

- ной частотой повторения последовательностей // Там же.— 1982.— 47, № 1.— С. 145—152.
14. *Higgins G. M., Anderson R. M.* Experimental pathology of the liver // *Arch. Pathol.*— 1931.— 12, N 2.— P. 186—202.
  15. *Оболенская М. Ю., Прима В. И., Платонов О. М.* Гибридизация нуклеиновых кислот эукариот в присутствии высоких концентраций формамида // *Stud. biophys.*— 1983.— 98, N 2.— С. 103—110.
  16. *Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J.* Molecular cloning: A laboratory manual.— N. Y.: Cold Spring Harbor, 1982.— 545 p.
  17. *Прима В. И., Платонов О. М., Газарян К. Г.* Анализ реассоциации фракций ДНК крысы // *Биохимия.*— 1980.— 45, № 3.— С. 498—506.
  18. *Chikaraishi D. M., Deeb S. S., Sueoka N.* Sequence complexity of nuclear RNAs in adult rat tissues // *Cell.*— 1978.— 13, N 1.— P. 111—120.
  19. *Paetkau V., Langman L.* A Quantitative batch hydroxyapatite method for analyzing native and denatured DNA at room temperature // *Analyt. Biochem.*— 1975.— 65, N 1—2.— P. 525—532.
  20. *Britten R. J., Graham D. E., Neufeld B. R.* Analysis of repeating DNA sequences by reassociation // *Meth. Enzymol.*— 1974.— 29E.— P. 363—418.
  21. *Черновская Т. В., Любимова Е. В., Лерман М. И.* Метаболизм мРНК в клетках регенерирующей печени: ускорение процессинга и распада мРНК // *Молекуляр. биология.*— 1976.— 10, № 6.— С. 1364—1368.
  22. *Holland C., Mayrand S., Pederson Th.* Sequence complexity of nuclear and messenger RNA in *HeLa* cells // *J. Mol. Biol.*— 1980.— 138, N 4.— P. 755—778.
  23. *Greene R. F., Fausto N.* Analysis of gene expression in regenerating rat liver by hybridization of nuclear and cytoplasmic RNA with DNA // *Cancer Res.*— 1977.— 37, N 1.— P. 118—127.
  24. *Изменения ультраструктуры цитоплазмы и содержания полирибосом в клетках печени крыс в первые часы после частичной гепатэктомии / О. М. Платонов, Т. Б. Герасимова, В. М. Андрианов и др. // Цитология и генетика.*— 1981.— 15, № 5.— С. 25—28.
  25. *Герасимова Т. Б., Оболенская М. Ю., Платонов О. М.* Авторадиографическое изучение синтеза и перехода в цитоплазму РНК на ранних стадиях регенерации печени // Там же.— 1980.— 14, № 3.— С. 77—82.
  26. *Davidson E. H., Britten R. J.* Regulation of gene expression: Possible role of repetitive sequences // *Science.*— 1979.— 204, N 4397.— P. 1052—1059.
  27. *Газарян К. Г., Тарантул В. З., Баранов Ю. Н.* Transcription of repetitive and unique DNA nucleotide sequences in pigeon erythroid cells with different degrees of specialization // *Differentiation.*— 1976.— 6, N 1.— P. 41—46.
  28. *Co-ordinated control of gene expression. Muscle-specific 7S RNA controls sequences homologous to 3'-untranslated regions of myosin genes and repetitive DNA / P. Khandekar, C. Saidapet, M. Kranskopi et al. // J. Mol. Biol.*— 1984.— 180, N 3.— P. 417—435.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 31.01.86

УДК 579.254.2

## ОПОСРЕДОВАННАЯ ЛИПОСОМАМИ ДОСТАВКА ДНК В ПРОТОПЛАСТЫ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

И. Е. Костецкий, В. А. Кордюм

**Введение.** В последние годы показано, что липосомы способны служить эффективным носителем для введения в клетки биологически активных веществ. В липосомы удается включить как низкомолекулярные соединения, так и макромолекулы, в том числе молекулы РНК и ДНК. С помощью липосом эти биополимеры успешно вводят в клетки млекопитающих [1], растительные протопласты [2], компетентные клетки *Escherichia coli* [3], *Bacillus subtilis* [4] и другие объекты. Основные преимущества липосом как носителей биологически активных веществ заключаются в предохранении включенных соединений от разрушения, повышении включения переносимого материала в клетки, возможности направленного транспорта [5]. Все это позволяет использовать липосомы для доставки требуемых веществ не только в клетки *in vitro*, но и в некоторые органы и ткани *in vivo*.

В настоящее время для генноинженерных исследований важное значение приобретают дрожжи. В связи с этим разработка эффективных методов введения экзогенной ДНК в дрожжи является весьма актуальной. Существующие методы трансформации *S. cerevisiae* не лишены определенных недостатков: специфичность по отношению к типу вводимого материала, зависимость уровня трансформации от степени нуклеазного загрязнения среды инкубации, что влечет за собой нестабильность получаемых результатов. Настоящая работа посвящена исследованию особенностей доставки плазмидной ДНК, заключенной в липосомы, в протопласты дрожжей.

**Материалы и методы. Штаммы и плазмиды.** В работе использовали ауксотрофный по лейцину и гистидину штамм дрожжей *S. cerevisiae* LL20 (*leu2-11 leu2-112 his3-11 his3-15*) [6], бесплазмидный штамм *E. coli* HB101. Используемая в работе плаزمида RB4 [6] содержит, кроме бактериального маркера (*Ap<sup>r</sup>*), дрожжевой ген *leu2* и дрожжевую двухмикронную ДНК.

**Растворы и реактивы.** Среда А: 1,5 %-ный пептон, 1 %-ный дрожжевой экстракт, 2 %-ная глюкоза; среда Б: 0,67 % JNB («Difco», США), 2 %-ная глюкоза, 0,8 М сорбит, 2 %-ный агар-агар, гистидин (20 мкг/мл), триптофан (20 мкг/мл), метионин (20 мкг/мл); раствор 1: 10 мМ трис-НСl, рН 7,5, 0,8 М сорбит, 10 мМ СаCl<sub>2</sub>; раствор 2: хлороформ, метанол, вода (65 : 35 : 4); раствор 3: 10 мМ трис-НСl, рН 7,5, 0,8 М сорбит, 0,1 мМ ЭДТА; раствор 4: 10 мМ трис-НСl, рН 7,5, 40 %-ный ПЭГ, 10 мМ СаCl<sub>2</sub>; раствор 5: 20 мМ трис-НСl, рН 7,5, 1 мМ ЭДТА.

**Получение лецитина.** Фосфатидилхолин из желтков куриных яиц получали методом хлороформ-метанольной экстракции [7] с последующей очисткой его на колонке с окисью алюминия. Чистоту получаемого препарата проверяли методом тонкослойной хроматографии в растворе 2 на стеклянных пластинках, покрытых силикагелем ЛЛ-254 («Сетарол», СССР).

**Получение липосом.** Большие однослойные липосомы получали методом Димера и Бэнгхема [8] в нашей модификации. Для этого 200 мкг ДНК в 0,5 мл раствора 3 помещали в круглодонную колбу, соединенную через водяной холодильник с хирургическим отсасывателем ОПН-2. При пониженном давлении раствор липидов (лецитин : холестерин, 5 : 1) в диэтиловом эфире подавали в раствор ДНК до конечной концентрации липидов в растворе 2 мг/мл. Полученные липосомы освобождали от незаклученной ДНК с помощью ДЭАЭ-сефадекса А-25 [9]. Эту процедуру проводили путем перемешивания липосомной суспензии с 1 см<sup>3</sup> предварительно уравновешенного раствором 3 ДЭАЭ-сефадекса в течение 15 мин, после чего сефадекс отделяли центрифугированием (60 с, 500 g). Полноту освобождения липосом от ДНК, незаклученной в липосомы, определяли в контрольном эксперименте: смесь «пустых» липосом и ДНК очищали на ДЭАЭ-сефадексе (как описано выше), а протопласты трансформировали супернатантом.

**Анализ включения ДНК в липосомы.** «Нагруженные» липосомы после очистки на ДЭАЭ-сефадексе суспендировали в двух объемах этанола и затем центрифугировали (20 000 g, 40 мин). Полученный осадок ДНК растворяли в растворе 5 и на спектрофотометре определяли его количество. Контрольную смесь пустых липосом и ДНК подвергали тем же процедурам.

**Количественный анализ включенной в липосомы ДНК** проводили следующим образом: меченную <sup>3</sup>Н-тимидином плазмидную ДНК после заключения в липосомы обрабатывали панкреатической ДНКазой (200 мкг/мл), затем суспензию липосом осаждали (35·10<sup>3</sup> g, 30 мин) и дважды отмывали раствором 3. Количество заключенной в липосомы ДНК определяли по соотношению радиоактивности исходного и конечного препаратов.

**Качественный анализ включенной в липосомы ДНК** проводили с нерадиоактивными препаратами. После обработки нагруженных липосом ДНКазой добавляли два объема этанола, центрифугировали (20·10<sup>3</sup> g, 40 мин), осадок растворяли в растворе 5 и анализировали, как описано выше.

**Трансформация *S. cerevisiae*.** Протопласты дрожжей получали по методу, предложенному Кирилловой и др. [10]. К 100 мкл протопластов в растворе 1 добавляли 25—100 мкл суспензии липосом и раствором 3 доводили объем каждой пробы до 200 мкл. Инкубировали 15 мин, добавляли 1 мл раствора 4 и инкубировали 30 мин, после этого клетки дважды отмывали 0,8 М сорбитом (все процедуры проводи-

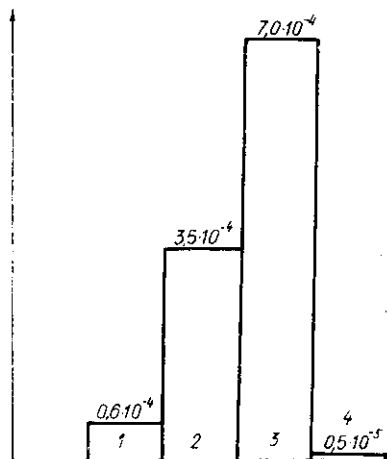
ли при комнатной температуре), ресуспендировали в растворе 3, смешивали со средой Б (при температуре 42 °С) и высевали на чашки Петри. Трансформацию с помощью свободной ДНК проводили в тех же условиях.

**Результаты и обсуждение.** Используемый в работе метод эфирной инъекции позволяет получать стабильные однослойные липосомы, не агрегирующие в течение длительного времени. При этом отсутствие ультразвуковой обработки существенно уменьшает вероятность деградации ДНК в процессе приготовления липосом.

Чтобы проверить, не влияют ли липиды на жизнеспособность протопластов дрожжей, мы добавляли к трансформационной смеси пустые липосомы и после инкубации с ними протопласты высевали в среду Б с лейцином (20 мкг/мл). Уровень регенерации таких протопластов по сравнению с контрольными (необработанными)

Частота трансформации протопластов *S. cerevisiae* плазмидной ДНК (1), ДНК в присутствии «пустых» липосом (2), заключенной внутри липосом ДНК (3), сорбированной на «пустых» липосомах ДНК (4).

Transformation frequency of *S. cerevisiae* protoplasts with plasmid DNA (1), DNA in the presence of «empty» liposomes (2), DNA incorporated into liposomes (3), external DNA adsorbed on «empty» liposomes (4).



ными липосомами) не менялся. Таким образом, липосомы не оказывают на протопласты токсического действия.

Обычным приемом для удаления незаключившейся в липосомы ДНК является гидролиз ее ДНКазой, а степень захвата определяют по количеству ДНК, недоступной гидролизу. В наших экспериментах уровень заключения ДНК в липосомы составлял  $2,3 \pm 0,24$  % внесенной в пробу. После экстракции ДНК из липосом, обработанных ДНКазой, определяли структурную целостность биополимера электрофорезом в агарозном геле. Оказалось, что экстрагированная из липосом ДНК не отличается от исходной по электрофоретической подвижности, биологическая активность ее (по данным трансформации *E. coli*) также не изменяется. Аналогичные результаты были получены при изучении экстрагированной из липосом ДНК после очистки нагруженных липосом на ДЭАЭ-сефадексе.

Нагруженные липосомы инкубировали с протопластами *S. cerevisiae*, как описано выше. При этом число возникающих трансформантов составляло 15—25 % числа трансформантов, возникающих после добавления к культуре дрожжей такого количества свободной ДНК, которое содержалось в липосомной суспензии до очистки на ДЭАЭ-сефадексе. Поскольку величина уровня включения ДНК в липосомы составляет 2—2,5 %, то уровень трансформации протопластов *S. cerevisiae* заключенной внутри липосом ДНК в пересчете на 1 мкг ДНК в 8—12 раз превышает уровень трансформации свободной ДНК (рисунок).

Повышенные частоты трансформации протопластов *S. cerevisiae* заключенной внутри липосом ДНК по сравнению с эквивалентным количеством свободной ДНК можно объяснить тем, что заключенная внутри липосом ДНК защищена от действия ДНКаз, которые гидролизуют трансформирующую ДНК при поглощении клеткой.

Пустые липосомы, к которым добавляли эквивалентное нагруженным количество ДНК с последующей очисткой на ДЭАЭ-сефадексе, трансформировали дрожжи с частотой, составляющей 3—5 % частоты трансформации нагруженными липосомами. Это свидетельствует об

удовлетворительной степени очистки липосом от невключившейся в липосомы ДНК.

При инкубации протопластов с нагруженными липосомами, которые не очищали от незаключенной ДНК, число возникающих трансформантов выше, чем при внесении эквивалентного количества свободной ДНК. Поскольку число трансформантов плазмидной ДНК, заключенной внутрь липосом, составляет, как было указано выше, лишь 15—25 % контрольной трансформации свободной ДНК, то эффект возрастания уровня трансформации связан с невключившейся внутрь липосом ДНК. Мы предположили, что липосомы, взаимодействуя с клеточной мембраной, стимулируют проникновение незаключенной в них ДНК в клетки. Для проверки этого предположения мы инкубировали протопласты со смесью пустых липосом и свободной ДНК, наблюдая при этом значительное увеличение частоты трансформации по сравнению с контрольной трансформацией эквивалентным количеством свободной ДНК. Так, если в пробе концентрация ДНК составляла 20—40 мкг/мл, пустые липосомы в 3—8 раз повышали уровень трансформации, при концентрации же 150—200 мкг/мл подобный эффект отсутствовал (таблица). Смесь нагруженных липосом и свободной ДНК трансформирует протопласты дрожжей с такой же эффективностью.

*Частота трансформации протопластов S. cerevisiae ДНК плазмиды RB4 в присутствии «пустых» липосом*

*Results of transformation of S. cerevisiae protoplasts with plasmid RB4 DNA in the presence of «empty» liposomes*

Концентрация ДНК в пробе, мкг/мл	Концентрация липидов в пробе, мг/мл				
	0	0,4	0,7	1,0	1,3
25	$0,6 \cdot 10^{-4}$	$1,1 \cdot 10^{-4}$	$3,9 \cdot 10^{-4}$	$2,9 \cdot 10^{-4}$	$0,9 \cdot 10^{-4}$
150	$2,6 \cdot 10^{-4}$	$3,0 \cdot 10^{-4}$	$2,5 \cdot 10^{-4}$	$2,8 \cdot 10^{-4}$	—

Приведенные результаты показывают, что липосомы взаимодействуют с протопластами *S. cerevisiae* и переносят заключенную в них ДНК внутрь клеток. По-видимому, при взаимодействии липосом с протопластами дрожжей происходит слияние липосом с мембраной протопласта и проникновение содержимого липосомы внутрь клетки или же захват клеткой липосомы с ее последующим распадом и освобождением содержимого. Эти предположения согласуются с результатами экспериментов по трансформации протопластов дрожжей нагруженными липосомами при внесении в трансформационную смесь ДНКазы. Однако уровень трансформации нагруженными липосомами в присутствии ДНКазы был в 3—5 раз ниже, чем без нее, что, возможно, объясняется тем, что ДНКазы проникает внутрь протопластов и гидролизует внутри них трансформирующую ДНК. Пустые липосомы с добавлением плазмидной ДНК при внесении в трансформационную смесь ДНКазы трансформации не вызывали.

Относительно низкий уровень трансформации протопластов *S. cerevisiae* в присутствии избытка нагруженных липосом (200—500 липосом на протопласт) свидетельствует о невысокой вероятности взаимодействий липосом с протопластами. Возможно, это связано с относительно большими размерами липосом (около 0,5 мкм) по сравнению с размерами протопластов (10 мкм), что затрудняет эндоцитоз столь крупных образований.

Невысокий уровень трансформации протопластов дрожжей плазмидной ДНК, заключенной в липосомы, отмечается в работе [11]: частота трансформации инкапсулированными ДНК была не выше, чем при использовании свободной ДНК.

Смесь пустых липосом и ДНК, концентрация которой в пробе составляет 20—40 мкг/мл, трансформирует протопласты дрожжей с большей эффективностью, чем свободная ДНК. По-видимому, это не связано с увеличением количества компетентных клеток, так как данный эффект отсутствует при более высоких концентрациях ДНК в пробе. Это можно объяснить тем, что в присутствии ионов  $Ca^{2+}$ , входящих в состав трансформационной смеси, образуются комплексы полинуклеотидов с фосфатидилхолиновыми липосомами [9], а взаимодействие таких липосом с протопластами приводит при малой концентрации ДНК в растворе к локальному увеличению этой концентрации на мембранах клеток дрожжей. Ранее было показано, что небольшие несодержащие ДНК липосомы стимулируют (в 26 раз) трансформацию протопластов *Streptomyces coelicolor* плазмидной ДНК *pIJ41* [12]. Исходя из этого, можно предположить, что подобное явление можно наблюдать и на других объектах.

С помощью метода эфирной инъекции образуется довольно гетерогенная смесь липосом размерами 0,3—0,6 мкм. В пересчете на фракцию липосом размером 0,5 мкм число молекул плазмидной ДНК, заключенной в одну липосому, достигает 20—30. Это позволяет при однократном взаимодействии липосомы с клеткой вводить большое число молекул ДНК. Данный факт может играть весьма важную роль при необходимости введения в один протопласт нескольких разных плазмид одновременно. ДНК, заключенная в липосомы, защищена от действия ДНКаз, что позволяет использовать липосомы для переноса нуклеиновых кислот в объекты, обладающие высокой нуклеазной активностью.

Авторы выражают благодарность В. С. Кирилловой за консультативную помощь, оказанную при работе с дрожжами.

#### LIPOSOME-MEDIATED DELIVERY OF DNA TO *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* PROTOPLASTS

I. E. Kostetsky, V. A. Kordyum

Institute of Molecular Biology and Genetics,  
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

#### Summary

To determine the peculiarities of plasmid DNA delivery by liposomes to yeast protoplasts (*Saccharomyces cerevisiae*) plasmid *RB4* was encapsulated into large monolamellar liposomes from lecithin and cholesterolin (mol, ratio 5:1). Fusion of liposomes with protoplasts was carried out. The uptake of plasmid DNA incorporated into liposomes by competent yeast cells was shown to exceed 8-12 fold than of free DNA. Liposomes without incorporated DNA were found to promote transformation of *S. cerevisiae* protoplasts 5-8 fold, if DNA concentration in a sample was 20-40  $\mu\text{g/ml}$ . The effect was absent at higher DNA concentrations in a sample (150-200  $\mu\text{g/ml}$ ).

1. Papahajopoulos O., Wilson T., Taber R. Liposomes as macromolecular for the introduction of RNA and DNA into cells // Transfer cell const. eukaryotic cells: Lect. NATO adv. study Inst. (Sintra-Estori, 1979).—New York; London, 1980.—P. 155—172.
2. Lurquin P. F., Sheky R. E. Effects of conditions of incubation on the binding of DNA-loaded liposomes to plant protoplasts // Plant Sci. Lett.—1982.—28, N 1.—P. 49—61.
3. Transfer of liposome-encapsulated plasmid DNA to *Bacillus subtilis* protoplasts and calcium-treated *Escherichia coli* cells / I. Holubova, Z. Jandova, P. Tichy et al. // Folia microbiol.—1985.—30, N 2.—P. 97—100.
4. Глушова Е. Р., Прозоров А. А. Трансформация компетентных клеток *Bacillus subtilis* посредством хромосомной и плазмидной ДНК, заключенной в липосомы // Генетика.—1983.—19, № 12.—С. 1958—1964.
5. Грегориадис Г., Аллисон Л. Липосомы в биологических системах.—Москва: Медицина, 1983.—384 с.
6. Sterile host yeast (SHY): a eukaryotic system of biological containment for recombinant DNA experiments / D. Botstein, S. C. Falko, E. S. Sue et al. // Gene.—1979.—N 8.—P. 17—24.

7. Кейтс М. Техника липидологии.— М. : Мир, 1975.— 258 с.
8. Deamer D., Bangham A. D. Binding of large liposomes to plant protoplasts and delivery of encapsulated DNA // *Biochim. et biophys. acta.*— 1976.— 443, N 3.— P. 629—634.
9. Трансфекция бактериальных клеток заключенной в фосфолипидные везикулы ДНК фага M13 / Н. О. Беляев, В. Г. Будкер, Т. Г. Максимова и др. // *Молекуляр. биология.*— 1982.— 16, № 3.— С. 612—618.
10. Горлов Ю. И., Кириллова В. С. Методы получения протопластов дрожжей // *Молекуляр. биология.*— 1978.— Вып. 20.— С. 85—94.
11. Ahn J. S., Pack M. Y. Use of liposomes in transforming yeast cells // *Biotechnol. Lett.*— 1985.— 7, N 8.— P. 553—556.
12. Rodicio M. R., Chater K. F. Small DNA-free liposomes stimulate transfection of streptomyces protoplasts // *J. Bacteriol.*— 1982.— 151, N 3.— P. 1078—1085.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 17.01.86

Окончание. Начало см. на с. 22—26.

5. Потапов А. П. Стереоспецифический механизм отбора аминоацил-тРНК рибосомой // Докл. АН УССР.— Сер. Б.— 1982.— № 5.— С. 100—102.
6. Potapov A. P. A stereospecific mechanism for the aminoacyl-tRNA selection at the ribosome // *FEBS Lett.*— 1982.— 146, N 1.— P. 5—8.
7. Потапов А. П. Механизм транслокации пептидил-тРНК и мРНК в рибосоме // Докл. АН УССР.— Сер. Б.— 1982.— № 6.— С. 73—75.
8. Volkenstein M. V., Goldstein B. N. A new method for solving the problems of the stationary kinetics of enzymological reactions // *Biochim. et biophys. acta.*— 1966.— 115, N 2.— P. 471—477.
9. Bardsley W. G., Childs R. E. Sigmoid curves, non-linear double-reciprocal plots and allosterism // *Biochem. J.*— 1975.— 149, N 2.— P. 313—328.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев  
Ин-т биофизики АИ СССР, Пушкино

Получено 26.07.85