

ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ РОЗРОБЛЕНОЇ АПАРАТУРИ ДЛЯ ЕЛЕКТРОЗЛИТТЯ КЛІТИН ТВАРИН

В.О. Шигимага, І.В. Пінігін
Інститут тваринництва УААН

У статті йдеться про розроблену апаратуру для електрозлиття клітин тварин, виготовлення та випробовування дослідного зразка приладу для електрозлиття на двоклітинних ембріонах миші. Розроблено спрощену конструкторську документацію, а також методику роботи з приладом. Загальна (по двох дослідях) ефективність злиття 2-клітинних ембріонів миші становить 77 %.

2-клітинні ембріони миші, апаратура для електрозлиття, ефективність злиття

Сучасна технологія клонування (ембріонального чи соматичного) будь-якого виду тварин містить у собі один з основних етапів - реконструкцію клітин, що проводиться широко розповсюдженим методом електрозлиття [1-4]. Для цього використовують електричне високочастотне та імпульсне поля, що послідовно накладаються на клітини, які зливаються, знаходячись між мікроелектродами. Однак, інформація про технологію та деякі параметри такого впливу електромагнітними полями на клітини дуже обмежена, скоріш за все, через високу комерційну цінність. Тому, навіть у методичних публікаціях щодо застосування цієї технології для клонування різних видів тварин, даються посилання виключно на апаратуру та технологію закордонних фірм, що займаються розробленням і впровадженням цієї наукоємкої продукції [5-7]. До того ж, закордонна апаратура та технологія занадто коштовні, принаймні, на рівні вартості автомобіля середнього класу, а вітчизняної для реалізації цього методу взагалі немає. Тому в нашій лабораторії самостійно розроблено методику і виготовлено апаратуру для електрозлиття клітин, що забезпечує досить високу його ефективність, але вартістю майже на два порядки меншою, ніж коштує, наприклад, такий сучасний популярний аналог, як електроманіпулятор ECM 2001 фірми GENETRONICS, inc., USA, або славнозвісний BTX-200 - прилад для клітинної електроманіпуляції фірми BTX, що увійшла до складу GENETRONICS [5].

Раніш було виготовлено дослідний зразок приладу для електрозлиття, розроблено спрощену конструкторську документацію - загальну принципову схему, схеми окремих вузлів, методику їх налагодження, а також методику роботи з приладом [8]. Метою подальшої роботи було випробовування розробленої апаратури для електрозлиття та встановлення її ефективності щодо цієї процедури. Оскільки бластомери інтактних двоклітинних ембріонів ссавців щільно контактують один з одним і цього контакту виявляється цілком достатньо для успішного електрозлиття із застосуванням тільки імпульсного поля, тому зручною моделлю для цієї роботи є відносно легко доступні та дешеві двоклітинні ембріони миші. На цій моделі були відпрацьовані основні режими електрозлиття в різних середовищах, у тому числі і PBS [9].

Матеріал і методи досліджень. Апаратура для електрозлиття складалась із генератора імпульсної напруги, яка подавалась на мікроелектроди з інертного металу, ізольовані склом [10] та закріплені в тримачі на позиціонерах з трьома ступенями свободи. Мікроелектроди юстовано співвісно в полі зору мікроскопа "БИОЛАМ-ПІ" (ЛОМО, Росія). Об'єкт розміщували у краплі середовища між

мікроелектродами на предметному склі мікроскопа. Для розглядання окремих стадій злиття з великим збільшенням та їх відеозапису використано мікроскоп AXIOVERT-35 (фірма OPTON, Німеччина) з вмонтованою нами відеокамерою, який додатково обладнаний шкалою для визначення розмірів об'єктів, що спостерігаються. Відеокамера підключена до відеомагнітофону та монітору для оперативного спостереження об'єктів. Відеокадри ембріонів, що зливались, отримано за звичайною методикою відеозахвату та відцифровування відеозапису на плівці за допомогою комп'ютерної обробки відеокартою ATI Rage Pro/Xpert 2000 Pro і програмою Adobe Premiere. Як середовище для злиття використаний ізотонічний розчин маніту. Після дії електричного імпульсу з напруженістю поля 1,4 кВ/см на двоклітинні ембріони миші, останні були перенесені у PBS та через деякий час, залежно від особливих властивостей клітини, у мікроскоп спостерігали наявність об'єднання мембран бластомерів та перебудову цитоскелетів з перетіканням цитоплазми та відтворенням загальної мембрани. Цілість мембрани контролювали шляхом короткочасного перенесення зливої клітини до гіпертонічного розчину NaCl. Потім підраховано відсоток злитих клітин і таким чином встановлено ефективність розробленої апаратури. Двоклітинні ембріони миші отримані за відомою методикою Манка [11].

Результати досліджень. Проведено два досліді з електрозлиття. Всього в них піддано цій процедурі з використанням розробленої апаратури 13 (2 та 11) двоклітинних ембріонів миші. Після завершення процесу об'єднання мембран клітин виявилось, що у першому досліді з двох ембріонів злився один, а у другому з 11 злилось 9, тобто ефективність злиття становила 50 та 82 % відповідно. Загальна (по двох дослідіх із загальним рахунком злитих/незлитих клітин 10/13) ефективність електрозлиття становила 77 %. Злиті клітини були додатково перевірені шляхом тестування у гіпертонічному розчині PBS, яке показало, що вони мали цілу мембрану. Всі досліді документовані відеозаписом на плівку. Цих даних достатньо для попереднього висновку про працездатність розробленої апаратури в цілому. Одну з дослідних груп ембріонів миші показана на рис.1. На кадрі є ембріони, що знаходяться на різному етапі злиття, у деяких з них чітко видно спільну мембрану та два ядра, а також полярні тілця. Цікаво, що злиття еластомерів двоклітинних ембріонів миші після імпульсного пробією контакту мембран триває близько 2 годин до повного округлення загальної мембрани тетраплоїда.

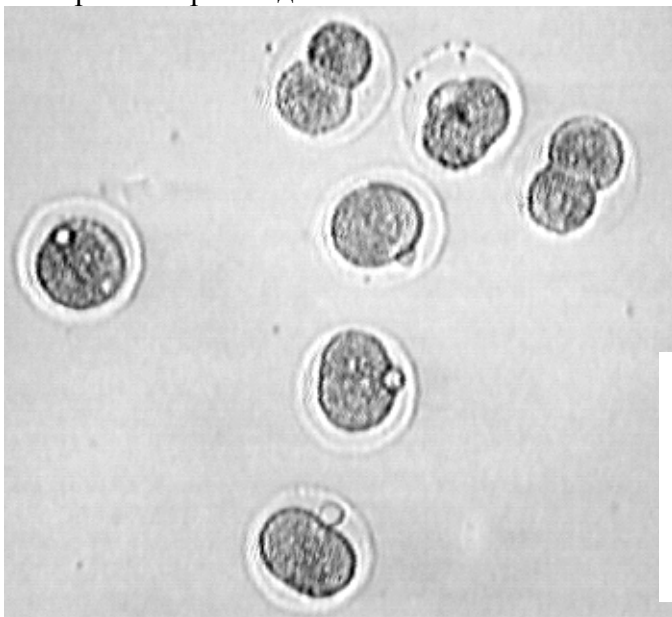


Рис.1. Група двоклітинних ембріонів миші на різних етапах злиття після імпульсного електропробією контакту мембран бластомерів

Таким чином, незважаючи на досить невелику кількість взятих у дослід двоклітинних ембріонів миші, отримано документальне підтвердження працездатності розробленої апаратури. Більш масштабний експеримент з використанням цього об'єкту принципово не змінить отриманого загального висновку або, принаймні, може змінити лише числове значення ефективності електрозлиття, що на даному етапі навряд чи потрібно, проте вартість проведення такої роботи суттєво зросте.

Висновки:

1. Встановлено працездатність розробленої апаратури для електрозлиття клітин тварин.
2. Загальна (по двох дослідках) ефективність злиття двоклітинних ембріонів миші становить 77 %.

Бібліографічний список

1. Zimmermann U., Neil G.A. Electromanipulation of cells.—N.Y.:CRC Press,1996.-375p.
2. Hofmann GA, Evans GA. Electronic genetic physical and biological aspects of cellular electromanipulation //IEEE eng. in med. and biol. magazine.-1986.-N12.-p.6-25.
3. Wolf E. et al. Nuclear transfer in mammals: recent developments and future perspectives //J. Biotechnol.- 1998.- V.65, №2-3.- P.99-100.
4. Mekid H. & Mir L. M. In vivo cell electrofusion //Biochim. Biophys. Acta.-2000.-V.1524.-P.118-130.
5. GENETRONICS inc., BTX division products catalog.-2001. (www.btxonline.com).
6. Cyto Pulse Sciences, inc., 2005. (www.cytopulse.com).
7. EPPENDORF, products catalog, 2002. (www.eppendorf.com)
8. Шигимага В.О. Апаратура для електрозлиття та вивчення провідності клітин //Вісник Харк.держ.техн.ун-ту сільськ. госп-ва.-Х.-2001.- Вип.6.- С.386-389.
9. Шигимага В.О. Електрозлиття двоклітинних ембріонів миші у провідному розчині PBS //Біологія тварин.-Львів.-2005.-Т.7, №1-2.-С.264-267.
10. Лисин В.И. Методика изготовления металлических микроэлектродов //Вісн. Полтав. держ. с.-г. інституту.-2001.- №2-3.- С.41-42.
11. Биология развития млекопитающих. Методы /Пер. с англ. под ред. М. Манк.- М.: Мир.-1990.- 406 с.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗРАБОТАННОЙ АППАРАТУРЫ ДЛЯ ЭЛЕКТРОСЛИЯНИЯ КЛЕТОК ЖИВОТНЫХ

В.А. Шигимага, И.В.Пинигин, Институт животноводства УААН

Разработана аппаратура для электрослияния клеток животных. Изготовлен и испытан опытный образец прибора для электрослияния на двухклеточных эмбрионах мыши. Разработана упрощенная конструкторская документация, а также методика работы с прибором. Общая (по двум опытам) эффективность слияния 2-клеточных эмбрионов мыши составила 77 %.

TESTER DESIGN ELABORATION & ITS APPLICATION FOR ELECTROFUSION OF ANIMAL CELLS.

Shygymaga V., The institute of animal science, UAAS

This article highlights the investigation results on the tester design elaboration for electrofusion of animal cells. Two cell mouse embryos were tested by the above-mentioned device application. Simplified documentation & instruction for apparatus utilization were presented. Embryonic fusion rate constituted 77%.