

В. С. ОДИНЦОВ, В. С. ПЕТРЕНКО

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭСТЕРАЗ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ
ЛИЧИНКИ КОМНАТНОЙ МУХИ (*MUSCA DOMESTICA* L.)
МЕТОДОМ УЛЬТРАМИКРОЭЛЕКТРОФОРЕЗА
В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

(Представлено академиком Е. М. Крепом 24 XII 1969)

В последние годы внимание исследователей привлекают, кроме ацетилхолинэстеразы — АХЭ (КФ 3.1.1.7), две другие эстеразы насекомых: арилэстераза — АрЭ (КФ 3.1.1.2) и карбоксилэстераза — КЭ (КФ 3.1.1.1), как вероятные ферментные мишени воздействия фосфорорганических инсектицидов (ФОИ). Полагая, что в механизме токсического действия ФОИ на насекомых участвуют главным образом эстеразы центральной нервной системы (ц.н.с.), изучение активности эстераз и уязвимости их к ФОИ, а также идентификацию в большинстве случаев проводили, однако, не на материале изолированной нервной ткани, а на целом насекомом. Из доступной литературы нам известны лишь единичные исследования по изучению эстераз ц.н.с. насекомых: биохимическое исследование активности эстераз комнатных мух манометрическим методом Варбурга (¹, ⁵), неспецифической эстеразы ц.н.с. личинки шелкопряда электрофорезом на агаре (⁴) и идентификация АХЭ домовых сверчков методом электрофореза в полиакриламидном геле (³). Эвардсу (³) удалось выявить АХЭ лишь при использовании для одного опыта 50 нервных цепочек насекомых. Поэтому полученные им результаты не отражали действительной электрофоретической картины эстераз, свойственной одному насекомому. Нам представляется, что констелляцию эстераз, характерную для ц.н.с. определенного вида насекомого, можно установить лишь исследуя нервную ткань одной особи. Сведений по электрофоретическому изучению АрЭ и КЭ ц.н.с. насекомых вообще нам найти не удалось.

Целью настоящего исследования было, используя электрофорез в полиакриламидном геле, выявить эстеразы в ц.н.с. одного насекомого и затем дифференцировать их при помощи ингибитора. Разработанный метод ультрамикродифференциального электрофореза позволил исследовать эстеразы ц.н.с. единичного насекомого, вес нервной ткани которого составлял всего лишь $3 \cdot 10^{-6}$ г. Соответственно, для этого использовались и микрообъемные гели, приготовленные в стеклянных капиллярах диаметром 0,25 мм и длиной 6 см.

У обездвиженной на льду личинки III возраста комнатной мухи *M. domestica* L. под МБС-1 извлекали ц.н.с. на предметном стекле в капле ледяной дистиллированной воды. Нервную ткань переносили в гомогенизатор — миниатюрную стеклянную ступку, закрепленную в ванночке со льдом. Гомогенат готовили в соотношении $3 \cdot 10^{-6}$ г нервной ткани на 0,05 мл 2,5% раствора Тритона X-100. Затем при комнатной температуре гомогенат центрифугировали 10 мин. при 9000 об/мин. Для электрофоретического разделения эстераз в полиакриламидном геле был применен метод Орнштейна и Дэвиса (⁶) в ультрамикромодификации. Так, капилляры для опыта готовились из капиллярных трубок-заготовок с внутрен-

ним диаметром 0,25 мм, при этом один из концов капилляра расширялся в виде воронки длиной 10 мм и диаметром 5 мм, которая позволяла вносить в капилляр микродозы исследуемого материала (см. рис. 1). Применяли 7,5% гель, для чего использовали: реактив А, содержащий 48 мл 1 N раствора HCl, 36,3 г триса и 0,46 мл тетраметилэтилендиамина, которые смешивали и доводили до 100 мл дистиллированной водой; реактив Б, состоящий из 30 г акриламида, 0,8 г N-N'-метиленабисакриламида и 0,015 г железосинеродистого калия, растворенных в воде (объем смеси также доводили до 100 мл); реактив В, в состав которого входил 0,14% раствор надсернистой кислоты в дистиллированной воде. Для получения геля исходные реактивы смешивали в пропорции: реактив А 1 часть, Б 2 части, В 4 части, дистиллированная вода 1,5 части. При помощи микрогруши капилляры наполняли смесью мономеров, предварительно дегазированной под вакуумом. В течение 2 час. в условиях комнатной температуры происходила полимеризация геля. Полученный из гомогената ц.н.с. личинки мухи центрифугат микропипеткой вносили в воронкообразную часть капилляра, на поверхность геля, и смешивали с внесенным небольшим количеством окрашенной Sunset Yellow FCF supra антиконвекционной среды. По-

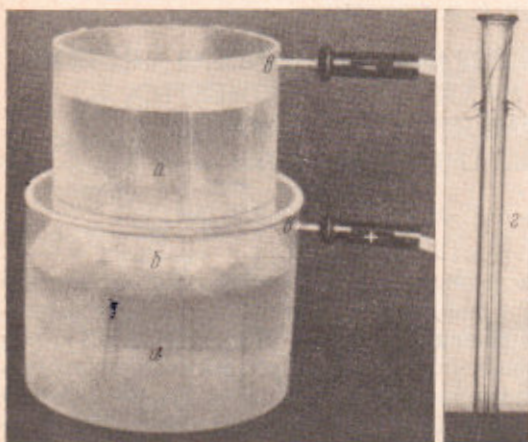


Рис. 1. Прибор для ультрамикроэлектрофореза в полиакриламидном геле. а — стаканы из плексигласа (верхний и нижний), заполненные трис-глициновым буфером; б — донная часть верхнего стакана с гнездами для закрепления капилляров; в — платиновые электроды, подключающиеся к источнику тока; г — общий вид капилляра, используемого при ультрамикроэлектрофорезе

следняя представляла собой 6% линейный полимер акриламида, полученный при фотополимеризации в условиях рассеянного дневного света в течение 15—20 час. В состав линейного полимера входили: акриламид 6 г, рибофлавин 0,0005 г и тетраметилэтилендиамин 0,05 мл. При электрофорезе использовали трис-глициновый буфер с pH 8,3 (5 μ мол. триса и 38 μ мол. глицина), который перед применением разводили дистиллированной водой в 10 раз. Ультрамикроэлектрофорез проводили в специально сконструированном приборе (см. рис. 1), представляющем собою модификацию аппарата Дэвиса (2). Режим электрофореза был следующий: сила тока 0,12 ма на один капилляр, время 2,5 часа, температура 4°. Гели из капилляров выдавливали при помощи плотно пригнанного металлического стилета в фиксатор — охлажденный 10% раствор формалина, где и выдерживали их в течение 30 мин.

Для ингибирования АХЭ и КЭ половинное количество гелей после отмывки от фиксатора помещали на 30 мин. в охлажденный $1 \cdot 10^{-5}$ M раствор параоксона. После этого гели вновь промывали и помещали в инкубационную среду. Другую половину вносили непосредственно в инкубационную среду. Инкубационная среда для выявления эстераз состояла из субстрата — α -нафтилацетата (10 мг) и соли прочного синего RR (50 мг), растворенных в 50 мл охлажденного фосфатного буфера pH 6,8. Время инкубации в субстрате 1—3 часа. После образования в гелях окрашенных в темно-синий цвет полос, соответствующих зонам эстеразной активности, гели промывали и для сохранности помещали в раствор метанол — вода — уксусная кислота (1:10:1).

В опытах с использованием пяти, трех и, наконец, одного ганглия (ц.н.с. личинки мухи III возраста) при сохранении идентичного режима исследования мы получили в гелях 8 мигрирующих к аноду зон эстеразной активности (рис. 2а). Ранее Эдвардсом и др. (3) в ц.н.с. домовых сверчков были обнаружены также 8 зон эстеразной активности, из них 3 катодные зоны были идентифицированы как АХЭ. Весьма вероятно, что эти 8 зон (1—8) в ц.н.с. личинки комнатной мухи (отр. Diptera) и имаго домовых сверчков (отр. Orthoptera) свидетельствуют о филогенетической близости этих отрядов насекомых.

В нашем опыте три катодные полосы (1—3), соответствующие АХЭ, выявлялись четко. Вместе с тем у всех зон, кроме 8, под МБС-1 просматривались еще по 2—3 побочные зоны, занимающие в отношении главных зон или катодное или анодное положение (рис. 2б). Так, зоны 1, 4—7 имели по одной побочной зоне, а 2 и 3 — по две, т. е. в общей сложности выявилось 17 зон. Окраска побочных зон была значительно слабее каждой из главных зон. Зоны 1 и 5 были окрашены несколько слабее остальных главных зон — примерно как побочные. Самой большой и наиболее интенсивно окрашенной была зона 8 (побочных зон она не имела). Наши результаты в отношении разделения катодной зоны 3 на две побочные зоны активности совпадают с данными Еситака Наруми и Хасигуси Цутоми (4), полученными ими электрофорезом на агаре в опыте на личинках шелкопряда. Факт разделения катодных полос 1—3 еще на 5 побочных говорит о том, что АХЭ в ц.н.с. личинок комнатных мух существует не в 3, а в 8 различных молекулярных формах фермента (рис. 2б).

Представляло также интерес идентифицировать среди 17 зон карбоксилэстеразу и арилэстеразу. Для этого был использован «универсальный», т. е. на АХЭ и КЭ, ингибитор — параоксон. В концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ М параоксон ингибировал АХЭ (зоны 1—3). Как известно, в этой же концен-

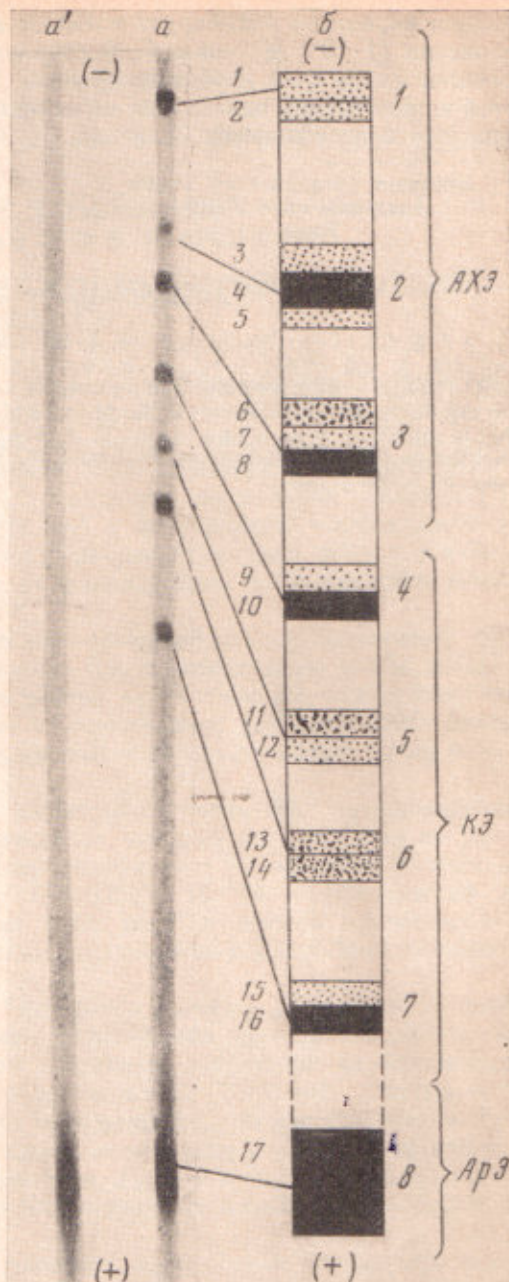


Рис. 2. Электрофореграмма (а) и схематическое изображение картины распределения (б) различных молекулярных форм эстераз в ц.н.с. личинки комнатной мухи. 1—8 — основные зоны; 1—17 — побочные. α' — электрофореграмма в случае применения параоксона ($1 \cdot 10^{-5}$ М). α , α' — $2,7 \times$

трации параоксон ингибирует и КЭ. Действительно, под воздействием параоксона ($1 \cdot 10^{-5} M$) зоны 4—7 также обесцветились, что позволило нам отнести их на счет карбоксилэстеразы (КФ 3.1.1.1). Так как зона 8 при этой концентрации параоксона не ингибировалась, она была принята нами, согласно классификации Сэлкелда (7), за арилэстеразу (КФ 3.1.1.2).

Институт органической химии
Академии наук УССР
Киев

Поступило
16 XII 1969

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ J. E. Casida, *Biochem. J.*, **60**, 3, 487 (1955). ² B. J. Davis, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 2, 404 (1964). ³ J. S. Edwards, D. Gomez, *J. Insect. Physiol.* **12**, 9, 1061 (1966). ⁴ Еситака Наруми, Хасигуси Цутоми, *J. Sericult. Sci. Japan*, **34**, 6, 395 (1965). ⁵ R. L. Metcalf et al., *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **49**, 3, 274 (1956). ⁶ L. Ornstein, B. J. Davis, *Disc. Electrophoresis, Parts I, II. Distillation Products Industries, Rochester, N. Y.*, 1962. ⁷ E. H. Salkeld, *Canad. J. Zool.*, **39**, 5, 589 (1961).