



**ВОЛГОГРАДСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ**

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
Кафедра фундаментальной медицины и биологии

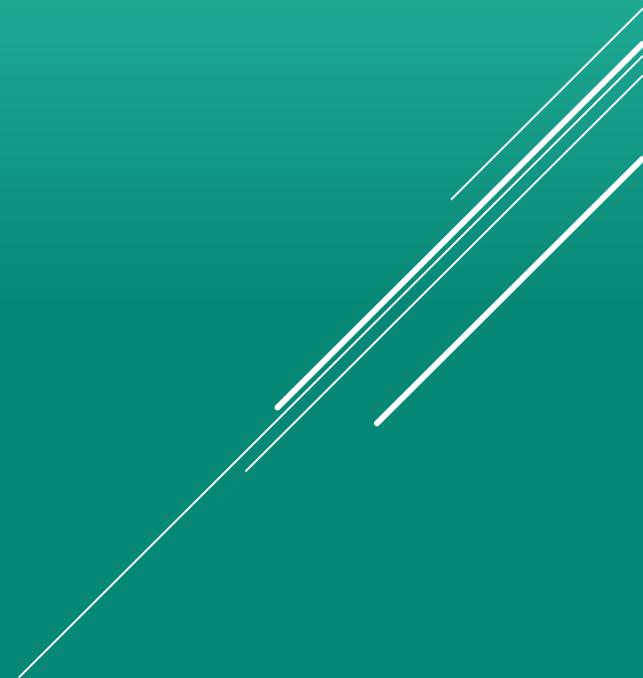
Трансфекция клеток

Волгоград, 2025 год

ТРАНСФЕКЦИЯ КЛЕТОК

Трансфекция клеток – процесс введения нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) в клетки эукариот невирусным методом

- ▶ Сравнение методов трансфекции клеток
- ▶ Оценка эффективности трансфекции



ТРАНСФЕКЦИЯ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

С появлением генетической инженерии методология введения молекул ДНК в клетки млекопитающих.

Привлекла внимание многих исследователей. К этому времени уже был разработан ряд методов трансфекции.

Культивируемых клеток животных нуклеиновыми кислотами различных вирусов.

ПОЧЕМУ ПРОИСХОДИТ ТРАНСФЕКЦИЯ?

Свойство ДНК	Процесс	Метод трансфекции
Отрицательный заряд	Перемещение ДНК в электрическом поле	Электропорация
Наличие фосфатных групп	Выпадение в осадок в растворе хлорида кальция	Кальций-фосфатная
Способность включаться в липидные мицеллы	Образование ДНК-липидных частиц	Липофекция

ГИПЕРТОНИЧЕСКИЙ СОЛЕВОЙ МЕТОД

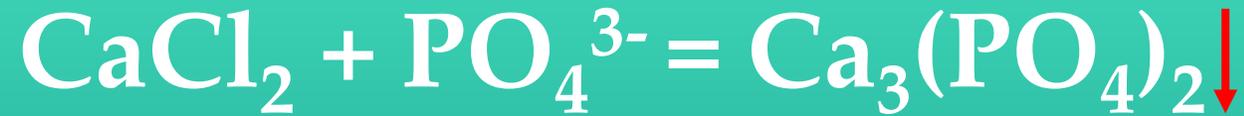
Инфекционность очищенной вирусной ДНК на культуре клеток описали Г.ди Майорка с соавторами в 1959 г. Они показали, что, если на монослой культуры клеток животных нанести ДНК вируса полиомы в гипертоническом солевом растворе (0,5 – 1,0 М NaCl), то через некоторое время образуются бляшки лизированных вирусом клеток. По-видимому, изменение осмотического давления среды приводит к активации процесса поглощения клетками вирусной ДНК. В дальнейшем в ряде работ было показано, что эффективность трансфекции для ДНК вирусов полиомы и SV40 данным методом близка и составляет $(1-3) \cdot 10^3$ БОЕ на 1 мкг ДНК. Для других типов вирусов получаемая данным методом инфекционность ДНК была заметно ниже, что стимулировало разработку новых методических подходов.

В настоящее время гипертонический солевой метод вытеснен другими, более эффективными методами трансфекции клеток млекопитающих вирусными нуклеиновыми кислотами.

ДЭАЭ-ДЕКСТРАНОВЫЙ МЕТОД

В 1968 г. Дж. Мак-Катчсн и Дж. Нагано опубликовали результаты исследования, в котором показали, что поликатион диэтиламиноэтилдекстран (ДЭАЭ-декстран) значительно увеличивает эффективность трансфекции клеток животных нуклеиновой кислотой вируса SV40. Очищенную ДНК вируса SV40 инкубировали сначала в растворе с ДЭЛЭ-декстраном, варьируя его концентрацию от 100 до 3000 мкг/мл. Затем эту смесь наносили на монослой клеток, который через определенный промежуток времени отмывали от поликатиона и заливали средой. В процессе последующей инкубации на монослое появлялись бляшки лизированных клеток. Эффективность трансфекции ДНК вируса SV40 таким методом составляет $(1 \cdot 10) \cdot 10^6$ БОЕ на 1 мкг ДНК.

КАЛЬЦИЙ-ФОСФАТНЫЙ МЕТОД

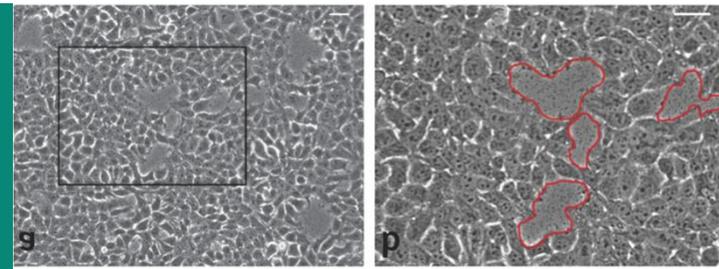
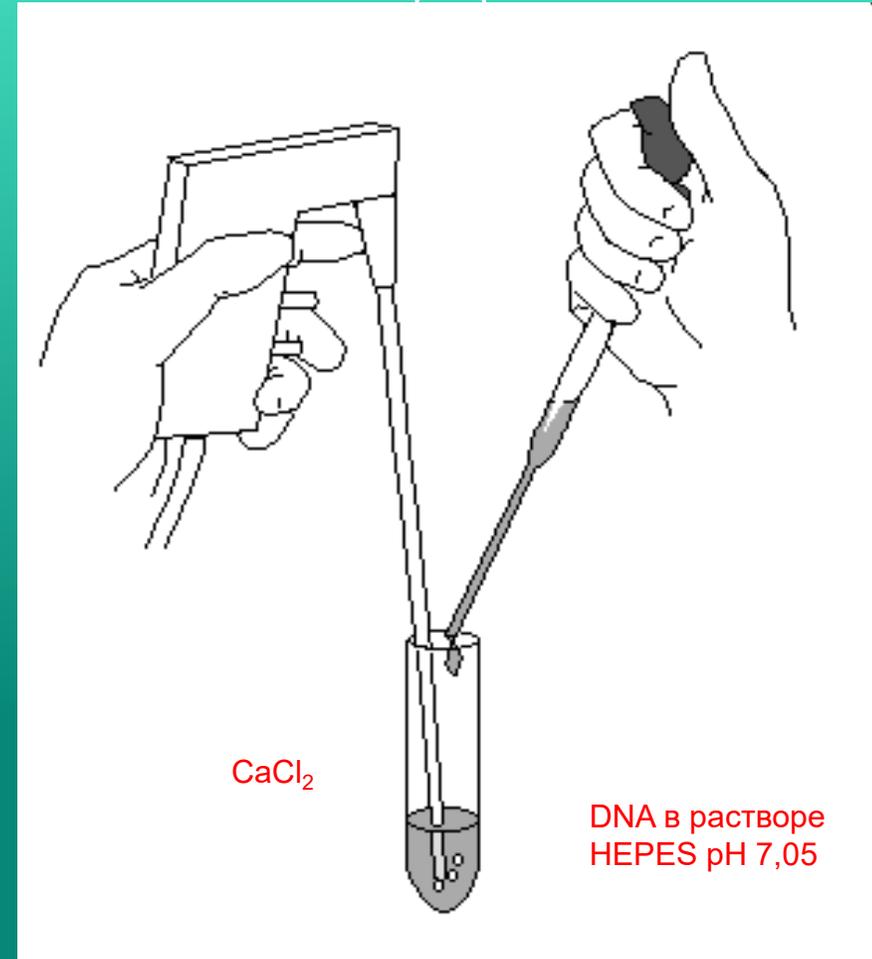


Ф. Грэхем и А. ван дер Эб нанесли на монослой клеток KB, предварительно обработанных ДЭАЭ-декстраном, ДНК аденовируса Ad5 в растворе CaCl₂. При этом эффективность трансфекции удалось повысить в 10-100 раз. Поскольку в питательной среде присутствовали фосфаты, при добавлении раствора хлорида кальция образовывался осадок фосфата кальция. Удаление этого осадка из среды приводило к потере инфекционности ДНК. В результате проведенных затем экспериментов стало ясно, что трансфекция происходит в результате соосаждения вирусной ДНК и образующихся микрокристаллов фосфата кальция на клеточный монослой.

На примере ДНК вируса простого герпеса показано, что сразу после соосаждения с фосфатом кальция вирусная ДНК становится устойчивой к разрушению ультразвуком, но комплекс фосфат кальция ДНК остается чувствительным к ДНКазе в течение 4 ч. При взаимодействии этого комплекса с культурой клеток животных ДНК становится устойчивой к ДНКазе уже в течение первого часа.

КАЛЬЦИЙ-ФОСФАТНЫЙ МЕТОД

- ▶ В присутствии солей кальция ДНК выпадает в осадок
- ▶ Эффективность процесса зависит от pH
- ▶ Размер частиц осадка зависит от интенсивности перемешивания



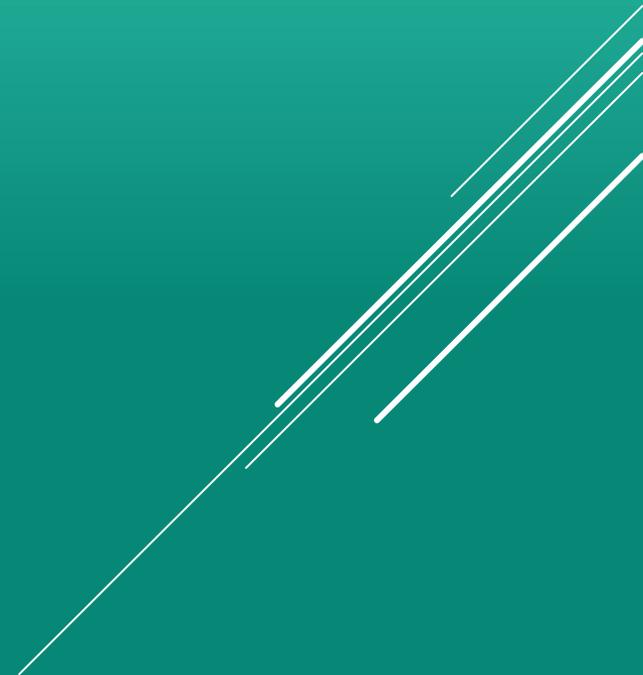


КАЛЬЦИЙ-ФОСФАТНЫЙ МЕТОД

Кальций-фосфатный метод обычно более эффективен, чем ДЭАЭ-декстрановый, при трансфекции линейными вирусными ДНК и заметно уступает последнему при использовании кольцевых молекул ДНК. Вероятно, образование микрокристаллов фосфата кальция и соосаждение с ними молекул ДНК сопровождается нарушением структуры части этих макромолекул



Микроинъекция вирусных молекул ДНК





А. Грессман (1970 г.)

Ф. Ямамото с соавт.
(1981 г.)

(около 10^{-8} мкл)

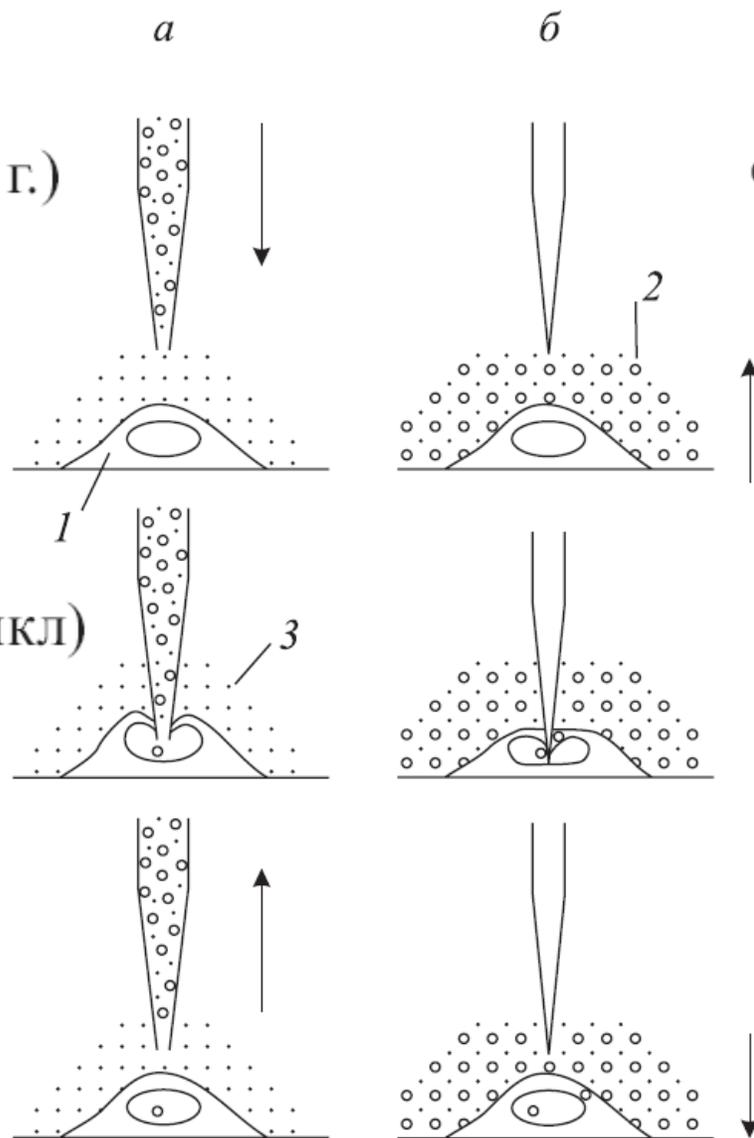
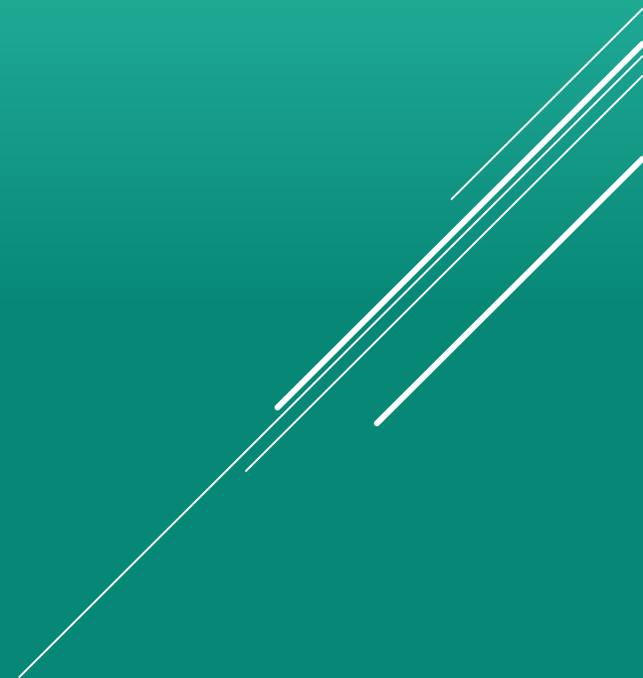


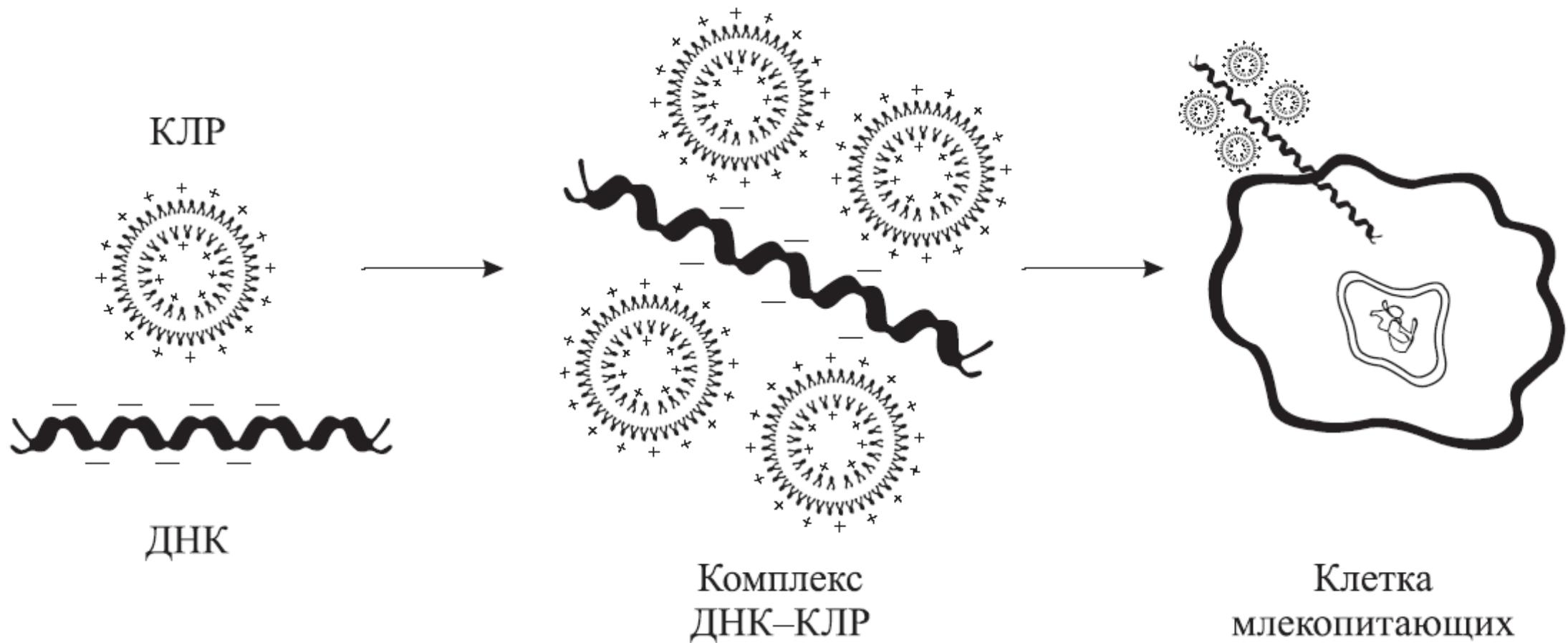
Схема методов микроинъекций (а) и прокалывания (б), обеспечивающих введение чужеродных молекул ДНК в клетки животных:

Схема методов микроинъекций (а) и прокалывания (б), обеспечивающих введение чужеродных молекул ДНК в клетки животных:
1 — клетка; 2 — молекула плазмиды;
3 — буферный раствор.
Стрелки обозначают направление движения микропипетки (а) или предметного столика микроскопа (б)



Липосомный метод



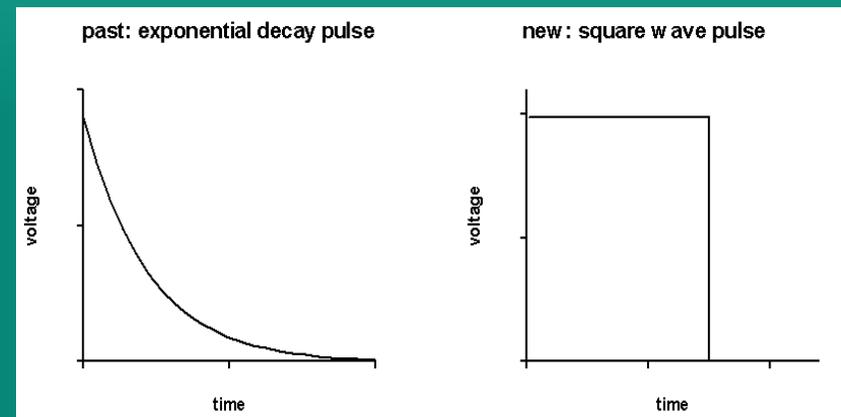
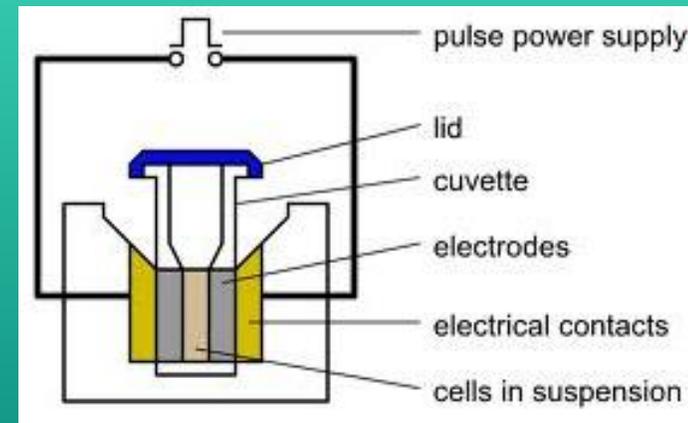


ВВЕДЕНИЕ МОЛЕКУЛ ДНК В КЛЕТКИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КАТИОННОГО ЛИПИДНОГО РЕАГЕНТА (КЛР)

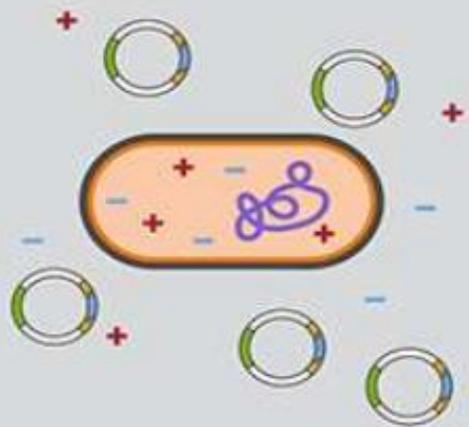
ЭЛЕКТРОПОРАЦИЯ

Зависит от...

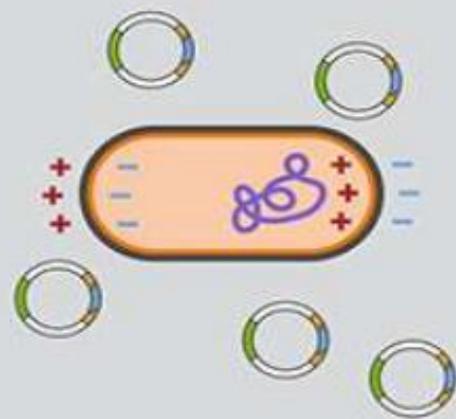
- ▶ Продолжительности импульса
- ▶ Напряженности электрического поля
- ▶ Формы кривой импульса
- ▶ Числа импульсов
- ▶ Концентрации клеток и плазмиды



Инкубация клеток и плазмид



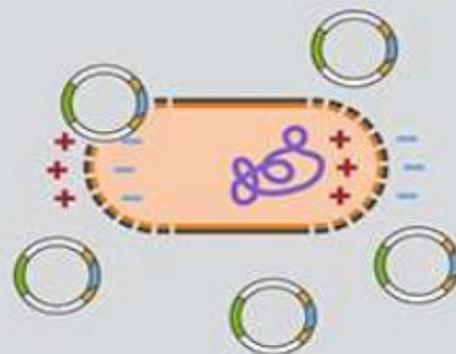
Образование транзитных пор



Электрическое поле



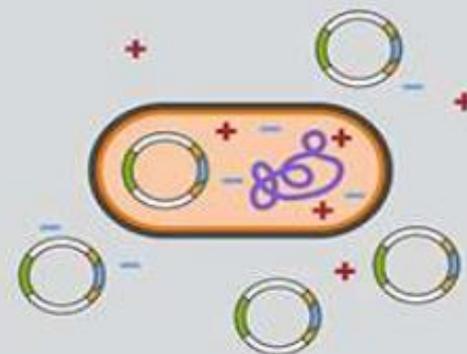
Вход плазмиды



Электрическое поле



Поглощение плазмиды



КАК ВЫБРАТЬ МЕТОД ТРАНСФЕКЦИИ

Метод	Цена	Эффективность	Выживаемость	Особенности
Кальций-фосфатная	Крайне низкая	Средняя	Отличная	Используется для трансфекции препаративных количеств клеток. Очень зависит от рН при формировании комплексов. Эффективность зависит от клеточной линии
DEAE-декстран	Крайне низкая	Средняя	Отличная	Редко используется для стабильной интеграции плазмидной ДНК в геном
Электропорация	Высокая	Зависит от множества факторов	Обычно низкая	Обычно требует оптимизации. Проводится в специальных кюветах или капиллярах
Поликатионные полимеры	Низкая	Высокая	Зависит от типа клеток	Используется для трансфекции аналитических и препаративных количеств клеток. Очень зависит от клеточной линии
Липофекция	Высокая	Высокая	Обычно высокая	Может быть сильно токсична для отдельных культур. Ингибируется антибиотиками

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ

Если введенная экзогенная генетическая информация способна сохраняться (в интегрированном или автономном состоянии) и экспрессироваться в клетках млекопитающих, то это может приводить к изменению не только генотипа, но и выявляемого фенотипа клеток. Данный процесс называется *трансформацией*.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ

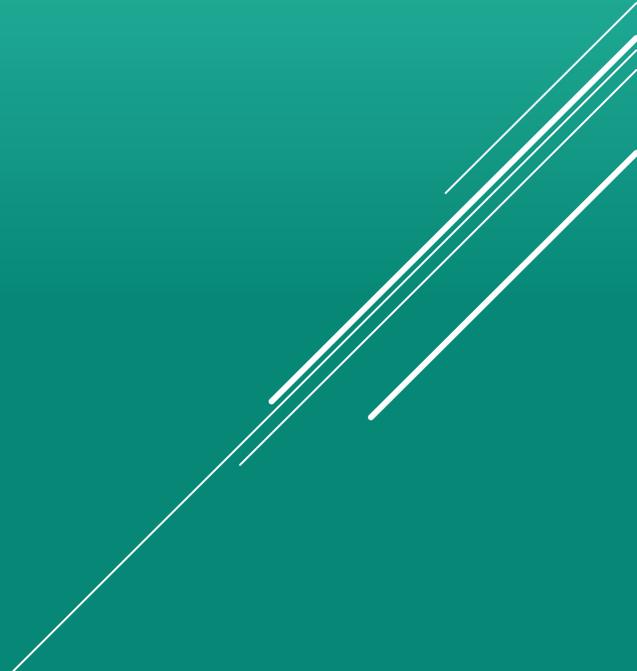
Возможность генетической трансформации клеток млекопитающих впервые продемонстрировал Л. Краус в 1961 г. Он выделил ДНК из костного мозга человека, гомозиготного по β^A -полипептиду гемоглобина, и обработал этим препаратом культивируемые клетки костного мозга от пациента с серповидно-клеточной анемией (β^S). В результате клетки человека приобрели способность продуцировать кроме полипептида β^S и полипептид β^A . Однако в данном случае отбор клонов трансформированных клеток был значительно затруднен, так как для рассматриваемого признака не найдены условия селекции.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ТРАНСФЕКЦИИ

- ▶ $E = n/N * 100$, где n -число ЖИВЫХ клеток, получивших плазмиду, N -общее число ЖИВЫХ клеток
- ▶ Для оценки эффективности используются флуоресцентные белки или ферменты (галактозидаза, люцифераза, хлорамфениколацетилтрансфераза)
- ▶ **Выживаемость** – важный параметр успешности трансфекции (оценивается разными способами, в том числе методом исключения красителей)



Спасибо за внимание!

A decorative graphic consisting of several parallel white lines of varying lengths, arranged in a diagonal pattern from the bottom right towards the center of the slide.