

УДК 575.224.2: 577.15:595.773.4

А. М. Андриевский, канд. биол. наук, доц.,

С. Л. Мирось, канд. биол. наук, доц.

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

ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина; e-mail: andriev_scar@mail.ru

ЭКСПРЕССИЯ β -СПЕЦИФИЧНОЙ КАРБОКСИЭСТЕРАЗЫ У МУХ РАЗЛИЧНЫХ ЛИНИЙ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

С помощью реакции одновременного азосочетания определяли степень выраженности электрофоретически выделенной молекулярной формы β -карбоксиэстеразы имаго *Drosophila melanogaster*. Материалом для анализа служили буферно-трисовые экстракты тканей отдельно взятых самок и самцов, отобранных из лабораторных популяций дрозофил дикого типа (*Одесская 1*, *Canton-S*), а также мутантных линий *vestigial* и *Var*. Показаны индивидуальные особенности экспрессии одного из аллозимов β -карбоксиэстеразы у каждой линии; обнаружены половые и межлинейные различия в уровне экспрессии β -эстеразы. Определены основные статистические показатели по изучаемому биохимическому признаку у мух с разными генотипами.

Ключевые слова: β -карбоксиэстераза, изменчивость, линии *Drosophila melanogaster*.

Данные белкового полиморфизма находят широкое применение в популяционно-генетических, эволюционных и селекционных исследованиях и, прежде всего, при установлении генетических связей между дивергирующими группами организмов, подвергающихся действию различных форм отбора [1–4]. В настоящее время обнаружена связь белкового полиморфизма с внутривидовой изменчивостью по целому ряду морфологических и физиологических признаков [5, 6].

Так, имеются сведения о корреляции между типами зиготности по определённым локусам у различных животных (в основном у моллюсков, рыб и мелких млекопитающих) и показателями размеров и массы тела, уровнями жизнеспособности и плодовитости [1–4, 7–9]. Поэтому исследования в данной области имеют большую научную и практическую ценность.

Данная работа посвящена изучению связи между фенотипическими проявлениями некоторых морфологических мутаций и экспрессией β -специфичной карбоксиэстеразы у плодовой мушки.

К сожалению, в доступной литературе не удалось обнаружить сведений о зависимости морфологических признаков от уровня экспрессии тех или иных форм карбоксиэстераз у различных генетических линий дрозофилы.

В связи с этим целью данного исследования было установление индивидуальных и межлинейных различий в уровне экспрессии β -специфичной карбоксиэстеразы у самок и самцов имаго *Drosophila melanogaster*.

В задачи исследования входило: 1) проведение сравнительного анализа уровня экспрессии β -карбоксиэстеразы у особей дикого типа и линий с морфологическими мутациями; 2) проведение сравнительного анализа уровня экспрессии карбоксиэстераз у самок и самцов этих линий.

Материалы и методы исследования

Экспериментальным материалом служили половозрелые самцы и самки лабораторных популяций *Drosophila melanogaster* (Meigen) дикого типа (линии *Одесская 1*, *Canton-S*), а также мутантных линий: *vestigial* (*vg*, II хромосома, зачаточные крылья) и *Bar* (*B*, I хромосома, полосковидные глаза). Развитие исходных форм изучаемых линий, а также их потомков в течение многих поколений происходило в стационарных условиях на простой питательной среде [10] при температуре 25 °С.

Каждое новое поколение дрозофил получали путём близкородственного скрещивания потомков в условиях, исключающих репродуктивное перекрывание разных поколений.

Перед приготовлением биологических проб одновозрастных мух наркотизировали диэтиловым эфиром и разделяли по полу. Гомогенат тканей каждой отдельно взятой особи готовили в эппендорфе в объёме 10 мкл 0,1 М глицин-NaOH буфера рН 9,0, содержащего 1% тритона X-100. Полученные гомогенаты (30 проб в расчёте на один эксперимент) сразу же центрифугировали в течение 15 мин при 10000 g и 4 °С. К отобраным экстрактам добавляли по 5 мкл 0,01% раствора бромфенолового синего, содержащего 60% сахарозы. Приготовленные таким образом образцы подвергали электрофоретическому разделению в системе вертикально-пластинчатого щелочного (рН 8,3 – 8,9) 10% полиакриламидного геля. При силе тока 40 мА в расчёте на два гелевых блока электрофорез проходил за 3 часа. После электрофореза гелевые блоки отмывали дистиллированной водой до нейтрального значения рН и замачивали на 15 мин в 50 мл 0,1 М трис-глицинового буфера рН 7,4. Далее инкубировали в 25 мл того же буфера с добавкой 12 мг β-нафтилацетата и 25 мг синего прочного *BB* (субстраты и диазоний предварительно растворяли в 50 мкл диметилформамида). Инкубация гелей в субстратной среде длилась 20 мин. при 25 °С, после чего реакцию смесь декантировали, а гели заливали кипящей дистиллированной водой, сканировали и анализировали путём компьютерной денситометрии, используя специальную лицензионную программу «*АнаИС*». Об уровне экспрессивности изучаемого фермента судили по интенсивности окрашивания азокрасителем индивидуальной зоны геля, совпадающей с местом специфического расположения β-карбоксиэстеразы на момент завершения электрофореза.

Статистическую обработку полученных данных проводили методом непараметрического дисперсионного анализа по критерию Краскла-Уоллиса (*H*) согласно рекомендациям, приведенным в руководстве [11]; достоверность половых и межлинейных отличий определяли по критерию Уилкоксона (*U*) для малых выборок при уровне значимости $P < 0,01$. В работе использовали реактивы фирм «*Reanal*» (Венгрия) и «*Chemapol*» (Чехия), а также установку для электрофореза «*VE-4*» российского производства (г. Москва, МГУ, «*Helikon*»).

Результаты исследования и обсуждение

Среди разнообразных форм карбоксиэстераз исследуемых линий *Drosophila melanogaster* наиболее активной по отношению к эфирам карбоновых кислот является β-специфичная карбоксиэстераза, представленная двумя аллозимами (β-*Est^s* и β-*Est^f*) [1]. В связи с этим в зависимости от структуры локуса β-эстеразы, в популяциях мух могут встречаться как гомозиготные, так и гетерозиготные

особи, частота которых во многом зависит от формы и направления действия отбора.

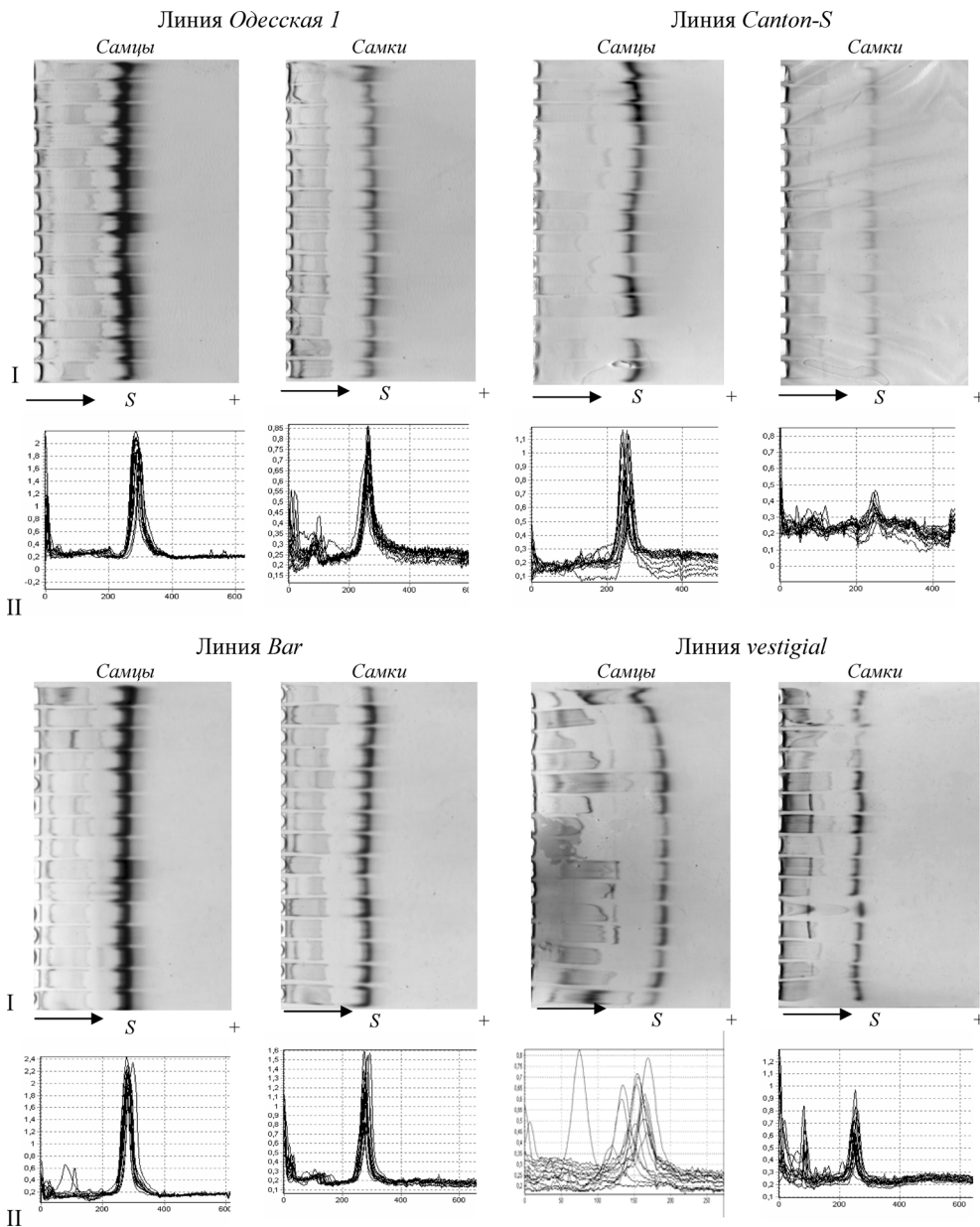


Рис. 1. Результаты идентификации и оценки уровня экспрессии β -специфичной эстеразы самцов и самок имаго диких и мутантных линий *Drosophila melanogaster*. I – электрофореграммы: стрелкой указано направление движения фермента в ходе электрофореза, S – медленноподвижный аллозим β -эстеразы; II – денситограммы: по оси y – оптическая плотность (ΔD_0 , относительные единицы), по оси x – длина треков (пиксели)

Как видно из рисунка 1, все особи изучаемых линий являются доминантными гомозиготами и обладают только S-формой β-эстеразы. Внутри каждой линии по признаку активности β-эстеразы обнаруживаются индивидуальные различия, как в группе самцов, так и в группе самок. Наибольшая вариабельность признака экспрессии β-эстеразы наблюдается среди самцов линии *Одесская 1*, наименьшая – в группе самок линии *Canton-S* (рис. 2).

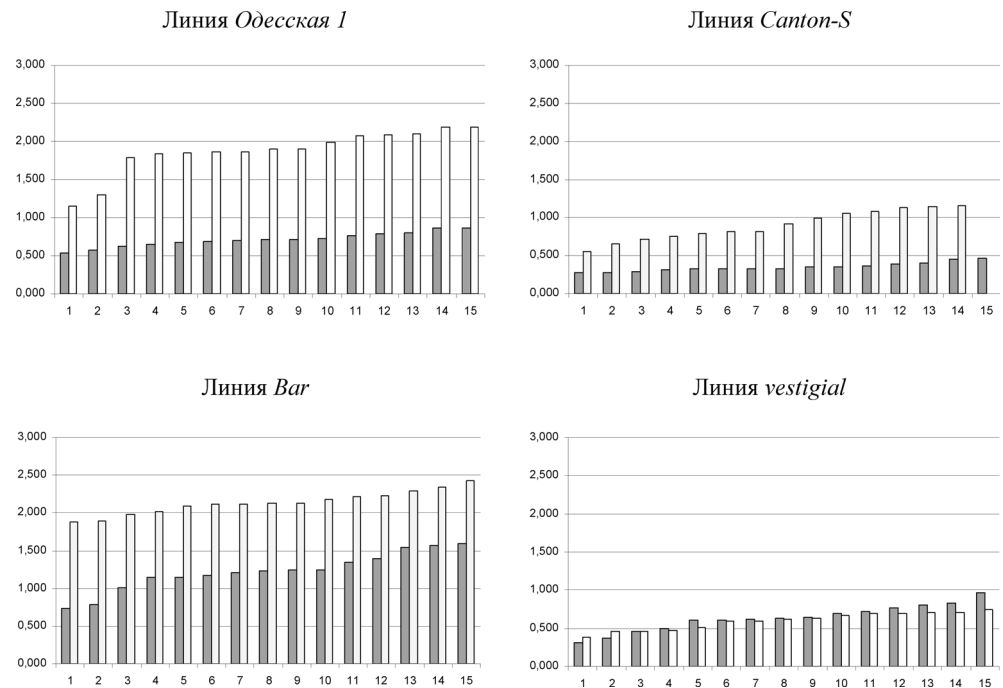


Рис. 2. Вариационные ряды изменчивости экспрессии β-специфичной эстеразы у самцов и самок имаго диких и мутантных линий *Drosophila melanogaster*: по оси x – порядковые номера самок (тёмные колонки) и самцов (светлые колонки); по оси y – оптическая плотность (ΔDo , относительные единицы)

Следует обратить внимание на то, что в структуре каждой линейной популяции наблюдаются характерные для неё частоты встречаемости особей с разными уровнями экспрессии β-эстеразы (рис. 3).

Так, в группе самцов линии *Одесская 1* более 10% особей обладают минимальным для данной популяции уровнем экспрессии (1,351–1,500 относительных единиц), около 35% особей обнаруживают средний уровень экспрессии (1,802–1,950 относительных единиц), а обладатели максимального уровня экспрессии фермента (2,101–2,250 относительных единиц) составляют около 7%. Сходное распределение особей, однако при более низкой активности у них эстеразы, наблюдается и среди самок *Одесской* линии. При этом у последних отмечается меньший диапазон вариабельности экспрессии β-эстеразы по сравнению с самцами (рис. 3). Иное распределение частот генотипов характерно для линии *Canton-S*. В этом случае самцы – обладатели минимального уровня экспрессии – составили 15%, а обладатели среднего и высокого уровня активности эстеразы встречались с одинаковой частотой – по 22%. Что касается мутантной

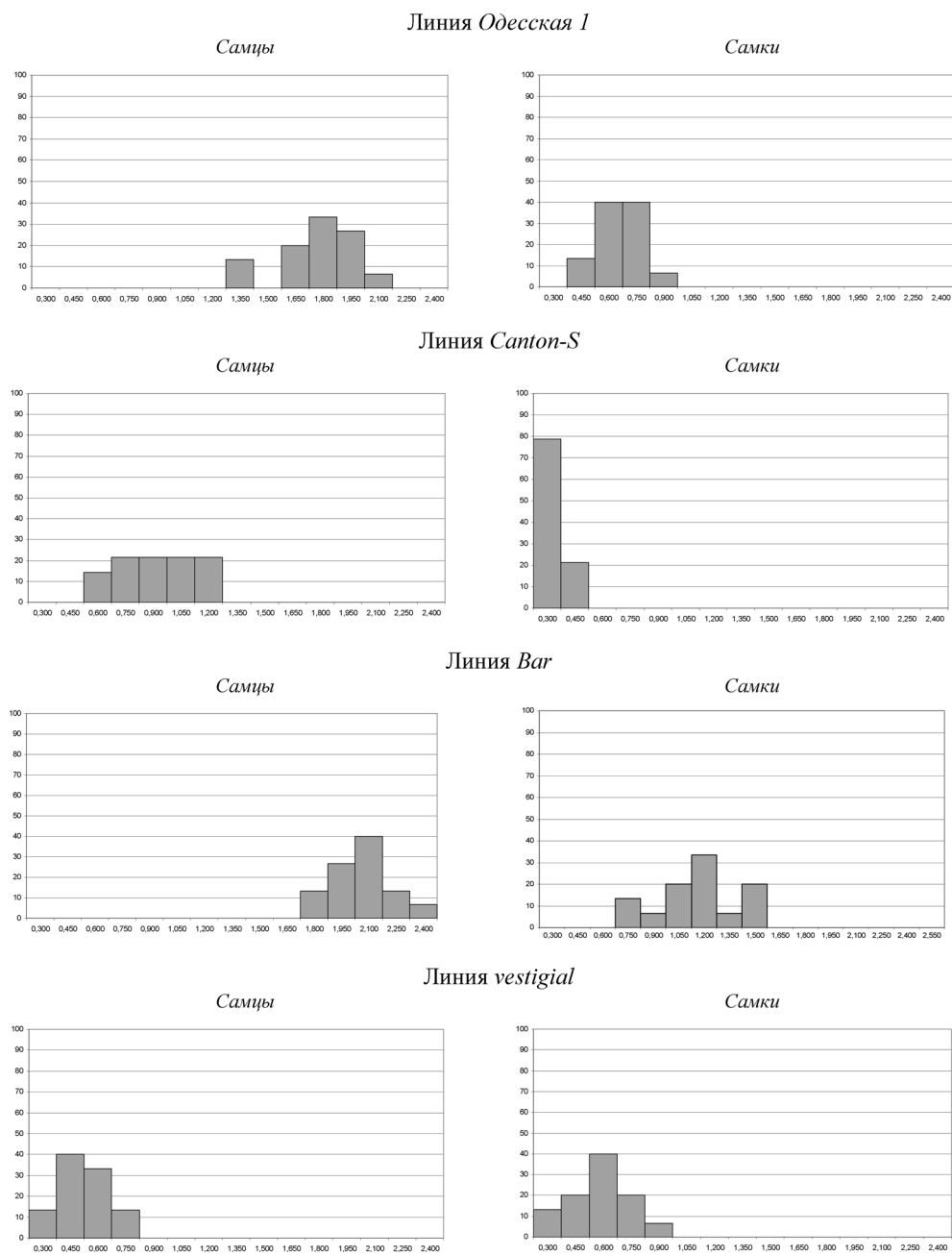


Рис. 3. Частота встречаемости особей с разным уровнем экспрессии β -специфичной эстеразы диких и мутантных линий *Drosophila melanogaster*: по оси x — оптическая плотность (ΔDo , относительные единицы); по оси y — относительная частота встречаемости, %

линии *Bar*, то в группе самцов 40% особей характеризуются средним уровнем β -эстеразной активности, а доли особей с минимальным и максимальным уровнем экспрессии составляют 12% и 7% соответственно. В группе самок той же мутантной линии варибельность изучаемого признака по сравнению с самцами значительно выше: доля особей со средним уровнем экспрессии составляла около 35%, с низким уровнем – 12% и с высоким – 20%. В группе самцов популяции линии *vestigial*, по сравнению с другими линиями, наблюдался самый низкий уровень экспрессии β -эстеразы, при этом, 40% особей обладали средней степенью активности фермента, а количество особей с низким и высоким уровнями экспрессии β -эстеразы было одинаковым – по 12%. В группе самок наблюдались сходные соотношения частот особей с разными уровнями экспрессии фермента (рис. 3).

Результат сравнительного анализа показателей экспрессии β -эстеразы в группах самцов и самок изучаемых диких и мутантных линий указывает на то, что максимальным проявлением биохимического признака характеризуются самцы линии *Bar*, которым уступают самцы *Одесской* линии. Та же закономерность прослеживается и для самок этих линий. Что касается самцов и самок линии *vestigial*, то по уровню экспрессии β -эстеразы они значительно уступают самцам всех исследуемых линий. Любопытно, что у мух линии *vestigial*, в отличие от особей остальных линий, практически отсутствуют половые различия по наблюдаемому биохимическому критерию (табл. 1).

Таблица 1
Статистические показатели экспрессии β -специфичной эстеразы у самцов и самок диких и мутантных линий *Drosophila melanogaster*

Линия, пол		Среднее арифметическое, \bar{x}	Стандартное отклонение, s	Ошибка среднего арифметического, $s_{\bar{x}}$	Ошибка стандартного отклонения, s_s	Размах вариации, d
<i>Одесская 1</i>	♂	1,872 *	0,076	0,056	0,054	1,040
	♀	0,710 *	0,024	0,030	0,017	0,324
<i>Canton-S</i>	♂	0,896**	0,053	0,057	0,037	0,597
	♀	0,349**	0,015	0,012	0,010	0,184
<i>Bar</i>	♂	2,136**	0,040	0,041	0,028	0,550
	♀	1,224**	0,065	0,066	0,046	0,858
<i>vestigial</i>	♂	0,598 *	0,033	0,046	0,023	0,438
	♀	0,636 *	0,046	0,046	0,032	0,661

Примечание: Данные отражают оптическую плотность (ΔDo , относительные единицы) зоны полиакриламидного геля, содержащей связанные с диазонием продукты гидролиза β -нафтилацетата. * (первая) – половые различия достоверны при $P < 0,01$; * (вторая) – межлинейные различия по сравнению с экспрессией эстеразы мух линии *Одесская 1* достоверны при $P < 0,01$.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что уровень экспрессии β -карбоксиэстеразы в целом зависит от наличия той или иной морфологической мутации. Самый высокий уровень ферментативной экспрессии отмечен у линии с доминантной мутацией *Bar*, (в 1,14 раза выше, чем у мух дикого типа *Одесская 1* – для самцов и в 1,71 раз – для самок). Мутация *vestigial*,

известная своим негативным плейотропным эффектом в отношении основных показателей жизнеспособности у дрозофилы, также вызывает снижение ферментативной активности β-карбоксиэстеразы (в 3,1 раза у самцов и в 1,1 раз у самок). Не исключено, что у мутанта *vestigial* снижение плодовитости, сокращение продолжительности жизни и другие физиологические отклонения от нормы являются результатом нарушения биохимических процессов, и в частности, угнетения экспрессивности ферментов эстеразной системы. С другой стороны, присутствие в генотипе дрозофилы доминантного аллеля *Bar*, нарушающего морфогенез зрительного органа у мутантных мух, по сравнению с мухами дикого типа, наоборот, стимулирует экспрессию β-эстеразы, причём как у самцов, так и у самок.

Различия в уровне экспрессии β-карбоксиэстеразы характерны и для мух линий дикого типа, имеющих разное происхождение. Так, у самцов и самок дрозофил, полученных из местной популяции (*Одесская 1*) экспрессия ферментов оказывается в 2,0 раза более высокой по сравнению с таковой мух линии *Canton-S*, имеющих иное происхождение.

Выводы

1. Исследуемые линии *Drosophila melanogaster* отличаются по признаку экспрессии β-специфичной эстеразы. Наибольший уровень экспрессии наблюдается у мух мутантной линии *Bar*, средний — у дрозофил линии *Одесская 1*, самцов *Canton-S*, а также у мутантных мух линии *vestigial*. Наименьший уровень экспрессии β-специфичной эстеразы наблюдается у самок линии *Canton-S*.

2. Для линий *Одесская 1*, *Canton-S*, а также линии *Bar* по критерию экспрессии β-эстеразы характерен половой диморфизм с существенным преобладанием активности фермента у самцов.

3. Самцы и самки диких и мутантных линий характеризуются разной вариабельностью признака экспрессии β-эстеразы: наибольший диапазон изменчивости наблюдается у самцов линий дикого типа, наименьший — у самцов мутантных линий.

Литература

1. Голубцов А. С. Внутрипопуляционная изменчивость животных и белковый полиморфизм. — М.: Наука, 1988. — 165 с.
2. Ильин И. И. Изучение биохимического полиморфизма в природной популяции ротана *Percottus glehhi* // Генетика. — 1982. — Т. 18, № 10. — С. 1645–1652.
3. Касинская С. И. Темп естественного отбора в экспериментальной популяции дрозофилы // Отбор и мутационный процесс в популяции. — Минск: Наука и техника, 1985. — С. 11–25.
4. Курпичников В. С. Селективный характер биохимического полиморфизма у камчатской нерки (*Oncothynchus nerka* Walb.) // Основы классификации и филогении лососевых рыб. — Л.: Зоологический институт АН СССР, 1977. — С. 53–60.
5. Aslund S. E. Mating behaviour as a fitness comoneht in maintaining allozyme polymorphism in *Drosophila melanogaster* // Hereditas. — 1977. — Vol. 87, N 2. — P. 261–270.
6. Anxolabelere D., Grard P., Palabost L., Periqiet G. Stabilité des polymorphismes morphologiques et emzymatique line population maturell de *Drosophila melanogaster* // Arch. zool. exp. et gen. — 1976. — Vol. 177. — Fasc. 2. — P. 179.
7. Андреевский А. М., Чернов И. А. Изменчивость карбоксиэстеразной системы у лабораторной популяции *Drosophila melanogaster* дикого типа // Вісник ОНУ. — 2005. — Т. 10. — Вип. 3. — С. 19–27.

8. Коваль Е. З., Богданов Л. В. Биохимический полиморфизм девяти видов камбал подсемейства *Pleuronectinae* в заливе Петра Великого // Биохимическая и популяционная генетика рыб. – Л., 1979. – С. 99–105.
9. Корешкова Н. Д., Паюсова А. Н. Популяционная структура рыбаца (*Vilba vilba*), выявленная на основании электрофоретического анализа мышечных эстераз // Биохимическая и популяционная генетика рыб. – Л., 1979. – 184 с.
10. Медведев Н. Н. Практическая генетика. – М.: Наука, 1989. – 320 с.
11. Атраментова Л. О., Утевська О. М. Статистичні методи в біології: Підручник. – Х.: ХНУ, 2007. – 288 с.

О. М. Андриевський, С. Л. Мирось

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

**ЭКСПРЕСИЯ β -СПЕЦИФИЧНОЙ КАРБОКСИЕСТЕРАЗИ У МУХ РІЗНИХ ЛІНІЙ
*DROSOPHILA MELANOGASTER***

Резюме

За допомогою реакції одночасного азосполучення визначали ступінь прояву електрофоретично виділеної молекулярної форми β -карбоксиестерази імаго *Drosophila melanogaster*. Матеріалом для аналізу слугували буферно-трисові екстракти тканин окремо взятих самок і самців з лабораторних популяцій дрозофіл дикого типу (*Одеська 1*, *Canton-S*), а також мутантних ліній *vestigial* та *Bar*. Показано індивідуальні особливості експресії одного із алелів β -карбоксиестерази у кожній мутантній лінії; знайдено статеві та міжлінійні відмінності у рівні експресії β -естерази. Визначено основні статистичні показники для досліджуваної біохімічної ознаки у мух з різними генотипами.

Ключові слова: β -карбоксиестераза, мінливість, лінії *Drosophila melanogaster*.

A. M. Andrievsky, S. L. Miros

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

**THE EXPRESSION OF β -SPECIFIC CARBOXYLESTERASES IN DIFFERENT LINES'
OF *DROSOPHILA MELANOGASTER***

Summary

Using the reaction of the simultaneous azo coupling we have determined the degree of expressiveness the reversed molecular β -carboxylesterase form in imago of *Drosophila melanogaster*. Buffer-tritone tissue extracts of separately treated males and females that were selected from common laboratory populations of wild type drosophila (*Odesskaya 1*, *Canton-S*) and mutant lines *vestigial* and *Bar*, were the material for our investigation. The individual peculiarities in expression of one of the carboxylesterases isoforms in each mutant lines have been described. The sex and lines variability in expression of β -esterase have been find. Statistic indices of investigated biochemical signs of the different genotypes flies have been obtained.

Key words: β -carboxylesterase, variability, lines of *Drosophila melanogaster*.