

**УДК 575.224.2: 577.15:595.773.4**

**А. М. АНДРИЕВСКИЙ**, к.б.н., доцент

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, кафедра генетики и молекулярной биологии,

ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, e-mail: andriev\_scar@mail.ru

### **ЭКСПРЕССИЯ КАРБОКСИЭСТЕРАЗ У МУТАНТОВ *DROSOPHILA MELANOGASTER***

С помощью реакции одновременного азосочетания определяли степень выраженности электрофоретически разделённых молекулярных форм карбоксиэстераз имаго *Drosophila melanogaster*. Материалом для анализа служили буферно-трисовые экстракты тканей отдельно взятых самцов, отобранных из лабораторных популяций дрозофилы дикого типа и мутантных линий: *vermilion*, *vestigial*, *yellow*, *chocolate*, *curved*, *Bar*, *black*, *brown*, *cut*, *white*, *white apricot*, *cinnabar*, *sepia*, *ebony*. Показаны индивидуальные особенности экспрессии изоформ карбоксиэстераз у каждой мутантной линии. Обнаружены различия в уровне активности карбоксиэстераз у изучаемых мутантов и мух дикого типа.

**Ключевые слова:** карбоксиэстеразы, изменчивость, мутанты *Drosophila melanogaster*.

Проблема белкового полиморфизма находит широкое отражение в популяционно-генетических, эволюционных и селекционных исследованиях и, прежде всего, при установлении генетических связей между дивергирующими группами организмов, которые подвергаются действию различных форм отбора [6, 8, 9, 11]. Обнаружена связь белкового полиморфизма с внутривидовой изменчивостью по ряду морфологических и физиологических признаков [2–5, 13–14].

Имеются сведения о корреляции между типами зиготности по белковым (энзимным) локусам у различных животных (моллюсков, рыб, млекопитающих) и размерно-массовыми показателями организмов, их жизнеспособностью и плодовитостью [2–5, 7]. Поэтому исследования в данной области имеют большую научную и практическую ценность.

© А. М. Андриевский

Работа посвящена изучению связи между некоторыми морфологическими мутациями и экспрессией карбоксиэстераз у плодовой мушки.

К сожалению, в доступной литературе не удалось обнаружить сведения о корреляции экспрессии форм карбоксиэстераз с детерминированными морфологическими признаками у различных генетических линий дрозофилы.

Целью исследования было определение индивидуальных и межлинейных различий в уровне экспрессии множественных молекулярных форм карбоксиэстераз у самцов имаго *Drosophila melanogaster*.

Основной задачей исследования было проведение сравнительного анализа активности карбоксиэстераз у мутантных линий и мух дикого типа.

#### **Материалы и методы исследования**

Экспериментальным материалом служили половозрелые самцы лабораторных популяций *Drosophila melanogaster* (Meigen) дикого типа (линия *Normal*), а также мутантных линий: *vermilion* (*v*, I хромосома), *vestigial* (*vg*, II хромосома), *yellow* (*y*, I хромосома), *chocolate* (*cho*, I хромосома), *curved* (*c*, II хромосома), *Bar* (*B*, I хромосома), *black* (*b*, II хромосома), *brown* (*bw*, III хромосома), *cut* (*ct*, I хромосома), *white* (*w*, I хромосома), *white apricot* (*w<sup>a</sup>*, I хромосома), *cinnabar* (*cn*, II хромосома), *sepia* (*se*, III хромосома), *ebony* (*e*, III хромосома). Развитие особей в популяциях в течение жизни многих поколений проходило в стационарных условиях на простой питательной среде [10] при температуре +25 °С.

Каждое новое поколение дрозофил получали путём близкородственного скрещивания потомков, исключая репродуктивное перекрывание разных поколений.

Перед приготовлением проб одновозрастных мух наркотизировали диэтиловым эфиром и отделяли самцов от самок. Гомогенат суммарных тканей каждой отдельно взятой особи готовили в эппендорфе в объёме 10 мкл 0,1 М глицин-*NaOH* буфера *pH* 9,0, содержащего 1% тритона X-100. Полученные гомогенаты (28–30 проб в расчёте на один эксперимент) сразу же центрифугировали в течение 15 мин при 10 000 g на холоде (+4 °С). К отобраным экстрактам добавляли по 5 мкл 0,01% раствора бромфенолового синего, приготовленного на 60% растворе сахарозы. Образцы подвергали электрофоретическому разделению в системе вертикально-пластинчатого щелочного (трис-глициновый буфер, *pH* 8,3–8,9) 10% полиакриламидного геля. При силе тока 40 мА в

расчёте на два гелевых блока электрофорез проходил за 3 часа. После проведения электрофореза гелевые блоки отмывали дистиллированной водой до нейтрального значения  $pH$  и замачивали на 15 мин в 50 мл 0,1 М фосфат-фосфатного буфера  $pH$  7,4. Далее инкубировали в 50 мл того же буфера с добавкой 25 мг  $\alpha$ -нафтилацетата, 25 мг  $\beta$ -нафтилацетата и 50 мг синего прочного RR (субстраты и диазоний предварительно растворяли в 10 мкл диметилформамида). Инкубация гелей в среде с субстратами длилась 20 мин при +25 °С, после чего реакционную смесь декантировали, а гели заливали кипящей дистиллированной водой, сканировали и анализировали путём компьютерной денситометрии, используя специальную лицензионную программу «АнаИС». Об уровне экспрессивности изучаемых ферментов судили по интенсивности окрашивания азокрасителем индивидуальных зон геля, совпадающих с местами специфического расположения карбоксиэстераз на момент завершения электрофореза.

Показатель вариабельности экспрессии ( $Ve$ ), выраженный в процентах от общего числа исследованных особей отдельной линии, рассчитывали по формуле:  $Ve = (n / N) 100\%$ , где  $n$  – число экземпляров с низким (ниже среднего значения по группе) уровнем экспрессии карбоксиэстераз,  $N$  – общее число проанализированных особей одной линии.

Относительную активность (ОА), или экспрессию ферментов определяли по формуле:

$$OA = \Delta Do \cdot V / v \cdot t \cdot k ,$$

где  $\Delta Do$  — показатель оптической плотности ферментативной зоны (относительные единицы),  $V$  — объём ферментативной зоны в гелевом блоке (0,028 мл),  $v$  — объём анализируемой пробы экстракта (0,010 мл),  $t$  — инкубационное время (20 мин),  $k$  — коэффициент перевода относительных единиц оптической плотности в миллимоли конечного продукта реакции (0,021), находящегося в ферментативной зоне. Удельную активность (УА) ферментов определяли, используя формулу:

$$UA = OA / [P],$$

где ОА — относительная активность фермента (относительные единицы в расчёте на 1 мл экстракта),  $[P]$  — концентрация белка в экстракте (0,37 мг/мл), найденная по методу Lowry *et al.* [15].

Статистическую обработку полученных данных проводили согласно [12], используя компьютерную программу «Excel». В работе применяли реактивы фирм «Reanal» (Венгрия) и «Chemapol» (Чехия), а также установку для электрофореза «VE-4» российского производства (г. Москва, МГУ, «Helikon»).

### Результаты исследования и обсуждение

Предварительное изучение разнообразия карбоксиэстераз у *Drosophila melanogaster* показало, что в тканях этого насекомого содержится 4 основные, легко экстрагирующиеся формы эстеролитических ферментов со стабильным показателем относительной электрофоретической подвижности (*Rf*), чётко обособленных от других соседних фракций [1].

По сравнению с дрозофилой дикого типа, среди 14 исследуемых мутантов наиболее ярко выраженные различия в активности карбоксиэстеразы 1 ( $\beta$ -специфичная эстераза), 2 (димерная ацетилхолинэстераза) и 4 (тетрамерная ацетилхолинэстераза) выявлены у 8-ми, а именно: *v*, *vg*, *y*, *cho*, *c*, *B*, *b*, *bw* (табл. 1 и табл. 2). При этом у линий *v*, *y*, *c* наблюдался самый высокий показатель variability экспрессии *Ve* – 33%.

В то же время, в популяциях мутантов *cho*, *B*, *b* обнаружены особи с максимальным уровнем экспрессии отдельных карбоксиэстераз (в частности  $\beta$ -эстеразы), доля которых из числа проанализированных составляла 46%, 53% и 60% соответственно.

Все исследованные особи мутантных линий, за исключением *cho*, оказались гомозиготными по локусу эстеразы 1, проявляющей  $\beta$ -нафтилацетазную активность, что указывает на гомогенность самих мутантных линий по данному биохимическому признаку. Обычно у имагодрозофилы дикого типа в зависимости от генотипа этот фермент представлен быстроподвижной молекулярной формой (*F*, *Rf* = 0,285), медленноподвижной (*S*, *Rf* = 0,280), либо той и другой — одновременно.

В целом средний показатель variability экспрессии (*Ve*) по локусу карбоксиэстеразы 2 у исследуемых мутантных линий оказался выше, чем у линии *Normal* и составил 22,5% и 8%, соответственно.

Как видно из представленных в таблицах 1 и 2 данных, в экспрессии соответствующих эстераз наблюдаются достоверные межлинейные различия: при отсутствии быстроподвижной формы эстеразы 1 уровень относительной экспрессии аллозима *1b* у мутантов *y*, *c*, *bw*, *b* оказался соответственно в 4,7, в 2,7, в 3,4 и в 2,3 раза ниже такового у линии *Normal*. Что касается карбоксиэстеразы 2, то показатели экспрессии этого фермента у самцов линии дикого типа значительно превосходят таковой у самцов мутантных линий *c*, *vg*, *y*, *v*, *b*, *bw*.

Таблица 1  
**Экспрессия карбоксиэстераз самцов *Drosophila melanogaster* дикого типа и мутантных линий ( $M \pm m$ ;  $n = 14 - 15$ ; (для *1a* –  $n = 4$ ))**

Линии	Молекулярные формы карбоксиэстераз			
	<i>1a</i>	<i>1б</i>	2	4
<i>N</i>	0,847 ± 0,156	1,859 ± 0,379	1,650 ± 0,304	1,262 ± 0,030
<i>y</i>		0,390 ± 0,069*	0,670 ± 0,128*	4,206 ± 0,680*
<i>v</i>		1,090 ± 0,170*	0,868 ± 0,064*	2,367 ± 0,214*
<i>vg</i>		1,174 ± 0,140*	1,247 ± 0,344*	4,714 ± 0,830*
<i>cho</i>	0,803 ± 0,109	1,561 ± 0,187	1,660 ± 0,228	4,435 ± 0,716*
<i>c</i>		0,697 ± 0,066*	0,562 ± 0,060*	4,205 ± 0,364*
<i>B</i>		0,937 ± 0,132*	2,200 ± 0,239*	2,080 ± 0,947*
<i>b</i>		0,810 ± 0,011*	0,510 ± 0,029*	5,494 ± 0,665*
<i>bw</i>		0,552 ± 0,057*	1,116 ± 0,216*	4,195 ± 0,124*

Примечание: *1a* — быстроподвижный аллозим  $\beta$ -эстеразы, *1б* — медленноподвижный аллозим  $\beta$ -эстеразы, 2 — димерная ацетилхолинэстераза, 4 — тетрамерная ацетилхолинэстераза. Данные отражают оптическую плотность ( $\Delta D_{50}$ , относительные единицы) зон полиакриламидного геля, содержащих связанные с диазоием продукты гидролиза нафтилацетатов соответствующими формами карбоксиэстераз; «—» — молекулярная форма отсутствует; \* — различия по сравнению с линией *N* достоверны при  $P < 0,05$ .

Исключение составляет линия *Var*, у которой выраженность эстеразы 2 в 1,3 раза превышает уровень относительной экспрессии того же фермента у нормальной линии. Что касается эстеразы 4, то этот фермент оказался более активным у всех мутантных линий. Так, у линии *b* его активность в 4,3 раза превосходила таковую у линии *Normal*.

Полученные данные об изменчивости экспрессии ферментов карбоксиэстеразной системы у мутантных линий дрозофилы указывают на их гетерогенность, тогда как средние показатели уровня активности каждого из исследуемых энзимов могут отражать физиолого-биохимическое состояние репродуктивно-способных организмов, развивающихся в стационарных условиях.

Таблица 2

**Удельная активность карбоксиэстераз самцов *Drosophila melanogaster* дикого типа и мутантных линий  
( $M \pm m$ ;  $n = 14 - 15$ ; (для *1a* –  $n = 4$ ))**

Линии	Молекулярные формы карбоксиэстераз			
	<i>1a</i>	<i>1б</i>	2	4
<i>N</i>	15,1 ± 0,16	33,2 ± 0,38	29,5 ± 0,30	22,4 ± 0,03
<i>y</i>		7,0 ± 0,07*	11,9 ± 0,13*	74,9 ± 0,68*
<i>v</i>		19,5 ± 0,17*	15,4 ± 0,06*	42,2 ± 0,21*
<i>vg</i>		20,8 ± 0,14*	22,2 ± 0,34*	84,1 ± 0,83*
<i>cho</i>	14,3 ± 0,11	27,8 ± 0,19	30,0 ± 0,23	79,2 ± 0,72*
<i>c</i>		12,4 ± 0,07*	10,0 ± 0,06*	75,1 ± 0,36*
<i>B</i>		16,8 ± 0,13*	39,2 ± 0,20*	37,0 ± 0,90*
<i>b</i>		14,1 ± 0,01*	9,2 ± 0,03*	98,1 ± 0,67*
<i>bw</i>		9,7 ± 0,06*	20,0 ± 0,22*	75,0 ± 0,12*

Примечание: *1a* — быстроподвижный аллозим  $\beta$ -эстеразы, *1б* — медленноподвижный аллозим  $\beta$ -эстеразы, 2 — димерная ацетилхолинэстераза, 4 — тетрамерная ацетилхолинэстераза. Данные отражают удельную активность карбоксиэстераз, выраженную в относительных единицах в расчёте на 1 мг белка (за одну единицу ферментативной активности принимали количество фермента, расщепляющего миллимоль субстрата за 1 мин инкубации при +25 °C); «—» — молекулярная форма отсутствует; \* — различия по сравнению с линией *N* достоверны при  $P < 0,05$ .

### Выводы

1. Наиболее выраженная изменчивость в проявлении активности карбоксиэстераз выявлена у мутантных линий: *v*, *vg*, *y*, *cho*, *c*, *B*, *b*, *bw*.
2. Средний показатель полиморфности у мутантов *v*, *vg*, *y*, *cho*, *c*, *B*, *b*, *bw* (22,5%) значительно превосходит таковой у линии *Normal* (8%).
3. Наиболее выражено межлинейные различия у дрозофилы проявляются в активности карбоксиэстераз *1б* и 4. Мутанты *v*, *vg*, *y*, *cho*, *c*, *B*, *b*, *bw* по экспрессивности эстеразы 4 в несколько раз превосходят линию *Normal*, в то же время, уступая ей в экспрессии эстеразы *1б*.

### Список использованной литературы

1. Андриевский А. М. Чернов И. А. Изменчивость карбоксиэстеразной системы у лабораторной популяции *Drosophila melanogaster* дикого типа / А. М. Андриевский // Вісник ОНУ, 2005. — Т. 10. — Вип. 3. — С. 19–27.
2. Голубцов А. С. Внутрипопуляционная изменчивость животных и белковый полиморфизм / А. С. Голубцов // М.: Наука, 1988. — 165 с.
3. Ильин И. И. Изучение биохимического полиморфизма в природной популяции ротана *Perccottus glehhi* / И. И. Ильин // Генетика. — 1982. — Т. 18, № 10. — С. 1645–1652.
4. Касинская С. И. Темп естественного отбора в экспериментальной популяции дрозофилы / С. И. Касинская // Отбор и мутационный процесс в популяции. — Минск: Наука и техника, 1985. — С. 11–25.
5. Кирпичников В. С. Селективный характер биохимического полиморфизма у камчатской нерки (*Oncorhynchus nerka* Walb.) / В. С. Кирпичников // Основы классификации и филогении лососёвых рыб. — Л.: Зоологический институт АН СССР, 1977. — С. 53–60.
6. Коваль Е. З. Биохимический полиморфизм девяти видов камбал подсем. Pleuronectinae в заливе Петра Великого / Е. З. Коваль, Л. В. Богданов // Биохимическая и популяционная генетика рыб. — Л., 1979. — С. 99–105.
7. Корешкова Н. Д. Популяционная структура рыбца (*Vilba vilba*), выявленная на основании электрофоретического анализа мышечных эстераз / Н. Д. Корешкова, А. Н. Паюсова // Биохимическая и популяционная генетика рыб. — 1979. — 184 с.
8. Костенко С. Г. Полиморфизм белков украинского карпа и амурского сазана / С. Г. Костенко // Генетика, селекция, гибридизация рыб: Тез. 2-го Всесоюз. совещ., М., 1981. — С. 148–149.
9. Куликова Н. И. Электрофоретическое исследование мышечных белков амурской летней кеты (*Oncorhynchus keta*) и горбуши (*O. gorbuscha*) / Н. А. Куликова, Е. А. Салменкова // Биохимическая и популяционная генетика рыб. — Л., 1979. — С. 125–128.
10. Медведев Н. Н. Практическая генетика / Н. Н. Медведев. — М.: Наука, 1966. — 240 с.

11. Омельченко В. Т. Генетические различия гольцов арктической группы (*Salvelinus alpinus* L., *Salvelinus taranetzi* Kaganovsky) и тихоокеанской мальмы (*Salvelinus malma* Walbaum) / В. Т. Омельченко, Е. А. Салменкова // Генетика. — 1998. — Т. 34, № 11. — С. 1518–1522.
12. Плохинский Н. А. Алгоритмы биометрии / Н. А. Плохинский. — М.: Изд-во МГУ, 1980. — 150 с.
13. Anxolabelere D. Stabilite des polymorphisms morphologiques et enzymatique line population maturell de *Drosophila melanogaster* / D. Anxolabelere, P. Grard, L. Palabost, G. Periqiet // Arch. zool. exp. et gen. — 1976. — Vol. 177. — Fasc. 2. — P. 179.
14. Aslund S. E. Mating behaviour as a fitness comoneth in maintaining allozyme polymorphism in *Drosophila melanogaster* / S. E. Aslund // Hereditas. — 1977. — Vol. 87, № 2. — P. 261–270.
15. Lowry O. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. Lowry, N. Rosebrough, A. Farr, R. Randall // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, № 1. — P. 265–275.

Стаття надійшла до редакції 28.02.2012

#### **О. М. Андрієвський**

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, кафедра генетики та молекулярної біології  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна

### **ЕКСПРЕСІЯ КАРБОКСИЕСТЕРАЗ У МУТАНТІВ *DROSOPHILA MELANOGASTER***

#### **Резюме**

За допомогою реакції одночасного азосполучення визначали ступінь вираженості електрофоретично розділених молекулярних форм карбоксиестераз імаго *Drosophila melanogaster*. Матеріалом для аналізу слугували буферно-тритонові екстракти тканин окремо взятих самців, відібраних з лабораторних популяцій дрозофіли дикого типу та мутантних ліній: *vermilion*, *vestigial*, *yellow*, *chocolate*, *curved*, *Bar*, *black*, *brown*, *cut*, *white*, *white apricot*, *cinnabar*, *seria*, *ebony*. Показано індивідуальні особливості експресії ізоформ карбоксиестераз у кожній мутантній лінії; виявлено відмінності в рівні експресії карбоксиестераз у вивчених мутантів та мухи дикого типу.

**Ключові слова:** карбоксиестерази, мінливість, мутанти *Drosophila melanogaster*.

**A. M. Andrievskii**

Odessa National I. I. Mechnikov University, Department of Genetics and Molecular biology,  
2, Dvoryanskaya Str., Odessa, 65082, Ukraine

**EXPRESSION OF CARBOXYLESTERASES IN MUTANTS OF  
*DROSOPHILA MELANOGASTER***

**Summary**

Using the reaction of the simultaneous azo coupling we have determined the degree of expressiveness of electrophoretically divided molecular forms of carboxylesterases in imago of *Drosophila melanogaster*. Buffer-tritone tissue extracts of separately treated males selected from common laboratory populations of wild type drosophila and mutant lines: *vermilion*, *vestigial*, *yellow*, *chocolate*, *curved*, *Bar*, *black*, *brown*, *cut*, *white*, *white apricot*, *cinnabar*, *sepia*, *ebony* have served as the material for our analysis. The individual peculiarities in expression of the carboxylesterases isoforms in mutant lines have been described. The variation of the variability in expression carboxylesterases of mutant lines and wild type drosophila have been shown.

**Key words:** carboxylesterases, variability, mutants of *Drosophila melanogaster*.