

УДК 577.158:578.088.7

ЭМБРИОЛОГИЯ

Л. И. КОРОЧКИН, Н. М. МАТВЕЕВА, О. Л. СЕРОВ, Л. С. КОРОЧКИНА

ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗОФЕРМЕНТОВ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНОВ ЛИЧИНОК *DROSOPHILA MELANOGASTER*

(Представлено академиком Б. Л. Астауровым 23 V 1972)

Достаточно полная генетическая характеристика дрозофилы делает этот объект весьма удобным для решения многих задач биохимической генетики и биологии развития (^{1, 2}). В работах, посвященных биохимии дрозофилы, дается детальная электрофоретическая характеристика фракций многих ферментов, служащих маркерами проявления активности соответствующих генов. В ряде случаев некоторые из них удалось локализовать (^{3, 4}). В то же время спектр изоферментов столь подробно исследованной у позвоночных лактатдегидрогеназы (ЛДГ, КФ. 1.1.1.27) у дрозофилы до сих пор удовлетворительно не изучен. Рештейнер получил при электрофорезе в агарозе лишь одну фракцию ЛДГ, однако данные по кинетике фермента свидетельствуют о его возможной гетерогенности (^{5, 6}). Для дальнейшего анализа вопроса мы использовали электрофорез в крахмальном и полиакриламидном 5 и 7,5% гелях по ранее описанным методикам (⁷). Личинки 3 возраста *Drosophila melanogaster* (линия Oregon-R) гомогенизировали в дистиллированной воде (по 50 личинок в 0,3 мл). Гомогенаты центрифугировали на центрифуге К-50 при 20 000 g 40 мин. Для определения органной специфики в распределении ЛДГ гомогенизировали отдельные слюнные железы, мальпигиевы сосуды и мышцы туловища. Их исследовали с помощью разработанной нами методики микроэлектрофореза в плоских капиллярах. Во всех случаях фореграммы окрашивали амидо-черным 10 Б и на ЛДГ (⁸). Для окрашивания микроэлектрофореграмм на ЛДГ все компоненты инкубационной среды были взяты в большей (в 2 раза) концентрации. Сканирование электрофореграмм производилось на микрофотометре МФ-4. Кроме того изолированные слюнные железы и мальпигиевы сосуды (от 96 личинок) окрашивались тем же методом гистохимически. Часть крахмальных и полиакриламидных блоков и предназначенных для гистохимических исследований препаратов подвергалась предварительной обработке растворами мочевины (0,5–5 M), лактата (1–5 M), температурной (50–80°) от 20–30 мин. до 1 часа, а при гистохимическом анализе — также растворами сульфата натрия (30 и 60 мг/мл), щавелевой кислоты (0,005 и 0,014 M) и оксалата натрия (0,001 M).

Следует отметить, что более четкие результаты были получены при электрофорезе в крахмальном геле. У целых личинок определяется две фракции — более медленная, главная (S) и более быстрая, минорная (F, рис. 1, 1а). В мышцах и слюнных железах преобладает S-фракция, в мальпигиевых сосудах — F (рис. 1, 1б, в, 2, 3). При электрофорезе в 5% полиакриламидном геле также обнаруживаются S- и F-фракции (рис. 1г). Обе фракции иногда (особенно в 7,5% геле) расщепляются на две-три (рис. 1, 1г, е). В контроле (инкубационная среда без субстрата) близ старта во всех случаях обнаруживаются одна-две довольно интенсивно окрашенные полосы (рис. 1, 1г). Спектр ЛДГ различных органов личинки анализировали с помощью микроэлектрофореза в плоских капиллярах 1×2 мм. В мальпигиевых сосудах более интенсивно окрашивается быст-

рая фракция (рис. 1, 4), в слюнных железах — более медленная (рис. 1, 5). Смесь супернатантов слюнных желез и мальпигиевых сосудов дает картину, сходную с полученными из целых личинок (рис. 1, 6). В мышцах определяется только медленная фракция (рис. 1, 1ж). При обработке ингибиторами получены следующие результаты. Под влиянием 1 *М* лактата (в течение 1 часа) резко снижается или снимается окрашиваемость быстрой фракции, в то время как S-фракция продолжает выявляться. Последняя более чувствительна к действию мочевины, так как 30-минутная

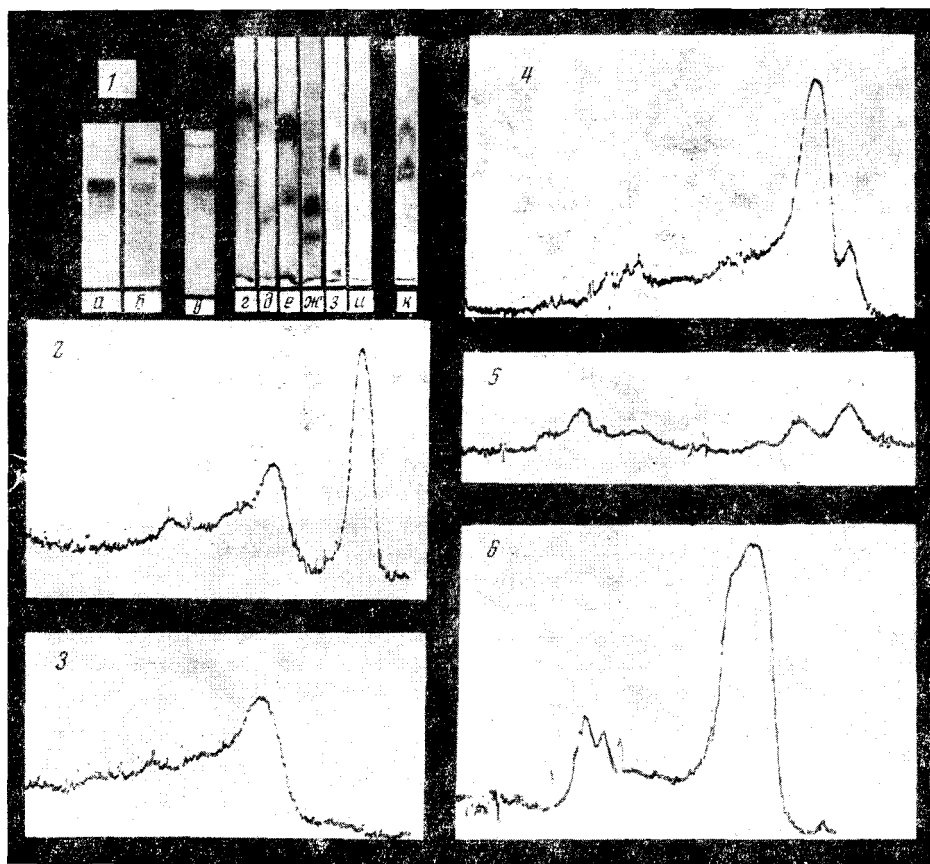


Рис. 1. Зимограммы лактатдегидрогеназы. 1. а, б, в — электрофорез в крахмальном геле: а — мышцы, б — мальпигиевы сосуды, в — целая личинка; г—к — электрофорез в полиакриламидном геле в плоских капиллярах размером 1 × 2 мм (длина капилляров 6 см): г — мальпигиевы сосуды, д — слюнные железы, е, ж — смесь мальпигиевых сосудов и слюнных желез, з — мышцы, и — смесь мальпигиевых сосудов и слюнных желез, к — целая личинка. 2—6 — денситограммы: 2—1б, 3—1а, 4—1г, 5—1д, 6—1е

обработка 3 *М* мочевиной резко снижает ее окрашиваемость. F-фракция в этом случае более резистентна, но после длительной обработки (1 час) при окраске заметны лишь ее следы. F-фракция более термостабильна. Предварительное нагревание (в буфере pH 7.4) при 65° в течение 10 мин. вызывает снижение активности S-фракции, F-фракция окрашивается достаточно интенсивно. При хранении в течение 1—2 суток при 20° фракция F сохраняет активность значительно лучше, чем более медленная.

Гистохимически обнаружено, что при использовании инкубационной среды, содержащей 0,15—0,25 *М* лактат, слюнные железы окрашиваются с различной степенью интенсивности (результаты при этом сильно варьируют), в то время как мальпигиевые сосуды обычно или не окрашиваются,

или обнаруживают следы окраски в согласии с данными Рештейнера (⁶). Однако при использовании среды, содержащей 0,5 М лактат, слюнные железы и мальпигиевые сосуды красятся достаточно интенсивно. Выявлены различия в отношении ЛДГ слюнных желез и мальпигиевых сосудов к ингибиторам. 3–5 М раствор лактата в течение 30 мин. снимает окрашиваемость и слюнных желез, и мальпигиевых сосудов как в случае предшествующей окраске обработки препаратов, так и при добавлении к инкубационной среде. Обработка 1 М лактатом вызывает снижение активности фермента в основной части слюнной железы. В обычных условиях она окрашивается интенсивнее шейки (имагинальный диск). После обработки 1 М лактатом (возможно, в силу ингибирования F-фракции слюнной железы) окрашиваемость выравнивается. В отличие от тормозящего действия 1 М лактата на F-фракцию зимограмм мальпигиевых сосудов, при гистохимическом исследовании окрашиваемость мальпигиевых сосудов несколько усиливается. Температурная обработка и воздействие другими ингибиторами не показали при гистохимическом анализе четких органических различий. Возможно, эти противоречия между биохимическими и гистохимическими данными обусловлены сложностью гистохимического выявления ЛДГ (и вообще дегидрогеназ) в слюнных железах, поскольку и в контроле (инкубационная среда без субстрата) они обнаруживают неспецифическое окрашивание. В связи с этим идентификация различных форм ЛДГ на тотальных гистохимических препаратах органов дрозофилы затруднена по сравнению с их выявлением у млекопитающих (⁹). Однако, при всей трудности интерпретации гистохимических данных, в целом они также свидетельствуют в пользу гетерогенности ЛДГ у дрозофилы, а электрофоретические данные, по-видимому, подтверждают существование двух ее форм — термостабильной и термолабильной. Согласно Рештейнеру (⁵), у *Drosophila melanogaster* около 80% ЛДГ термолабильно. Денситометрия зимограмм ЛДГ в нашем случае дает примерно те же цифры (80–85% в случае электрофореза в крахмальном геле, 85–90% — в полиакриламидном геле). По своим свойствам F-фракция напоминает H-тип ЛДГ млекопитающих, S-фракция — M-тип. Однако необходимы дальнейшие исследования для анализа особенностей этих фракций и их функционального значения.

Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Академии наук СССР
Новосибирск

Поступило
28 III 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ H. Ursprung, K. Smith et al., Science, **160**, 1075 (1968). ² E. Glassman, T. Shinoda et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., **151**, 263 (1968). ³ В. А. Гвоздев, Усп. соврем. биол., **65**, 398 (1968). ⁴ D. Lindsley, E. Grell, Genetic Variations of *Drosophila Melanogaster*, Washington, 1967. ⁵ M. Rechsteiner, J. Insect Physiol., **16**, 957 (1970). ⁶ M. Rechsteiner, J. Insect Physiol., **16**, 1179 (1970). ⁷ Л. В. Корочкин, ДАН, **190**, 1459 (1970). ⁸ А. Пирс, Гистохимия, ИЛ, 1962. ⁹ I. Brody, W. Engle, J. Histochem. and Cytochem., **12**, 687 (1964).