**Tipy a triky pro úspěšnou transfekci pomocí nevirových chemických metod transfekce**

Nevirové metody transfekce lze seskupit na fyzikální a chemické metody. Metody chemické transfekce jsou založeny na elektrostatické vazbě nukleových kyselin s nosnými konstrukty za vzniku lipoplexů nebo polyplexů, v závislosti na tom, zda pocházejí z pozitivně nabitých lipozomů/lipidů nebo polymerů.

Všechny metody chemické transfekce vykazují podobné silné a slabé stránky, protože se řídí podobným mechanismem. Vědět to může pomoci vyhnout se chybám a zlepšit výsledky.

**Čistota nukleových kyselin**

V zásadě je třeba vzít v úvahu vysokou kvalitu použitých nukleových kyselin. Pokud se při transfekci použijí syntetické konstrukty – jako je tomu například u siRNA – kvalita nabízená většinou výrobců je obecně dostatečná.

Pokud se však k syntéze konstruktů použijí bezbuněčné biologické systémy, buněčné kultury nebo bakterie, je třeba tomuto tématu věnovat více pozornosti.

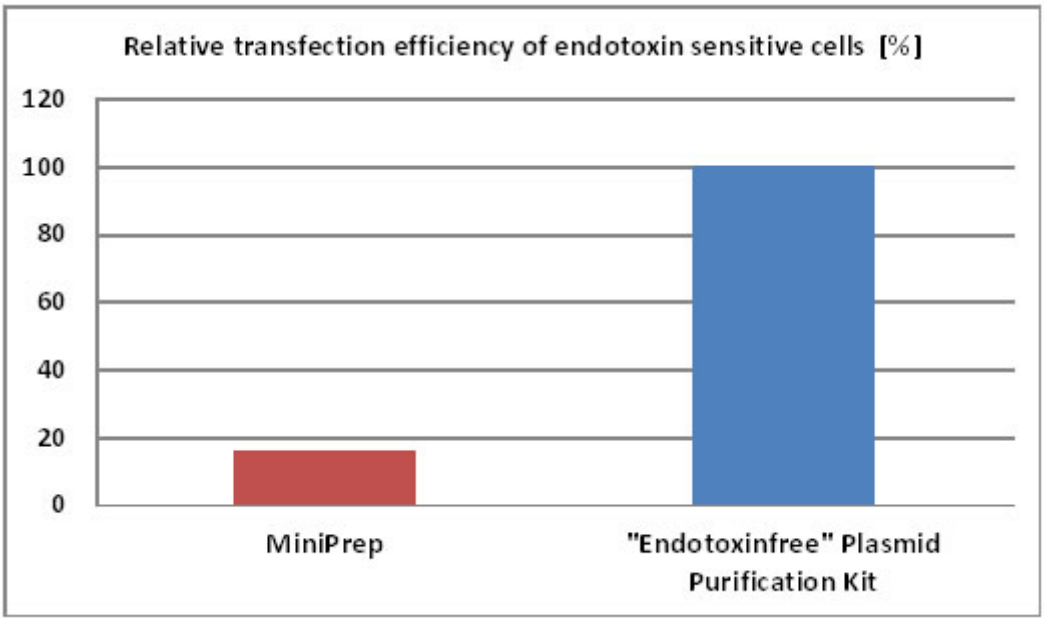
Na jedné straně je třeba dbát na to, aby se zabránilo nečistotám s necílovými nukleovými kyselinami, které mohou snížit požadovaný výsledek nebo narušit efekty „mimo cíl“.

Zejména by však měla být středem pozornosti kontaminace. To lze detekovat vrozeným imunitním systémem buněk – jako je tomu například v případě plazmidů produkovaných v kmenech E.coli.

Pokud takové plazmidy neobsahují lipopolysacharidy nebo endotoxiny, účinnost transfekce může být značně snížena.

Vrozený imunitní systém mnoha typů buněk je schopen detekovat takové endotoxiny prostřednictvím Toll-like receptoru 4. Obranný stav nastává jako reakce, což ztěžuje transfekci.

Purifikace plazmidů metodou "miniprep" neodstraňuje dostatečně endotoxiny. Při použití čisticích souprav je třeba dbát na to, aby splňovaly kvalitativní požadavek „bez endotoxinů“.



**Zdraví buněk**

Aby byla transfekce úspěšná, musí být buňky zdravé. Zatímco bakteriální kontaminace může rychle vést ke ztrátě kultur, nečistoty na bázi plísní, a zejména mykoplazmata, často nejsou rozpoznány a zůstávají latentně přítomny v kultuře živých buněk.

Nicméně použití antibiotických činidel, jako je penicilin / streptomycin k prevenci bakteriální kontaminace, podporuje možnost kontaminace mikroorganismy, které tato antibiotika nezabíjejí, jako jsou houby a mykoplazmata.

Tento důvod je následující. Podle našich zkušeností jsou produkty pro buněčné kultury, které byly dříve podezřelé z toho, že jsou vstupní branou pro výskyt mykoplazmat nebo jiných kontaminantů – jmenovitě sérum a trypsin – nyní bezpečné, pokud jsou získávány od kvalitních výrobců.

Hlavními zdroji kontaminace zůstávají lidské zdroje a křížová kontaminace. Protože je vyloučena selektivní kontaminace mykoplazmaty nebo houbami, nejlepší ochranou je kultivace buněk bez antibiotik.

Pro zkušený personál to není problém. Pokud však dojde ke kontaminaci, okamžitě to povede k viditelnému růstu bakterií a tím také ke ztrátě kultury.

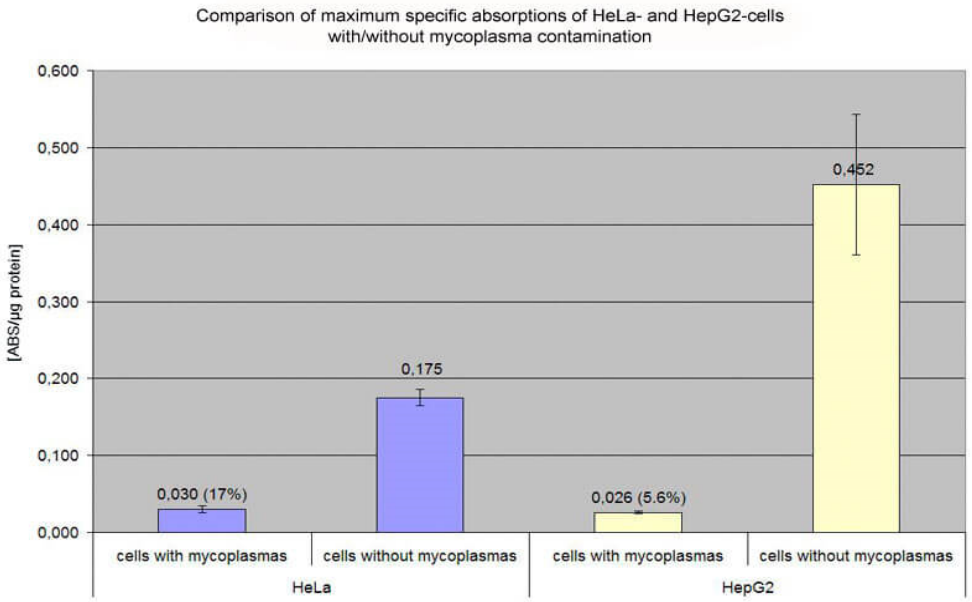
Protože většina buněčných kultur je snadno vyměnitelná, není to velký problém. Používání antibiotik také snižuje riziko křížové kontaminace.

Riziko křížové kontaminace lze dále snížit přijetím různých dalších opatření. Zmrazené buňky mohou být například skladovány v plynné fázi nad kapalným dusíkem v kryogenních nádobách namísto v samotném kapalném dusíku. Prostorové a časové oddělení práce buněčné kultury od různých kultur dále snižuje riziko. Nicméně monitorování buněk, zejména s ohledem na mykoplazmata, by nemělo být opomenuto. Podle našeho názoru nejsou metody barvení v tomto případě dostatečně spolehlivé. Detekční soupravy založené na PCR (např. MycoSPY® nebo MycoSPY® Master Mix) jsou poněkud složitější, ale extrémně spolehlivé.

**Mykoplazmata**

Mykoplazmata jsou vážným problémem ve výzkumu buněčné biologie. Jsou extrémně rozšířené a často nejsou odhaleny.

Mykoplazmata jsou bakterie, které nejsou zabity běžnými antibiotiky, jako je penicilin nebo streptomycin, a nejsou viditelné pod mikroskopem. Mykoplazmata jsou detekována buňkou prostřednictvím vrozeného imunitního systému. Výsledkem je, že buňky zaujímají obranný stav, který ztěžuje transfekci. Buňky také proliferují pomaleji než obvykle, což je další inhibitor úspěšné transfekce. Celkově mohou mykoplazmata způsobit snížení transfekovatelnosti buněk až o 95 %.




Nedoporučujeme obecné profylaktické použití antibiotik namířených proti mykoplazmatům, protože by to podpořilo tvorbu rezistentních kmenů mykoplazmat. Pokud je personál hlavním zdrojem kontaminace bakteriemi a mykoplazmaty, antibiotika by nejprve zničila všechny mikroorganismy. Pokud by se vyvinula rezistence vůči bakteriím, bakterie by poměrně rychle překonaly buněčnou kulturu a tím by kontaminovaly. Jinak tomu není při tvorbě rezistentních mykoplazmat, které by buněčnou kulturu nepřemnožily. Pro ošetření buněčné kultury kontaminované mykoplazmaty nabízíme **MycoRAZOR®.**

**Proliferace buněk při transfekci plazmidu**

Na rozdíl od transfekce RNA, která je nezávislá na buněčném dělení a proliferaci, protože místem účinku je cytosol, musí protein kódující DNA vstoupit do buněčného jádra, aby nabyl účinku. Protože dosud nebyla zavedena žádná úspěšná metoda pro aktivní transport plazmidů do buněčného jádra, spoléhají plazmidy na dělení buněk, aby vstoupily do jádra. Tento jev se také nazývá „jaderná bariéra“. Pomalu nebo nedělící se buňky (např. neurony) jsou odpovídajícím způsobem obtížně transfekovatelné. Pokud se buňka nedělí, přístup plazmidů do buněčného jádra je z velké části blokován. Existují však náznaky, že plazmidy s odpovídajícími sekvencemi mohou být transportovány do buněčného jádra prostřednictvím mechanismu transkripčních faktorů "zavazadel".

Pro dosažení optimálních výsledků s ohledem na výtěžek bílkovin, např. pro tvorbu virů, protilátek nebo jiných proteinů musí být v době lipoplexování zajištěna co největší buněčná proliferace.

Pokud je znám tento vztah mezi proliferací a úspěchem při transfekci plazmidy, lze účinnost transfekce zvýšit.

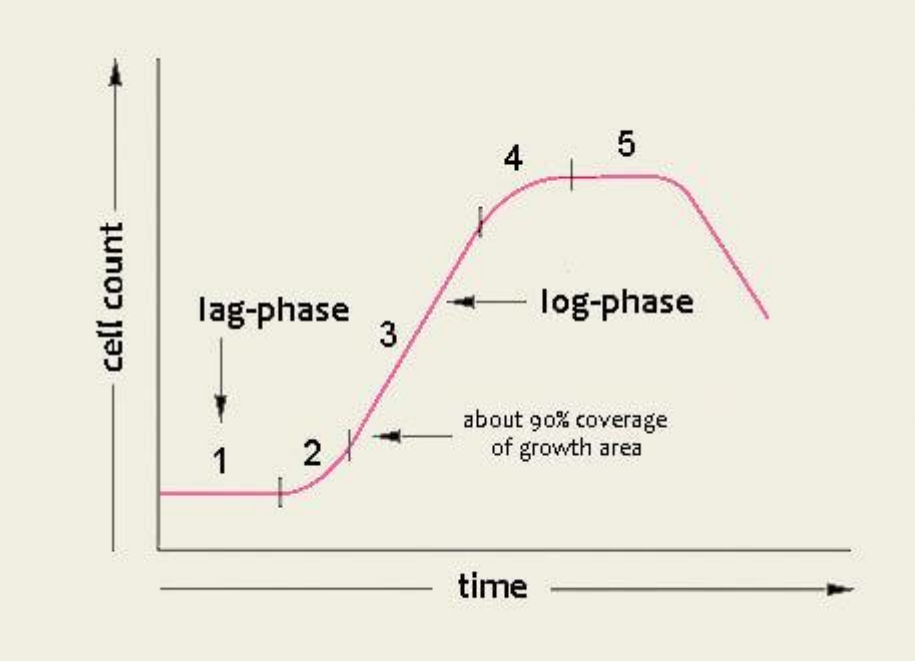
**Médium a sérum**

V první řadě je třeba dbát na správný výběr média. Literatura často navrhuje médium pro buněčný typ, které nepodporuje proliferaci buněk optimálním způsobem. Někdy lze nalézt alternativní média (často s vyšší koncentrací glukózy), která poskytují lepší proliferaci.

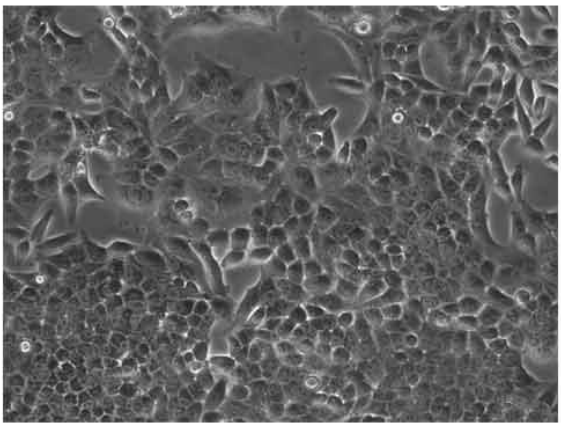
Na rychlost proliferace může mít vliv i kvalita séra. Opět by mělo být zajištěno, že sérum splňuje požadavky na kvalitu.

**Počet nasazených buněk**

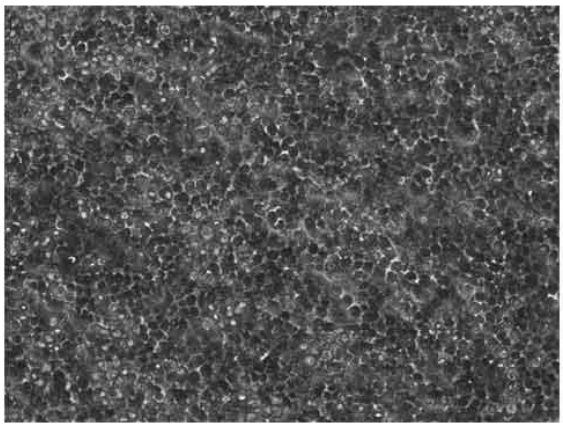
V ideálním případě buňky stejného typu sledují stejnou růstovou křivku. Ta se dělí na fázi zpoždění s nízkou proliferací (také známou jako „fáze latence“) a logaritmickou fázi s logaritmickým růstem. Jak je vysvětleno výše, je výhodné přidat lipoplexy na začátku log fáze.




Na rozdíl od rozšířeného názoru začíná log fáze, když buňky pokrývají téměř celý povrch růstu. Je to proto, že koncept "konfluence", ve kterém buňky přestanou růst kvůli kontaktní inhibici, vede k předpokladu, že buňky, které jsou v kontaktu, zastaví růst. Podmínky v praxi jsou však jiné, jak je vidět na následujících obrázcích.



*HeLa cells almost at the beginning of the logphase*

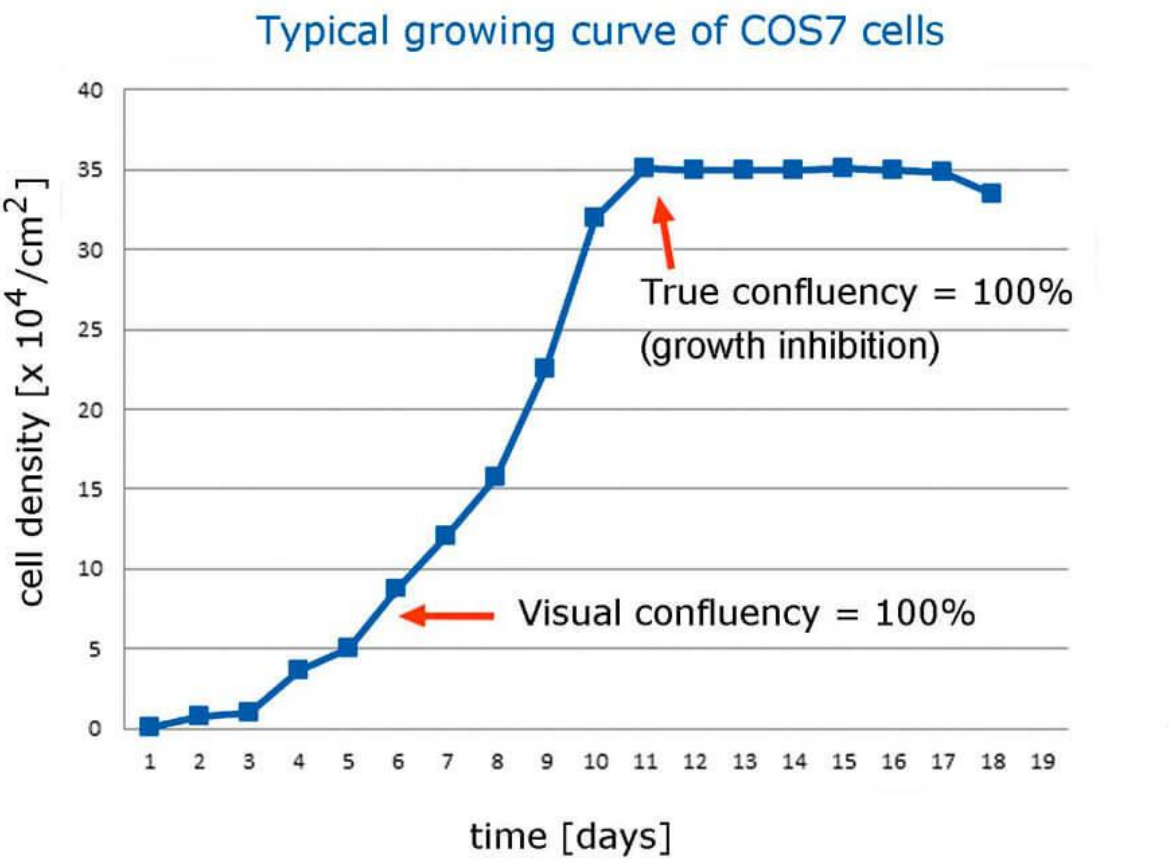


*Nearly confluent HeLa cells*

Cílem by tedy mělo být naočkování tolika buněk, kolik je nutné k dosažení log fáze v okamžiku, kdy je přidán lipoplex/polyplex. To má za následek nejvyšší míru transfekovaných buněk a nejvyšší výtěžek proteinu. Protože však uplyne přibližně 48 hodin, než dojde k maximální expresi proteinů, výsledkem je relativně hustě rostoucí buněčná kultura.

Bohužel, mnoho buněk se také odchyluje od tohoto růstového chování. Mohou se rychleji množit, zpomalovat nebo vykazovat růstovou křivku s jiným průběhem.

Přestože vytvoření růstové křivky pro vaše vlastní buňky vyžaduje určité úsilí, může se vám to vyplatit, pokud chcete dosáhnout optimálních výsledků transfekce.




Je-li cílem maximální účinnost transfekce a je vybrán odpovídající vysoký počet buněk, může se stát – zejména u rychle proliferujících adherentních buněk –, že kultura vstoupí do oblasti „nadměrně splývající“, ve které se některé buňky oddělí a apoptotické. . Buňky jsou samozřejmě také stresovány transfekcí vysokými hladinami nukleové kyseliny nezbytnými pro maximální účinnost transfekce.

Zdá se tedy, že transfekované buňky se oddělují spíše než netransfekované. Transfekce plasmidy kódujícími GFP často umožňuje, aby byly tyto buňky mikroskopicky detekovány v buněčném supernatantu.

Tyto buňky již většinou nejsou vitální, ale mohou přispívat k výtěžku proteinů nebo virů. Pokud se kultury před sklizní nebo testem opláchnou, získají se pouze dílčí výsledky.

S ohledem na mikroskopické nebo různé jiné studie buněčné biologie není hustá stresovaná kultura po transfekci často žádoucím výsledkem. V době měření transfekce je cílem dosáhnout relativně volného růstu na růstovém povrchu s co nejvyšší vitalitou buněk.

Toho lze dosáhnout naočkováním buněk odpovídajícím menším počtem buněk na začátku transfekce a poté optimalizací množství nukleové kyseliny a poměru množství nukleové kyseliny/činidla.

Očekává se však, že míra transfekce zde bude výrazně nižší kvůli nižší proliferaci. Alternativně lze samozřejmě hustou transfekovanou kulturu také "naředit" subkultivací.

Pokud máte co do činění s buňkami, které se dělí pomalu nebo vůbec, může být vhodné zvážit transfekci mRNA. In vitro transkripční systémy, které lze použít k přípravě odpovídající RNA, jsou komerčně dostupné.

**Parametr optimalizace: Poměr nukleová kyselina/činidlo a množství lipoplex/polyplex**

Množství lipoplexů/polyplexů musí být přizpůsobeno počtu nasazených buněk. Typ buňky určuje hladinu nukleové kyseliny, která je tolerována. Příliš vysoká množství lipoplexu/polyplexu vedou k toxickým nebo apoptotickým účinkům, zatímco příliš nízká množství vedou k nižší účinnosti transfekce. Ve skutečnosti je to obvykle nukleová kyselina uvolněná v buňce, která má negativní vliv na vitalitu buněk spíše než transfekční činidlo.

Lipoplexy/polyplexy mohou být připraveny s různým množstvím nukleové kyseliny a transfekčního činidla. Rozhodujícím faktorem pro transfekční aktivitu je, že výsledný komplex má čistý kladný náboj. Komplexy s různým složením však vykazují různou účinnost transfekce v závislosti na použitém typu buňky. Proto je nutné provést optimalizační postup pro každý jednotlivý typ buněk pro použití se specifickým transfekčním činidlem. Výrobci zpravidla doporučují rozumné optimalizační parametry.

Optimalizace poměru nukleová kyselina/činidlo a optimální množství lipoplex/polyplex nebo optimální množství nukleové kyseliny pro dříve stanovený počet buněk se obvykle provádí současně, protože tyto parametry nejsou na sobě zcela nezávislé. Příručky výrobců často obsahují informace o množství nukleových kyselin pro různé nádoby pro kultivaci buněk. Kromě toho jsou obvykle uvedeny rozsahy pro poměry nukleová kyselina/reagent. Uvedená rozmezí je třeba chápat jako empiricky stanovené parametry, ve kterých jsou pravděpodobné optimální výsledky. Je důležité mít na paměti, že rozsahy pro množství nukleových kyselin se vztahují k buněčným hustotám, které umožňují maximální účinnost transfekce. Pokud jsou požadovány nižší hustoty buněk, musí být tyto aspekty přizpůsobeny.

Lze předpokládat, že stabilita lipoplexů je upravena v poměru nukleová kyselina/činidlo. Čím více činidla (lipidu) je použito, tím je lipoplex stabilnější. Musí být zřejmé, že lipoplexy nebo nukleové kyseliny jsou degradovány buňkami, např. nukleázami umístěnými v cytosolu, a proto mají omezenou životnost.

**Různé scénáře ovlivňují stabilitu lipoplexů různými způsoby:**

Pokud je místem působení nukleové kyseliny cytosol (siRNA / mRNA), výsledky budou těžit z rychle dosažené vysoké koncentrace nukleové kyseliny v cytosolu. V souladu s tím by měl být lipoplex kladně nabitý, aby umožnil endocytózu, ale jinak by měl být méně stabilní, aby umožnil rychlé uvolnění nukleové kyseliny do cytosolu.

Pokud je místem působení nukleové kyseliny buněčné jádro (plazmidy), mohou být poměry různé. Buňkám, které se štěpí pomalu, prospívá například, když je lipoplex stabilnější, takže lipoplex nebo volná nukleová kyselina je stále přítomna v pozdějších buněčných děleních.

Poznámka: Protože rychlost proliferace v kultuře také závisí na tom, kolik buněk bylo nasazeno před transfekcí, optimální množství nukleové kyseliny a poměr nukleová kyselina: činidlo se může změnit, pokud se změní počet nasazených buněk!

Optimální doba měření

V závislosti na typu buňky, reportéru nebo experimentu se může časové rozpětí pro optimální výsledek mezi transfekcí a měřením lišit. Reportér GFP a luciferáza mají mírně odlišné poločasy. Optimální doba, tj. maximální exprese proteinu, je zde obecně stále přibližně 36 až 48 hodin po transfekci plasmidu. Při použití mRNA je tato doba výrazně kratší (asi 16-24 hodin). Vhodné časové úseky pro knockdown detekci pomocí siRNA závisí na metodě analýzy: kvantifikace mRNA (RT-qPCR) nebo kvantifikace proteinu. Když je analýza prováděna na hladinách proteinu, poločas rozpadu proteinu je hlavním faktorem.

**Konstrukce úspěšného transfekčního experimentu**

Úspěšný transfekční experiment je tedy konstruován následovně:

- Zajistěte kvalitu nukleové kyseliny
- Zajistěte zdraví buněk
- Pro transfekci plazmidu optimalizujte buněčnou proliferaci
- Zadejte počet buněk, které mají být nasazeny (v závislosti na cíli experimentu)
- Optimalizujte současně množství nukleové kyseliny a poměr nukleová kyselina/reagent
- Vyhodnoťte experiment v optimální době měření

Přilnavost k plastovým povrchům a stárnutí lipoplexů

V zásadě mají nabité molekuly, jako jsou nukleové kyseliny a kationtové lipidy nebo polymery, tendenci přilnout ke skleněným a plastovým povrchům. Zatímco ztráta hmoty z toho vyplývající je zanedbatelná v případě vysoce koncentrovaných roztoků, podmínky pro zředěné roztoky používané pro tvorbu lipoplexu jsou odlišné. Podle našich zkušeností je tento efekt nevyhnutelný. Polypropylen je stále nejlepším z dostupných materiálů pro tvorbu lipoplexních nádob (před polystyrenem a sklem). Proto je třeba dbát na to, aby naředěné roztoky zůstaly v nádobách co nejkratší dobu.

Lipoplexy mají také tendenci ulpívat na plastových površích a navíc „stárnout“. To znamená, že lipopolexe se shlukují do větších celků, které nemohou být absorbovány buňkami v endocytóze, což snižuje jejich schopnost transfekce. Po vytvoření lipoplexu byste tedy měli pokračovat v práci co nejrychleji.

**Up & downscaling**

Vzhledem k tendenci lipoplexů přilnout k plastovým povrchům nelze transfekční experimenty jednoduše přenést do různě velkých kultivačních nádob na základě proporcionality růstových povrchů. U 96jamkové destičky je volný plastový povrch válcových bočních stěn výrazně větší ve vztahu k růstové ploše než u 6jamkové destičky. To znamená, že na bočních stěnách 96jamkové destičky se ztrácí mnohem více lipoplexu než na 6jamkové destičce. Většina výrobců transfekčních činidel proto doporučuje množství uvedená v návodu pro zvýšení a snížení. Protože náboj lipoplexů a tím i jejich adhezní chování závisí na složení, mohou být tyto údaje pouze přibližné. Nejlepší strategií je při změně formátu znovu optimalizovat experiment s transfekcí.

**Stabilní transfekce**

Pro stabilní buněčnou transfekci musí být pomocí selekčního antibiotika vybráno několik buněk, které náhodně integrovaly plazmidovou DNA do svého genomu. Za tímto účelem musí plazmid nést odpovídající rezistenci vůči antibiotiku. Pravděpodobnost náhodné integrace může být zvýšena linearizací plazmidu. Během selekce je nejlepší strategií pomalu zvyšovat selekční tlak.

**Vrozený imunitní systém**

Vrozený imunitní systém hraje důležitou roli v procesech transfekce. Buňky dokážou v podstatě detekovat všechny současné nukleové kyseliny a rozlišovat mezi „cizí“ a „vlastní“ pomocí endozomálních receptorů (např. toll-like receptorů) a také cytosolických receptorů. Pokud je detekována cizí nukleová kyselina, buňka využívá signální transdukční kaskády ke konverzi proteinové exprese a vytvoření obrany. Kromě toho se uvolňují mediátorové látky - zejména interferon-β, takže buňky, které nejsou v přímém kontaktu s nukleovou kyselinou, vytvářejí obranu.

Exprese vrozeného imunitního systému se však liší typ od typu buňky. Kromě rozdílů v proliferaci může být prokázána odlišná transfekovatelnost různých typů buněk.

Konkrétně suspenzní buňky a primární buňky se obtížněji transfekují než adherentní buněčné linie.

Protože suspenzní buňky pocházejí z imunitních buněk, pokud byly neadherentní buňky adaptovány na suspenzní podmínky, jsou tyto buňky logicky charakterizovány výrazným imunitním systémem.

V důsledku odpovídajícího selekčního tlaku jsou primární buňky také vybaveny lepším vrozeným imunitním systémem než buněčné linie, které již nejsou vystaveny tomuto selekčnímu tlaku v buněčné kultuře. Jako dobrý příklad buňky HEK293 nevykazovaly žádné detekovatelné receptory pro detekci nukleových kyselin a jsou považovány za snadno transfekovatelné buňky. Role vrozeného imunitního systému pro transfekci syntetickými nosnými systémy nás vedla k vývoji transfekčního systému K2® a později k transfekčnímu systému K4®.

**Postup zmrazení/rozmrazení**

Dlouhodobé skladování lipozomových roztoků při 4 °C nebo RT může vést ke koagulaci liposomů. Distribuce velikosti lipozomů je tak posunuta směrem k větším lipozomům, což může zhoršit účinnost transfekce. Jak je popsáno v příručce pro řadu METAFECTENE (METAFECTENE®, METAFECTENE® PRO, METAFECTENE® SI) a K2® Transfection Reagent/K4® Transfection Reagent, takové lipozomové

roztoky lze obnovit cyklem zmrazování/rozmrazování. Za tímto účelem musí být činidlo zmraženo přes noc při -20 °C a následně rozmraženo a znovu skladováno při 4 °C. Cyklus zmrazování/rozmrazování nepoškozuje molekuly činidla a lze jej opakovat libovolněkrát. Tento postup doporučujeme před prvním použitím a následně každé 4 týdny.

**Okrajové efekty**

U vícejamkových destiček jsou za přesně stejných podmínek často pozorovány horší přechodné výsledky na okrajích destiček než uprostřed. Je to proto, že vnější studny jsou více ovlivněny účinky odpařování než vnitřní studny. V důsledku toho se soli koncentrují v médiu a mění se osmolalita. Buňky netrpí a nemnoží se tak efektivně. V důsledku toho však účinnost transfekce v těchto jamkách klesá. Pravidelné sledování hladiny vody (kvůli vlhkosti) v inkubátoru může obvykle problém vyřešit. Navíc v případě pochybností je lepší pracovat s více médiem než méně.

**Mikroskop-FACS-GFP**

Jedním z nejčastěji používaných reportérů je „zelený fluorescenční protein“ neboli GFP. Pokud je buňka transfekována odpovídajícím plazmidem kódujícím GFP, GFP je produkován v cytosolu buňky. To umožňuje identifikovat transfekované buňky pomocí fluorescenčního mikroskopu nebo FACS. Výsledky těchto analýz však závisí na různých faktorech.

**wtGFP, eGFP a TurboGFP**

GFP „divokého typu“ se nyní téměř nepoužívá, protože výrazně silněji emitující GFP je k dispozici ve formě „vylepšeného“ GFP. GFP byl původně odvozen z druhu medúzy (Aequorea victoria). Náhrada několika aminokyselin v chromoforu významně zvýšila jeho emisi. Tento eGFP byl tak úspěšný, že téměř úplně vytlačil GFP „divokého typu“. Nyní však existuje mnoho eGFP, z nichž některé proteiny jsou také odvozeny od jiných organismů, např. pancella (Pontellina plumata), které vykazují různou emisivitu. Copepod varianty jsou často označovány jako copGFP nebo TurboGFP, ale často jsou deklarovány pouze jako eGFP. Vzhledem k jejich vysoké svítivosti doporučujeme tuto variantu, protože jsou nejcitlivějším způsobem detekce transfekce pomocí GFP. Na základě těchto různých citlivostí se naměřené rychlosti transfekce výrazně liší v závislosti na variantě GFP. Také srovnání různých výsledků musí být aplikováno opatrně tam, kde jsou zapojeny různé promotory.

To platí v širokém smyslu i pro metodu měření. Zatímco FACS citlivě detekuje každou buňku s fluorescencí vyšší než samofluorescence, citlivost fotočipu nebo lidského oka je klíčová při mikroskopickém počítání. Odpovídajícím způsobem bude nejvyšší účinnost transfekce stanovena pomocí FACS, zatímco nejnižší bude zjištěna počítáním pomocí mikroskopu bez digitální podpory.

Je tedy možné, že zdánlivě velmi odlišné výsledky jsou ve skutečnosti relativně podobné. Naopak, zdánlivě srovnatelné výsledky generované stejným plazmidem mohou být skutečně velmi odlišné, zejména při práci s mikroskopem a fotoaparátem s expozičním časem nastaveným na „automatickou“ nebo „automatickou expozici“ pomocí softwaru. Zde mohou být vyrovnány relativně odlišné výsledky, protože se fotografují slabě emitující kultury s vysokou dobou expozice a silně emitující kultury s nízkou dobou expozice.

**Speciální případ: Závěsné články**

Adherentní buňky jsou uloženy v extracelulární matrici vytvořené samotnými buňkami. Tato matrice je trvale tvořena a degradována procesy endo- a exocytózy. Předpokládá se, že většina lipoplexů/polyplexů se váže na negativně nabité složky těchto extracelulárních matric a nakonec vstupuje do buněk endocytózou.

Klasické suspenzní buňky nemají extracelulární matrix (to neplatí pro buňky adaptované na suspenzní podmínky). V důsledku toho je příjem lipoplexů/polyplexů nízký; tomu lze čelit drasticky zvýšeným množstvím lipoplexů. Kromě toho mohou doplňky média jako transferin a inzulín, které jsou internalizovány v lipoplexech/polyplexech, pokud jsou přítomny během tvorby, zvýšit rychlost vychytávání pomocí receptorem zprostředkované endocytózy, protože každá buňka má receptory pro tyto molekuly.

**Srovnání experimentů**

Rozdílné výsledky testů z přesně stejných testovacích parametrů nejsou neobvyklé. Výsledky transfekčních experimentů vykazují značný rozsah fluktuace.

To je v podstatě způsobeno tím, že fyziologický stav buněk není nikdy stejný. Pokud jsou buňky trypsinizovány a vysévány pro přípravu transfekčního experimentu, podstupují určitou úroveň stresu, která může být v jiném procesu sklizně odlišná.

Kromě toho jsou určení počtu buněk spojena s vysokou úrovní chyb, která může způsobit posun dosažení log fáze o kritické hodiny; to může mít zásadní vliv na výsledky transfekce při práci s plazmidy.

Obecně jsou výsledky testů srovnatelné, když byly experimenty prováděny se stejnou buněčnou suspenzí, která byla obvykle vyseta do stejné kultivační nádoby (např. 6-jamková destička).