

Տարբեր ռեստրիկցիոն ֆերմենտների օգնությամբ ստացված են pALM1 պլազմիդի ղեկցիոն մուտանտներ, որոնց մոտ համենայն դեպս պահպանված է *argE* գենը: *E. coli*-ի բջիջներում ռեկոմբինանտ պլազմիդները առաջացնում են բազմաթիվ պատճեններ, բնութագրվում են ամպլիֆիկացիայի ենթարկվելու լեղունակությամբ և կայունությամբ:

Նկատված է սպինի զոզայի էֆեկտ: ըստ N-ացետիլորնիթին ղենացետիլազայի (*argE* գենի սրոդոկտը) ակտիվության ռեկոմբինանտ պլազմիդը կրող *E. coli* շտամի էքստրակտներում:

PHYSICAL ANALYSIS OF RECOMBINANT PLASMIDS CARRYING *argECBH* REGION OF THE CHROMOSOME OF *ESCHERICHIA coli K-12*

I. L. METT, A. V. KOCHIKYAN, A. I. METT, M. Z. ASTVATSATORYAN,
V. A. SAKANYAN

argECBH genes of *E. coli K-12* have been cloned on the vector-pBR322. Restriction map of the pALM1 recombinant plasmid, harbouring *BamHI*-fragment (8 kb) with whole bipolar operon *argECBH*, has been constructed. Deletion mutants of pALM1 plasmid have been generated by different restriction enzymes. The mutant plasmids have retained at least *argE* gene. Recombinant plasmids are multicopy, amplifiable and stable in *E. coli* cells. The strains carrying recombinant plasmids have increased the activity of N-acetylornithine deacetylase, coded by *argE* gene.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Beny G., Cuntin R., Glansdorff N., Boyen A., Charlier J., Kether N. J. Bact., 151, 1, 58, 61, 1982.
2. Cuntin R., Eckhardt T., Plette J., Boyen A., Pierard A., Glansdorff N. Nucl. Acids Res., 11, 15-5007-5019, 1983.
3. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning. A laboratory manual., Cold Spring Harbor Labor., Cold Spring Harbor, New York, 1982.
4. Plette J., Cuntin R., Boyen A., Charlier D., Crabot M., Van Ytter F., Glansdorff N., Squires C., Squires C. L. Nucl. Acids Res., 10, 24, 8031-8048, 1982.
5. Vogel H. J., McLeilan W. Methods Enzymology, 17A, 255-259, 1970.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVIII, № 1, 1985

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 577.352.2-577.15.0.87

МЕТОД БЫСТРОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОНИЦАЕМОСТИ ЛИПОСОМ ДЛЯ β-D-ГЛЮКОЗЫ

Ц. М. АВАКЯН, С. Я. АДАМЯН, Т. Г. АМБАРЦУМЯН, Ж. А. ОГАНЕСЯН,
Л. С. ПЕТРОСЯН, А. Л. СИМОНЯН, С. Ш. ТАТИКЯН, Г. Э. ХАЧАТРЯН

Ключевые слова: липосома, иммобилизованный фермент, глюкоза.

В настоящее время в медицинских и биологических исследованиях интенсивно используются липосомы как для доставки веществ в ткани

организма, так и для моделирования различных свойств клетки [1, 2, 3]. В связи с этим особое значение придается изучению их физико-химических свойств, в частности, проницаемости липосомальной мембраны.

Для тестирования проницаемости липосом выбрана глюкоза—вещество, играющее важную роль в метаболизме клеток. О проницаемости липосомальной мембраны судили по прибыти глюкозы в наружном растворе, обусловленной ее выходом из липосом. Обычно химические методы анализа глюкозы требуют довольно большой затраты времени и, возможно, оказывают влияние на мембраны клеток. Энзиматические методы анализа требуют постоянного расхода высокоочищенных ферментов и кофакторов. От этих недостатков свободен метод определения концентрации глюкозы с использованием иммобилизованных ферментов. При определении проницаемости мембраны липосом для глюкозы в данной работе впервые применена аналитическая система—глюкозиметр, сконструированный в нашей лаборатории [4].

В основе работы глюкозиметра лежит реакция окисления глюкозы с помощью иммобилизованной на силикагеле глюкозооксидазы. О концентрации глюкозы, окисляемой глюкозооксидазой, судили по убыли кислорода, определяемой кислородным мембранным электродом. Измерения проводили в проточном реакторе с вытеснением. Необходимую осмотичность проточающего раствора создавали добавлением сахаразы. Результаты измерений регистрировали в цифровом виде с помощью электронного блока. Время отклика глюкозиметра—30 с. Для получения липосом использовали яичный лецитин харьковского завода Химреактивов. Исходная водно-лецитиновая смесь состояла из 25 мг лецитина на 1 мл триэтанового буфера с 100 мМ NaCl , 400 мг% глюкозы и 10 мМ дезоксиколата натрия. Диспергирование проводили ультразвуком частотой 22 кГц с использованием трубчатого излучателя прибора ХЗДН-1.

Наиболее удобным условием определения выходящего потока глюкозы из липосом по данной методике было бы отсутствие глюкозы в наружном растворе. Однако в процессе освобождения наружного раствора от глюкозы, например, методом гельфильтрации, липосомы теряют ее, и к началу измерения выходящего потока истинная концентрация глюкозы в липосомах оказывается неизвестной. Это затрудняет определение константы выхода глюкозы. Поэтому мы пошли по пути создания градиента концентрации, направленного из липосом в наружную среду. Для этого раствор с липосомами, содержащий 400 мг% глюкозы, развели солевым триэтановым буфером до 50 мг% глюкозы, а изотоничность раствора создавали добавкой сахаразы. За нулевую точку отчета времени принимали момент разведения раствора и через определенные временные интервалы вводили в проток пробу объемом 70 мкл. В качестве калибровочного раствора использовали солевой триэтановый буфер с 50 и 100 мг% глюкозы.

Рассчитанный коэффициент проницаемости $P = 3,5 \cdot 10^{-11}$ м/с (среднее из 40 измерений) является несколько заниженным, так как в такой постановке опыта, строго говоря, измеренный поток является разностным; потоком, направленным внутрь липосом, можно пренебречь из-за сравнительно низкой наружной концентрации глюкозы. Введение поправки на утечку глюкозы из раствора в липосомы увеличивает рассчитанный коэффициент проницаемости всего на $0,12 \cdot 10^{-11}$ м/с.

Аналогичные опыты по определению потока глюкозы из липосом проводились на спектрофотометре энзиматическим методом [5], позволяющим определять концентрацию глюкозы в растворе. Результаты

полностью совпали с результатами, полученными с помощью глюкозиметра

С помощью глюкозиметра можно определить внутренний объем липосом по количеству захваченной липосомами глюкозы. Для этого через проточный реактор пропускали не изотонический раствор, а дистиллированную воду, что приводило к осмотическому шоку липосом. Калибровочные кривые при изотоническом сахарозном протоке и протоке дистиллированной воды не отличались друг от друга.

Разница между показаниями глюкозиметра до осмотического шока и после него соответствует количеству глюкозы, вышедшей из липосом. Поделив количество глюкозы, вышедшей из липосом в результате осмотического разрушения, на концентрацию глюкозы в липосомах, которая известна, можно вычислить объем липосом, который в данном случае составлял в среднем 10—15%.

Описанный метод быстрого определения глюкозы может быть модифицирован для определения проницаемости не только мембран липосом, но и проницаемости клеток в клеточной суспензии благодаря высокой специфичности метода определения.

Ереванский физический институт ГНАЭ СССР

Получено 25.IV 1983 г.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Биомембраны Структура Функции Медицинские аспекты Рига, 1981.
2. Липосомы в биологических системах М., 1983
3. Липосомы и их взаимодействие с клетками и тканями. Материалы Всесоюзу симп., М., 1981.
4. Сидякин А. Л., Татикян С. Ш., Хачатрян Г. Э., Абабян Ц. М. Биолог. ж. Армения, 36, 575, 1983
5. Lamprecht W., Trautshold J. In: Methods of Enzymatic Analysis II. Bergmeyer (ed.), N.—J., London, 1963.

«Биолог. ж. Армения», т. XXXVIII, № 1, 1985

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

ВЛИЯНИЕ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТА НАТРИЯ НА ЧИСЛО СТАДИЙ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ПРОБОЯ БЛМ

Г. Р. ХАЧАТРЯН, В. Б. АРАКЕЛЯН, С. А. АДЖЯН

Ключевые слова: бислойная липидная мембрана, пробой, детергент

В работах Абидора, Аракеяна и др. [1, 4] было показано, что пробой бислойных липидных мембран (БЛМ) в электрическом поле связан с появлением и развитием дефектов типа скважных гидрофильных пор. Рост этих пор, приводящий к разрушению БЛМ, связан с преодолением энергетического барьера (диффузионная стадия пробоя). Число стадий электрического пробоя БЛМ можно определить из зависимости, приведенной в работе [2]