

COMPARISON AND OPTIMIZATION OF TRANSIENT TRANSFECTION METHODS IN THE HEK293T CELL LINE

Issabekova A.S.¹, Zhunusova M.S.², Ramanculov E.M.¹, Kulyyassov A.T.¹

¹Republican State Enterprise «National Center for Biotechnology» under the Science Committee of Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan, Astana, 010000, 13/5, Kurgalzhynskoye road, akulyyassov@gmail.com

²L.N.Gumilyov Eurasian National University, 5, Munaitpasov str., 010000, Astana, Kazakhstan

ABSTRACT

The expression of transgenes and control of gene expression in mammalian cells is an active area of biomedical research. Therefore, the improvement of methods for effective gene transfer into eukaryotic cells is of great interest and remains a search priority. We compared different methods of transient transfection of HEK293T cells, namely calcium phosphate with different pH values of the HBS buffer solution, 6.90, 6.95, 7.00, 7.05 and 7.10, as well as commercial sets of FuGENE and Lipofectamine. Results were analyzed using fluorescence microscopy with green fluorescent protein GFP as a reporter gene. We determined that the optimal pH of the HBS phosphate buffer for transient transfection was 6.95. A small pH deviation in the range of 6.90–7.10 did not significantly modify the expression efficiency of a protein of interest. Among the methods studied, Lipofectamine showed the highest level of transfection efficiency based on expression of the GFP protein, but exceeding the recommended dose of this reagent exerted a toxic effect on the viability of HEK293T cells.

Keywords: Plasmid, DNA, transient transfection, HEK293T

576.53:57.085.23:57.085.25:577.218

СРАВНЕНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДОВ ТРАНЗИЕНТНОЙ ТРАНСФЕКЦИИ НА КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ HEK293T

Исабекова А.С.¹, Жунусова М.С.², Раманкулов Е.М.¹, Кулыясова А.Т.¹

¹РГП «Национальный центр биотехнологии», КН МОН, Кургальджинское шоссе, 13/5, Астана, 010000, Казахстан, akulyyassov@gmail.com

²Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, ул. Мунайпасова, 5, Астана, 010000, Казахстан

АБСТРАКТ

Экспрессия трансгенов и контроль экспрессии генов в клетках млекопитающих является основой биомедицинских исследований. Следовательно, улучшение методов эффективного переноса генов внутрь эукариотических клеток представляет большой интерес и остается одним из приоритетных направлений исследований.

Нами проведено сравнение различных методов транзientной трансфекции клеток HEK293T, а именно кальций фосфатной с различными значениями pH буферного раствора HBS – 6,90, 6,95, 7,00, 7,05 и 7,10, а также с помощью коммерческих наборов FuGENE и Lipofectamine. Полученные результаты проанализированы с помощью флуоресцентной микроскопии с использованием зеленого флуоресцирующего белка GFP, как репортерного гена.

По результатам проведенных экспериментов установлено, что оптимальным значением фосфатного буфера HBS для проведения транзientной трансфекции является величина pH 6,95. Кроме того, небольшое отклонение pH в диапазоне 6,90-7,10 заметно не влияет на эффективность экспрессии интересующего нас белка.

Ключевые слова: плазмиды, ДНК, транзientная трансфекция, клеточные линии, HEK293T.

ВВЕДЕНИЕ

Трансфекция—процесс введения нуклеиновой кислоты в клетки эукариот без участия вирусов, является мощным аналитическим методом, позволяющим изучить функции генов и их продуктов внутри клетки [1]. Обычно для решения поставленной задачи ДНК вводят в клетки лишь на какое-то время, достаточное для её экспрессии. Т.к. трансфицированная ДНК обычно не включается в ядерный геном и не реплицируется, чужеродная ДНК быстро теряется по мере размножения клеток. Такой способ трансфекции называется транзитным. Этот метод широко используется не только в фундаментальных исследованиях, но также имеет большой потенциал для практического применения в биофармацевтической промышленности для производства рекомбинантных белков в культурах клеток для нужд медицины [2]. О возрастающем интересе исследователей и специалистов-технологов к данному методу отмечено в ряде обзорных статей [3-8].

Метод транзитной трансфекции берет начало с пионерских работ Грэхема и Ван дер Эба, предложивших использовать комплексы ДНК с фосфатом кальция [9]. Различные варианты кальций-фосфатной трансфекции до сих пор широко используются в лабораториях по всему миру, а также являются основой коммерческих наборов для экспрессии генов [10-11]. Основным преимуществом этой методики является дешевизна и доступность реагентов, простота приготовления буферных растворов в сочетании с довольно высокой эффективностью.

В общих чертах, для самостоятельного приготовления комплекса раствор, содержащий ДНК и хлорид кальция, медленно по каплям добавляют к раствору, содержащему фосфат ионы в буфере HEPES. Через некоторое время образуется осадок фосфата кальция со связанной на поверхности ДНК. После этого полученную суспензию добавляют к клеткам. Экспрессию белков в достаточном количестве обычно наблюдают через 48 часов. На эффективность трансфекции влияют множество параметров, как например, концентрации хлорида кальция и фосфатного буферного раствора, тип используемых клеток, pH, качество и количество ДНК, температура, концентрация сыворотки в среде, содержание CO₂. Наиболее детальное изучение влияния различных факторов на эффективность трансфекции линии клеток CHO (Chinese hamster ovary) приведено в работе Джордана и Вурма [12]. В другой статье предлагается видоизмененная методика трансфекции клеток HeLa с применением инкубирования раствора комплексов ДНК с фосфатом кальция при 37°C в течение 30 минут, позволяющая увеличивать его эффективность [13].

Наиболее важным фактором, влияющим на качество трансфекции, является величина pH фосфатного буфера, который должен точно соответствовать рекомендуемым значениям [14]. Однако в литературе существуют небольшие расхождения относительно этой величины. Например, в работе Чена и др. [15] описана методика простой и эффективной кальций-фосфатной трансфекции линий клеток NIH3T3, C127, BHK, CHO, HeLa. Важным фактором эффективности процесса, согласно авторам этой работы, является величина pH (6.95) фосфатного буфера и уровень CO₂ (3%) в течение инкубации клеток с ДНК. Согласно авторам другой работы [16], которые проводят трансфекцию клеток CHO и HEK293, оптимальным является использование фосфатного буфера с pH (7.05).

Помимо кальций-фосфатного метода трансфекции, существуют также другие способы доставки ДНК в клетку, как например, использование липосом в наборе Lipofectamine [17] или мультикомпонентного реагента FuGENE [18], которые имеют более высокую эффективность. Однако эти реагенты являются дорогостоящими и при превышении определенной дозы обладают токсичностью по отношению к клеткам.

В литературе имеется статья, где проводили сравнение эффективности трансфекции линий астроцитомных клеток 1321N1 с помощью фосфата кальция, липофектамина и набора FuGENE [19].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вектор, не содержащий эндотоксины (pcDNA3.1(+).BirA.GFP), получен согласно стандартным методикам [20] и наработан с помощью наборов для выделения плазмидной ДНК (Sigma, PLED35-1KT или Qiagen, 12362), согласно протоколам, приведенным в инструкциях или на сайтах компаний-производителей. В экспериментах использовали ранее полученную конструкцию pcDNA3.1(+).BirA.GFP [21-26].

Для проведения трансфекции использовали также наборы FuGENE HD Transfection Reagent (Promega, E2311) и Lipofectamine 2000 (Invitrogen, 11668-019).

Для приготовления среды в бутылку, содержащую 500 мл DMEM с содержанием глюкозы 4,5 г/мл, добавили 50 мл (10%) эмбриональной телячьей сыворотки (Fetal Bovine Serum, FBS) и 5 мл (1%) смеси антибиотиков стрептомицина и ампициллина (PS). Сыворотку нагревали 15 мин при 55°C и хранили при +4°C.

Экспрессию рекомбинантного белка из плазмиды pcDNA3.1(+).BirA.GFP осуществляли в клетках HEK293T (Human embryonic kidney cells линия 293T).

Для приготовления клеток пробирку с HEK293T из Дьюара быстро разморозили при 37°C, затем центрифугировали при 200 gcf 3 минуты и удалили супернатант (удаление ДМСО). Используя пипетку

на 5 мл, ресуспендировали 1 мл клеток в среде DMEM. Перенесли суспензию с клетками во флакон T75, добавили дополнительно среды DMEM до объема 20 мл и поместили в инкубатор на 37°C (CO₂–4,8%).

Наблюдение за клетками и сбор данных экспериментов осуществляли с помощью флуоресцентного микроскопа «AxioObserverA1» («CarlZeiss», Germany) со встроенной CCD-камерой «AxioCamErc5s» («CarlZeiss») и программного обеспечения Zen 2011. Обработку полученных снимков проводили с помощью программы «ImageJ».

Транзientная трансфекция клеток HEK293T с помощью кальций-фосфатного метода

Для приготовления буферного раствора HBS 2x взяли компоненты в следующих количествах: Hepes 2 г, KClO₄ 15 г, глюкоза 0,4 г, NaCl 3,2 г, Na₂HPO₄ 0,0426 г, pH должно составить 5,9. Затем раствор разделили на пять пробирок в равных объемах и довели pH до необходимого значения в каждой (6,90, 6,95, 7,00, 7,05 и 7,10) добавлением небольшими порциями 1M раствора NaOH, отфильтровали через стерильный фильтр фирмы Millipore и хранили при 4°C.

За 1 день до трансфекции посеяли 200,000 клеток HEK293T в каждую лунку 6-луночной планшеты в 2 мл среды DMEM с 10% FBS и 1% PS. На следующий день за 1 час до трансфекции поменяли среду на 2 мл свежей DMEM. Затем в расчете на 1 лунку приготовили по две пробирки на 1.5 мл, промаркированные 0A, 0B (1A, 1B). Образец, помеченный меткой «0», содержащий хлорид кальция, без добавления ДНК взяли в качестве контроля. В одну пробирку (раствор А) загрузили 220 мкл воды, 31 мкл 2M раствора хлорида кальция и необходимое количество ДНК. Плазмиды брали в количестве 1.0 мкг на 1 лунку планшеты. Во вторую пробирку (раствор В) загрузили 250 мкл буферного раствора HBS 2x. Затем медленно по каплям добавляли раствор А к раствору В, оставили на 15 минут и добавили полученную смесь к клеткам HEK293T.

Транзientная трансфекция клеток HEK293T с помощью реагента FuGENE

Перед приготовлением комплекса реагента FuGENE с ДНК флакон из набора переворачивали несколько раз для перемешивания его содержимого. В пробирку с 100 мкл деионизированной и стерильной воды добавили раствор плазмиды, содержащей 1,0 мкг ДНК. К раствору ДНК прибавили 5 мкл реагента FuGENE, непосредственно в среду, не касаясь пластиковых стенок пробирки. Перемешали полученную смесь переворачиванием или щелчком пальцем и оставили на 30 минут при комнатной температуре. После этого полученный комплекс добавили по каплям в лунку с клетками HEK293T.

Трансфекция с помощью набора Lipofectamine 2000

Для трансфекции предварительно смешивали 125 мкл Opti-MEM с 15 мкл Lipofectamine 2000 Reagent. В отдельной пробирке смешивали 125 мкл Opti-MEM с 5 мкл (1,0 мкг) ДНК. Добавляли готовую, разбавленную ДНК к разбавленному Lipofectamine 2000 Reagent. Инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут. Добавляли по каплям 250 мкл ДНК-липидный комплекс к клеткам в 6-луночной планшете. Инкубировали при 37°C в CO₂ инкубаторе 48 часов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Критически важным параметром, влияющим на качество трансфекции, является величина pH буферного раствора HBS (Hepes-buffered saline), который точно должен соответствовать рекомендуемому значению. И поскольку в литературе имеются некоторые отличия в рекомендуемых показателях кислотности HBS, мы приготовили несколько буферных растворов с различными значениями pH – 6,90, 6,95, 7,00, 7,05 и 7,10. Полученные растворы использовали в дальнейшем для экспрессии GFP-содержащего белка с использованием плазмиды pCDNA3.1(+). BirA.GFP, в структуре которого имеется сильный CMV промотор (рис. 1). Для сравнения, параллельно провели трансфекцию клеток с помощью коммерческих наборов FuGENE и Lipofectamine. В качестве отрицательного контроля использовали раствор фосфата кальция без добавления плазмиды (рис. 2).

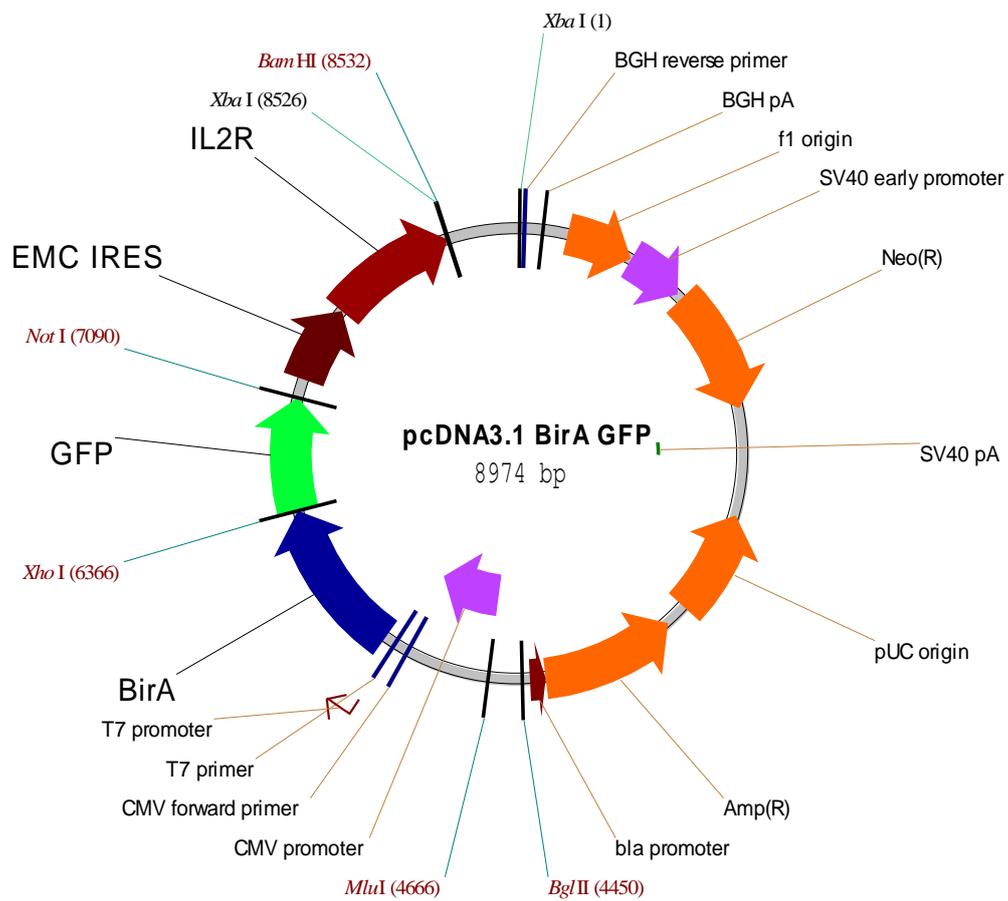
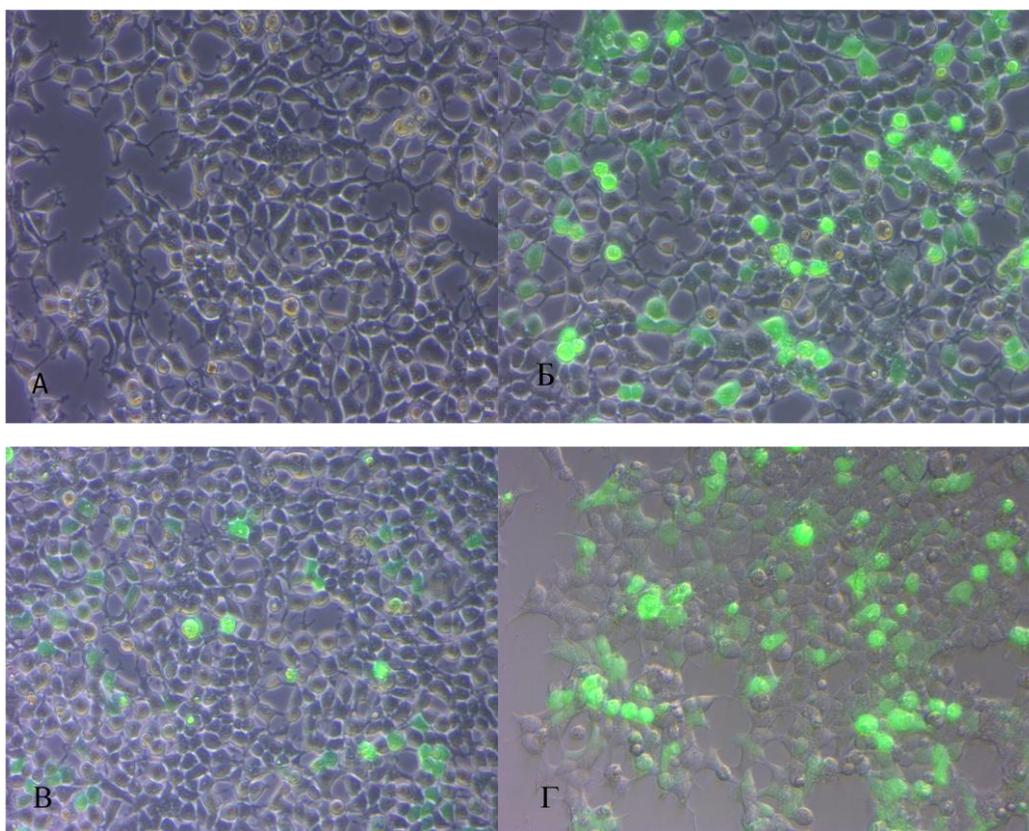


Рис. 1. Дизайн вектора для трансфекции в эукариотических клетках на примере конструкции, содержащей ген GFP, слитый с BirA. (Конструкция получена на основе стандартной плазмиды pcDNA3.1(+) с CMV промотором)

Fig. 1. Design of vector for transfection in eukaryotic cells on example of vector, containing GFP gene, fused with BirA. (Construct was obtained on the basis of plasmid pcDNA3.1(+) with CMV promoter)



А – контроль; Б – трансфекция с CaCl_2 при pH 6,95; В – трансфекция с FuGENE; Г – трансфекция с липофектаминам. Увеличение – 100X

Рис. 2. Сравнение эффективности различных способов трансфекции

A – Control; Б – transfection by CaCl_2 at pH 6,95; В – transfection by FuGENE; Г – transfection by Lipofectamine. Zoom – 100X

Fig. 2. Comparison of efficiency of different transfection methods

Во всех экспериментах использовали одинаковое количество ДНК (1.0 мкг). Оценку эффективности трансфекции проводили на флуоресцентном микроскопе с длиной возбуждения 499 нм в сравнении с нетрансфицированными клетками с использованием программы ImageJ для подсчета клеток. Результаты, приведенные в таблице 1, указывают, что значение pH 6,95 является наиболее оптимальным для клеток НЕК293Т. Хотя следует отметить, что и другие значения pH фосфатного буфера HBS также показывают сравнимую эффективность трансфекции.

Несмотря на то, что Lipofectamine показал максимальную эффективность экспрессии белка GFP ($38,48 \pm 5,32$, табл. 1), но его использование привело к снижению жизнеспособности клеток. Например, небольшое увеличение дозы этого реагента (15 мкл), привело к уменьшению числа клеток практически вдвое (рис.3), что сопоставимо с результатами аналогичных экспериментов на линии астроцитомных клеток 1321N1 [19].

Таблица 1. Сравнение эффективности транзентной трансфекции различными методами

Table 1. Comparison of the effectiveness of transient transfection with different methods

Вид трансфекции Type of transfection	Число клеток Number of cells	Трансфицированные клетки Transfected cells	% трансфицированных клеток % of transfected cells
CaCl_2 (pH 6,90)	423±59	124±11	29,39±6,87
CaCl_2 (pH 6,95)	405±22	135±22	33,4±3,50
CaCl_2 (pH 7,00)	532±24	155±7	29,18±0,37

CaCl ₂ (pH 7,05)	552±19	157±12	28,49±3,01
CaCl ₂ (pH 7,10)	520±47	141±5	27,38±3,15
FuGENE	548±23	112±14	20,39±1,65
Lipofectamine	459±38	176±26	38,48±5,32

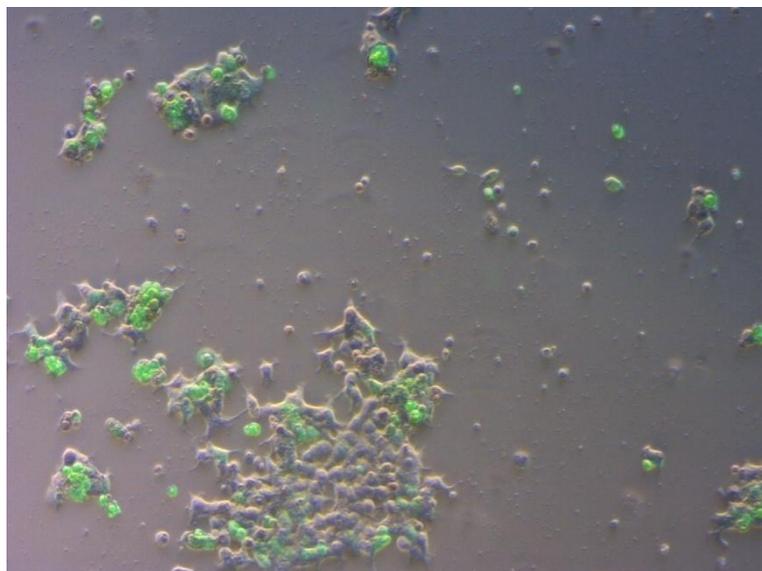


Рис. 3. Токсический эффект липофектамина на клетки HEK293T. Увеличение 50X

Fig. 3. Toxic effect of Lipofectamine on HEK293T cells. Zoom 50X

Таким образом, по результатам проведенных экспериментов установлено, что оптимальным значением фосфатного буфера HBS для проведения транзientной трансфекции является величина pH 6,95. Небольшое отклонение pH этого буфера в диапазоне 6,90-7,10 заметно не влияет на эффективность экспрессии интересующего нас белка.

ВЫВОДЫ

Трансфекция клеток является сложным процессом, включающим несколько этапов, которые невозможно полностью контролировать. В то время как многие параметры процесса известны, не представляется возможным его полное понимание на молекулярном уровне. Однако строгое следование инструкциям и протоколам обычно приводит к эффективной трансфекции клеточных линий.

Кальций-фосфатную методику часто сравнивают с другими доступными методами трансфекции. Несмотря на растущий выбор новых коммерческих наборов и различных реагентов, данный метод все еще остается привлекательным. Это единственный способ, где присутствуют неорганические ионы, являющиеся естественными компонентами питательной среды, и, следовательно, в среде после проведения трансфекции отсутствуют синтетические химические вещества, которые могут снизить жизнеспособность клеток. Таким образом, спустя более 40 лет после опубликования, кальций-фосфатная трансфекция все еще остается полезным методом и широко применяется в лабораторной практике.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан в рамках проекта 1804/ГФ4 «Новые подходы для изучения и количественного анализа убиквитинирования *in vivo*, на основе метода биотинилирования от сближения» на 2015-2017 гг. (номер госрегистрации 0115PK01802).

ЛИТЕРАТУРА

1. Kim T.K., Eberwine J.H. Mammalian cell transfection: the present and the future // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2010. – Vol.397, №8. – P. 3173-3178.
2. Ding K., Han L., Zong H., Chen J., Zhang B., Zhu J. Production process reproducibility and product quality consistency of transient gene expression in HEK293 cells with anti-PD1 antibody as the model protein // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2017. – Vol. 101, №5. – P. 1889-1898. doi 10.1007/s00253-016-7973-y.
3. Hacker D.L., Kiseljak D., Rajendra Y., Thurnheer S., Baldi L., Wurm F.M. Polyethyleneimine-based transient gene expression processes for suspension-adapted HEK-293E and CHO-DG44 cells // *Protein Expr. Purif.* – 2013. – №92. – P. 67-76.
4. Wurm F.M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells // *Nat. Biotechnol.* – 2004. – Vol.22, №11. – P. 1393-1398.
5. Geisse S. Reflections on more than 10 years of TGE approaches // *Protein Expr. Purif.* – 2009. – Vol.64, №2. – P.99-107.
6. Nettleship J.E., Assenberg R., Diprose J.M., Rahman-Huq N., Owens R.J. Recent advances in the production of proteins in insect and mammalian cells for structural biology // *J. Struct. Biol.* – 2010. – Vol.172, №1. – P.55-65.
7. Andrell J., Tate C.G. Overexpression of membrane proteins in mammalian cells for structural studies // *J. Mol. Membr. Biol.* – 2013. – Vol.30. – P.52-63. <http://dx.doi.org/10.3109/09687688.2012.703703>.
8. Bieniossek C., Imasaki T., Takagi Y., Berger I. MultiBac: expanding the research toolbox for multiprotein complexes // *Trends Biochem. Sci.* – 2012. – Vol.37, №2. – P.49-57.
9. Graham F.L., Van der Eb A.J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA // *Virology.* – 1973. – Vol.52, №2. – P.456-467.
10. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K278001>.
11. <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/calcium-phosphate-transfection-kit.html>.
12. Jordan M., Wurm F.M. Transfection of adherent and suspended cells by calcium phosphate // *Methods.* – 2004. – Vol. 33, №2. – P. 136-143.
13. Chowdhury E.H., Sasagawa T., Nagaoka M., Kundu A.K., Akaike T. Transfecting mammalian cells by DNA/calcium phosphate precipitates: Effect of temperature and pH on precipitation // *Anal. Biochem.* – 2003. – Vol.314, №2. – P.316-318.
14. Higgins S.J., Hames B.D. *Protein Expression. A practical approach.* – Oxford University Press, 1999. – 282p.
15. Chen C., Okayama H. High-Efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA // *Mol. Cell. Biology.* – 1987. – Vol.7, №8. – P.2745-2752.
16. Jordan M., Schallhorn A., Wurm F. M. Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation // *Nucleic Acids Research.* – 1996. – Vol. 24, №4. – P. 596-601.
17. Felgner P.L., Gadek T.R., Holm M. et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1987. – Vol. 84, №21. – P. 7413-7417.
18. Jacobsen L.B., Calvin S.A., Colvin K.E., Wright M. FuGENE 6 Transfection Reagent: the gentle power // *Methods.* – 2004 – Vol. 33, №2. – P. 104-112.
19. Marucci G., Lammi C., Buccioni M. et al. Comparison and optimization of transient transfection methods at human astrocytoma cell line 1321N1 // *Anal Biochem.* – 2011. – Vol. 414, №2. – P.300-302.
20. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрун Дж. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – 480с.
21. Kulyyassov A., Shoaib M., Ogryzko V. Use of in vivo biotinylation for chromatin immunoprecipitation // *Curr. Protoc. Cell Biol.* – 2011. – Chapter 17, Unit17.12. – P.17.12.1-17.12.22.
22. Kulyyassov A., Shoaib M., Pichugin A. et al. PUB-MS: a mass spectrometry-based method to monitor protein-protein proximity in vivo // *J. Proteome Res.* – 2011. – Vol. 10, №10. – P.4416-4427.
23. Shoaib M., Kulyyassov A., Robin C. et al. PUB-NChIP – “in vivo biotinylation” approach to study chromatin in proximity to a protein of interest // *Genome Research.* – 2013. – Vol. 23, №2. – P.331-340.
24. Кулыясов А.Т., Жубанова Г.С., Раманкулов Е.М., Огрызко В.В. Метод количественной оценки взаимодействия гетерохроматинового белка HP1 *in vivo* // *Биотехнология. Теория и практика.* – 2014. – №1. – С.17-27.
25. Пат.30034 Республика Казахстан. Рекомбинантная плазмидарс DNA3.1(+)-BAP-HP1a, кодирующая гетерохроматиновый белок человека HP1a и обеспечивающая его экспрессию в клетках HEK293T / Кулыясов А.Т., Огрызко В.В. – №2013/1352.1; опубл. 16.10.2013; Бюл. №6. – 6с.
26. Пат.30035 Республика Казахстан. Рекомбинантная плазмидарс DNA3.1(+)-BAP-KAP1, кодирующая белок транскрипционного кофактора человека KAP1 и обеспечивающая его экспрессию в клетках HEK293T / Кулыясов А.Т., Огрызко В.В. – №2013/1377.1; опубл. 17.10.2013; Бюл. №6. – 6с.

REFERENCES

1. Kim T.K., Eberwine J.H. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, vol. 397, no. 8, pp. 3173-3178. doi: 10.1007/s00216-010-3821-6.
2. Ding K., Han L., Zong H., Chen J., Zhang B., Zhu J. Production process reproducibility and product quality consistency of transient gene expression in HEK293 cells with anti-PD1 antibody as the model protein. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2017, vol. 101, no. 5, pp. 1889-1898. doi: 10.1007/s00253-016-7973-y.
3. Hacker D.L., Kiseljak D., Rajendra Y., Thurnheer S., Baldi L., Wurm F.M. Polyethyleneimine-based transient gene expression processes for suspension-adapted HEK-293E and CHO-DG44 cells. *Protein Expr. Purif.*, 2013, no. 92, pp. 67-76. doi: 10.1016/j.pep.2013.09.001.
4. Wurm F.M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat. Biotechnol.*, 2004, vol. 22, no. 11, pp.1393-1398. doi: 10.1038/nbt1026.
5. Geisse S. Reflections on more than 10 years of TGE approaches. *Protein Expr. Purif.* 2009, vol.64, no. 2, pp. 99-107. doi: 10.1016/j.pep.2008.10.017.
6. Nettleship J.E., Assenberg R., Diprose J.M., Rahman-Huq N., Owens R.J. Recent advances in the production of proteins in insect and mammalian cells for structural biology. *J. Struct. Biol.*, 2010, vol.172, no. 1, pp. 55-65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2010.02.006>.
7. Andrell J., Tate C.G. Overexpression of membrane proteins in mammalian cells for structural studies. *J. Mol. Membr. Biol.*, 2013, vol.30, pp.52-63. <http://dx.doi.org/10.3109/09687688.2012.703703>.
8. Bieniossek C., Imasaki T., Takagi Y., Berger I. MultiBac: expanding the research toolbox for multiprotein complexes. *Trends Biochem. Sci.*, 2012, vol.37, no. 2, pp.49-57. doi: 10.1016/j.tibs.2011.10.005.
9. Graham F.L., Van der Eb A.J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*, 1973, vol.52, no. 2, pp.456-467. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(73\)90341-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(73)90341-3).
10. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K278001>.
11. <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/calcium-phosphate-transfection-kit.html>
12. Jordan M., Wurm F. M. Transfection of adherent and suspended cells by calcium phosphate. *Methods*, 2004, vol.33, no. 2, pp.136-143. doi:10.1016/j.ymeth.2003.11.011.
13. Chowdhury E.H., Sasagawa T., Nagaoka M., Kundu A.K., Akaike T. Transfecting mammalian cells by DNA/calcium phosphate precipitates: Effect of temperature and pH on precipitation. *Anal. Biochem.*, 2003, vol.314, no. 2, pp.316-318. [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00648-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00648-6).
14. Higgins S.J., Hames B.D. Protein Expression. A practical approach. Oxford University Press, 1999, 282p.
15. Chen C., Okayama H. High-Efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biology*, 1987, vol.7, no. 8, pp.2745-2752. PMID: 3670292. PMCID: PMC367891.
16. Jordan M., Schallhorn A. Wurm F.M. Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Research.*, 1996, vol. 24, no. 4, pp. 596-601. PMID: 8604299. PMCID: PMC145683.
17. Felgner P.L., Gadek T.R., Holm M. et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, no. 21, pp. 7413-7417. doi:10.1073/pnas.84.21.7413.
18. Jacobsen L.B., Calvin S.A., Colvin K.E., Wright M. FuGENE 6 Transfection Reagent: the gentle power. *Methods*, 2004, vol.33, no. 2, pp. 104-112. doi:10.1016/j.ymeth.2003.11.002.
19. Marucci G., Lammi C., Buccioni M. et al. Comparison and optimization of transient transfection methods at human astrocytoma cell line 1321N1. *Anal. Biochem.*, 2011, vol.414, no. 2, pp. 300-302. doi: 10.1016/j.ab.2011.02.028.
20. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular cloning: A laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 480 p.
21. Kulyassov A., Shoaib M., Ogryzko V. Use of in vivo biotinylation for chromatin immunoprecipitation. *Curr. Protoc. Cell Biol.*, 2011, chapter 17, unit17.12, pp. 17.12.1-17.12.22. doi: 10.1002/0471143030.cb1712s51.
22. Kulyassov A., Shoaib M., Pichugin A. et al. PUB-MS: a mass spectrometry-based method to monitor protein-protein proximity in vivo. *J. Proteome Res.*, 2011, vol. 10, no. 10, pp. 4416-4427. doi: 10.1021/pr200189p.
23. Shoaib M., Kulyassov A., Robin C. et al. PUB-NChIP – “in vivo biotinylation” approach to study chromatin in proximity to a protein of interest. *Genome Research*, 2013, vol. 23, no. 2, pp. 331-340. doi:10.1101/gr.134874.111.
24. Kulyassov A.T., Zhubanova G.S., Ramankulov E.M., Ogryzko V.V. Method of quantitative evaluation of heterochromatin protein HP1 interactions in vivo. *Biotechnology. Theory and practice*, 2014, no. 1, pp. 17-27.
25. Patent of the Republic of Kazakhstan for invention, registration number 2013 / 1352.1. Number 30034, Bulletin # 6. The recombinant plasmid pcDNA3.1 (+) -BAP-HP1a, encoding the human

heterochromatin protein HP1a, and providing its expression in HEK293T cells /Kulyyassov A.T., Ogryzko V.V. 16.10.2013, 6p.

26. Patent of the Republic of Kazakhstan for invention, registration number 2013 / 1377.1. Number 30035, Bulletin # 6. The recombinant plasmid pcDNA3.1 (+) -BAP-KAP1, which encodes the human transcription cofactor protein KAP1, and providing its expression in HEK293T cells /Kulyyassov A.T., Ogryzko V.V. 16.10.2013, 6p.

НЕК293Т ЖАСУША ЛИНИЯСЫНДА ТРАНЗИЕНТТІ ТРАНСФЕКЦИЯ ӘДІСІН САЛЫСТЫРУ ЖӘНЕ ОПТИМИЗАЦИЯЛАУ

А.С. Исабекова¹, М.С. Жунусова², Е.М. Раманқұлов¹, А.Т.Құлыясов¹

¹ РМК «Ұлттық биотехнология орталығы», Қазақстан Республикасының Білім және ғылым министрілігінің Ғылым комитеті, Қорғалжын тас жолы 13/5, Астана қ., 010000, Қазақстан

² Л.Н. Гумилев атындағы Евразия ұлттық университеті, Мунайтпасов көшесі, 5, Астана қ., 010000, Қазақстан
akulyyassov@gmail.com

ТҮЙІН

Трансгендердің экспрессиясы және сүтқоректілер жасушаларында гендер экспрессиясын бақылауда ұстау биомедициналық зерттеулердің негізі болып табылады. Яғни, эукариоттық жасушаның ішіне гендерді тиімді көшіру әдісін жетілдіру үлкен қызығушылық тудырады және зерттеудің басым бағыты болып табылады.

Біз НЕК293Т жасушаларына әртүрлі транзиетті трансфекция әдістерін салыстыру жүргіздік, оның ішінде әртүрлі рН-пен HBS буферлі ерітіндісі – 6,90, 6,95, 7,00, 7,05 және 7,10 негізіндегі кальций фосфатты, сонымен қатар FuGENE мен Lipofectamine коммерциялық жинақтары арқылы. Алынған нәтижелер репортер ген негізіндегі жасыл флуоресцентті ақуыз GFP көмегімен флуоресцентті микроскопия арқылы алынды.

Жүргізілген тәжірибелер нәтижелері бойынша транзиетті трансфекция жүргізу үшін HBS фосфатты буферінің ең қолайлы рН мәні 6,95 болып табылады. Сонымен қатар рН 6,90 – 7,10 диапазонында сәл ауытқуы бізді қызықтыратын ақуыздардың экспрессиясына айтарлықтай әсер етпейді. Зерттелген әдістердің ішінде GFP белогының экспрессиясы бойынша Lipofectamine ең жоғарғы трансфекция нәтижелілігінің деңгейін көрсеткеніне қарамастан бұл реагенттің ұсынылған мөлшерінен жоғарылату НЕК293Т жасушаларына айқын улы әсер көрсетті.

Негізгі сөздер: Плазмидалар, ДНК, транзиетті трансфекция, жасуша линиясы, НЕК293Т.