

19. *Feinberg A. P., Vogelstein B.* A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity // *Anal. Biochem.*— 1983.— **132**, N 1.— P. 6—13.
20. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 480 с.
21. *The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA / Yamamoto, C. G. Davis, M. S. Brown et al.* // *Cell.*— 1984.— **39**, N 1.— P. 27—38.
22. *Identification of a deletion in the LDL receptor gene. A Finnish type of mutation / K. Aalto-Setälä, H. Gylling, T. Miettinen, K. Kontula* // *FEBS Lett.*— 1988.— **230**, N 1, 2.— P. 31—34.
23. *The use of recombinant DNA techniques for the diagnosis of familial hypercholesterolaemia / S. Humphries, R. Taylor, M. Jeenah et al.* // *J. Inher. Metabol. Disease.*— 1988.— **11**, suppl. 1.— P. 33—44.
24. *Gene probes in diagnosis of familial hypercholesterolemia / S. Humphries, R. Taylor, M. Jeenah et al.* // *Arteriosclerosis.*— 1989.— **9**, N 1, suppl.— P. 59—65.

НИИ эксперим. медицины АМН СССР, Ленинград

Получено 13.06.89

УДК 577.212:577.352.27

**С. И. Шиндсвая, И. Е. Костецкий, Л. И. Лихачева, Л. Г. Жарова,
Д. М. Иродов, Е. В. Усенко, Т. В. Столяр, В. А. Кордюм**

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭКСПРЕССИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ β -ГАЛАКТОЗИДАЗЫ IN VIVO С ПОМОЩЬЮ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА

Исследована экспрессия гена бактериальной β -галактозидазы in vivo в гепатоцитах мышцей линии BALB/c. Использовано несколько векторных молекул, содержащих lacZ-ген. Тестирование продукта экспрессии проводили иммунофлюоресцентным методом с последующей микроцитометрией. Обсуждаются преимущества использованного метода тестирования для выявления отдельных трансформированных клеток в популяции гепатоцитов.

Введение. Функциональная коррекция наследственных патологий методами геновой терапии требует детального изучения функционирования введенного генетического материала в клетках различных органов и тканей и включает в себя ряд экспериментальных подходов: тестирование введенной ДНК (ДНК-дот и ДНК-блот анализы) и транскрипта (РНК-блот), тестирование продукта экспрессии (иммуноферментный и др. методы анализа количественного определения белка, Western-блот, использование специфических биохимических субстратов для выявления функциональной активности продукта экспрессии). Все эти методы позволяют оценить эффективность функционирования введенного гена в группе клеток, отдельном органе или ткани по суммарному продукту. В то же время в ряде случаев существует необходимость более точного изучения уровня экспрессии и для этих целей очень удобным инструментом может оказаться непрямо́й иммунофлюоресцентный (ИФ) метод [1]. Целью настоящей работы явилось изучение функционирования бактериального *lacZ*-гена, кодирующего экспрессию β -галактозидазы в гепатоцитах мышей, и возможности корректного использования ИФ-метода для получения быстрого ответа об экспрессии гена на уровне отдельной клетки.

Материалы и методы. В экспериментах по исследованию экспрессии гена бактериальной β -галактозидазы использованы векторные молекулы, содержащие *lacZ*-ген *Escherichia coli*, плазмиды *pGA293* [2] и *pCII110*. Кроме того, применяли конструкцию *pGA293A*, представляющую собой плазмиду *pGA293* с клонированным по *BamHI*-сайту *Alu*-повтором, и плазмиду *pGA293Z^Δ*, лишенную *EcoRI*-фрагмента, содержащего ген бактериальной β -галактозидазы.

В опытах по одновременному введению животным нескольких плазмид использовали *pGA293A* и *pKCR2* (в плазмиду *pKCR* [3] клонирован по *BamHI*-сайту полноразмерный *recA*-ген *E. coli*) в соотношении 1 : 1.

В качестве переносчика ДНК использовали отрицательно заряженные моноламеллярные липосомы размером от 10 до 100 нм. Концентрация липида составляла 20 мг/мл. Плазмидную ДНК заключали в липосомы методом кальцевой плавки (*Ca-fusion*). Количество заключенной в липосомы ДНК соответствовало 7—10 % количества внесенной. Размеры, ламеллярность и сохранность липосом контролировали с помощью электронной микроскопии с использованием методов негативного контрастирования и срезов.

Результаты и обсуждение. В экспериментах, проведенных на мышах, использовали животных линии *BALB/c* двухмесячного возраста. Материал (60 мкл на особь, т. е. 0,3 мг липидов и 10 мкг ДНК) вводили в крупную нижнюю долю печени, из той же доли брали ткань для цитологических препаратов гепатоцитов. Изготовление препаратов гепатоцитов подробно описано ранее [4]. Бактериальную β -галактозидазу тестировали в каждой отдельной клетке образца на цитологических препаратах непрямым ИФ-методом с последующей цитофотометрией через 24 ч и 8 сут при длине волны 520 нм.

Экспрессию *lacZ*-гена, кодирующего синтез бактериальной β -галактозидазы, предварительно проверяли на культуре *Ltk⁻*-клеток. Трансформацию проводили Ca^{2+} -фосфатным методом. Через 4 ч после трансформации *L*-клеток плазмидой *pGA293* примерно у 35 % клеток наблюдалась яркая флуоресценция цитоплазмы в зеленой области спектра, что свидетельствовало о появлении в клетках бактериальной β -галактозидазы. Наличие β -галактозидазы было также подтверждено другим цитохимическим методом — окрашиванием препаратов ОНФГ [5]. В гепатоцитах интактных животных продукт реакции в виде мелких гранул располагался по периферии ядра и клетки, в меньшем количестве — в центральной части цитоплазмы. В опытных вариантах гетерогенность клеток по β -галактозидазной активности по сравнению с контролем проявляется более четко. У большинства клеток отмечается появление плотных скоплений продукта экспрессии β -галактозидазной активности ближе к периферии клетки. Отдельные гранулы продукта располагались вокруг ядер либо свободно — в цитоплазме. У части клеток распределение продукта, обладающего ферментативной активностью, не отличалось от такового в гепатоцитах контрольных животных.

При исследовании экспрессии гена бактериальной β -галактозидазы в гепатоцитах мышей проведено сравнение функционирования двух различных векторов, несущих *lacZ*-ген, — плазмид *pGA293* и *pCH110*. Проведенными ранее [4] экспериментами было показано, что введение в печень мышей чужеродного генетического материала обеспечивает его функционирование в органе в течение 2 сут. При использовании в опытах плазмиды *pCH110* в составе липосом через сутки наблюдались аналогичные результаты, но с более выраженным смещением кривых распределения в сторону увеличения интенсивности флуоресценции, а также незначительным возрастанием доли ярко флуоресцирующих клеток (рис. 1).

Использование же в опытах конструкции *pGA293A* в составе липосом позволило усилить β -галактозидазную активность в гепатоцитах. Происходило увеличение интенсивности флуоресценции цитоплазмы гепатоцитов по сравнению с таковой при работе с плазмидой *pGA293* без *Ain*-повтора. Эффект наблюдался через 24 ч после введения плазмиды в составе липосом. В гепатоцитах контрольной группы животных, которым инъецировалась плаزمида *pGA293Z^A* в составе липосом, проявлялись незначительное увеличение флуоресценции по сравнению с интактными животными и типичная для этого варианта форма распределения.

Изучали также длительность сохранения продукта экспрессии *lacZ*-гена в гепатоцитах животных. По предварительным результатам, через 8 сут после инъекции в печень мышей заключенной в липосомы плазмиды *pGA293A* в гепатоцитах части животных продолжает тестироваться продукт экспрессии *lacZ*-гена, однако максимумы на кривых распределения имеют менее выраженный характер (рис. 1). По-видимому, последовательность *Alu* выполняет здесь либо промоторные,

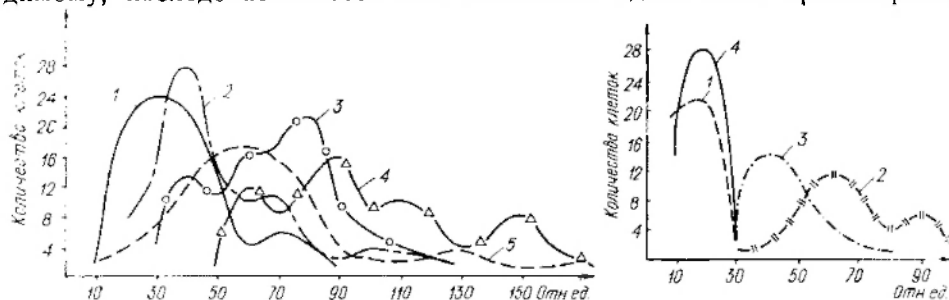


Рис. 1. Распределение гепатоцитов мыши по уровню флюоресценции через 24 ч после инъекции плазмид в составе липосом: 1 — *pGA2293Z^Δ*; 2 — *pGA293*; 3 — *pCH110*; 4 — *pGA293A*; 5 — плазмида *pGA293A* через 8 сут

Fig. 1. Distribution of hepatocytes by fluorescence intensity 24 h after injection of different plasmids included into liposomes: 1 — *pGA2293Z^Δ*, 2 — *pGA293*, 3 — *pCH110*, 4 — *pGA293A*, 5 — 8 days after injection of plasmid *pGA293A* included into liposomes

Рис. 2. Трансформация гепатоцитов *in vivo* плазмидами *pGA293A* и *pKCR2* в составе липосом (2—4) и инъекция ненагруженных липосом (1). Сутки после инъекций: 1—3 — препараты окрашены сывороткой к *RecA*-белку; 4 — сывороткой к β-галактозидазе; 1, 2, 4 — распределение гепатоцитов по уровню свечения цитоплазмы; 3 — ядер

Fig. 2. Transformation of hepatocytes *in vivo* by plasmids *pGA293A* and *pKCR2* included into liposomes (2-4), injection of liposomes (1), 24 h after injections; 1-3 — used non-labeled antiserum to *RecA* protein, 4 — antiserum to β-galactosidase; 1, 2, 4 — distribution of hepatocytes by fluorescence intensity of cytoplasm; 3 — nucleus

либо энхансерные функции, что приводит к большему накоплению продукта экспрессии *lacZ*-гена. Проявление индивидуального ответа и индивидуальных особенностей отдельных животных соответственно здесь выявляются более четко, чем в опытах, где тестирование продукта проводили через сутки. Очевидно, это может быть объяснено наличием различных компенсаторных механизмов, включаемых клеткой.

В ряде случаев существует необходимость одновременного введения нескольких различных генов. Использование липосом позволяет осуществлять доставку различного генетического материала, а применяемый в работе ИФ-метод предоставляет возможность изучать эффективность экспрессии и ее вероятную избирательность в различных клетках исследуемой ткани или органа.

После одновременного введения в клетки печени *in vivo* плазмид *pGA293A* и *pKCR2* в составе липосом продукты экспрессии генов выявляли, используя при окраске препаратов соответствующие кроличьи сыворотки к бактериальной β-галактозидазе и *RecA*-белку (с титрами 1 : 32 и 1 : 16). Через сутки после инъекций у всех опытных животных светимость гепатоцитов после окраски препаратов сывороткой к β-галактозидазе не отличалась по интенсивности от таковой у контрольных животных, которым вводили ненагруженные ДНК липосомы (рис. 2). Этот результат рассматривался как следствие отсутствия бактериальной β-галактозидазы в клетках гепатоцитов и свидетельствовал об отсутствии экспрессии *lacZ*-гена при введении в печень одновременно двух плазмид.

Вместе с тем при окраске препаратов сывороткой к *RecA*-белку уровень флюоресценции гепатоцитов резко возрастал и *RecA*-белок тестировался как в цитоплазме, так и в ядрах гепатоцитов через сутки после инъекции (рис. 2). Таким образом, проведенный эксперимент показывает, что ИФ-анализ позволяет оценивать не только эффектив-

ность экспрессии введенного гена, но и провести сравнительное определение функционирования различных генетических конструкций в клетках органа.

Исходя из опыта работ по тестированию экспрессии чужеродных генов как в культурах клеток животных, так и в клетках органа, ИФ-метод в сочетании с цитофотометрией можно считать достаточно корректным инструментом для быстрой экспресс-оценки функционирования гена. Необходимым условием корректного использования метода является тщательная очистка исходных немеченых сывороток (двукратное высаливание γ -глобулинов сульфатом аммония, очистка их на ДЭАЭ-целлюлозе, доочистка печеночным порошком), что исключает появление перекрестных иммунологических реакций [6, 7]. Следует также избавляться от несвязанного флюорохрома в меченной флюоресценцизотиоцианатом (ФИТЦ) ослиной антикроличьей сыворотке. Метод плацебо, применяемый при измерении флюоресценции клеток, также способствует получению объективных результатов.

Поскольку иммунофлюоресцентный анализ позволяет работать на отдельных клетках, а не на суммарном продукте, несомненным достоинством метода является возможность альтернативного выявления отдельных трансформированных клеток в популяции.

COMPARATIVE STUDIES IN EFFICIENCY OF EXPRESSION OF BACTERIAL β -GALACTOSIDASE IN VIVO BY THE IMMUNOFLUORESCENCE METHOD

*S. P. Shpilevaya, I. E. Kostetsky, L. I. Likhacheva, L. G. Zharova,
D. M. Trodov, E. V. Usenko, T. V. Stolyar, V. A. Kordium*

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

С у м м а р

The expression of some vector molecules encoding the synthesis of bacterial β -galactosidase in mouse liver hepatocytes 24 h after direct injection has been investigated. The advantages of immunofluorescence method with the microcytometry for rapid test of gene expression at the cell level are discussed.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Coons A. H., Ledis E. M., Connolly J. M. Studies on antibody production. I. A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit // *J. Exp. Med.* — 1955 — 102, N 1. — P. 49—59.
2. An. G., Hidaka K., Siminovitch I. Expression of bacterial β -galactosidase in animal cells // *Mol. and Cell. Biol.* — 1982 — 2, N 12. — P. 1628—1632.
3. O'Hare K., Benoist C., Breathnach R. Transformation of mouse fibroblasts to methotrexate resistance by a recombinant plasmid expressing a prokaryotic dihydrofolate reductase // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1981. — 78, N 3. — P. 1527—1531.
4. Экспрессия β -галактозидазы *Escherichia coli* в гепатоцитах мыши // И. Е. Костецкий, С. П. Шпилевая, Л. И. Лихачева и др. // *Биополимеры и клетка.* — 1989. — 5, № 2. — С. 51—58.
5. Rhodes J. M., Blom J. Cytochemical localization of β -galactosidase in resident and inflammatory peritoneal macrophages from *C57BL* mice // *Histochemistry.* — 1986. — 86, N 2. — P. 159—164.
6. Зильбер А. Иммунологический анализ. — М.: Медицина, 1968. — 185 с.
7. Эрнст Б., Тесман Д. Иммунология // *Иммунологические методы.* — М.: Мир, 1979. — С. 373—413.

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

Получено 23.06.89