

О. П. ГАРКУША, А. М. АНДРИЕВСКИЙ, В. В. ЗАМОРОВ,  
Ю. Н. ОЛЕЙНИК, В. А. КУЧЕРОВ

**ПОЛИМОРФИЗМ КАРБОКСИЭСТЕРАЗ БЫЧКА-КРУГЛЯКА *NEOGOBIOUS MELANOSTOMUS* (PALLAS) ИЗ СЕВЕРО-ЗАПАДНОЙ ЧАСТИ ЧЁРНОГО МОРЯ**

Методом электрофореза в полиакриламидном геле изучено многообразие молекулярных форм карбоксиэстераз у бычка-кругляка, добытого в акватории Одесского залива, в районе о. Змеиный и в озере Ялпуг (придунайские водоёмы). Путём проведения реакции азосочетания идентифицировали электрофоретические фракции карбоксиэстераз бычка-кругляка. Установлены отличия между группировками бычка-кругляка из разных районов по трем основным группам исследуемых ферментов и высказывается предположение о происхождении этих группировок. Обсуждается возможность практического использования данных изозимного анализа при описании популяционных систем у бычка-кругляка.

Наследственный полиморфизм белков (в том числе и ферментов) рассматривавшийся и использовавшийся ранее как ключ к изучению популяционной структуры [3, 12], а более узко – к распознаванию и идентификации популяций, привлекает к себе внимание многих исследователей и в наше время [1, 7, 8, 10, 11, 13]. Обнаружен невероятный размах биохимической изменчивости в популяциях самых различных видов животных, в том числе и рыб [4].

Благодаря развитию электрофоретических методов исследования белков у многих видов рыб обнаружены генетически детерминированные варианты различных белковых (в том числе ферментных) систем, что дает возможность использования новых подходов в решении таких вопросов популяционной биологии, как структура, динамика, устойчивость популяций во времени. Не менее важны подобные исследования для изучения систематических отношений, выявления родства видов в пределах таксономических единиц ранга рода и семейства.

Эстеразы – ферменты, относящиеся к классу гидролаз – широко используются как генетические маркеры при исследовании популяций различных видов животных [5]. Причины этому: 1) большая степень внутривидовой изменчивости; 2) возможность одномоментного изучения нескольких генов, контролирующих спектр эстераз; 3) простота гистохимического выявления. Вся группа эстераз обладает одним общим свойством – в искусственных субстратах они расщепляют эфирные связи карбоновых кислот и производных нафтаола, индоксила, метилумбеллиферрила.

Целью нашей работы было изучить с помощью метода электрофореза полиморфизм карбоксиэстераз у бычка-кругляка, обитающего в разных районах северо-западной части Черного моря.

**Материал и методы.** Исходным экспериментальным материалом служила ткань гонад самцов бычка-кругляка, которую гомогенизировали в системе 0,1 М глицин-NaOH буфера pH 9,0, содержащего 1 % тритон X-100, в соотношении 1:6. Гомогенаты центрифугировали при 12 000 об/мин. в течение 15 мин, после чего полученные экстракты использовали для электрофоретического разделения содержащихся в них карбоксиэстераз.

Для разделения белков кислой природы применяли вариант щелочного электрофореза в системе трис-глицинового буфера pH 8,3. Разделяющая фаза носителя представляла собой пластинчатый блок (140 × 120 × 1 мм) с концентрацией полиакриламидного геля 10 %. Для приготовления геля пользовались реактивами венгерского производства (фирма "Reanal").

Полученные экстракты вносили в промытые разбавленным электродным буфером слоты в объеме 20 мкл с добавкой 5 мкл 60 % раствора сахарозы с 0,1 % бромфено-

© О. П. Гаркуша, А. М. Андриевский, В. В. Заморов, Ю. Н. Олейник, В. А. Кучеров, 2005

ловим синим, применяемым в качестве лидирующего красителя. Сразу после нанесения проб на стартовую поверхность геля устанавливали электрический ток силой в 5 мА (на 10 мин) и 10 мА (на 20 мин), затем в 20 мА в расчете на один гелевый блок. После достижения лидирующим красителем финишного уровня (через 3 – 4 ч) форец прекращали, высвобождали гелевые блоки, многократно отмывали их от внутреннего буфера (исходное значение рН - 8,9) и использовали для гистохимического выявления карбоксильных эстераз. После нейтрализации внутригелевой среды каждый отдельный блок выдерживали в 50 мл подходящего буфера в течение 10 – 15 мин.

Для обнаружения молекулярных форм карбоксиэстераз пользовались модифицированной методикой, описанной ранее [5]. О местонахождении фермента в геле судили по результату проведения в мягких условиях (рН 7,4) реакции одновременного азосочетания, идущей с образованием азокрасителя, с участием ароматического продукта гидролиза сложного эфира и диазония – прочного синего RR (реактивы фирмы “Chemapol”, Чехия) [2].

Инкубационную среду для фиксированного в геле фермента готовили в 0,1 М фосфат-фосфатном буфере (рН 7,4). Каждую гелевую пластину помещали в пенопластовую кювету и заливали 50 мл буфера, содержащего смеси субстратов в количестве 25 мг соответственно, а также прочный синий RR в количестве 50 мг. В работе было использовано два вида субстрата:  $\alpha$ -нафтилацетат,  $\beta$ -нафтилацетат. Все субстраты, а также прочный синий перед введением в буфер растворяли в 100 или 200 мкл диметилформамида. Реакция гидролиза субстрата и азосочетания при 25°C длилась в течение часа. С целью более полного выявления эстераз в щелочной среде время инкубации увеличивали до 12 ч. После экспозиции реакционные смеси удаляли, а гели многократно промывали дистиллированной водой и, в случае необходимости, очищали от мелкодисперсного осадка азокрасителя с помощью мягкой кисти.

Липазы выявили с помощью 0,2 % твина-85, используемого в качестве субстрата в присутствии 0,4 %  $\text{CaCl}_2$  по методу [6]. После инкубации в течение 1 ч, гели обрабатывали 1 % раствором уксуснокислого свинца.

Влажные отмые гелевые блоки сканировали, а затем денситометрировали и обрабатывали с помощью специальной компьютерной программы.

Пробы тканей семенников бычков для последующего исследования содержащихся в них карбоксиэстераз брали у рыб, проживших три лета (2+). Средняя абсолютная длина тела и масса кругляка из района о. Змеиный составила 160 мм и 73 г, из Одесского залива – 165 мм и 76 г и из оз. Ялпуг – 130 мм и 39 г (табл. 1).

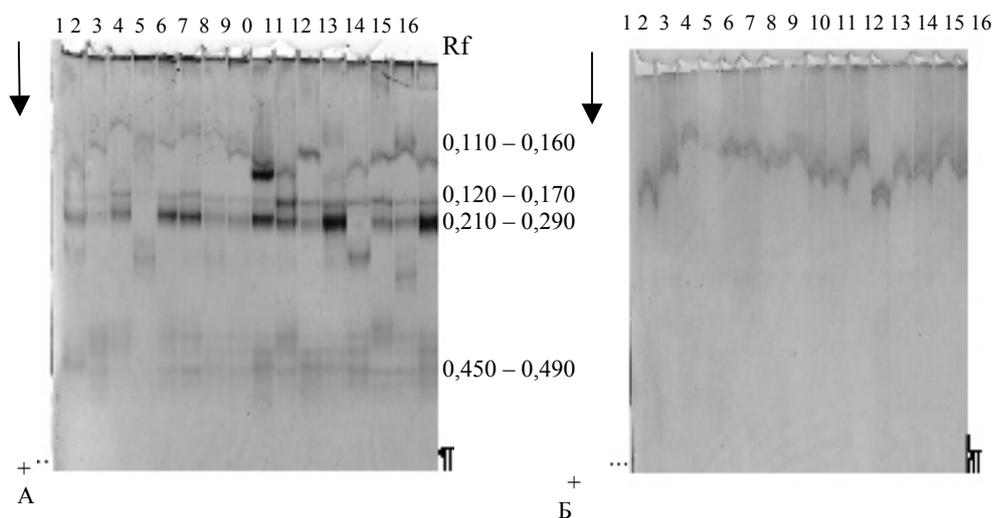
**Таблица 1. Биологическая характеристика выборок бычка-кругляка**  
**Table 1. Biological characteristic of round goby males**

Район проведения исследований	Время проведения исследований	Количество особей, экз.	Зрелость гонад	Возраст, годы	Абсолютная длина, мм	Масса, г
о. Змеиный	ноябрь 2004	20	II	2 +	160 ± 1,82	73 ± 2,39
Одесский залив	август 2004	27	II	2 +	165 ± 2,54	76 ± 3,19
Оз. Ялпуг	сентябрь 2004	40	II	2 +	130 ± 1,91	39 ± 1,86

Из меристических признаков для характеристики исследуемых группировок кругляка использовали число лучей в первом и втором спинных плавниках, анальном плавнике, грудном и брюшных плавниках. Подсчет числа лучей в грудных и брюшных плавниках проводили отдельно для правого и левого плавников с целью изучения ненаправленных изменений в билатеральных структурах, возникающих под воздействием факто-

ров внешней среды (флуктуирующая асимметрия – ФА). Определение возраста проводили по отолитам.

**Результаты и обсуждение.** Все исследуемые ферменты, судя по электрофоретической подвижности, можно разделить на три группы. Первую группу составляют ферменты, обладающие как нафтилацетазной так и липазной активностью. Наиболее высокий уровень экспрессии липаз обнаружен у особей из района о. Змеиный (рис. 1).



**Рисунок 1. Электрофоретический спектр карбоксиэстераз (А) и липаз (Б) гонад самцов бычка-кругляка из района о. Змеиный: стрелкой обозначено направление движения ферментов**  
**Figure 1. Electrophoretic spectrum of carboxiesterases (A) and lipases from round goby males' gonads from region of Island Zmeinyi: an arrow points to enzymes movement**

У всех особей бычков, обитающих у о. Змеиный, фракции липолитических ферментов проявляют  $\beta$ -нафтилацетазную активность, тогда как аналогичные изоформы у рыб из оз. Ялпуг и из Одесского залива имеют выраженную  $\alpha$ -нафтилацетазную активность. При этом индивидуальные различия связаны, с одной стороны, с чрезвычайно разнообразными показателями электрофоретической подвижности изоформ липаз, с другой – встречаемостью экземпляров с разным числом индивидуальных фракций этих ферментов. В целом, обнаружен глубокий параллелизм в проявлении этой группой энзимов липазной и эстеразной активностей.

Что касается второй и третьей группы карбоксиэстераз, то они не проявляют липазной активности. Вторая группа представлена одной более экспрессивной фракцией ( $R_f = 0,210 - 0,290$ ) и одной с меньшей экспрессией ( $R_f = 0,120 - 0,170$ ). Третья группа – наиболее электрофоретически подвижная ( $R_f = 0,450 - 0,490$ ), но с невысокой экспрессией изоформ (рис. 2А). У бычков из Одесском залива и оз. Ялпуг наиболее электрофоретически подвижная группа представлена практически следовыми количествами изоформ (рис. 2Б, 2В, 3).

Судя по коэффициентам  $R_f$  отдельно взятых фракций, все группы ферментов, характерные для исследуемых рыб, являются родственными.

Анализ особей из района о. Змеиный и оз. Ялпуг при существенных индивидуальных различиях указывает на большое сходство среднестатистических показателей экспрессивности изоформ основных групп карбоксиэстераз бычка-кругляка. Так, средняя оптическая плотность (относительные единицы) фракций второй и третьей групп изученных ферментов составила 0,600; 0,930; 0,480; и 0,670; 0,900; 0,480 соответственно.

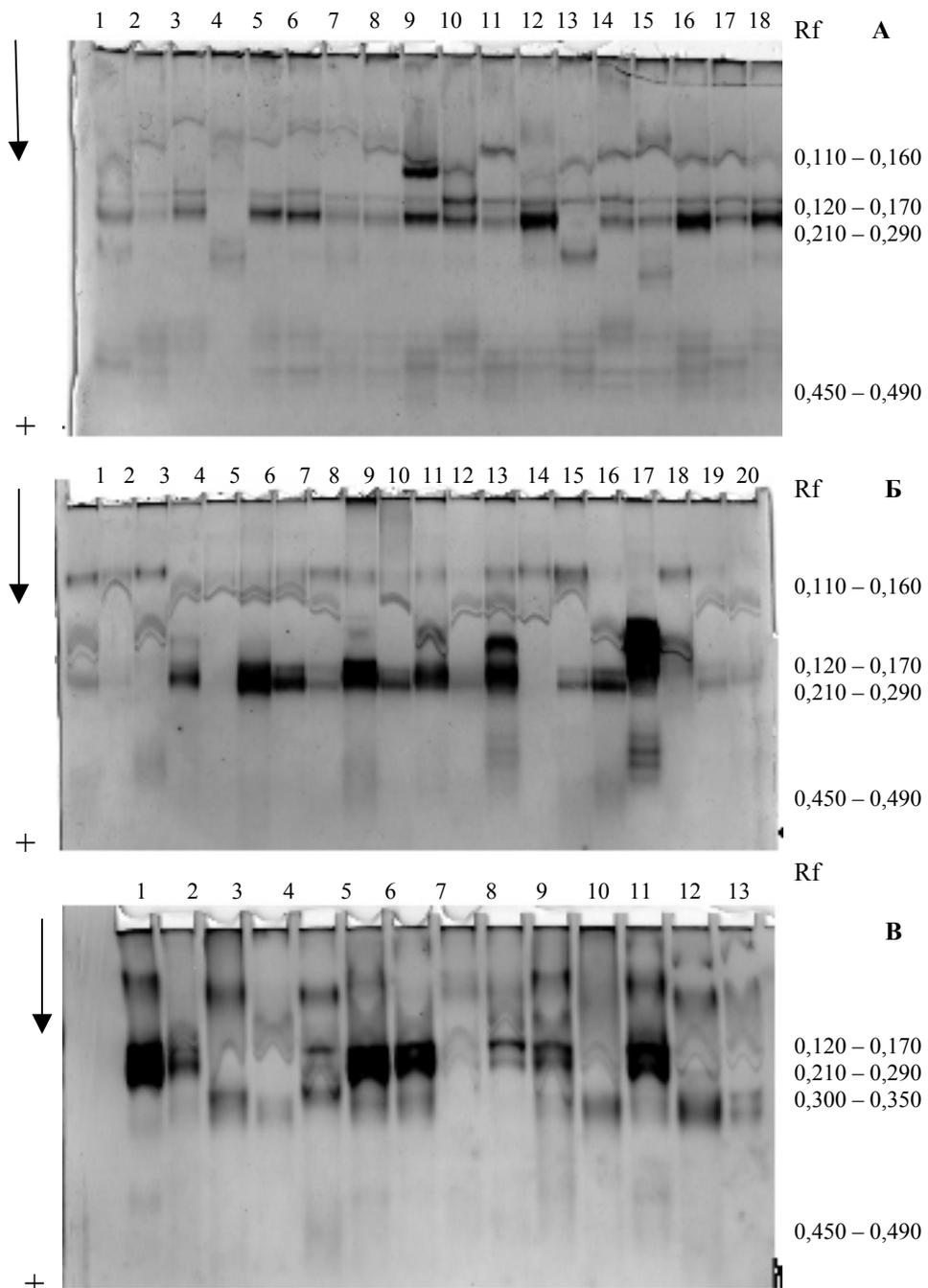
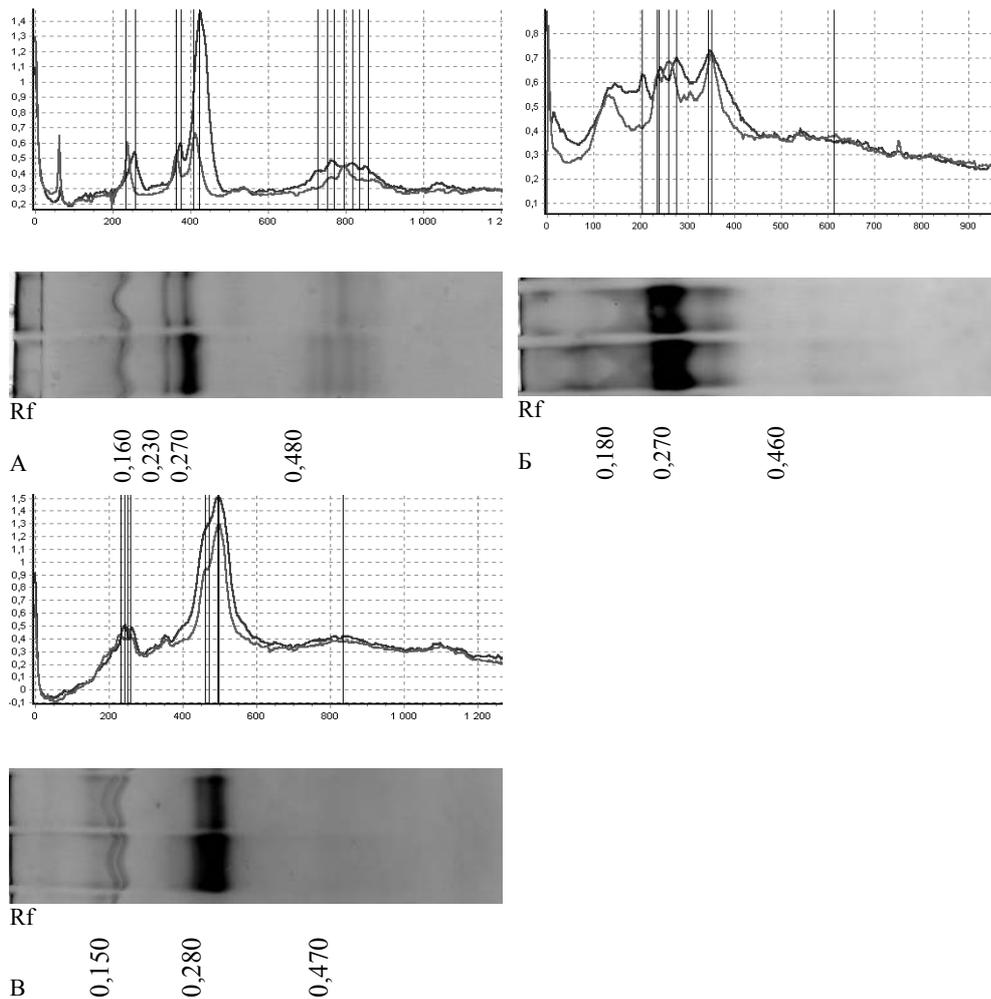


Рисунок 2. Электрофоретический спектр карбоксиэстераз гонад самцов бычка-кругляка: А - из района о. Змеиный; Б - из оз. Ялпуг; В - из акватории Одесского залива (стрелкой обозначено направление движения ферментов)

Figure 2. Electrophoretic spectrum of carboxiesterases from round goby males' gonads from: А - region of Island Zmeinyi; Б - lake Jalpug; В - Odessa Bay (an arrow points to enzymes movement)



**Рисунок 3. Электрофореграммы и соответствующие им денситограммы распределения изоформ карбоксиэстераз гонад самцов бычка-кругляка района о. Змеиный (А), Одесского залива (Б), оз. Ялпуг (В): по оси  $x$  – длина трека (пикселя); по оси  $y$  – оптическая плотность фракций (относительные единицы)**

**Figure 3. Electrophoregrams and correspondent to them densitograms of carboxiesterases isoforms distribution. Carboxiesterases are extracted from round goby males' gonads Island Zmeinyi region (A), of Odessa bay (B), lake Jalpug: axis  $x$  – track length (pixels), axis  $y$  – optical density factions (relative units)**

Сравниваемые группировки бычка-кругляка из района о. Змеиный и оз. Ялпуг по морфологическим (меристическим) признакам, размаху изменчивости последних близки. Величина флуктуирующей асимметрии билатеральных структур (грудные, брюшные плавники), ее дисперсия у рыб из придунайских озер и в прилегающей к дельте морской акватории, находящейся в зоне выноса дунайской воды, существенно не различается. В то же время бычок-кругляк из более удаленных морских районов (Одесский залив), по сравнению с группировкой кругляка из придунайских озер, также как и в сравнении с кругляком из акватории о. Змеиный, характеризуется достоверно большей величиной ФА [9].

**Выводы.** Полученные данные позволяют предполагать, что бычки, обитающие в районе о. Змеиный и в оз. Ялпуг, принадлежат одной генеральной совокупности. В то же время группировка бычка-кругляка, обитающая в Одесском заливе, является более обособленной. Таким образом, данные, отражающие полиморфизм карбоксиэстераз в совокупности с анализом изменчивости морфологических признаков могут быть использованы при изучении генетической структуры популяционных систем разного ранга у бычка-кругляка, а также их экологического мониторинга.

1. Андриевский А. М., Заморов В. В., Черников Г. Б. и др. Разнообразие карбоксиэстераз как генетико-биохимический показатель гетерогенности черноморских популяций бычка-кругляка и бычка-ратана / Актуальные проблемы экологической физиологии, биохимии и генетики животных (Саранск, март 2005). – Саранск: Изд-во Мордовск. ун-та, 2005. – С. 11– 14
2. Берстон М. Гистохимия ферментов. – М.: Мир, 1965. – 464 с.
3. Дуценко В. В. Частоты фенотипов быстрых эстераз тупорылого макрураса *Macrurus rupestris* Плато Хаттон / В. С. Кирпичников. Биохимическая и популяционная генетика рыб: Сб. науч. тр. (материалы совещ). – Ленинград, 1979. – С. 54 – 57.
4. Кирпичников В. С. Генетика и селекция рыб. – Л.: Наука, 1987. – 520 с.
5. Корочкин Л. И., Серов О. Л., Пудовкин А. И. и др. Генетика изоферментов. – М., 1977. – 275 с.
6. Лизосомы. Методы исследования / Д. Дингл. – М.: Мир, 1980. – 342 с.
7. Махоткин М. А. Биохимический полиморфизм пиленгаса *Mugil soiyu* Азовского моря. Тез. докл. Всероссийской конференции молодых ученых, посвященной 140-летию со дня рождения Н. М. Книповича (Мурманск, 23 – 25 апреля 2002 г.). – Мурманск, 2002. – С. 133 – 134.
8. Мещерякова О. В., Груздев А. И., Немова Н. Н. Активность и распределение изоферментов малатдегидрогеназы в органах самцов радужной форели *Salmo gairdnerii* // Вопросы ихтиологии. – 2004. – 44, № 5. – С. 717 – 720.
9. Олейник Ю.Н., Заморов В.В., Радионова Н.П. и др. Морская и пресноводные формы бычка-кругляка *Neogobius melanostomus* (Pallas) бассейна северо-западной части Черного моря // Современные проблемы зоологии и экологии: Мат. междунар. конф., посвящ. 140-летию ОНУ им. И.И.Мечникова, каф. зоол. ОНУ, зоол. музея ОНУ и 120-й годовщины со дня рожд. засл. деятеля науки УССР, проф. И. И. Пузанова. – Одесса: Феникс, 2005. – С. 196 -197.
10. Осинев А. Г., Алексеев С. С., Кириллов А. Ф. Арктический голец *Salvelinus alpinus* из озера Улахан-Силяю-Кюэль (бассейн реки Яны): биология, морфология, генетика, филогения // Вопросы ихтиологии. – 2003. – 43, № 1. – С. 58 – 72.
11. Павлов С. Д. Аллозимная изменчивость и генетическая дивергенция тихоокеанских форелей (род *Parasalmo*) западной Камчатки // Генетика. – 2000. – 36, № 9. – С. 1251 – 1261.
12. Салменкова Е. А., Волохонская Л. Г. Биохимический полиморфизм в популяциях диплоидных и тетраплоидных рыб // Тр. Всесоюзн. совещ. по биохимической генетике рыб. – Л., 1973. – С. 54 – 61.
13. Scholze H., Stutz H., Paltauf F. et al. Fluorescent inhibitors for the qualitative and quantitative analysis of lipolytic enzymes // Anal. Biochem. – 1999. – 276, № 1. – P. 72 – 80.

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова  
г. Одесса

Получено 15.062005

O. P. GARKUSHA, A. M. ANDRIEVSKY, V. V. ZAMOROV, Y. N. OLEINIK,  
V. A. KOOSHEROV

#### ROUND GOBY *NEOGOBIOUS MELANOSTOMUS* (PALLAS) CARBOXYESTERASES POLYMORPHISM FROM THE NORTHWESTERN BLACK SEA

##### Summary

Carboxiesterases molecular variety was studied using the electrophoresis method in polyacrilamid gel. Carboxiesterases were extracted from the round goby from different regions (Odessa bay, Island Zmeinyi, lake Jalpug). Carboxiesterases electrophoretic factions were identified in the reaction of nitrogen combination. Differences in the round goby's groups from different regions were established. Three main groups of analyzed enzymes were found. An opinion about the origin of round goby analyzed groups is expressed. The possibility is considered to application in practice isozymes analyze data while round goby populations description.