

Е. И. КАРАКИН, С. М. СВИРИДОВ, Л. И. КОРОЧКИН

## ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ АНТИГЕНОВ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

(Представлено академиком Д. К. Беллевым 8 XII 1974)

В генетических исследованиях последних лет в качестве маркеров все чаще используются биохимические признаки. В ряде случаев это белки с известной функцией, в частности ферменты (<sup>1-3</sup>), в других случаях функция белков неизвестна (<sup>4</sup>). Биохимическими маркерами являются также антигенные свойства белков, исследуемые в виде специфических комплексов антиген — антитело, которые позволяют изучать наряду с ферментами белки с неизвестной функцией (<sup>5</sup>). Высокая разрешающая способность электрофореза при исследовании антигенов в сочетании со специфичностью действия антисывороток дают веские основания считать иммуноэлектрофоретический анализ (<sup>6</sup>), особенно его двумерный вариант (<sup>7</sup>), весьма перспективным методом исследования. В связи с интенсивным анализом генетической регуляции процессов детерминации и дифференцировки у *Eukaryota* существенно важно исследование биохимических признаков, в частности антигенов, варьирующих в ходе онтогенеза. Удобным объектом для этой цели является *Drosophila melanogaster*, ставшая классической моделью для решения ряда задач биохимической генетики. Для анализа динамики становления спектра водорастворимых антигенов в ходе индивидуального развития *D. melanogaster* необходимо установить общее их число в период от кладки яиц до предкуколки, характеризующийся активными процессами роста и дифференцировки (<sup>8</sup>). В немногочисленных исследованиях антигенов *D. melanogaster* (<sup>9, 10</sup>) данные подобного рода отсутствуют, поэтому целью настоящей работы был двумерный иммуноэлектрофоретический анализ общего антигенного спектра *D. melanogaster* на эмбриональной и личиночной стадиях развития в сочетании с функциональной идентификацией некоторых антигенов с известными ферментами, обнаруженными у данного вида (<sup>11</sup>).

В экспериментах использовали отмытые от питательной среды массовые культуры эмбрионов и личинок *D. melanogaster* Canton S (дикий тип) всех возрастов, смешанные в равных соотношениях. Гомогенаты культур, приготовленные на деионизованной воде, центрифугировали 4 часа при 20 000 *g*, надосадочные жидкости лиофилизировали. 6% растворы антигенов готовили непосредственно перед проведением экспериментов в трис-ЭДТА-боратном буфере pH 8,6. Кроличьи антисыворотки против цельных гомогенатов *D. melanogaster* получали по методу Дорфмана (<sup>12</sup>). Двумерный иммуноэлектрофорез проводили по Лаурелл (<sup>7</sup>) в нашей модификации. Иммунофореграммы отмывали в 0,14 *M* NaCl pH 7,2 и после высушивания окрашивали на белок (<sup>13</sup>). Учитывая электроэндоосмотические явления, играющие существенную роль в окончательной локализации антигенов после проведения электрофореза в трис-ЭДТА-боратном буфере, наряду с обычным проводили также электрофорез инвертированного типа, при помощи которого выявляли антигены, движущиеся к катоду. Для установления ферментной природы некоторых антигенов *D. melanogaster* исполь-

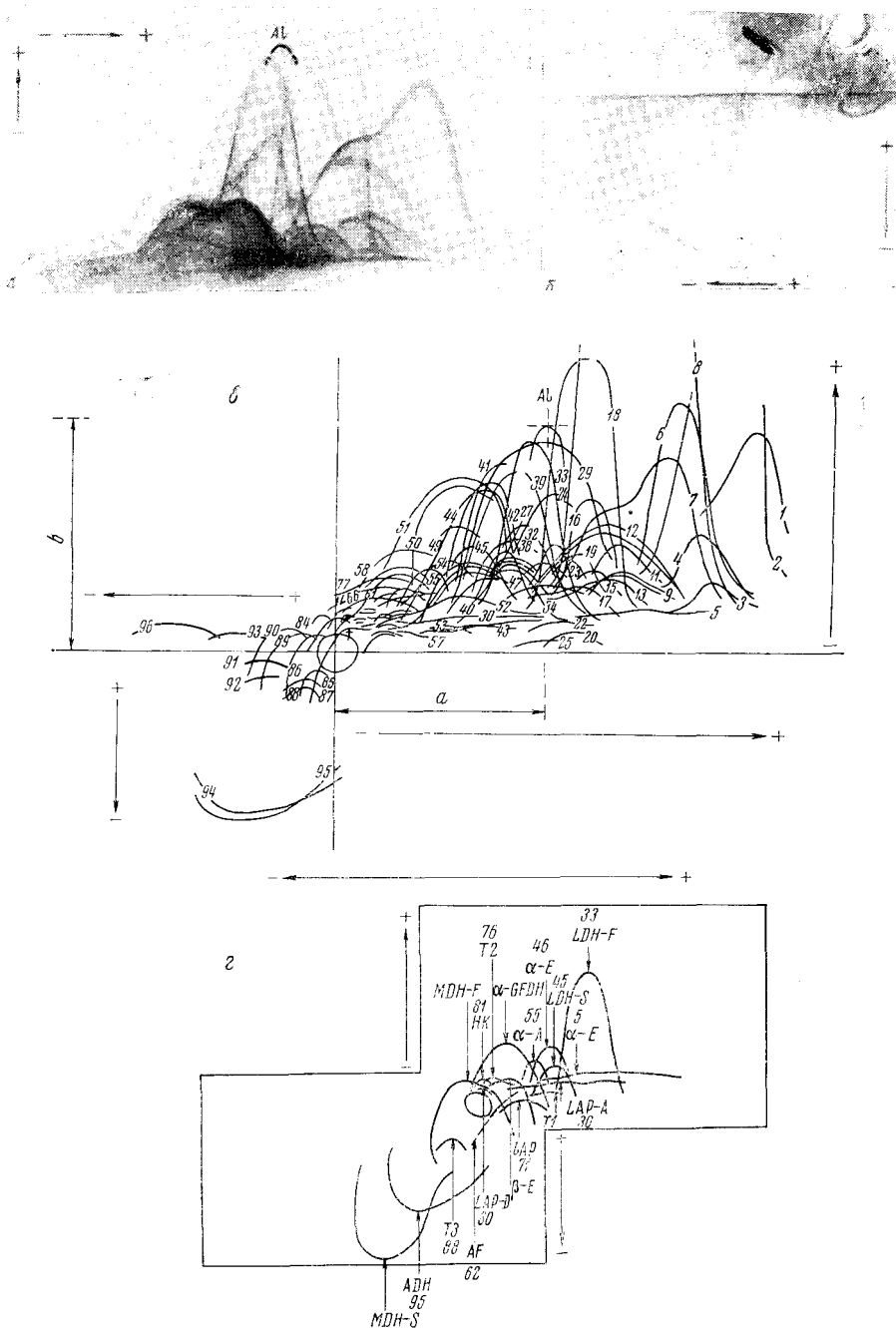


Рис. 1. Двумерные иммуноэлектрофоретграммы антигенов *D. melanogaster* 0–120 час. развития после кладки яиц. а – иммуноэлектроферграмма обычного типа; б – иммуноэлектроферграмма инвертированного типа; антигены проявлены 12% кроличьей антисывороткой; в – схема антигенов *D. melanogaster* после проведения двумерного иммуноэлектрофореза обычного и инвертированного типа, штриховыми линиями обозначено положение пика преципитации альбумина Al сыворотки крови крыс, разбавленной трис-ЭДТА-боратным буфером в отношении 1 : 29; альбумин проявлен 8% кроличьей антисывороткой; г – схема антигенов *D. melanogaster*, проявивших ферментативную активность; ADH – алкогольдегидрогеназа (АДГ), LDH – лактатдегидрогеназа (ЛДГ), MDH – малатдегидрогеназа (МДГ),  $\alpha$ -GFDH –  $\alpha$ -глицерофосфатдегидрогеназа ( $\alpha$ -ГФДГ), HK – гексокиназа (ГК),  $\alpha$ -E,  $\beta$ -E – неспецифические эстеразы (Э), LAP – щелочная фосфатаза (ЩФ), AP – кислая фосфатаза (КФ),  $\alpha$ -A – амилаза (А), LAD – лейцинаминопептидаза (ЛАП), T – тирозиназа. Цифры возле названия фермента соответствуют номеру пика преципитации по схеме в

зовали иммуногистохимические варианты гистохимических реакций на 11 ферментов (<sup>14</sup>); схема принятых обозначений приведена в подписи к рис. 1.

На двумерных иммуноэлектрофореграммах обычного и инвертированного типа обнаружено 84 и 12 антигенов соответственно; на рис. 1а, б представлены результаты одной из двух серий независимых экспериментов, в которых найдено 96 и 93 антигенов для каждой серии, что более чем в три раза превосходит количество антигенов, выявленное одномерным иммуноэлектрофорезом (<sup>10</sup>). Следует, однако, заметить, что вследствие ограниченной, хотя и высокой чувствительности использованного красителя на белки (<sup>13</sup>), наиболее четко выявляются лишь 83 из них. Антигены 59, 63, 65–67, 73–75, 77, 79, 82, 94, локализованные в зоне  $\beta$ -глобулинов, требуют для их обнаружения очень тщательного анализа препаратов.

Из рис. 1 также видно, что высота пиков преципитации, пропорциональная концентрации антигенов (<sup>15</sup>), различна, ширина оснований пиков, отражающая гетерогенность образующих их антигенов, также варьирует. Кроме того, ряд из них проявил множественность электрофоретических форм. Для определения электрофоретической подвижности антигенов *D. melanogaster* очень важно введение реперного пика преципитации, который позволит в любых условиях эксперимента (различные типы буферных систем, режимы электрофореза и т. д.) проводить точную электрофоретическую характеристику антигенов *D. melanogaster*. Для этой цели проводили одновременно двумерный иммуноэлектрофорез разбавленной буфером нативной сыворотки крови крыс против кроличьего антиальбумина крыс и показали, что положение пика преципитации альбумина совпадает с положением пика 29, образованного одним из антигенов *D. melanogaster*. Для выяснения специфичности действия антисывороток против антигенов *D. melanogaster* по отношению к антигенам дрожжей проводили иммуноэлектрофорез дрожжевых антигенов, взятых из среды для культивирования животных; на иммунофореграммах 6% растворов лиофилизированных дрожжевых антигенов обнаружено 4 пика преципитации, возможно отсутствующие на иммунофореграммах *D. melanogaster* в силу значительной их разбавленности. Около 20% антигенов идентифицированы как известные ферменты по отношению к бессубстратным контролям. АДГ,  $\alpha$ -ГФДГ, ГК, ЩФ, КФ, А выявлены в виде одного электрофоретического варианта (по одному ферментативно активному пику преципитации), обнаружено по две формы ЛДГ, МДГ, ЛАП (по два пика преципитации), найдено по три фракции Э, Т (по три пика преципитации). Иммунохимический анализ подтвердил данные о существовании двух форм ЛДГ у *D. melanogaster* (<sup>16</sup>). Заслуживает внимания тот факт, что некоторые пики преципитации, обнаруживающие ферментативную активность (МДГ-S, МДГ-F,  $\beta$ -Э,  $\alpha$ -ГДФГ), не выявляются на препаратах при обычном окрашивании на белки. Отсюда следует, что на двумерных иммуноэлектрофореграммах существует некоторое множество преципитатов, находящихся вне пределов чувствительности используемого красителя (<sup>13</sup>), которые в ряде случаев выявляются иммуногистохимически. При сопоставлении результатов наших исследований с данными по генетике изоферментов *D. melanogaster* (<sup>3, 11, 17</sup>) обнаружена тождественность количества пиков преципитации, обладающих ферментативной активностью, числу известных неаллельных локусов генома, контролирующих синтез соответствующих ферментов. В связи с этим в некоторых случаях можно, по-видимому, предсказать минимальное количество структурных неаллельных генов для тех ферментов *D. melanogaster*, генетический контроль для которых пока не установлен, в частности для двух форм ЛДГ.

Полученные результаты достаточно полно характеризуют эмбрион- и личиночноспецифичный антигенный спектр *D. melanogaster*, отличающийся высокой воспроизводимостью. Эти данные составляют основу для последующего анализа динамики становления антигенного спектра в ходе инди-

видуального развития *D. melanogaster* на синхронно развивающихся культурах, в том числе и на некоторых мутантах, а также для исследования органной специфичности их антигенов.

Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения Академии наук СССР  
Новосибирск

Поступило  
17 IX 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> T. Wright, *Genetics*, v. 48, 787 (1963). <sup>2</sup> J. Jelnes, *Hereditas*, v. 67, 291 (1971).  
<sup>3</sup> D. Fox, E. Abacherli, H. Ursprung, *Experientia*, v. 27, 248 (1971). <sup>4</sup> J. Hubby, R. Lewontin, *Genetics*, v. 54, 577 (1966). <sup>5</sup> П. Грабар, П. Бурен, Иммуноэлектрофоретический анализ, ИЛ, 1963. <sup>6</sup> P. Grabar, C. Williams, jr., *Biochim. et biophys. acta*, v. 10, 193 (1953). <sup>7</sup> C. B. Laurell, *Anal. Biochem.*, v. 10, 2, 358 (1965). <sup>8</sup> D. Bodenstein, In: *Biology of Drosophila*, N. Y.—London, 1950. <sup>9</sup> K. Fuscaldo, A. Fox, *Genetics*, v. 47, 999 (1962). <sup>10</sup> D. Roberts, *Nature*, v. 233, 394 (1971). <sup>11</sup> S. O'Brien, R. MacIntyre, *Drosophila Information Service*, v. 46, 89 (1971). <sup>12</sup> И. А. Дорфман, *Вопр. мед. хим.*, т. 13, 1, 51 (1967). <sup>13</sup> O. Vesterberg, *Biochim. et biophys. acta*, v. 243, 2, 345 (1971). <sup>14</sup> Ch. Shaw, R. Prasad, *Biochem. Genetics*, v. 4, 2, 297 (1970). <sup>15</sup> N. Axelsen, E. Bock, *J. Immunol. Methods*, v. 1, 109 (1972). <sup>16</sup> Л. И. Корочкин, И. М. Мареева и др., *ДАН*, т. 208, № 1, 254 (1973). <sup>17</sup> Biochemical Mutants of *D. melanogaster*, In: *Handbook of Biochemistry*, Cleveland, 1968, p. 1.