



Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System

中文簡易操作手冊



汎泰儀器有限公司

台北總公司 台北市南京東路3段338巷3號7樓
TEL: 02-27319211~4 FAX: 02-27415583
台中分公司 台中市西屯區河南路二段262號12F-6
TEL: 04-24526191 FAX: 04-24528301
台南分公司 台南市東門路3段31號5樓之1
TEL: 06-3357029 FAX: 06-3357030
高雄分公司 高雄市左營區裕誠路 394 號 4 樓之 2
TEL: 07-5582776 FAX: 07-5567082

產品專員 游璿樺

0800-045-168

實驗器材準備

1. PDS-1000/He Particle Delivery System
2. 氦氣 (Helium)：等級 5 (99.999%) 或 4.5 (99.995%) 以上；壓力調節筏 (GA580, female fitting)
3. 70%及 100%新鮮乙醇 (Ethanol)：HPLC 或 Spectrometric 等級
4. 70% Isopropanol
5. 50% Glycerol (預先滅菌)
6. 1.5 ml 微量離心管
7. Macrocarrier holders 及 Macrocarriers (預先滅菌)
8. Rupture disks (使用前先泡於 70% Isopropanol 數秒，不可太久)
9. Stopping screens (預先滅菌或以 70%乙醇消毒後,置於無菌處晾乾)
10. Microcarriers 之準備：
 - ◇ 取 30mg 的 microparticles 於 1.5ml 微量離心管並加入 1ml 70% 乙醇 (v/v)
 - ◇ vortex 3-5 分鐘後使 particles 靜置於 70%乙醇 15 分鐘
 - ◇ 以 microfuge spinning 5 秒沉澱 particles
 - ◇ 移走上清液,加入 500ul 已滅菌的 50% glycerol 使 microparticles 濃度為 60mg/ml
 - ◇ 鎢粉保存於-20°C；金粉保存於 4°C 待用
 - ※ 乾燥的鎢粉及金粉皆置於乾燥的環境內 (ex. 乾燥箱)
11. 載體 DNA (ex. pBI121)
12. 2.5M CaCl₂
13. 0.1M Spermidine (Sigma, free base, tissue culture grade)
14. Milli-Q 滅菌水
15. 1% NaOCl
16. Target cell (ex. 種子)
17. 培養皿 (Petri Dish)
18. 若使用 GUS 基因，則尚需使用 substrate：X-gluc

Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System

粒子撞擊基因傳送系統操作流程

系統內各物品之前置作業

儀器主體之準備

1. 檢視氬氣筒壓力是否保持大於粒子撞擊衝破圓盤所需壓力 200psi
2. 設定破裂圓盤保持蓋 (rupture disk retaining cap) 與微攜帶子送出組 (microcarrier launch assembly) 間隙距離。當放置好破裂圓盤保持蓋後，將整個含覆蓋蓋 (cover lid) 的微攜帶子送出組放置於撞擊腔最上方一格，並使在白色塑膠架上的設定鈕面朝外，以六角板手將旋鈕鬆開，調整間隙工具有 1/8"、1/4"、3/8" 三種，建議使用 1/4" 的距離。當調整間隙工具固定於破裂圓盤保持蓋的底部時，旋轉可調式窩巢 (adjustable nest) 直到巨攜帶子覆蓋蓋 (macrocarrier cover lid) 接觸到調整間隙工具，將白色塑膠架上的設定鈕以六角板手將旋鈕旋緊固定可調式窩巢的位置
3. 製備破裂圓盤保持蓋 (rupture disk retaining cap)，調整好 step 2. 的間距後，將破裂圓盤保持蓋以鋁箔包起進行高壓滅菌
4. 製備微攜帶子送出組 (microcarrier launch assembly)，氣體激發微攜帶子速度部份是由破裂圓盤與巨攜帶子間隙所決定的，巨攜帶子飛行距離 (macrocarrier flight distance) 是以調整固定式巢 (fixed nest) 內的停止屏支座 (stopping screen support) 與間隔環 (spacer rings) 的位置來決定的，工廠設定建議位置是將停止屏支座置於中間位置。調整方式是將微攜帶子送出組自 PDS-1000/He 單元取出，旋開並移出巨攜帶子覆蓋蓋，微攜帶子送出組各組成分子以巨攜帶子插入工具 (macrocarrier insertion tool) 自底部推出，將巨攜帶子飛行距離調至最小 6mm---反轉固定式巢並插入停止屏支座於內，使停止屏的圓錐面最後位置會朝下然後插入 2 個間隔環 (每個 5mm 厚)，在固定式巢仍反轉的情

形下將巨攜帶子送出組置於其上，將固定式巢定位於可調式窩巢內。若需較大的間隙則重新排列停止屏支座與間隔環，可增加到兩個 5mm 的步驟，最大 16mm 距離。將微攜帶子送出組以鋁箔包住後高壓滅菌或將微攜帶子送出組以 70% 酒精消毒後，於無菌環境下待乾

5. 標的架 (target shelf) 在使用前先以 70% 酒精消毒，置放於無菌環境下晾乾待用 (不可使用高壓滅菌)

耗材的準備

1. 巨攜帶子 (Macrocarriers)

將巨攜帶子取出置於培養皿上方便操作，移除間隔紙片，以巨攜帶子定位工具 (macrocarrier seating tool) 將巨攜帶子確實的置入巨攜帶子支撐物 (macrocarrier holder) 邊緣，將此裝置一起進行高壓滅菌。

2. 破裂圓盤 (rupture disk)

將破裂圓盤取出置於培養皿上方便操作，在放入保留蓋 (retaining cap) 前以 70% isopropanol 快速地消毒 (不可泡太多秒否則會造成分層)，為避免損壞”不建議”高壓滅菌

3. 停止屏 (stopping screen)

將停止屏取出置於培養皿上方便操作，建議以高壓滅菌為佳！或以 70% 酒精消毒，置放於無菌環境下晾乾待用

4. 微攜帶子 (Microcarriers)

※下述方法製備鎢或金粉微攜帶子方法乃根據 Sanford 等人 (*Method in Enzymology*, 217, 482-509 (1993)) 方法製備，可供 120 次粒子撞擊 (以每次使用 500 g 的微攜帶子計算)

- ① 秤 30mg 微攜帶子於 1.5ml 的微量離心管中，加入 1ml 70% 酒精 (v/v) 強力振盪 (vortex) 3-5 分鐘
- ② 靜置 15 分鐘
- ③ 以微量離心機 (microfuge) 離心 5 秒使微攜帶子沉澱

- ④ 移除上清液
- ⑤ 加入 1ml 的無菌水，強力振盪 1 分鐘
- ⑥ 靜置 1 分鐘
- ⑦ 以微量離心機 (microfuge) 短暫離心使微攜帶子沉澱
- ⑧ 移除上清液
- ⑨ 再重複步驟⑤-⑧ 2 次
- ⑩ 加入 500 μ l 滅過菌之 50% glycerol，使最終濃度達 60mg/ml

* 製備好之微攜帶子可於室溫保存 2 周--製備好之鎢粉應保存於 -20°C 避免氧化；製備好之金粉則保存於 4°C 或室溫

* 乾燥未製備之微攜帶子應保存於乾燥、避氧的環境以避免集結

5. 將 DNA 附著於清洗過之微攜帶子上

※ 下述方法可供 6 次粒子撞擊

- ① 將製備於 50% glycerol 的微攜帶子 (濃度 60mg/ml) 強力振盪 5 分鐘，使微攜帶子在溶液中均勻散布
- ② 取出 50 μ l (約 3mg) 置於 1.5ml 的微量離心管中，強力振盪
- ③ 一面振盪一面緩速且依序加入 5 μ l DNA (1 μ g/ μ l)、50 μ l 2.5M CaCl_2 、20 μ l 0.1M spermidine (組織培養等級) 後，持續振盪 2-3 分鐘
- ④ 靜置 1 分鐘
- ⑤ 以微量離心機 (microfuge) 離心 2 秒使微攜帶子沉澱
- ⑥ 以 pipette 小心移除上清液
- ⑦ 加入 140 μ l 70% 酒精 (HPLC 等級) 後並立即以 pipette 小心移除上清液
- ⑧ 加入 140 μ l 100% 酒精後並立即以 pipette 小心移除上清液
- ⑨ 加入 48 μ l 100% 酒精，清敲管壁數次使沉澱物懸浮，再以低速振盪 2-3 秒，即製備完成

Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System

粒子撞擊基因傳送系統簡易操作流程

射擊前的準備

6. 設定破裂圓盤保持蓋 (rupture disk retaining cap) 與微攜帶子送出組 (microcarrier launch assembly) 間隙距離。當放置好破裂圓盤保持蓋後，將整個含覆蓋蓋 (cover lid) 的微攜帶子送出組放置於撞擊腔適當位置
7. 系統內各物品之前置作業檢視氦氣筒壓力是否保持大於粒子撞擊衝破圓盤所需壓力 200psi
8. 清潔/消毒：製備破裂圓盤保持蓋 (rupture disk retaining cap)、微攜帶子送出組 (microcarrier launch assembly)、巨攜帶子 (Macrocarriers)、巨攜帶子支撐物 (macrocarrier holder)
9. 清洗微攜帶子 (Microcarriers)，懸浮於 50% glycerol 並將 DNA 附著於清洗過之微攜帶子上
10. 實驗當天將帶有 DNA 的微攜帶子灌注於滅過菌之巨攜帶子 (Macrocarriers) /巨攜帶子支撐物 (macrocarrier holder) 上

射擊

1. 插好電源，打開電源開關
2. 以 70% 酒精消毒射擊腔內壁
3. 將消毒過之破裂圓盤 (rupture disk) 置入將消毒過之破裂圓盤保持蓋 (rupture disk retaining cap)
4. 使破裂圓盤保持蓋 (rupture disk retaining cap) 置於氣體加速管 (gas acceleration tube) 末端，以專用扳手 (torque wrench) 鎖緊

5. 將巨攜帶子與停止屏置入微攜帶子送出組 (microcarrier launch assembly)
6. 將微攜帶子送出組與目標細胞置入射擊腔，將門關上
7. 將射擊腔抽真空，使真空度達需求壓力(最小 5 英吋 Hg)後 Hold 住使壓力固定
8. 射擊材料：一直壓住 Fire 鈕直到破裂圓盤破掉且壓力值達零才放開

射擊後的工作

1. 釋放射擊腔之真空度
2. 將目標細胞自射擊腔移出
3. 自微攜帶子送出組取出攜帶子與停止屏，取出破掉的破裂圓盤
4. 將氦氣自系統移除 (若當天實驗已完成)