

P.A. Богомъя
**МЕТОД ТРАНСФЕКЦИИ КЛЕТОК НЕК-293Т НА ОСНОВЕ КАТИОННОГО
ПОЛИМЕРА ПОЛИЭТИЛЕННИМИНА**

Научный руководитель: канд. мед. наук, доц. Л.М. Сычик

Кафедра биологии

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

R.A. Bogomya

**НЕК-293Т CELL TRANSFECTION METHOD BASED ON POLYETHYLENIMINE
CATIONIC POLYMER**

Tutor: PhD, associate professor L.M. Sychik

Department of Biology

Belarusian State Medical University, Minsk

Резюме. В работе представлены результаты постановки трансфекции клеток НЕК-293Т с помощью полиэтиленимина (ПЭИ). Были подобраны оптимальные условия трансфекции для обеспечения максимальной экспрессии плазмид при минимальной цитотоксичности. Результаты эксперимента подтверждают эффективность и доступность метода для получения рекомбинантных белков, которые в дальнейшем будут использоваться в ветеринарном ИФА-наборе.

Ключевые слова: трансфекция, полиэтиленимин, плазмиды.

Resume. The paper presents the results of HEK-293T cell transfection using polyethylenimine (PEI). Optimal transfection conditions were selected to ensure maximum plasmid expression with minimal cytotoxicity. The experimental results confirm the effectiveness and accessibility of the method for obtaining recombinant proteins, which will later be used in the veterinary ELISA kit.

Keywords: transfection, polyethylenimine, plasmids.

Актуальность. В настоящее время рекомбинантные белки находят широкое применение в исследовательских, терапевтических и диагностических целях. В связи с этим требуются эффективные и доступные технологии их производства. Клеточная линия НЕК-293Т (англ. Human Embryonic Kidney 293) широко используется в биотехнологии благодаря высокой трансфекционной эффективности и уровню экспрессии белков. Трансфекция ПЭИ – один из наиболее экономичных и простых (в отличие от липофекции и вирусной трансдукции) методов доставки нуклеиновых кислот в клетки, обеспечивающий высокий уровень экспрессии целевого белка.

Цель: получение рекомбинантных антигенов и специфичных белков для ИФА-набора, разрабатываемого для использования в ветеринарном деле.

Задачи:

1. Подбор оптимальных условий для проведения трансфекции с помощью полиэтиленимина.
2. Получение рекомбинантных антигенов путем трансфекции клеток.

Материалы и методы. Трансфекции подвергались клетки НЕК-293Т. В качестве вектора для экспрессии использовались плазмиды pTurbo-GFP-N различной молекулярной массы с геном, кодирующим зеленый флуоресцентный белок GFP (англ. green fluorescent protein).

В настоящее время научный интерес вызывают химические носители на основе

катионных полимеров. Свойство данных молекул взаимодействовать с отрицательно заряженными фосфатными группами молекулы ДНК и таким образом формировать самособирающиеся нанокомплексы, обеспечивается следующими электростатическими взаимодействиями: водородными связями и силами Ван-дер-Ваальса. Такие нанокомплексы называются полиплексами. Полиплексы, состоящие из кationных полимеров и ДНК, поглощаются клеткой с помощью эндоцитоза. В данном исследовании использовался ДНК-связывающий полимер ПЭИ [1].

Трансфецирующая активность комплексов ДНК-ПЭИ определяется их суммарным зарядом, который обусловлен соотношением количества положительных зарядов полимеров к отрицательно заряженным фосфатным группам ДНК. Для обеспечения положительного заряда полиплекса ПЭИ должен быть в избытке. В биотехнологии используется ПЭИ с молекулярной массой от 5 до 25 кДа. При применении ПЭИ с молекулярной массой выше 25 кДа наблюдается повышенная цитотоксичность, вызванная повреждением мембранны клеток. ПЭИ с молекулярной массой менее 5 кДа не обладает должной трансфецирующей способностью.

По данным литературных источников, существуют различные массовые соотношения смеси ДНК-ПЭИ (1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:40). В соответствии с этим сделан вывод, что наиболее эффективно трансфекция будет протекать при соотношении ДНК-ПЭИ 1:2 (при массе ПЭИ 20 кДа) [1,4].

Результаты и их обсуждение. Для успешного проведения трансфекции количество плазмидной ДНК рассчитывается исходя из плотности посева, в соответствии с правилом, что на 1 млн клеток требуется 1 мкг плазмидной ДНК. Как уже упоминалось выше, для приготовления трансфецирующей смеси оптимальное соотношение ПЭИ/ДНК составило 1:2. Объем смеси для трансфекции составлял 1/10 от общего объема среды в лунке. Для культивирования клеток в 12-ти луночном планшете необходимо 1500 мкл полной среды на лунку. Следовательно, объем трансфецирующей смеси составлял 150 мкл. Перед применением готовую смесь перемешивали и инкубировали 15 минут при комнатной температуре. Данные условия обеспечивали максимальную эффективность трансфекции при минимальной цитотоксичности [2].

В соответствии с указанными выше условиями, исследование проводилось по следующей схеме.

В первый день пассажировали клетки НЕК-293T в 12-луночные планшеты по 300 тыс. клеток на лунку. Для культивирования использовалась полная среда DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) с 10%-ным содержанием эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотиком (1500 мкл на лунку) [2].

На второй-третий день, при достижении клетками 70-80% конфлюентности (около 500.000 клеток), из лунок удаляли среду и добавляли 1350 мкл пустой среды DMEM. По каплям добавляли в лунки по 150 мкл трансфецирующей смеси [3]. Через 4 часа заменяли пустую среду на среду с антибиотиком, но без сыворотки, так как присутствие посторонних белков и гормонов может препятствовать трансфекции. Инкубировали клетки в течение 48 часов при 38°C, 5% CO₂.

Экспрессия целевого белка наблюдалась через 48 часов после трансфекции. В лунках, где находились клетки, трансфецированные плазмидами с различной

молекулярной массой, детектировалась флуоресценция в сравнении с нетрансфенированным контролем (рис. 1).

Трансфенированные клетки снимали с планшета, вносили 1,5 мл PBS (англ. Phosphate buffered saline) и ресуспензировали. Для анализа флуоресценции использовался спектрофотометр Tecan Infinite 200 PRO.

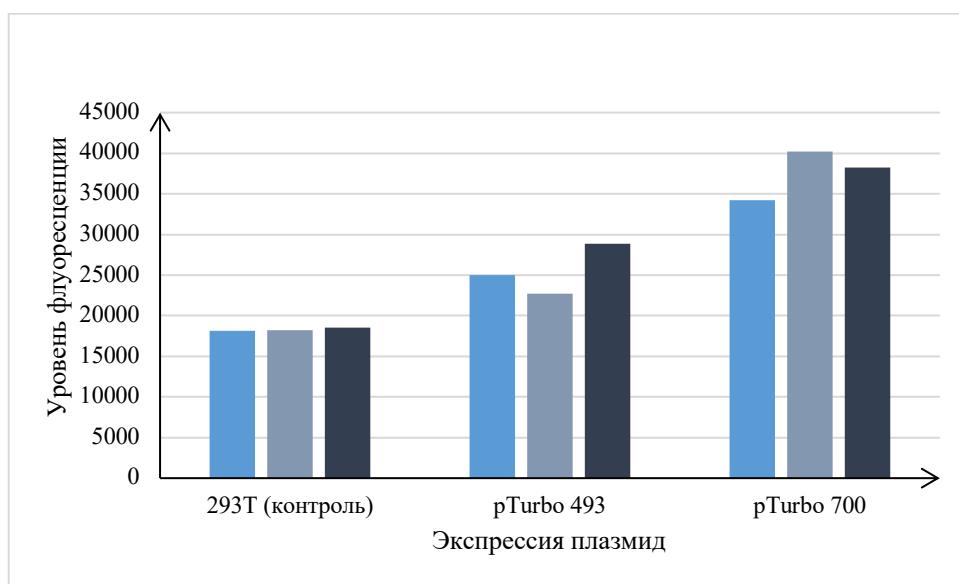


Рис. 1 – Экспрессия плазмид

Выводы:

- Полиэтиленимин является доступным и эффективным трансфекционным агентом.
- Методика подходит для различных биотехнологических применений, включая экспрессию рекомбинантных белков в клеточной линии НЕК-293Т.
- Исходя из полученных результатов необходима дальнейшая оптимизация условий и модификация плазмид для достижения высокого уровня экспрессии белков при минимальной цитотоксичности и их использования в ИФА-наборе, разрабатываемом для применения в ветеринарном деле.

Литература

1. Шинкевич, В. А. Эффективность трансфекции клеток *in vitro* с различными изоформами полиэтиленимина / В. А. Шинкевич, М. В. Стёганцева, А. Н. Мелешко // Молодежь в науке-2017: сборник материалов Международной конференции молодых ученых: в 2 книгах. Том Часть 2. Национальная академия наук Беларусь, Совет молодых ученых. – 2018. – С. 103-113.
2. ATCC. Primary Cell Culture Guide. – Manassas, VA: American Type Culture Collection, 2022. – 30 p.
3. Gibco. Cell Culture Basics Handbook. – Carlsbad, CA: Thermo Fisher Scientific, 2021. – 132 p.
4. Mancinelli, S. Design of transfections: Implementation of design of experiments for cell transfection fine tuning / S. Mancinelli, A. Turcato, A. Kisslinger // Biotechnology and Bioengineering. – 2021. – Vol. 118, № 11. – P. 4488–4502.