



УДК 575.21:577.352

ТРАНСФОРМАЦИЯ ПРОТОПЛАСТОВ *STREPTOMYCES GRISEUS* ХРОМОСОМНОЙ И ПЛАЗМИДНОЙ ДНК, ЗАКЛЮЧЕННОЙ В ЛИПОСОМЫ

А. С. Стенько, Б. П. Мацелох, Т. Д. Дехтяренко, Е. Е. Стефанишин,
А. В. Стефанов, П. К. Безкоровайная, Л. В. Полищук, Н. Н. Малковский

Введение. В настоящее время липосомы широко применяются в биологии и медицине для решения разных задач. В молекулярно-биологических и генетических исследованиях их начали применять для введения генетического материала (ДНК, РНК, отдельные хромосомы, клеточные ядра) в животные клетки, протопласты растений и микроорганизмов [1—7]. Исследования по трансформации микроорганизмов с применением липосом малочисленны и представляют значительный интерес для генетической инженерии. Мейкинс и др. выполнили работу с использованием липосом на *Streptomyces coelicolor* и *S. clavuligerus* [6, 7], Родфорд и др. — на *Neurospora crassa* [8], Прозоров и др. — на *Bacillus subtilis* [9]. Полученные ими результаты свидетельствуют о высокой эффективности введения чужеродной ДНК в протопласты и клетки микроорганизмов с помощью липосом, обеспечивающих надежную защиту ДНК от воздействия нуклеаз и полностью сохраняющих ее биологическую активность [10, 11].

Целью настоящей работы явилось выяснение возможности использования липосом при трансформации протопластов *Streptomyces griseus* хромосомной и плазмидной ДНК.

Материалы и методы. В работе использованы следующие штаммы стрептомицетов и бактерий: прототрофный штамм 773 *S. griseus*, бесплазмидный штамм 68-31 *thi leu S. griseus*, *S. lividans TC8*, несущий гибридную плазмиду *pI12 Neo^r*, полученный от Д. Холвуда (Англия), стрептомицет глобиспориновой группы *S. species 1912*, содержащий плазмиду *pSG1912 Ant^r*, детерминирующую образование антибиотика неизвестной природы, который угнетает рост тест-штамма 165 и принадлежит к той же группе стрептомицетов, полученный из музея культур отдела общей и почвенной микробиологии Ин-та микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного АН УССР. Штамм *E. coli C600*, содержащий плазмиду *pBR322*, получен из Ин-та микробиологии АН ЧССР. Хромосомную ДНК получали по модифицированному методу Мармура [13], плазмидную — по Бирнбойму и Доли [14], а также методом равновесного центрифугирования в градиенте плотности CsCl — этидия бромид (ЭБ) по Кирби [15].

Для получения липосом использовали яичный лецитин, выделенный по методу Бенгхема [16]. Чистоту лецитина контролировали посредством тонкослойной хроматографии на пластинках *Silufol UV254* («Kavalier», ЧССР) в системе хлороформ : метанол : вода (65 : 35 : 4). В опытах использовали нейтральные липосомы из яичного лецитина, положительно заряженные липосомы, мембрана которых содержала лецитин и стеариламин (7 : 1, моль/моль), а также отрицательно заряженные липосомы, состоящие из лецитина и дицетилфосфата в соотношении 7 : 1, моль/моль. Раствор липидов в хлороформе (20 мг/мл) вносили в круглодонную колбу и высушивали при пониженном давлении в роторном испарителе. К образовавшейся тонкой пленке липида добавляли ДНК в концентрации 14—52 мкг/мл и 185—370 кБк ³H-ДНК в буферном растворе (среда Р для получения протопластов [17]). Для разрушения невключившейся ДНК к

суспензии липосом добавляли 50—100 мкг/мл ДНКазы и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Для удаления нуклеотидов суспензию липосом пропускали через колонку (1,5×20 см) ультрагеля АСА34, уравновешенного буферным раствором. Включение ДНК в липосомы оценивали по уровню радиоактивной метки ^3H -ДНК на сцинтилляционном счетчике Rack-Beta («LKB», Швеция), с использованием сцинтиллятора Брея.

Трансформация протопластов хромосомной и плазмидной ДНК, включенной в липосомы. Протопласты штамма *S. griseus 68-31 thi leu*, устойчивого к 0,5 мкг/мл неомидина, получали по модифицированной методике Оканиши [17]. Трансформационная смесь состояла из равных объемов (по 0,2 мл) протопластов (10^5 — 10^9 клеток в 1 мл) и липосом, нагруженных ДНК (10^{10} вирионов в 1 мл), а также двойного объема (0,8 мл) 20 %-ного полиэтиленгликоля (ПЭГ) с молекулярной массой 1000. После инкубации в течение 3 мин при мягком покачивании смесь разбавляли средой Р до 4 мл, центрифугировали при 2000 об/мин в течение 15 мин и рассеивали на полноценную среду регенерации R_2 . Спустя 5—7 сут регенерировавшие колонии отсеивали на полноценную среду тотально и выращивали до получения обильной споруляции, а затем проводили генетический анализ регенерантов. Для выделения трансформантов по хромосомным маркерам в среды добавляли факторы роста тиамин и лейцин; клоны, трансформированные *pII2*, отбирали на средах, содержащих 10 и 30 мкг/мл неомидина. Трансформанты, полученные с помощью плазмидной ДНК *pSG1912*, идентифицировали среди колоний регенерантов на соевой среде перепечатыванием на газон со штаммом тест-культуры *165*.

Результаты и обсуждение. Меченная ^3H -ДНК *pBR322* взята нами как модельная для изучения взаимодействия липосом с различным зарядом и ДНК. Установлено, что включение ДНК зависит от заряда мембраны липосом. Наиболее высокий процент включения меченой ДНК отмечался в положительно заряженные липосомы и составлял 8 % исходного количества ДНК, тогда как в нейтральные липосомы включался 1,6 % ДНК, а в отрицательно заряженные — 0,8 %. Результаты трансформации хромосомной и плазмидной ДНК, заключенной в липосомы, по маркерам *thi*⁺, *leu*⁺, *thi*⁺*leu*⁺, *Neor* и по признаку угнетения роста тест-штамма (образование зон) представлены в таблице. Расчет частоты трансформации проводили по отношению полученных трансформантов к числу проверенных, тотально отсеянных колоний регенерантов в опытах с липосомами и включенной ДНК. Ошибку вычисляли по Пуассону.

Как видно из таблицы, трансформация протопластов хромосомной ДНК, заключенной в липосомы, происходит с высокой частотой, которая на 2—3 порядка выше частоты трансформации с помощью ДНК, используемой без липосом. Частота образования одинарных и двойных трансформантов была одного порядка и практически не зависела от заряда мембраны липосом и концентрации ДНК, используемой в наших исследованиях (1 мкг/мл и 0,1 мкг/мл). Частота трансформации протопластов с помощью ДНК *pSG1912* и липосом по признаку угнетения роста тест-штамма *165* (рис. 1) составляла $2 \cdot 10^{-1}$ на 1 мкг/мл ДНК, тогда как при использовании плазмидной ДНК без липосом она составляла $3 \cdot 10^{-3}$, что на два порядка ниже опытной. Всего выделено 439 клонов, 20 из которых были изучены биохимически для выявления плазмиды *pSG1912*. Все 20 проверенных клонов стабильно в течение 6—7 генераций сохраняли плазмидную ДНК, которая по скорости движения в агарозном геле соответствовала характеристикам плазмиды *pSG1912* (рис. 2). Необходимо отметить, что плазмидную ДНК выделяли только по методу Бирнбойма и Доли, попытка выделить плазмиду методом равновесного центрифугирования в градиенте плотности CsCl —ЭБ была безуспешной. При хранении полученных клонов в течение 12 генераций в лабораторных условиях у ряда трансформантов плазмиду выделить не удалось, хотя фенотип их сохранялся.

Отбор неомидиностойчивых клонов, полученных при использовании ДНК плазмиды *pII2*, осуществляли методом непрямой селекции с последующим отсеиванием на среды с неомидином в концентрации 10 и

30 мкг/мл. Среди 1424 проверенных регенерантов было получено 232 клона, устойчивых к неомицину, т. е. частота появления неомицинрезистентных клонов составляла $2 \cdot 10^{-1}$ на 1 мкг/мл ДНК, тогда как в контроле без использования липосом она была $3 \cdot 10^{-3}$. Из указанных 232 *Neor* клонов 24 были отобраны для биохимической проверки на наличие плазмиды *pII2*. В результате проведенного скрининга плаزمиды *pII2* обнаружена только у двух клонов. Наличие плазмиды *pII2* подтверждалось каждой из проверок в течение семи генераций (рис. 3). При дальнейшем хранении этих клонов в течение 11—12 генераций фенотип их сохранялся, но плазмиду выделить не удалось. Это, по-видимому, связано

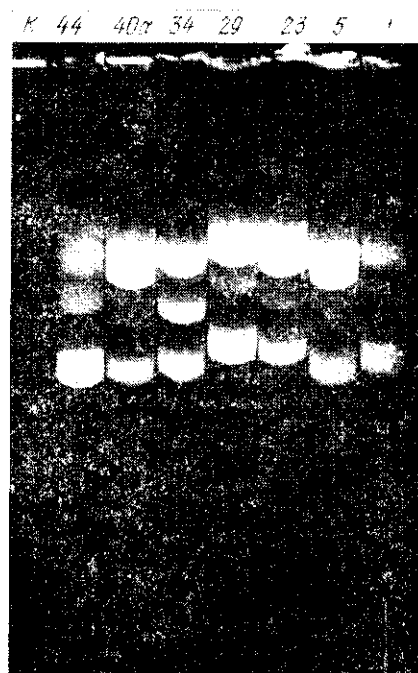
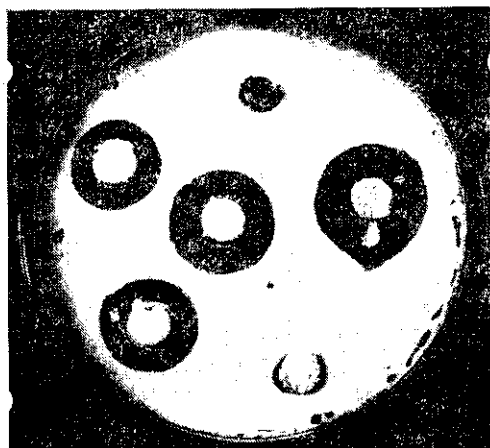


Рис. 1. Угнетение роста штамма 165 штаммом 1912 и трансформантами. Газон штамма 165, на который наложены агаровые блоки с выросшими культурами: справа — штамм 1912; внизу — штамм 165; вверху — штамм 68 (бесплазмидный); в центре и слева — трансформанты.

Fig. 1. Inhibition of strain 165 growth by strain 1912 and transformants. Plate with culture of strain 165, where agar blocks with grown cultures are superposed: on the right — strain 1912, in the lower part — strain 165, in the upper part — strain 68 (without plasmid), in the centre and on the left — transformants.

Рис. 2. Электрофорез в агарозном геле препаратов плазмидной ДНК, выделенной из штамма реципиента *S. griseus* 68-31, трансформантов 44, 40a, 34, 29, 23, 5, 1 [2—8].

Fig. 2. Agarose gel electrophoresis in the preparations of plasmid DNA isolated from transformants: 1 — strain-recipient *S. griseus* 68-31; 2-8 — transformants 44, 40a, 34, 29, 23, 5, 1.

со встраиванием плазмиды в хромосому трансформанта, что и подтверждается длительным сохранением маркера неомицинустойчивости, детерминированного плазмидой *pII2*. Высокая частота трансформации протопластов стрептомицетов с помощью хромосомной ДНК, заключенной в липосомы, показана у *S. coelicolor* и *S. clavuligerus* [6, 7]. В этих трансформационных системах аукоотрофные и прототрофные штаммы поочередно служили и донорами, и реципиентами. Эффективность трансформации по маркерам прототрофности и антибиотикорезистентности была одинаково высокой и составляла 10%, тогда как по маркерам аукоотрофности экспрессировалось только 2—4% колоний. Возможно, такая высокая частота трансформации связана с тем, что авторы для получения липосом использовали фосфолипиды, изолированные из клеточной стенки этих же стрептомицетов. Использование в наших исследованиях фосфолипидов другой природы позволило получить такой же высокий уровень трансформации, так что, по-видимому, природа фосфолипидов не играет такой важной роли в эффективности трансформации. Очевидно, определяющим здесь явля-

ются липосомы как инструмент для введения и защиты ДНК. На первых этапах работы с липосомами мы использовали смесь липосом и ДНК (контроль 1), и частота трансформации в этом случае была на уровне частоты трансформации с помощью одной ДНК без липосом (контроль 2). Липосомы при этом не влияли на регенерацию протопластов, и выживаемость после регенерации составляла в среднем от

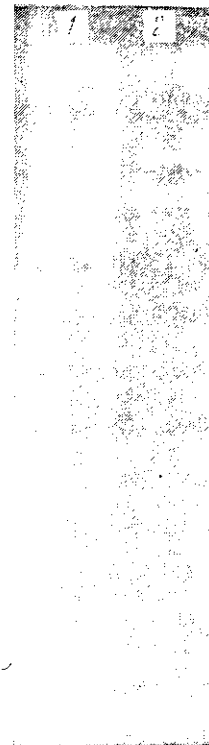
Частота трансформации протопластов *S. griseus* 68-31 *thi leu* хромосомной и плазмидной ДНК
Frequency of the transformation of protoplasts of *S. griseus* 68-31 *thi leu* by the chromosome and plasmid DNA

Донор ДНК (1 мкг/мл)	Использование липосом	Маркер или признак	Частота трансформации
Хромосомная ДНК штамма 773	+	<i>thi</i> ⁻	$1 \cdot 10^{-1} \pm 0,006$
	-	<i>leu</i> ⁻	$6 \cdot 10^{-2} \pm 0,005$
	+	<i>thi</i> ⁺ <i>leu</i> ⁺	$1 \cdot 10^{-1} \pm 0,007$
	-	<i>thi</i> ⁻	Нет
	-	<i>leu</i> ⁺	$1,8 \cdot 10^{-4} \pm 0,0002$
	-	<i>thi</i> ⁺ <i>leu</i> ⁺	Нет
ДНК плазмиды <i>pI12 Neo</i> ^r	+	<i>Neo</i> ^r	$1,8 \cdot 10^{-1} \pm 0,007$
	-	»	$8 \cdot 10^{-3} \pm 0,0001$
ДНК плазмиды <i>pSG1912 Ant</i> ^r	+	<i>Ant</i> ^r	$2 \cdot 10^{-1} \pm 0,0001$
	-	»	$3 \cdot 10^{-3} \pm 0,0002$

Примечание. «+» — с использованием липосом; «-» — без них.

Рис. 3. Электрофорез в агарозном геле препаратов плазмидной ДНК: 1 — из *S. lividans* TC8 (*pI12*); 2 — из трансформанта, устойчивого к неомицину.

Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of the plasmid DNA preparations: 1 — from strain *S. lividans* TC8 (*pI12*); 2 — from transformant *Neo*^r.



$4 \cdot 10^4$ до $5-6 \cdot 10^5$. При трансформации протопластов лизатом клеток как источником свободной ДНК по хромосомным маркерам у *S. purpurinus* также получена высокая частота трансформации [19]. В наших исследованиях частота трансформации практически не отличалась при использовании положительно и отрицательно заряженных липосом, хотя ранее Ларквин [3, 20] при введении ДНК плазмиды *pBR322*, меченной ³H-тимидином, в протопласты листьев табака с помощью липосом показал, что наиболее эффективными являются положительно заряженные липосомы. С одной стороны, они более эффективно защищают ДНК от действия нуклеаз, а с другой — обладают более высокой ДНК-связывающей способностью по сравнению с отрицательно заряженными липосомами, что позволяет использовать более низкие концентрации нуклеиновых кислот и сводит к минимуму структурные и метаболические повреждения протопластов при взаимодействии с липосомами. Молекулярные механизмы поглощения ДНК, заключенной в липосомы, изучены недостаточно, однако на основании высокой частоты трансформации, полученной в экспериментах с применением липосом, можно предположить, что липосомы в данном случае функционируют как искусственные протопласты, и здесь наблюдается процесс, аналогичный их слиянию. Сначала происходит слияние мембран липосом и протопластов, а затем слияние и смешивание содержимого; при этом генетический материал не подвергается разрушению из-за отсутствия нуклеаз периплазматического пространства клетки [21, 22].

Мейкинс [6] на основании собственных и литературных данных пришел к заключению, что в липосомы заключаются ДНК с молекулярной массой $8-10 \cdot 10^6$ в количестве, эквивалентном 3—5 копиям генома.

Таким образом, с помощью хромосомной и плазмидной ДНК, заключенной в липосомы, осуществлена трансформация протопластов *S. griseus*, которая по эффективности была на 2—3 порядка выше контрольной без использования липосом.

TRANSFORMATION OF *STREPTOMYCES GRISEUS* PROTOPLASTS
BY CHROMOSOMAL AND PLASMID DNA
INCAPSULATED IN LIPOSOMES

A. S. Stenko, B. P. Matsiyukh, T. D. Dekhtyarenko, E. E. Stephanishin,
A. V. Stefanov, N. K. Bezkorovainaya, L. V. Polishchuk, N. N. Mashkovsky

D. K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

S. griseus protoplasts are transformed by chromosomal and plasmid DNA encapsulated in liposomes. The frequency of transformation by chromosomal markers of prototrophy and by plasmid markers of resistance to neomycin and the formation of growth inhibition zones by means of DNA encapsulated in liposomes was two-three orders higher in comparison with control DNA without liposomes.

Plasmid DNA was isolated from transformants and remained stable for 6-7 generations, phenotype being unchanged for 12 generations.

1. Ostro M. D., Giacomoni D., Drey S. Incorporation of high molecular weight RNA into large artificial lipid vesicles // Biochem. and Biophys. Res. Commun. -- 1977. -- 76, N 3. -- P. 836--842.
2. Dimitriadis G. Entrapment of plasmid DNA in liposomes // Nucl. Acids Res. -- 1979. -- 6, N 6. -- P. 2697--2705.
3. Lurguin P. F. Binding of plasmid loaded liposomes to plant protoplasts validity of biochemical methods to evaluate the transfer of exogenous DNA // Plant Sci. Lett. -- 1981. -- 21, N 1. -- P. 31--40.
4. Introduction of liposome encapsulated SV-40 DNA into cells / R. Fraley, S. Subramany, P. Berg, D. Papahadjopoulos // J. Biol. Chem. -- 1980. -- 265, N 21. -- P. 10431--10435.
5. Liposome-mediated association of DNA with plant protoplasts: influence of vesicle lipid composition / F. Rollo, S. Francesco, G. Rino, P. Bruno // Plant Cell. Cult. -- 1980. -- 2, N 1. -- P. 237--246.
6. Makins J., Holt G. Liposome-protoplast interaction of microbial product // FEMS symp. on overproduction of microbial product. -- Hradec Kralove, 1981. -- P. 236.
7. Makins J., Holt G. Liposome-mediated transformation of *Streptomyces* of applied chromosomal DNA // Nature. -- 1981. -- 293, N 5834. -- P. 671--673.
8. Liposome-mediated genetic transformation of *Neurospora crassa* / A. Roodford, A. Sazci, M. J. Trarier, H. Parisi // Mol. and Gen. Genet. -- 1981. -- 184, N 3. -- P. 567--571.
9. Глушова Е. Ф., Прозоров А. А. Трансформация компетентных клеток посредством хромосомной и плазмидной ДНК, заключенной в липосомы // Генетика. -- 1983. -- 19, № 12. -- С. 1958--1963.
10. Willson T., Papahadjopoulos D., Taber R. The introduction of polio-virus RNA into cells via lipid vesicles (liposomes) // Cell. -- 1979. -- 17, N 1. -- P. 77--84.
11. Fucuda J., Nagata T., Tanabe J. Liposome-mediated infection of plant protoplasts with tobacco mosaic virus RNA // Virology. -- 1984. -- 113, N 2. -- P. 752--760.
12. Изучение плазмид стрептомицетов клониспориновой группы / Л. В. Полицук, Т. Д. Дехтяренко, Е. Е. Стефаншин и др. // Микробиол. журн. -- 1985. -- 49, № 4. -- С. 83--88.
13. Marmur J. A procedure for the isolation of desoxyribonucleic acid from microorganisms // J. Mol. Biol. -- 1961. -- 3, N 2. -- P. 208--218.
14. Birnboim H., Doly J. A rapid extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // Nucl. Acids Res. -- 1979. -- 7, N 6. -- P. 1513--1523.
15. Kirby R., Wotton S. Restriction studies on the SCP2 plasmid of *S. coelicolor* // FEMS Lett. -- 1979. -- 6, N 5. -- P. 321--323.
16. Bangham A. D., Hill M. M., Miller N. J. A. Preparation and use of liposomes as models of biological membranes // Methods in membrane biology. -- New York: Plenum press, 1974. -- Vol. 1. -- P. 1--68.
17. Стенко А. С., Безкоровайна Н. К. Получение и регенерация протопласт *S. griseus* // Микробиол. журн. -- 1983. -- 45, № 4. -- С. 29--33.
18. Horwood D. A., Wright H. M. Bacterial protoplast fusion: recombination in fused protoplasts of *S. coelicolor* // Mol. and Gen. Genet. -- 1978. -- 162, N 2. -- P. 307--317.

(Окончание см. на с. 278).

- gels / I. Dretgen, M. Bellard, P. Sassone-Corsi, P. Chambon // *Anal. Biochem.* — 1981. — 112, N 2. — P. 295—298.
7. *Munitatis T., Fritsch E. F., Sambrook J.* Molecular cloning — a laboratory manual. — New York : Cold Spring Harbor, 1982. — 545 p.
 8. *Миллер Дж.* Эксперименты в молекулярной генетике. — М. : Мир, 1976. — 436 с.
 9. *Beck E., Zink B.* Nucleotide sequence and genome organization of filamentous bacteriophages *f1* and *fd* // *Gene*. — 1981. — 16, N 1. — P. 35—58.
 10. *Collins J.* Deletions, insertions and rearrangements affecting *rpoB* gene expression // *Mol. and Gen. Genet.* — 1979. — 173, N 1. — P. 217—220.

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

Получено 15.02.86

Окончание. Начало см. на с. 270—274.

19. *Ochi K.* Protoplast fusion // *Molecular breeding and genetics of applied microorganisms* / Eds K. Sakaguchi, M. Okanishi. — New York : Acad. press, 1980. — P. 88—94.
20. *Lurquin P., Sheely R., Rao N.* Quantitative aspects of nucleic acid sequestration in large liposomes and their effects on plant protoplast // *FEBS Lett.* — 1981. — 25, N 2. — P. 183—187.
21. *Weisman G., Cohen C., Hoffstein S.* Introduction of enzymes by means of liposomes, into non-phagocytic human cells *in vitro* // *Biochim. et biophys. acta.* — 1977. — 498, N 2. — P. 375—385.
22. *Маргулис Л. Б., Нейфах А. А.* Взаимодействие липосом с клетками. Липосомы с жидкокристаллической мембраной // *Успехи соврем. биологии.* — 1982. — 93, № 2. — С. 211—229.

Ин-т микробиологии и вирусологии
им. Д. К. Заболотного АН УССР, Киев

Получено 22.07.85