

DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-3-280-284
УДК 576.3:57.017.642:57.088



Электропорация эмбриональных стволовых клеток мыши с помощью прибора Neon

И. П. Савченкова¹, А. А. Савченкова²

¹ ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К. И. Скрябина и Я. П. Коваленко Российской академии наук» (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН), г. Москва, Россия

² ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К. И. Скрябина» (ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К. И. Скрябина), г. Москва, Россия

¹ <https://orcid.org/0000-0003-3560-5045>, e-mail: s-ip@mail.ru

² e-mail: redbullshark01@gmail.com

РЕЗЮМЕ

Эмбриональные стволовые клетки мыши широко используются в качестве перспективного материала для создания новых клеточных систем с заданными свойствами в клеточной и молекулярной биологии, фармакологии, вирусологии, медицине, ветеринарии и биотехнологии. Для каждого типа клеток требуются разные условия электропорации, которые должны быть определены экспериментально, поэтому была поставлена цель путем подбора и изменения различных параметров (напряжения, ширины импульса и количества импульсов) оптимизировать условия электропорации при использовании электропоратора нового поколения Neon® Transfection System, обеспечивающие высокую эффективность трансфекции эмбриональных стволовых клеток линии D3 и их жизнеспособность. Установлено, что наиболее подходящими параметрами для данных клеток являются: импульсное напряжение – 1200 В, ширина импульса – 10 мс, количество импульсов – 3. При данных условиях жизнеспособность клеток после электропорации составила 91%, а эффективность временной трансфекции (24 ч после электропорации), оцениваемая по продукции бактериальной β-галактозидазы, достигала 88%. Показано, что при более высокой клеточной концентрации любые испытанные режимы электропорации обеспечивают более высокую эффективность трансфекции в диапазоне от 34 до 88%. Продемонстрировано, что для введения ДНК плазмиды с геном *lacZ Escherichia coli* в клетки линии D3 из 12 изученных протоколов с разными параметрами можно успешно использовать 5. Таким образом, полученные в эксперименте результаты показывают, что, имея предварительную информацию о режимах электропорации аналогичного типа клеток, которую рекомендует производитель прибора, можно подобрать экспериментальным путем более оптимальные условия. Электропорация эмбриональных стволовых клеток мыши с использованием электропоратора нового поколения может быть эффективным методом введения нуклеиновых кислот в представляющие интерес для исследователя клетки *in vitro*.

Ключевые слова: эмбриональные стволовые клетки, введение экзогенной ДНК плазмиды, электропоратор Neon, ген *lacZ Escherichia coli*, эффективность трансфекции, жизнеспособность

Благодарности: Работа выполнена по теме FGUG-2022-0010 «Поддержание и развитие коллекций культур клеток и микроорганизмов на основе фундаментальных исследований, разработка бактериальных и вирусных штаммов с заданными свойствами для применения в ветеринарной медицине с использованием методов биотехнологии, в том числе на основе клеточных нанобиотехнологий, усовершенствование диагностики и средств специфической профилактики инфекционных болезней».

Для цитирования: Савченкова И. П., Савченкова А. А. Электропорация эмбриональных стволовых клеток мыши с помощью прибора Neon. *Ветеринария сегодня*. 2022; 11 (3): 280–284. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-3-280-284.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Савченкова Ирина Петровна, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории стволовой клетки ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, 109428, Россия, г. Москва, Рязанский пр., д. 24, корпус 1, e-mail: s-ip@mail.ru.

Electroporation of mouse embryonic stem cells with Neon device

I. P. Savchenkova¹, A. A. Savchenkova²

¹ Federal State Budget Scientific Institution “Federal Scientific Centre VIEV” (FSC VIEV), Moscow, Russia

² Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Moscow state Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA by K. I. Skryabin” (Moscow SAVMB), Moscow, Russia

¹ <https://orcid.org/0000-0003-3560-5045>, e-mail: s-ip@mail.ru

² e-mail: redbullshark01@gmail.com

SUMMARY

Mouse embryonic stem cells are widely used as a promising material for producing of new cellular systems with desired properties in cellular and molecular biology, pharmacology, virology, medicine, veterinary medicine and biotechnology. Each type of cells requires different electroporation conditions that are determined experimentally. Therefore, the main goal was to optimize conditions of electroporation with Neon® Transfection System, a new-generation device, by selecting

and changing of various parameters (voltage, impulse width and number of impulses) to maximize efficiency of D3 embryonic stem cell line transfection and to maintain cell viability. The following parameters were found to be the most optimal for the said cells: impulse voltage— 1200 V, impulse width — 10 ms, number of impulses — 3. Under given conditions, viability of the cells after electroporation was 91%, and transient transfection efficiency (24 hours after electroporation) assessed based on bacterial β -galactosidase production was 88%. It was shown that with higher cell density any electroporation condition tested yielded higher transfection efficiency ranging between 34 and 88%. It was demonstrated that only 5 out of 12 tested protocols with different parameters could be successfully used for insertion of DNA plasmid carrying *lacZ Escherichia coli* gene into D3 cell line. Thus, the experiment results show the more optimal conditions can be selected experimentally taking into account available information on electroporation protocols for similar cell types recommended by the device manufacturer. Electroporation of mouse embryonic stem cells with the new-generation device can be an effective method for *in vitro* insertion of nucleic acids into the cells of interest to the researcher.

Keywords: embryonic stem cells, insertion of exogenous DNA plasmid, Neon electroporation device, *lacZ Escherichia coli* gene, transfection efficiency, viability

Acknowledgements: The study was carried out within FGUG-2022-0010 "Maintaining and developing collections of cell cultures and microorganisms based on the fundamental studies, development of bacterial and viral strains with desired properties for use in veterinary medicine with biotechnological methods including nanobiotechnologies, improvement of infectious disease diagnosis and specific prevention tools".

For citation: Savchenkova I. P., Savchenkova A. A. Electroporation of mouse embryonic stem cells with Neon device. *Veterinary Science Today*. 2022; 11 (3): 280–284. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-3-280-284.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

For correspondence: Irina P. Savchenkova, Doctor of Science (Biology), Professor, Chief Researcher, Stem Cell Laboratory, FSC VIEV, 109428, Russia, Moscow, Rjazanskij prospekt, d. 24, korpus 1, e-mail: *s-ip@mail.ru*

ВВЕДЕНИЕ

С момента своего открытия в 1981 г. [1, 2] мышинные эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) широко используются в качестве перспективного материала для создания новых клеточных систем с заданными свойствами в клеточной и молекулярной биологии, фармакологии, вирусологии, медицине, ветеринарии и биотехнологии. К особенностям этих клеток относят высокую скорость удвоения, экспрессию специфических генов-маркеров, которые подтверждают их происхождение, способность реагировать на факторы роста, вызывая морфологические и биохимические изменения, приводящие к дифференцировке ЭСК в клетки с фенотипом, подобным более 225 клеточным типам, в культуре, и сохранение ими свойств ранних предимплантационных эмбрионов как *in vitro*, так и *in vivo*.

Введение экзогенной ДНК в ЭСК мыши позволяет не только генетически модифицировать их геном, но и использовать такие клетки для создания животных с генетически отредактированными генами [3]. Методы введения рекомбинантных молекул в ЭСК требуют тщательного подбора из-за их морфологических особенностей: мелкие клетки с крупным ядром и узким ободком цитоплазмы, которые растут плотными колониями, как правило, на монослое фибробластов. Электропорация рассматривается как наиболее приемлемый способ введения экзогенной ДНК в эти клетки с высокой эффективностью, без клеточных изменений и с сохранением их способности к дифференцировке [4]. Во время такой трансфекции клетки подвергаются воздействию высоковольтного импульса в присутствии экзогенной нуклеиновой кислоты. Высокое напряжение вызывает кратковременную проницаемость клеточной мембраны, что позволяет чужеродным нуклеиновым кислотам проникать в клетку [5, 6]. Для каждого типа клеток требуются разные условия электропорации, которые должны быть определены экспериментально. Надо учитывать напряженность электрического поля и длительность импульса, которые являются ключевыми параметрами

для достижения максимальной эффективности трансфекции и поддержания жизнеспособности клеток после процедуры. Импульс, подаваемый на клетки, может быть сгенерирован в виде двух различных волновых форм: прямоугольного и экспоненциального затухания. Формы прямоугольной волны основаны на постоянном заряде, приложенном к клеткам в течение установленного времени. Использование прямоугольных сигналов позволяет применять несколько импульсов. Во время экспоненциальной формы волны затухания задается начальное напряжение, а продолжительность затухания (постоянная времени) является произведением установки емкости и сопротивления образца. Поскольку сопротивление образца в основном зависит от ионной силы буфера для электропорации, так что сопротивление является постоянным, можно эмпирически определить влияние изменения настройки емкости на импульс [7]. Компоненты буферного раствора также влияют на эффективность трансфекции и жизнеспособность клеток. Ранее буферный раствор с высокой ионной силой (низкое сопротивление), такой как фосфатно-солевой буфер (ФСБ) или бессывороточная среда для роста, был адаптирован для электропорации ЭСК мыши линии D3 при высокой емкости [8].

В связи с приобретением электропоратора нового поколения Neon® Transfection System (Invitrogene, Thermo Fisher Scientific, США) была поставлена цель оптимизировать условия электропорации, обеспечивающие высокую эффективность трансфекции ЭСК мыши и их жизнеспособность. В отличие от ранее используемых систем для электропорации, например Gene Pulser (Bio-Rad), воздействие электрическими импульсами происходит не в кюветах, а в уникальных наконечниках 100 или 10 мкл в качестве электропорационной камеры. Было показано, что с помощью данного прибора можно успешно трансфицировать некомпетентные к поглощению экзогенной ДНК клетки, первичные и иммортализованные гематopoэтические клетки, а также стволовые клетки и клетки различных тканей [9–11].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования были мышинные ЭСК линии D3. Клетки культивировали в среде DMEM, которая содержала 4,5 г/л глюкозы, 10% сыворотки крови плодов коров (HyClone, США), однократный раствор незаменимых аминокислот, 2 мМ α -глутамин, 0,1 мМ β -меркаптоэтанол и антибиотики: пенициллин и стрептомицин в конечной концентрации 50 ед/мл и 50 мкг/мл соответственно (НПП «ПанЭко», Россия). Эмбриональные стволовые клетки культивировали на монослое, представленном мышинными диплоидными эмбриональными фибробластами, у которых предварительно был заблокирован митоз митомидином С (конечная концентрация 30 мкг/мл, в течение 3 ч).

Для трансфекции использовали плазмиду pcDNATM3.1/His/lacZ, содержащую нуклеотидную последовательность маркерного бактериального гена *lacZ Escherichia coli*. Перед трансфекцией экзогенную ДНК переосаждали этанолом (70°) и растворяли в стерильном буфере (0,1 мМ ЭДТА, 1 мМ трис-HCl, pH 8,0).

Трансфекцию проводили электропорацией на приборе Neon® Transfection System с использованием стартового набора реагентов согласно инструкции производителя (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США). За день до трансфекции ЭСК пассировали с целью их отделения от клеток фибробластного слоя (метод разделения по адгезии) и высевали в чашки Петри (диаметр 60 мм) без фибробластов за 24 ч до трансфекции, чтобы они находились в экспоненциальной фазе роста в день электропорации.

Перед электропорацией клетки дважды промыли фосфатно-солевым буферным раствором без

ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} (ФСБ-2), добавляли 1 мл трипсина (НПП «ПанЭко», Россия) и инкубировали в течение 2 мин при 37 °С. После внесения 9 мл DMEM с добавками клетки ресуспендировали, переносили в стерильную полипропиленовую пробирку на 15 мл (Sarstedt, Германия) и центрифугировали при 200 g в течение 5 мин. Осадок ресуспендировали в 10 мл ФСБ и подсчитывали клетки в камере Горяева. Клетки снова осаждали и к осадку добавляли буферный раствор R из набора для электропорации: в одном случае до конечной концентрации клеток $1,0 \times 10^7$ клеток/мл, а во втором – в два раза меньше ($0,5 \times 10^7$ клеток/мл), а также ДНК плазмиды pcDNATM3.1/His/lacZ (конечная концентрация 1 мкг/мл). ДНК и ЭСК в буфере перемешивали и 10 мкл смеси набирали пипеткой с наконечниками для электропорации. Фиксировали пипетку в держателе для электропорации и подвергали воздействию электрического тока с использованием предварительно заданных или введенных вручную протоколов в системе Neon. Клетки, подвергшиеся трансфекции в объеме 10 мкл, переносили в лунку 24-луночного планшета для тканевых культур, которая содержала 500 мкл соответствующей ростовой среды без антибиотиков, и далее процедуру повторяли 11 раз для каждой концентрации клеток, только меняя параметры на электропораторе. Планшет с трансфицированными мышинными ЭСК и контролем (нетрансфицированные) инкубировали при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5% CO_2 в течение 24 ч.

Жизнеспособность клеток после электропорации оценивали посредством окраски ЭСК трипановым синим (0,02%-й раствор). Процент жизнеспособных клеток рассчитывали как отношение количества неокрашенных клеток к общему количеству клеток, умноженному на 100.

Эффективность трансфекции оценивали по наличию в клетках β -галактозидазы – продукта экспрессии гена *lacZ E. coli*. Для этого использовали в качестве субстрата X-gal (Sigma-Aldrich, США). Перед окраской клетки фиксировали на льду холодным метанолом (-20 °С) в течение 15 мин. Долю окрашенных в сине-зеленый цвет клеток (продуцирующих β -галактозидазу) рассчитывали при анализе не менее 1000 клеток. В качестве отрицательного контроля служили нетрансфицированные ЭСК.

Визуализацию клеток проводили с помощью инвертированного фазово-контрастного микроскопа фирмы Carl Zeiss (Германия) и программного обеспечения AxioVision Rel. 4.8. Эксперименты имели трехкратную повторяемость. Приведены значения среднего арифметического (m) и стандартной ошибки среднего (SEM).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведен ряд экспериментов по введению экзогенной ДНК плазмиды, которая содержит маркерный ген *lacZ E. coli*, в ЭСК мыши посредством электропорации на предназначенном для клеток млекопитающих приборе Neon® Transfection System со стартовым набором реагентов. Для электропорации использовали два набора параметров, рекомендованных производителем для трансфекции ЭСК мыши (протоколы № 5 и 8 в таблице). Дополнительно был протестирован ряд комбинаций напряжения (1000, 1300, 1400 или 1500 V), длительности импульса (10, 20, 30, 40 ms) и числа импульсов (1–3), как указано в таблице. Для оптимизации условий использовали разные клеточные концентрации: $0,5 \times 10^5$ или $1,0 \times 10^5$ клеток в 10 мкл.

Таблица

Оптимизация параметров электропорации эмбриональных стволовых клеток мыши линии D3 в наконечнике 10 мкл (Neon)

Table

Optimization of conditions for electroporation of D3 mouse embryonic cell line in 10 μ l tip (Neon)

№ протокола	Импульсное напряжение, V	Ширина импульса, ms	Количество импульсов	Эффективность трансфекции/ жизнеспособность, % (m \pm SEM)	
				концентрация клеток $0,5 \times 10^5$	концентрация клеток $1,0 \times 10^5$
1	1000	10	3	29 \pm 0,1/70 \pm 0,04	39 \pm 0,01/83 \pm 0,5
2	1000	20	2	37 \pm 0,6/77 \pm 0,05	39 \pm 0,5/79 \pm 0,1
3	1000	40	1	37 \pm 0,7/64 \pm 0,3	37 \pm 0,01/68 \pm 0,7
4	1200	10	3	74 \pm 0,02/86 \pm 0,8	88 \pm 0,7/91 \pm 0,04
5	1200	20	2	66 \pm 0,03/87 \pm 0,01	70 \pm 0,6/90 \pm 0,3
6	1200	20	3	65 \pm 0,04/85 \pm 0,1	76 \pm 0,5/89 \pm 0,7
7	1200	40	1	44 \pm 0,5/58 \pm 0,001	57 \pm 0,4/60 \pm 0,3
8	1400	10	3	71 \pm 0,05/70 \pm 0,3	78 \pm 0,1/88 \pm 0,1
9	1400	20	2	68 \pm 0,2/70 \pm 0,5	81 \pm 0,1/90 \pm 0,5
10	1400	20	3	65 \pm 0,4/66 \pm 0,6	70 \pm 0,7/72 \pm 0,6
11	1400	30	3	33 \pm 0,7/59 \pm 0,02	57 \pm 0,4/66 \pm 0,1
11	1500	10	3	26 \pm 0,6/46 \pm 0,3	35 \pm 0,1/48 \pm 0,01
12	1500	40	1	22 \pm 0,07/34 \pm 0,4	34 \pm 0,2/41 \pm 0,2

Из данных, представленных в таблице, видно, что наилучшие результаты получены при использовании протоколов № 4 и 9: эффективность трансфекции была наиболее высокой, и доля окрашенных клеток превышала значения при использовании других параметров электропорации.

Метод демонстрирует воспроизводимость, что определяется путем сравнения эффективности в трех повторных экспериментах. Параметры, которые рекомендует фирма для ЭСК мыши (приведенные в таблице протоколы № 5 и 8), были также эффективными, но уступали прогнозируемым показателям. Так, в руководстве указано, что использование предлагаемых параметров позволяет через 48 ч достичь 79 и 88%-й эффективности трансфекции мышинных ЭСК плазмидой, которая содержит ген *EGFP*, с жизнеспособностью клеток 99 и 96% соответственно протоколам № 5 и 8.

Анализ данных показал, что концентрация клеток в суспензии является одной из наиболее важных переменных, влияющих на эффективность трансфекции на приборе Neon. На основании полученных результатов можно заключить, что при более высокой клеточной концентрации, в нашем случае в два раза, любые испытанные условия электропорации обеспечивают более высокую эффективность трансфекции в диапазоне от 34 до 88%. При использовании более низкой концентрации клеток эти показатели варьируют в пределах от 22 до 74%.

В отличие от стандартных методов электропорации, проводимых в кюветках, в системе Neon используются уникальные реакционные камеры – наконечники Neon, которые обеспечивают высокое электрическое поле для биологического образца. Наконечники позволяют увеличить величину зазора между двумя электродами, сводя тем самым к минимуму площадь поверхности каждого электрода. В результате уменьшаются изменения pH, образование побочных ионов и выделение тепла. Такое решение увеличивает эффективность трансфекции и жизнеспособность клеток, а также обеспечивает эргономичный рабочий процесс. В связи с тем что трансфекция происходит в микрообъеме смеси (буферный раствор, ДНК и клетки), представляло интерес оценить жизнеспособность клеток после электропорации. С клетками, подвергшимися электропорации, манипулировали так же, как и с клетками, не подвергшимися электропорации, которые не получали ни экзогенную ДНК, ни электрический импульс. Результаты показали, что значения жизнеспособности ЭСК (концентрация клеток $1,0 \times 10^5$) после трансфекции при использовании параметров протоколов № 4, 5, 6, 8, 9 (табл.) были сопоставимы со значениями в контроле $95 \pm 0,2\%$ (ЭСК без электропорации) и составляли 91, 90, 89, 88 и 90% соответственно. Наилучшая жизнеспособность клеток (91%) была достигнута при использовании следующих значений параметров: напряжение – 1200 V, ширина импульса – 10 ms и количество импульсов – 3.

Для работы были выбраны ЭСК мыши, которые перспективны для создания модельной лабораторной системы для изучения вирусной инфекции [12] и являются иммортализованными клетками, т. е. бессмертными в культуре. В предыдущих экспериментах удалось ввести ген *lacZ E. coli* в составе плазмиды pCMV-lacZ в данные клетки на приборе Gene Pulser (Bio-Red, США) с эффективностью трансфекции 35% [8]. При этом максимальное число выживших клеток после электро-

порации составляло 82%. Сравнение эффективности электропорации эмбриональных стволовых клеток мыши D3 на приборе Neon (от 34 до 88%) выявило преимущество электропоратора нового поколения, в котором трансфекция происходит в наконечниках. Следует отметить, что система Neon позволяет использовать очень маленькие объемы для трансфекции, миниатюризирована для использования наконечников для электропорации и объемов трансфекции 10 или 100 мкл.

В опыте удалось ввести экзогенную ДНК плазмиду pсDNATM3.1/His/lacZ в ЭСК мыши с эффективностью трансфекции 88%, изменив параметры электропорации. Накапливаются данные об эффективности введения экзогенных РНК [13–15], ДНК и белков в некомпетентные к поглощению чужеродного материала клетки с помощью электропоратора Neon [16–18]. Полученные в эксперименте данные согласуются с этими сообщениями, однако перед трансфекцией требуется оценка качества клеток и оптимизация параметров для каждой культуры клеток. Различия, отмеченные в протоколах электропорации, опубликованных в научной литературе [9, 10, 16], позволяют предположить, что даже незначительные изменения условий роста клеток могут оказать существенное влияние на введение экзогенной ДНК в них.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные в эксперименте результаты показывают, что, имея предварительную информацию о режимах электропорации аналогичного типа клеток, которую рекомендует производитель, можно подобрать экспериментальным путем более оптимальные условия. Продемонстрировано, что электропорация может быть очень эффективным методом введения нуклеиновых кислот в представляющие интерес клетки, в том числе в те, которые часто считаются трудными для трансфекции. Высокая эффективность трансфекции для клеток, описанных в данной работе, была достигнута путем оптимизации и определения параметров электропорации на приборе Neon. Установлено, что наиболее подходящими параметрами для эмбриональных стволовых клеток мыши линии D3 являются: импульсное напряжение – 1200 V, ширина импульса – 10 ms, количество импульсов – 3, при которых жизнеспособность клеток после электропорации составляет 91%, а эффективность временной трансфекции (24 ч после электропорации), которую оценивали по продукции бактериального белка β -галактозидазы, – 88%.

Анализ полученных результатов указывает на необходимость подбора оптимальных условий электропорации мышинных ЭСК линии D3 из-за особенностей их поведения в культуре. Как показано в опыте, концентрация клеток в суспензии является одной из наиболее важных переменных, влияющих на эффективность трансфекции в оптимизированных условиях электропорации. По итогам проведенной работы можно сделать заключение, что при более высокой клеточной концентрации, в нашем случае в два раза, любые испытанные режимы электропорации обеспечивают более высокую эффективность трансфекции в диапазоне от 34 до 88%.

Наилучшие условия электропорации для любого типа клеток могут быть получены при использовании системы, которая позволяет регулировать параметры, включая форму волны, напряжение, а также клеточную плотность, что может существенно влиять как на

витабельность клеток после действия электрического тока, так и эффективность трансфекции. Изменяя эти показатели, можно добиться увеличения доли жизнеспособных клеток (сопоставимо значениям в контроле, т. е. нетрансфицированным клеткам) или же более высокой эффективности трансфекции. Продemonстрировано, что для введения ДНК плазмиды с геном *lacZ* *E. coli* в ЭСК линии D3 из 12 изученных протоколов с разными параметрами можно успешно использовать 5. Таким образом, на электропораторе Neon® Transfection System (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США) можно подобрать условия, наиболее подходящие для создания клеток с заданными свойствами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Evans M. J., Kaufman M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981; 292 (5819): 154–156. DOI: 10.1038/292154a0.
- Martin G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1981; 78 (12): 7634–7638. DOI: 10.1073/pnas.78.12.7634.
- Савченкова И. П., Зиновьева Н. А., Булла Й., Брем Г. Эмбриональные стволовые клетки, их генетическое изменение путем гомологичной рекомбинации и использование в получении трансгенных животных. *Успехи современной биологии*. 1996; 116 (1): 78–92.
- Савченкова И. П., Сергеев Н. И. Введение экзогенной ДНК плазмид в культуру клеток сельскохозяйственных животных. *Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук*. 1994; 6: 26–28. eLIBRARY ID: 22275920.
- Shi J., Ma Y., Zhu J., Chen Y., Sun Y., Yao Y., et al. Electroporation-based intracellular delivery. *Molecules*. 2018; 23 (11):3044. DOI: 10.3390/molecules23113044.
- Villemejeane J., Mir L. M. Physical methods of nucleic acid transfer: general concepts and applications. *British J. Pharmacol.* 2009; 157 (2): 207–219. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2009.00032.x.
- Chong Z. X., Yeap S. K., Ho W. Y. Transfection types, methods and strategies: a technical review. *PeerJ*. 2021; 9:e11165. DOI: 10.7717/peerj.11165.
- Савченкова И. П. Введение гена *lac-Z* *E. coli* в эмбриональные стволовые клетки мыши D3 электропорацией. *Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук*. 1996; 6: 36–37. eLIBRARY ID: 22272344.
- Moore J. C., Atze K., Yeung P. L., Toro-Ramos A. J., Camarillo C., Thompson K., et al. Efficient, high-throughput transfection of human embryonic stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* 2010; 1 (3):23. DOI: 10.1186/scrt23.
- Covello G., Siva K., Adami V., Denti M. A. An electroporation protocol for efficient DNA transfection in PC12 cells. *Cytotechnology*. 2014; 66 (4): 543–553. DOI: 10.1007/s10616-013-9608-9.
- Kim J. A., Cho K., Shin M. S., Lee W. G., Jung N., Chung C., Chang J. K. A novel electroporation method using a capillary and wire-type electrode. *Biosens. Bioelectron.* 2008; 23 (9): 1353–1360. DOI: 10.1016/j.bios.2007.12.009.
- Савченкова И. П., Алексеенкова С. В., Юров К. П. Эмбриональные стволовые клетки мыши – перспективный материал для изучения вируса инфекционной анемии лошадей *in vitro* и *in vivo*. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61 (3): 107–111. DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-3-107-111.
- Gardner C. L., Trobaugh D. W., Ryman K. D., Klimstra W. B. Electroporation of alphavirus RNA translational reporters into fibroblastic and myeloid cells as a tool to study the innate immune system. *Methods Mol. Biol.* 2016; 1428: 127–137. DOI: 10.1007/978-1-4939-3625-0_8.
- Slanina H., Schmutzler M., Christodoulides M., Kim K. S., Schubert-Unkmeir A. Effective plasmid DNA and small interfering RNA delivery to diseased human brain microvascular endothelial cells. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2012; 22 (4): 245–257. DOI: 10.1159/000342909.
- Yunus M. A., Chung L. M., Chaudhry Y., Bailey D., Goodfellow I. Development of an optimized RNA-based murine norovirus reverse genetics system. *J. Virol. Methods*. 2010; 169 (1): 112–118. DOI: 10.1016/j.jviromet.2010.07.006.
- Eghbalsaid S., Hyder I., Kues W. A. A versatile bulk electrotransfection protocol for murine embryonic fibroblasts and iPSC cells. *Sci. Rep.* 2020; 10 (1):13332. DOI: 10.1038/s41598-020-70258-w.

17. Brees C., Fransen M. A cost-effective approach to microporate mammalian cells with the Neon Transfection System. *Anal. Biochem.* 2014; 466: 49–50. DOI: 10.1016/j.ab.2014.08.017.

18. Yu L., Reynaud F., Falk J., Spencer A., Ding Y. D., Baumlé V., et al. Highly efficient method for gene delivery into mouse dorsal root ganglia neurons. *Front. Mol. Neurosci.* 2015; 8:2. DOI: 10.3389/fnmol.2015.00002.

REFERENCES

- Evans M. J., Kaufman M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981; 292 (5819): 154–156. DOI: 10.1038/292154a0.
- Martin G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1981; 78 (12): 7634–7638. DOI: 10.1073/pnas.78.12.7634.
- Savchenkova I. P., Zinov'eva N. A., Bulla Y., Brem G. Embryonic stem cells, their genetic change by a homologous recombination and use in receiving transgene animals. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 1996; 116 (1): 78–92. (in Russ.)
- Savchenkova I. P., Sergeev N. I. Vvedenie jekzogennoj DNK plazmid v kul'turu kletok sel'skokhozjajstvennykh zhivotnykh = Insertion of exogenous DNA plasmid in livestock animal cell culture. *Doklady Rossijskoi akademii sel'skokhozjajstvennykh nauk*. 1994; 6: 26–28. eLIBRARY ID: 22275920. (in Russ.)
- Shi J., Ma Y., Zhu J., Chen Y., Sun Y., Yao Y., et al. Electroporation-based intracellular delivery. *Molecules*. 2018; 23 (11):3044. DOI: 10.3390/molecules23113044.
- Villemejeane J., Mir L. M. Physical methods of nucleic acid transfer: general concepts and applications. *British J. Pharmacol.* 2009; 157 (2): 207–219. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2009.00032.x.
- Chong Z. X., Yeap S. K., Ho W. Y. Transfection types, methods and strategies: a technical review. *PeerJ*. 2021; 9:e11165. DOI: 10.7717/peerj.11165.
- Savchenkova I. P. Vvedenie gena *lac-Z* *E. coli* v embrional'nye stvolovye kletki myshi D3 elektroporatsiei = Insertion of *lac-Z* *E. coli* gene in D3 mouse embryonic cell line with electroporation. *Doklady Rossijskoi akademii sel'skokhozjajstvennykh nauk*. 1996; 6: 36–37. eLIBRARY ID: 22272344. (in Russ.)
- Moore J. C., Atze K., Yeung P. L., Toro-Ramos A. J., Camarillo C., Thompson K., et al. Efficient, high-throughput transfection of human embryonic stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* 2010; 1 (3):23. DOI: 10.1186/scrt23.
- Covello G., Siva K., Adami V., Denti M. A. An electroporation protocol for efficient DNA transfection in PC12 cells. *Cytotechnology*. 2014; 66 (4): 543–553. DOI: 10.1007/s10616-013-9608-9.
- Kim J. A., Cho K., Shin M. S., Lee W. G., Jung N., Chung C., Chang J. K. A novel electroporation method using a capillary and wire-type electrode. *Biosens. Bioelectron.* 2008; 23 (9): 1353–1360. DOI: 10.1016/j.bios.2007.12.009.
- Savchenkova I. P., Alekseyenkova S. V., Yurov K. P. Mouse embryonic stem cells – a new cellular system for studying the equine infectious anemia virus *in vitro* and *in vivo*. *Problems of Virology*. 2016; 61 (3): 107–111. DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-3-107-111. (in Russ.)
- Gardner C. L., Trobaugh D. W., Ryman K. D., Klimstra W. B. Electroporation of alphavirus RNA translational reporters into fibroblastic and myeloid cells as a tool to study the innate immune system. *Methods Mol. Biol.* 2016; 1428: 127–137. DOI: 10.1007/978-1-4939-3625-0_8.
- Slanina H., Schmutzler M., Christodoulides M., Kim K. S., Schubert-Unkmeir A. Effective plasmid DNA and small interfering RNA delivery to diseased human brain microvascular endothelial cells. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2012; 22 (4): 245–257. DOI: 10.1159/000342909.
- Yunus M. A., Chung L. M., Chaudhry Y., Bailey D., Goodfellow I. Development of an optimized RNA-based murine norovirus reverse genetics system. *J. Virol. Methods*. 2010; 169 (1): 112–118. DOI: 10.1016/j.jviromet.2010.07.006.
- Eghbalsaid S., Hyder I., Kues W. A. A versatile bulk electrotransfection protocol for murine embryonic fibroblasts and iPSC cells. *Sci. Rep.* 2020; 10 (1):13332. DOI: 10.1038/s41598-020-70258-w.
- Brees C., Fransen M. A cost-effective approach to microporate mammalian cells with the Neon Transfection System. *Anal. Biochem.* 2014; 466: 49–50. DOI: 10.1016/j.ab.2014.08.017.
- Yu L., Reynaud F., Falk J., Spencer A., Ding Y. D., Baumlé V., et al. Highly efficient method for gene delivery into mouse dorsal root ganglia neurons. *Front. Mol. Neurosci.* 2015; 8:2. DOI: 10.3389/fnmol.2015.00002.

Поступила в редакцию / Received 12.04.2022

Поступила после рецензирования / Revised 19.04.2022

Принята к публикации / Accepted 23.05.2022

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Савченкова Ирина Петровна, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории стволовой клетки ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, г. Москва, Россия.

Савченкова Ангелина Александровна, студент 4-го курса факультета ветеринарной медицины ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К. И. Скрябина, г. Москва, Россия.

Irina P. Savchenkova, Doctor of Science (Biology), Professor, Chief Researcher, Stem Cell Laboratory, FSC VIEV, Moscow, Russia.

Angelina A. Savchenkova, 4th year student of the Faculty of Veterinary Medicine, Moscow SAVMB, Moscow, Russia.