

УДК 577.152.31:591.3/.4/.8:595.773.4

**А. М. Андриевский**, канд. биол. наук, доц., **В. А. Кучеров**, мл. науч. сотр., **В. Н. Тоцкий**, д-р биол. наук, проф., зав. каф.  
Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова, кафедра генетики и молекулярной биологии,  
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина  
e-mail: caphgen\_onu@mail.ru

## МЕТОДИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ ИЗУЧЕНИЯ ПОЛИМОРФИЗМА КАРБОКСИЭСТЕРАЗ В ОНТОГЕНЕЗЕ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Методом электрофореза в полиакриламидном геле изучено многообразие молекулярных форм карбоксиэстераз у личинок, куколок и имаго дрозофилы. Подобраны и оптимизированы условия экстракции и гистохимического обнаружения исследуемых ферментов. Установлены электрофоретические свойства всех экстрагированных эстераз суммарных тканей плодовой мушки. Показаны онтогенетические изменения в молекулярных спектрах карбоксиэстераз. Высказывается предположение о том, что качественно-количественные изменения в наборах карбоксиэстераз в ходе развития насекомого связаны с онтогенетически зависимой экспрессией соответствующих генов эстераз.

**Ключевые слова:** гистохимия, эстеразы, онтогенез, дрозофила.

Гидролитические ферменты в живых организмах выполняют многочисленные функции, среди которых немаловажной является обеспечение метаболизма белков, жиров, углеводов, эфиров и их производных [1]. Представители этого класса энзимов могут характеризоваться разными качественно-количественными биохимическими параметрами в зависимости от видовой принадлежности, органно-тканевого распределения, цитологической компартментализации, онтогенетического состояния организма, а также от условий окружающей среды, в которых находится изучаемый объект. Иными словами, реальное состояние той или иной ферментативной системы является адекватным отражением генотипа данного организма в определенное время его развития, а также модифицирующего действия факторов окружения.

Среди ферментов данной группы выделяются как наименее изученные карбоксиэстеразы животных организмов [2—4]. Подавляющее большинство из них часто неоправданно называют неспецифическими, поскольку активность их чаще всего обнаруживается в условиях *in vitro* по неспецифическим ненатуральным субстратам — ароматическим эфирам. Это в свою очередь породило весьма условное название искусственно сформированного семейства — ароматические эстеразы [1, 5]. Критические замечания по этому поводу возникли у нас в хо-

де ознакомления с научной литературой примерно за 40-летний период развития биохимии эстераз.

Определение активности эстераз проводят либо спектрофотометрически непосредственно в пробирках путем смешивания биологической пробы с субстратом в подходящем буфере, либо гистохимически на уровне фиксированных клеток (тканей), либо в системе гелевого блока после предварительного электрофоретического разделения проб гомогенатов и экстрактов соответствующих тканей организма [6—11]. Большим преимуществом последнего методического подхода является то, что он дает возможность во многом преодолеть агрегационный эффект в действии эстераз, обладающих групповой субстратной специфичностью, и неизбежно имеющий место в инкубационном растворе в пробирке.

В связи с вышесказанным авторы настоящей работы преследовали цель оптимизировать условия экстракции и гистохимического выявления в гелевом блоке после электрофореза множественных форм эстераз, расщепляющих сложные эфиры карбоновых кислот и ароматических спиртов. Кроме того, ставилась задача выяснить электрофоретические свойства наблюдаемых форм карбоксиэстераз и их некоторые биохимические параметры. Наконец, преследовалась цель изучить онтогенетические изменения молекулярных спектров эстераз, отражающих, на наш взгляд, генетико-фенотипическое состояние дрозофилы в нормальных условиях среды при ее содержании в культуре.

### Материалы и методы исследования

Исходным экспериментальным материалом служила инбредная линия *Canton-S (C-S) D. melanogaster*. Проявление внешних фенотипических признаков у этой линии (красно-коричневые глаза, серая окраска тела, нормальная форма крыла и др.) полностью совпадает с таковым у дрозофилы линии *Normal*, полученной от мух дикого типа юга Украины. Обе линии в условиях культивирования характеризуются высокой плодовитостью и жизнеспособностью.

Развитие опытной линии на обычной четырёхкомпонентной питательной среде при 25 °С проходило примерно за 10 суток.

Для приготовления ферментсодержащих экстрактов, отобранных синхронных, 3-суточных по возрасту, личинок, куколок и имаго гомогенизировали в течение 2 минут при комнатной температуре в трёх различных буферных растворах: 1) 0,1 М аланин-уксусная кислота, рН 4,5; 2) 0,1 М К, Na-фосфатный, рН 7,4; 3) 0,1 М глицин-едкий натр, рН 9,0. Соотношение массы живого материала к объему экстрагента составляло для личинок — 1 : 0, 1 : 1, 1 : 2; для куколок — 1 : 0, 1 : 1, 1 : 4; для имаго — 1 : 0, 1 : 1, 1 : 6. В отдельных случаях к гомогенатам личинок, куколок и взрослых мух добавляли β-меркаптоэтанол ("Reanal", Венгрия) в 2,5 % конечной концентрации. Полученные гомогенаты сразу же центрифугировали при 12 000 g и температуре +4 — +6 °С в течение 15 минут. После от-

деления супернатантов к осадкам добавляли исходные количества соответствующих экстрагентов с целью проведения повторной экстракции. При необходимости ферментсодержащие вытяжки хранили в замороженном состоянии при  $-10^{\circ}\text{C}$ . Полученные таким образом из личинок, куколок и имаго экстракты тканей использовали с целью электрофоретического разделения и выявления в них эстераз.

В данном исследовании для разделения белков кислой природы в основном применяли вариант щелочного электрофореза в системе трис-глицинового буфера рН 8,3. Контрольный, кислый электрофорез проводили в системе аланин-уксусного рабочего буфера рН 4,5. Разделяющая фаза носителя представляла собой пластинчатый блок ( $140 \times 120 \times 1$  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 сахарозы и 5 мкл 0,1 % бромфенолового синего, применяемого в качестве лидирующего красителя (в условиях кислого фореза использовали метилгрюн). Сразу после нанесения проб на стартовую поверхность геля устанавливали электрический ток силой в 5 мА (на 10 минут) и 10 мА (на 20 минут), затем в 20 мА в расчёте на один гелевый блок. При комнатной температуре и соблюдении указанных условий электрофорез проходил обычно за 3 часа. При этом инактивации разделяемых ферментов не наблюдалось. После достижения лидирующим красителем финишного уровня форез 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 минут.

Для обнаружения молекулярных форм карбоксиэстераз пользовались модифицированной нами методикой, описанной ранее Л. И. Корочкиным [5]. О местонахождении фермента в геле судили по результату проведения в мягких условиях реакции одновременного азосочетания, идущей с образованием азокрасителя, с участием ароматического продукта гидролиза сложного эфира (азокомпонента) и диазония — прочного синего RR (диазокомпонента) (реактив фирмы "Chemapol", Чехия) [6].

Инкубационную среду для фиксированного в геле фермента готовили на трех различных буферных растворах, взятых в 0,1 М концентрации: 1) аланин-уксусном (рН 4,5); 2) фосфат-фосфатном (рН 7,4) и 3) NaOH-глициновом (рН 9,0). Каждую гелевую пластину помещали в пенопластовую кювету и заливали 50 мл подходящего буфера, содержащего отдельно используемые субстраты (или их смеси) в количестве 50 или 25 мг соответственно, а также прочный синий RR в количестве 50 мг. В работе было использовано четыре вида субстратов:  $\alpha$ -нафтилацетат,  $\beta$ -нафтилацетат,  $\alpha$ -нафтилпропионат и  $\beta$ -AS-D-на-

фтилхлорацетат ("Chemapol", Чехия). Все субстраты, а также прочный синий перед введением в буфер растворяли в 100 или 200 мкл диметилформамида (отдельно показано, что этот растворитель не искажает эстеразную активность). Реакция гидролиза субстрата и азосочетания при 25 °С длилась в большинстве случаев в течение часа. С целью более полного выявления эстераз в кислой и щелочной средах время инкубации увеличивали до 12 часов. После экспозиции реакционные смеси удаляли, а гели многократно промывали дистиллированной водой и, в случае необходимости, очищали от мелкодисперсного осадка азокрасителя с помощью мягкой кисти. Влажные гелевые блоки сканировали, оформляли в виде гистоэлектрофореграмм и анализировали полученные результаты. В качестве контроля на реакцию спонтанного азосочетания был взят гелевый блок после электрофореза в равных условиях, в слоты которого пробы экстрактов не вносили. При этом электрофоретическое разделение равных количеств использованных экстрагентов считали нецелесообразным.

Авторы выражают благодарность сотрудникам кафедры генетики и молекулярной биологии З. В. Мироть и Н. А. Стрельцовой за любезно предоставленные технические средства и исходные микропопуляции дрозофилы.

### Результаты исследований и обсуждение

Прежде всего следует отметить, что деэстерификация в гелевом блоке всех используемых нами субстратов и последующая за ней реакция азосочетания наиболее интенсивно протекают в нейтральной среде при рН 7,4. При этом через 1 час инкубации обнаруживается максимальное число фракций карбоксиэстераз во всех используемых экстрактах личинок, куколок и имаго. По сравнению с этим гидролиз тех же сложных эфиров в кислой среде (рН 4,5) происходит менее активно, однако через 3 часа инкубации ферментсодержащего геля в этих условиях удается выявить все основные формы эстераз, проявляющиеся в нейтральной среде. Что касается расщепления эфиروпроизводных нафтола в щелочной среде (рН 9,0), то оно выражено крайне слабо. Однако, в этом случае во всех биопробах обнаруживается одна и та же форма эстеразы (практически единственная) с ослабленной активностью. Результаты этой части работы представлены на рис. 1 (А—Ж).

Используемая издавна реакция образования нерастворимого азокрасителя из нафтолов и диазотатов, была успешно применена для обнаружения эстераз в клетках, тканях или других структурах. При этом в зависимости от природы или структуры выбираемого субстрата — эфира — можно ожидать образования азокрасителя того или иного цвета. Так, сочетание  $\alpha$ -нафтола с прочным синим дает продукт коричневого окраски,  $\beta$ -нафтола с тем же диазотатом — продукт пурпурного цвета. Кроме того, интенсивность окраски либо смещение ее в ту или иную цветовую область, вероятно, зависит от молекулярного окружения частиц осадка азокрасителя, а также наложения цветов.

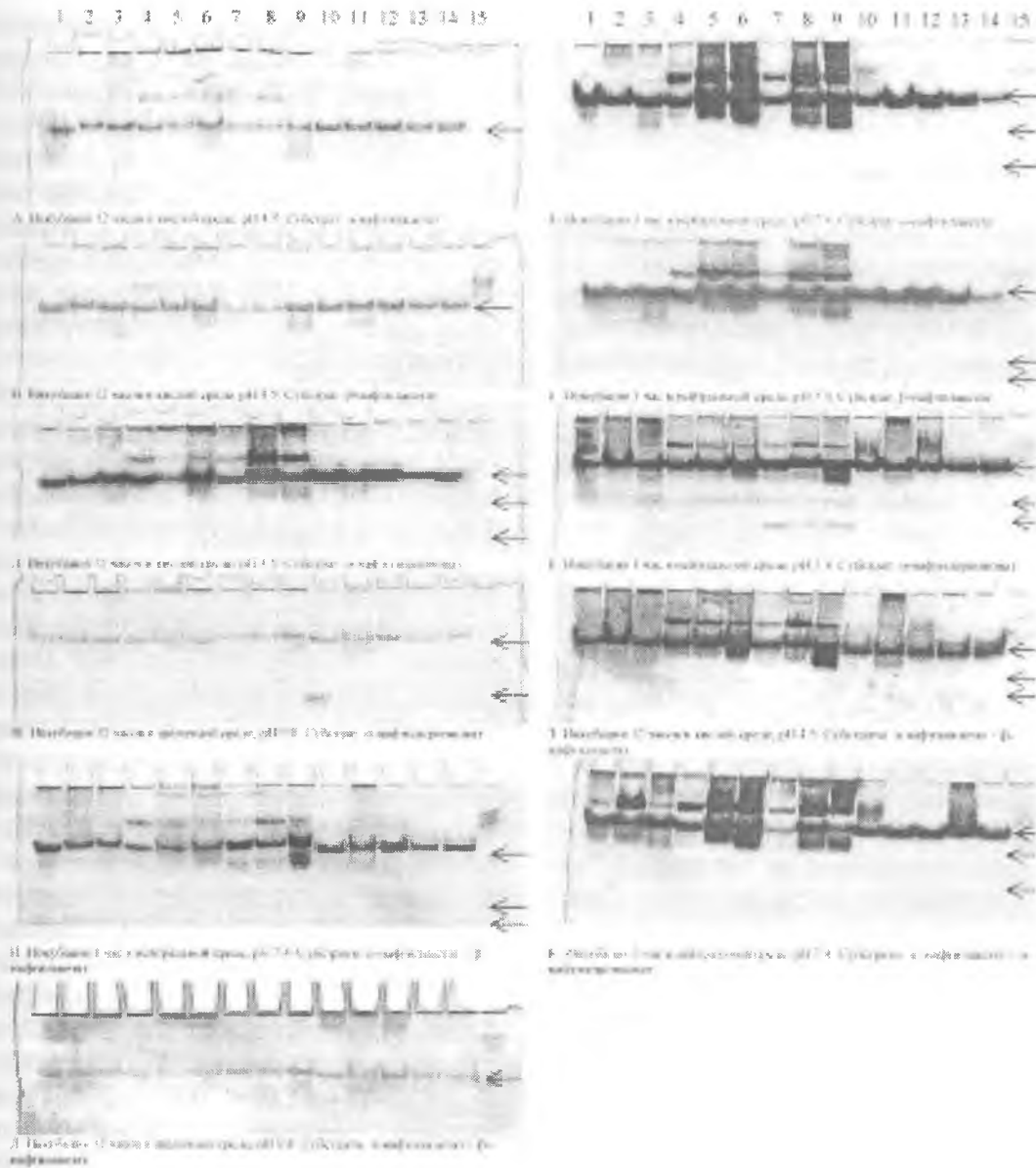


Рис. 1. Электрофоретические спектры карбоксиэстераз экстрактов тканей личинок, куколок и имаго линии *Canton-S Drosophila melanogaster*.

Слоты: 1 — личинки, экстракция — pH 4.5; 2 — личинки, экстракция — pH 7.4; 3 — личинки, экстракция — pH 9.0; 4 — куколки, экстракция 4.5; 5 — куколки, экстракция — pH 7.4; 6 — куколки, экстракция — pH 9.0; 7 — имаго, экстракция — pH 4.5; 8 — имаго, экстракция — pH 7.4; 9 — имаго, экстракция — pH 9.0; 10 — личинки, экстракция — pH 4.5 +  $\beta$ -меркаптоэтанол; 11 — личинки, экстракция — pH 7.4 +  $\beta$ -меркаптоэтанол; 12 — личинки, экстракция — pH 9.0 +  $\beta$ -меркаптоэтанол; 13 — куколки, экстракция — pH 7.4 +  $\beta$ -меркаптоэтанол; 14 — куколки, экстракция — pH 9.0 +  $\beta$ -меркаптоэтанол; 15 — химотрипсин панкреатический ("Reanal", Венгрия; 20 мкг; контроль на неспецифический эстерализ).

Примечание:  $\leftarrow$  —  $\beta$ -фильная карбоксиэстераза.

Сказанное наглядно демонстрируется при выявлении эстераз экстрактов тканей дрозофилы при наличии в среде инкубации двух одновременно взятых субстратов:  $\alpha$ -нафтилацетата и  $\beta$ -нафтилацетата. По данным, представленным на рис. 1 (З—Л), можно выделить две неодинаковые по разнообразию форм группы эстераз. Локализация в геле эстераз первой группы, представленных несколькими фракциями, связана с образованием коричневого азокрасителя. Стало быть, именно эти молекулярные формы фермента гидролизуют  $\alpha$ -нафтилацетат. Местонахождение эстераз второй группы связано с появлением продукта пурпурной окраски. Продукт этот образуется в результате сочетания  $\beta$ -нафтола с прочным синим.

В соответствии с проявляющейся окраской (или особенностью строения арильной группы субстрата), выделяют две группы ароматических эстераз:  $\alpha$ -эстеразы и  $\beta$ -эстеразы [5—7]. Исследования показали, что применение каждого из субстратов порознь дает возможность обнаружить все те основные формы эстераз, которые проявляются в присутствии обоих субстратов одновременно. При этом, в инкубационной среде с  $\alpha$ -нафтилацетатом все изоформы эстераз в геле окрашиваются в коричневый цвет, а в случае  $\beta$ -нафтилацетата — в пурпурный. Следует подчеркнуть, что и в первом, и во втором случаях за 1 час инкубации достигается более интенсивная окраска ферментных зон по сравнению с таковой, выявляемой при использовании двухсубстратной среды. Основываясь на полученных данных, можно предположить, что в системе с двумя различными субстратами возникает конкуренция между ними за место в активном центре фермента. Кроме того, в таких условиях ярко проявляется  $\alpha$ -фильность одних форм эстераз и  $\beta$ -фильность — других, что не имеет места в среде с одним из субстратов. Как видно из рис. 1 (З—Л), разнообразие молекулярных форм  $\beta$ -фильных карбоксиэстераз не совпадает с таковым  $\alpha$ -фильных.

Что касается вопроса о влиянии природы экстрагента на элюцию эстераз из тканей дрозофилы, то следует отметить, что большинство форм ферментов экстрагируется как кислым буфером, так и нейтральным, однако более богатым как по количеству фракций карбоксиэстераз, так и по их активности является щелочной экстракт. Примечательным оказалось и то, что введение в гомогенат  $\beta$ -меркаптоэтанола либо препятствовало экстракции основной молекулярной формы  $\alpha$ -фильной эстеразы, обладающей средней электрофоретической подвижностью, либо инактивировало эту фракцию фермента. Если верно последнее предположение, то не исключено, что для проявления активности  $\alpha$ -эстераз крайне важны дисульфидные связи.

Для наиболее полного выхода различных эстераз из тканей личинок, куколок и имаго дрозофилы необходимо наличие хотя бы минимального объема экстрагента. Так, гомогенизация биоматериала без добавки какого-либо буфера (1 : 0) сильно затрудняет экстракцию этих гидролаз. Увеличение же соотношения ткани к водному растворителю до 1 : 2, 1 : 4 или 1 : 6 благоприятно сказывается на солю-

билизации всех молекулярных форм карбоксиэстераз, характерных для той или иной стадии развития дрозофилы.

Несмотря на то, что после однократной экстракции в супернатантах регистрируется высокий уровень содержания эстераз (особенно  $\beta$ -фильных у имаго), значительная их часть остается связанной с осаждающимися субклеточными структурами, но практически полностью вымывается в процессе повторной экстракции.

При гистохимическом выявлении эстераз дрозофилы обнаруживаются четкие онтогенетические различия, касающиеся количественно-качественных характеристик множественных молекулярных форм изучаемых ферментов у личинок, куколок и имаго. Так, у личинок проявляется единственная мажорная фракция  $\beta$ -фильной эстеразы, дающая положительную реакцию гидролиза как с  $\alpha$ -нафтилацетатом, так и с  $\alpha$ -нафтилпропионатом.  $\alpha$ -Нафтилацетазная активность связана с появлением свойственной только куколкам и имаго формы  $\alpha$ -эстеразы. Эта эстераза, ( $R_f = 0.17$ ) обладает высокой активностью по отношению и к другим субстратам —  $\beta$ -нафтилацетату,  $\alpha$ -нафтилпропионату). Как видно из электрофореграмм, она всегда располагается перед  $\beta$ -фильной карбоксиэстеразой. Имагинальным формам мухи также свойственно наличие основной активной  $\alpha$ -фильной фракции эстеразы с теми же общими характеристиками. Что касается наличия минорных компонентов эстераз, то они выявляются с разной экспрессивностью в зависимости от стадии развития плодовой мушки. Наиболее полно они определяются по  $\alpha$ -нафтилпропионату и составляют на фореграммах группу быстродвижущихся белков. Наименее подвижные фракции  $\alpha$ -фильных эстераз характерны в основном для имагинальной фазы развития дрозофилы. Их отличает плохая фокусируемость. Однако, качество форебеза можно существенно улучшить путем введения в экстракт (но не в гомогенат) неионного детергента (например, тритона X-100).

Таким образом, путем электрофореза в полиакриламидном геле нам удалось достичь разделения группы карбоксиэстераз, присутствующих в экстрактах тканей дрозофилы. В зависимости от стадии развития насекомого эстеразный спектр включает одну, две или три основные фракции, обладающие  $\alpha$ - и  $\beta$ -нафтилацетазной активностью, и 2—4 — дополнительные. Каждая из выявленных фракций способна деэстерифицировать также  $\alpha$ -нафтилпропионат. По всей видимости, разнообразие карбоксиэстераз дрозофилы ограничивается белками кислой природы, что значительно упрощает исследование этих ферментов путем щелочного электрофореза. В отдельном эксперименте (вариант кислого форебеза) нами было однозначно показано отсутствие в различных экстрактах личинок, куколок и имаго тех или иных щелочных форм карбоксиэстераз.

Таким образом, полученные нами данные указывают на то, что в ходе индивидуального развития дрозофилы цитоплазматическая, а также, вероятно, и гемолимфатическая системы деэстерификации испытывают существенные изменения. С одной стороны, это может быть

связано с перерывом в режиме питания насекомого на стадии куколки, а с другой — с запуском механизма реализации генетической программы клеток имагинальных органов и тканей, начало развития которых совпадает с началом куколочной стадии. Таким образом появление новых молекулярных форм карбоксиэстераз можно связывать с дифференциальной активностью генов, которая регулируется в ходе онтогенеза.

Судя по опубликованным работам, посвященным исследованию карбоксиэстераз, наиболее полно изучены эти ферменты у млекопитающих. У этих организмов выделяют несколько самостоятельных семейств эстераз, включающих, вероятно, разное количество полиморфных форм. Сложность изучения данной группы энзимов состоит в том, что практически все они могут проявлять групповую субстратную специфичность, что сильно затрудняет их идентификацию. Небольшой выбор малоспецифичных искусственных субстратов позволяет лишь выявить (да и то не всегда и не полностью) многообразие эстераз. Что же касается их идентификации, то здесь исследователи встречаются с серьезными трудностями. Иногда задачу удается разрешить, используя специфические ингибиторы тех или иных эстераз. Так, применяя диизопропилфторфосфат или эзерин, можно блокировать ацетилхолинэстеразы и холинэстеразы; добавляя в инкубационную среду  $\text{CuSO}_4$  инактивируют ароматические эстеразы (того же эффекта добиваются применяя *p*-хлормеркурибензоат). К сожалению, одни и те же соединения, вызывая инактивацию одних эстераз и стимулируя другие, не всегда однозначно и предсказуемо ведут себя по отношению к ферментам разного происхождения.

Полученные нами данные могут существенно дополнить сведения о многообразии молекулярных форм карбоксиэстераз у дрозофилы и побуждают к проведению дальнейших исследований, направленных на идентификацию, изучение физико-химических свойств, выяснение генетической детерминации и онтогенетического контроля выявляемых фракций карбоксиэстераз.

### **Выводы:**

1. С помощью реакции азосочетания в полиакриламидном геле обнаруживается активность множественных молекулярных форм карбоксиэстераз экстрактов тканей дрозофилы по гидролизу  $\alpha$ - и  $\beta$ -нафтилацетата,  $\beta$ -AS-D-нафтилхлорацетата, а также  $\alpha$ -нафтилпропионата.
2. Применяемые синтетические субстраты с наибольшей скоростью гидролизуются в нейтральной среде, что вполне может соответствовать условиям реализации активности изучаемых ферментов *in vivo*.
3. В ходе онтогенеза от стадии личинки до стадии половозрелой мухи наблюдаются существенные изменения в спектрах множественных молекулярных форм исследуемых эстераз.



4. На стадиях куколки и имаго выявлена электрофоретически медленноподвижная высокоактивная фракция  $\alpha$ -фильной эстеразы, отсутствующая у личинок.

## Литература

1. Диксон М., Узбб Э. Ферменты. — М.: Мир, 1966. — 816 с.
2. Rivolo-Takasusuki Maria Claudia C., Collet Thais. Characterization of *Nasutitermes globiceps* (Isoptera: Termitidae) esterases // *Biochem. Genet.* — 2000. — V. 38, № 11—12. — P. 367—375.
3. Иванова Евгения, Стойкова Теодора, Вълчев Иван, Колева Стела, Мурлева Петя. Электрофоретично проучване на неспецифичните естерази при вида *Reticulitermes lucifugus*, разпространен в България // *Науч. тр. Биол. / Пловдив. унив.* — 1999. — Т. 35, № 6. — С. 99—103.
4. Tecles F., Martinez-Subiela S., Ceron J. J. Technical considerations for improving cholinesterase determination in whole blood of domestic animals: Pap. 9th Congress International Society of Animal Clinical Biochemistry "ISACB 2000: Animal Clinical Biochemistry", Toulouse, 17—20 July, 2000 // *Rev. med. vet. (France).* — 2000. — 151, № 7. — P. 778.
5. Корочкин Л. И., Серов О. Л., Пудовкин А. И. и соавт. Генетика изоферментов. — М.: Наука, 1977. — 275 с.
6. Берстон М. Гистохимия ферментов. — М.: Мир, 1965. — 464 с.
7. Лизосомы. Методы исследования / Под ред. Д. Дингла. — М.: Мир, 1980. — 342 с.
8. Тоцький В. Н., Хаустова Н. Д., Андриевский А. М., Гандирук Н. Г., Белова Г. И., Есеркепова Е. В. Экспрессивность ген-энзимных систем и показатели жизнеспособности в онтогенезе инбредных линий и гибридов дрозофилы // *Генетика.* — 1990. — Т. 26, № 10. — С. 1791—1799.
9. Никольская Е. Б., Кугушева Л. И. Возможность применения карбоксиэстераз в химическом анализе // *Ж. анал. химии.* — 1999. — Т. 54, № 2. — С. 153—158.
10. Sprung J., Srinivasan V., Castellani W. J., Udayashankar S. Effects of acetylcholinesterase inhibitors donepezil and neostigmine on pseudocholinesterase activity in vitro: Abstr. 73rd Clinical and Scientific Congress of the International Anesthesia Research Society, Los Angeles, Calif., March 12—16, 1999 // *Anesth. and Analg.* — 1999. — V. 88, № 2, Suppl. — P. 235.
11. Rivas de la Vega Yaelis, Gonzales Lavaut Jose A., Avila Gonzales Rizette, Ruiz Caballero Ritsie, Sordo Martinez Lisette, Castro Nodal Mayra. Estudio del proceso de extraccion de esterasa a partir de *Plexaura homomalla* y evaluacion de su actividad enzimatica // *Acta farm. bonaerense.* — 1999. — V. 18, № 3. — P. 165—170.

**О. М. Андриєвський, В. О. Кучеров, В. М. Тоцький**

Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,  
кафедра генетики та молекулярної біології,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

## МЕТОДИЧНІ ПРОБЛЕМИ ВИВЧЕННЯ ПОЛІМОРФІЗМУ КАРБОКСИЕСТЕРАЗ В ОНТОГЕНЕЗИ *DROSOPHILA* *MELANOGASTER*

### Резюме

Методом електрофореза у поліакриламідному гелі вивчено різноманітність молекулярних форм карбоксиестераз у личинок, лялечок та имаго дрозофіли. Підбрано та оптимізовано умови екстракції та гістохімічного виявлення досліджуваних ферментів. Встановлено електрофоретичні властивості всіх екстрагованих естераз су-

марних тканин плодової мушки. Показано онтогенетичні зміни у молекулярних спектрах карбоксиестераз. Висловлюється припущення про те, що якісно-кількісні зміни у наборах карбоксиестераз у ході розвитку комахи пов'язані з онтогенетично залежною експресією відповідних генів естераз.

**Ключові слова:** гістохімія, естерази, онтогенез, дрозофіла.

**A. M. Andrievsky, V. A. Koocherov, V. N. Totsky**

Odessa National I. I. Mechnikov University,  
Department of Genetics and Molecular Biology,  
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukrain

### **THE METHODOICAL PROBLEMS OF STUDYING OF THE CARBOXYESTERASES' POLYMORPHISM IN THE ONTOGENESIS OF DROSOPHILA MELANOGASTER**

#### **Summary**

The variety of carboxyesterases' molecular forms of larvas, chrysalises and imagos of drosophila has been studied with the help of the method of polyacrylamid gel electrophoresis. The conditions of extraction and histochemical detection of the studied ferments have been selected and optimized. The electrophoretic properties of all extracted esterases of drosophila's summary tissues were established. The ontogenetical changes in molecular spectrums of carboxyesterases have been revealed. It is assumed that the qualitative and quantitative changes in the sets of carboxyesterases are connected with ontogenetically dependent expression of corresponding gens of esterases in process of the insect's development.

**Key words:** histochemistry, esterases, ontogenesis, drosophila.