

Мягкий и эффективный метод пермеабиллизации клеток животных и человека

Б. С. Негруцкий

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
252143, Киев, ул. Академика Заболотного, 150

Одним из наиболее перспективных методов для изучения открытой недавно субклеточной организации ряда метаболических процессов и механизмов их протекания в высших эукариотах является использование пермеабиллизованных клеток. Существующие методы пермеабиллизации предлагают довольно жесткую обработку мембран, приводящую к потере интегральности внутриклеточного содержимого. В настоящей работе для пермеабиллизации клеток животных и человека использован детергент мягкого действия, растительный гликозид сапонин. Это вещество оказалось практически единственным из протестированных, использование которого позволило обеспечить, с одной стороны, существенную сохранность внутриклеточной организации и, с другой, — доступ экзогенных макромолекул внутрь клетки. Разработаны щадящие условия перфорации цитоплазматических мембран, отличающиеся для прикрепленных к поверхности и находящихся в суспензии клеток. Показана высокая функциональная активность пермеабиллизованных клеток и доступность интерьера клеток флюоресцентно меченым белкам.

Введение. Пермеабиллизованные клетки — важный инструмент для изучения самых разнообразных клеточных процессов, предлагающий возможности, недоступные при изучении интактных клеток либо изолированных макромолекул. Позволяя добавление извне ферментов, как и ингибиторов, система пермеабиллизованных клеток сохраняет элементы клеточной структуры, необходимые для протекания этих процессов *in vivo*. Особое значение приобретает использование этой системы в связи с открытием компартиментализации и каналирования многих метаболических путей клетки [1—3]. Механизм каналирования подразумевает наличие статических и динамических фермент-ферментных взаимодействий в процессе синтеза метаболитов, что может быть связано с образованием в субклеточных компартаментах не только стабильных, но и лабильных макромолекулярных ассоциатов [2]. Система пермеабиллизованных клеток незаменима для изучения механизмов протекания метаболических и регуляторных процессов в таких компартаментах. К сожалению, большинство из известных к настоящему времени методов пермеабиллизации предлагает довольно жесткие условия, зачастую приводящие к потере интегральности внутренней структуры клеток, перемешиванию и вытеканию их содержимого

[4]. Применение подобных методов может привести к неадекватным результатам в случае изучения сложноорганизованных и высокоструктурированных процессов, к каким относится, например, клеточный биосинтез белка [3, 5].

Задачей настоящей работы было предложить универсальный метод пермеабиллизации клеток млекопитающих, позволяющий при неограниченном доступе экзогенных макромолекул внутрь клеток сохранить функциональную активность перфорированных клеток и лабильную внутриклеточную инфраструктуру.

Материалы и методы. Реагенты для культивирования клеток произведены «GIBCO» (США); сапонин, компоненты системы белкового синтеза, трипановый голубой — фирмой «Sigma» (США). [¹⁴C]фенилаланин и [³⁵S]метионин были из «ICN» (США). Пластиковая посуда для культивирования клеток предоставлена фирмой «Falcon» (США).

Первичную культуру клеток фибробластов крайней плоти человека Vh25 (15—18 пассажи) поддерживали в ДМЕМ (модифицированная Далбекко среда Иггла) («GIBCO»), дополненной 10 %-й фетальной сывороткой теленка («GIBCO»), при 37 °С в воздухе, содержащем 5 % CO₂. После трипсинизации суспензию клеток разбавляли в 5—10 раз ДМЕМ с 10 %-й фетальной сывороткой теленка, переносили в чашку Петри, на дне кото-

рой помещены стерильные покровные стекла (три стекла на чашку). Клетки оставляли на ночь при 37 °С, после чего использовали для эксперимента.

Культуру клеток яичника китайского хомячка (СНО) поддерживали в монослое в DMEM в присутствии 5 % сыворотки коровы («GIBCO»), 5 % фетальной сыворотки телят, 2 мМ глутамин («Sigma») и 0,35 мМ пролина («Sigma») при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. Клетки пересаживали через каждые 4 дня с разбавлением 1:5 и использовали для экспериментов после достижения ими конfluence.

Критерием пермеабиллизованности клеток была их доступность красителю трипановому голубому, который не проникает сквозь цитоплазматическую мембрану интактных клеток. Для изучения доступности интерьера пермеабиллизованных клеток макромолекулам применяли метод флуоресцентного мечения белков и тРНК [6, 7] с последующим введением макромолекул в пермеабиллизованные клетки.

Результаты и обсуждение. Для выбора процедуры, действие которой на клетку являлось бы наиболее приемлемым компромиссом между эффективностью пермеабиллизации и сохранением внутренней структурированности клетки, был изучен эффект дигитонина, стрептолизина-О, фосфолипазы С, сапонины, а также электропорации на проницаемость цитоплазматической мембраны клеток китайского хомячка. Установлено, что подавляющее большинство указанных методов вызывает полное разрушение части клеток и значительное разрушение ультраструктуры многих других клеток, о чем можно судить как на основании визуальных наблюдений клеток в микроскоп, так и по крайне низкой активности таких клеток в трансляции мРНК, даже при условии инкубации пермеабиллизованных клеток в среде, содержащей низкомолекулярные компоненты бесклеточных систем белкового синтеза. Оказалось, что лишь инкубация клеток с растительным гликозидом сапонином и фосфолипазой С не вызывает заметного изменения клеточной ультраструктуры (данные не приведены). Было, однако, установлено, что применение фосфолипазы С не приводит к достаточно эффективной пермеабиллизации цитоплазматических мембран во всем изучавшемся диапазоне концентраций данного фермента. Таким образом, для последующей работы был выбран сапонин.

На рис. 1 приведена зависимость эффективности пермеабиллизации суспензии клеток СНО от концентрации сапонины. Как следует из рис. 1, а, практически 100 %-я пермеабиллизация клеток достигается при концентрации детергента 100 мкг/мл. Настолько же эффективной пермеабиллизации можно достичь и при более низкой, 75 мкг/мл, концентрации сапонины, если сразу же

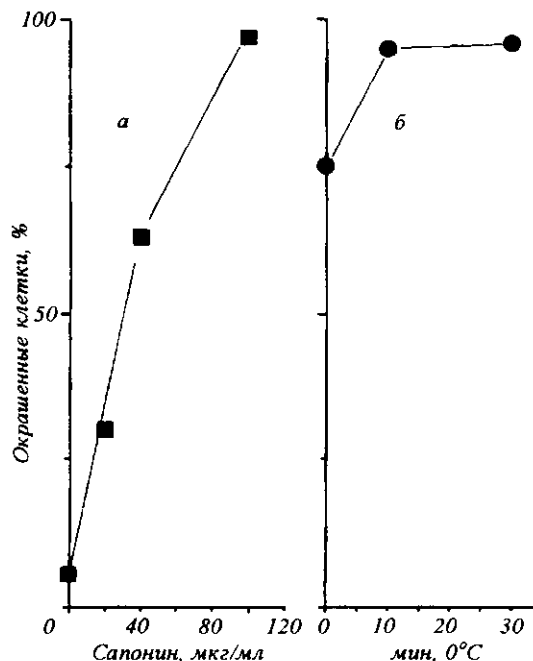


Рис. 1. Пермеабиллизация сапонином клеток СНО в суспензии: а — клетки ($2 \cdot 10^7$) сняты с поверхности флажек трипсином, разделены на аликвоты, ресуспендированы в буфере А и инкубированы с различными концентрациями сапонины. После пермеабиллизации клетки были отцентрифугированы, ресуспендированы в буфере А, окрашены трипановым голубым и подсчитаны в гемацитометре; б — клетки ($2,2 \cdot 10^7$) обработаны сапонином (75 мкг/мл) по стандартной методике, ресуспендированы в буфере А, инкубированы на льду указанное время, окрашены трипановым голубым и подсчитаны в гемацитометре

после обработки детергентом и промывки клеток выдержать их на льду в течение 10 мин (рис. 1, б). Действие холодового шока, по всей видимости, дополняет действие сапонины на мембраны. Доступность интерьера пермеабиллизованных клеток экзогенным макромолекулам подтверждается при использовании флуоресцентно меченных тРНК и РНКазы А (данные не приведены).

Необходимо подчеркнуть, что, имея перед собой цель максимального сохранения клеточной субструктуры при пермеабиллизации цитоплазматической мембраны, необходимо учитывать весь комплекс воздействий на клетку при пермеабиллизации. Так, для получения суспензии клеток, растущих на поверхности, обычно рекомендуется применение скребка. Однако жесткое удаление клеток с поверхности чашки Петри уже само по себе приводит к частичному их разрушению. Очевидно, поэтому, несмотря на то, что для пермеабиллизации клеток, снятых с поверхности скребком, необходима значительно меньшая концентрация

сапонина, 30 мкг/мл, при микроскопическом наблюдении они выглядят значительно более разрушенными. Часть клеток при такой обработке слипается, образуя агрегаты. В силу этого для получения суспензии пермеабилizованных клеток рекомендуется использовать снятие клеток с поверхности трипсином. Возможное попадание этого фермента в пермеабилizированные клетки снимается отмывкой клеток в буфере с 10 %-й фетальной сывороткой теленка, содержащей естественные ингибиторы трипсина. Обнаружено также, что введение сахарозы в буфер для пермеабилizации способствует предотвращению образования клеточных агрегатов.

Таким образом, предлагается следующая процедура пермеабилizации клеток СНО: конфлуэнтные клетки промывают ФБС (137 мМ хлорид натрия, 5 мМ хлорид калия, 1,4 мМ K_2HPO_4 , 8 мМ Na_2HPO_4) и обрабатывают трипсином, согласно обычной процедуре. Затем во флаги (объем 75 см³) с клетками добавляют 20 мл среды ДЕМЕМ с 10 %-й фетальной сывороткой теленка для ингибирования трипсина. Освобожденные с поверхности клетки промывают дважды по 10 мл ФБС и один раз — буфером, содержащим 130 мМ сахарозу, 45 мМ ацетат калия, 45 мМ хлорид калия, 20 мМ ХЕПЕС,

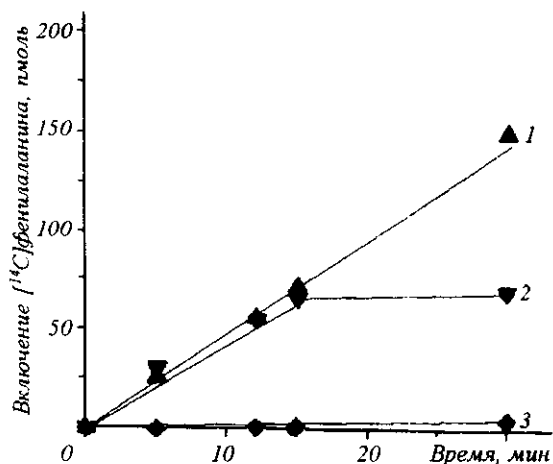


Рис. 2. Биосинтез белка в интактных (1) и пермеабилizованных (2) клетках СНО, а также в клеточном гомогенате (3). $2 \cdot 10^7$ клеток были разделены на три равные порции: одна обработана сапонином, вторая оставлена интактной. Клетки третьей порции были гомогенизированы в гомогенизаторе Поттера и центрифугированы в течение 10 мин при 10000 g. Супернатант использовали для изучения синтеза белка в цитозоле разрушенных клеток. После инкубации в смеси для биосинтеза белка пробы осаждали горячей ТХУ, кипятили в течение 5 мин и сорбировали на фильтры GF/C

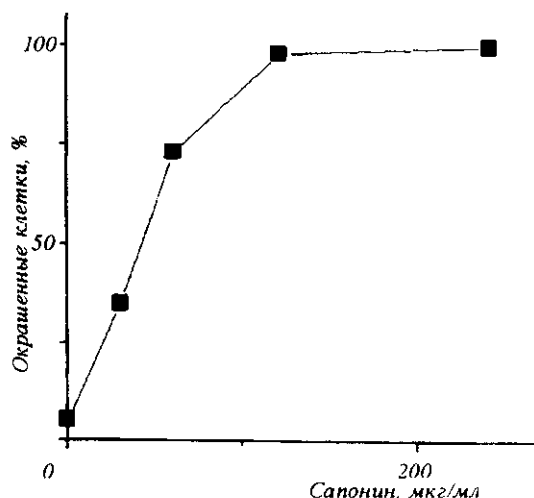


Рис. 3. Пермеабилizация сапонином фибробластов человека, растущих на поверхности. В опыте использованы две чашки Петри, содержащие шесть покровных стекол с иммобилизованными фибробластами каждая. Клетки на покровных стеклах обрабатывали возрастающими количествами сапонина, как описано в тексте. После промывки буфером Б на каждое покровное стекло добавлена капля трипанового голубого, и клетки немедленно наблюдали в микроскоп

pH 7,4, 0,3 мМ дитиотреитол (буфер А). Клетки ресуспендируют в буфере А ($50 \text{ мкл}/10^7$ клеток). Общий объем суспензии измеряют микропипеткой, используя наконечник с обрезанным концом. Затем к клеткам добавляют равный объем сапонина (150 мкг/мл буфера А). Суспензию осторожно перемешивают, инкубируют в течение 6 мин при 37 °С, затем 10 мин на льду и центрифугируют 1 мин при 400 g. Осадок клеток ресуспендируют в буфере А с необходимыми для последующих экспериментов добавками. Так, для изучения белкового синтеза необходимо дополнить буфер А смесью, содержащей 0,8 мМ АТФ, 0,07 мМ ГТФ, 30 мкг/мл креатинфосфокиназы, 7,5 мМ креатинфосфат, 1,3 мМ ацетат магния, 50 мкМ смесь аминокислот, 100 мкМ $[^{14}\text{C}]$ фенилаланин (концентрации конечные). Мягкий, неразрушительный характер предложенной процедуры подтверждается сравнением белкового синтеза в интактных и пермеабилizованных клетках, а также в клеточном гомогенате (рис. 2). Значительно более высокий уровень белкового синтеза по сравнению с клеточным гомогенатом и отсутствие различий между интактными и пермеабилizованными клетками на протяжении значительного промежутка времени инкубации свидетельствуют о высокой активности белок-синтезирующего аппарата в сапонизированных клетках. Интересно, что снижение скорости белкового

синтеза в пермеабилizованных клетках может быть преодолено добавлением в систему значительного избытка аминокислот, т. е. является результатом потери низкомолекулярных компонентов, а не распада внутриклеточных компартментов белкового синтеза. Полученные данные свидетельствуют о неразрушительном, щадящем характере действия сапонина на организацию и функционирование метаболических процессов в пермеабилizованных клетках.

Необходимо отметить, что в ряде случаев необходимо осуществить пермеабилizацию сапонином клеток, прикрепленных к поверхности. Это особенно важно для изучения внутриклеточной локализации флюоресцентно меченных белков при сохранении существующей *in vivo* организации цитоскелета клетки, тем более, что использование сапонина не вызывает увеличения аутофлюоресценции клеток [8]. Фибробласты человека, растущие на покровных стеклах, являются удобной моделью для изучения распределения различных белков в клетке.

Зависимость пермеабилizации этих клеток от концентрации сапонина приведена на рис. 3. При обработке фибробластов сапонином (125 мкг/мл) наблюдается практически полная доступность клеток трипановому голубому. Возможность входа в клетку макромолекул подтверждена при использовании флюоресцентно меченных белков — овальбумина (45 кДа), альбумина (60 кДа), различных субъединиц фактора элонгации 1 (*EF-1*). На рис. 4 показано распределение в пермеабилizованной клетке меченной ФИТЦ α -субъединицы *EF-1* (50 кДа).

Таким образом, для пермеабилizации клеток, прикрепленных к поверхности, предлагается следующая модификация метода. Все процедуры проводят при 37 °С. Фибробласты, растущие на покров-

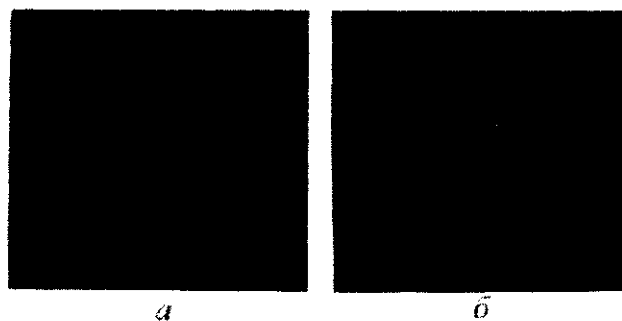


Рис. 4. Доступность интерьера пермеабилizованных клеток флюоресцентно меченым макромолекулам. Интактные (а) и пермеабилizованные (б) клетки инкубировали с меченым ФИТЦ фактором элонгации *EF-1a* в течение 5 мин. После промывки ФБС клетки фиксировали 3,8 %-м формальдегидом и фотографировали

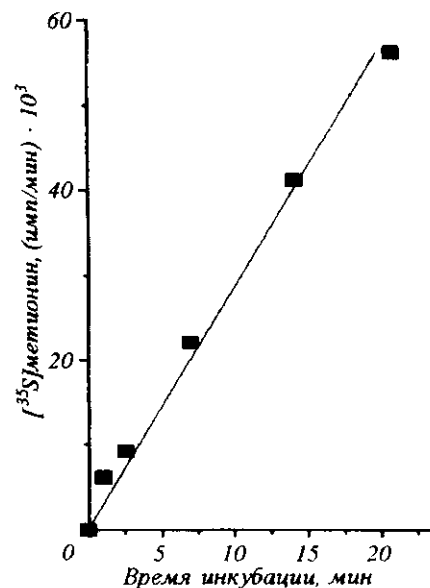


Рис. 5. Кинетика биосинтеза белка в пермеабилizованных сапонином фибробластах человека. Биосинтез белка в прикрепленных к поверхности клетках проводили в буфере, описанном в тексте. По истечении времени инкубации клетки осаждали горячей ТХУ. Покровные стекла с клетками кипятили с 5 %-й ТХУ в течение 5 мин в пластиковых сцинтилляционных флаконах. После охлаждения во флаконы добавляли сцинтилятор и подсчитывали радиоактивность

ных стеклах, промывают дважды 2 мл ФБС и один раз — 2 мл буфера Б (30 мМ сахараза, 50 мМ ацетат калия, 50 мМ хлорид калия, 20 мМ ХЕПЕС, рН 7,4). Затем в чашку добавляют 1 мл раствора сапонина в буфере Б (конечная концентрация 125 мкг/мл) и инкубируют в течение 6 мин. После полного удаления сапонина с помощью пипетки клетки осторожно промывают буфером Б, содержащим необходимые для последующих экспериментов добавки.

Так, для изучения белкового синтеза буфер Б дополняют смесью, содержащей 5 мМ АТФ, 13 мМ креатинфосфат, 5 мМ глюкозу, 6 мМ ацетат магния, 250 мкМ смесь 19 аминокислот (без метионина), 250 мкМ [³⁵S]метионин. Линейность графика зависимости накопления продукта белкового синтеза от времени на протяжении 20 мин (рис. 5) свидетельствует о возможности эффективного функционирования метаболических процессов в иммобилизованных клетках после сапонизации и предполагает наличие, в основном, неповрежденной инфраструктуры пермеабилizованных фибробластов человека.

Пермеабилizующее действие растительного гликозида сапонина было впервые отмечено еще в 1962 г. [9]. Этот детергент мягкого действия имеет

сродство к холестерину и примечательно тем, что при низких концентрациях способен пермеабиллизовать преимущественно цитоплазматическую мембрану клеток млекопитающих, а не внутренние их мембраны [10]. Поэтому использование сапонина представляется целесообразным именно в тех случаях, когда необходимо максимально сохранить лабильные субклеточные структуры. Интересно, что ранее этот детергент использовали в кардинально отличающихся целях — либо для вымывания цитоплазматических белков из клетки в достаточно жестких условиях [11], либо для того, чтобы обеспечить проникновение в клетку низкомолекулярных компонентов, например, фосфатидилсерина [12] или ионов Ca^{2+} [13].

В настоящей работе разработаны условия щадящей пермеабиллизации сапонином клеток млекопитающих, обеспечивающие доступ макромолекул внутрь клеток при сохранении их высокой метаболической активности, по крайней мере в белковом синтезе. Предложенный метод представляется возможным использовать для изучения *in situ* субклеточного уровня организации и регуляции метаболических процессов, функционирование которых в клетках требует точной колокализации и компартиментализации различных макромолекул — участников данной метаболической цепи. Метод универсален для клеток животных и человека и пригоден для пермеабиллизации как иммобилизованных на поверхности, так и находящихся в суспензии клеток.

Автор глубоко признателен проф. М. Дойчеру (США) и проф. В. Меллеру (Нидерланды) за возможность проведения экспериментов в их лабораториях, а также Др. Р. Стапуленису (Литва) — за консультации и поддержку. Часть работы была осуществлена в ходе выполнения краткосрочного проекта FEBS. Данная работа частично финансировалась Министерством по делам науки и технологии Украины (грант № 5.4/73).

Б. С. Негруцкий

М'який та ефективний метод пермеабілізації клітин тварин і людини

Резюме

Одним з найперспективніших методів вивчення відкритої недавно субклітинної організації ряду метаболічних процесів і механізмів їх протікання у вищих еукаріотах є використання пермеабілізованих клітин. Існуючі методи пермеабілізації пропонують доволі жорстку обробку мембран, що призводить до втрати інтегральності вмісту клітин. У цій роботі для пермеабілізації клітин тварин і людини використано детергент м'якої дії — рослинний глікозид сапонін. Ця речовина виявилася практично єдиною із тестованих, використання якої дозволило забезпечити, з одного боку, значне збереження внутрішньоклітинної організації і, з другого, — доступ екзогенних макромолекул всередину клітин. Розроблено м'які умови перфорації цитоплазматичних мембран, які різняться для

прикріплених до поверхні і перебуваючих у суспензії клітин. Показано високу функціональну активність пермеабілізованих клітин та доступність інтер'єру клітин флюоресцентно міченим білкам.

B. S. Negrutskii

Gentle and effective method to permeabilize the animal and human cell membrane

Summary

The permeabilized cell system appears one of the most promising methods to study recently discovered subcellular organization of some metabolic processes and the functional mechanisms involved. The existing permeabilization procedures offer rather harsh membrane treatment which leads to the loss of cell integrity. The plant glycoside saponin was used to permeabilize human and animal cells in this work. The saponin treatment is found to provide both essential conservation of intracellular organization and unlimited access of exogenous macromolecules to the inside of cell. The permeabilization conditions are slightly different for immobilized cells and cells in suspension. High functional activity of permeabilized cells as well as the availability of the interior of cells to fluorescently labeled macromolecules are demonstrated.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Srere P. A. Complexes of sequential metabolic enzymes // *Ann. Rev. Biochem.*—1987.—56.—P. 89—124.
2. Spivey H. O., Merz J. M. Metabolic compartmentation // *BioEssays.*—1989.—10.—P. 127—130.
3. Negrutskii B. S., Deutscher M. P. Channeling of aminoacyl-tRNA for protein synthesis *in vivo* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1991.—88.—P. 4991—4995.
4. Heppel L. A., Makan N. Methods for rapidly altering the permeability of mammalian cells // *J. Supramol. Struct.*—1977.—6.—P. 399—409.
5. Ryazanov A. G., Ovchinnikov L. P., Spirin A. S. Development of structural organization of protein-synthesizing machinery from prokaryotes to eukaryotes // *Biosystems.*—1987.—20.—P. 275—288.
6. Melan M. A., Sluder G. Redistribution and differential extraction of soluble proteins in permeabilized cultured cells // *J. Cell Sci.*—1992.—101.—P. 731—743.
7. Newmeyer D. D., Finlay D. R., Forbes D. J. *In vitro* transport of a fluorescent nuclear protein and exclusion of non-nuclear proteins // *J. Cell Biol.*—1986.—103.—P. 2091—2102.
8. Jacob M.C., Favre M., Bensa J.-C. Membrane cell permeabilization with saponin and multiparametric analysis by flow cytometry // *Cytometry.*—1991.—12.—P. 550—558.
9. Bangham A. D., Horne R.-W. Action of saponin on biological cell membranes // *Nature.*—1962.—196.—P. 952—953.
10. Wassler M., Jonasson I., Persson R., Fries E. Differential permeabilization of membranes by saponin treatment of isolated rat hepatocytes // *Biochem. J.*—1987.—247.—P. 407—415.
11. Lin A., Krockmalnic G., Penman S. Imaging cytoskeleton-mitochondrial membrane attachments by embedment-free electron microscopy of saponin-extracted cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1990.—87.—P. 8565—8569.
12. Voelker D. R. Characterization of phosphatidyl-serine synthesis and translocation in permeabilized animal cells // *J. Biol. Chem.*—1990.—265.—P. 14340—14346.
13. Burgess G. M., McKinney J. S., Fabiato A. et al. Calcium pools in saponin-permeabilized guinea pig hepatocytes // *Ibid.*—1983.—258.—P. 15336—15345.

УДК 577

Поступила в редакцию 26.12.96