

Подбор оптимальных условий электропорации мезенхимных стволовых клеток костного мозга крупного рогатого скота и кролика

Научный руководитель – Чивилев Игорь Викторович

Кашапова Ирина Сергеевна

Выпускник (специалист)

Российский государственный аграрный университет МСХА имени К.А. Тимирязева,
Зоотехнии и биологии, Разведения и племенного дела, Москва, Россия

E-mail: i-kashapova@rambler.ru

Подбор оптимальных условий электропорации мезенхимных стволовых клеток костного мозга крупного рогатого скота и кролика

Кашапова Ирина Сергеевна

Младший научный сотрудник отдела клеточных биотехнологий

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий, Москва, Россия

e-mail: <mailto:i-kashapova@rambler.ru>

Создание генетически модифицированных клонов - популярный метод снижения гетерогенности и геномной нестабильности мезенхимных стволовых клеток костного мозга (МСК КМ) [Bianco et al. 2001:180–192; Лебедев 2010: 5-13; Lu et al., 2013:249-261].

Целью настоящего исследования был подбор оптимальных условий трансфекции МСК КМ крупного рогатого скота (КРС) и кролика (К) методом электропорации для последующего создания генетически модифицированных клональных линий. Для этого были использованы плазмиды, содержащие геном улучшенного зеленого флуоресцирующего белка рEGFP-N1, по литературным данным не оказывающего видимого влияния на функциональность клетки [Ludin, Matus 1998:72-77; Drummen 2012:14067-14090], поскольку по флуоресценции GFP можно судить о состоянии клеток и внутриклеточных структур [Tsien 2005: 509–544; Schepartz; Gonzalez 2011: 749–751; Drummen 2012:14067-14090; Persson et al. 2013:737–744]

Исследовались следующие режимы электропорации для обоих типов клеток: первоначальная концентрация трансфицируемых клеток составила 10000 (6000 кл/мл) и 50000 (30000 кл/мл) на 100 мкл среды DMEM (ПанЭко, Россия) с содержанием 10% и 20% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) (HyClone, США) или регуляторных факторов роста LIF (Sigma, США) и FGF (Sigma, США) отдельно и совместно из расчета 1нг/1мл среды; напряжение 200-500V с шагом 50V, длина волны 15 мксек, количество импульсов 1, 2 и 3; концентрация плазмидной ДНК составила 1, 2, 3 и 5 мкг/100мкл среды. Эффективность трансфекции оценивали по количеству клеток, несущих витальную флуоресцентную метку EGFP, через 48 часов культивирования в нормальных условиях. Для возбуждения флуоресценции использовали инвертированный микроскоп (Nikon, Eclipse Ti-U, Япония).

Из полученных результатов следует, что воздействие 1-3 импульсов напряжением 200-250V ни при каких условиях не дает трансфицированных МСК, при 500V выживших клеток не наблюдается. Максимальная эффективность электропорации МСК КМ КРС была достигнута использованием первоначальной концентрации трансфицируемых клеток, равной 50000/100мкл среды с содержанием 10% FBS, применением 3 импульсов напряжением 300V и 350V и добавлением 2мкгДНК/100мкл, и составила 0,7% модифицированных МСК от общего количества клеток. В случае МСК КМ К наилучший результат трансфекции был получен также при начальной концентрации клеток 50000/100мкл среды с 10% FBS и применении 3 импульсов, но напряжением 400V и добавлением 1 мкг ДНК на

100 мкл среды и равнялась 1,8% флуоресцирующих клеток, в то время, как при воздействии напряжения той же величины на клетки КРС снижалась не только эффективность трансфекции, но общее количество выживших клеток.

При добавлении в среду 20%FBS, LIF, FGF, LIF+FGF процент трансфицированных клеток обоих типов практически не различался и был ниже, чем при добавлении 10% FBS. Следует отметить, что эффективность трансфекции МСК КМ снижалась с увеличением концентрации плазмидной ДНК более 1мкг/100мкл среды в случае использования клеток кролика и 2мкг/100мкл - КРС, что может свидетельствовать о ее губительном влиянии на данный тип клеток. Этот вопрос требует дальнейшего изучения. В ходе эксперимента установлено, что МСК КМ К более устойчивы к высокому напряжению, чем МСК КМ КРС, тем временем, как клетки крупного рогатого скота более устойчивы к негативному воздействию GFP.