

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ПРОСТАЯ МЕТОДИКА ВЫДЕЛЕНИЯ ПЛАЗМИД ИЗ *ESCHERICHIA COLI* ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ТРАНСФЕКЦИИ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

В.А. Манувера, Е.Н. Графская, В.Н. Лазарев\*

Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины  
федерального медико-биологического агентства, 119435, Москва, ул. Малая Пироговская, 1а;

\*e-mail: lazarev@rcpcm.org

В настоящее время в продаже находится большое количество наборов реагентов, предназначенных для выделения высокоочищенной плазмидной ДНК и последующей трансфекции линий клеток человека. Однако ввиду высокой стоимости и логистических проблем может возникнуть необходимость проводить выделение плазмидной ДНК с использованием только самых простых реактивов и материалов. Мы представляем одну из возможных методик такого выделения, подходящую для повседневного лабораторного применения. Она основывается на хорошо известных принципах и методах очистки плазмидной ДНК, имеет минимальную стоимость, не требует специальных навыков и легко масштабируется. Методика включает стадии щелочного лизиса и очистки с помощью частиц оксида кремния и гель-фильтрации. Плазмиды, выделенные с помощью предложенной методики, трансфицируют клетки эмбриональной почки человека Expi293F не менее эффективно, чем плазмиды, очищенные с использованием специализированного набора реагентов Qiagen plasmid maxi kit («Qiagen», США).

**Ключевые слова:** бактериальные плазмиды; трансфекция; линия клеток человека

**DOI:** 10.18097/BMCRM00170

## ВВЕДЕНИЕ

Трансфекция клеточных линий человека плазмидами, полученными из *Escherichia coli*, является широко распространенным методом, применяемым для решения различных исследовательских и биотехнологических задач [1, 2]. При этом, для эффективной трансфекции качество плазмидной ДНК (пДНК) должно быть достаточно высоким. Во-первых, пДНК должна быть хорошо очищена от примесей, в первую очередь от бактериальных липополисахаридов [3] и белков [2]. Во-вторых, основная часть плазмид должна находиться в форме с отрицательной сверхспирализацией [4]. Таким образом, при выделении пДНК, с одной стороны, необходимо проводить ряд последовательных стадий для удаления примесей, часто в достаточно жестких условиях, а с другой – избегать повреждений и разрывов сахарофосфатного остова ДНК, что ведет к релаксации суперскрученной формы.

В подавляющем большинстве случаев первой стадией выделения пДНК является щелочной лизис [5, 6]. пДНК, полученная после щелочного лизиса и осаждения спиртом, пригодна для ряда задач, таких как ПЦР, рестрикция, секвенирование и т. п. Однако для трансфекции требуется проводить дополнительные стадии очистки. Самыми распространенными методами очистки являются фенол-хлороформовая экстракция, связывание с частицами диоксида кремния, анионообменная хроматография, гель-фильтрация. Для получения пДНК с чистотой, соответствующей фармакологическим стандартам, применяют сложные схемы хроматографической очистки со специальными сорбентами [7].

Мы предлагаем простую лабораторную методику выделения плазмидной ДНК, состоящую из трех стадий: щелочного лизиса, связывания с диоксидом кремния и гель-фильтрации. Методика подходит для получения пДНК для трансфекции. Мы показали, что эффективность трансфекции с использованием пДНК, выделенной по описываемой методике, не уступает эффективности трансфекции с использованием пДНК, выделенной коммерческим набором Qiagen plasmid maxi kit («Qiagen», США).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

## Реактивы

В работе использованы: ЭДТА, NaCl, NaOH, додецилсульфат натрия, Tris-base, ацетат натрия («Реахим», Россия); дрожжевой экстракт, триптон, ампициллин, агароза, бромистый этидий («Хеликон», Россия); частицы оксида кремния S5631 («Sigma», США), суспензия 300 г/л в 10 мМ TrisCl, 1 мМ ЭДТА, pH 7,5; фетальная сыворотка крупного рогатого скота, гентамицин, DMEM, OptiMEM, HBSS («Life Technologies», США); Lipofectamine™ 3000 Transfection Kit («Invitrogen», США); хроматографический сорбент Sephacryl S-500 HR («Cytiva», США).

## Растворы

Раствор I: 20 мМ TrisHCl pH 7,5, 1 мМ ЭДТА, сахароза 200 г/л; раствор II: 10 г/л SDS, 0,2 М NaOH; раствор III: 3 М CH<sub>3</sub>COONa, 2 М CH<sub>3</sub>COOH; раствор W: 100 мМ TrisHCl pH 7,5, 50 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 50% (об.) этанол; раствор



E: 20 mM TrisHCl pH 7.5, 1 mM ЭДТА, 10 мг/л РНКазы А («Sigma», США); PBS: 20 mM фосфат натрия, 8 г/л NaCl, pH 7.4; бактериальная среда LB: триптон 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л, NaCl 10 г/л.

#### Клетки

Штамм *E. coli* Top10: F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15; линия клеток человека Expi293F («Thermo Fisher Scientific», США).

#### Оборудование

Хроматограф АКТА Start («GE Healthcare», США); спектрофотометр UV-1900 («Shimadzu», Япония); CO<sub>2</sub>-инкубатор Heraeus Heracell 240 («Thermo Fisher Scientific», США); проточный цитофлуориметр NovoCyte Flow Cytometer («ACEA Biosciences», США).

#### Культивирование бактерий

В работе использовали штамм *E. coli* Top10, трансформированный плазмидой pEGFP-N1 («Clontech», США). Единичную колонию клеток переносили в культуральную колбу объемом один литр, содержащую 100 мл среды LB с канамицином (50 мг/л). Колбу помещали в шейкер-инкубатор и инкубировали 16 ч при температуре 37°C и 240 об/мин. Клеточную культуру переносили в центрифужный стакан и центрифугировали в течение 10 мин при 5000 g и 4°C. Осадок ресуспендировали в 50 мл PBS и повторно центрифугировали в тех же условиях. Надосадочную жидкость сливали, а клеточный осадок замораживали и хранили при -20°C.

#### Щелочной лизис

Центрифужную пробирку, содержащую замороженный осадок бактерий, оттаивали на льду. К осадку добавляли 10 мл раствора I и тщательно ресуспендировали. Далее, к суспензии добавляли 10 мл раствора II и перемешивали десять раз, переворачивая пробирку, после чего помещали на лед на 5 мин. К лизату добавляли 15 мл раствора III перемешивали десять раз, переворачивая пробирку, после чего помещали на лед на 5 мин. Выпавший осадок отделяли с помощью центрифугирования при 4°C и 15000 g в течение 15 мин. Полученный раствор объемом 35 мл переносили в новую центрифужную пробирку.

#### Связывание пДНК с частицами оксида кремния

К раствору, полученному на предыдущей стадии, добавляли 15 мл 6 M раствора гуанидинхлорида и 0.5 мл суспензии частиц диоксида кремния. Пробирку перемешивали переворачиванием и инкубировали при комнатной температуре 15 мин, периодически перемешивая. Частицы диоксида кремния осаждали центрифугированием 1 мин при 5000 g. Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 10 мл 6 M гуанидинхлорида и центрифугировали 1 мин при 5000 g. Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 25 мл раствора W и центрифугировали 1 мин при 5000 g, после чего повторяли отмывку раствором W. Осадок

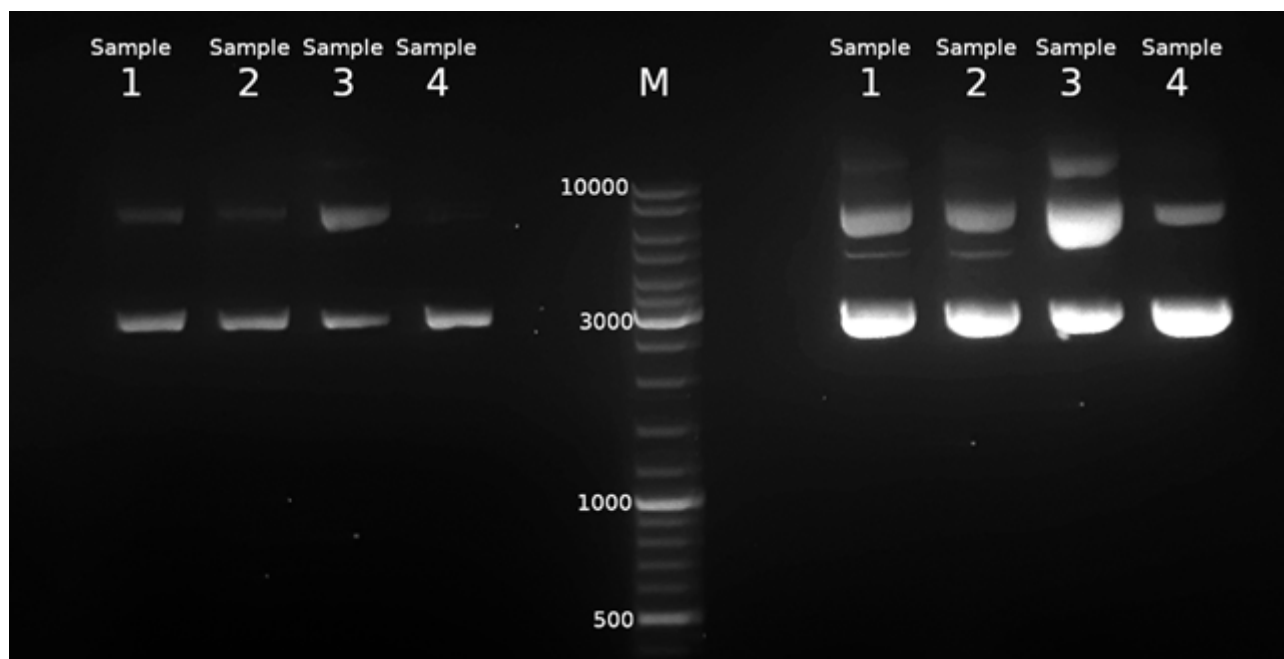
высушивали 10 мин под вакуумом и размешивали в 2 мл раствора E. Суспензию инкубировали 15 мин при 37°C, периодически перемешивая. Частицы диоксида кремния осаждали центрифугированием 5 мин при 5000 g, раствор пДНК переносили в новую пробирку.

#### Гель-фильтрация

Разделение проводили на хроматографической колонке Tricorn 10/100 10x50 мм («Cytiva»), заполненной сорбентом Sephacryl S-500 HR. Колонку уравнивали PBS. К 1 мл раствора пДНК, полученному на предыдущем этапе, добавляли 10 мкл раствора SDS (100 г/л) и наносили на колонку со скоростью потока 1 мл/мин. Контроль разделения осуществляли на основе проточного измерения оптической плотности при 280 нм. пДНК выходила в свободном объеме колонки, в то время как более низкомолекулярные примеси сходили с задержкой. К фракции, содержащей пДНК, добавляли равный объем изопропилового спирта, 1/10 объема раствора III, инкубировали 10 мин при -20°C и центрифугировали при 15000 g в течение 15 мин. Супернатант удаляли, осадок высушивали под вакуумом и растворяли в 0.5 мл воды. Перед повторным использованием колонку промывали 10 мл 0.5 M NaOH и уравнивали PBS.

#### Определение эффективности трансфекции

Эффективность трансфекции определяли по флуоресценции белка eGFP в эукариотических клетках эмбриональной почки человека Expi293F. Для этого использовали транзиентную трансфекцию этих клеток плазмидными конструкциями, описанными выше, с использованием трансфицирующего агента Lipofectamine™ 3000. Накануне трансфекции клетки Expi293F рассевали в 48-луночный планшет из расчета 5x10<sup>4</sup> клеток в лунку в 1 мл среды DMEM, содержащей 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота и гентамицин 10 мкг/мл. Клетки инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в атмосфере 8% CO<sub>2</sub>. На следующий день готовили смеси реагента Lipofectamine™ 3000 со средой OptiMEM из расчета 0.75 мкл реагента на 50 мкл среды. Lipofectamine™ 3000 реагент добавляли непосредственно в среду. Сразу после внесения реагента перемешивали аккуратно полученную суспензию двукратным пипетированием. Затем разводили 1 мкг плазмидной ДНК в 50 мкл среды OptiMEM, перемешивали пипетированием. К раствору ДНК добавляли 1 мкл реагента P3000™, инкубировали раствор 5 мин. К готовому раствору ДНК с реагентом P3000™ по каплям добавляли разведенный реагент Lipofectamine™ 3000. Раствор аккуратно пипетировали два раза для равномерного перемешивания. Инкубировали смесь 10-15 мин при комнатной температуре. После этого по каплям добавляли суспензию комплексов ДНК/ Lipofectamine™ 3000 к клеткам в каждую лунку ранее приготовленного культурального планшета. Аккуратно перемешивали планшет круговыми движениями. Через 48 ч после начала трансфекции отбирали аккуратно культуральную среду, суспендировали клетки в 200 мкл буфера HBSS. Эффективность трансфекции оценивали на проточном цитофлуориметре NovoCyte Flow Cytometer с использованием программного обеспечения The NovoExpress software («ACEA Biosciences»).



**Рисунок 1.** Электрофоретическое разделение пДНК в 1% агарозном геле, окраска бромистым этидием. Sample1, Sample2, Sample3, Sample4 – образцы ДНК 1, 2, 3 и 4 соответственно. М – маркер длины ДНК. Слева от маркера нанесено по 100 нг каждого образца, справа – по 500 нг.

**Таблица 1.** Результаты выделения пДНК. Стадии выделения: ЩЛ — щелочной лизис, силика — связывание с диоксидом кремния, ГФ – гель-фильтрация, ИПС – осаждение изопропанолом, Qiagen kit – набор реактивов Qiagen plasmid maxi kit.  $OP_{260}/OP_{280}$  – отношение оптических плотностей растворов ДНК при длинах волн 260 и 280 нм.

Образец	Стадии выделения	Количество, мкг	$OP_{260}/OP_{280}$
1	ЩЛ+Силика+ГФ	300	1.93
2	ЩЛ+силика	366	1.89
3	ЩЛ+ИПС+ГФ	1005	1.87
4	Qiagen kit	830	1.85

#### Определение концентрации пДНК.

Концентрацию ДНК определяли по оптической плотности при длине волны 260 нм. Измерения проводили с помощью спектрофотометр UV-1900 («Shimadzu», Япония) в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 1 см. При пересчете использовали коэффициент экстинкции  $A_{0,1\%} = 20$ . Раствор пДНК разводили водой в 20 раз, при этом значение  $OP_{260}$  численно равнялось концентрации исходного раствора ДНК в мг/мл. Дополнительно измеряли оптическую плотность при длине волны 280 нм и рассчитывали отношение  $OP_{260}/OP_{280}$  как один из критериев чистоты образца ДНК.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

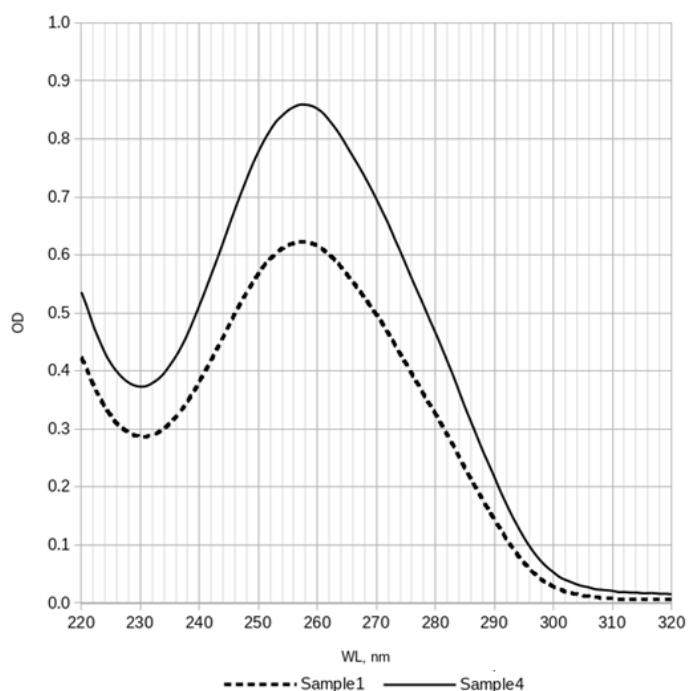
#### Выделение пДНК

Для получения образцов сравнения помимо пДНК, выделенной по полной описанной методике (образец 1), были получены образцы пДНК, выделенные по методике с исключением отдельных стадий. В первом случае после щелочного лизиса и очистки с помощью диоксида кремния, пДНК осаждали изопропанолом и растворяли в воде, а стадию гель-фильтрации не проводили (образец 2). Во втором случае исключали стадию связывания с частицами диоксида кремния (образец 3). Раствор после щелочного

лизиса осаждали изопропиловым спиртом, растворяли в растворе Е и переходили сразу к стадии гель-фильтрации. Для того, чтобы исключить флуктуации при наращивании биомассы бактерий, перед центрифугированием содержимое четырех культуральных колб объединяли, перемешивали, потом снова делили на четыре части, а затем осаждали клетки центрифугированием. Далее из каждой части выделяли пДНК одним описанным выше способом. Кроме того, из одной части проводили выделение пДНК с помощью коммерческого набора Qiagen plasmid maxi kit (образец 4).

В результате во всех случаях была получена плазмидная ДНК, находящаяся преимущественно в сверхспирализованной форме (рис. 1). При этом, наименьшее количество релаксированной формы наблюдается в образце, выделенном набором Qiagen plasmid maxi kit, а наибольшее – в образце 3, полученном без стадии очистки с помощью диоксида кремния.

В количественном отношении наилучший результат был получен в случае образца 3 – 1005 мкг, а наихудший в случае образца 1 – 300 мкг (табл. 1). Можно заключить, что наибольшие потери возникают на стадии очистки с помощью диоксида кремния. Соотношение количества пДНК в образцах 3 и 1 составляет 3.3 раза. В то же время потери при гель-фильтрации не столь велики, соотношение количества пДНК в образцах 2 и 1 составляет 1.2 раза. Соотношение оптической плотности образцов при длинах волн 260 нм и 280 нм для всех четырех образцов хорошее и



**Рисунок 2.** Спектр поглощения образцов пДНК в ультрафиолетовой области. По вертикальной оси отложены значения оптической плотности, по горизонтальной — длина волны в нм. Измерения проводили для образцов пДНК, разбавленных водой в 20 раз, в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 1 см на спектрофотометре UV-1900.

составляет более, чем 1.8 раза (табл. 1). Спектр поглощения в ультрафиолетовой области имеет характерный для ДНК вид с максимумом при 260 нм (рис. 2).

### Эффективность трансфекции

Эффективность трансфекции оценивали с использованием проточного цитофлуориметра, подсчитывая количество клеток, в которых наблюдалась флуоресценция зеленого флуоресцентного белка (eGFP). Результаты представлены в таблице 2. Во всех опытных образцах количество трансфицированных клеток составляло около 95%, различия между образцами статистически незначимы. Таким образом, плазмидная ДНК, выделенная по описанной методике, трансфицирует клетки эмбриональной почки человека линии Hcr1293F столь же эффективно, как и пДНК, выделенная с помощью специализированного набора реагентов фирмы «Qiagen». Предложенная методика примерно вдвое более затратна по времени, но требует для выполнения только самых простых и дешевых реактивов.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложена лабораторная методика выделения плазмид из клеток *E. coli* для последующей трансфекции линии клеток человека. Методика не требует дорогостоящих реактивов и легко масштабируется.

**Таблица 2.** Сравнение эффективности трансфекции клеток Hcr1293F образцами плазмид, выделенных различными способами.

Образец	Эффективность трансфекции, %
1	94.8±0.7
2	93.4±1.2
3	94.5±1.1
4	96.1±0.4
Контроль	0.2±0.1

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания ФМБА России по теме «Разработка комплексной схемы терапии лекарственно-устойчивых возбудителей инфекционных заболеваний с применением бактериофагов или их производных в сочетании с антибактериальными препаратами».

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ЛИТЕРАТУРА

- Kim T.K., Eberwine J.H. (2010) Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **397**(8), 3173-3178. DOI: 10.1007/s00216-010-3821-6
- Fus-Kujawa A., Prus P., Bajdak-Rusinek K., Teper P., Gawron K., Kowalczyk A., Sieron A.L. (2021) An Overview of Methods and Tools for Transfection of Eukaryotic Cells *in vitro*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, **9**, 701031. DOI: 10.3389/fbioe.2021.701031
- Butash K.A., Natarajan P., Young A., Fox D.K. (2000) Reexamination of the effect of endotoxin on cell proliferation and transfection efficiency. *Biotechniques*, **29**(3), 610-614. DOI: 10.2144/00293rr04
- Remaut K., Sanders N.N., Fayazpour F., Demeester J., De Smedt S.C. (2006) Influence of plasmid DNA topology on the transfection properties of DOTAP/DOPE lipoplexes. *Journal of Controlled Release*. **115**(3), 335-343. DOI: 10.1016/j.jconrel.2006.08.009
- Birboim H.C., Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, **7**(6), 1513-1523. DOI: 10.1093/nar/7.6.1513
- Figueroa-Bossi N., Balbontin R., Bossi L. (2022) Preparing Plasmid DNA from Bacteria. *Cold Spring Harbor protocols*, Aug 5, online ahead of print. DOI: 10.1101/pdb.prot107852
- Rinaldi M., Fioretti D., Iurescia S. (2014) A Blueprint for DNA Vaccine Design. In *DNA Vaccines* (Vol. 1143), Springer, New York, pp. 3-10. DOI: 10.1007/978-1-4939-0410-5

Поступила: 11.06.2022  
 После доработки: 21.07.2022  
 Принята к публикации: 05.08.2022

## A SIMPLE TECHNIQUE FOR ISOLATING PLASMIDS FROM *ESCHERICHIA COLI* FOR EFFICIENT CHEMICAL TRANSFECTION OF HUMAN CELL CULTURE

*V.A. Manuvera, E.N. Grafskaya, V.N. Lazarev\**

Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency,  
1a Malaya Pirogovskaya str., Moscow, 119435 Russia; \*e-mail: lazarev@rcpcm.org

Currently, a large number of reagent kits are commercially available for the isolation of highly purified plasmid DNA for subsequent transfection of human cell lines. However, due to high cost and logistical problems, it may be necessary to isolate plasmid DNA using only the simplest reagents and materials. We present one of the possible methods for such DNA isolation, suitable for routine laboratory use. It is based on well-known principles and methods for plasmid DNA purification, has minimal cost, does not require special skills, and is easily scalable. The technique includes the steps of alkaline lysis, purification with silica particles and gel filtration. It was shown that plasmids isolated using the proposed method transfect human embryonic kidney Expi293F cells no less efficiently than plasmids purified using a specialized Qiagen plasmid maxi kit («Qiagen», USA).

**Key words:** bacterial plasmids; transfection; human cell line

### FUNDING

This research was supported by the State Assignment on the Development of a complex therapy scheme for drug-resistant pathogens of infectious diseases using bacteriophages or their derivatives in combination with antibacterial drugs (Code: Bacteriophage-2) (Russia).

Received: 11.06.2022, revised: 21.07.2022, accepted: 05.08.2022