

УДК 577.152.31:591.3/.4/.8:595.773.4

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

**В. А. Кучеров**, мл. науч. сотр.

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,  
кафедра генетики и молекулярной биологии,  
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

## **ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ КАРБОКСИЭСТЕРАЗ *DROSOPHILA MELANOGASTER***

С помощью гель-фильтрации на сефадексе G-50 и ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-сефадексе проводили выделение основных карбоксиэстераз имаго дрозофилы. Методом электрофореза в полиакриламидном геле осуществляли разделение белковых компонентов исходных экстрактов и хроматографических фракций. Путём проведения реакции азосочетания идентифицировали электрофоретические фракции карбоксиэстераз дрозофилы на этапах их выделения. Установлена кислая природа основных форм карбоксиэстераз, показана их субстратная специфичность, разработана схема выделения и идентификации указанных ферментов.

**Ключевые слова:** карбоксиэстеразы, хроматография, электрофорез, дрозофила.

Судя по многочисленным данным, исследование карбоксиэстераз живых организмов в основном проводится либо на уровне фиксированных клеток и тканей с помощью гистохимических методов, либо *in vitro* на уровне гомогенатов и экстрактов путем спектрофотометрического определения общеэстеразной активности [1–10]. К недостаткам таких подходов, прежде всего, следует отнести то, что и в первом, и во втором случаях наблюдаемое проявление эстеразной активности может оказаться результатом действия многих ферментов совершенно разных классов. В недифференцированных поствитальных системах суммарное проявление активности, как правило, наблюдается за счет довольно обширного перекрытия субстратной специфичности всех имеющихся в данной системе эстераз, и в том числе карбоксильных. При этом трудно судить об индивидуальном реальном вкладе отдельных ферментов в метаболизм сложных эфиров карбоновых кислот и спиртов.

Преследуя цель исследовать уровень проявления эстеразной активности обособленными формами карбоксиэстераз, мы применили методы гель-фильтрации, ионообменной хроматографии, а также кислого и щелочного электрофореза, позволившие провести разделение очищенных форм карбоксиэстераз дрозофилы с последующим гистохимическим выявлением их активности и локализации в полиакриламидном геле с помощью реакции одновременного азосочетания продуктов гидролиза синтетических сложных эфиров и соли диазония.

## Материалы и методы исследования

Биологическим источником изучаемых карбоксиэстераз служила *Drosophila melanogaster* дикого типа, культивируемая в лабораторных условиях при температуре 25 °С на обычной питательной среде [11]. Полученное путем близкородственного скрещивания родительских форм одновозрастное половозрелое потомство замораживали при -10 °С в течение 15 минут и гомогенизировали 2 минуты в системе 0,1 М глицин-NaOH буфера рН 9,0, содержащего 1 % тритона X-100, в соотношении 1 : 6. Гомогенаты центрифугировали при 12 000 g в течение 15 минут, после чего полученные экстракты использовали для хроматографической очистки и электрофоретического разделения содержащихся в них карбоксиэстераз. Гель-фильтрацию проводили на колонке (130 × 35 мм) с сефадексом G-50 ("Pharmacia", Швеция), уравновешенным 0,1 М трис-ацетатным буфером рН 7,5. Экстракт вносили в объеме 1 мл. Скорость прохождения элюента составляла 72 мл/час. При такой скорости фильтрация компонентов экстракта проходила за 3 часа. В полученных фракциях спектрофотометрически определяли оптическую плотность при 280 нм; отдельно анализировали результат реакции проб на реактив Фолина при 750 нм, а также контролировали уровень трипсиноподобных пептидгидролаз по расщеплению субстрата БАПНА [12]. О наличии в элюатах активности карбоксиэстераз судили по гидролизу синтетических субстратов α- и β-нафтилацетатов и α-нафтилпропионата, наблюдаемому после щелочного электрофоретического разделения ферментов в 10 % полиакриламидном геле. Реакцию одновременного азосочетания проводили в инкубационной среде 0,1 М трис-глицинового (либо фосфат-фосфатного) буфера рН 7,4, взятого в объеме 50 мл и содержащего по 25 мг α- и β-нафтилацетата либо 50 мг α-нафтилпропионата и 50 мг соли диазония — прочного синего RR. (В отдельном случае все три субстрата, взятые по 25 мг, растворяли в 50 мл буфера, куда вносили 50 мг диазотата.) Образование азокрасителя в гелевом блоке проходило в течение одного часа при температуре 25 °С.

Фракции, собранные при гель-фильтрации и обладающие выраженной эстеразной активностью, объединяли и наносили на колонку (200 × 10 мм) с ДЭАЭ-сефадексом ("Pharmacia", Швеция), адаптированным к 0,1 М трис-ацетатному буферу рН 7,5. После внесения образца анионообменник промывали буферным раствором для удаления неадсорбирующихся в данных условиях компонентов. Связанные с носителем белки вымывали со скоростью 72 мл/час растворами KCl со ступенчато нарастающими концентрациями: 0,01, 0,1, 0,2, 0,5 и 1,0 М. Объем каждого элюента с хлоридом калия составлял 100 мл; объем индивидуальной фракции — 3 мл. Собранные элюаты спектрофотометрировали при 280 нм, проводили реакцию по методу Лоури, определяли наличие в них пептидгидролаз, а также подвергали электрофоретическому разделению и окраске [1, 13] с целью выявления индивидуальных карбоксиэстераз.

В отдельном варианте исходный экстракт тканей имаго хроматографировали на анионообменнике без предварительного группового разделения. В этом случае на колонку с ДЭАЭ-сефадексом наносили 2 мл супернатанта; в качестве элюента применяли 0,050 М трис-ацетатный буфер pH 7,5. Все ионообменные хроматографии проходили в течение 6 часов.

Для установления природы изучаемых ферментов использовали метод вертикального пластинчатого (140 × 120 × 1 мм) электрофореза в кислой (аланин-уксусный буфер pH 4,5) и щелочной (трис-глициновый буфер pH 8,3) средах. При этом наряду с экстрактами имаго анализировали первичные и вторичные экстракты яиц, личинок и куколок, приготовленные в равных условиях. С целью контроля разделения белков разной природы в варианте щелочного фореза, пробы экстрактов, содержащие 50 % сахарозу, вносили в слоты, сформированные в средней части гелевого блока. После этого свободный объём полимеризационной камеры заполняли тем же 10 % гелем. В качестве лидирующих красителей применяли бромфеноловый синий и метиловый зелёный, взятые в 0,1 % концентрации. Начальное концентрирование белков происходило в течение 20 мин при 10 и 20 мА в расчёте на два гелевых блока, после чего устанавливали ток силой в 40 мА. После завершения электрофореза гелевые блоки использовали для обнаружения и идентификации в них карбоксиэстераз. Все операции, связанные с хроматографиями и электрофоретическим выявлением активности ферментов проводили при температуре 25 °С в предельно сжатые сроки; в случае необходимости опытные препараты хранили при 4 °С, либо замораживали.

Приведенные в статье электрофореграммы получали путем прямого сканирования гелевых блоков с сохранением всех элементов оригинала. Хроматограммы строили, пользуясь компьютерной программой "Excel".

В работе в основном были использованы реактивы фирм "Reanal" (Венгрия) и "Chemapol" (Чехия).

### **Результаты исследований и обсуждение**

Электрофоретическое разделение в щелочных условиях (pH 8,3) экстрактов тканей личинок, куколок и имаго дрозофилы позволило дифференцировать две основные формы карбоксиэстераз, имеющих разную степень экспрессивности в зависимости от стадии развития насекомого. В инкубационной среде, содержащей два субстрата —  $\alpha$ -нафтилацетат и  $\beta$ -нафтилацетат, электрофоретически более подвижная форма всегда проявляет  $\beta$ -фильную эстеразную активность (в этом случае продукт азосочетания окрашивает зоны геля, где локализована карбоксиэстераза, в пурпурный цвет). В то же время менее подвижная форма преимущественно гидролизует  $\alpha$ -нафтилацетат (зоны геля, содержащие этот фермент, приобретают коричневое окрашивание). Судя по результату электрофореза, представленного на

рис. 1, определяемые формы карбоксиэстераз являются белками с хорошо выраженными кислыми свойствами. Однако эти свойства проявляются лишь в условиях щелочного электрофореза при pH 8,3–8,9. После электрофореза в кислой среде при pH 4,5 в гелевом блоке обнаруживается только карбоксиэстераза, обладающая  $\beta$ -фильной активностью по расщеплению  $\beta$ -нафтилацетата в системе с двумя субстратами (рис. 2 А), либо гидролизующая отдельно взятый  $\alpha$ -нафтилпропионат (рис. 3 А). Полученный результат подтверждается электрофорезом с последующим гистохимическим выявлением карбоксиэстераз вторичных экстрактов личинок, куколок и имаго (рис. 2 Б и 3 Б). Поскольку поведение этой формы эстеразы в условиях щелочного электрофореза практически совпадает с таковым в условиях кислого электрофореза, мы полагаем, что изучаемая  $\beta$ -фильная эстераза представляет собой белок со слабо выраженными кислыми свойствами. Что касается  $\alpha$ -фильной карбоксиэстеразы, то она после кислого электрофореза не обнаруживается вовсе (рис. 2, 3). Обладающий резко выраженными кислыми свойствами этот фермент при pH 4,5 не приобретает щелочных свойств и не способен мигрировать к катоду. То, что в получаемых нами экстрактах личинок, куколок и имаго отсутствуют карбоксиэстеразы щелочной природы, подтверждает и результат электрофоретического разделения ферментных препаратов при pH 8,3 в системе, позволяющей сохранять и учитывать белки как анионной, так и катионной природы (рис. 4).

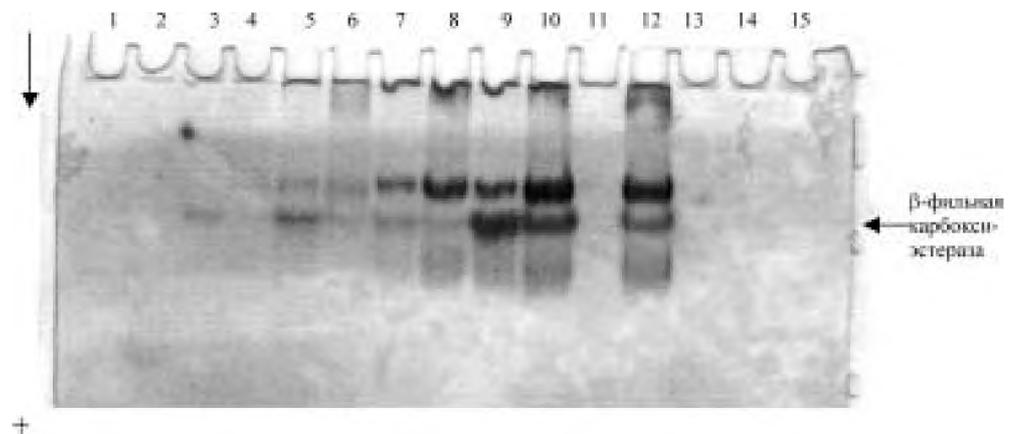


Рис. 1. Электрофоретический спектр кислых карбоксиэстераз экстрактов тканей яиц, личинок, куколок и имаго дрозофилы:

Первичная экстракция. Инкубация 1 час в нейтральной среде, pH 7,4. Субстраты:  $\alpha$ -нафтилацетат +  $\beta$ -нафтилацетат. Слоты: 1 — без пробы; 2 — без пробы; 3 — яйца; 4 — яйца + тритон 1 %; 5 — личинки; 6 — личинки + тритон 1 %; 7 — куколки; 8 — куколки + тритон 1 %; 9 — имаго; 10 — имаго + тритон 1 %; 11 — имаго самцы + тритон 1 %; 12 — имаго самки + тритон 1 %; 13 — химотрипсин (20 мкг); 14 — без пробы; 15 — без пробы.

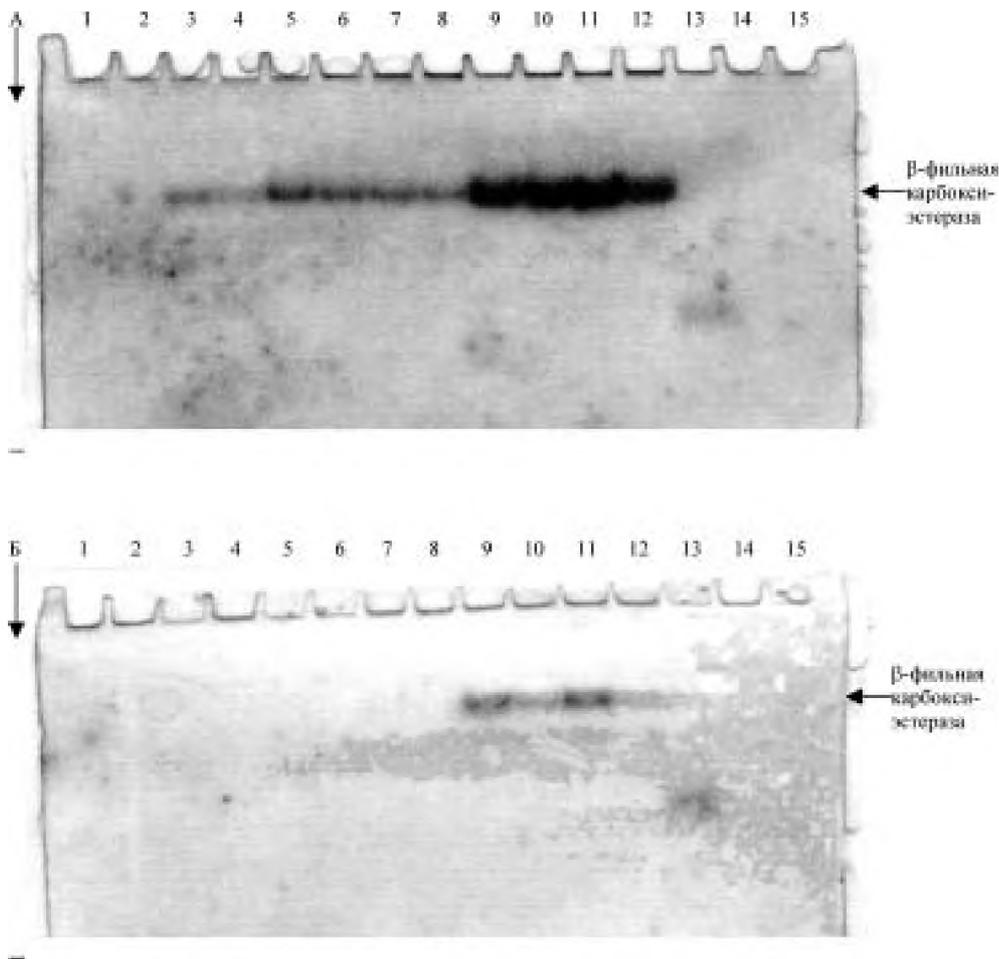


Рис. 2. Электрофоретическое разделение карбоксиэстераз экстрактов тканей яиц, личинок, куколок и имаго дрозофилы в кислой среде (рН 4,5):

Первичная (А) и вторичная (Б) экстракции. Инкубация 1 час в нейтральной среде, рН 7,4. Субстраты:  $\alpha$ -нафтилацетат +  $\beta$ -нафтилацетат. Слоты: 1 — питательная среда; 2 — питательная среда + тритон 1 %; 3 — яйца; 4 — яйца + тритон 1 %; 5 — личинки; 6 — личинки + тритон 1 %; 7 — куколки; 8 — куколки + тритон 1 %; 9 — имаго; 10 — имаго + тритон 1 %; 11 — имаго самцы + тритон 1 %; 12 — имаго самки + тритон 1 %; 13 — химотрипсин (20 мкг); 14 — трипсин (20 мкг); 15 — папаин (20 мкг).

Как видно из электрофореграммы, изучаемые формы карбоксиэстераз представлены исключительно белками кислой природы.

Несмотря на то, что  $\alpha$ -фильная и  $\beta$ -фильная карбоксиэстеразы существенно различаются по электрофоретической подвижности, их молекулярные массы, видимо, близки.

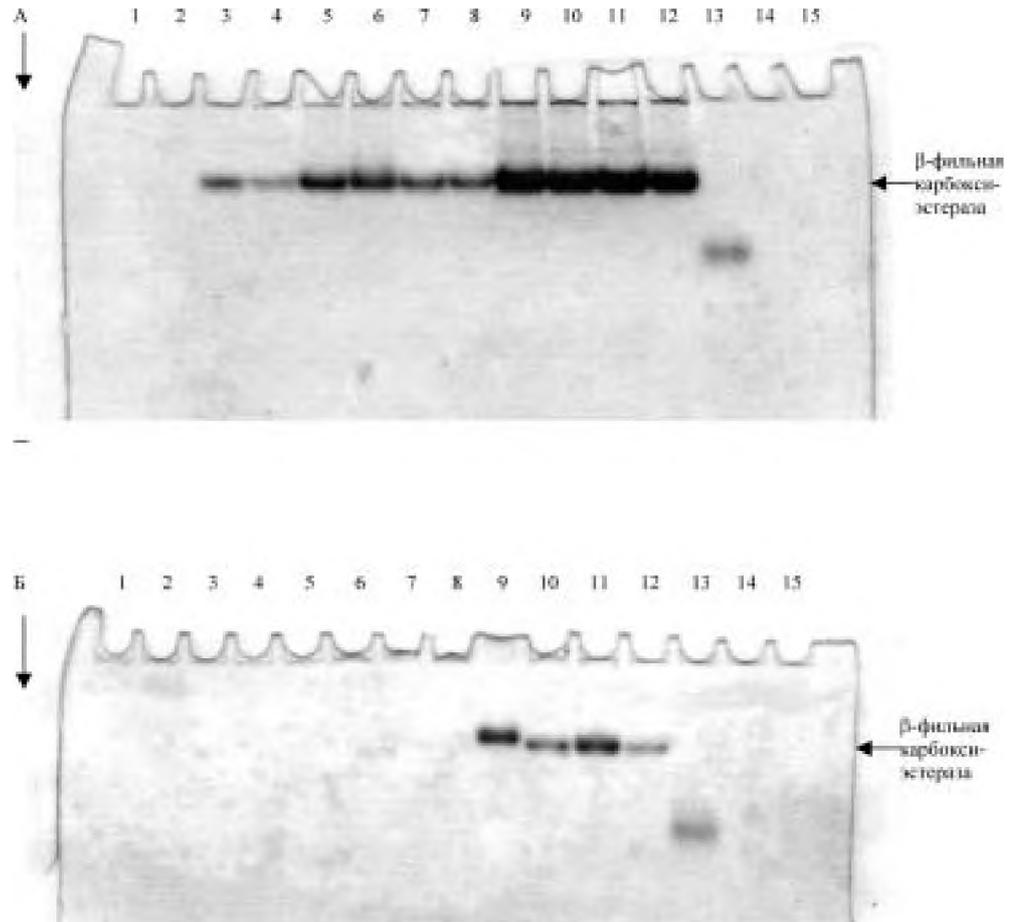


Рис. 3. Электрофоретическое разделение карбоксиэстераз экстрактов тканей яиц, личинок, куколок и имаго дрозофилы в кислой среде (рН 4,5):

Первичная (А) и вторичная (Б) экстракции. Инкубация 1 час в нейтральной среде, рН 7.4. Субстрат:  $\alpha$ -нафтилпропионат. Слоты: 1 — питательная среда; 2 — питательная среда + тритон 1 %; 3 — яйца; 4 — яйца + тритон 1 %; 5 — личинки; 6 — личинки + тритон 1 %; 7 — куколки; 8 — куколки + тритон 1 %; 9 — имаго; 10 — имаго + тритон 1 %; 11 — имаго самцы + тритон 1 %; 12 — имаго самки + тритон 1 %; 13 — химотрипсин (20 мкг); 14 — трипсин (20 мкг); 15 — папаин (20 мкг).

В процессе гель-фильтрации на сефадексе G-50 эти ферменты не отделяются друг от друга и попадают в первый белковый пик, образуемый тяжелыми молекулами (рис. 5). Очевидно то, что во фракциях 16–72, содержащих низкомолекулярные компоненты экстракта имаго, совершенно отсутствуют формы основных карбоксиэстераз. Обращает на себя внимание и то, что выход фильтрующихся эстераз практичес-

ки совпадает с выходом трипсиноподобной пептидгидролазы пищеварительной системы дрозофилы. Этот фермент, возможно, принимает непосредственное участие в неограниченном протеолизе в системе *in vitro*, вызывая деградацию различных белков, в том числе и эстераз. Электрофоретическое изучение ферментов показало, что их выделение и очистка на этапе гелевой фильтрации не приводят к потере ни одной из определяемых активностей. Значительное снижение скорости гидролиза субстратов эстеразами вымываемых из колонки фракций по сравнению с эстеразами исходного экстракта, по-видимому, вызвано сильным (примерно, 30-кратным) разведением нанесенной на колонку пробы в ходе фильтрации.

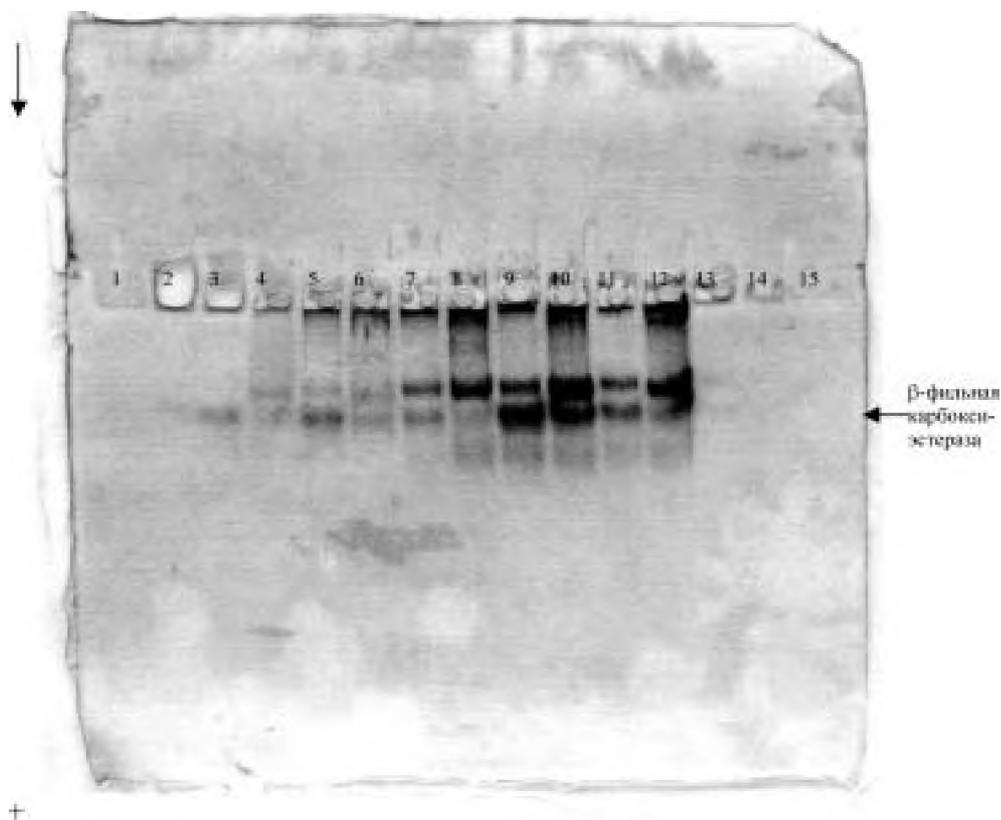


Рис. 4. Разделение карбоксиэстераз экстрактов тканей яиц, личинок, куколок и имаго дрозофилы в условиях двухстороннего щелочного электрофореза:

Первичная экстракция. Инкубация 1 час в нейтральной среде, pH 7,4. Субстраты:  $\alpha$ -нафтилацетат +  $\beta$ -нафтилацетат +  $\alpha$ -нафтилпропионат. Слоты: 1 — питательная среда; 2 — питательная среда + тритон 1 %; 3 — яйца; 4 — яйца + тритон 1 %; 5 — личинки; 6 — личинки + тритон 1 %; 7 — куколки; 8 — куколки + тритон 1 %; 9 — имаго; 10 — имаго + тритон 1 %; 11 — имаго самцы + тритон 1 %; 12 — имаго самки + тритон 1 %; 13 — химотрипсин (20 мкг); 14 — без пробы; 15 — без пробы.

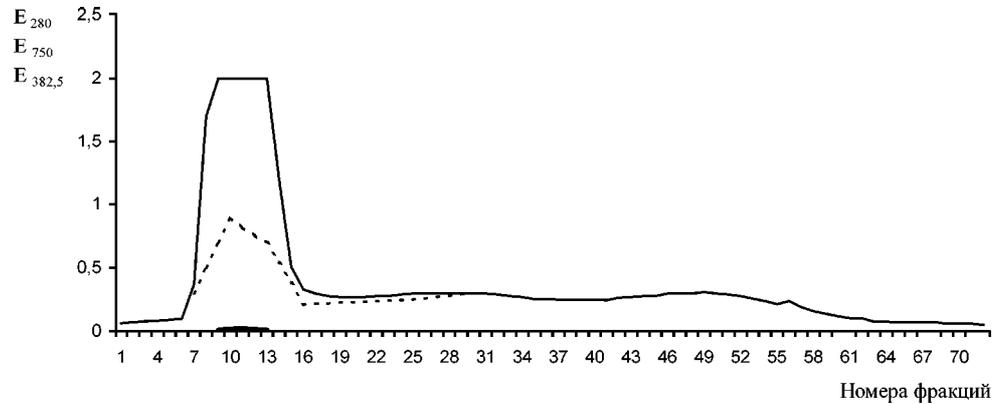


Рис. 5. Элютограмма гелевой фильтрации через сефадекс G-50 экстракта тканей имаго дрозофилы:  
 — оптическая плотность при 280 нм; - - - оптическая плотность при 750 нм; — — — оптическая плотность при 382,5 нм

Определение содержания белка в полученных фракциях методом Лоури показало, что основная его доля заключена в первом хроматографическом пике, средние фракции которого обладают самой высокой оптической плотностью при 280 нм.

В результате хроматографического разделения очищенной путем гелевой фильтрации суммарной фракции, содержащей эстеразы, на колонке с ДЭАЭ-сефадексом выделена довольно большая группа белков, которые не связываются с анионообменником при pH 7,5. На хроматограмме (рис. 6) фракции, включающие эти белки, формируют первый пик. Применение ступенчатого градиента KCl в концентрациях 0,01 М и 0,1 М не приводило к вымыванию слабокислых (при pH 7,5) белков. Следующий пик формировался белками, десорбция которых наблюдалась в присутствии 0,2 М раствора KCl. Повышение концентрации соли до 0,5 М вызывало высвобождение ряда белковых компонентов сильнокислой природы, обладающих, вероятно, разной молекулярной массой. 1 М раствор хлорида калия приводил к выходу максимально кислых белковых компонентов, хотя, судя по окраске стартовой зоны носителя, большая доля примесей всё ещё оставалась связанной с анионообменником. Выраженной эстеразной активностью обладали фракции первого белкового пика. Причем, из двух форм карбоксиэстераз, стабильно проявляющихся на всех предыдущих этапах выделения, сохранялась только  $\alpha$ -фильная (расщепляющая  $\alpha$ -нафтилацетат). В некоторых фракциях остальных пиков имела место следовая активность той же карбоксиэстеразы. Остается невыясненной причина нестабильности  $\beta$ -фильной формы эстеразы; замечено лишь, что после гелевой фильтрации фермент существенно снижает свою активность.

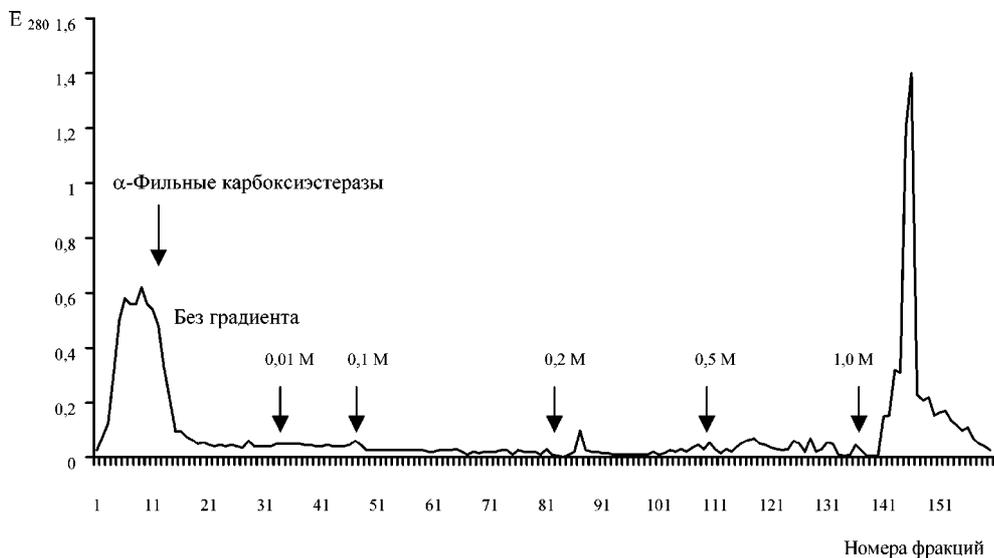


Рис. 6. Результат хроматографического разделения на ДЭАЭ-сефадексе карбоксиэстеразосодержащего гель-фильтрата экстракта тканей имаго дрозофилы

В то же время, прямое ионообменное хроматографирование экстракта имаго без предварительной фильтрации ведет к отделению сильно пигментированной фракции белков, проявляющих при рН 7,5 нейтральные либо слабощелочные свойства. Именно с этой фракцией, в основном, связана активность  $\beta$ -фильной и  $\alpha$ -фильных карбоксиэстераз. Кроме того, дополнительная форма только  $\beta$ -фильного фермента обнаруживается во фракции, вымываемой из колонки 0,2 М концентрацией хлористого калия (рис. 7).

Доля несвязывающихся с ДЭАЭ-сефадексом компонентов экстракта характеризуется высоким содержанием белка, дающего положительную реакцию с реактивом Фолина. В этой же фракции обнаруживается довольно высокая активность пептидгидролазы, определяемая по специфическому субстрату БАПНА.

В проводимых ранее исследованиях нами было показано, что в тканях пищеварительной системы дрозофилы (стадия личинки и имаго) присутствует высокоактивный трипсиноподобный фермент, расщепляющий различные субстраты, в том числе и нативные белки. Вполне вероятно, что эта протеиназа, ассоциированная на этапах выделения с эстеразами, модифицирует их либо расщепляет полностью, вызывая снижение эстеразной активности по тем или иным субстратам. Сказанное подтверждают проведенные нами отдельные эксперименты по изучению устойчивости карбоксиэстераз к действию таких ферментов как трипсин, химотрипсин, пепсин и папаин. Судя по предварительным данным, некоторые из перечисленных протеаз активно гидролизуют эстеразы в системе *in vitro*.

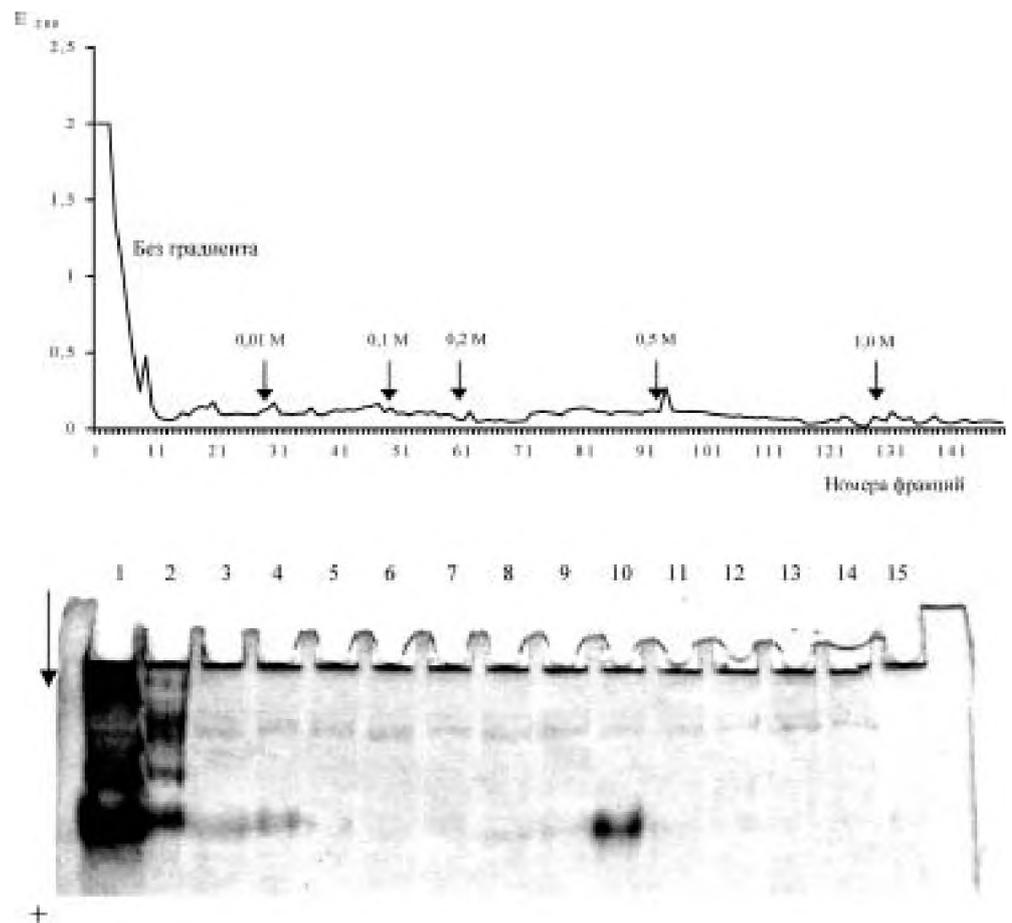


Рис. 7. Результат ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-сефадексе экстракта тканей имаго дрозофилы и электрофореза хроматографических фракций:

Инкубация 1 час в нейтральной среде, рН 7,4. Субстраты:  $\alpha$ -нафтилацетат +  $\beta$ -нафтилацетат. Слоты: 1 — исходный экстракт; 2 — фракция 2; 3 — фракция 9; 4 — фракция 14; 5 — фракция 17; 6 — фракция 20; 7 — фракция 30; 8 — фракция 46; 9 — фракция 57; 10 — фракция 62; 11 — фракция 74; 12 — фракция 80; 13 — фракция 94; 14 — фракция 123; 15 — фракция 131

### Выводы

1. Карбоксиэстеразы дрозофилы представлены двумя основными формами, проявляющими  $\alpha$ - и  $\beta$ -фильную эстеразную активность.
2.  $\alpha$ -Фильная карбоксиэстераза обладает свойствами кислого белка, тогда как  $\beta$ -фильная — свойствами слабокислого.

3. Гель-фильтрация экстракта имаго на сефадексе G-50 приводит к значительной очистке основных форм карбоксиэстераз от балластных белков и прочих примесей, однако она не разделяет их по молекулярной массе.
4. Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-сефадексе дает возможность отделить одну из подфракций  $\beta$ -фильной карбоксиэстеразы от  $\alpha$ -фильной и существенно повысить качество очистки этих ферментов.

## Литература

1. Берстон М. Гистохимия ферментов. — М.: Мир, 1965. — 464 с.
2. Лизосомы. Методы исследования / Под ред. Д. Дингла. — М.: Мир, 1980. — 342 с.
3. Тоцкий В. Н., Хаустова Н. Д., Андриевский А. М., Гандирук Н. Г., Белова Г. И., Есеркепова Е. В. Экспрессивность ген-энзимных систем и показатели жизнеспособности в онтогенезе инбредных линий и гибридов дрозофилы // Генетика. — 1990. — Т. 26, № 10. — С. 1791–1799.
4. Tavares Mara Garcia, de Azeredo-Oliveira Maria Tercilia Vilela, Ceron Carlos Roberto. Tissue-specific expression of esterases in *Triatoma infestans* (Triatominae, Heteroptera) // Genet. and Mol. Biol. — 1998. — V. 21, № 4. — P. 461–464.
5. Иванова Е., Стойкова Т., Вълчев И., Колева С., Мурлева П. Электрофоретично проучване на неспецифичните естерази при вида *Reticulitermes lucifugus*, разпространен в България / / Науч. тр. Биол. / Пловдив. унив. — 1999. — Т. 35, № 6. — С. 99–103.
6. Rivas de la Vega Yaelis, Gonzalez Rizette, Ruiz Coballero Ritsie, Sordo Martinez Lisette, Castro Nodal Mayra. Estudio del proceso de extraccion de esterasa a partir de *Plexaura homomalla* y evaluacion de su actividad enzimatica // Acta farm. bonaerense. — 1999. — V. 18, № 3. — P. 165–170.
7. Lee Sung-Eun, Lees Edith M., Campbell Bruce C. Purification and characterization of an esterase conferring resistance to fenitrothion in *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Insecta, Coleoptera, Silvanidae) // J. Agr. and Food Chem. — 2000. — V. 48, № 10. — P. 4991–4996.
8. Ruvolo-Takasusuki Maria Claudia C., Collet Thais. Characterization of *Nasutitermes globiceps* (Isoptera: Termitidae) esterases // Biochem. Genet. — 2000. — V. 38, № 11–12. — P. 367–375.
9. Shiotsuki Takahiro, Bonning Bryony, Hirai Makoto, Kikuchi Kyoko, Hammock Bruce D. Characterization and affinity purification of juvenile hormone esterase from *Bombyx mori* / / Biosci, Biotechnol. and Biochem. — 2000. — V. 64, № 8. — P. 1681–1687.
10. Tecles F., Martinez-Subiela S., Ceron J. J. Technical considerations for improving cholinesterase determination in whole blood of domestic animals: Pap. 9<sup>th</sup> Congress International Society of Animal Clinical Biochemistry "ISACB 2000: Animal Clinical Biochemistry", Toulouse, 17–20 July, 2000 // Rev. med. Vet. (France). — 2000. — V. 151, № 7. — P. 778.
11. Медведев Н. Н. Практическая генетика. — М.: Наука, 1966. — 240 с.
12. Андриевский А. М., Катаненко С. В., Тоцкий В. Н. Онтогенетические особенности пептид-гидролазной активности экстрактов тканей *Drosophila melanogaster* // Укр. биохим. журн. — 1982. — Т. 54, № 5. — С. 519–524.
13. Корочкин Л. И., Серов О. Л., Пудовкин А. И. и соавт. Генетика изоферментов. — М.: Наука, 1977. — 275 с.

**О. М. Андриевський, В. О. Кучеров**

Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,  
кафедра генетики та молекулярної біології,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

**ВИДІЛЕННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ КАРБОКСИЕСТЕРАЗ  
*DROSOPHILA MELANOGASTER***

**Резюме**

За допомогою гель-фільтрації на сефадексі G-50 та іонообмінної хроматографії на DEAE-сефадексі провадили виділення основних карбоксиестераз імаго дрозофіли. Методом електрофорезу в поліакриламідному гелі розділяли білкові компоненти вихідних екстрактів та хроматографічних фракцій. Шляхом проведення реакції азосполучення ідентифікували електрофоретичні фракції карбоксиестераз дрозофіли на етапах їх виділення. Встановлена кисла природа основних форм карбоксиестераз, показана їх субстратна специфічність, розроблено схему виділення та ідентифікації даних ферментів.

**Ключові слова:** карбоксиестерази, хроматографія, електрофорез, дрозофіла.

**A. M. Andrievsky, V. A. Koocherov**

Odessa National I. I. Mechnikov University,  
Department of Genetics and Molecular Biology,  
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukrain

**THE ISOLATION AND IDENTIFICATION OF CARBOXYESTERASES  
OF *DROSOPHILA MELANOGASTER***

**Summary**

The isolation of the main carboxyesterases of drosophila's imago was conducted with the help of gel filtration chromatography on sefadex G-50 and ion exchange chromatography on DEAE-sefadex. The albuminous components of initial extracts and chromatographic fractions were divided by the method of polyacrilamide gel electrophoresis. The electrophoretic fractions of drosophila's carboxyesterases were identified on the stages of their isolation by means of carrying out the reaction of nitric combination. The acid nature of the main forms of carboxyesterases was established, their substrate specificity was revealed and the scheme of isolation and identification of these ferments was worked out.

**Keywords:** carboxyesterases, chromatography, electrophoresis, drosophila.