

## فسفات کلروکین تنها در عدم حضور گلیسرول و یا DMSO، محرکی پر قدرت برای ورود DNA به سلول‌های HEK293T است

سارا انصاری M.Sc.، ماریه سقائیان جزی M.Sc.، سارا سلمانیان M.Sc.، سید محمود عرب نجفی Ph.D.\*

- پردیس علوم دانشگاه تهران، دانشکده زیست شناسی، گروه علوم سلولی و مولکولی، صندوق پستی ۶۴۵۵-۱۴۱۵۵ تهران، ایران

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: najafim@khayam.ut.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۰/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۴/۳

### چکیده

**هدف:** روش‌های متعددی برای وارد کردن مواد ژنتیکی خصوصاً DNA به داخل سلول‌های حیوان به کار گرفته شده‌اند. روش وابسته به فسفات کلسیم روشی آسان و ارزان قیمت است با این حال این روش برای ترانسفکشن عده‌ای از سلول‌های حیوانی کارایی مناسبی ندارد. در این مطالعه تلاش بر این بود که بتوان کارایی ترانسفکشن با واسطه فسفات کلسیم را افزایش داد.

**مواد و روش‌ها:** دویست هزار سلول HEK293T در هر یک از خانه‌های ظروف ۶ خانه‌ای که حاوی یک لامل پوشیده از پلی‌الیزین بود کاشته شده و تا رسیدن به تراکم ۶۰ درصد در محیط مناسب رشد داده شدند. سلول‌ها سپس توسط یک روش استاندارد فسفات کلسیم در حضور یا عدم حضور فسفات کلروکین با پلاسمید رمز کننده پروتئین GFP (Green Fluorescence Protein) ترانسفکت شدند. سلول‌ها با میکروسکوپ فلورسانس مورد مشاهده قرار گرفته و میزان بیان GFP توسط نرم افزار *Image J* مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

**نتایج:** ما نشان می‌دهیم که فسفات کلروکین می‌تواند به میزان قابل ملاحظه‌ای ترانسفکشن سلول‌های HEK293T را با واسطه فسفات کلسیم افزایش دهد به طوری که در حضور این ماده تعداد سلول‌های ترانسفکت شده تا ۸ برابر افزایش می‌یابد. فسفات کلروکین هیچ سمیتی برای سلول‌ها نداشت ولی افزایش کارایی ترانسفکشن این ماده در حضور گلیسرول و یا DMSO (Dimethyl sulphoxide) مشاهده نگردید.

**نتیجه گیری:** ما فسفات کلروکین را به منظور افزایش کارایی ترانسفکشن توسط روش فسفات کلسیم توصیه می‌کنیم. به علاوه پیشنهاد می‌شود فسفات کلروکین به صورت تنها و در عدم حضور سایر محرک‌های ترانسفکشن مورد استفاده قرار گیرد.

**واژگان کلیدی:** فسفات کلروکین، ترانسفکشن، سلول‌های HEK293T

## مقدمه

ترانسفکشن سلول‌ها به فرآیندی اطلاق می‌گردد که در طی آن یک ماده ژنتیکی به صورت DNA یا RNA به‌درون سلول‌ها فرستاده می‌شود (۱). حاملین مولکولی مختلفی برای ترانسفکشن سلول‌های پستانداران مورد استفاده قرار گرفته‌اند. این حاملین معمولاً دارای بار الکتریکی مثبت هستند و به‌دنبال اتصال با DNA توسط پدیده آندوسیتوز وارد سلول می‌شوند. لیپوزوم‌ها حاملین بسیار خوبی برای انتقال مواد ژنتیکی مانند DNA هستند زیرا انواع مختلف سلول‌ها را می‌توان توسط آن‌ها ترانسفکت کرد و این ترانسفکشن معمولاً با کارایی مناسب صورت می‌گیرد و اثرات سمی نسبتاً کمی بر سلول‌ها دارد (۴-۲). با این حال عواملی مانند سلامت سلول‌ها- کیفیت و کمیت ماده ژنتیکی- سرم موجود در محیط کشت- روش تهیه لیپوزوم و در نهایت مدت زمان ترانسفکشن از عواملی هستند که ممکن است کارایی ترانسفکشن توسط لیپوزوم‌ها را کاهش دهند (۵) و (۶). به‌علاوه لیپوزوم‌ها حاملین بسیار گران قیمتی هستند.

اولین روش ترانسفکشن وابسته به فسفات کلسیم توسط دانشمندانی به‌نام‌های van der Eb و Graham معرفی شد (۷). این روش وابسته به مخلوط کردن DNA با محلولی از کلرید کلسیم است. سپس این مخلوط به یک محلول بافری سالیین/ فسفات (saline/phosphate) اضافه می‌گردد و در دمای اتاق نگه‌داری می‌شود تا رسوبات DNA با کلسیم تشکیل گردد. سپس محلول حاوی این رسوبات به کشت سلول‌ها اضافه می‌گردد که در نتیجه آن سلول‌ها توسط پدیده آندوسیتوز رسوبات ریز DNA/کلسیم را به خود جذب نموده و از طریق آندوزوم‌ها (endosomes) DNA به هسته سلول منتقل می‌گردد (۲ و ۸).

علی‌رغم کارایی پایین روش فسفات کلسیم در ترانسفکشن سلول‌ها و نیز حساسیت این روش به pH، حرارت و تغییر غلظت سالیین، این روش برای ترانسفکشن انواع مختلفی از سلول‌های حیوانی مورد استفاده قرار گرفته است (۶ و ۹). به‌علاوه این روش ساده و ارزان قیمت است و در میان سایر روش‌های ترانسفکشن تنها روشی است که از یون‌های کوچکی که به‌طور طبیعی در محیط کشت سلول وجود دارند استفاده می‌کند (۹ و ۱۰).

در این مقاله ما نتایج دیگر دانشمندان را مورد تایید قرار داده و نشان دادیم که کیفیت پائین ترانسفکشن توسط روش کلسیم فسفات می‌تواند به‌میزان قابل ملاحظه‌ای توسط ماده‌ای به‌نام

فسفات کلروکین (chloroquine phosphate) که یک داروی ضد مالاریا است (۱۱) بهبود یابد. افزودن فسفات کلروکین با غلظت ۲۵ میکروگرم در هر میلی‌لیتر ( $\mu\text{g/ml}$ ) کارایی ترانسفکشن سلول‌های HEK293T را به میزان قابل ملاحظه‌ای (تا ۸ برابر) افزایش داد و جالب آنکه در این شرایط سلول‌ها سلامت خود را حفظ کردند و کاهش در حیات سلول‌ها مشاهده نگردید. به‌علاوه، نتایج ما نشان داد که گلیسرول و یا دی‌متیل سولفوکسید (DMSO, Dimethyl sulphoxide) که از محرک‌های ترانسفکشن سلول‌ها محسوب می‌شوند، اثرات افزایشی فسفات کلروکین در ترانسفکشن سلول‌ها را از بین می‌برند.

## مواد و روش‌ها

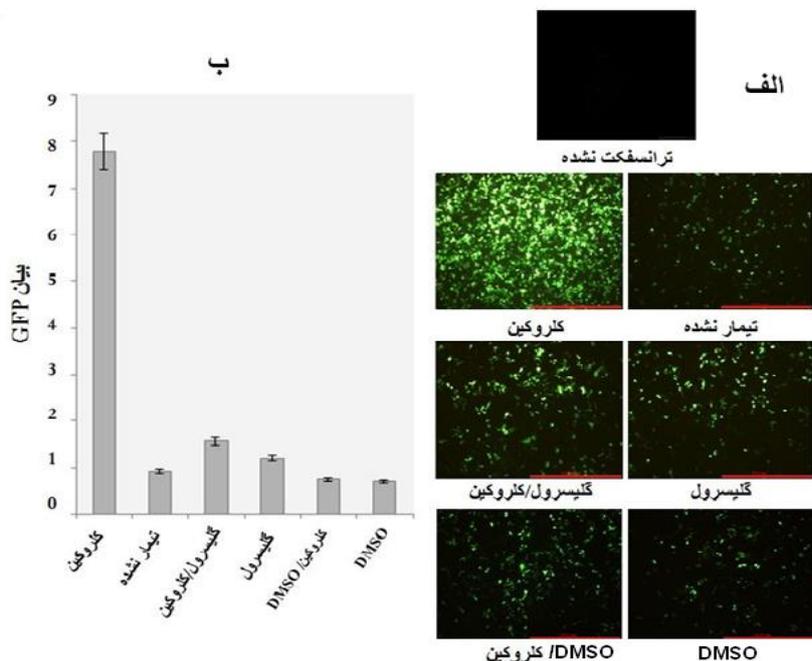
**کشت سلول و ترانسفکشن:** رده سلولی HEK293T از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شد. دویست هزار سلول ( $2 \times 10^5$ ) HEK293T در هر یک از خانه‌های یک ظرف ۶ خانه‌ای (مخصوص کشت سلول‌های جانوری) که حاوی یک لامل پوشیده از پلی‌الیزین بود کاشته شدند و سلول‌ها در انکوباتور کشت سلول با شرایط استاندارد، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن و رطوبت مناسب کشت داده شدند. برای کشت سلول‌ها از محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم گوساله (FBS, fetal bovine serum) و آنتی‌بیوتیک (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر استرپتومایسین) استفاده شد. هنگامی که سلول‌ها تقریباً به تراکم رشدی ۶۰ درصد (confluency) رسیدند، محیط کشت سلول‌ها با محیط تازه حاوی ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر فسفات کلروکین (Ipcalaboratories, India) تعویض گردید. در آزمایش‌هایی که اثرات گلیسرول و یا DMSO مورد ارزیابی قرار گرفت، هر یک از آن‌ها به‌میزان درصد حجمی ۱۰ درصد به محیط کشت سلول‌ها اضافه شدند. بعد از ۲ ساعت سلول‌ها با ۲ میکروگرم از یک حامل پلاسمیدی رمز کننده پروتئین GFP (Green Fluorescence Protein) ترانسفکت شدند. یک روش استاندارد وابسته به فسفات کلسیم برای ترانسفکشن سلول‌ها مورد استفاده قرار گرفت (۱۲). ۶ ساعت بعد از ترانسفکشن، محیط سلول‌ها با محیط فاقد فسفات کلروکین تعویض شد و ۳۶ ساعت بعد سلول‌ها برداشت شدند و برای بیان پروتئین GFP با استفاده از میکروسکوپ فلوروسنس (Zeiss, Germany) مورد بررسی قرار گرفتند.

## نتایج

بسیاری از رده‌های سلولی می‌توانند توسط رسوبات DNA/فسفات کلسیم ترانسفکت شوند که این رسوبات به سطح سلول می‌چسبند و توسط پدیده آندوسیتوز وارد سلول می‌شوند (۱۴). برای مطالعه نقش فسفات کلروکین در کارایی ترانسفکشن، سلول‌های HEK293T با پلاسمید تجلی دهنده پروتئین GFP (حامل cDNA ژن GFP) و با یک روش استاندارد وابسته به فسفات کلسیم ترانسفکت شدند (۱۲). ژن GFP که پروتئین Green Fluorescent Protein را تجلی می‌دهد به‌طور گسترده به‌عنوان یک ژن گزارشگر ( GFP reporter gene) در مطالعات بیان ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفته است (۱۵). تیمار با فسفات کلروکین تا ۸ برابر میزان ترانسفکشن سلول‌ها را افزایش داد در حالی که تیمار سلول‌ها با گلیسرول و یا DMSO تاثیری بر ترانسفکشن سلول‌ها نداشت (شکل ۱).

## آنالیز بیان پروتئین GFP با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس (immunofluorescence microscopy):

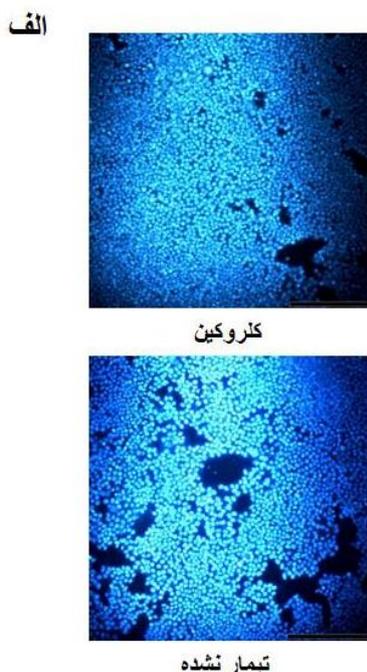
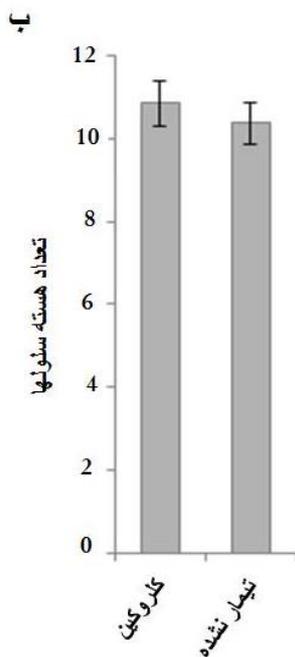
سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید GFP بعد از برداشت، با محلول (PBS, phosphate-buffered saline) شستشو داده شدند و سپس در محلول ۴ درصد پارافرمالدئید (در PBS) به‌مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق ثابت (fix) شدند. سلول‌ها مجدداً شستشو داده شدند و توسط محلول ۰/۲ درصد تریتون X-100 در PBS به‌مدت ۳ دقیقه نفوذ پذیر شدند. لامل‌های حاوی سلول سپس دو بار (هر بار ۵ دقیقه) توسط محلول PBS شستشو داده شده و سپس هر کدام از آن‌ها بر روی یک اسلاید میکروسکوپی تمیز حاوی یک قطره کوچک از محیط چسبنده شامل ۹۰ درصد گلیسرول و ۱۰ درصد PBS (mounting medium) قرار گرفتند. کناره‌های لامل‌ها توسط لاک ناخن مسدود شده و سپس توسط میکروسکوپ فلورسانس (Zeiss, Germany) مورد مشاهده قرار گرفتند. میزان تجلی پروتئین GFP توسط نرم افزار image J مورد اندازه‌گیری کمی قرار گرفت و اندیکس تجلی پروتئین همانند روش توضیح داده شده در منبع شماره ۱۳ محاسبه گردید (۱۳).



شکل ۱: الف) نتیجه یکی از آزمایشات ایمونوفلورسانس که در آن، سلول‌های HEK293T با پلاسمید کد کننده پروتئین GFP (Green Fluorescent Protein) همانند روش توضیح داده شده در قسمت "مواد و روش‌ها" ترانسفکت و با موادی که در شکل معرفی شده‌اند تیمار شده‌اند. ب) نمودار معرف نوع تیمار سلول‌های ترانسفکت شده و همین‌طور معرف میزان بیان ژن GFP در سلول‌ها می‌باشد که توسط نرم افزار Image J اندازه‌گیری شده است. متوسط اندازه‌گیری نتایج سه آزمایش مختلف (همانند آزمایش نشان داده شده در الف، در این شکل نشان داده شده است).

که هر دو این عوامل در حضور فسفات کلوکین افزایش پیدا کردند. شدت بیان ژن *GFP* توسط نرم افزار *Image J* مورد اندازه گیری قرار گرفت.

ما همچنین در این مطالعه دریافتیم که تیمار سلول های HEK293T با غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر ( $\mu\text{g/ml}$ ) فسفات کلوکین به مدت ۶ ساعت (بعد از ترانسفکشن) باعث هیچ گونه کاهشی در بقای سلول ها نمی شود (شکل ۲).



شکل ۲: الف) نمونه ای از رنگ آمیزی هسته سلول ها با رنگ *DAPI* (*diamidino-2-phenylindole*). این شکل جمعیت سلول ها را در حالت تیمار شده و تیمار نشده با فسفات کلوکین مورد مقایسه قرار می دهد. ب) نمودار بیانگر اندازه گیری کمی نتایج است.

استفاده در این مطالعه (۲۵ میکروگرم در میلی لیتر) و زمان ترانسفکشن (۶ ساعت)، فسفات کلوکین هیچگونه اثر سمی بر سلول های HEK293T نداشت.

بازدارندگی تجزیه DNA توسط فسفات کلوکین یکی از مکانیسم های محتمل در افزایش میزان ترانسفکشن توسط این ماده می باشد. در طی ترانسفکشن، اکثر مولکول های پلاسمید از طریق پدیده آندوسیتوز وارد سلول می شوند و در این مرحله DNA ممکن است قبل از آنکه به هسته سلول برسد به علت ادغام اندوزوم (*endosome*) و لیزوزوم (*lysosome*) توسط آنزیم های نوکلئاز لیزوزومال مورد تجزیه واقع گردد (۱۹). ادغام اندوزوم و لیزوزوم می تواند توسط عوامل لیزوزوموتروپیک مانند فسفات کلوکین، که از ادغام اندوزوم و لیزوزوم ممانعت

## بحث

ترانسفکشن سلول ها با روش وابسته به فسفات کلسیم روشی آسان و از نظر اقتصادی به صرفه است. با این حال کارایی این روش برای بعضی از سنجش های آزمایشگاهی کافی نیست (۱۶). در این مطالعه ما نشان می دهیم که فسفات کلوکین به میزان قابل ملاحظه ای کارایی ترانسفکشن سلول های HEK293T را با روش فسفات کلسیم افزایش می دهد.

فسفات کلوکین ماده ای است که مدت ها است در درمان مالاریا مورد استفاده قرار گرفته است (۱۷). گزارشاتی است مبنی بر اینکه غلظت های بالای این ماده و یا در معرض قرار گرفتن طولانی مدت سلول ها با این ماده برای سلول ها سمی است و باعث مرگ آن ها می گردد (۱۸). با این حال در غلظت مورد

قرار گیرند.

### نتیجه گیری

به طور خلاصه با توجه به استفاده گسترده از سلول‌های HEK293T در مطالعات بیان ژنتیکی، ما فسفات کلوکین را به عنوان یک ماده با ارزش برای افزایش کارایی ترانسفکشن توسط روش ارزان قیمت فسفات کلسیم توصیه می‌کنیم. با این حال با توجه به نتایج این مقاله پیشنهاد می‌گردد که فسفات کلوکین به عنوان تنها محرک در واکنش ترانسفکشن مورد استفاده قرار گیرد و از استفاده توأم آن با سایر محرک‌ها مانند گلیسرول و DMSO خودداری گردد.

### تشکر و قدردانی

حامل پلاسمیدی رمز کننده پروتئین GFP به صورت اهدایی از دکتر Peter Klein (از دانشگاه پنسیلوانیا در کشور آمریکا) دریافت گردید. این کار توسط طرح پژوهشی شماره ۸۶۱۰۳/۳۱ صندوق حمایت از پژوهشگران ریاست جمهوری و معاونت پژوهشی دانشگاه تهران مورد حمایت مالی قرار گرفته است.

### منابع

1. Bassani-Molinias MM. Transient transfection of HEK293 cells in suspension: process characterization and optimization by applying invasive nucleotide and non-invasive electronic nose technology. Doctoral thesis. Universität Carolus-Wilhelmina zu Braunschweig, Germany. 2003.
2. Jordan M, Schallhorn A, Wurm FM. Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. Nucl Acid Res. 1996; 24(4): 596-601.
3. Wordragen MV, Shakya R, Verkerk R, Peytaviv R, et al. Liposome-mediated transfer of YAC DNA to tobacco cells. Plant Mol Biol Rep. 1997; 15: 170-178.
4. Lonz C, Vandenbranden M, Ruyschaert MJ. Cationic liposomal lipids: From gene carriers to cell signaling Progress. Lipid Res. 2008; 47(5): 340-347.
5. Felgner JH, Kumar R, Sridhar CN, Wheeler CJ, et al. Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. J Biol Chem. 1994; 269: 2550-2561.
6. Gavrilescu LC, Van Etten RA. Production of replication-defective retrovirus by transient transfection of 293T cells. J Vis Exp. 2007; 10: 550.
7. Graham FL, van der Eb AJ. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. Virology 1973; 52: 456-467.

می‌کنند، جلوگیری شود (لازم به ذکر است که مواد لیزوزوموتروپیک موادی هستند که به طور ترجیحی در لیزوزومها تجمع پیدا می‌کنند) (۸). در حقیقت فسفات کلوکین می‌تواند pH اندوزوم را تنظیم کند و فرآیند اسیدی شدن را بر هم بزند و بنابراین باعث افزایش اسمولاریته و در نهایت پارگی وزیکول‌ها گردد که در نتیجه آن DNA پلاسمیدی به داخل سیتوپلاسم آزاد می‌گردد (۹ و ۱۰).

این نکته قابل ذکر است که فسفات کلوکین کارایی ترانسفکشن سلول‌های سرطانی کولون (SW480) و سلول‌های سرطانی پروستات (PC-3) را افزایش نداد. دلیل این امر می‌تواند تفاوت در خصوصیات بیولوژیک (مانند تراوایی غشایی) میان سلول‌های HEK293T و سلول‌های ذکر شده باشد. بنابراین به نظر می‌رسد که ماده فسفات کلوکین به طور ترجیحی تنها باعث افزایش ترانسفکشن عده‌ای از سلول‌ها می‌شود.

فسفات کلوکین اول بار برای ترانسفکشن سلول‌ها با DNA ویروس پولیوما مورد استفاده قرار گرفت (۲۰) و از آن زمان تاکنون به عنوان یک ماده موثر در ترانسفکشن برای عده‌ای از سلول‌های پستانداران مورد استفاده قرار گرفته است (۲۱ و ۲۲). میزان افزایش کارایی ترانسفکشن توسط فسفات کلوکین به نوع سلول - محیط کشت و روش ترانسفکشن بستگی دارد و بنابراین محققین دیگری که از فسفات کلوکین برای تحریک ترانسفکشن سلولی استفاده کرده‌اند میزان افزایش متفاوتی را تجربه کرده‌اند. برای مثال در مورد رده سلولی استئوسارکوما افزایش ۳ برابری ترانسفکشن توسط فسفات کلوکین گزارش شده است (۲۲) و یا گروه دیگری توانسته‌اند ترانسفکشن سلول‌های رت را با DNA ویروس پولیوما تا ۶ برابر توسط فسفات کلوکین افزایش دهند (۲۰). گروه دیگری ترانسفکشن سلول‌های CHO (Chinese hamster ovary) را با پلاسمید *pSV2neo* توسط فسفات کلوکین تا ۲۰ برابر افزایش داده‌اند (۲۱). با روش توضیح داده شده در این مقاله ما نشان می‌دهیم که کارایی ترانسفکشن سلول‌های HEK293T به طور قابل ملاحظه‌ای تا ۸ برابر می‌تواند توسط فسفات کلوکین افزایش یابد. به علاوه ما نشان می‌دهیم که دو ماده گلیسرول و یا DMSO (که هر دو به عنوان محرک‌های ترانسفکشن سلول‌ها شناخته شده‌اند) اثر افزایشی ترانسفکشن توسط فسفات کلوکین را از بین می‌برند. بنابراین با توجه به نتایج فوق توصیه نمی‌کنیم که این محرک‌ها توأم با فسفات کلوکین مورد استفاده

8. Moore NM, Sheppard CL, Sakiyama-Elbert SE. Characterization of a multifunctional PEG-based gene delivery system containing nuclear localization signals and endosomal escape peptides. *Acta Biomaterialia*. 2009; 5: 854-564.
9. Erbacher P, Roche AC, Monsigny M, Midoux P. Putative role of chloroquine in gene transfer into a human hepatoma cell line by DNA/lactosylated polylysine complexes. *Exp Cell Res*. 1996; 225: 186-194.
10. Wolfert MA, Seymour LW. Chloroquine and amphipathic peptide helices show synergistic transfection in vitro. *Gene Ther*. 1998; 5(3): 409-414.
11. Bruce Chwatt, L.J. *Essential malariology*; 2<sup>th</sup> Ed. John Wiley & Sons Inc. New York, NY. 1985.
12. Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D. Production of high-titer helper free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(18): 8392-8396.
13. Kang Y, Saile E, Schell MA, Deny TP. Quantitative immunofluorescence of regulated *eps* gene expression in single cells of *Ralstonia solanacearum*. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 2356-2362.
14. Welzel T, Radtke T, Meyer-Zaika W, Heumann R, et al. Transfection of cells with custom-made calcium phosphate nanoparticles coated with DNA. *J Mat Chem*. 2004; 14: 2213-2217.
15. Tsien RY. The green fluorescent protein, *Ann Rev Biochem*. 1998; 67: 509-544.
16. Kingston RE, Chen CA, Rose JK. Calcium phosphate transfection. *Curr Prot Mol Biol*. 2003; Chapter 9: Unit 9.1.
17. Cooper RG, Magwere T. Chloroquine: Novel uses and manifestations. *Indian J Med Res*. 2007; 127: 305-316.
18. Boya P, Gonzalez-Polo RA, Poncet D, Andreau K, et al. Mitochondrial membrane permeabilization is a critical step of lysosome-initiated apoptosis induced by hydroxychloroquine. *Oncogene* 2003; 22: 3927-3936.
19. Ciftci K, Levy RJ. Enhanced plasmid DNA transfection with lysosomotropic agents in cultured fibroblasts. *Int. J. Pharmaceutics*. 2001; 218(1-2): 81-92.
20. Luthman H, Magnusson G. High efficiency polyoma DNA transfection of chloroquine treated cells. *Nucl Acid Res*. 1983; 11(5): 1295-1308.
21. Mazahir T, Hasan RS, Chang TY. High-efficiency stable gene transfection using chloroquine-treated Chinese hamster ovary cells. *Soma Cell Mol Genet*. 1991; 17: 513-517.
22. Karikó K, Kuo A, Barnathan ES, Langer DJ. Phosphate-enhanced transfection of cationic lipid-complexed mRNA and plasmid DNA. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1369(2): 320-334.

## Chloroquine Phosphate Is a Potent Inducer Only in Absence of Glycerol or DMSO to Enter DNA into the HEK293T Cells

Ansari S, M.Sc., Saghaeian Jazi M, M.Sc., Salmanian S, M.Sc., Arab Najaf SM, Ph.D.\*

- Department of Cell & Molecular Biology, School of Biology, College of Sciences, University of Tehran, P.O. Box 14155-6455, Tehran, Iran

\* Email corresponding author: najafim@khayam.ut.ac.ir

Received: 24 Jun. 2013

Accepted: 14 Jan. 2014

---

### Abstract

**Aim:** Different methods have been used for introducing DNA into mammalian cells. Calcium phosphate-based transfection protocols are inexpensive and easy to perform, however, the transfection efficiency in some cases is not satisfactory. In this study we try to increase the efficiency of calcium phosphate-mediated cell transfection.

**Material and Methods:**  $2.0 \times 10^5$  HEK293T cells were plated in each well of a 6-well plate containing a 10% poly L lysine-coated coverslip and grown to 60% confluency. The cells were then transfected with a plasmid encoding GFP (Green Fluorescence Protein), using a standard calcium phosphate protocol in the presence or absence of chloroquine phosphate. GFP protein expression was observed by immunofluorescence microscopy and quantified with the help of Image J software.

**Results:** We have shown that chloroquine phosphate can highly improve the efficiency of calcium phosphate-dependent transfection in the HEK293T cells, leading to an approximate 8-fold increase in the number of transfected cells. Chloroquine phosphate was not toxic to the cells, however, its positive effect on transfection efficiency was abolished in the presence of glycerol or DMSO (Dimethyl sulphoxide).

**Conclusion:** we recommend chloroquine phosphate for increasing the efficiency of transfection by the inexpensive method of calcium phosphate. In addition, we recommend that chloroquine phosphate to be used alone and not along with other inducers of cell transfection.

**Keywords:** Chloroquine phosphate, Transfection, HEK293T cells