

1. *Loevstad R. A.* Catecholamine stimulation of copper dependent haemolysis: protective action of superoxide dismutase, catalase, hydroxyl radical scavengers and serum proteins (ceruloplasmin, albumin and apotransferrin // *Acta pharmacol. et toxicol.*—1984. — 54, N 5. — P. 340—345.
2. *Ryden L.* Ceruloplasmin // *Copper proteins and copper enzymes.*—Florida: CRC press, 1984. — V. 3. — P. 38—100.
3. *Fridovich I.* Superoxide dismutases // *Adv. Enzymol.*—1974. — 41. — P. 36—97.
4. *Klug D., Rabani J., Fridovich I.* A direct demonstration of the catalytic action of superoxide dismutase through the use of pulse radiolysis // *J. Biol. Chem.*—1972. — 247, N 15. — P. 4839—4842.
5. *Kirby T. W., Fridovich I.* A picomolar spectrophotometric assay for superoxide dismutase // *Anal. Biochem.*—1982. — 127, N 2. — P. 435—440.
6. *Ceruloplasmin: a scavenger of superoxide radical* / G. Goldstein, H. B. Kaplan, H. S. Edelson, G. Weisman // *J. Biol. Chem.*—1979. — 254, N 10. — P. 4040—4045.
7. *Gutteridge J. M. C., Stocks J.* Ceruloplasmin. Physiological and pathological perspectives // *CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*—1981. — 14. — P. 257—330.
8. *Wolf P. L.* Ceruloplasmin: method and clinical use // *Ibid.*—1982. — 17. — P. 229—245.
9. *Friden E.* Ceruloplasmin // *Copper in the environment.*—New York: Wiley, 1979. — Pt 2. — P. 241—276.
10. *Laurie S. H., Mohammed E. S.* Ceruloplasmin: the enigmatic copper protein // *Coord. Chem. Revs.*—1980. — 33, N 3. — P. 279—312.
11. *ESR evidence of superoxide radical dismutation by human ceruloplasmin* / A. Plonka, D. Metodiewa, A. Zgirski et al. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1980. — 95, N 3. — P. 978—984.
12. *Кинетическое исследование окислительной реакции церулоплазмина* / Е. Л. Саснко, О. Б. Сиверина, В. В. Басевич, А. И. Ярополов // *Биохимия.*—1986. — 51, № 6. — С. 1017—1021.
13. *McCord I. M., Fridovich I.* Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein // *J. Biol. Chem.*—1969. — 244, N 22. — P. 6049—6055.
14. *Nishikimi H., Rao N. A., Yagi K.* The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1972. — 46, N 2. — P. 849—854.
15. *Van Heuvelen A.* Kinetic studies of electron transport reactions at low temperatures in xanthine oxidase // *Ibid.*—1975. — 64, N 3. — P. 963—969.
16. *Гиндилис А. Л., Ярополов А. И., Березин И. В.* Роль механизма действия фермента в проявлении его электрокаталитических свойств // *Докл. АН СССР.*—1987. — 293, № 2. — С. 383—386.
17. *Механизм антиоксидантного действия церулоплазмина* / А. И. Ярополов, А. Г. Сергеев, В. В. Басевич и др. // *Там же.*—1986. — 291, № 1. — С. 237—241.

Ин-т биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Получено 24.02.87

УДК 578.22

ЭФФЕКТИВНЫЙ МЕТОД ВКЛЮЧЕНИЯ ДНК В РЕКОНСТРУИРОВАННЫЕ ОБОЛОЧКИ ВИРУСА СЕНДАЙ

**В. В. Власов, Ю. Д. Кренделев, М. Н. Овандер,
А. С. Райт, В. Е. Репин, Ф. П. Свищарчук**

Введение чужеродной ДНК в клетки эукариот и последующее изучение ее экспрессии — один из самых прямых способов исследования функции генетического материала. Однако методы генетической трансформации эукариотических клеток еще далеки от совершенства. Предложенные к настоящему времени способы переноса генов (преципитация с кальций-фосфатом, прямая микроинъекция в ядро клетки, электропорация и некоторые другие) либо чрезмерно трудоемки, либо применимы не ко всем типам клеток [1, 2]. Перспективными выглядят работы по трансформации с помощью плазмид, упакованных в ретровирусподобные частицы. Однако они требуют предварительной работы по созданию соответствующих векторов и их упаковки [3]. Возможно, компромиссным решением может быть использование плазмид, упакованных в вирусные оболочки в системе *in vitro*. Первые опыты в этом направлении уже проделаны [4]. Достигнутая эффективность упаковки пока невелика, соотношение нуклеиновая кислота : белок оболочки в полученных частицах не превосходит 10 % этого соотношения в вирусе [4].

В настоящей работе для заключения ДНК в реконструированные оболочки вируса Сендай (РОВС) применена процедура замораживания — оттаивания.

Материалы и методы. Получение вируса. Вирус Сендай (линия 960) выращивали и выделяли, как описано [5]. Для получения [³⁵S]-меченного вируса в алантонский мешок во время инфекции вводили 18,5 МБк [³⁵S]метионина в 200 мкл 0,14 М NaCl, pH 7,6. Это давало выход вируса с удельной радиоактивностью (1—5)·10⁵ имп·мин⁻¹ на 1 мг вирусного белка.

Приготовление РОВС. РОВС получали, используя процедуру медленного диализа [6]. Вместо октилглюкозида использовали CHAPS, 3-(3-холамидопропил)диметиламмоний-1-пропансульфонат.

Выделение и мечение ДНК. Плазмиду *pBR322* и ДНК фага λ выделяли, как описано ранее [7]. После гидролиза (рестриктазами *EcoRI* — *pBR322*, *BamHI* — фага λ) ДНК метили α[³²P]АТФ с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I [7].

Электрофорез ДНК. Электрофорез проводили в 1%-ном агарозном геле в буфере, содержащем 40 мМ трис-ацетат, pH 8,0, 20 мМ натрий-ацетат, 1 мМ ЭДТА. После окраски бромистым этидием полосы, содержащие ДНК, вырезали. Относительное содержание ДНК в полосах определяли по содержанию ³²P на счетчике «Мини-бета» («ЛКВ», Швеция).

Культура клеток. В работе использовали клетки асцитной карциномы Кребс-2, перевиваемой на мышах линии *CC57BR*. Клетки, извлеченные из брюшной полости мыши, трижды отмывали на холоду средой Игла и инкубировали с РОВС или вирусом в этой же среде при плотности 5·10⁶ клеток в 1 мл. После инкубации клетки трижды отмывали от неприсоединившихся РОВС раствором (0,01 М трис-НСl, pH 7, 4, 0,15 М NaCl), осаждая клетки центрифугированием при 1000 *g* в течение 10 мин.

Выделение ядер. Ядра из клеток выделяли, применяя гипотонический раствор (10 мМ трис-НСl, pH 7,4, 6 мМ MgCl₂). К одному объему клеток добавляли 50 объемов гипотонического раствора и после разрыва клеточных оболочек (за окончанием процесса следили под микроскопом) немедленно добавляли 1/5 объема 2,0 М сахарозы. Ядра осаждали центрифугированием при 2500 *g* в течение 10 мин и промывали еще два раза раствором, содержащим 10 мМ трис-НСl, pH 7,4, 330 мМ сахарозу, 5 мМ MgCl₂.

Прочие процедуры. Гемолитическую активность РОВС определяли по [5]; белок — по Лоури [8]. Отмывку РОВС от невключившейся ДНК проводили в 0,14 М NaCl, pH 7,6, осаждая оболочки центрифугированием 60 мин при 40000 *g* и 2 °С (центрифуга J2-21, «Вектап», США). ДНКазную обработку РОВС осуществляли в растворе, содержащем 0,14 М NaCl, 0,01 М NaH₂PO₄, 0,005 М MgCl₂, pH 7,6 и 30 мкг/мл ДНКазы I, в течение 30 мин при 25 °С. Реакцию останавливали, добавляя ЭДТА до конечной концентрации 0,02 М.

Результаты и обсуждение. РОВС получали, используя процедуру медленного диализа. Применение CHAPS вместо октилглюкозида позволяет получать оболочки, обладающие гемолитической активностью (как и в работе [9], нам не удалось получить РОВС, обладающие этой активностью, с помощью октилглюкозида). Изучение взаимодействия полученных таким способом РОВС с клетками асцитной карциномы Кребс-2 показывает, что их поведение сходно с поведением исходного вируса (рис. 1).

Заключение ДНК в РОВС проводили в условиях, подобранных нами ранее для олигонуклеотидов: пять циклов замораживания — оттаивания (жидкий азот — вода, 25 °С) в растворе 1×SSC, содержащем 0,15 М маннит. Существенной является концентрация РОВС — в наших опытах она составляла 20—24 мг/мл по белку. Интерес представлял как суммарный процент включения ДНК в РОВС (в том числе устойчивой к ДНКазе), так и зависимость эффективности включения от длины плазмидной ДНК. Для ответа на эти вопросы мы использовали меченный α[³²P]АТФ *BamHI*-гидролизат фага λ. При полном гидролизе ДНК фага рестриктазой *BamHI* образуются шесть фрагментов длиной 5500, 5626, 6527, 7233, 6770 и 16 841 пар оснований

(п. о.). При проведении электрофореза эти фрагменты разделяются на три полосы (рис. 2). ДНК заключалась в РОВС, как описано выше. Концентрация ДНК составляла 1 мг/мл, объем смеси — 5 мкл. После процедуры перемораживания суспензию РОВС делили на две части. К первой части добавляли 200 мкл буфера с ДНКазой (30 мкг/мл), ко второй — 200 мкл буфера без ДНКазы. После 30 мин инкубиро-

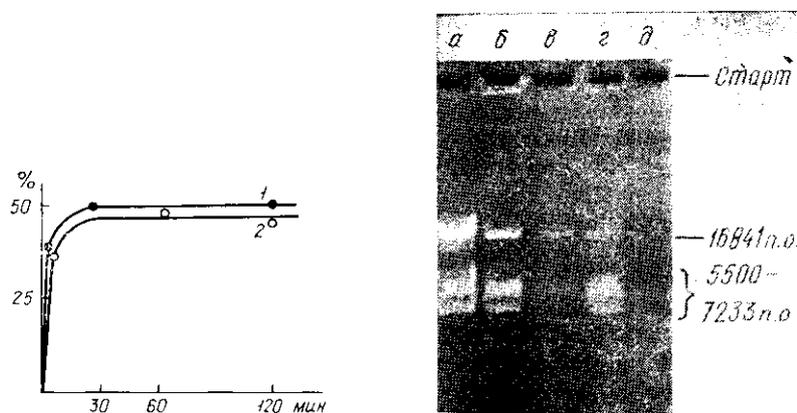


Рис. 1. Присоединение вируса Сендай (меченного ^{35}S) и РОВС (меченных ^{32}P) к клеткам асцитной карциномы Кребс-2 ($5 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл): 1—20 мкг (по белку) вируса Сендай и $1 \cdot 10^7$ клеток; 2—2,4 мкг (по белку) РОВС и $1 \cdot 10^7$ клеток

Fig. 1. Binding of Sendai virus (^{35}S methionine labelled) and reconstituted Sendai virus envelopes (RSVE) (^{32}P labelled) to Krebs-2 ascites tumour cells ($5 \cdot 10^6$ cells/ml): 1—20 μg (by protein) Sendai virus and $1 \cdot 10^7$ cells; 2—2.4 μg (by protein) RSVE and $1 \cdot 10^7$ cells

Рис. 2. Электрофореграмма продуктов расщепления ДНК фага λ рестриктазой *Bam*HI до и после заключения в РОВС методом замораживания—оттаивания: а — *Bam*HI-гидролизат ДНК фага λ ; б — ДНК, заключенная в РОВС (без ДНКазной обработки); в — не включившаяся в РОВС ДНК (1/10 часть супернатанта после осаждения РОВС); г — ДНК, заключенная в РОВС (после ДНКазной обработки); д — супернатант после отмывки РОВС с ДНКазой (контроль действия ДНКазы)

Fig. 2. Analysis of phage λ DNA *Bam*HI restriction fragments before and after encapsulation into RSVE by the freezing-thawing method: а — *Bam*HI restriction fragments of phage λ DNA; б — DNA trapped within RSVE (without DNAase treatment); в — DNA nontrapped within RSVE (10 % of supernatant after RSVE pelleting); г — DNA trapped within RSVE (after DNAase treatment); д — supernatant after RSVE treatment with DNAase (control of the DNAase activity)

ния РОВС осаждали центрифугированием. Десятая часть каждого супернатанта и осадки, растворенные в 2 %-ном DS-Na, наносили на старт 1 %-ного агарозного геля. Подсчет ДНК в отдельных полосах проводили, как описано в «Материалах и методах». Результаты этого опыта представлены на рис. 2 и в табл. 1. Как видно из таблицы, процент включения ДНК в РОВС в изученных пределах не зависит от длины фрагментов. Устойчивость в ДНКазной обработке приобретает около половины количества ДНК, присоединившейся к РОВС. По-видимому, именно эта часть ДНК находится внутри оболочек [4].

Таблица 1

Включение в РОВС фрагментов ДНК фага λ .

Encapsulation of phage λ DNA restriction fragments into RSVE

ДНК, %	Без ДНКазной обработки			С ДНКазной обработкой		
	Всего	Из них длиной 16841 п. о.	Из них длиной от 5500 до 7233 п. о.	Всего	Из них длиной 16841 п. о.	Из них длиной от 5500 до 7233 п. о.
Включившейся в РОВС	39,8	11,0	89,0	17,3	14,2	85,8
Не включившейся в РОВС	60,2	17,0	83,0	—	—	—

Таблица 2

Взаимодействие РОВС, нагруженных ДНК, с клетками асцитной карциномы Krebs-2
Interaction of DNA loaded RSVE with ascites tumor cells Krebs-2

№ опыта	Количество клеток	Количество РОВС, мкг белка	Количество ДНК в РОВС (без ДНК-азной обработки), мкг	Количество ДНК, присоединившейся к клеткам, мкг		
				Всего	Из них в	
					ядре (%)	цитоплазме (%)
1	$2 \cdot 10^8$	100	10,2	1,1 (1100 молекул на клетку*)	0,45 (41)	0,65 (59)
2	$2,5 \cdot 10^8$	60	3,0	1,0 (800 молекул на клетку*)	0,42 (42)	0,58 (58)

Примечание. *EcoRI*-гидролизат плазмиды *pBR322*, меченный ^{32}P , заключали в РОВС методом замораживания — оттаивания. Удельная радиоактивность плазмиды в 1-м опыте — 1,24 ТБк/мМ, во 2-м — 1,9 ТБк/мМ. Количество ДНК, присоединившейся к клеткам, определяли по содержанию ^{32}P на счетчике «Мини-бета» («ЛКВ», Швеция).

* Количество молекул плазмидной ДНК на клетку рассчитывали в предположении отсутствия деградации.

В другом аналогичном опыте, но без подсчета включения отдельных фрагментов, общее включение ДНК в РОВС составило 44,6 %, в том числе 31,0 % — устойчивой к ДНКазе.

Взаимодействие РОВС, нагруженных ДНК, с клетками. Для получения предварительных данных о взаимодействии РОВС, нагруженных плазмидной ДНК, с эукариотическими клетками, мы использовали клетки асцитной карциномы Krebs-2 и плазмиду *pBR322*. Включение ДНК в оболочки производили при концентрации плазмиды 5 мг/мл (опыт № 1) и 15 мг/мл (опыт № 2). После отмывки от невключившейся ДНК РОВС инкубировали с клетками в течение 90 мин при 37 °С в среде Игла. Отмывку клеток от неприсоединившихся РОВС и выделение ядер проводили, как описано выше. Результаты этих экспериментов приведены в табл. 2. Из таблицы видно, что доставка плазмиды к клеткам зависит от соотношения объемов РОВС и клеток, увеличиваясь с уменьшением этого показателя. Метод позволяет доставить в клетки до 30 % ДНК, присоединившейся к РОВС. Из этого количества 40 % метки попадает в ядро. Целостность плазмиды внутри клетки не проверяли. Если предположить, что плазида не деградировала, то в клетку доставляется 800—1100 копий плазмидной ДНК, что близко к оптимальным условиям для генетической трансформации эукариотических клеток [1].

Авторы благодарят Л. А. Якубова за помощь в поддержании культуры вируса и приготовление РОВС с использованием октилглюкозида.

THE EFFICIENT METHOD FOR DNA ENCAPSULATION INTO RECONSTITUTED SENDAI VIRUS ENVELOPES

V. V. Vlassov, Yu. D. Krendelev, M. N. Ovander, A. S. Ryte, V. E. Repin, F. P. Svinarchuk

Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk
Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

The freezing-thawing method is used for encapsulation up to 17000 base pairs DNA into reconstituted Sendai virus envelopes (RSVE). It permits encapsulating up to 30 % of DNA added to the solution. The interaction RSVE loaded with plasmid DNA and Krebs-2 ascites tumours cells results in up to 30 % penetration of the encapsulated material into the cells.

1. *Celis J. E.* Microinjection of somatic cells with micropipettes: comparison with other transfer techniques // *Biochem J.*— 1984.— 223, N 2.— P. 281—291.
2. *Anderson W. F.* Prospects for human gene therapy // *Science.*— 1984.— 226, N 4673.— P. 401—409.
3. *Cepko C. L., Roberts B. E., Milligan R. C.* Construction and applications of a highly transmissible murine retrovirus shuttle vector // *Cell.*— 1984.— 37, N 3.— P. 1053—1062.
4. *Fusogenic* reconstituted Sendai virus envelopes as a vehicle for introducing DNA into viable mammalian cells / A. Vainstein, A. Razin, A. Grassmann, A. Loyter // *Meth. Enzymol.*— 1983.— 101.— P. 493—512.
5. *Hsu M.-Ch., Scheid A., Choppin R. W.* Reconstitution of membranes with individual paramyxovirus glycoproteins and phospholipid in cholera solution // *Virology.*— 1979.— 95, N 2.— P. 476—491.
6. *Reconstitution* and fusogenic properties of Sendai virus envelopes / M. C. Harmsen, J. Wilschut, G. Scherphof et al. // *Eur. J. Biochem.*— 1985.— 149, N 3.— P. 591—599.
7. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 480 с.
8. *Protein* measurement with Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, R. J. Randall // *J. Biol. Chem.*— 1951.— 193, N 1.— P. 265—275.
9. *Citovsky V., Blumenthal R., Loyter A.* Fusion of Sendai virions with phosphatidylcholine-cholesterol liposomes reflects the viral activity required for fusion with biological membranes // *FEBS Lett.*— 1985.— 193, N 2.— P. 135—140.

Ин-т биоорг. химии Сиб. отд-ния АН СССР, Новосибирск
Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 25.02.87

УДК 578.822.1:577.113

НЕКОТОРЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДНК ВИРУСА ДЕНСОНУКЛЕОЗА КОМАРОВ

Л. П. Буцацкий, О. М. Филенко

Мелкий сферический вирус кровососущих комаров — вирус денсонуклеоза (ВДК) поражает комаров родов *Aedes*, *Culex*, *Culiseta*, представляя тем самым значительный интерес в плане разработки биологических методов регулирования численности переносчиков [1].

В предыдущей нашей работе [2] показано, что вирус денсонуклеоза комаров относится к семейству *Parvoviridae*. Основываясь на физико-химических свойствах ДНК, это семейство разделяют на две группы. У представителей одной из них (род *Parvovirus*) в вирионах содержится линейная однонитевая молекула, а у представителей другой (род *Densovirus* и род *Dependovirus*) в отдельных вирионах содержатся комплементарные («плюс» и «минус») нити ДНК. Из рода денсовирусов наиболее полно охарактеризована ДНК вируса большой вошинной моли [3—7]. В настоящей работе приведены результаты изучения ДНК вируса денсонуклеоза комаров.

Материалы и методы. В работе использован штамм ГКВ-002002. Вирус накапливали на личинках лабораторной культуры комаров *Aedes aegypti*, как описано в работе [8]. Очистку ВДК проводили ранее опубликованным способом [2].

ДНК ВДК выделяли по методу, предложенному в работе [9], ее концентрацию определяли спектрофотометрически [10].

Нейтрализованный формальдегид добавляли к суспензии очищенных вирионов и к изолированной ДНК до конечной концентрации 1,8 %. Спектры поглощения снимали сразу же и через 15 ч инкубации при 37 °С на спектрофотометре «Spectrum» (ГДР).

ДНК в 0,1 и 1×SSC инкубировали в интервале температур от 25 до 100 °С в герметически закрытых кварцевых кюветках и спектрофотометрировали при 260 нм на приборе «Spectrum» (ГДР).

Гиперхромизм определяли по формуле: $H = (OD_T / OD_{20^\circ})^{-1} \cdot 100$ %, где OD_T и OD_{20° — оптическая плотность при 260 нм и температуре T и 20 °С соответственно.

Температуру плавления (T_m) определяли как температуру, при которой достигалось 50 % общей величины гиперхромизма.