

УДК 636.2.082.11

ГЕНЕТИКА

П. Н. ШУБИН

ПОЛИМОРФНАЯ СИСТЕМА ЭСТЕРАЗЫ ПЕЧЕНИ
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

(Представлено академиком Б. Л. Астауровым 4 IX 1972)

В тканевых экстрактах печени различных видов животных методом зпмограмм ⁽¹⁾ обнаружен сложный спектр растворимых эстераз, принадлежащих по отношению к субстратам и чувствительности к различным ингибиторам к ацетил-, карбоксил- и холинэстеразам ⁽²⁻⁴⁾. Отдельные типы эстераз встречаются в виде множественных молекулярных форм или изоэнзимов, спектр которых может формироваться разными путями ⁽⁵⁾. К примеру, известны случаи, когда синтез изоэнзимов связан с детерминирующим действием серии аллельных генов. Среди систем эстераз ткани печени наследственные варианты с подобного рода генетическим контролем найдены у кур ⁽⁴⁾ и американского омара ⁽⁶⁾.

Несмотря на недостаток наших знаний о структурных и функциональных взаимоотношениях между наследственными изоэнзимными формами, такие изоформы, маркирующие элементарные изменения в генетическом материале — точковые мутации, — могут с успехом использоваться в генетическом анализе. Применительно к сельскохозяйственным животным выявление новых генетических маркеров расширяет возможности популяционных исследований, связанных с разработкой теоретических основ селекции.

В настоящей работе рассматривается изоферментный спектр эстераз экстрактов ткани печени крупного рогатого скота и обосновывается гипотеза о наличии у этого вида новой полиморфной системы карбоксилэстеразы с двухаллельным генетическим контролем этой системы.

Индивидуальные образцы ткани печени (1 г), взятые от 128 животных — помесей от скрещивания зырянского скота Коми АССР с холмогорской породой ⁽⁷⁾, после двукратного замораживания и оттаивания гомогенизировали в ступке с кварцевым стеклом 3—4 объемами дистиллированной воды. Полученный гомогенат центрифугировали в течение 20 мин. при 9000 оборотов в 1 мин., а супернатант использовали для анализа.

Разделение эстераз экстрактов ткани печени проводили с помощью горизонтального электрофореза на 13,5% крахмальном геле с использованием в электродных сосудах трис-ЭДТА буферной системы ⁽⁸⁾. Этот же буфер брали и для приготовления геля, но с доведением 1 N соляной кислотой pH до 8,6. Электрофорез вели в течение 6 час. на пластине геля размером 16×21×0,4 см, при силе тока 60—70 ма и напряжении 180—340 в. После электрофореза гель разрезали по толщине на две поло-

Таблица 1

Фактическое и теоретически ожидаемое распределение фенотипов (генотипов) по локусу Es-P₃ у крупного рогатого скота

Фенотипы (генотипы)	Фактическое		Ожидаемое	
	число фенотипов	%	число фенотипов	%
Es-P ₃ AA	120	93,7	119,2	93,1
Es-P ₃ BB	1	0,8	0,1	0,1
Es-P ₃ AB	7	5,5	8,7	6,8
Всего	128	100,0	128,0	100,0

вины. Локализацию изоферментов эстераз выявляли на нижней половине геля, используя α -нафтилацетат в качестве субстрата. Инкубационную смесь готовили по прописи Кубека (8). Для идентификации различных фракций эстераз, полученных на зимограмме, использовали набор ингибиторов: ЭДТА ($2 \cdot 10^{-3} M$), салицилат физостигмина ($1 \cdot 10^{-5} M$) и *n*-хлормеркурибензоат ($1 \cdot 10^{-3} M$). Вторую половину геля сначала помещали в фосфатный буфер (рН 7,0), содержащий ингибитор, а затем в инкубационную смесь с той же концентрацией ингибитора.

На зимограммах эстераз экстрактов печени выявились три отдельных области неспецифической эстеразной активности, которые в порядке

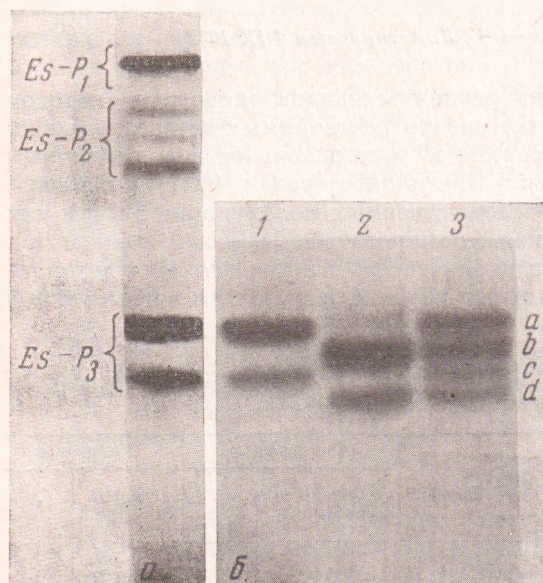


Рис. 1. Зимограмма эстераз тканевых экстрактов печени крупного рогатого скота. *a* — область эстеразной активности; *b* — три фенотипа в области $Es-P_3$: 1 — $Es-P_3AA$, 2 — $Es-P_3BB$, 3 — $Es-P_3AB$

следования от катода к аноду обозначены как $Es-P_1$, $Es-P_2$ и $Es-P_3$ (рис. 1*a*). Кроме того, очень слабые эстеразные зоны наблюдались: одна — впереди области $Es-P_1$ и другая за $Es-P_3$ вблизи стартовой линии. Выявленные на зимограмме растворимые типы эстераз, по-видимому, являются специфичными для ткани печени. По крайней мере, сыворотка крови и гемолизаты эритроцитов при разгонке образцов на одном и том же блоке геля вместе с экстрактами ткани печени дали только очень слабую зону, близкую к области $Es-P_1$, а сыворотка, кроме того, — еще две зоны, расположенные ниже $Es-P_3$.

Основной интерес в этом исследовании представляет третья область эстеразной активности, отличающаяся очень высоким сродством к α -нафтилацетату. Изофер-

ментный спектр в этой области оказался резистентным к ЭДТА, к салицилату физостигмина (эзерину) и *n*-меркурибензоату. Исходя из этого, а также принимая во внимание результаты работ других исследователей по электрофоретической разгонке эстераз печени (3, 4), можно предполагать, что в третьей полиморфной области зимограммы локализованы карбоксилэстераза (КФ.3.1.1.1).

Число и положение зон эстеразной активности в этой области у отдельных животных варьировало таким образом, что легко идентифицировать три фенотипа: *ac*, *bd* и *abcd* (рис. 1*b*). Первый и второй фенотипы состоят из двух зон, однако все они имеют разную электрофоретическую подвижность. Третий тип включает четыре зоны, которые по положению на зимограмме копируют оба предыдущих фенотипа. Эти индивидуальные различия могут рассматриваться как генетически детерминированные, а именно — связанные с наличием аутосомального локуса $Es-P_3$ с двумя кодоминантными аллелями $Es-P_3A$ и $Es-P_3B$. Каждая аллель контролирует две зоны, соответственно *ac* и *bd*, неперекрывающихся в гетерозиготе $Es-P_3AB$.

Гипотеза о двухаллельном генетическом контроле полиморфной системы эстеразы печени крупного рогатого скота подтверждается данными сравнения наблюдаемой частоты фенотипов с ожидаемой их частотой,

рассчитанной на основе закона Харди — Вейнберга. Отношения фенотипов (генотипов) в фактическом распределении оказались близкими к таковым в теоретическом распределении (табл. 1).

Частоты генов $Es-P_3A$ и $Es-P_3B$ в исследуемой популяции крупного рогатого скота оказались соответственно равными $0,965 \pm 0,012$ и $0,035 \pm 0,06$.

Известно, что синтез изоэнзима или каждой субъединицы (полипептида), из которых состоит этот изоэнзим, должен контролироваться отдельным структурным геном. В рассмотренном нами случае с полиморфной эстеразой печени каждая аллель контролирует две полосы эстеразной активности, т. е. два изоэнзима. Такие случаи, когда продукты одной аллели локуса эстеразы дают на зимограмме два или более электрофоретических изомера, наблюдались другими исследователями (⁴, ⁶, ⁹⁻¹¹). Было высказано несколько гипотез относительно биохимической природы этого явления (⁶): взаимодействие макромолекул с составными компонентами буфера, образование конформационных изомеров, полимеризация субъединиц фермента и т. д. Электрофоретический анализ эстераз без привлечения других методов исследования белков, конечно, не дает достаточной информации для обсуждения реальности этих гипотез. Единственно, на что следует, может быть, обратить внимание, это на неодинаковую экспрессивность полос эстеразной активности на зимограммах как в гомозиготных, так и в гетерозиготных генотипах. У обеих гомозигот ($Es-P_3AA$ и $Es-P_3BB$) фронтальная зона окрашена значительно сильнее следующей за ней второй зоны, и эта закономерность воспроизводится в гетерозиготе $Es-P_3AB$ (рис. 16). Учитывая подобную каталитическую неравноценность отдельных изозимов, можно полагать, что каждая аллель локуса $Es-P_3$ в действительности контролирует одну фракцию и что появление второй слабой фракции скорее связано с каким-то начальным этапом вторичных химических изменений макромолекул энзима *in vitro*, отражающихся на снижении их активности.

Институт биологии
Коми филиала Академии наук СССР
Сыктывкар

Поступило
22 VIII 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ R. L. Hunter, C. L. Markert, *Science*, 125, 1294 (1957). ² В. Б. Долго-Сабуров, *Укр. біохім. журн.*, 41, 671 (1969). ³ Р. П. Кашкин, Б. П. Сурянов, Д. Н. Бочкова, *Бюлл. эксп. биол. и мед.*, 6, 39 (1970). ⁴ I. Okada, S. Sasaki, *Animal Blood Groups and Biochem. Genetics*, 1, 181 (1970). ⁵ H. Harris, *Proc. Roy. Soc. Lond.*, B174, 1 (1969). ⁶ J. Barlow, G. Ridgway, J. Fish, *res. Board of Canada*, 28, 15 (1971). ⁷ П. Н. Шубин, В. М. Котельников, *Породное преобразование крупного рогатого скота Коми АССР, Сыктывкар*, 1965. ⁸ A. Kubek, XI European Conference on Animal Blood Groups and Biochemical Polymorphism, Warszawa, 1968, p. 355. ⁹ S. L. Allen, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 94, 753 (1961). ¹⁰ B. Gähne, *Genetics*, 53, 681 (1966). ¹¹ A. A. Grunder, G. Sartore, C. Stormont, *Genetics*, 52, 1345 (1965).