

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ОБЩЕДОСТУПНЫХ МЕТОДОВ ТРАНСФЕКЦИИ МОДЕЛЬНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ДЛЯ ЗАДАЧ БИОТЕХНОЛОГИИ

П. О. Воробьев¹, Д. В. Кочетков¹, К. В. Василенко², А. В. Липатова¹✉

¹ Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта, Москва, Россия

² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Краткосрочная экспрессия генов является одним из самых широко используемых методов в молекулярной биологии, как в исследовательских проектах, так и для решения задач биотехнологической промышленности. Несмотря на то что существующие коммерческие трансфекционные агенты позволяют добиться эффективной трансфекции и высокой экспрессии целевых генов в клетках, масштабирование производственного процесса часто затруднительно из-за высокой стоимости таких агентов. Хорошо описанные методы катионной или кальций-фосфатной трансфекции доступны и дают воспроизводимые результаты при значительно меньшей себестоимости. Целью исследования было проверить методы кальций-фосфатной трансфекции, катионной трансфекции (PEI) и коммерчески доступного реагента TurboFect на эффективность монотрансфекции и котрансфекции на панели широко используемых клеточных линий, таких как HEK293T, HUH7, BHK-21, CHO, MRC5. Эффективность трансфекции плазмидными конструкциями, несущими различные флуоресцентные белки, оценивали путем проведения проточной цитофлуориметрии. Среди всех методов кальций-фосфатная трансфекция позволяет добиться максимально эффективной доставки плазмидной ДНК во всех клеточных линиях, использованных в нашем исследовании, кроме BHK21 — для нее катионная трансфекция с использованием PEI оказалась эффективнее, и сопоставима по эффективности с кальций-фосфатным методом в клеточных линиях CHO.

Ключевые слова: кальций-фосфатная трансфекция, полиэтиленимин, котрансфекция, трансфекция, лентивирусы

Финансирование: проект был поддержан Российским научным фондом (Соглашение № 20-75-10157 от 14 августа 2020 г. «Изучение возможностей получения рекомбинантных штаммов онколитических вирусов с опухоль-специфической репликацией и экспрессией иммуномодулирующих белков»).

Вклад авторов: П. О. Воробьев, Д. В. Кочетков, К. В. Василенко, А. В. Липатова внесли равнозначный вклад в проведение лабораторных экспериментов, подготовку рисунков и интерпретацию результатов.

Соблюдение этических стандартов: исследование проведено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации.

✉ **Для корреспонденции:** Анастасия Валерьевна Липатова
ул. Вавилова, д. 32/1, г. Москва, 119991, Россия; lipatovaanv@gmail.com

Статья получена: 22.04.2022 **Статья принята к печати:** 30.05.2022 **Опубликована онлайн:** 23.06.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.031

COMPARATIVE EFFICIENCY OF ACCESSIBLE TRANSFECTION METHODS IN MODEL CELL LINES FOR BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS

Vorobyev PO¹, Kochetkov DV¹, Vasilenko KV², Lipatova AV¹✉

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Transient gene expression is one of the most common methods in molecular biology, equally relevant for basic research projects and biotechnological industries. Despite the existence of commercial transfection systems, which afford high transfection efficiency and high expression levels of reporter genes, expanding such systems to industrial scales is often problematic due to high costs of the reagents. The well-described methods of cationic and calcium-phosphate transfection are accessible and ensure reproducible results at much lower costs. This study is aimed at comparative validation of calcium phosphate and cationic (polyethylenimine-based) transfection protocols along with the commercially available TurboFect reagent for mono- and cotransfections on a panel of commonly used cell lines including HEK293T, Huh7, BHK-21, CHO and MRC5. The efficiency of transfection with plasmid constructs encoding different fluorescent proteins was measured by flow cytometry. Of all the tested methods, calcium phosphate transfection afforded the highest efficiency of plasmid DNA delivery in all the cell lines except BHK21, for which the PEI method turned out to be more efficient than calcium phosphate transfection, and CHO, for which both methods showed comparable efficiency.

Keywords: calcium phosphate transfection, polyethylenimine, cotransfection, transfection, lentiviruses

Funding: the project was supported by the Russian Science Foundation (grant number 20-75-10157 of August 14, 2020 "Research on the possibilities of obtaining recombinant strains of oncolytic viruses with tumor-specific replication and immunomodulatory protein expression").

Author contribution: Vorobyev PO, Kochetkov DV, Vasilenko KV and Lipatova AV participated equally in the laboratory experiments, preparation of the figures and interpretation of the results.

Compliance with ethical standards: the study complies with the requirements of the World Medical Association Declaration of Helsinki.

✉ **Correspondence should be addressed:** Anastasia V. Lipatova
Vavilova, 32/1, Moscow, 119991, Russia; lipatovaanv@gmail.com

Received: 22.04.2022 **Accepted:** 30.05.2022 **Published online:** 23.06.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.031

Трансфекция — это процесс доставки экзогенной ДНК или РНК в эукариотическую клетку [1], широко используемый для наработки рекомбинантных белков [2] и введения репортерных конструкций для изучения самых разнообразных сигнальных путей [3–6]. Особенно важную роль в развитии метода сыграли исследования

инфекционности вирусных геномов [7]. В настоящее время трансфекция незаменима для создания рекомбинантных вирусных штаммов, а также наработки лентивирусных и аденоассоциированных вирусных векторов [8, 9].

Химические методы трансфекции классифицируют по типам реакционных агентов: фосфат кальция,

полиэтиленимин (PEI), катионные полимеры (хитозан), липосомы, полиамидамины (PAMAM) [10]. Все эти методы имеют свои преимущества и недостатки, выбор одного из них зависит от баланса цитотоксичности и эффективности введения генетической конструкции в клетку [11]. Существует широкий спектр готовых коммерческих решений, таких как Lipofectamine 3000, TurboFect, SuperFect, FuGENE HD [12], однако доступные и хорошо изученные методы кальций-фосфатной и катионной трансфекции все еще широко применяют [10].

Кальций-фосфатная трансфекция (КФТ) была впервые описана в 1973 г. [13], ее применяли для изучения инфекционности геномной ДНК аденовируса, однако сам механизм действия кальций-фосфатных преципитатов как трансфекционных комплексов был описан спустя 17 лет [14]. Было показано, что доставка экзогенной ДНК происходит через эндосомы напрямую в ядро. С этого момента началось активное применение метода. Традиционный протокол основан на копреципитации кальция и ДНК с формированием гидроксипатита ДНК, который образуется в строгих химико-физических условиях перенасыщенного раствора, определенном диапазоне температур и концентраций кальция и фосфата. В связи с этим хорошая воспроизводимость протокола требует определенной методической подготовки [15–18]. На сегодняшний день существуют модификации стандартного метода КФТ, которые позволяют обойти ограничения традиционного способа [19, 20].

Другим доступным и распространенным методом трансфекции является катионная трансфекция с использованием полиэтиленимина (polyethylenimine, PEI) [10, 21], модификацией которой стало использование коммерчески доступного TurboFect. Один из определяющих факторов эффективности этого метода — соотношение ДНК/PEI, а также молекулярный вес PEI, уменьшение которого снижает цитотоксичность и эффективность, и наоборот. Коммерческие решения в большинстве своем предлагают PEI с молекулярным весом 25 кДа [22]. На рынке представлена также химическая модификация высокомолекулярного PEI со сниженной цитотоксичностью PEI «MAX» 40 кДа [10, 23]. Бесспорным преимуществом PEI являются его высокая трансфекционная активность, простота использования и универсальность. Один из серьезных недостатков — его непригодность к длительному хранению, обусловленная окислением PEI атмосферным кислородом, но предложено частичное решение данной проблемы [24]: разведение PEI в 0,2 М соляной кислоте позволяет продлить срок его хранения, а снизить уровень цитотоксичности позволяет разведение смеси PEI/ДНК в лактатном буфере.

Широко используемый трансфекционный реагент Lipofectamine 3000 обладает исключительной эффективностью, хорошо хранится при +4 °С, однако его цена для одного эксперимента по трансфекции 10 млн клеток составляет более 50 USD, данная ценовая категория трансфекционных реагентов в статье не будет рассмотрена.

Одновременная доставка нескольких генетических конструкций часто необходима в рамках решения задач синтетической биологии, создания рекомбинантных вирусных штаммов [8, 9], наработки лентивирусных и аденоассоциированных вирусных частиц, а также для широкого ряда методов биотехнологической промышленности. Подобные эксперименты связаны с трансфекцией большого объема клеток [25]. Применение

готовых коммерческих наборов является удобным, воспроизводимым вариантом, однако их высокая стоимость и логистические проблемы, связанные с отсутствием отечественных аналогов, создают некоторую проблему выбора. Целью нашего исследования было сравнить эффективность КФТ, PEI и готового коммерческого реагента TurboFect для одновременной трансфекции тремя репортерными плазмидными конструкциями и количественно оценить эффективность методом проточной цитометрии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии

Линии HEK293T (ATCC #CRL-3216), BHK21 (ATCC #C-13), MRC5 (ATCC #CCL-171), CHO K1 (ATCC #CCL-61) были приобретены в коллекции ATCC (American Type Culture Collection; США), клеточные линии CHO DG-44 и HUH7 были любезно предоставлены А. В. Ивановым (ИМБ РАН; Россия) из коллекции клеточных линий лаборатории биохимии вирусных инфекций ИМБ РАН. Клетки культивировали на среде DMEM (Gibco, США) с добавлением 10% FBS (HyClone, США) в присутствии антибиотиков в стандартных концентрациях (пенициллин 50 ед./мл и стрептомицин 50 мкг/мл); CHO DG-44 культивировали на DMEM/F12 (PanEco; Россия) с 10% FBS и антибиотиками.

Плазмидные конструкции и трансфекционные реагенты

Плазмидные конструкции, кодирующие флуоресцентные белки (Katushka, BFP и eGFP), были клонированы в вектор pL-CMV-PL4-Puro, разработанный ранее в лаборатории пролиферации клеток (ИМБ РАН; Россия). После подтверждения успешной инсерции и секвенирования соответствующих фрагментов плазмидные конструкции были наработаны в бактериях штамма TOP-10 (New England Biolabs; США) в объеме 200 мл среды LB, после чего из бактериального осадка была выделена плазмидная ДНК с использованием набора Plasmid Midiprep 2.0 (Eurogen; Россия). Чистоту полученной ДНК оценивали путем спектрометрического анализа (Nanodrop 2000; ThermoFisher, США) по соотношению поглощения на длинах волн 260 и 280 нм (для используемых образцов соотношение было от 1,9 и выше).

За сутки до трансфекции на шестиугольный планшет клетки были посеяны в количестве $1,5 \times 10^5$ в объеме 4 мл среды DMEM с 10% фетальной бычьей сыворотки в условиях инкубатора при 37 °С при 5% CO₂.

Трансфекцию с использованием PEI проводили как было описано ранее [24].

Сухой PEI (Polysciences Inc., USA; Cat# 23966) растворяли в 0,2М HCl до концентрации 5 мкг/мкл, затем аликвотировали и подвергнули отсроченному хранению при –80 °С. Лактатный буфер (20 мМ лактата натрия, 150 мМ NaCl, pH 4,0) хранили при +4 °С.

В день эксперимента смешивали 3 мкг ДНК и 150 мкл лактатного буфера. Отдельно смешивали 15 мкг PEI и 150 мкл лактатного буфера. Растворы ДНК в лактатном буфере и PEI в лактатном буфере перемешивали на вортексе и смешивали между собой, выдерживали при комнатной температуре 10–15 мин, после чего капельно добавляли в культуральную среду. При последовательном

добавлении в 300 мкл лактатного буфера ДНК и PEI эффективность трансфекции сохранялась (данные не приведены). Анализ флуоресценции проводили через 48 ч. Кальций-фосфатную трансфекцию проводили в соответствии с опубликованной ранее методикой [26].

За час до трансфекции среду меняли на DMEM (Gibco), содержащий 10% FBS (HyClone), для шестилучного планшета объем среды составлял 2,25 мл. Двукратный HBS (табл. 1) объемом 125 мкл был смешан с равным объемом ДНК (3 мкг) / 2 М CaCl₂/dH₂O, молярность CaCl₂ в итоговой смеси ДНК / CaCl₂ / dH₂O должна составлять 148 мМ. Далее 2× HBS, буфер смешивали с ДНК/CaCl₂/dH₂O при постоянном перемешивании и инкубировали 10–20 мин при комнатной температуре. Капельно добавляли в культуральную среду. Спустя 14 ч проводили шок клеточной мембраны. Для этого культуральную среду удаляли и добавляли 1 мл 10%-го раствора ДМСО в PBS. После инкубации в течение 2,5 мин клетки дважды промывали 3 мл PBS, затем добавляли свежую культуральную среду.

Трансфекцию с помощью TurboFect™ проводили в соответствии с рекомендациями производителя. В день эксперимента 4 мкг плазмидной ДНК смешивали с бессывороточной средой DMEM, после чего добавляли 6 мкл реагента TurboFect, который предварительно тщательно перемешивали на вортексе, инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин и капельно добавляли в культуральную среду.

Оценка жизнеспособности клеток

Эксперименты по оценке жизнеспособности проводили с помощью 24-луночных планшетов. Оценка проводилась спустя 24 ч после трансфекции, так как при более длительной инкубации в результате пролиферации клеток сложно оценить разницу в токсических эффектах. Использовали стандартный МТТ-тест. Раствор МТТ (Диа-М; Россия) приготавливали в PBS в концентрации 5 мкг/мл. Инкубация с клетками длилась 3 ч, после чего среду удаляли и добавляли 300 мкл ДМСО (ПанЭко; Россия). В качестве контролей использовали клетки без обработки. Детекцию проводили с использованием планшетного ридера CLARIOSTAR (BMG LABTECH; США) путем измерения поглощения на длине волны 595 нм с нормализацией по длине волны 490 нм.

Проточная цитометрия и обработка данных

Количественную оценку флуоресценции определяли с помощью цитофлуориметра BD LSR Fortessa (Beckman Dickinson; США). Детекцию проводили в каналах PE (561/(586/15) нм — Katushka), FITC (488/(530/30) нм — eGFP) и Pacific Blue (405/(450/50) нм — tagBFP). Настройку компенсации, а также первичную обработку данных проводили с помощью программного обеспечения FACS Diva. Дальнейший анализ выполняли с использованием программы Flowing Software 2.0 (Perttu Terho; Центр биотехнологии Турку, Финляндия). Исследование проводили в трех независимых экспериментах (каждый в трех биологических повторностях).

Наработка лентивирусных стоков и оценка их титра

Для наработки лентивирусных частиц использовали плазмидные конструкции с упаковочными белками pREV, pGAG-pol, p-VSV-G и pL-CMV-eGFP-puro из

Таблица 1. Состав 2× hepes buffer saline (HBS)

NaCl	280 мМ
KCl	10 мМ
Na ₂ HPO ₄	1,5 мМ
Декстроза / глюкоза	12 мМ
HEPES pH 7,05	50 мМ

коллекции лаборатории пролиферации клеток (ИМБ РАН; Россия). Клетки HEK293T высевали на чашки Петри в конfluence 35%, на следующий день трансфецировали плазмидами (в соотношении 2 : 1 : 1 : 4 в соответствии с порядком перечисления) согласно одной из описанных выше методик [27]. Спустя 16 ч культуральную среду заменяли на DMEM с 2% FBS. Еще через 8 ч собирали первый сток и затем дважды в сутки повторяли сбор лентивирусных частиц. Оценка вирусного титра объединенных пяти стоков проводили модифицированным методом конечных разведений на линии HEK293T. Приготавливали 10-кратные серийные разведения лентивируса в бессывороточной среде DMEM, затем добавляли к свежей культуре, высаженной на 48-луночные планшеты, по 15 000 клеток на лунку. Среду заменяли на DMEM с 2% FBS и добавляли разведения лентивирусных стоков. Опыт проводили в четырех технических параллелях. Спустя 72 ч проводили подсчет флуоресцентных блюшек в лунках с максимально разведенным вирусом.

Статистический анализ результатов

Статистический анализ проводили в программном пакете GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, Inc.; Ла-Хойя, Калифорния, США). Для анализа достоверности статистических различий использовали однофакторный ANOVA-анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка жизнеспособности клеток после трансфекции

Спустя 24 ч после добавления к клеткам трансфекционных реагентов и ДНК проводили оценку жизнеспособности методом МТТ-анализа (рис. 1).

Как видно из полученных данных, более 80% клеток всех исследуемых линий успешно переживают процедуру трансфекции. Через 48 ч после проведения трансфекции оценка жизнеспособности не является информативной, так как в связи с эффектом контактного торможения количество клеток в контрольных лунках не увеличивается после достижения полной конfluence, в то время как трансфецированные клетки продолжают пролиферировать.

Оценка эффективности монотрансфекции

Для сравнения эффективности КФТ и трансфекции с помощью PEI была проведена трансфекция плазмидной конструкцией (pL-CMV-Katushka-puro) (рис. 2).

Была проведена оптимизация следующих условий:
– время инкубации клеток с ДНК/кальций-фосфатным преципитатом (6 и 14 ч);
– использование шока клеточной мембраны, вызываемого инкубацией с ДМСО в течение 2,5 мин.

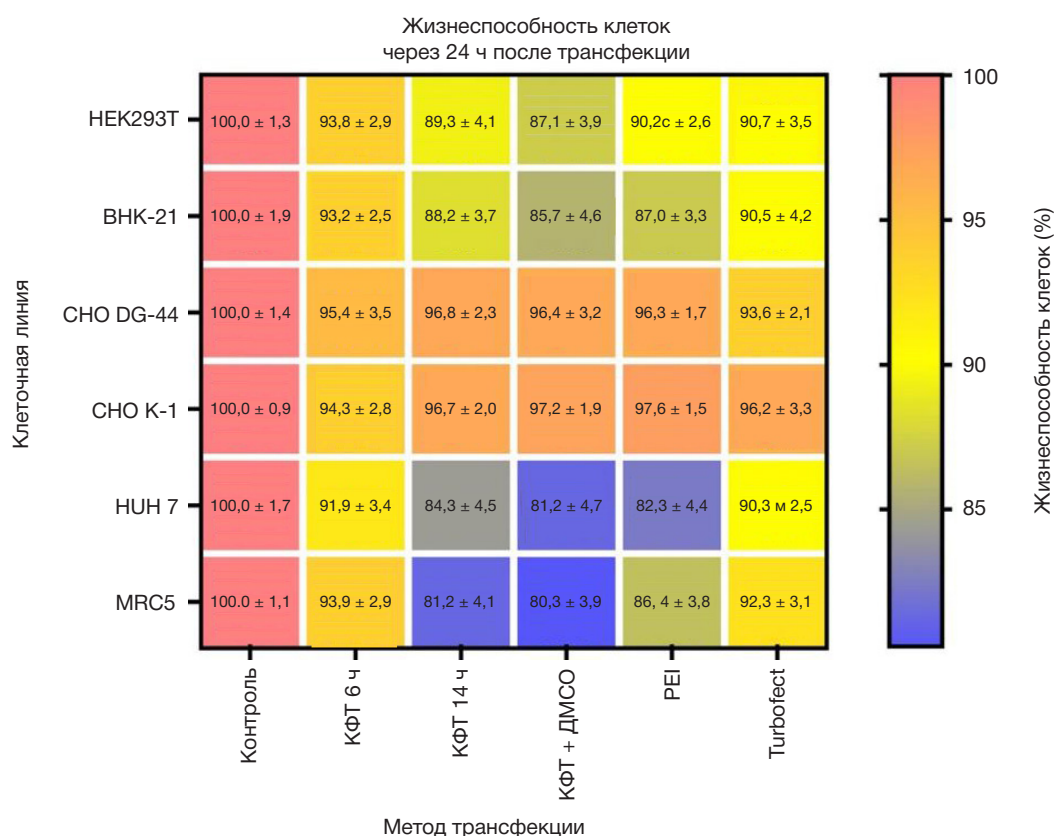


Рис. 1. Оценка жизнеспособности клеточных линий после проведения трансфекции с PEI, Turbofect или КФТ в сравнении с нетрансфицированными клетками методом МТТ-анализа

Инкубация в течение 14 ч с ДНК/кальций-фосфатным преципитатом для клеточных линий HEK293T и CHO K-1 приводит к увеличению числа трансфицированных клеток с 27% при шестичасовой до 97% при инкубации в течение 14 ч (p -value < 0,01) для HEK293T и с 1,5 до 13% для CHO K-1, соответственно (p -value < 0,01). Тогда как клеточные линии MRC5 и HUH7 показали снижение числа трансфицированных клеток с 25 до 3% (p -value < 0,01) для MRC5, с 8 до 1% (p -value < 0,01) — для HUH7.

Инкубация клеток с 10% ДМСО приводила к значительному увеличению доли трансфицированных клеток только для клеточной линии MRC5 (p -value < 0,05). На всех исследованных клеточных линиях, за исключением BHK-21 КФТ, она оказалась более эффективной. Трансфекция с применением PEI также оказалась эффективным методом для большинства линий со сравнимым цитотоксическим эффектом на клетках.

Для линий HEK293T и CHO DG-44 была проведена проверка влияния культуральной среды на эффективность КФТ (рис. 2А, В). Для линии CHO DG-44 было показано заметное увеличение числа трансфицированных клеток на среде DMEM/F12 (p -value < 0,01). Для образцов на среде DMEM/F12 ДМСО-шок клеточной мембраны достоверно не повышал эффективность.

Оценка эффективности котрансфекции

На следующем этапе исследования мы проверили эффективность трансфекции двумя плазмидными конструкциями, кодирующими флуоресцентные белки eGFP и Katushka (рис. 3А; табл. 2). Наиболее эффективно проходит котрансфекция клеточной линии HEK293T, для CHO КФТ оказалось лучше, чем PEI (p -value < 0,01). Трансфекция с применением TurboFect была наименее

эффективной. Микрофотографии результатов КФТ на линии HEK293T представлены на рис. 4.

Оценку эффективности котрансфекции тремя плазмидными конструкциями, кодирующими флуоресцентные белки BFP, eGFP и Katushka, также проводили методом проточной цитометрии (рис. 5). Тенденции, отмеченные при трансфекции двумя генетическими конструкциями, сохраняются. Процент клеток, трансфицированных одновременно тремя плазмидными конструкциями, ожидаемо снижается (рис. 3Б; табл. 3). Анализ результатов проточной цитометрии проводили в соответствии с параметрами, приведенными на рис. 5. Популяции положительных по флуоресценции клеток отделялись по границе аутофлуоресценции нетрансфицированных клеток.

Из полученных результатов следует, что общедоступные методы химической трансфекции демонстрируют очень высокую эффективность при моно- и котрансфекциях, сравнимую с самыми эффективными коммерчески доступными системами FuGENE и Lipofectamine 3000 [28].

Оценка эффективности сборки лентивирусных частиц, несущих интеграционную кассету с eGFP

Лентивирусную трансдукцию широко применяют для получения клеточных сублиний, стабильно экспрессирующих экзогенные белки, для репрограммирования клеток и многих других задач молекулярной и клеточной биологии. Для наработки лентивирусных стоков необходимо трансдуцировать упаковочную линию клеток HEK293T тремя или четырьмя плазмидными конструкциями, кодирующими белки HIV-1, гликопротеид VSV-G, а также плазмидой, несущей целевой трансген. Эффективность сборки частиц зависит от эффективности трансфекции и жизнеспособности клеток. Для решения этой практической

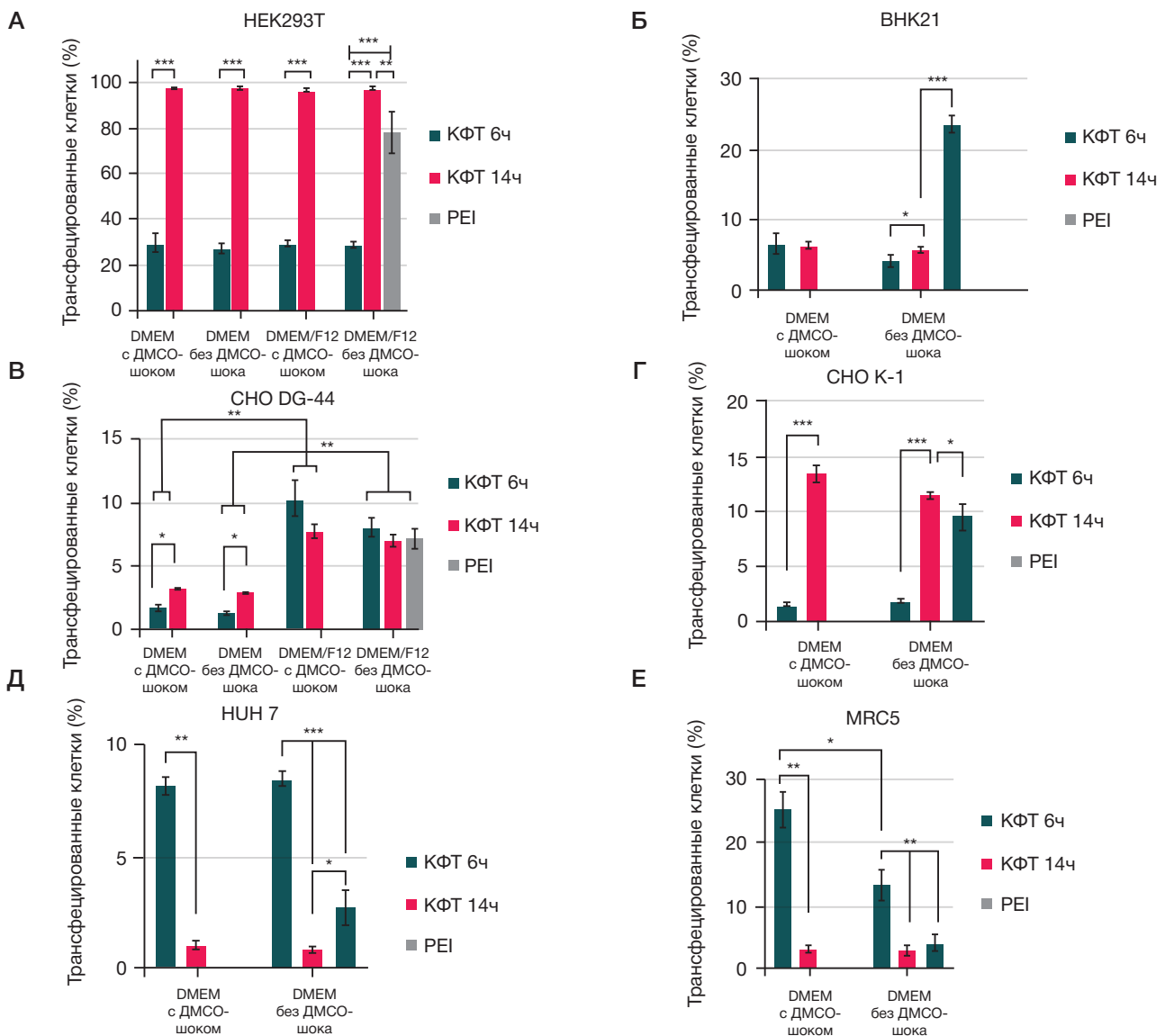


Рис. 2. Оценка эффективности КФТ и трансфекции PEI плазмидной конструкцией, несущей флуоресцентный белок Katushka, на различных модельных клеточных линиях: HEK293T (А), VHK-21 (Б), CHO DG-44 (В), CHO K-1 (Г), HUH7 (Д), MRC5 (Е). КФТ 6 ч — кальций-фосфатная трансфекция 6 ч инкубации; КФТ 14 ч — 14 ч инкубации

задачи на основании полученных ранее данных были выбраны методы КФТ + ДМСО, PEI и Turbofect.

Трансфекцию проводили на 6 млн клеток (чашка Петри диаметром 10 см в конфлюэнтности 70%). Титр лентивирусных частиц оценивали методом конечных разведений (рис. 6).

Эффективность наработки лентивирусных частиц максимальна в случае использования КФТ (9×10^5 и.е./мл), PEI дает сравнимый результат (105 и.е./мл), однако титр достоверно ниже (p -value < 0,05), как и в случае Turbofect (6×10^4 и.е./мл; p -value < 0,01).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Методы химической трансфекции демонстрируют различную токсичность и эффективность трансфекции в зависимости от их химической природы и соотношения ДНК и трансфекционного реагента. На эффективность трансфекции влияют многие параметры, при этом различия в условиях проведения экспериментов затрудняют детальное сравнение результатов в различных работах [16, 24]. В настоящем исследовании был проведен

сравнительный анализ эффективности трех методов трансфекции в нескольких клеточных линиях различного происхождения.

Среди всех линий наиболее эффективно трансфицируются клетки HEK293T. Данная линия широко используется для наработки рекомбинантных белков и лентивирусных стоков и является одной из самых изученных модельных линий. КФТ дает очень хороший воспроизводимый результат на данной линии (более 95% трансфицированных клеток). Для HEK293T время инкубации с ДНК / кальций / фосфатным преципитатом является ключевым фактором для увеличения эффективности трансфекции с 6 до 14 ч и составляет 29 и 97% соответственно (p -value < 0,01), тогда как роль шока клеточной мембраны не играет существенной роли, статистически значимой разницы не выявлено. Эффективность трансфекции КФТ и PEI составляет 68 и 21%, соответственно (p -value < 0,01) для трансфекции двумя плазмидными конструкциями, 40 и 15% соответственно (p -value < 0,01) для трехплазмидной котрансфекции. Эффективность же PEI и TurboFect составляет 21 и 5,9% для трансфекции двумя конструкциями и 15 и 5% — для трехплазмидной трансфекции (p -value < 0,01).

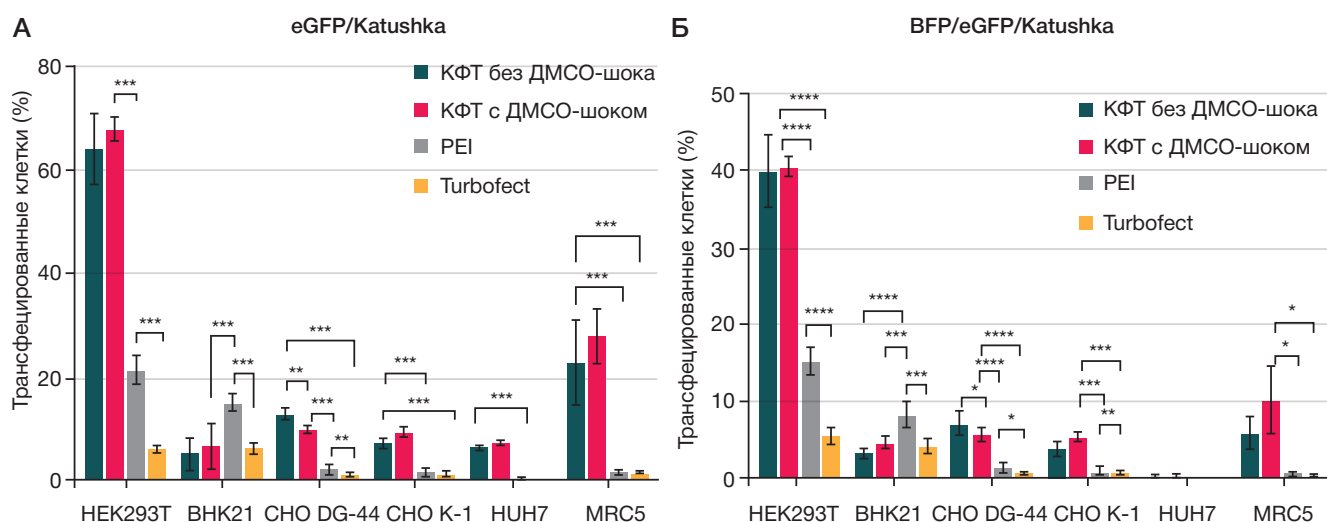


Рис. 3. Оценка эффективности котрансфекции двумя плазмидными конструкциями (eGFP/Katushka) (А) и тремя плазмидными конструкциями (BFP/eGFP/Katushka) (Б) на различных модельных клеточных линиях

Таблица 2. Количественная оценка доли клеток, трансфицированных двумя плазмидными конструкциями через 48 ч после трансфекции различными методами (выделены лучшие методы из использованных)

Клеточная линия	Доля клеток, котрансфицированных двумя плазмидными конструкциями, %			
	КФТ	КФТ + ДМСО	PEI	Turbofect
HEK293T	64,27 ± 6,85	68,1 ± 2,29 (<i>p</i> < 0,001)	21,33 ± 2,78	5,97 ± 0,61
BHK21	5 ± 3,11	6,6 ± 4,40	15 ± 1,85 (<i>p</i> < 0,001)	6,2 ± 0,86
CHO DG-44	12,87 ± 1,16 (<i>p</i> < 0,001)	9,85 ± 0,75	2,13 ± 0,92	1,05 ± 0,47
CHO K-1	7,1 ± 0,916	9,43 ± 0,93 (<i>p</i> < 0,001)	1,43 ± 0,83	1,13 ± 0,51
HUH7	6,93 ± 0,50	7,23 ± 0,55 (<i>p</i> < 0,001)	0,23 ± 0,16	0,09 ± 0,06
MRC5	22,7 ± 8,15	27,93 ± 5,25 (<i>p</i> < 0,001)	1,4 ± 0,56	1,55 ± 0,25

Таблица 3. Количественная оценка доли клеток, трансфицированных тремя плазмидными конструкциями через 48 ч после трансфекции различными методами (выделены лучшие методы из использованных)

Клеточная линия	Доля клеток, котрансфицированных тремя плазмидными конструкциями, %			
	КФТ	КФТ + ДМСО	PEI	Turbofect
HEK293T	39,83 ± 4,55	40,47 ± 1,27 (<i>p</i> < 0,001)	15,2 ± 1,75	5,57 ± 0,98
BHK21	3,3 ± 0,511	4,63 ± 0,80	8,23 ± 1,70 (<i>p</i> < 0,001)	4,16 ± 0,92
CHO DG-44	7,2 ± 1,52 (<i>p</i> < 0,001)	5,73 ± 0,99	1,33 ± 0,72	0,63 ± 0,09
CHO K-1	3,8 ± 0,92	5,4 ± 0,53 (<i>p</i> < 0,001)	0,93 ± 0,41	0,7 ± 0,19
HUH7	0,13 ± 0,06	0,2 ± 0,13 (ns)	0,09 ± 0,06	0,07 ± 0,06
MRC5	5,8 ± 2,02	10,17 ± 4,33 (<i>p</i> < 0,05)	0,43 ± 0,15	0,33 ± 0,15

Примечание: ns — незначимо.

Для оценки практической эффективности котрансфекций четырьмя плазмидными конструкциями, кодирующими упаковочные белки лентивируса, и одной, кодирующей целевой ген (eGFP), нами были получены лентивирусные стоки, которые эффективно трансдуцируют клетки, в результате чего можно наблюдать экспрессию eGFP. Лентивирусные стоки, полученные методом КФТ, имели самый высокий титр 9×10^5 и.е./мл, тогда как полученные с помощью PEI и TurboFect существенно более низкий 10^5 и.е./мл и 6×10^4 и.е./мл соответственно (p -value < 0,05).

Что касается линии ВНК-21, то КФТ продемонстрировала менее высокую эффективность, чем PEI, — 6,6 и 15% соответственно (p -value < 0,01) и 4,6% против 8,3% при тройной трансфекции (p -value < 0,01), что частично согласуется с опубликованными ранее данными [24]. Различия в результатах можно объяснить несколькими критически важными факторами, в частности, методом приготовления PEI. Одним из важных требований для сохранения высокой эффективности является оперативное приготовление раствора PEI без длительного хранения в сухом виде после производства, так как окисление PEI атмосферным кислородом снижает его эффективность [24]. Трансфекция PEI во многом оказалась эффективнее, чем Turbofect (11 и 6% соответственно, p -value < 0,01) для трансфекции двумя плаزمидами и 8% против 4% при тройной трансфекции (p -value < 0,01). TurboFect хранится при +2–8 °С, и несоблюдение этих условий существенно снижает его эффективность, что могло бы объяснить низкие показатели его эффективности во всех проведенных нами экспериментах.

КФТ показала себя как эффективный метод и на других клеточных линиях, использованных в нашем исследовании в сравнении с PEI (p -value < 0,001 — для линий HEK293T, NuH7, CHO DG-44, CHO K-1 и p -value < 0,05 — для MRC5). Следует отметить, что шок клеточной мембраны, вызванный инкубацией с DMSO для клеточных линий CHO-K1 (p -value < 0,05) и MRC5, приводил к незначительному увеличению эффективности трансфекции, как при двойной, так и при тройной котрансфекции. Клетки линии NuH7 не были эффективно котрансфецированы ни одним из исследованных нами методов, однако монотрансфекция

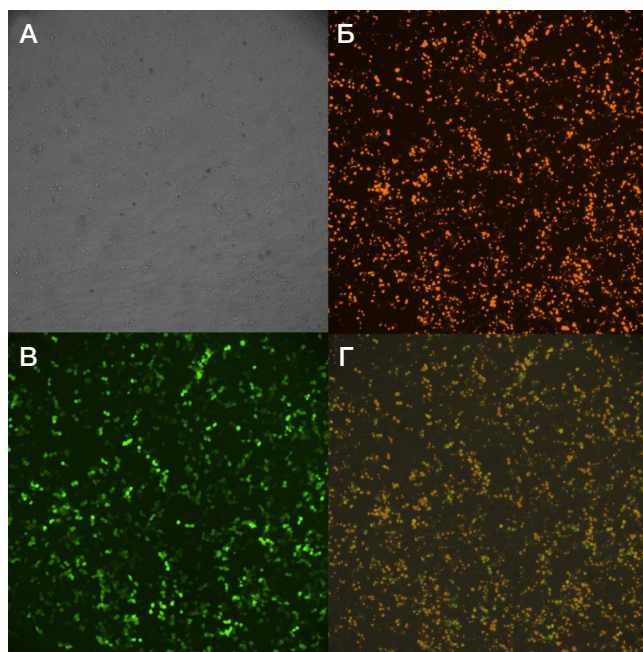


Рис. 4. Микрофотографии КФТ двумя генетическими конструкциями, кодирующими флуоресцентные белки (eGFP и Katushka). А. Светлое поле. Б. Katushka. В. eGFP. Г. Совмещенное изображение (увеличение $\times 40$)

КФТ с шоком мембраны приводила к трансфекции более 7% клеток.

Одним неоспоримым преимуществом PEI перед КФТ является простота применения для трансфекции суспензионных культур клеток, которые не были использованы в нашем исследовании. Клеточная линия Expi293, широко применяемая для наработки белков, может быть эффективно трансфецирована с использованием PEI вместо весьма дорогостоящего ExpiFectamine [29].

ВЫВОДЫ

Кальций-фосфатный метод позволяет добиться высокого уровня трансфекции и воспроизводимых результатов на панели клеточных линий широко используемых

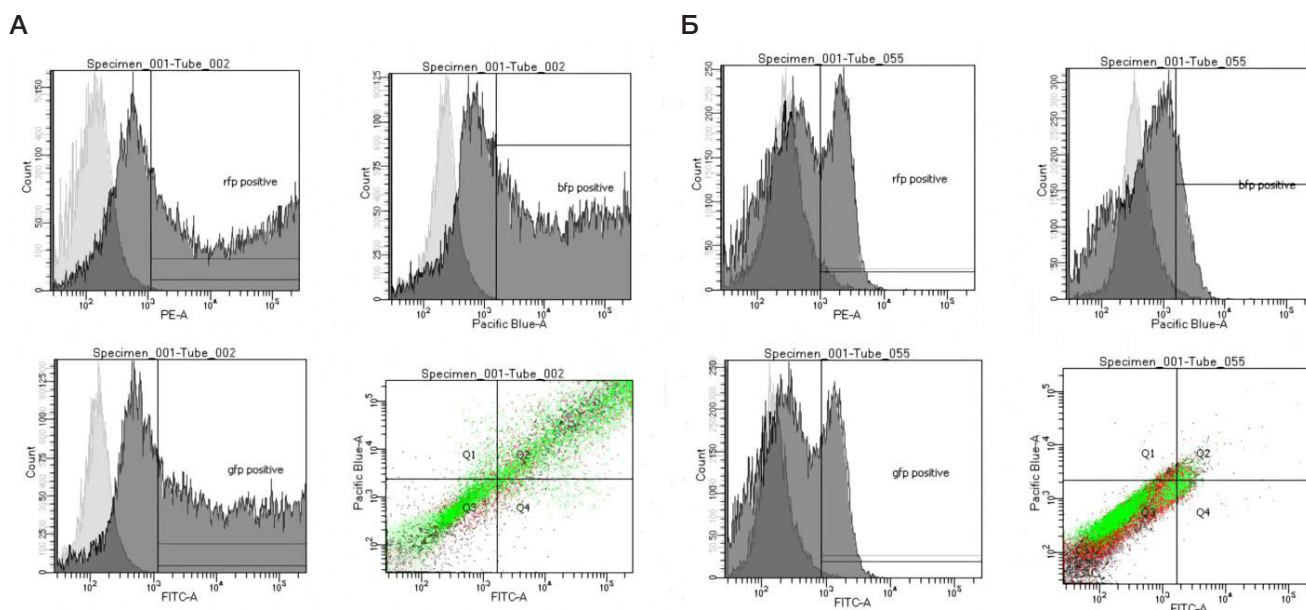


Рис. 5. Данные проточной цитометрии для клеточных линий HEK293T (А) и NuH7 (Б), светлый контур — нетрансфецированный контроль, темный — КФТ. Выделены популяции, положительные по флуоресценции соответствующих экспрессируемых белков (eGFP, Katushka, BFP), а также положительные по трем флуоресцентным меткам (Q2)

для исследовательских и биотехнологических задач. Его выполнение требует определенной методической подготовки, но при этом отсутствует проблема хранения трансфекционного агента, что гарантирует высокую воспроизводимость метода. Для задач получения лентивирусных стоков на клетках HEK293T данный метод дает очень хороший результат (9×10^5 и.е./мл без концентрирования), не уступающий готовым коммерческим лентивирусным частицам, что особенно актуально с учетом логистических сложностей. Катионная трансфекция PEI также демонстрирует высокую эффективность при сравнительно простом протоколе выполнения. Подготовка реактивов с учетом особенностей хранения делает метод простым для масштабирования без снижения эффективности. TurboFect дает приемлемые результаты, хотя эффективность этого трансфекционного реагента ниже. Тем не менее метод очень легкий в исполнении и хорошо подходит для небольших исследовательских задач. Однако высокая стоимость и длительная доставка не позволяют использовать его в качестве метода трансфекции для масштабных проектов.

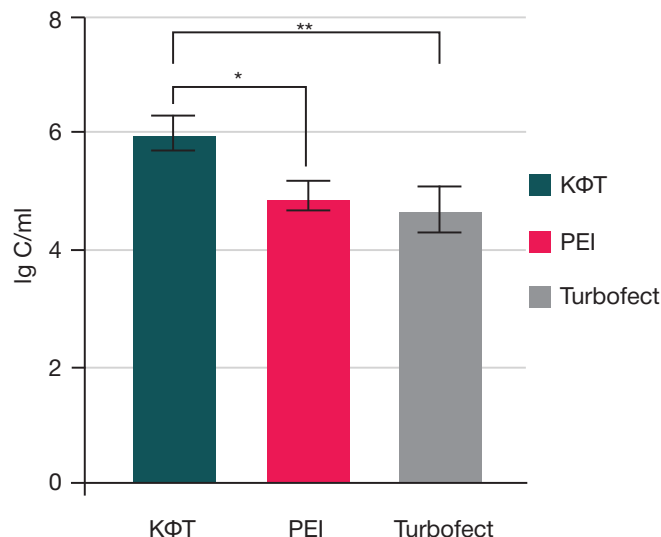


Рис. 6. Концентрация лентивирусных стоков, полученных на клетках HEK293T после трансфекции различными реагентами

Литература

- Kim TK, Eberwine JH. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010; 397: 3173–8.
- Teixeira AP, Stucheli P, Auslander S, Auslander D, Schonenberger P, Hurlmann S, et al. CelloSelect — A synthetic cellobiose metabolic pathway for selection of stable transgenic CHO cell lines. *Metabolic Engineering*. 2022; 70: 23–30.
- Gu L, Kitamura M. Sensitive detection and monitoring of senescence-associated secretory phenotype by SASP-RAP assay. *PLoS One*. 2012; 7: e52305.
- Miura M, Yuan J. Transient transfection assay of cell death genes. *Methods in Enzymology*. 2000; 322: 480–92.
- Strebel A, Harr T, Bachmann F, Wernli M, Erb P. Green fluorescent protein as a novel tool to measure apoptosis and necrosis. *Cytometry*. 2001; 43: 126–33.
- Boulaiz H, Prados J, Melguizo C, Garcia AM, Marchal JA, Ramos JL, et al. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human breast cancer by transfection of gef gene. *British Journal of Cancer*. 2003; 89: 192–8.
- Vaheri A, Pagano JS. Infectious poliovirus RNA: a sensitive method of assay. *Virology*. 1965; 27: 434–6.
- Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, Hobom G, Webster RG. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 6108–13.
- Weber K, Bartsch U, Stocking C, Fehse B. A multicolor panel of novel lentiviral "gene ontology" (LeGO) vectors for functional gene analysis. *Molecular Therapy*. 2008; 16: 698–706.
- Longo PA, Kavran JM, Kim MS, Leahy DJ. Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI). *Methods in Enzymology*. 2013; 529: 227–40.
- Jin L, Zeng X, Liu M, Deng Y, He N. Current progress in gene delivery technology based on chemical methods and nano-carriers. *Theranostics*. 2014; 4: 240–55.
- Rahimi P, Mobarakeh VI, Kamalzare S, SajadianFard F, Vahabpour R, Zabihollahi R. Comparison of transfection efficiency of polymer-based and lipid-based transfection reagents. *Bratisl Lek Listy*. 2018; 119: 701–05.
- Graham FL, van der Eb AJ. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*. 1973; 52: 456–67.
- Orrantia E, Chang PL. Intracellular distribution of DNA internalized through calcium phosphate precipitation. *Experimental Cell Research*. 1990; 190: 170–4.
- Kingston RE, Chen CA, Okayama H. Calcium phosphate transfection. *Current protocols in immunology*. 2001; 31: 1–9.
- Olton D, Li J, Wilson ME, Rogers T, Close J, Huang L, et al. Nanostructured calcium phosphates (NanoCaPs) for non-viral gene delivery: influence of the synthesis parameters on transfection efficiency. *Biomaterials*. 2007; 28: 1267–79.
- Pedraza CE, Bassett DC, McKee MD, Nelea V, Gbureck U, Barralet JE. The importance of particle size and DNA condensation salt for calcium phosphate nanoparticle transfection. *Biomaterials*. 2008; 29: 3384–92.
- Sokolova VV, Radtke I, Heumann R, Epple M. Effective transfection of cells with multi-shell calcium phosphate-DNA nanoparticles. *Biomaterials*. 2006; 27: 3147–53.
- Cao X, Deng W, Wei Y, Su W, Yang Y, Wei Y, et al. Encapsulation of plasmid DNA in calcium phosphate nanoparticles: stem cell uptake and gene transfer efficiency. *Int J Nanomedicine*. 2011; 6: 3335–49.
- Nouri A, Castro R, Santos JL, Fernandes C, Rodrigues J, Tomas H. Calcium phosphate-mediated gene delivery using simulated body fluid (SBF). *Int J Pharm*. 2012; 434: 199–208.
- Baker A, Saltik M, Lehrmann H, Killisch I, Mautner V, Lamm G, et al. Polyethylenimine (PEI) is a simple, inexpensive and effective reagent for condensing and linking plasmid DNA to adenovirus for gene delivery. *Gene Therapy*. 1997; 4: 773–82.
- Moghimi SM, Symonds P, Murray JC, Hunter AC, Debska G, Szewczyk A. A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy. *Molecular Therapy*. 2005; 11: 990–5.
- Liu T, Yu X, Kan B, Guo Q, Wang X, Shi S, et al. Enhanced gene delivery using biodegradable poly(ester amine)s (PEAs) based on low-molecular-weight polyethylenimine and poly(epsilon-caprolactone)-pluronic-poly(epsilon-caprolactone). *J Biomed Nanotechnol*. 2010; 6: 351–9.
- Fukumoto Y, Obata Y, Ishibashi K, Tamura N, Kikuchi I, Aoyama K, et al. Cost-effective gene transfection by DNA compaction at pH 4.0 using acidified, long shelf-life polyethylenimine. *Cytotechnology*. 2010; 62: 73–82.
- Yahalom-Ronen Y, Tamir H, Melamed S, Politi B, Shifman O, Achdout H, et al. A single dose of recombinant VSV-G-spike vaccine provides protection against SARS-CoV-2 challenge. *Nat Commun*. 2020; 11: 6402.
- Kwon M, Firestein BL. DNA transfection: calcium phosphate method. *Methods Mol Biol*. 2013; 1018: 107–10.
- Chumakov SP, Kravchenko JE, Prassolov VS, Frolova EI, Chumakov PM. Efficient downregulation of multiple mRNA targets with a single shRNA-expressing lentiviral vector. *Plasmid*. 2010;

- 63: 143–9.
28. Hasan MM, Ragnarsson L, Cardoso FC, Lewis RJ. Transfection methods for high-throughput cellular assays of voltage-gated calcium and sodium channels involved in pain. *PLoS One*. 2021; 16: e0243645.
29. Fang XT, Sehlin D, Lannfelt L, Syvanen S, Hultqvist G. Efficient and inexpensive transient expression of multispecific multivalent antibodies in Expi293 cells. *Biol Proced Online*. 2017; 19: 11.

References

- Kim TK, Eberwine JH. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010; 397: 3173–8.
- Teixeira AP, Stucheli P, Auslander S, Auslander D, Schonenberger P, Hurlermann S, et al. CelloSelect — A synthetic cellobiose metabolic pathway for selection of stable transgenic CHO cell lines. *Metabolic Engineering*. 2022; 70: 23–30.
- Gu L, Kitamura M. Sensitive detection and monitoring of senescence-associated secretory phenotype by SASP-RAP assay. *PLoS One*. 2012; 7: e52305.
- Miura M, Yuan J. Transient transfection assay of cell death genes. *Methods in Enzymology*. 2000; 322: 480–92.
- Strebel A, Harr T, Bachmann F, Wernli M, Erb P. Green fluorescent protein as a novel tool to measure apoptosis and necrosis. *Cytometry*. 2001; 43: 126–33.
- Boulaiz H, Prados J, Melguizo C, Garcia AM, Marchal JA, Ramos JL, et al. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human breast cancer by transfection of gef gene. *British Journal of Cancer*. 2003; 89: 192–8.
- Vaheri A, Pagano JS. Infectious poliovirus RNA: a sensitive method of assay. *Virology*. 1965; 27: 434–6.
- Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, Hobom G, Webster RG. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 6108–13.
- Weber K, Bartsch U, Stocking C, Fehse B. A multicolor panel of novel lentiviral "gene ontology" (LeGO) vectors for functional gene analysis. *Molecular Therapy*. 2008; 16: 698–706.
- Longo PA, Kavran JM, Kim MS, Leahy DJ. Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI). *Methods in Enzymology*. 2013; 529: 227–40.
- Jin L, Zeng X, Liu M, Deng Y, He N. Current progress in gene delivery technology based on chemical methods and nano-carriers. *Theranostics*. 2014; 4: 240–55.
- Rahimi P, Mobarakeh VI, Kamalzare S, SajadianFard F, Vahabpour R, Zabihollahi R. Comparison of transfection efficiency of polymer-based and lipid-based transfection reagents. *Bratisl Lek Listy*. 2018; 119: 701–05.
- Graham FL, van der Eb AJ. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*. 1973; 52: 456–67.
- Orrantia E, Chang PL. Intracellular distribution of DNA internalized through calcium phosphate precipitation. *Experimental Cell Research*. 1990; 190: 170–4.
- Kingston RE, Chen CA, Okayama H. Calcium phosphate transfection. *Current protocols in immunology*. 2001; 31: 1–9.
- Olton D, Li J, Wilson ME, Rogers T, Close J, Huang L, et al. Nanostructured calcium phosphates (NanoCaPs) for non-viral gene delivery: influence of the synthesis parameters on transfection efficiency. *Biomaterials*. 2007; 28: 1267–79.
- Pedraza CE, Bassett DC, McKee MD, Nelea V, Gbureck U, Barralet JE. The importance of particle size and DNA condensation salt for calcium phosphate nanoparticle transfection. *Biomaterials*. 2008; 29: 3384–92.
- Sokolova VV, Radtke I, Heumann R, Epple M. Effective transfection of cells with multi-shell calcium phosphate-DNA nanoparticles. *Biomaterials*. 2006; 27: 3147–53.
- Cao X, Deng W, Wei Y, Su W, Yang Y, Wei Y, et al. Encapsulation of plasmid DNA in calcium phosphate nanoparticles: stem cell uptake and gene transfer efficiency. *Int J Nanomedicine*. 2011; 6: 3335–49.
- Nouri A, Castro R, Santos JL, Fernandes C, Rodrigues J, Tomas H. Calcium phosphate-mediated gene delivery using simulated body fluid (SBF). *Int J Pharm*. 2012; 434: 199–208.
- Baker A, Saitik M, Lehrmann H, Killisch I, Mautner V, Lamm G, et al. Polyethylenimine (PEI) is a simple, inexpensive and effective reagent for condensing and linking plasmid DNA to adenovirus for gene delivery. *Gene Therapy*. 1997; 4: 773–82.
- Moghimi SM, Symonds P, Murray JC, Hunter AC, Debska G, Szweczyk A. A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy. *Molecular Therapy*. 2005; 11: 990–5.
- Liu T, Yu X, Kan B, Guo Q, Wang X, Shi S, et al. Enhanced gene delivery using biodegradable poly(ester amine)s (PEAs) based on low-molecular-weight polyethylenimine and poly(epsilon-caprolactone)-pluronic-poly(epsilon-caprolactone). *J Biomed Nanotechnol*. 2010; 6: 351–9.
- Fukumoto Y, Obata Y, Ishibashi K, Tamura N, Kikuchi I, Aoyama K, et al. Cost-effective gene transfection by DNA compaction at pH 4.0 using acidified, long shelf-life polyethylenimine. *Cytotechnology*. 2010; 62: 73–82.
- Yahalom-Ronen Y, Tamir H, Melamed S, Politi B, Shifman O, Achdout H, et al. A single dose of recombinant VSV-G-spike vaccine provides protection against SARS-CoV-2 challenge. *Nat Commun*. 2020; 11: 6402.
- Kwon M, Firestein BL. DNA transfection: calcium phosphate method. *Methods Mol Biol*. 2013; 1018: 107–10.
- Chumakov SP, Kravchenko JE, Prassolov VS, Frolova EI, Chumakov PM. Efficient downregulation of multiple mRNA targets with a single shRNA-expressing lentiviral vector. *Plasmid*. 2010; 63: 143–9.
- Hasan MM, Ragnarsson L, Cardoso FC, Lewis RJ. Transfection methods for high-throughput cellular assays of voltage-gated calcium and sodium channels involved in pain. *PLoS One*. 2021; 16: e0243645.
- Fang XT, Sehlin D, Lannfelt L, Syvanen S, Hultqvist G. Efficient and inexpensive transient expression of multispecific multivalent antibodies in Expi293 cells. *Biol Proced Online*. 2017; 19: 11.