



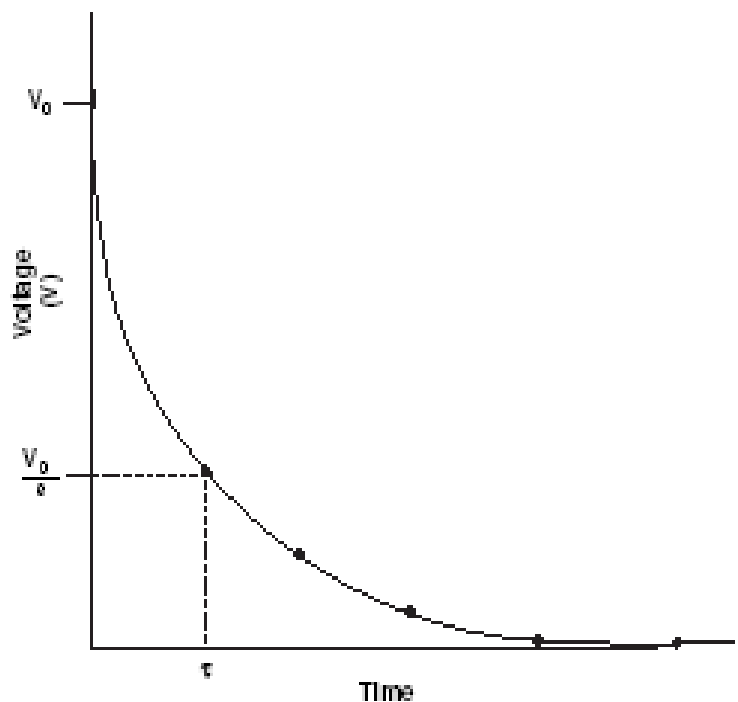
## Bio-rad Gene Pulser Xcell 电穿孔系统

### 一 Gene Pulser Xcell 电穿孔系统介绍

电穿孔的过程中可以有 2 种波型来控制外界电压的变化，Gene Pulser Xcell 可以提供 2 种波型，即指数波和方波。

#### 1.Exponential Decay Wave（指数波）

所谓指数波的方式，就是将已经充电到指定电压的电容进行快速的放电，放电的方式是以指数的形式进行的（如下面的 slide 显示）。该种方式的电穿孔取决于 2 个参数，电场强度(kV/cm)和时间常数(ms)。在实验过程中，采用具体的电击杯调整电压即可调整不同的电场强度。此外，电容和电阻的具体值也可以在 Gene Pulser Xcell 的界面上进行设置。



- 电容器充电到预定的电压( $V_0$ )放电后，即向样品释放脉冲，细胞表面的电压随时间按指数方式下降的
- 电容器的电压值达到峰值释放脉冲后迅速的衰减
- 电场强度  $E$  (V/cm) 是用来描述电击杯外界电场环境的一个参数 ( $E=V/d$ )
- 脉冲时间是一般用时间常数来进行衡量 ( $\sim 37\%$  of  $V_0$ ,  $V_0/e$ )
- 脉冲的时间是由电阻和电容的大小所决定的

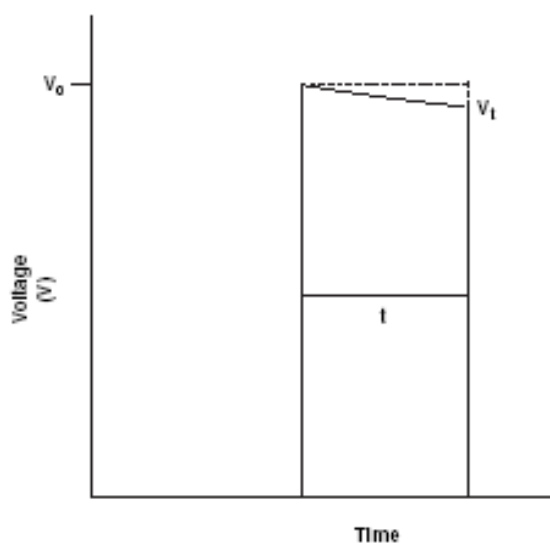
备注：PC module 作用

PC (Parallel Capacitor) 模块的本质就是在放电回路中，在样品上并联一套电阻。在放电回路中设置 PC 模块的目的：如果实验样品具有很高的电阻值，那么脉冲就需要维持相当长的时间，这样对细胞是会有损伤的，长时间的电场作用会导致细胞的裂解。并联了 PC 模块后对样品而言电击是的电压并没有变化，但是 PC 模块起到了分流的作用，可以使得脉冲的时间常数大大减小，可有效的维持细胞的活性。并联了 PC 模块后，时间常数取决于该模块的电阻，电阻越小，那么放电的时间也就越短。

## 2. Square Wave (方波)

对于某些细胞而言，采用指数波进行实验特别容易导致细胞的死亡。对于这种细胞而言，采用方波的形式来进行电穿孔既可以进行有效的转染，又可以很好的保护细胞，维持细胞的活性。方波的形式通常用以下的参数来进行描述：电压、脉冲时间、脉冲次数和脉冲间的间隔时间。上述所有的参数都可以在 Gene Pulser Xcell 的操作界面上方便的设置。在实验结束后，Gene Pulser Xcell 还可以显示实验中这些参数的具体值。

方波的本质和指数波是一样的，区别在于电压还没有下降为 0 的时候，电容器的放电已经被截止了。所有的方波都会有电压的细微下降，以其始的电压值的百分比计算。一般下降率不超过 5%。



- 电容器的指数放电过程中被截止后就会形成方波，其时间常数远大于脉冲时间
- 脉冲时间就是细胞被放电的时间
- 脉冲是可以被反复释放的，在低压回路最多可以重复 **10** 次，在高压回路最多可以重复 **2** 次
- 脉冲的间隔时间就是指 **2** 个脉冲间的时间
- 脉冲下降是指终止电压和起始电压值之间的差值

电容器的指数放电过程中被截止后就会形成方波，但是采用不同电压的回路会形成不同的方波脉冲。

采用方波的工作原理是：对电容器进行充电后，释放脉冲到细胞上维持所需的时间，在进行第二次脉冲前需要对电容器进行重新充电。那么脉冲间的间隔就取决于电容器充电需要的时间和具体的电压，也就是说在设置脉冲间的时间时，其值不能小于电容器充电所需的时间。

采用低压回路时，那么就需要采用 **CE** 模块，该模块的设置是可调的，所以其脉冲时间和脉冲间的间隔是可调的，比高压电路要灵活、方便很多

高压回路：

一次充电，一次脉冲。在下次脉冲前，电容器需要重新充电

最多只能进行 2 次脉冲，脉冲时间为 0.05 – 5msec，脉冲间隔为 5-30sec

低压回路：

该电路是可调的，因此可一次充电，进行多次的脉冲

最多可进行 10 次脉冲，脉冲时间为 0.05-100msec，脉冲间隔为 0.1 – 10 sec

## 二 使用方法：

系统部件：



主界面

```
HOME
  1. Exponential protocol
  2. Time constant protocol
  3. Square wave protocol
  4. Pre-set protocols
> 5. User protocols
```

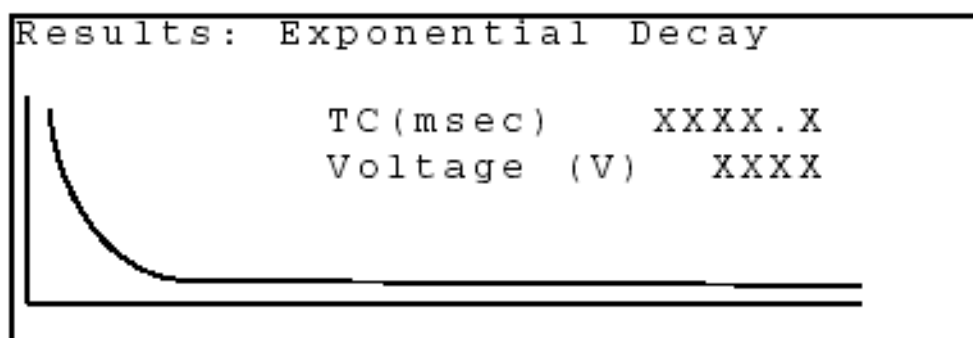
```
HOME
< 6. Last pulse
   7. Optimize
   8. Data management
   9. Measurements
  10. User preferences
```

#### 1. Exponential protocol

在该选项下，用户可设置指数波的脉冲条件  
程序显示：

| PROTOCOL DETAIL: EXPONENTIAL |      |
|------------------------------|------|
| Voltage (V)                  | XXXX |
| Capacitance (uF)             | XXXX |
| Resistance (ohm)             | XXXX |
| Cuvette (mm)                 | X    |

结果显示:



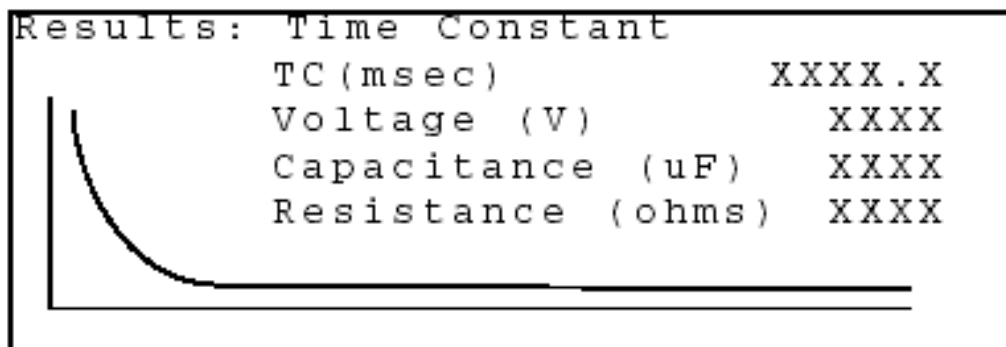
## 2. Time constant protocol

时间常数确定的指数波形式, 在该选项下, 用户可设置具体的时间常数及其他条件来进行指数波的脉冲条件

程序显示:

| PROTOCOL DETAIL: TIME CONSTANT |        |
|--------------------------------|--------|
| Voltage (V)                    | XXXX   |
| Time constant (msec)           | XXXX.X |
| Cuvette (mm)                   | X      |

结果显示:



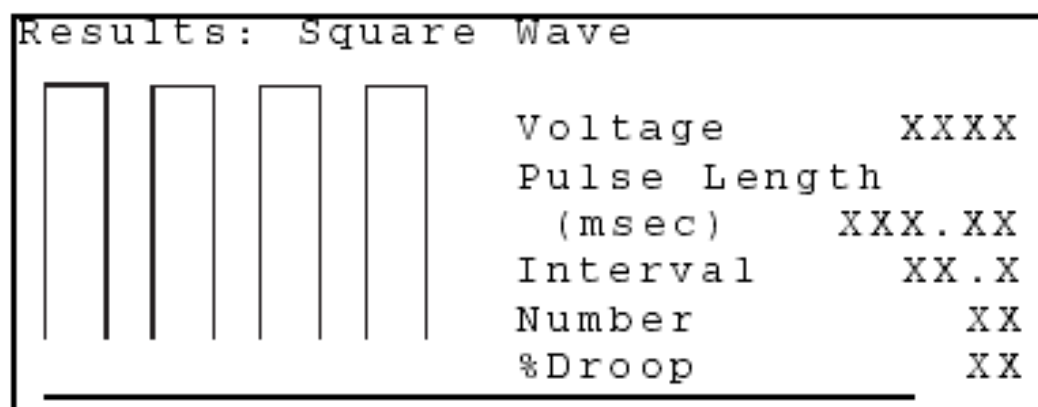
### 3. Square wave protocol

在该选项下，用户可设置方波的脉冲条件  
程序显示：

```
PROTOCOL DETAIL: SQUARE WAVE

Voltage (V)                XXXX
Pulse length (msec)        XXX.XX
Number of pulses            1
Pulse interval (sec)       00.0
Cuvette (mm)               X
```

结果显示：



### 4. Pre-set protocols

在该选项下，仪器本身预存了一些经过优化的电穿孔条件，针对的样品包括细菌、真菌及哺乳动物细胞等

| Pre-set Protocol Designation | Cells         | Pulse type        | PL (msec) | C (μF) | PC (ohm) | V    | Cuvette (cm) | Cell vol (μl) |
|------------------------------|---------------|-------------------|-----------|--------|----------|------|--------------|---------------|
| <b>Mammalian Protocols</b>   |               |                   |           |        |          |      |              |               |
| Mammalian 1                  | CHO           | Square wave       | 15        |        |          | 160  | 0.2          | 100           |
| Mammalian 2                  | COS7          | Square wave       | 20        |        |          | 110  | 0.2          | 100           |
| Mammalian 3                  | 3T3           | Exponential decay |           | 500    |          | 160  | 0.2          | 100           |
| Mammalian 4                  | 293           | Square wave       | 25        |        |          | 110  | 0.2          | 100           |
| Mammalian 5                  | HeLa          | Exponential decay |           | 500    |          | 160  | 0.2          | 100           |
| Mammalian 6                  | BHK21         | Square wave       | 25        |        |          | 140  | 0.2          | 100           |
| Mammalian 7                  | A549          | Square wave       | 10        |        |          | 150  | 0.2          | 100           |
| Mammalian 8                  | CV1           | Square wave       | 25        |        |          | 100  | 0.2          | 100           |
| Mammalian 9                  | K562          | Exponential decay |           | 1000   |          | 155  | 0.2          | 100           |
| Mammalian 10                 | HL60          | Square wave       | 25        |        |          | 140  | 0.2          | 100           |
| Mammalian 11                 | Jurkat        | Exponential decay |           | 1000   |          | 140  | 0.2          | 100           |
| Mammalian 12                 | HuT78         | Square wave       | 25        |        |          | 130  | 0.2          | 100           |
| <b>Bacterial Protocols</b>   |               |                   |           |        |          |      |              |               |
| Bacterial 1                  | E coli        | Exponential decay |           | 25     | 200      | 1800 | 0.1          | 20            |
| Bacterial 2                  | E coli        | Exponential decay |           | 25     | 200      | 2500 | 0.2          | 20-40         |
| Bacterial 3                  | E coli        | Exponential decay |           | 25     | 200      | 3000 | 0.2          | 20-40         |
| Bacterial 4                  | A tumefaciens | Exponential decay |           | 25     | 200      | 2400 | 0.1          | 20            |
| Bacterial 5                  | P aeruginosa  | Exponential decay |           | 25     | 200      | 2500 | 0.2          | 100           |
| Bacterial 6                  | S aureus      | Exponential decay |           | 25     | 100      | 2900 | 0.2          | 50            |
| Bacterial 7                  | B cereus      | Exponential decay |           | 50     | 200      | 1000 | 0.2          | 100           |
| Bacterial 8                  | S pyogenes    | Exponential decay |           | 25     | 200      | 2100 | 0.2          | 200           |
| Bacterial 9                  | L plantarum   | Exponential decay |           | 25     | 400      | 1500 | 0.2          | 40            |
| <b>Fungal Protocols</b>      |               |                   |           |        |          |      |              |               |
| Fungal 1                     | S cerevisiae  | Exponential decay |           | 25     | 200      | 1500 | 0.2          | 40            |
| Fungal 2                     | S cerevisiae  | Exponential decay |           | 25     | 200      | 2500 | 0.4          | 80            |
| Fungal 3                     | S pombe       | Exponential decay |           | 25     | 200      | 2300 | 0.2          | 40            |
| Fungal 4                     | C albicans    | Exponential decay |           | 25     | 200      | 1500 | 0.2          | 40            |
| Fungal 5                     | P pastoris    | Exponential decay |           | 25     | 200      | 2000 | 0.2          | 40            |
| Fungal 6                     | D discoideum  | Exponential decay |           | 10     | 600      | 1000 | 0.4          | 800           |

##### 5. User protocols:

在该选项下，最多可储存 144 个用户自己的程序，采用 12x12 的形式，即 12 个人，每人可储存 12 个自己的程序

| USER DIRECTORY |        |
|----------------|--------|
| 1.             | User1  |
| 2.             | Labguy |
| 3.             | Malcom |
| 4.             | Smith  |
| 5.             | Wesson |
| > 6.           |        |

```

USER PROTOCOLS: User1

1. CHO
2. Monkey
3. Human
4.
5.
> 6.

```

#### 6. Last pulse:

在该选项下，用户可记录最后一次脉冲的条件，并使用该条件进行电穿孔实验。即使关机后，GPX 还是可以调出仪器最后一次电穿孔的条件，并利用该程序进行实验。方便实验室最常用程序的使用

#### 7. Optimize:

可用于方便的优化实验条件，可连续的对脉冲条件中的电压某一个参数进行优化。该功能可在指数波、方波、特定时间常数的指数波模式下使用

```

OPTIMIZE: EXPONENTIAL DECAY

Starting voltage (V)      XXXX
Increment (V)             XXX
Capacitance (uF)         XXXX
Resistance (OHM)          XXXX
Cuvette (mm)             X

```

#### 8. Data management

数据管理

- 可以调出之前的 100 个实验程序
- 显示每个程序的设置条件和结果

|                            |          |        |
|----------------------------|----------|--------|
| Data output 12-12-01 20:23 |          |        |
| Std Protocol: S.pombe      |          |        |
|                            | Settings | Output |
| V                          | 2000     | 2047   |
| C (uF)                     | 25       | 25     |
| R (ohm)                    | 200      | 200    |
| TC (msec)                  |          | 5.1    |
| Cuvette (mm)               | 2        | 2      |

#### 9. Measurements:

仪器的测量功能，用户可预测样品电阻、校正仪器内部电阻等参数

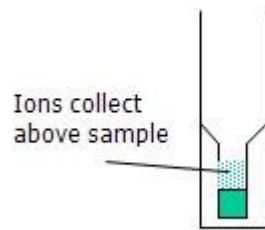
- 该功能使用户可以在日常的工作中经常对 GPX CE 模块电路中的电容器进行校正，确保实验的精确，具体的步骤如下：
  - 断开 ShockPod 电击槽
  - 连接 CE 模块
  - 按下操作面板上的小数点按键
- 在电击前预测样品的电阻
  - 在实验前，在电击杯里加入样品后放入 ShockPod 电击槽内，在 Resistance Measurement 的菜单下按下“回车键”

#### 10. User Preferences:

在该选项下，用户可调节诸如 LCD 屏幕亮度、时钟等参数

|                    |
|--------------------|
| User Preferences   |
| 1.Clock            |
| 2.Screen intensity |
| 3.Sleep function   |

### 三 电弧保护



- 在电击杯中出现电阻特别小的区域时，就会形成短路，产生电弧。样品缓冲液中的离子成分就会造成电弧现象
- 只要上述电阻突然变小的情况被检测到，那么电流就不会经过样品
- 电弧保护就是在存在短路的情况下，使电流不经过样品，确保样品不受强电流的损伤
- 如果样品量很少的话，那么产生的热量会使得样品蒸发
- 如果由于样品的低电阻而产生电弧，那么 **GPX** 会给出提示，并不能提供脉冲