Влияние диметилсульфоксидного шока на эффективность кальций-фосфатной трансфекции клеток

Effect of dimethyl sulfoxide shock on the efficiency of calcium phosphate transfection of cells

Савченкова И.П.

г. Москва

DOI CrossRef: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2018-5-2
УДК 619+578.23

Ключевые слова: кальций-фосфатная трансфекция, диметилсульфоксидный шок, ген *lacZ E. coli*, β -галактозидаза, окраска x-gal, эффективность временной трансфекции, клетки животных, *in vitro*.

Key words: calcium phosphate transfection, dimethyl sulfoxide shock, *lacZ E. coli* gene, β -galactosidase, x-gal staining, transitory transfection efficiency, mammalian cells, *in vitro*.

Резюме. Методы введения чужеродной ДНК плазмид в клетки животных представляют огромный интерес в создании новых клеточных систем с заданными свойствами для ветеринарной вирусологии и биотехнологии. В статье приводятся данные экспериментов по трансфекции мышечных эмбриональных фибробластов линии STO стандартным кальций-фосфатным методом и с использованием диметилсульфоксидного (ДМСО) шока. Для трансфекции использовали плазмиду pcDNATM3.1/His/lacZ, содержащую н.п. маркерного бактериального гена *lacZ E. coli*. Эффективность трансфекции оценивали по наличию в клетках β -галактозидазы, продукта экспрессии гена *lacZ E. coli*. Для этого клетки окрашивали, используя в качестве субстрата x-gal. Показано, что дополнительная кратковременная обработка клеток 10% раствором ДМСО позволяет увеличить эффективность временной трансфекции клеток STO в 2 раза. Установлено, что кальций-фосфатная методика трансфекции, как с ДМСО шоком, так и без него, не токсична для данной клеточной линии. Продemonстрировано большое число окрашенных клеток в фазе клеточного цикла М после трансфекции. Полученные данные позволяют сделать вывод о необходимости использования ДМСО шока после кальций-фосфатной трансфекции, с целью увеличения её эффективности.

Summary. Methods of delivery of exogenic plasmid DNA to mammalian cells are of great interest in the creation of new cell systems with specified properties for veterinary virology and biotechnology. The article presents the data of experiments on transfection of mouse embryonic fibroblasts of STO line by standard calcium-phosphate method and with the use of dimethylsulfoxide (DMSO) shock. For transfection pcDNATM3.1/His/lacZ plasmid that contains marker gene *lacZ E. coli* were used. The efficiency of transfection was estimated by the presence in the cells of β -galactosidase, the product of expression of the gene *lacZ* of *E. coli*. For this purpose used as a substrate

x-gal. It is shown that additional short-term treatment of cells with 10% DMSO solution allows to increase the efficiency of STO cells transient transfection by 2 times. It is established that the calcium-phosphate method of transfection, as with DMSO shock, and without it, it is not toxic to this cell line. A large number of stained cells in the cell cycle phase M after transfection have been demonstrated. The obtained data allow drawing a conclusion about the necessity of using DMSO shock after calcium-phosphate transfection, with the aim of increasing its effectiveness.

Создание новых клеточных систем с заданными свойствами на основе клеток млекопитающих, подвергнутых генетической трансформации *in vitro*, актуально для ветеринарной вирусологии и биотехнологии. Методы генетической трансформации постоянно совершенствуются и становятся одним из основных экспериментальных подходов для изучения молекулярных механизмов патогенеза инфекций на уровне клеток, создания эукариотических клеток - продуцентов белков, в том числе антигенов вирусов, бактерий и других патогенов. Методы генетической инженерии открывают новые возможности для создания рекомбинантных вакцин. Наряду с получением чистых препаратов техника рекомбинантных белков позволяет разрабатывать совершенно новые концепции иммунизации [Isagulants et al., 2003; Masalova et al., 2010]. В связи с этим методы доставки чужеродной ДНК плазмид в клетки животных постоянно совершенствуются и представляют огромный интерес [Lamand Dean, 2010].

Кальций-фосфатный метод трансфекции - один из первых методов [Graham and van der Eb, 1973], который был разработан для доставки чужеродной ДНК в клетки млекопитающих. В настоящее время он широко используется как для временной (транзитной) трансфекции, так и для стабильной генетической трансформации различных типов культивируемых клеток, поскольку требуемые компоненты легко доступны и недороги [Urabe et al., 2000; Segura et al., 2001; Qureshi et al., 2008]. Ранее мы подробно отмечали достоинства и недостатки данного метода [Савченкова, 1992]. Для него характерна относительно низкая эффективность трансфекции по сравнению с другими методами химической трансфекции. Считается, что эффективность трансфекции может быть увеличена в некоторых линиях клеток, если перед трансфекцией использовать шок: глицериновый или диметилсульфоксидный (ДМСО) [Kingston et al., 2001]. Однако эти химические вещества токсичны для клеток, поэтому условия для отдельных типов клеток должны быть оптимизированы. Кроме того, совместное осаждение фосфата кальция подвержено изменчивости из-за его чувствительности к незначительным изменениям концентрации pH, температуры, буферной соли и может быть цитотоксичным для многих типов клеточных культур.

В связи с этим, перед тем как трансфицировать клетки плазмидами, содержащими специфичные гены (в нашем случае ген рецептора вируса инфекционной анемии лошадей - *ELR1*) представляло интерес предварительно определить эффективность трансфекции кальций-фосфатным методом с шоком и без него.

Материалы и методы

Все реактивы, кроме указанных, получены из фирмы Gibco. *Культура клеток.* В эксперименте использовали перерабатываемую линию эмбриональных фибробластов мыши (STO), которая в дальнейшем будет использована в качестве фидерного слоя для культивирования эмбриональных стволовых клеток мыши. Клетки STO культивировали в среде DMEM, которая содержала 4,5 г/л глюкозы, 10% сыворотки крови плодов коров (СКПК) и антибиотики в

Авторы / Authors

Савченкова И.П., доктор биологических наук, профессор, зав. лабораторией стволовой клетки, s-ip@mail.ru
Васильева С.А., мл.н.с. лаб. стволовой клетки
Гулюкин А.М., кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории эпизотологии
ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт им. Я.П. Коваленко (ФГБНУ ВИЭВ), Москва
Savchenkova I.P., Vasilieva S.A., Gulyukin A.M.

Таблица. Сравнительный анализ эффективности трансфекции клеток линии STO кальций-фосфатным методом

Клетки линии STO	окрашенные (%)	неокрашенные	всего
стандартный метод	154 (6)	2354	2508
с ДМСО шоком	499 (12)	3462	3961

конечной концентрации 50 мкг/мл стрептомицина и 50 Ед/мл пенициллина, соответственно.

Плазмида. Для трансфекции использовали плазмиду рс DNA™ 3.1/His/lacZ, содержащую н.п. маркерного бактериального гена lacZ E. coli в концентрации 2.5 мкг во всех экспериментальных группах.

Трансфекцию проводили кальций-фосфатным методом, с помощью набора K2780-1 фирмы Invitrogen согласно инструкции. Клетки перед трансфекцией высевали в плотности 7 10⁵ клеток на чашку Петри с диаметром 60 мм. Такая плотность позволяла в день трансфекции иметь 50%-ный монослой клеток STO (рис.1.а.).

Диметилсульфоксидный (ДМСО) шок проводили через 24 час после трансфекции посредством дополнительной обработки клеток 10%-ным раствором ДМСО в ФСБ в течение 2,5 мин при 37° С в присутствии 5% CO₂.

Эффективность трансфекции оценивали по наличию в клетках β-галактозидазы, продукта экспрессии гена lacZE.coli. Для этого использовали в качестве субстрата х-гал фирмы Sigma. Перед окраской клетки фиксировали на льду ледяным метанолом в течение 15 мин. Долю клеток, продуцирующих β-галактозидазу рассчитывали при анализе не менее 1000 клеток. Эксперименты имели трёхкратную повторяемость. В качестве отрицательного контроля служили нетрансфицированные клетки линии STO. Визуализацию клеток проводили с помощью инвертированного фазово-контрастного микроскопа фирмы "CarlZeiss" и программно-обеспечения AxioVisionRel. 4.8.

Результаты и обсуждение

Результаты экспериментов, представленных в таблице, выявили влияние ДМСО шока на эффективность временной трансфекции клеток линии STO. Эффективность трансфекции клеток после дополнительной обработки ДМСО увеличивалась в 2 раза. Как видно из результатов, представленных на рис.1. б, в, е, окрашивание трансфицированных клеток х-гал демонстрирует увеличение числа голубых клеток после кратковременной обработки их ДМСО. В контроле не были обнаружены клетки, продуцирующие β-галактозидазу (рис.1. г). Максимальное количество окрашенных клеток (12 %) наблюдалось в случае дополнительной обработки клеток ДМСО (таблица). Наши результаты согласуются с данными других авторов. Считается, что при использовании кальций-фосфатного метода для временной трансфекции, 1-5 % клеток поглощают экзогенную ДНК [Глебов, 1989; Савченкова, 1992; Urabe et al., 2000; Segur et al., 2001; Qureshi et al., 2008].

Установлено, что кальций-фосфатная методика трансфекции, как с ДМСО шоком, так и без него, не токсична для

данной клеточной линии. Через 48 час после трансфекции общее число клеток увеличивается (таблица, рис.1. в). Следует отметить большое число окрашенных клеток в фазе клеточного цикла М (на рис.1. д, указано стрелками). Ранее считалось, что эффективность трансфекции зависит от клеточного деления [Horibe et al.,2014; Flume et al., 2016; Bai et al., 2017]. В последнее время приводятся данные, что чужеродную ДНК могут поглощать митотически неактивные клетки [Kirchenbuechier et al., 2016; Bai et al., 2017]. Однако следует заметить, что эффективность проникновения ДНК плазмид из цитоплазмы в ядро увеличивается у делящихся клеток, поскольку в прометафазе митоза происходит разрушение ядерной оболочки клетки, а в телофазе сборка новых ядер у двух дочерних клеток. Этот момент необходимо учитывать для создания генетически-трансформированных клеток.

Принцип совместного осаждения фосфата кальция заключается в смешивании ДНК с хлоридом кальция в забуференном солевом/фосфатном растворе с образованием осадка кальция-фосфат-ДНК, который затем диспергируется на культивируемых клетках. Считается, что фосфат-кальция облегчает связывание конденсированной ДНК в соосадителе с поверхностью клетки, и ДНК поступает в клетку эндоцитозом [Глебов, 1989]. Каким образом ДМСО влияет на эффективность временной трансфекции клеток до сих пор недостаточно изучено. Возможно, это связано с изменениями в клеточной мембране, которые он может вызывать [Kingston et al., 2001].

Таким образом, полученные данные позволяют нам сделать вывод о необходимости использования ДМСО шока после кальций-фосфатной трансфекции, с целью увеличения её эффективности.

Литература

1. Глебов О.К. Генетическая трансформация соматических клеток. Л.: Наука. 1989. 350 с.
2. Савченкова И.П. Генетическая трансформация клеток почек эмбрионов свиньи (СПЭВ ТК-) геномповерхностного антигена вируса гепатита В. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Москва. 1992.
3. Bai H., Lester G. M. Sch., Petishnok L.C., Dean D.A. Cytoplasmic transport and nuclear import of plasmid DNA. Bioscience Reports. 2017. 37. BSR20160616
4. Isagulians M.G., Petrakova N.V., Mokhonov V.V., Zaberezhny A.D., Garaev M.M., Smirnov V.D., Pokrovskaya K., Nordenfelt E., Suzdaltzeva Y.G., Krivonos A.V. DNA Immunization efficiently targets conserved functional domains of protease and ATPASE/HELICASE of nonstructural 3 protein (NS3) of human hepatitis C virus. Immunology Letters. 2003. 88(1):1-13.
5. Flume G., Di Rienso C., Marchetti L., Pozzi D., Caracciolo G., Cardarelli F. Single-cell real-time imaging of transgene expression upon lipofection. Biochem. Biophys Res Commun. 2016. 474:8-14.
6. Graham F.L., van der Eb A.J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. Virology. 1973. 52: 456-67.
7. Horibe T., Torisawa A., Akiyoshi R., Hatta-Ohashi Y., Suzuki H., Kawakami K. Transfection efficiency of normal and cancer cell lines and monitoring of promoter activity by single-cell bioluminescence imaging. Luminescence. 2014. 29(1):96-100. doi: 10.1002/bio.2508. Epub 2013 Mar 25.
8. Kingston R.E., Chen C.A., Okayama H. Calcium phosphate transfection. CurrProtocImmunol. 2001.Chapter 10:Unit 10.13. doi:10.1002/0471142735.im1013s31.
9. Kirchenbuechier I., Kirchenbuechier D.,Elbaum M. Correlation between cationic lipid-based transfection and cell division. Exp.Cell Res. 2016. 345:1-5.
10. Lam A.P., Dean D.A. Progress and prospects: nuclear import of nonviral vectors. GeneTher. 2010. 17(4): 439-47. doi:10.1038/gt.2010.31
11. Masalova O.V., Lesnova E.I., Grabovetsky V.V., Petrakova N.V., Zaberezhny A.D., Isagulians M.G., Kushch A.A., Pichugin A.V., Ataullakhanov R.I., Melnikova T.M., Smirnova O.A., Ivanov A.V. The successful immune response against hepatitis C nonstructural protein 5A (NS5A) requires heterologous DNA/protein immunization. Vaccine. 2010. 28(8):1987-96.
12. Qureshi H.Y., Ahmad R., Zafarullah M. High-efficiency transfection of nucleic acids by the modified calcium phosphate precipitation method in chondrocytes. Anal Biochem. 2008. 382(2):138-40. doi:10.1016/j.ab.2008.07.027. Epub 2008 Jul 31.
13. Segura I., Gonzalez M.A., Serrano A., Abad J.L., Bernad A., Riese H.H. High transfection efficiency of human umbilical vein endothelial cells using an optimized calcium phosphate method. Anal Biochem. 2001. 296(1):143-7.
14. Urabe M., Kume A., Tobita K., Ozawa K. DNA/Calcium phosphate precipitates mixed with medium are stable and maintain high transfection efficiency. Anal Biochem. 2000. 278(1):91-2.

Обнаружение продукта экспрессии гена lacZE.coli в клетках STO после кальций-фосфатного метода трансфекции: а - клетки перед трансфекцией, б - клетки, окрашенные х-гал через 24 часа после стандартного кальций-фосфатного метода; в, д, е - клетки, окрашенные х-гал после кальций-фосфатной метода с последующим ДМСО шоком (стрелками указаны митозы), г - нетрансфицированные клетки, окрашенные х-гал (контроль). Ув. : а, г - х400; б, в - х100; д - х200; е - х630