

# 'BIOFLAVONOIDS' ACTION ON THE LIPID PEROXIDATION PROCESS IN THE RATS' BRAIN AND LIVER

V. G. MKHITARIAN, L. V. MKHITARIAN, L. V. SEMERDJIAN

It was established that rutin (5 mg/100 g) and hesperidin (6 mg/100 g animal mass) induced the reduction of lipid peroxides' content in the brain and in the liver of rats in all terms of experiment, especially after the 7 th day.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Араратян Э. А. Журн. эксп. и клин. медицины, 21, 482—487, 1981.
2. Давидек И. Биохимия, 25, 1105, 1960.
3. Даурова Л. М. Автореф. канд. дисс., Алма-Ата, 1974.
4. Казаков А. Л. Химикофарм. ж., 13, 1, 58—60, 1967.
5. Мелик-Агаева Е. А. Автореф. канд. дисс., Ереван, 1967.
6. Мхитарян В. Г., Агаджанов М. И., Мелик-Агаева Е. А. Биолог. ж. Армении, 27, 6, 3—8, 1974.
7. Мхитарян В. Г., Семерджиан Л. В. Журн. эксп. и клин. мед. 22, 2, 103—107, 1982.
8. Смирнов М. И. Витамины. 415, М., 1974.
9. Baumann J., Bruchhausen F. Prostaglandins, 20, 4, 627—639, 1980.
10. Cavallini L., Bindoli A., Siliprandi N. Pharmacol Res., 10, 2, 133, 1978.
11. Gintter E. Patisol bohemols, 28, 6, 516—524, 1979.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXV, № 10, 1982

УДК 577.321.01

## СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПЛАЗМИДНЫХ ДНК

А. Г. ГАБРИЕЛЯН, Н. Г. АЗАРЯН, Р. А. ЗАХАРЯН

Исследована тонкая структура кривых плавления ДНК плазмид RP4, RP4::Tp3 и pAS9. Разностные дифференциальные кривые плавления, полученные с помощью ЭВМ, соответствуют выплавлению отдельных делеций и вставок в молекулах ДНК и демонстрируют возможности спектрофотометрии высокого разрешения в изучении характера последовательности оснований в различных ДНК.

*Ключевые слова:* плазмидные ДНК, делеции и вставки, разностные дифференциальные кривые плавления.

Обычно для характеристики плазмидных и рекомбинантных ДНК применяют рестрикционный анализ, использующий электрофоретический метод разделения, и электронную микроскопию. Эти методы позволяют с большой точностью и достаточно быстро выяснить, в каком месте ДНК и какого размера изменения типа вставки или делеции участка. Однако они не могут дать информации о характере нуклеотидной последовательности как исходной ДНК, так и ее производных. Изу-

чение тонкой структуры кривых плавления позволяет охарактеризовать особенности распределения пар оснований в структуре генома [3, 4, 24].

В данной работе исследование дифференциальных кривых плавления (ДКП) применено нами для характеристики ДНК плазмиды RP4 и ее производных с делециями и вставками.

*Материал и методика.* В работе использованы следующие плазмиды: RP4<sup>+</sup> (bla, tet, kap, tra<sup>+</sup>), [20], RP4::Tn3 (bla, tet, kap, tra<sup>-</sup>), предоставленная В. Б. Федосеевой (ИМГ АН СССР, Москва) [13], pAS9 (bla, tet, tra<sup>-</sup>), предоставленная В. А. Саканяном (ВНИИ Генетика, Москва) [5]. Плазмидную ДНК выделяли из саркозидных лизатов бактерий (штамм *E. coli*, J53 pro<sup>-</sup>met<sup>-</sup>), используя методику Клевелла и Хелинского [10]. Равновесное ультрацентрифугирование в градиенте CsCl с бромистым этидием (плотность 1,62 г/см<sup>3</sup>) осуществляли на угловом роторе № 3 (44000 об/мин) при 15° в течение 44 ч (центрифуга «Beckman» США, модель L5-65). Обратную фракцию плазмидной ДНК очищали на колонке с гидроксипатитом, элюцию производили 0,5 М фосфатным буфером pH 7,5 при 60°.

ДНК плазмиды RP4 обрабатывали для раскрытия суперспиралей рестриктазой EcoRI в буфере 100 mM трис-HCl, pH 7,5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl при 37° в течение часа. С этой же целью ДНК плазмиды RP4::Tn3 подвергали серии последовательных размораживаний—замораживаний. Для раскрытия суперспиралей плазмиды pAS9 использовали рестриктику эндонуклеазой BamHI в буфере 10 mM трис-HCl, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,5 в течение часа при 37°, а также метод замораживания—размораживания.

После трехкратной фенольной депротеинизации и окончательной очистки ДНК ее переносили в 0,1×SSC на колонке с сефадексом G-50 fine.

Операции отбора, очистки, рестрикции плазмидных ДНК контролировали электронно-микроскопически и электрофоретически (0,5%-ный агарозный гель, агароза «Сигма № 111» при 30 v, в течение 10 ч).

Плавление образцов ДНК проводили на спектрофотометре «Cary 219», оборудованном специальной термостатирующей ячейкой. Использовали микрокуветы «Varian». Дифференцирование кривых плавления осуществляли на ЭВМ HP 9829 по программе «Melting». ДКП, отвечающие усреднению кривых плавления одной и той же ДНК, полученных в нескольких независимых экспериментах, строили с помощью программы «Unification». Разностные кривые для ДНК различных плазмид получали по программе «Delta», результирующие кривые нормированы по программе «Melting», полученных от Е. И. Голованова (ИМГ АН СССР, Москва).

*Результаты и обсуждение.* Плазида RP4 из P-1 группы несовместимости обладает уникальным свойством передаваться конъюгационным путем в широкий круг различных видов грамотрицательных бактерий и стабильно в них наследоваться [11, 12, 21]. Единственный транспозон Tn3 расположен на координате 5,2—9,8 кв в области генов несовместимости и репликации, кодирующих жизненно важные функции плазмиды [8, 22]. Tn3 фланкирован небольшими инвертированными повторами (по ~140 пар оснований). ДНК плазмиды RP4—кольцевые, суперспиральные молекулы с молекулярным весом 36,4 млн. дальтон (19,1 мкм) [16]. Суперспиральные циркулярно-замкнутые молекулы ДНК при плавлении дают гладкую дифференциальную кривую, лишенную тонкой структуры [15], поэтому необходимо предварительно перевести молекулы ДНК в линейную форму, желательнее в одном и предпочтительнее в определенном месте молекул.

В случае RP4 мы действовали посредством рестриктазы EcoRI, имеющей один сайт рестрикции на ДНК плазмиды (см. например, [8]).

На рис. 1 (кр. 2) приведена ДКП для ДНК RP4. Кривая—не гладкая, колоколообразная, как для ДНК эукариот аналогичного молекулярного веса [18], а имеет тонкую структуру. Большая ширина интервала плавления характеризует гетерогенную ДНК, состоящую из больших блоков с сильно различающимися ГЦ-содержаниями. ГЦ-содержание всей ДНК RP4 приблизительно определяется из кривой плавления [1, 19], оно равно 68%, что согласуется с результатами работы Саундерса [23], полученными методом аналитического ультрацентрифугирования. Большая доля ДНК плавится в интервале температур 79—84°, но имеется отделенная часть кривой плавления в  $\sim 3^\circ$  шириной. Мы предположили, что соответствующая ему более легкоплавкая область ДНК, выплавляющаяся при 74—77°,—область Tn3. Во-первых, судя по температуре плавления, эта часть ДНК имеет ГЦ-содержание,

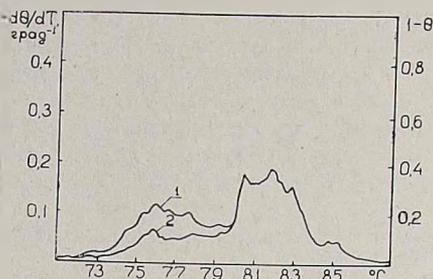


Рис. 1.

Рис. 1. Дифференциальные кривые плавления ДНК RP4::Tn3 (кривая 1) и RP4 (кривая 2).

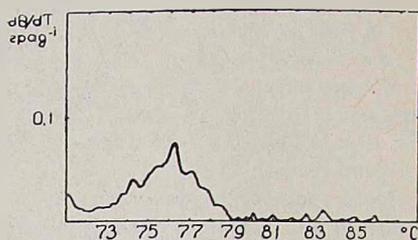


Рис. 2.

Рис. 2. Нормированная разностная кривая плавления ДНК RP4::Tn3—RP4.

равное 50%, что соответствует величине ГЦ-содержания Tn3 (50,11%), рассчитанной на ЭВМ по расшифрованной последовательности [2, 17]. Во-вторых, по форме этот пик соответствует форме кривой плавления Tn3 в составе плазмиды ColE1::Tn3 [7]. Для доказательства этого предположения нами проплавлена ДНК плазмиды RP4::Tn3.

Плазида RP4::Tn3 является производной плазмиды RP4 и, как показал гетеродуплексный анализ [13], содержит две инвертированные копии элемента Tn3 (по  $3,2 \times 10^5$  дальтон). На рис. 1 (кр. 1) приведена ДКП ДНК этой плазмиды. Видно, что низкотемпературный пик кривой 1 повторяет по форме пик кривой 2, но охватывает большую площадь. А правые части обеих кривых совпадают\*. Таким образом, левая часть кривых действительно отвечает выплавлению элемента Tn3 в ДНК плазмиды RP4 (кривая 2) и двух копий Tn3 в случае ДНК плазмиды RP4::Tn3. Разность двух кривых, полученная с помощью ЭВМ, списывает плавление транспозона Tn3 в составе плазмиды RP4::Tn3

\* Поскольку сравниваются кривые, отвечающие плавлению ДНК с различными молекулярными весами, то нормируется одна из кривых (кривая 2), а другая приведена не к площади 1, а к  $1 M_1/M_2$ , где  $M_1$  и  $M_2$  соответственно молекулярные веса ДНК RP4::Tn3 и RP4. Такая графическая процедура приводит к совпадению площадей, ограниченных правыми частями кривых.

(рис. 2). Локализованный характер плавления транспозона Tn3 свидетельствует о гомогенном, равномерном распределении в нем нуклеотидных пар.

Получена также ДКП ДНК плазмиды pAS9—производной RP4. Это—рекомбинантная плазида, делеционный, нетрансмиссибельный мутант гибридной плазмиды pAS8 (RP4—ColE1) [5, 6]. pAS9 содержит неповрежденный ColE1-фактор и часть ДНК плазмиды RP4. При этом утрачивается детерминанта устойчивости к канамицину и повреждается tra-оперон, что указывает на их близкое расположение друг от друга.

Так как рестриктаза EcoRI имеет два участка узнавания на pAS9, мы расщепляли циркулярно-замкнутую плазмидную ДНК эндонуклеазой BamHI, имеющей один сайт рестрикции [8]. При этом кривые плавления получались неотличимыми от ДКП ДНК pAS9, суперспирали которой раскрыты методом замораживания—размораживания. Определенный методом скоростной седиментации [1, 14] молекулярный вес ДНК pAS9 оказался равен  $(23 \pm 3) \times 10^6$ , что согласуется с полученной электронно-микроскопически величиной контурной длины 9,8 мкм (контурная длина ДНК RP4—19,1 мкм [16], а pAS8—21,3 мкм [6]).

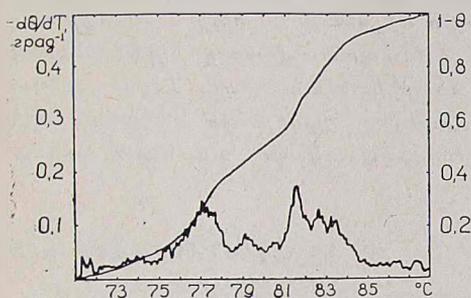


Рис. 3.

Рис. 3. Интегральная (кривая 1) и нормированная дифференциальная (кривая 2) кривые плавления ДНК pAS9.

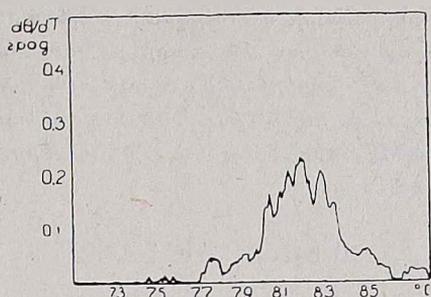


Рис. 4.

Рис. 4. Нормированная разностная кривая плавления ДНК RP4—pAS9.

Из рис. 3 видно, что кривая плавления ДНК pAS9 имеет такой же характер, как и ДКП ДНК RP4. Это понятно, поскольку последовательность нуклеотидов ДНК pAS9 в основном содержится в ДНК RP4. В то же время ДНК pAS9 характеризуется более выраженной тонкой структурой ДКП, чем более высокомолекулярная ДНК RP4. Форма кривой плавления ДНК pAS9 такая же, какой была бы кривая плавления смеси двух ДНК с различным ГЦ-содержанием. Сравнение с кривой плавления RP4 позволяет считать, что низкотемпературный массив пиков соответствует ДНК ColE1 (ГЦ-содержание ~58% близко к значению, полученному для ДНК ColE1 в работе [7]). ГЦ-содержание остатка RP4 ~69% (правая часть ДКП). ДНК плазмиды pAS9 содержит приблизительно 65% ГЦ [1].

На рис. 4 приведена разностная кривая плавления двух ДНК RP4—pAS9. В какой-то мере (без учета ColE1—вставки) она характеризует

делетированный участок RP4, содержащий детерминанту устойчивости к канамицину и tga—оперон. Как видно из кривой, это довольно гомогенный по составу ГЦ-обогащенный участок.

Таким образом, по изменению ДКП можно получить сведения о характере нуклеотидной последовательности вставки (или делеции) в ДНК.

Авторы благодарят Ю. С. Лазуркина и Ю. Л. Любченко за предоставление возможности для проведения работы и Банникова Ю. А. за помощь в работе.

Институт экспериментальной биологии  
АН Армянской ССР

Поступило 14.V 1982 г.

### ՊԼԱԶՄԻԴԱՅԻՆ ԴՆԹ-ՆԵՐԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒՄԸ ՍՊԵԿՏՐՈՖՈՏՈՄԵՏՐԻԿ ԵՂԱՆԱԿՈՎ

Ա. Դ. ԳԱԲՐԻԵԼՅԱՆ, Ն. Գ. ԱԶԱՐՅԱՆ, Բ. Ա. ԶԱԽԱՐՅԱՆ

Հետազոտվել է RP4, RP4:Тn3 և pAS9 պլազմիդների ԴՆԹ-ների հալման կորերի նուրբ կառուցվածքը: Էլեկտրոնային մեքենայի հատուկ ծրագրերի միջոցով հաշված են տարբեր ԴՆԹ-ներին համապատասխանող դիֆերենցիալ հալման կորերի տարբերությունները: «Տարբերական» այդ կորերը բնութագրում են տվյալ ԴՆԹ-ներում պարունակվող ներդիրների և հանումների (դելեցիաների) ազոտային հիմքերի հաջորդականության առանձնահատկությունները:

### SPECTROPHOTOMETRIC STUDY OF PLASMID DNA-s

A. G. GABRIELIAN, N. G. AZARYAN, R. A. ZAKHARYAN

The differential melting curves of RP4 and of its derivatives RP4: Tn3 and pAS9 plasmid DNA-s have been studied. The difference between the differential melting curves corresponds to the melting of individual insertion and deletion elements in DNA macromolecules and allows to study the character of base sequences in different DNA-s.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Габриелян А. Г., Аблизимова Н. А., Варганян М. К., Карагезян К. С., Захарян Э. Г., Захарян Р. А. Биолог. ж. Армении, 33, 8, 799, 1980.
2. Габриелян А. Г., Захарян Р. А., Азарян Н. Г., Федосеева В. Б. Мат-лы симпозиума СССР—ФРГ «Структура генома и транскрипция», Ереван, 1981.
3. Габриелян А. Г., Сафарян З. С., Сафарян А. С., Варганян М. К., Захарян Р. А. Биолог. ж. Армении, 34, 6, 627, 1981.
4. Лазуркин Ю. С. Молек. биол., 11, 6, 627, 1981.
5. Саканян В. А., Алиханян С. И., Якубов Л. З., Степанов А. И. Генетика, 13, 10, 1778, 1977.
6. Саканян В. А., Якубов Л. З., Алиханян С. И., Степанов А. И. Генетика, 14, 5, 853, 1978.
7. Amrikyan B. R., Vologodskii A. V., Lyubchenko Yu. L. Nucl. Acids Res., 9, 5469, 1981.