

Н. Н. КОЛЕСНИКОВ, С. Я. СЛОБОДЯНЮК, В. А. БЕРДНИКОВ,
И. И. КИКНАДЗЕ

**ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ
И ЖИРОВОГО ТЕЛА DROSOPHILA MELANOGASTER
В РАЗВИТИИ**

(Представлено академиком Д. К. Беляевым 26 V 1975)

Дифференциальная активность генов в тканях двукрылых с политепными хромосомами находит выражение в виде образования пухов, конденсированных участков хромосом, активно включающих меченные предшественники синтеза РНК. При этом с очевидностью показано наличие стадии-специфических пухов. Наиболее заметные изменения в картине пухинга происходят в период окукливания, знаменующего начало метаморфоза (¹⁻⁴). Однако динамика синтеза клеточных белков в онтогенезе изучена крайне недостаточно и представления о том, отражаются ли изменения картины пухинга в наборе клеточных белков весьма противоречивы. Согласно одним авторам (⁵⁻⁶), наблюдается определенная корреляция подобного рода; согласно другим, она вовсе не наблюдается (⁷⁻⁸), в связи с этим высказываются предположения о том, что изменение картины пухинга не проявляется в смене набора клеточных белков (⁷).

В настоящей работе сделана попытка проанализировать изменение состава клеточных белков в двух тканях *Drosophila melanogaster* (дикий тип, линия Орегон-Р) в течение последнего личиночного возраста и при окукливании. Культуру *D. melanogaster* поддерживали в термостате при 25°. Синхронно развивающихся личинок отбирали в течение 1 часа во время второй линьки — 72 часа (время от откладки яиц) и на стадии предкуколки по моменту эверсии дыхалец — 120 час (0 час предкуколической стадии). Слюнные железы, прилежащие к ним жировые тела препарировали из личинок одного возраста на разных стадиях развития в 15% растворе Хэнкса. Тканевые экстракты готовили из различного количества личинок (20—85) в зависимости от стадии развития. Материал собирали и гомогенизировали в 70 мкл раствора, содержащего 8 М мочевины, 0,9 М уксусную кислоту, 10% сахарозу. Центрифугировали при 22 000 g в течение 30 мин. Надосадочную жидкость отсасывали и использовали в качестве опытных образцов. Электрофорез проводили в блоках 15% акриламидного геля в присутствии 8 М мочевины, 0,9 М уксусной кислоты по методу Панима и Чокли (⁹), модифицированному нами для блоков геля толщиной 1 мм и длиной 20 см. Перед нанесением образцов проводили преэлектрофорез в течение 24 час, электрофорез проводили при напряжении 600 в, силе тока 10 ма, без охлаждения, в течение 22 час. Блок геля окрашивали в 0,1% растворе Кумасси, обесцвечивали в 7% уксусной кислоте. Высушивали последовательным обезвоживанием в 50% спирте 20 мин., ацетоне 30—40 мин. Примененная методика позволяет обнаружить фракции, содержащие 10⁻⁷ г белка.

Результаты электрофоретического анализа белков слюнных желез и жировых тел, полученных из личинок на разных стадиях развития, представлены на рис. 1, 2 и табл. 1. Следует отметить, что максимальное количество белковых фракций (102—111) в слюнных железах обнаруживается на стадии предкуколки, вместо 68—89 фракций в слюнных железах личи-

Таблица 1

Число белковых фракций слюнных желез и жировых тел личинок разных стадий развития

Время развития, часы	Слюнные железы				Жировое тело			
	всего		появляю- щихся	исчезаю- щих	всего		появляю- щихся	исчезаю- щих
	основ- ных	минор- ных			основ- ных	минор- ных		
Личинка 3-го воз- раста								
80	53	15	—	—	45	26	—	—
95	69	13	14	—	62	13	5	1
105	72	11	4	2	62	13	—	—
115	79	4	3	4	69	10	9	5
119	85	4	9	3	69	10	—	—
Предкуколка								
4	96	11	22	4	68	14	3	—
8	95	16	11	7	67	19	5	1
12	82	20	2	11	—	—	—	—

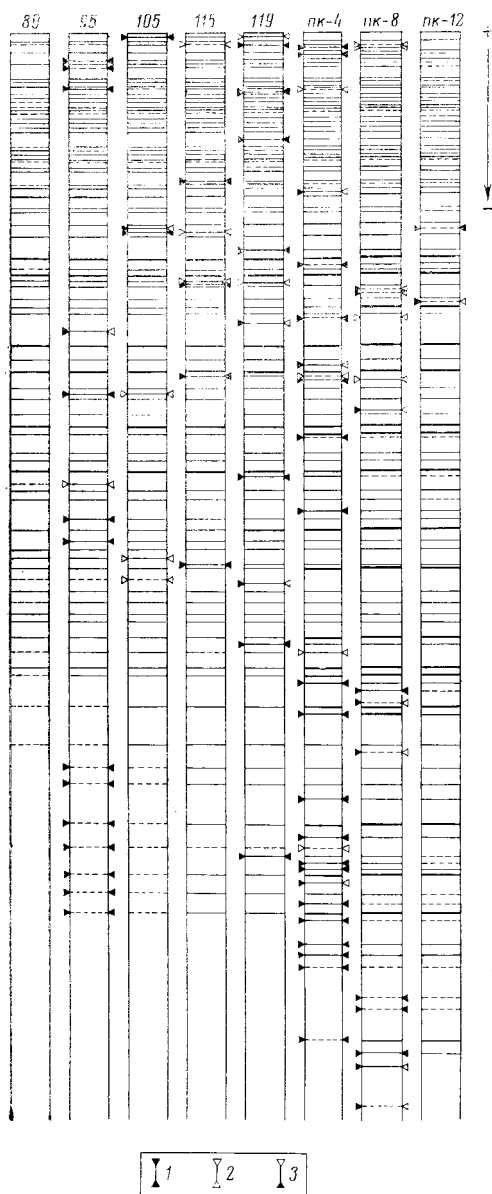
нок 3 возраста. В жировом теле общее количество фракций изменяется в ходе развития менее существенно: 71–79 фракций в 3-м личиночном возрасте и 82–86 фракций на стадии предкуколки. К началу окукливания (120 час., время образования купариума) возрастает гетерогенность состава белков, достигающая максимума через 4–8 час. после начала окукливания. Эти различия возникают в основном за счет появления слабоокрашенных фракций, а 62 основные фракции слюнной железы и 68 фракций жирового тела прослеживаются на всех стадиях развития, изменяясь лишь по интенсивности окрашивания. Также можно выделить периоды развития с максимальным числом изменяющихся фракций: 95 час, стадия предкуколки (4, 8, 12 час.) — для слюнных желез и 95, 115 час. и стадия предкуколки (4, 8 час.) — для жирового тела.

Обсуждая возможное значение отмеченных количественных и качественных изменений в спектре белков, необходимо учитывать, что для слюнных желез, в частности, характерны 3 момента перепрограммирования в исследованный период: начало синтеза мукопротеинового секрета, 96 час. ⁽¹⁰⁾, затем выброс его для прикрепления окукливающейся личинки к субстрату ⁽¹¹⁾ и подготовка железы к лизису на предкуколичной стадии ⁽¹²⁾.

Из табл. 1 видно, что появление 14 новых фракций белков предшествует обнаружению первых гранул секрета в клетках дистального отдела железы. Закономерно было ожидать появление новых фракций на стадии 105 час, поскольку к этому моменту железа приобретает ШИК-положительную реакцию и заполнена гранулами секрета ⁽¹⁰⁾. Однако из 3 фракций, возникающих на стадии 105 час., лишь самая первая наименее подвижная фракция может быть отнесена к белкам секрета. Она обнаруживает ШИК-положительную реакцию, сохраняется только в период синтеза секрета, исчезает после вывода секрета из железы — стадия предкуколки 4 часа (рис. 2а). По-видимому, белки секрета обладают высоким молекулярным весом и остаются на старте, стартовая зона также дает ШИК-положительную реакцию. Вероятно, для фракционирования белков секрета необходимы другие условия проведения электрофореза. В период образования секрета не отмечается существенных изменений в картине пунфинга ⁽⁴⁾.

Выброс секрета из слюнных желез и процесс лизиса стимулируется экдизоном ⁽¹⁴⁾, на фоне возникновения крупных экдизонстимулирующих пуфов в конце 3-го личиночного возраста, 115–120 час. ⁽⁴⁾, в слюнных железах происходит постепенное нарастание количества появившихся

а



б

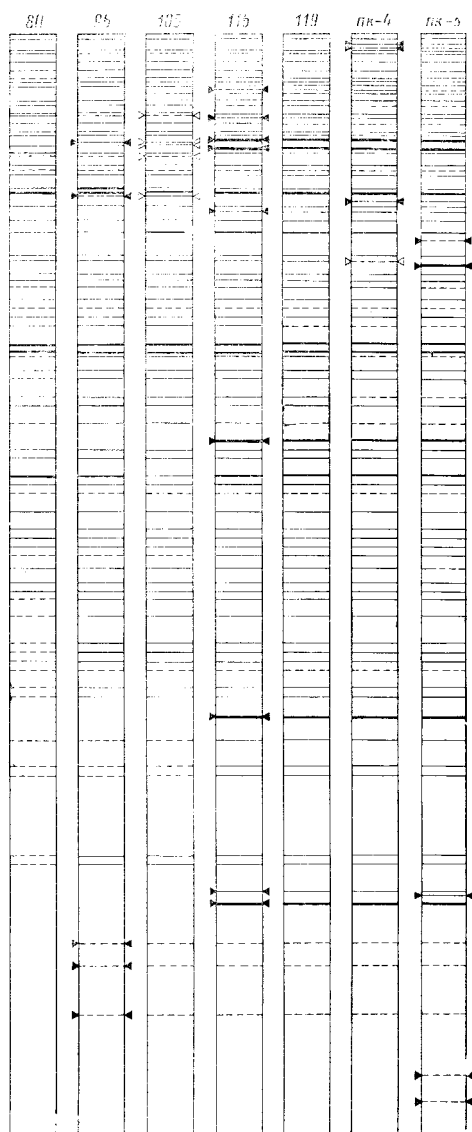


Рис. 2. Схематическое изображение белкового спектра после электрофореза слюнных желез (а) и жирового тела (б). Сплошными линиями обозначены основные; пунктировыми — минорные фракции. 1 — фракции, появляющиеся на данной стадии развития, 2 — исчезающие на последующей стадии, 3 — стадий-специфические фракции. Цифры — то же, что на рис. 1

белков, достигающее максимального значения на стадии предкуколки 4 часа (рис. 2а, табл. 1). Резкая смена картины белков в жировом теле происходит на стадии развития 115 час., после увеличения концентрации экдизона в гемолимфе в 110 час., причем 5 из появившихся белков по интенсивности окрашивания принадлежат к очень крупным фракциям (рис. 2б). Наиболее резкие изменения в спектре белков слюнных желез характерны для предкуколической стадии (табл. 1, рис. 2а). На стадии предкуколки 8 час. отмечено появление 7 стадий-специфических белков. Количество пиков, уменьшающееся после образования куколки, достигает по-

вого пика к 8 час. предкуколки и падает по мере приближения к окукливанию⁽²⁾. Возможно, вновь появившиеся белковые фракции связаны с процессами лизиса обеих тканей, с другой стороны, синтезируемые белки могут использоваться имагинальными тканями во время гистогенеза⁽²⁾.

На основании полученных данных можно думать, что вариация белкового состава слюнных желез в ходе развития определенным образом связана с изменением картины пuffedинга. Обращает на себя внимание еще тот факт, что доля пuffedов с постоянной активностью (162 из 340) в слюнных железах в течение 3-го личиночного возраста⁽⁴⁾ примерно соответствует количеству фракций (62 из 122), прослеживающихся на всех стадиях развития.

Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Академии наук СССР
Новосибирск

Поступило
26 V 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ W. Beermann, *Chromosoma*, v. 5, 139 (1952). ² M. Ashburner, *Developmental Studies on Giant Chromosomes*, Berlin — Heidelberg — N. Y., 1972. ³ И. И. Кукуладзе, *Функциональная организация хромосом*, Л., 1972. ⁴ I. F. Zhimulev, *Chromosoma*, v. 46, 59 (1974). ⁵ N. Pasteur, C. D. Kastriasis, *Development. Biol.*, v. 26, 525 (1971). ⁶ A. Tissieres, H. K. Mitchell, M. Tracy, *J. Molec. Biol.*, v. 84, 389 (1974). ⁷ U. Wobus, S. Popp et al., *Molecular General Genetics*, v. 116, 309 (1972). ⁸ A. C. Benn, E. M. Rasch, *J. Cell Biol.*, v. 55, 420 (1972). ⁹ S. Panyim, R. Chalkley, *Arch. Biochem. and Biophys.*, v. 130, 337 (1969). ¹⁰ Н. Н. Колесников, И. Ф. Жимулев, *Онтогенез*, т. 6, 177 (1975). ¹¹ C. L. M. Poels, *Cell Differentiation*, v. 1, 63 (1972). ¹² N. J. Lane, Y. R. Carter, M. Ashburner, *Wilhelm Roux' Arch.*, v. 169, 216 (1972).

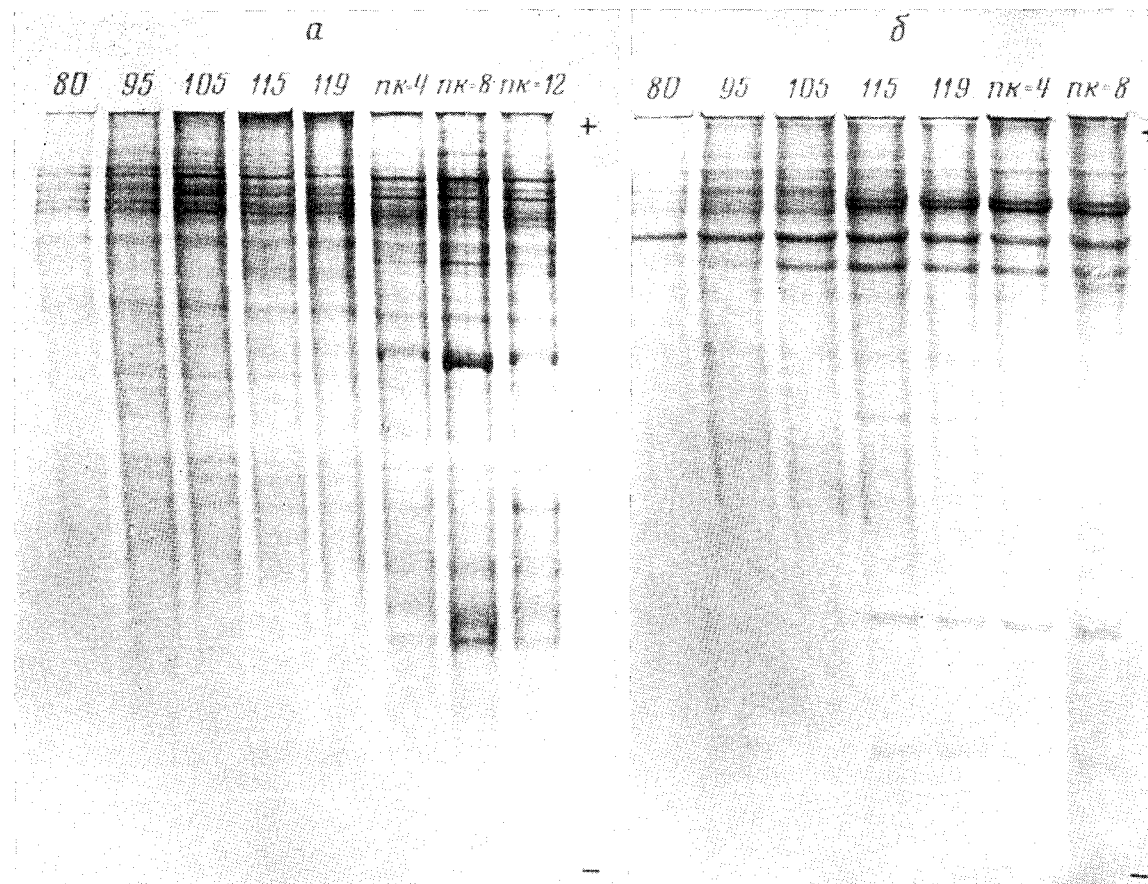


Рис. 1. Электрофореграмма белков слонных желез (а) и жирового тела (б) после электрофореза в 15% акриламидном геле, в присутствии 8 М мочевины, 0,9 М уксусной кислоты. Цифрами над каждым образцом обозначено время развития (в часах) от откладки яиц, пак — предкулоочная стадия 4, 8, 12 час.