары выделяли на градиенте плотности фиколла. Для этого культуральную среду RPMI -1640 (фирма ПанЭко, Россия), раствор фиколла плотностью 1,077 г/см³ (фирма ПанЭко, Россия) и раствор Хенкса с феноловым красным (фирма ПанЭко, Россия) помещали из холодильника (хранение при +4 °С) в шейкер-инкубатор (при +37 °С). Венозную кровь в объеме 5-6 мл делили на 2 равные части по 2,5-3 мл, которые помещали в центрифужные пробирки объемом 15 мл (фирмы SPL Lifesciences, Ю.Корея), затем к крови приливали раствор Хенкса (фирма ПанЭко, Россия) в объеме 5 мл и ресуспендировали. После перемешивания до 8 мл разбавленной крови пастеровской пипеткой наслаивали на 3 мл фиколла. И центрифугировали при 400g в течение 40 мин, используя режим brake off. По окончании центрифугирования аккуратно пипеткой собирали клетки интерфазы (тонкий слой мононуклеаров крови между плазмой сверху и фиколлом и осадком внизу (рис. 1)) в пробирку объемом 15 мл (фирмы SPL Lifesciences, Ю.Корея),

в которую приливали раствор Хенкса (фирма ПанЭко, Россия) и ресуспендировали. Затем суспензию белых клеток центрифугировали при 400g в течение 10 минут (процедуру отмывки повторяли) и ресуспендировали.

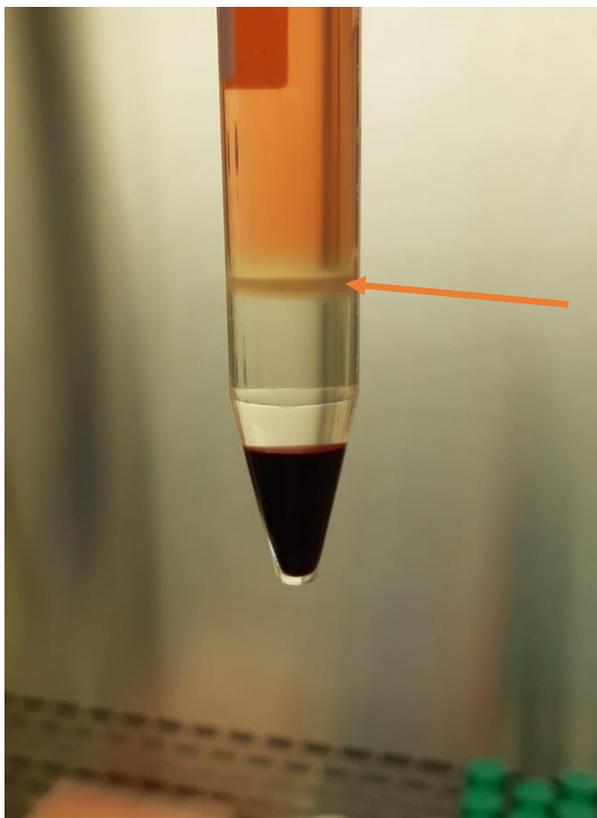


Рис. 1. Пробирка с кровью, в которую был добавлен фиколл, после центрифугирования (стрелкой обозначены клетки интерфазы)

В эксперименте использовали мононуклеары, полученные из венозной крови 4 пациентов. Одну пробу использовали для выбора оптимальных параметров (рабочего напряжения и числа импульсов) электропорации с определением жизнеспособности клеток после электропорации, вторую – для определения эффективности электропорации с использованием пептидных антигенов.

Для электропорации клетки вносили в стерильные чашки Петри 35 мм с наружным ребристым кольцом (фирмы SPL Lifesciences, Ю.Корея) в концентрации $1,0-5,0 \times 10^6/\text{мл}$ и приливали 4 мл среды RPMI 1640 (фирма

ПанЭко, Россия). Инкубировали клетки в течение 2 часов в условиях CO₂ инкубатора при +37°C, 5% CO₂ и 95% влажности.

Число клеток подсчитывали с помощью автоматического счетчика Scepter 2.0 (Merck, Millipore) (рис. 2).

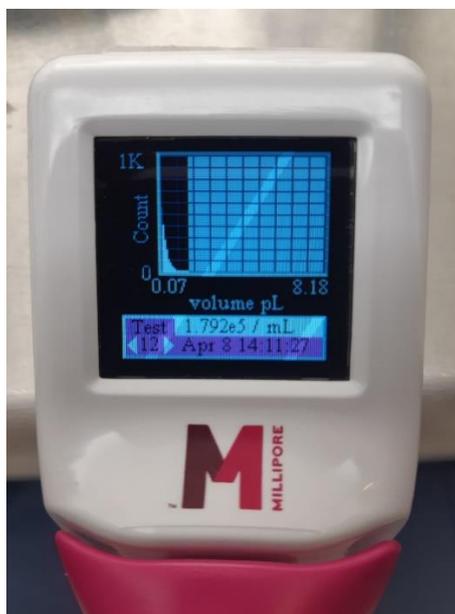


Рис. 2. Подсчет клеток с помощью автоматического счётчика Scepter 2.0 (Merck, Millipore) ($1,7925 \cdot 10^5$ / мл)

После истечения времени инкубации отбирали неадгезировавшие клетки (лимфоциты). После смыва лимфоцитов с дна чашки Петри добавляли полную питательную среду RPMI 1640 (фирма ПанЭко, Россия), содержащую антибиотик, антимикотик (фирма ПанЭко, Россия) и 10% аутологичной сыворотки донора или эмбриональной телячьей сыворотки (предварительно инактивированной при 56°C в течение 30 мин.). В состав полной питательной среды RPMI 1640 (фирма ПанЭко, Россия) входили ростовые факторы: GM-CSF (50 нг/мл) и IL-4 (100 нг/мл). Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе при 37°C и 5% CO₂. Замену среды осуществляли на 3 и 6 день культивирования белых клеток.

Активность мононуклеаров оценивали на 3 день культивирования при помощи флуоресцентного микроскопа Eclipse Ti-S (фирмы Nikon, Япония) с использованием контраста Хоффмана.

Для выбора оптимальных параметров (рабочего напряжения и числа импульсов) электропорации с определением жизнеспособности клеток после проведения процедуры электропорации применяли окрашивание двухкомпонентным красителем согласно инструкции производителя (Calcein AM/ethidium homodimer-1, LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity Kit, фирма Invitrogen™, США) при помощи флуоресцентного микроскопа Eclipse Ti-S (фирмы Nikon, Япония).

Эффективность электропорации оценивали при помощи мечения человеческим простатическим специфическим антигеном (Natural Human Prostate Specific Antigen protein, фирма Abcam, США) с флуоресцентной меткой TC-FlAsH II In-Cell Tetracysteine Tag Detection Kits (фирма Thermo Scientific, США). Готовили рабочий раствор белка (концентрация белка 27,5 мкг/мл) таким образом, чтобы финальное содержание белка в чашке Петри составляло ~ 1 мкг. Для этого отбирали 10 мкл раствора белка (2,2 мг/мл) в отдельную пробирку Эппендорфа. Добавляли к раствору белка 789 мкл буфера Хенкса (фирма ПанЭко, Россия) и 1 мкл TC-FlAsH II In-Cell Tetracysteine Tag Detection Kits (фирма Thermo Scientific, США) (концентрация 2,5 мкМ), использовали вортекс для перемешивания. После окрашивания клетки промывали с помощью буфера BAL (в концентрации 250 мкМ) дважды (промывка уменьшает фоновый шум, позволяя определить оптимальный сигнал). Для визуализации белка, меченного TC-FlAsH, использовали конфокальный лазерный сканирующий микроскоп Digital Eclipse C1 plus (фирмы Nikon, Япония), возбуждение флуоресценции проводили при помощи лазера с длиной волны 488 нм.

Электропорацию выполняли с использованием аппарата ECM 2001 (фирмы ВТХ Harvard Apparatus, США), который представляет собой multifункциональный генератор импульсов прямоугольной волны для

электрофузии и электропорации, работающий в режимах постоянного и переменного тока (рис.3).



Рис. 3. Электропоратор ECM 2001 (фирмы BTX Harvard Apparatus, США)

На первом этапе работ выполняли программирование режимов ECM 2001. Перед проведением электропорации присоединяли электрод Petri Pulser™ Electrode (фирмы BTX Harvard Apparatus, США), к ECM 2001 через коаксиальный кабель и «банана» кабель.

Длительность импульса задавали при помощи ручки «Mode». Устройство прибора позволяет выбрать режим высокого напряжения (HV): 500-3000 Вольт, или один из двух режимов низкого напряжения (LV): 10-500 Вольт или 50-500 Вольт. При режиме высокого напряжения длительность задается в микросекундах, при режимах низкого напряжения – в миллисекундах. В данной экспериментальной работе был выбран режим низкого напряжения 10-500 Вольт. Когда было установлено нужное значение напряжения, загорался соответствующий индикатор. Используя ручку управления «Set Voltage», устанавливали напряжение постоянного электрического тока, для этого поворачивали ручку по часовой стрелке. На панели «Number Of Pulses» (количество импульсов) задавали число импульсов

от 1 до 9, в данной экспериментальной работе число импульсов варьировало от 1 до 3. При каждом импульсе раздавался звуковой сигнал и загорался желтый световой индикатор. Появление сигнала «Wait» означало, что аппарат завершил заданный цикл операций и разряжался для безопасности. Нажимая кнопку Automatic Start, запускали процесс электропорации клеток, согласно заданным установкам.

Для определения оптимальных параметров (рабочего напряжения и числа импульсов) электропорации чашки Петри (первой пробы) переносили из CO₂-инкубатора в ламинарный шкаф, где под ламинарным воздушным потоком выполняли отмывку клеток с использованием буфера Хенкса (фирма ПанЭко, Россия). Затем в чашку Петри добавляли 1000 мкл охлажденной среды Opti-MEM™ Medium (фирма Gibco, США). Для выполнения электропорации электрод Petri Pulser™ Electrode (фирмы ВТХ Harvard Apparatus, США) помещали в чашку Петри 35 мм, стерильная, с наружным ребристым кольцом (фирмы SPL Lifesciences, Ю.Корея), в которой находились мононуклеары, и включали генератор импульсов ЕСМ 2001 (рис. 4).



Рис. 4. Электрод, погруженный в чашку Петри, в которой растут клетки.

После выполнения всего цикла электропорации в чашки Петри добавляли двухкомпонентный краситель (calcein AM/ethidium homodimer-1, LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity Kit, фирма Invitrogen™, США) и помещали в CO₂ инкубатор на 30 минут. По окончании времени инкубации чашки Петри помещали на предметный столик флуоресцентного микроскопа Eclipse Ti-S (фирмы Nikon, Япония) для определения числа живых (зеленая флуоресценция) и мертвых клеток (красная флуоресценция).

Для определения эффективности электропорации чашки Петри (второй пробы) переносили из CO₂-инкубатора в ламинарный шкаф и под ламинарным воздушным потоком аспирировали питательную среду RPMI 1640 из чашек, отмывали клетки буфером Хенкса (фирма ПанЭко, Россия). Далее в чашку Петри добавляли 1000 мкл охлажденной среды Opti-MEM™ Medium (фирма Gibco, США), которая содержала 100 мкл человеческого простатического специфического антигена (Natural Human Prostate Specific Antigen protein) (фирма Abcam, США) с флуоресцентной меткой TC-FIAsH II In-Cell Tetracysteine Tag Detection Kits (фирма Thermo Scientific, США). Для выполнения электропорации электрод Petri Pulser™ Electrode (фирмы ВТХ Harvard Apparatus, США) помещали в чашку Петри 35 мм, стерильную, с наружным ребристым кольцом (фирмы SPL Lifesciences, Ю.Корея), в которой находились мононуклеары и включали генератор импульсов ECM 2001 в режиме, при котором реализуются следующие программные установки: 10 Вольт – 3 импульса. После выполнения всего цикла электропорации чашки Петри помещали на предметный столик конфокального лазерного сканирующего микроскопа (возбуждение флуоресценции проводилось при помощи лазера с длиной волны 488 нм) и выполняли исследование эффективности электропорации путем оценки флуоресценции мононуклеаров, внутри которых находился человеческий простатический специфический антиген, Natural Human Prostate Specific Antigen protein (фирма Abcam, США) с флуоресцентной меткой TC-FIAsH II In-Cell Tetracysteine Tag Detection Kits (фирма Thermo Scientific, США).

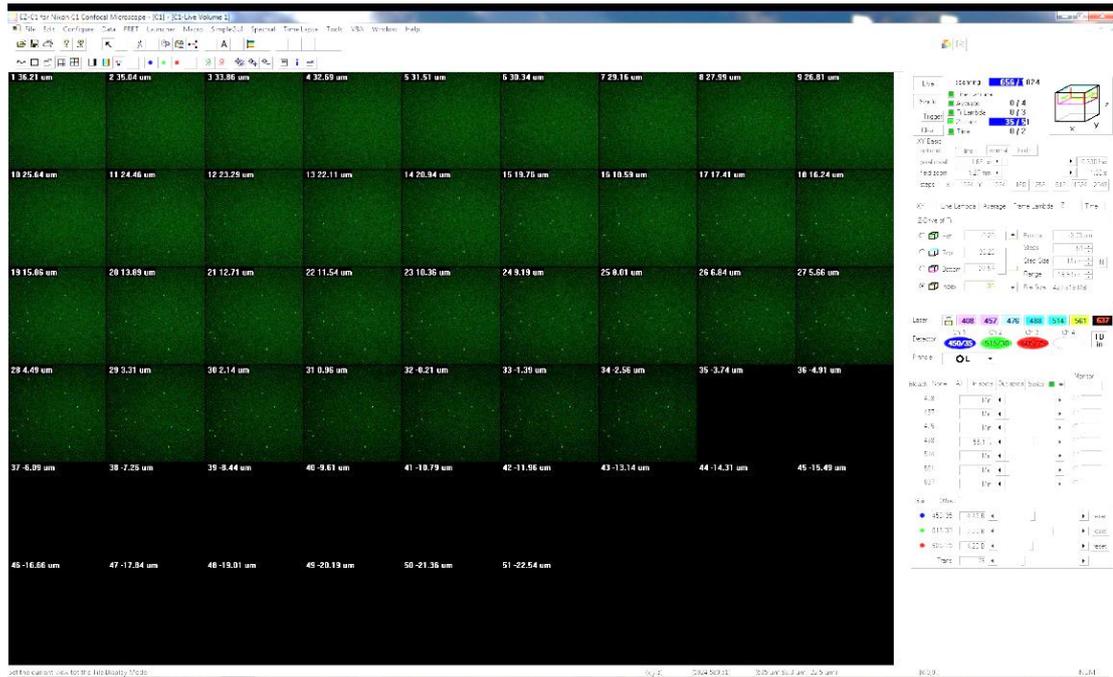


Рис. 5. Сканирование чашек Петри с моноклеарами загруженными белковым антигеном меченным флуоресцентным красителем при помощи конфокальный лазерный сканирующий микроскоп Digital Eclipse C1 plus (фирмы Nikon, Япония).

Глава 3. Полученные результаты и их обсуждение

После трех дней культивирования проведенная оценка активности мононуклеаров показала, что белые клетки крови от разных пациентов имеют различную активность. Так из 4 образцов суспензии мононуклеаров активность была снижена у 2 проб, что может свидетельствовать об остаточном цитотоксическом эффекте лекарственных препаратов, которыми лечили пациента от острого миелобластного лейкоза (рис. 6).

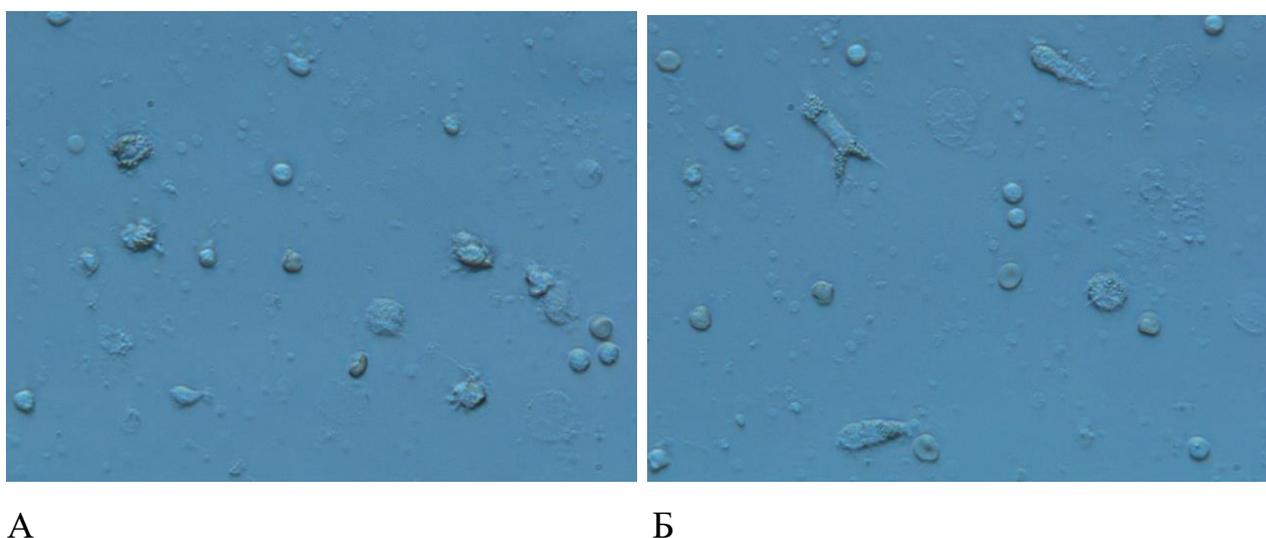


Рис. 6. Белые клетки крови: А – не мигрирующие (проба 2) и Б – мигрирующие (проба 3) по дну чашки Петри.

В результате эксперимента 2 пробы были забракованы, электропорацию клеток в данных пробах не проводили. В оставшиеся чашки Петри, содержащие активные мононуклеары, поочередно помещали электрод Petri Pulser™ Electrode (фирмы ВТХ Harvard Apparatus, США) и проводили электропорацию в трех режимах:

- 1) 50 Вольт – 1 импульс;
- 2) 50 Вольт – 3 импульса;
- 3) 10 Вольт – 3 импульса.

После завершения цикла электропорации в чашках Петри появились характерные полосы пузырьков воздуха, что свидетельствовало о прохождении тока между пластинами электрода (рис. 7).

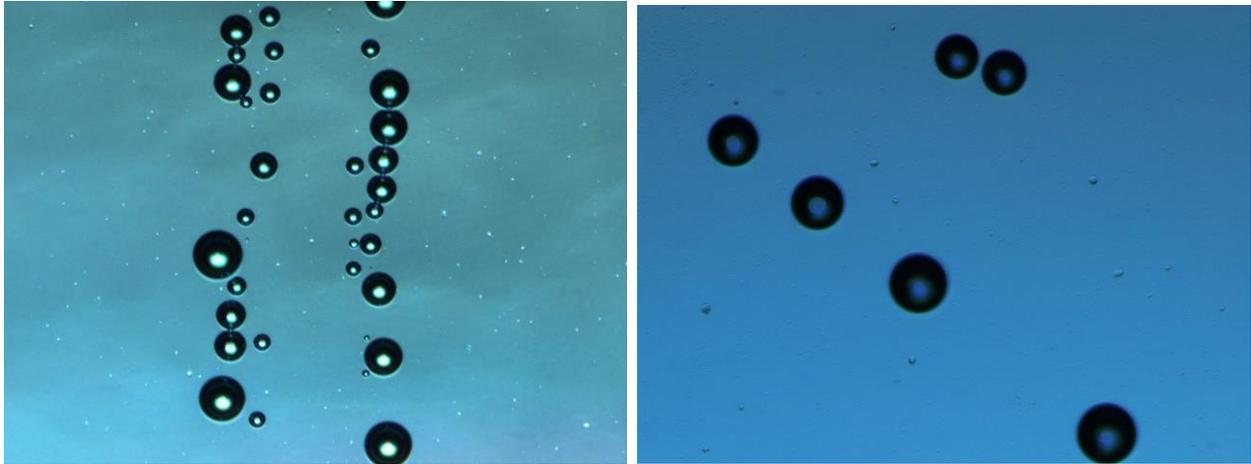


Рис. 7. Пузырьки воздуха на дне чашки Петри после процесса электропорации, видны белые клетки вокруг пузырьков воздуха.

Оценка жизнеспособности мононуклеаров при выборе оптимальных параметров (рабочего напряжения и числа импульсов) электропорации показала, что действие на клетки трех последовательных импульсов электрического тока, характеризовавшегося напряжением 50 В, приводило к снижению числа живых клеток по сравнению с контрольной группой на 62,1% (таблица 1, рис. 9).

Влияние на клетки 1 импульса электрического тока, напряжение которого было равно 50 В, сопровождалось снижением числа живых клеток по сравнению с контрольной группой на 46,0% (таблица 1, рис. 10).

Действие на клетки трех импульсов электрического тока, характеризовавшегося напряжением 10 В, не приводило к снижению числа живых клеток (таблица 1, рис. 11).

Таблица 1

Результаты исследования жизнеспособности клеток, после выполнения электропорации при использовании различных режимах работы прибора
($M \pm SD$)

Контроль белые клетки без воздействия		Опыт 1 (50 V – 3 импульса)		Опыт 2 (50 V – 1 импульс)		Опыт 3 (10 V – 3 импульса)	
Живые	Мертвые	Живые	Мертвые	Живые	Мертвые	Живые	Мертвые
91,00 ± 6,50	49,11 ± 8,46	34,44 ± 6,82	48,33 ± 6,74	49,11 ± 7,82	110,22 ± 16,57	97,56 ± 12,64	46,67 ± 6,30

На рисунке 8 представлены сканы клеток, не подвергавшихся влиянию электрического тока, полученные с использованием флуоресцентного микроскопа.

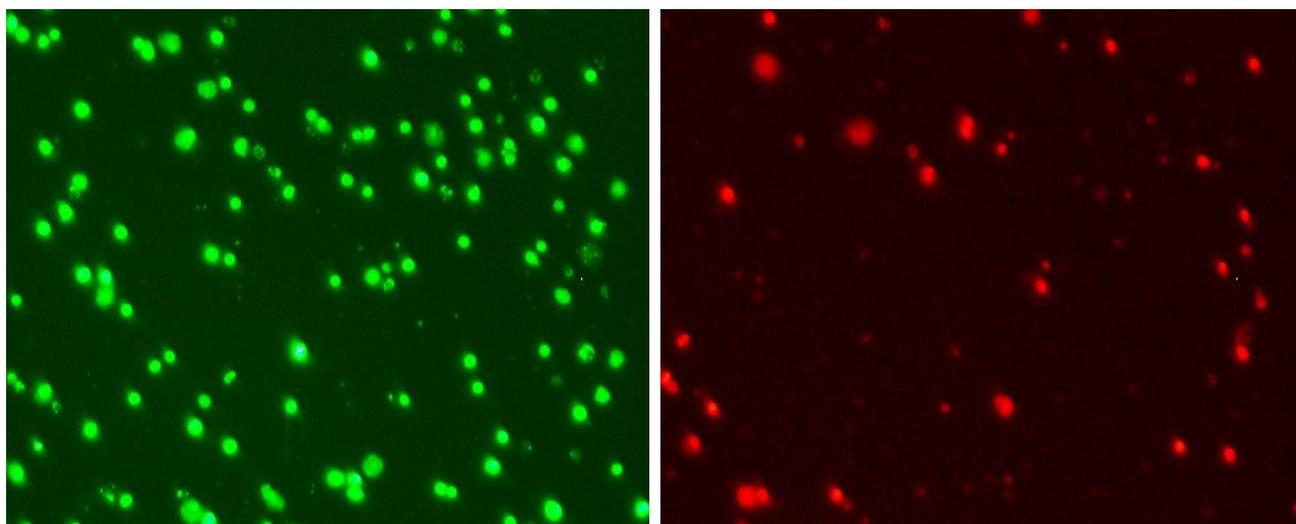


Рис. 8. Белые клетки крови, окрашенные Calcein AM (слева) и Ethidium Homodimer (справа) (Контрольная группа)

На рисунке 9 представлены сканы клеток, подвергавшихся влиянию электрического тока максимальной интенсивности, полученные с использованием флуоресцентного микроскопа. Отмечается разрушение клеток под действием тока.

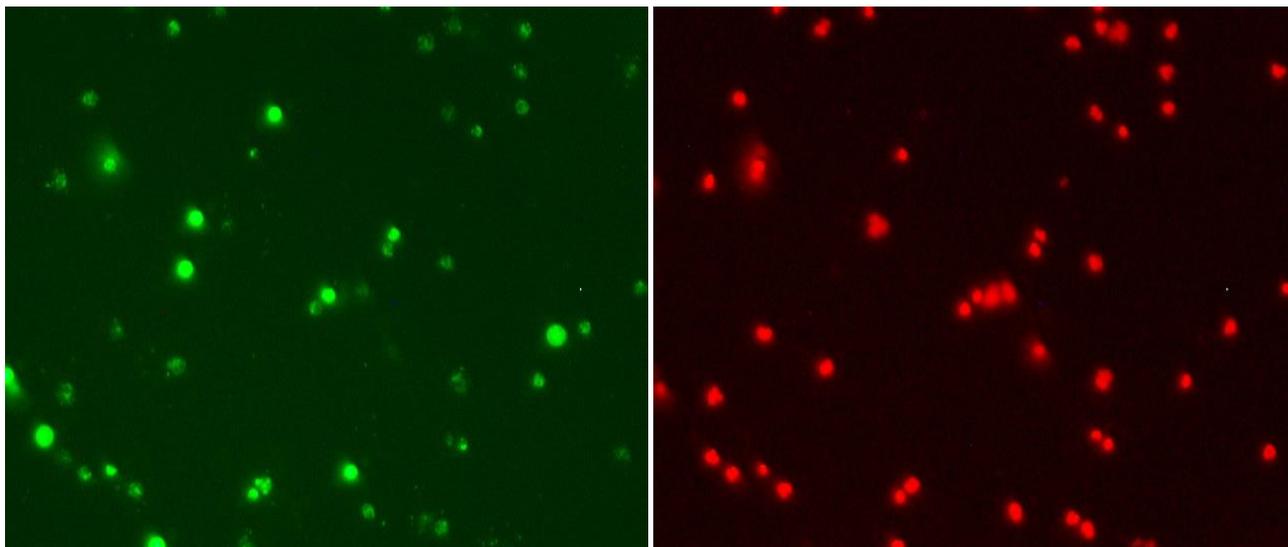


Рис. 9. Белые клетки крови, окрашенные Calcein AM (слева) и Ethidium Homodimer (справа), после воздействия максимального тока (50V – 3 импульса)
(Опыт 1)

На рисунке 10 представлены сканы клеток, подвергавшихся влиянию электрического тока максимальной интенсивности, при меньшем числе импульсов, полученные с использованием флуоресцентного микроскопа. Отмечается снижение флуоресценции Calcein AM.

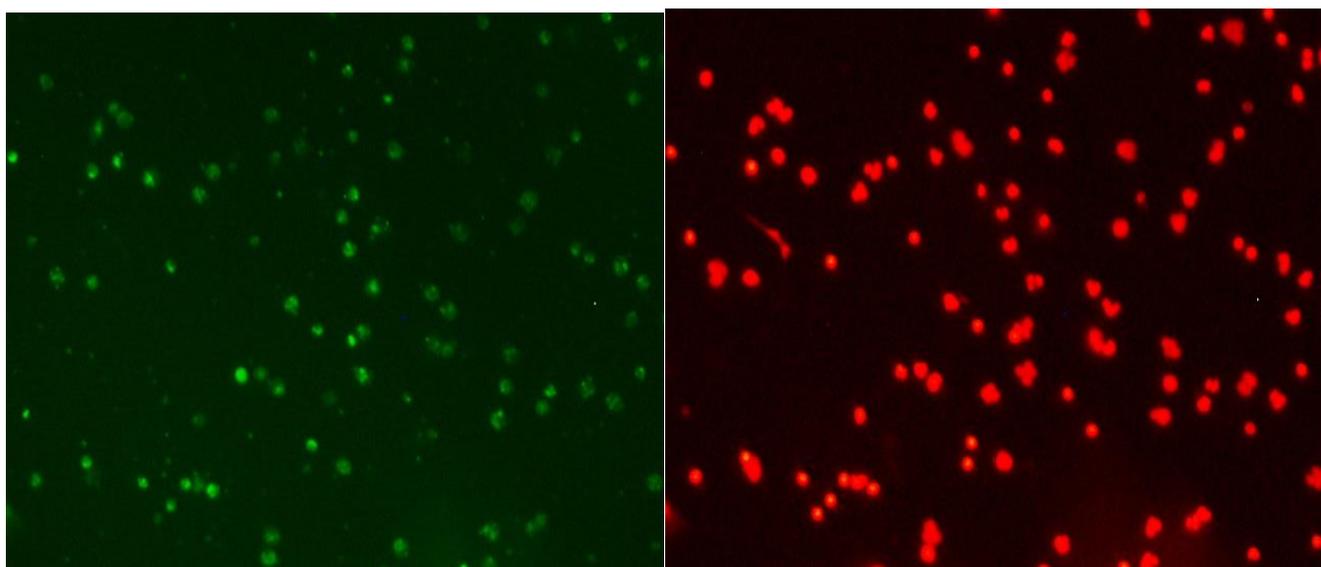


Рис. 10. Белые клетки крови, окрашенные Calcein AM (слева) и Ethidium Homodimer (справа), после воздействия тока максимальной интенсивности, при меньшем числе импульсов (50 V – 1 имп.) (Опыт 2)

На рисунке 11 представлены сканы клеток, подвергавшихся влиянию электрического тока средней интенсивности, полученные с использованием флуоресцентного микроскопа.

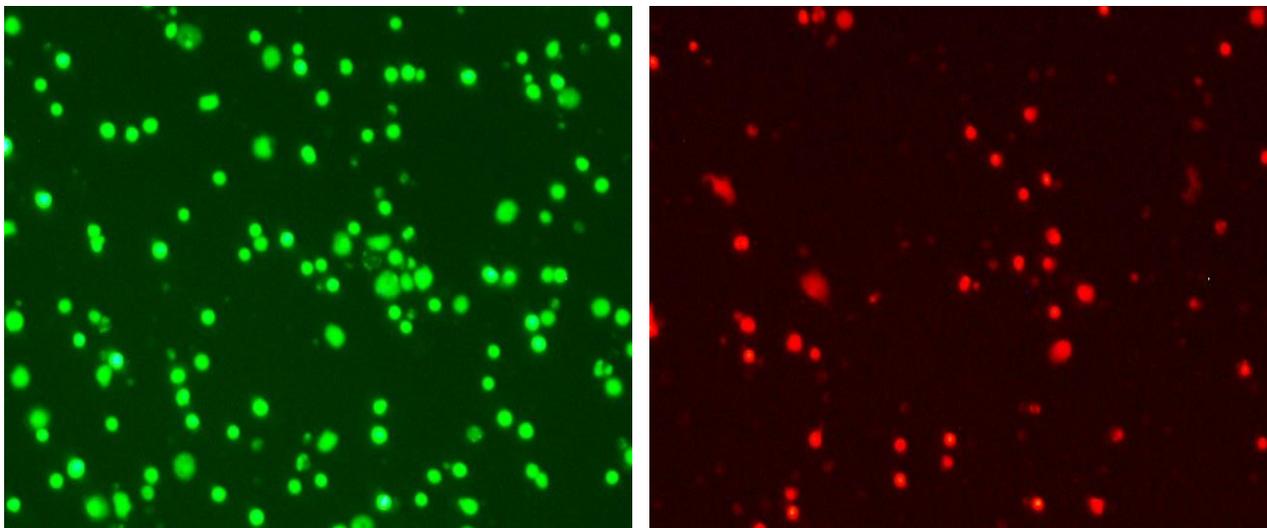


Рис. 11. Белые клетки крови, окрашенные Calcein AM (слева) и Ethidium Homodimer (справа), после воздействия тока средней интенсивности (10 V – 3 имп.) (Опыт 3)

Таким образом, оптимальными параметрами для электропорации является режим 10 В – 3 импульса.

В ходе оценки эффективности электропорации при помощи мечения человеческим простатическим специфическим антигеном с флуоресцентной меткой было выявлено проникновение белковых антигенов через плазмалемму белых клеток крови в образовавшиеся поры при проведении электропорации.

Было установлено, что интенсивность флуоресценции белкового антигена меченного флуоресцентным красителем отмечается более 715 у.е. у 80% мононуклеаров.

Выводы

1. Освоены методики выделения моноцитов из периферической крови здоровых доноров-добровольцев, культивирования моноклеарных клеток и их дифференцировки.

2. Выполнена электропорация клеток с использованием прибора Petri Pulser Electrode, ВТХ, Harvard Apparatus при различных импульсных характеристиках: 50 V – 3 импульса, 50V – 1 импульс, 10 V – 3 импульса.

3. Выявлено изменение жизнеспособности клеток после выполнения электропорации различными способами.

Список использованных источников

1. Соловьева, В.В. Перенос рекомбинантных нуклеиновых кислот в клетки (трансфекция) с помощью гистонов и других ядерных белков / В.В. Соловьева, Н.В. Кудряшова, А.А. Ризванов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Том VI, №3. – С. 29-40.
2. Aluigi, M. Nucleofection is an efficient nonviral transfection technique for human bone marrowderived mesenchymal stem cells / M. Aluigi, M. Fogli, A. Curti, A. Isidori, E. Gruppioni, C. Chiodoni, M.P. Colombo, P. Versura, A. D’Errico-Grigioni, E. Ferri, M. Baccarani, R.M. Lemoli // Stem Cells. – 2006. – Vol. 24. – P. 454–461.
3. Balicki, D. Structure and function correlation in histone H2A peptide-mediated gene transfer / D. Balicki, C.D. Putnam, P.V. Scaria et al. // PNAS USA. – 2002. – Vol. 99, No 11. – P. 7467–7471.
4. Bangari, D.S. Current strategies and future directions for eluding adenoviral vector immunity / D.S. Bangari, S.K. Mittal // Curr Gene Ther. – 2006. – Vol. 6. – P. 215–226.
5. Barrett, L.E. Region-directed phototransfection reveals the functional significance of a dendritically synthesized transcription factor / L.E. Barrett, J.Y. Sul, H. Takano, E.J. Van Bockstaele, P.G. Haydon, J.H. Eberwine // Nature Methods. – 2006. – Vol. 3(6). – P. 455–460.
6. Bushman, F. Genome-wide analysis of retroviral DNA integration / F. Bushman, M. Lewinski, A. Ciuffi, S. Barr, J. Leipzig, S. Hannenhalli, C. Hoffmann // Nat Rev Microbiol. – 2005. – Vol. 3. – P. 848–858.
7. Cai, D. Highly efficient molecular delivery into mammalian cells using carbon nanotube spearing / D. Cai, J.M. Mataraza, Z.-H. Qin, Z. Huang, J. Huang, T.C. Chiles, D. Carnahan, K. Kempa, Z. Ren // Nature Methods. – 2005. – Vol. 2. – P. 449–454.

8. Chen, C. Membrane electroporation theories: a review / C. Chen, S.W. Smye, M.P. Robinson, J.A. Evans // *Med Biol Eng Comput.* – 2006. – Vol. 44. – P. 5–14.
9. Dobson, J. Gene therapy progress and prospects: magnetic nanoparticle-based gene delivery / J. Dobson // *Gene Therapy.* – 2006. – Vol. 13(4). – P. 283–287.
10. Eisenbraun, M.D. Examination of parameters affecting the elicitation of humoral immune responses by particle bombardment-mediated genetic immunization / M.D. Eisenbraun, D.H. Fuller, J.R. Haynes // *DNA Cell Biol.* – 1993. – Vol. 12, No 9. – P. 791–797.
11. Ewert, K.K. Non-viral gene delivery with cationic liposome-DNA complexes / K.K. Ewert, A. Ahmad, N.F. Boussein, H.M. Evans, C.R. Safinya // *Methods Mol Biol.* – 2008. – Vol. 433. – P. 159-75.
12. Flotte, T.R. Gene therapy: The first two decades and the current state-of-the-art / T.R. Flotte // *J Cell Physiol.* – 2007. – Vol. 213. – P. 301–305.
13. Fontaine, C. The orphan nuclear receptor Rev-Erbalpha is a peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma target gene and promotes PPARgamma-induced adipocyte differentiation / C. Fontaine, G. Dubois, Y. Duguay, T. Helledie, N. Vu-Dac, P. Gervois, F. Soncin, S. Mandrup, J.C. Fruchart, J. Fruchart-Najib, B. Staels // *J Biol Chem.* – 2003. – Vol. 278. – P. 37672–37680.
14. Gehl, J. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research / Gehl, J. // *Acta Physiologica Scandinavica.* – 2003. – Vol. 177, No 4. – P. 437–447.
15. Glover, D.J. Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans / D.J. Glover, H.J. Lipps, D.A. Jans // *Nat Rev Genet.* – 2005. – Vol. 6(4). – P. 299–310.
16. Golzio, M. Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery / M. Golzio, J. Teissie, M.P. Rols // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2002. – Vol. 99. – P. 1292–1297.

17. Gresch, O. New non-viral method for gene transfer into primary cells / O. Gresch // *Methods*. – 2004. – Vol. 33(2). – P. 151–163.
18. Hacein-Bey-Abina, S. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy / S. Hacein-Bey-Abina, F. Le Deist, F. Carlier, C. Bouneaud, C. Hue, J.P. De Villartay, A.J. Thrasher, N. Wulffraat, R. Sorensen, S. Dupuis-Girod, A. Fischer, E.G. Davies, W. Kuis, L. Leiva, M. Cavazzana-Calvo // *The New England journal of medicine*. – 2002. – Vol. 346(16). – P. 1185–1193.
19. Haleem-Smith, H. Optimization of high-efficiency transfection of adult human mesenchymal stem cells in vitro / H. Haleem-Smith, A. Derfoul, C. Okafor, R. Tuli, D. Olsen, D.J. Hall, R.S. Tuan // *Mol Biotechnol*. – 2005. – Vol. 30. – P. 9–20.
20. Hamilton, A.J. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants / A.J. Hamilton, D.C. Baulcombe // *Science*. – 1999. – Vol. 286(5441). – P. 950–952.
21. Hamm, A. Efficient transfection method for primary cells / A. Hamm, N. Krott, I. Breibach, R. Blindt, A.K. Bosserhoff // *Tissue Eng*. – 2002. – Vol. 8. – P. 235–245.
22. Helledie, T. A Simple and Reliable Electroporation Method for Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells / T. Helledie, V. Nurcombe, S.M. Cool // *Stem Cells and Development*. – 2008. – Vol. 17, No 4. – P. 837–848.
23. Helledie, T. The gene encoding the Acyl-CoA-binding protein is activated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma through an intronic response element functionally conserved between humans and rodents / T. Helledie, L. Grontved, S.S. Jensen, P. Kiilerich, L. Rietveld, T. Albrektsen, M.S. Boysen, J. Nohr, L.K. Larsen, J. Fleckner, H.G. Stunnenberg, K. Kristiansen, S. Mandrup // *J Biol Chem*. – 2002. – Vol. 277. – P. 26821–26830.
24. Hunt, M.A. Optimizing Transfection of Primary Human Umbilical Vein Endothelial Cells Using Commercially Available Chemical Transfection

Reagents / M.A. Hunt, M.J. Currie, B.A. Robinson, G.U. Dachs // *J Biomol Tech.* – 2010. – Vol. 21, No 2. – P. 66–72.

25. Ikeda, S.R. Heterologous expression of metabotropic glutamate receptors in adult rat sympathetic neurons: subtypespecific coupling to ion channels / S.R. Ikeda, D.M. Lovinger, B.A. McCool, D.L. Lewis // *Neuron.* – 1995. – Vol. 14(5). – P. 1029–1038.

26. Inoue, T. An impulse to the brain-using in vivo electroporation / T. Inoue, R. Krumlauf // *Nature Neuroscience.* – 2001. – Vol. 4. – P. 1156–1158.

27. Job, C. Identification of sites for exponential translation in living dendrites / C. Job, J. Eberwine // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2001. – Vol. 98 (23). – P. 13037–13042.

28. Kim, H.J. Ultrasound-mediated transfection of mammalian cells / H.J. Kim, J.F. Greenleaf, R.R. Kinnick, J.T. Bronk, M.E. Bolander // *Human Gene Therapy.* – 1996. – Vol. 7(11). – P. 1339–1346.

29. Kim, T.K. Mammalian cell transfection: the present and the future / T.K. Kim, J.H. Eberwine // *Anal Bioanal Chem.* – 2010. – Vol. 397. – P. 3173–3178.

30. Lakshmiopathy, U. Efficient transfection of embryonic and adult stem cells / U. Lakshmiopathy, B. Pelacho, K. Sudo, J.L. Linehan, E. Coucouvanis, D.S. Kaufman, C.M. Verfaillie // *Stem Cells.* – 2004. – Vol. 22. – P. 531–543.

31. Larregina, A.T. Direct transfection and activation of human cutaneous dendritic cells / A.T. Larregina, S.C. Watkins, G. Erdos, L.A. Spencer, W.J. Storkus, S.D. Beer, L.D. Falo Jr. // *Gene Ther.* – 2001. – Vol. 8, No 8. – P. 608–617.

32. Li, S. Nonviral gene therapy / S. Li, Z. Ma // *Current Gene Therapy.* – 2001. – Vol. 1(2). – P. 201–226.

33. Li, Z. Murine leukemia induced by retroviral gene marking / Z. Li, J. Dullmann, B. Schiedlmeier, M. Schmidt, C. von Kalle, J. Meyer, M. Forster, C. Stocking, A. Wahlers, O. Frank, W. Ostertag, K. Kuhlcke, H.G. Eckert, B. Fehse, C. Baum // *Science.* – 2002. – Vol. 296. – P. 497.

34. Lo, D.C. Neuronal transfection in brain slices using particle-mediated gene transfer / D.C. Lo, A.K. McAllister, L.C. Katz // *Neuron*. – 1994. – Vol. 13 (6). – P. 1263–1268.
35. Marshall, E. Gene therapy death prompts review of adenovirus vector / E. Marshall // *Science*. – 1999. – Vol. 286. – P. 2244–2245.
36. Martinou, I. Viral proteins E1B19K and p35 protect sympathetic neurons from cell death induced by NGF deprivation / I. Martinou, P.A. Fernandez, M. Missotten, E. White, B. Allet, R. Sadoul, J.C. Martinou // *Journal of Cell Biology*. – 1995. – Vol. 128(1–2). – P. 201–208.
37. Mehier-Humbert, S. Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells / S. Mehier-Humbert, R.H. Guy // *Adv Drug Del Rev*. – 2005. – Vol. 57(5). – P. 733–753.
38. Mehierhumbert, S. Physical methods for gene transfer: Improving the kinetics of gene delivery into cells / S. Mehierhumbert, R. Guy // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2005. – Vol. 57, No 5. – P. 733–753.
39. Müller, K. Highly efficient transduction of endothelial cells by targeted artificial virus-like particles / K. Müller, T. Nahde, A. Fahr, R. Müller, S. Brüsselbach // *Cancer Gene Ther*. – 2001. – Vol. 8, No 2. – P. 107–117.
40. Neumann, E. Fundamentals of electroporative delivery of drugs and genes / E. Neumann, S. Kakorin, K. Toensing // *Bioelectrochem Bioenerg*. – 1999. – Vol. 48. – P. 3–16.
41. Niidome, T. Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors / T. Niidome, L. Huang // *Gene Therapy*. – 2002. – Vol. 9 (24). – P. 1647–1652.
42. O'Brien, J.A. Biolistic transfection of neuronal cultures using a hand-held gene gun / J.A. O'Brien, S.C. Lummis // *Nature Protocols*. – 2006. – Vol. 1 (2). – P. 977–981.
43. Pfeifer, A. Gene therapy: promises and problems / A. Pfeifer, I.M. Verma // *Annu Rev Genomics Hum Genet*. – 2001. – Vol. 2. – P. 177–211.

44. Prausnitz, M.R. Electroporation of mammalian skin: a mechanism to enhance trans-dermal drug delivery / M.R. Prausnitz, V.G. Bose, R. Langer, J.C. Weaver // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1993. – Vol. 90. – P. 10504–10508.
45. Recillas-Targa, F. Multiple strategies for gene transfer, expression, knockdown, and chromatin influence in mammalian cell lines and transgenic animals / F. Recillas-Targa // *Mol Biotechnol*. – 2006. – Vol. 34(3). – P. 337–354.
46. Roesler, J. Third-generation, self-inactivating gp91 (phox) lentivector corrects the oxidase defect in NOD/SCID mouse-repopulating peripheral blood-mobilized CD34+ cells from patients with X-linked chronic granulomatous disease / J. Roesler, S. Brenner, A.A. Bukovsky, N. Whiting-Theobald, T. Dull, M. Kelly, C.I. Civin, H.L. Malech // *Blood*. – 2002. – Vol. 100 (13). – P. 4381–4390.
47. Sanford, J.C. Optimizing the biolistic process for different biological applications / J.C. Sanford, F.D. Smith, J.A. Russell // *Methods Enzymol*. – 1993. – Vol. 217. – P. 483–509.
48. Scherer, F. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo / F. Scherer, M. Anton, U. Schillinger, J. Henke, C. Bergemann, A. Krüger, B. Gänsbacher, C. Plank // *Gene Therapy*. – 2002. – Vol. 9 (2). – P.102–109.
49. Schneckenburger, H. Laser-assisted optoporation of single cells / H. Schneckenburger, A. Hendinger, R. Sailer, W.S. Strauss, M. Schmitt // *Journal of Biomedical Optics*. – 2002. – Vol. 7(3). – P. 410–416.
50. Shirahata, Y. New technique for gene transfection using laser irradiation / Y. Shirahata, N. Ohkohchi, H. Itagak, S. Satomi // *Journal of Investigative Medicine: the official publication of the American Federation for Clinical Research*. – 2001. – Vol. 49(2). – P. 184–190.
51. Sieczkarski, S.B. Dissecting virus entry via endocytosis / S.B. Sieczkarski, G.R. Whittaker // *J. Gen. Virol*. – 2002. – Vol. 83, Pt 7. – P. 1535–1545.
52. Sork, H. Lipid-based Transfection Reagents Exhibit Cryo-induced Increase in Transfection Efficiency / H. Sork, J.Z. Nordin, J.J. Turunen, O.P.

Wiklander, B. Bestas, E.M. Zaghoul, ... S.E. Andaloussi // *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. – 2016. – Vol. 5. – P. e290.

53. Sul, J.Y. Transcriptome transfer produces a predictable cellular phenotype / J.Y. Sul, C.W. Wu, F. Zeng, J. Jochems, M.T. Lee, T.K. Kim, T. Peritz, P. Buckley, D.J. Cappelleri, M. Maronski, M. Kim, V. Kumar, D. Meaney, J. Kim, J. Eberwine // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2009. – Vol. 106(18). – P.7624–7629.

54. Sullenger, B.A. Emerging clinical applications of RNA / B.A. Sullenger, E. Gilboa // *Nature*. – 2002. – Vol. 418(6894). – P. 252–258.

55. Suzuki, T. Direct gene transfer into rat liver cells by in vivo electroporation / T. Suzuki, B.C. Shin, K. Fujikura, T. Matsuzaki, K. Takata // *FEBS Lett*. – 1998. – Vol. 425. – P. 436–440.

56. Tabata, H. Efficient in utero gene transfer system to the developing mouse brain using electroporation: visualization of neuronal migration in the developing cortex / H. Tabata, K. Nakajima // *Neuroscience*. – 2001. – Vol. 103(4). – P. 865–872.

57. Takahashi, K. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors / K. Takahashi, S. Yamanaka // *Cell*. – 2006. – Vol. 126(4). – P. 663–676.

58. Tekle, E. Electro-permeabilization of cell membranes: effect of the resting membrane potential / E. Tekle, R.D. Astumian, P.B. Chock // *Biochem Biophys Res Commun*. – 1990. – Vol. 172. – P. 282–287.

59. Thomas, C.E. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy / C.E. Thomas, A. Ehrhardt, M.A. Kay // *Nature Reviews. Genetics*. – 2003. – Vol. 4(5). – P. 346–358.

60. Tros de Ilarduya, C. Gene delivery by lipoplexes and polyplexes / C. Tros de Ilarduya, Y. Sun, N. Düzgüneş // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2010. – Vol. 40, No 3. – P. 159–170.

61. Tsong, T.Y. Electric modification of membrane permeability for drug loading into living cells / T.Y. Tsong // *Methods Enzymol*. – 1987. – Vol. 149. – P. 248–259.

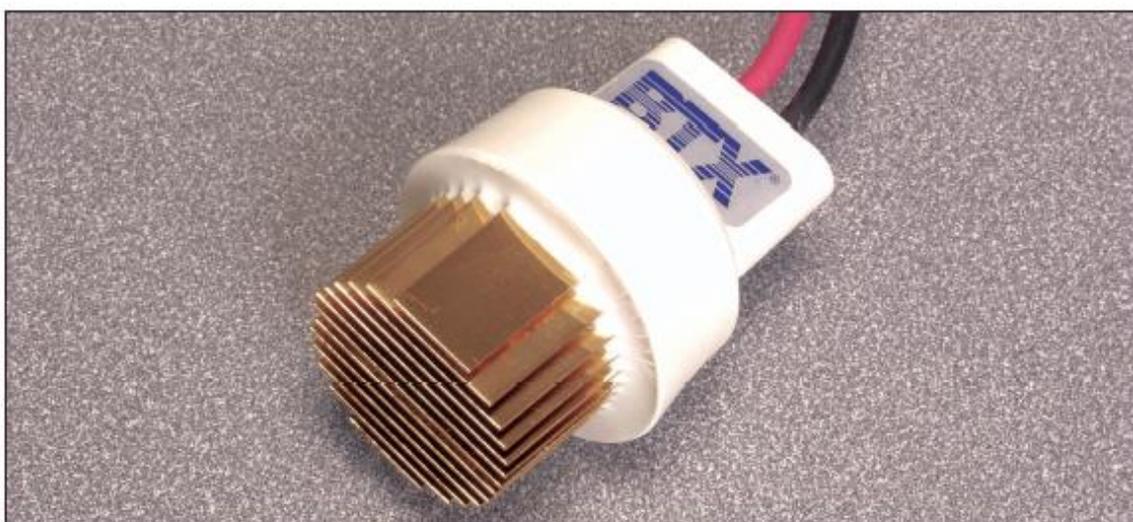
62. Uchida, E. Comparison of the efficiency and safety of non-viral vector-mediated gene transfer into a wide range of human cells / E. Uchida, H. Mizuguchi, A. Ishii-Watabe, T. Hayakawa // *Biol Pharm Bull.* – 2002. – Vol. 25. – P. 891–897.
63. Vijayanathan, V. DNA nanoparticles and development of DNA delivery vehicles for gene therapy / V. Vijayanathan, T. Thomas, T.J. Thomas // *Biochemistry.* – 2002. – Vol. 41, No 48. – P. 14085–14094.
64. Wang, S. Delivery of DNA to skin by particle bombardment / S. Wang, S. Joshi, S. Lu // *Methods Mol. Biol.* – 2004. – Vol. 245, No 185 – P. 196.
65. Woods, N.B. Lentiviral vector transduction of NOD/SCID repopulating cells results in multiple vector integrations per transduced cell: risk of insertional mutagenesis / N.B. Woods, A. Muessig, M. Schmidt, J. Flygare, K. Olsson, P. Salmon, D. Trono, C. von Kalle, S. Karlsson // *Blood.* – 2003. – Vol. 101 (4). – P. 1284–1289.
66. Wurm, F.M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells / F.M. Wurm // *Nat Biotechnol.* – 2004. – Vol. 22(11). – P. 1393–1398.
67. Yamamoto, A. Current prospects for mRNA gene delivery / A. Yamamoto, M. Kormann, J. Rosenecker, C. Rudolph // *Eur J Pharm Biopharm.* – 2009. – Vol. 71(3). – P. 484–489.
68. Yao, C.P. Laser-based gene transfection and gene therapy / C.P. Yao, Z.X. Zhang, R. Rahmanzadeh, G. Huettmann // *IEEE Trans Nanobioscience.* – 2008. – Vol. 7(2). – P. 111–119.
69. Zelphati O. Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes / O. Zelphati, F.C. Szoka // *PNAS USA.* – 1996. – Vol. 93, No 21. – P. 11493–11498.
70. Zuris, J.A. Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo / J.A. Zuris, D.B. Thompson, Y. Shu, J.P. Guilinger, J.L. Bessen, J.H. Hu et al. // *Nat Biotechnol.* – 2015. – Vol. 33. – P. 73–80.

Приложения

Petri Pulser™ Electrode

USER'S MANUAL

BTX[®]
HARVARD APPARATUS
The Electroporation Experts



INTRODUCTION

The Petri Pulser™ Electrode PP35-2P is a reusable electroporation applicator designed to fit into each single well of a 6-well plate or an individual 35 mm diameter Petri dish. The PP35-2P consists of an electrode assembly embedded in a polyurethane holder with high voltage electrode cables. The thin electrodes are gold plated and designed to maximize the surface area of electroporation. The high voltage cables are connected with a BTX electroporator, and the electrode head inserted into the dish or well containing the sample. An electroporation pulse may then be delivered. The entire applicator may be cleaned with mild detergent, and the electrodes may be sterilized with ethanol and dried with acetone.

IMPORTANT: Read all Instructions, Warnings and Precautions prior to use.

FOR RESEARCH PURPOSES ONLY

SAMPLE PREPARATION

BTX protocols outline detailed information on sample preparation. Please request protocols by contacting BTX technical service (Web: www.btxonline.com). In sample preparation, the medium used represents a certain electrical resistance to the power supply. The cuvette resistance is determined by the cuvette geometry and the specific conductivity of the medium. These variables could cause a voltage drop when using highly conductive media such as PBS.

Order No.	Model	Description
45-0130	PP35-2P	Petri Pulser™ Electrode

Petri Pulser™ Electrode

GENERAL INFORMATION

Warranty

BTX/Harvard Apparatus warrants this BTX Petri Pulser™ Electrode for a period of 90 days from date of purchase. At its option, BTX/Harvard Apparatus will repair or replace the item if it is found to be defective as to workmanship or material. This warranty does not extend to damage resulting from misuse, neglect, or abuse, normal wear and tear, or accident. This warranty extends only to the original customer purchase.

IN NO EVENT SHALL HARVARD APPARATUS BE LIABLE FOR INCIDENTAL OR CONSEQUENTIAL DAMAGES. Some states do not allow exclusion or limitation of incidental or consequential damages so the above limitation or exclusion may not apply to you. **THERE ARE NO IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR USE, OR OF ANY OTHER NATURE.**

Some states do not allow this limitation on an implied warranty, so the above limitation may not apply to you. If a defect arises within the 90 day warranty period, promptly contact: **BTX/Harvard Apparatus, 84 October Hill Road, Holliston, Massachusetts 01746-1388** using our toll free number **1-800-272-2775 (Outside the U.S. call 1-508-893-8999)**. Goods will not be accepted for return unless an RMA (Return Materials Authorization) number has been issued by our customer service department. The customer is responsible for shipping charges. Please allow a reasonable period of time for completion of repairs or replacement and return. If the unit is replaced, the replacement unit is covered only for the remainder of the original warranty period dating from the purchase of the original device. This warranty gives you specific rights, and you may also have other rights which vary from state to state.

Note: BTX electrodes are not recommended for use with power supplies or cables from other manufacturers. Such use is completely at the customer's own risk as it may result in damage, create unsafe conditions and will immediately void the 90 day warranty.

IMPORTANT: Read all instructions, warnings and precautions prior to use.

Technical & Customer Service

BTX® is the ultimate resource for technical information on the use of high voltage bacterial transformation and general electroporation of molecules and drugs into cells. We constantly track and monitor scientific publications in this area. Our Technical Service group extracts and enters pertinent information, such as results and parameters from these papers into a Protocol database. This database is available via the BTX website. Please visit www.btxonline.com. For technical assistance, additional information or an inquiry/request for repair service, contact BTX/Harvard Apparatus Technical Support/Customer Service Group at:

BTX®

A Division of Harvard Apparatus
84 October Hill Road

Holliston, MA 01746-1388 U.S.A.

Toll Free: 1-800-272-2775 (U.S. only)

Phone: 1-508-893-8999

Fax: 1-508-429-5732

E-mail: techsupport.btx@harvardapparatus.com

Internet: www.btxonline.com (click on customer service)

If outside the United States and Canada: call **1-508-893-8999** or contact your nearest BTX Distributor. A complete list of distributors is on our website.

toll free 800.272.2775 • local 508.893.8999 • www.btxonline.com

GENERAL SAFETY INFORMATION

Review the following safety precautions to avoid injury and prevent damage to this product or any products connected to it. To avoid potential hazard, use this product only as specified. Only qualified BTX personnel should perform service procedures.

To Prevent Hazard or Injury:

ARCING CAN OCCUR AT HIGH VOLTAGES

An unfavorable combination of parameters such as high voltage settings and a small sample volume with a highly conductive medium might lead to flashover between the electrodes (ARC) and/or explosive evaporation of the medium. Reduce voltage or pulse length to avoid repeating this condition.

DO NOT OPERATE WITH SUSPECTED FAILURES

If you suspect there is damage to the product, have it inspected by qualified BTX service personnel.

DO NOT CONTACT ELECTRODES

To avoid fire or shock hazard, observe all ratings and markings on the product or in this manual before using the device.

AVOID EXPOSURE TO CONTACT

Do not insert fingers or try to remove electrode or sample during pulsing sequence.

WEAR PROPER EYE PROTECTION DURING ELECTROPORATION

DO NOT OPERATE IN AN EXPLOSIVE ENVIRONMENT

DO NOT OPERATE IN WET/DAMP CONDITIONS

Safety Terms and Symbols:

Terms that appear in this manual:



WARNING. Warning statements identify conditions or practices that could result in injury or loss of life.



CAUTION. Caution statements identify conditions or practices that could result in damage to these products or other property.

Symbols that may appear on the products:



**Danger
High
Voltage**



**Attention
Refer to
Manual**



**Protective
(Earth)
Terminal**



**Functional
Ground
Terminal**

Petri Pulser™ Electrode

OPERATION: GETTING STARTED



WARNING HIGH VOLTAGE

Make sure the BTX electroporator is switched off before continuing.

1. Plug the HV cables from the PP35-2P into output jacks of a BTX electroporator or the VIP 3000 Monitoring System.
2. Prepare sample of interest (cells-adherent or suspension and molecule-DNA, protein, etc.) in 6-well plates.
3. Place the electrode head in one well of the 6-well plate. Allow it to gently rest on the surface of the dish.
4. Deliver electroporation pulse(s) from a BTX electroporator, following the manual instructions.
5. Remove the electrode, clean as appropriate and complete delivery of pulses to all wells.

Cleaning the electrode between samples

1. Fill the wells of a 6-well plate with 3 ml of serum-free medium (you may want to prepare a few "cleaning plates" like these depending on the number of samples you have).
2. In between samples, dip the electrode sequentially into the two wells of serum-free media. Dab the electrode with Kimwipe gently to dry. Then dip the electrode into the well with the actual sample and deliver the pulse.
3. When you are changing sample type again, repeat the cleaning by dipping the electrodes into two new wells in the cleaning plate. This will ensure that no cross-contamination is introduced. Do this each time you change the sample type.

APPENDIX A: SPECIFICATIONS

Petri Pulser™ Electrode Electrical & Technical Specifications

Standard Capabilities:

Voltage Range	0 to 300 VDC (Do not use AC current)
Pulse Length Range	1 µsec to 35 msec
Pulse Number Range	1 to 99 (depending on voltage)
Operating Temperature	5° to 40°C
Intended Use	Indoor use only
Relative Humidity	20 to 80%
Maximum Altitude	2,000 m (6,562 ft)
Pollution Degree	II
Insulation Category	CAT I

Physical Characteristics:

Weight	170.1 g (6 oz)
Number of Electrodes	13
Volume Range	0.5 to 3.0 ml
Gap Size	2 mm
Electrode Thickness	0.5 mm
Electrode Material	Gold Plated

Compatibility:

Generators	ECM® 630, 630 and 2001
Monitoring	The Enhancer 3000® Monitoring System recommended

APPENDIX B: REPLACEMENT PARTS

Order No.	Model	Description
45-0130	PP35-2P	Petri Pulser™ Electrode PP35-2P
45-0059	VIP3000SC	The Enhancer 3000® Monitoring System

Meets requirements of Directive 89/336/EEC for Electromagnetic Compatibility (EC) and Low-Voltage Directive 72/23/EEC for Product Safety.

APPENDIX C: TROUBLESHOOTING

Please contact BTX Technical Service at any of the numbers listed below in the event of any failure.

BTX®

A Division of Harvard Apparatus

84 October Hill Road

Holliston, MA 01746-1388 U.S.A.

Toll Free: 1-800-272-2775 (US only)

Phone: 1-508-893-8999

Fax: 1-508-429-5732

E-mail: techsupport.btx@harvardapparatus.com

Internet: www.btxonline.com (click on customer service)

APPENDIX D: MAINTENANCE

Do not attempt maintenance while the Petri Pulser™ Electrode PP35-2P is plugged into an electroporator. Clean the polyurethane electrode base with a soft cloth or Kimwipe. If necessary, moisten the cloth or Kimwipe with a dilute detergent solution. Clean the electrode plates by washing with a mild detergent using a soft bristled brush. Alternatively, the electrode head can be placed into an ultrasonic water bath and cleaned with mild detergent under sonication. Do not immerse the electronic components of the electrode head.



Petri Pulser™ Electrode
45-0130

CAUTION
FOR RESEARCH USE ONLY
NOT FOR CLINICAL
USE ON PATIENTS

WEEE/RoHS Compliance Statement

EU Directives WEEE and RoHS

To Our Valued Customers:

We are committed to being a good corporate citizen. As part of that commitment, we strive to maintain an environmentally conscious manufacturing operation.

The European Union (EU) has enacted two Directives, the first on product recycling (Waste Electrical and Electronic Equipment, WEEE) and the second limiting the use of certain substances (Restriction on the use of Hazardous Substances, RoHS). Over time, these Directives will be implemented in the national laws of each EU Member State.

Once the final national regulations have been put into place, recycling will be offered for our products which are within the scope of the WEEE Directive. Products falling under the scope of the WEEE Directive available for sale after August 13, 2005 will be identified with a "wheelle bin" symbol.

Two Categories of products covered by the WEEE Directive are currently exempt from the RoHS Directive – Category 8, medical devices (with the exception of implanted or infected products) and Category 9, monitoring and control instruments. Most of our products fall into either Category 8 or 9 and are currently exempt from the RoHS Directive. We will continue to monitor the application of the RoHS Directive to its products and will comply with any changes as they apply.



- Do Not Dispose Product with Municipal Waste
- Special Collection/Disposal Required



HARVARD APPARATUS

The Electroporation Experts

84 October Hill Road • Holliston MA, 01746

toll free 800.272.2775 • local 508.893.8999 • fax 508.429.5732

email techsupport.btx@harvardapparatus.com • web www.btxonline.com

Publication 5502-004-REV-CS