

ИЗОЗИМЫ ЭСТЕРАЗЫ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ И ГИБРИДОВ КУКУРУЗЫ

Андрей БАБИЦКИЙ

Славянский университет, г. Кишинев, Молдова

A fost elaborată o metodă nouă, înalt sensibilă, de depistare a esterazei pe gel prin combinarea indigo și coloranților tetrazolii. Identificarea alelelor E4 esterazei din rădăcinile plantulelor liniilor înbrede s-a efectuat utilizând PAA-gel standard. A fost depistată o diferență semnificativă în spectrele esterazei la înbrezi și hibrizi. Ca punct de referință a fost luată izoforma esterazei E8. S-a constatat că E4, formă descrisă anterior, ce conține o serie de linii pe gel, este artefact al interacțiunii dintre hidroxamatul ciclic și ramurile lizinei din E4 esterază. A fost stabilit că E4 esteraza este monomer. Este dată modalitatea de descompunere a esterazei E8 în monomeri. Ea este heterodimer. Specificitatea substratului și link dimerului prin intermediul grupurilor de sulfhidril poate identifica E8 esteraza ca acetilcolinesterazei.

Cuvinte-cheie: esterază, E4, E8 izoenzime, acetilcolinesteraze, metoda înalt sensibilă, depistarea esterazei, linii înbrede și hibride ale porumbului.

ESTERASE ISOZYMES OF MAIZE INBRED LINES AND HYBRIDS

The separation of esterase isozymes from seedling of maize was carried out using standard disc PAGE technique. Significant differences were observed in esterase pattern in maize inbred lines and their hybrids. The esterase E8 enzyme, whose structural locus was demonstrated to be elsewhere in the genome, was referred as the mark for identification esterase isozymes on the gel. New highly sensitive method to detect the esterase by means of combination of indigo and tetrazolium dyes is developed. It has been found that the E4 esterase described before as being composed in series lines on the gel is really the artifact of interaction between cyclic hydroxamate molecules with lysine groups of this isozyme. Additive patterns of inheritance E4 esterase isozymes in hybrid produced from parental lines have been shown that the esterase E4 isozymes are the monomers. There has found the new way to split E8 esterase into monomers and it is shown as being a heterodimer. The substrate specificity and the dimer link by means of the sulphhydryl groups can identify E8 esterase as acetylcholinesterase.

Keywords: esterase, E4, E8 isozymes, acetylcholinesterase, highly sensitive method to detect esterase, maize inbred lines and hybrids.

Введение

Для изучения молекулярно-генетических процессов жизнедеятельности, идентификации генотипов возделываемых растений, среди которых заметное место занимает и кукуруза, уже общепринято применять энзимы. При этом большое внимание уделяется эстеразе, используемой при изучении инбредных линий и гибридов кукурузы, для чего создана номенклатура ее изозимов [9, 13, 17-19] и проведено их хромосомное картирование. Однако для использования этого банка данных необходим ключ для узнавания отдельных изозимов на цельном электрофоретическом спектре, в соответствии с общепринятой номенклатурой их обозначения. Но в большинстве научных публикаций указаны только части того геля, на котором был проведен электрофорез, чтобы выделить ту изоформу, о которой идет речь, а общая картина остается неизвестной. В дополнение к этому необходимо учитывать, что все изозимы эстеразы кукурузы были открыты, идентифицированы и генетически прокартированы, в основном, на американском континенте и на американских инбредных линиях кукурузы.

Совершенно очевидно, что, не владея способом узнавания изоформ эстеразы в общем спектре, любое проведение экспериментов и изложение полученных данных почти лишено научной информативности, поскольку как для самого автора, так и для остальных исследователей остается не ясным, о какой из изоформ из суммарного спектра эстеразы идет речь в публикации. Этими недочетами страдают все публикации отечественных исследователей и ряда европейских, поскольку у нас до сих пор не все инбредные линии изучены и прокартированы по энзиму эстеразы. К служебным же результатам исследований американских ученых доступа нет, несмотря на то, что номенклатура эстераз кукурузы начала создаваться более 45 лет тому назад. Поэтому вполне естественно, что пока в статьях российских и других авторов предложенная американскими учеными номенклатура изоферментов эстеразы в полной мере не использована [6, 7, 10, 11, 22].

Попытки уклоняться от научных дискуссий на общепринятом языке путем введения своей номенклатуры, вопреки уже существующей, вряд ли способствуют научному прогрессу. Здесь, как и вообще

в науке, необходимо вести научный диалог по общепринятым обозначениям, введенным первооткрывателями этих изоформ эстераз, и не осуществлять подмену предмета исследования и обсуждения своими мнениями. Кроме этих факторов, существенное значение имеет то, что при создании различными авторами номенклатуры изоферментов эстеразы при электрофорезе использованы различные гелевые носители: целлюлозный, агаровый, крахмальный, полиакриламидный с различными буферными системами, что не позволяет сравнивать результаты различных исследователей. Имеется обзор литературы по проведенным вплоть до 1986 года исследованиям по изозимам эстеразы кукурузы [1], где также показано, что изозимный спектр существенно зависит от применяемого электрофоретического буфера. Эта номенклатура изозимов эстеразы дополнена новой, обнаруженной нами мембранно-связанной изоформой эстеразы [12].

Номенклатуру эстераз начал создавать Д.Шварц, разделив на крахмальном геле в боратной буферной системе эстеразы эндосперма кукурузы на стадии молочной спелости и обозначив их в порядке описания как E1, E2 и E3 изозимы. Однако в боратной буферной системе подвижность белков в значительной степени определяется размером ковалентно связанного с ними углеводного фрагмента, и ввиду значительных погрешностей методики эти изоформы были оставлены без внимания. Настоящее развитие номенклатуры получила после применения в качестве носителя при электрофорезе полиакриламидного геля в других буферных системах, но порядок их наименования был продолжен и появилась изоформа E4, впервые описанная Харрисом [15], который на основании её подвижности к аноду идентифицировал 4 аллели: наиболее медленную – C, и наиболее подвижную – F аллель, так что между их подвижностями располагаются другие при соотношении $C < D < E < F$. При этом было показано, что E4 изоформа является мономером и локализована на третьей хромосоме [16].

Цель данной публикации – показать на общей картине результата электрофореза на геле расположение изозимов, узнать их и, соответственно этому, изложить собственные экспериментальные данные: показать расположение E4 эстеразы на общем виде геля по отношению к стартовой линии и к повсеместно присутствующей изоформе E8 эстеразы, являющейся димером и локализованной на коротком плече хромосомы 3 [20], описать характерные свойства E4 эстеразы, идентифицировать ряд молдавских инбредных линий кукурузы по аллелям изофермента E4 эстеразы. Показать на геле расположение открытой нами мембранной эстеразы [12]. Для стандартизации условий электрофореза нами применена стандартная методика прерывистого (диск) электрофореза в щелочной буферной системе [14].

Материалы и методы исследования

Семена различных инбредных линий и гибридов кукурузы проращивались в растильнях между двумя слоями фильтровальной бумаги, увлажненной слабым 0,2 г/л раствором NaCl в термостате при 22°C. Из одного проростка на 6-7 день проращивания нами отделялся корень, обсушивался снаружи фильтровальной бумагой, взвешивался и измельчался при 0°C в ступке над капроновой мелкоячеистой тканью с равным по весу объемом раствора 20% сахарозы на 0,063 М Трис HCl формирующем буфере с pH 6,9. Для связывания присутствующего в тканях кукурузы алкилирующего NH₂ и SH группы белков, циклического гидроксамата DIMBOA [16], перед растиранием корня в ступке добавляли 0,1 г уравновешенного с дистиллированной водой слабоосновного анионита АН-15 в хлоридной форме. Гомогенат отжимали через капроновую ткань и супернатант центрифугировали до просветления. В ячейку геля вносили 0,1 мл надосадочного раствора. В связи с тем, что каждая дорожка на электрофорезе представляет один генотип, а чистота исследуемого материала не была гарантирована, то между отдельными зимограммами существует некоторое расхождение вследствие генетического полиморфизма исследуемого генетического материала.

Электрофорез проводили в ступенчатой буферной системе с трис-глициновым буфером в 7,5% полиакриламидном пластинчатом геле толщиной 1,5 мм. Инкубация гелей на ферментативную активность проводилась в 0,1 М фосфатном буфере с pH 8,3. В качестве субстрата мы использовали вначале индоксилатетат, α -нафтил и β -нафтилацетаты или смесь последних двух. Суммарное содержание субстрата составляло 1 мг/мл. Для одновременного азосочетания образующихся нафтолов в реакционную среду вносили соль прочного синего ББ в количестве 0,5 мг/мл инкубационного раствора.

Результаты и их обсуждение

Публикация по E4 эстеразе [15, 16] настолько лаконична, что совершенно отсутствует методика извлечения фермента, условия его электрофореза и окрашивания. Поэтому нами были начаты поиски

соответствующих методов исследований, позволяющих визуально на общем спектре увидеть эти изоформы. После серии экспериментов с использованием боратной, вероналовой и трис-глициновой буферных систем для выделения эстеразы и её электрофореза, нам удалось установить, что наиболее подходящим буфером для извлечения E4 эстеразы, чтобы она на электрофоретическом геле давала то изображение, которое представил в своих публикациях Харрис [15, 16], является трис-хлоридный буфер. А для самого электрофореза необходимо использовать классический прерывистый (диск) электрофорез по Дэвису [14].

В таких условиях на геле можно видеть одну аллель E4 эстеразы, представленную серией полос в виде гармошки, начиная от самой медленной и наиболее интенсивной, и последующих, градуально снижающихся по интенсивности, по направлению их электрофоретического движения к аноду (рис.1). Причем, число видимых линий в серии варьирует от трех до пяти при использовании гелей с субстратом α -нафтилацетатом в сочетании с солью прочного синего ББ. При использовании одного индоксилацетата чувствительности методики недостаточно, чтобы видеть все эти серии полос. Наибольшее число полос видно при использовании смеси индоксилацетата и нитросинего тетразолия.

Анализируя условия, необходимые для того, чтобы видеть то изображение E4, которое представил Харрис в своих публикациях, нам стало ясно, что серия полос – это артефакт, неизбежно создаваемый плохими условиями выделения изоферментов из растительной ткани. Как известно, в клетках кукурузы находится глюкозид циклического гидроксамата DIMBOA, который гидролизует при измельчении растительной ткани с освобождением агликона, алкилирующего свободные сульфгидрильные и аминокислотные группы белков и ферментов. Поэтому при извлечении фермента эстеразы в буфере без защитной добавки полиамидного порошка, поливинилпирролидона или цистеина, он алкилируется по свободной аминокислотной группе, боковым лизиновым группам, а также по свободным сульфгидрильным группам.

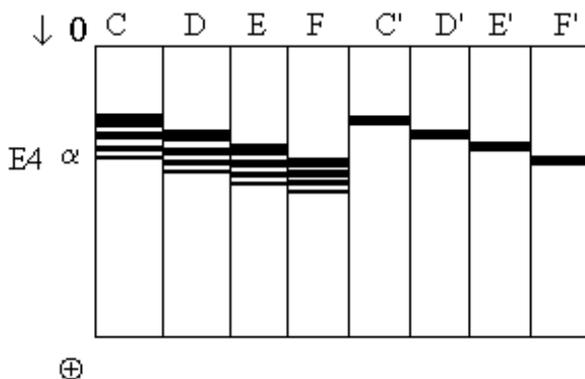


Рис.1. Участок геля с изображением аллелей E4 эстеразы из корней кукурузы в порядке увеличения их подвижностей к аноду при электрофорезе по Дэвису при pH 8,9: C<D<E<F (артефактные серии изоформ по Харрису [15,16] как результат алкилирования лизиновых остатков); C',D',E', F' – нативные аллели E4 эстеразы.

Одна молекула DIMBOA способна алкилировать две близлежащие аминокислотные группы лизиновых остатков эстеразы. В результате молекула эстеразы дискретно уменьшает свой положительный заряд на 2 единицы, что эквивалентно соответствующему увеличению её отрицательного заряда, и как результат – дискретному возрастанию её подвижности к аноду, с одновременным уменьшением её ферментативной активности. Такая алкилированная форма E4 эстеразы будет дискретно отличаться как по подвижности, так и по активности фермента от исходной её нативной формы и создавать артефакт наличия множественности существования этого изоэстеразы [3]. Поскольку E4 – один из самых малоподвижных изоферментов в щелочной буферной системе, то он имеет наименьший отрицательный заряд и, следовательно, наиболее обогащен аминокислотными группами и более сильно алкилируется. Появление при электрофорезе серии полос с градуально уменьшающейся интенсивностью по направлению электрофоретического движения алкилированного по лизиновым остаткам белка хорошо доказано в исследованиях на лизинбогатых гистонах [8]. Отсюда, и количество линий в каждой серии E4 эстеразы также отражает количество алкилированных лизиновых остатков E4 эстеразы, при которых эстераза еще проявляет свои ферментативные свойства.

Для доказательства этого мы измельчили корни кукурузы в трис-хлоридном буфере с добавлением анионита АН-15, представляющего высокомолекулярный полимер с боковыми аминогруппами. В результате на электрофореграммах эстеразы корней кукурузы E4 эстераза лишилась серии дискретных полос с убывающей по направлению к аноду ферментативной активностью и на геле появилась одна линия более высокой интенсивности. Эти аллели на рис.1 нами правильно обозначены как С', D', E', F'. Вместе с тем то, что аллели E4 эстеразы можно видеть в виде серии полос, помогло нам идентифицировать этот изофермент на общей картине энзимограммы на геле. Таким образом, появилась вторая опорная точка, в дополнение к известному положению E8 эстеразы.

Пользуясь выявленными нами условиями выделения и электрофореза эстеразы, мы изучили спектры инбредных линий кукурузы для идентификации их по аллелям E4 эстеразы (рис. 2). В результате установлено, что наименее подвижная аллель E4 эстеразы – аллель С, присутствует у инбредной линии Од-140. Аллель D присутствует у целого ряда инбредных линий: П-346, МК-159, МК-109; аллель E не обнаружена, аллель F присутствует у линий МК-302, МБ-201, ВИР-44, ВИР-38, П-502.

Исходя из теоретических положений учения о химических связях, мы разработали способ дополнительного разделения изоферментов эстеразы по субстратной специфичности на топоизомеры. Квантово-механическое рассмотрение сложноэфирной связи показывает, что между карбонильным и эфирным кислородами возможен резонанс валентных связей, и эти атомы расположены копланарно. В этой плоскости возникает цис- и транс-положение заместителей вдоль эфирной связи кислорода и углерода боковых заместителей кислотной и спиртовой составляющих молекулы сложного эфира. Эти цис- и транс-энантимеры молекул сложных эфиров разлагаются соответствующими топоизомерными ферментами эстераз, которые также можно идентифицировать изомерными ингибиторами.

Например, в нервной клетке вырабатываются два топоизомера по эфирной связи ацетилхолина: цис-форма и транс-форма, первая из которых имеет сродство к никотиновым рецепторам (блокируемым тубокурарином) синаптических мембран скелетных мышц, в то время как вторая (транс-форма) разлагается мускариновыми рецепторами мышц вегетативной системы, где располагаются, соответственно, топоизомерные к этим формам ацетилхолина ферменты ацетилхолинэстеразы, состоящие из димеров. В растительной ткани также находится фермент ацетилхолинэстераза, которая на геле после электрофореза до сих пор не идентифицирована. Были веские основания полагать, что E8 эстераза, присутствующая во всех тканях и являющаяся димером, может принадлежать к одной из топоизомеров ацетилхолинэстеразы растений. Поэтому E8 эстераза была подвергнута внимательному изучению.

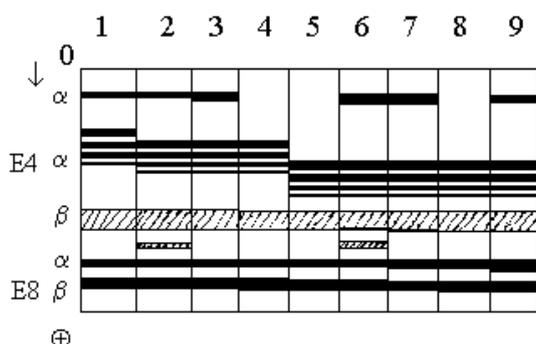


Рис.2. Аллели E4 эстеразы из корней инбредных линий кукурузы:

1. Од-140; 2. П-346; 3. Мк-159; 4. МК-109; 5. МК-302; 6. МБ-201; 7. ВИР-44; 8. ВИР-38; 9. П-502.

Слева греческими буквами обозначены топоизомерные формы эстераз.

Для идентификации топоизомеров мы использовали смесь из α - и β -нафтилацетатов в качестве субстратов для инкубации гелей. Для этого вносили уравновешенную по количеству мест азосочетаний смесь из них в пропорции 1:2, поскольку α -нафтол имеет 2 места сочетания с азокомпонентой, а β -нафтол – только одно.

В качестве копулирующей азокомпоненты вносили соль прочного синего ББ. При этом зоны изоферментов на геле, имеющие наибольшее сродство к α -нафтилацетату, окрашивались в черный цвет, а зоны изоферментов, имеющие большее сродство к β -нафтилацетату, окрашивались в красный цвет. Используя этот метод, мы смогли разделить изоферменты эстеразы по сродству к различным субстратам

на α - и β -изоформы. Так найдено, что E4 эстераза является α -топоизомером эстеразы кукурузы, в то время как вездесущая изоформа E8 является β -изоформой и может быть ацетилхолинэстеразой. Кроме E8 свойства ацетилхолинэстеразы проявляет не идентифицированный нами еще один непостоянно и слабо проявляющийся на геле изофермент, предшествующий по подвижности E8 эстеразе. Это дает дополнительный способ идентификации изоформ и аллелей на общем электрофоретическом спектре на геле.

Далее нами было изучено наследование E4 эстеразы различными гибридами кукурузы. При этом было показано, что E4 эстераза у гибридов представлена суммой серийных линий, и гибридной формы с промежуточной подвижностью не образуется, что подтверждает сведения Харриса о том, что E4 эстераза является мономером. При этом у гибридов функционируют обе аллели E4 эстеразы, так что содержание ферментов каждой аллели в них в 2 раза меньше, чем у инбредных линий. Поэтому серии линий в аллелях представлены меньшим числом, т. к. остальные линии находятся за пределами обнаружения ферментативной активности с субстратом нафтилацетатом (рис. 3). Таким образом, фермент E4 не образует гибридных димеров и поэтому гетерозигота представляет собой просто механическую смесь двух альтернативных молекулярных форм.

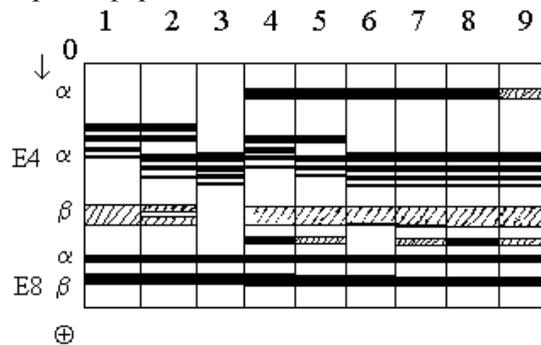


Рис. 3. Наследование E4 эстеразы в корнях гибридов кукурузы исходя из данных родительских инбредных линий. 1. Од-140; 2. Од-140х МК 302; 3. МК-302; 4. П-346; 5. П-346хП- 502; 6. П-502; 7. П-502хМБ-201; 8. МБ-201; 9. П-302х МБ-201.

При изучении различных ингибиторов метаболизма в процессе прорастания проростков кукурузы нами найдено, что ингибитор синтеза матричной РНК актиномицин Д не изменяет на геле спектра эстеразы из колеоптилей и корней проростков кукурузы. Таким же свойством обладает хлорамфеникол. Это показывает, что в процессе прорастания ферменты эстеразы синтезируются на уже предсуществующих в рибосомах матрицах РНК, поскольку при проращивании семян в растворе актиномицина Д в концентрации 1 мг/мл спектр эстеразы корней и колеоптилей не отличается от такового при проращивании семян в воде. На спектр не повлияли такие соединения, как квартазин, примулин, N-диметиламид янтарной кислоты.

Значительное усиление окраски E4 эстеразы на геле показал ремантадин, что позволяет считать его фактором, удлиняющим время пребывания матричной РНК на рибосомах. Ингибитор сульфгидрильных групп N-этилмалеинимид привел к разделению одиночной полосы E8 эстеразы на две (рис. 4).

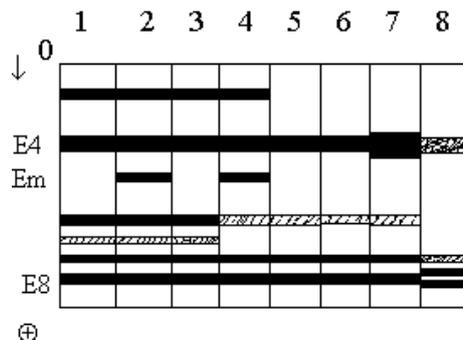


Рис.4. Изоферменты эстеразы колеоптиля: 1,2 – щитка; 3,4 – корня; 5,6 – проростка инбредной линии ВИР-44. Показано расположение мембранной формы эстеразы Em. Дорожка 7 представляет действие ремантадина, дорожка 8 – это действие N-этилмалеинимида.

Это доказывает, что E8 эстераза является гетеродимером. Для четкой демонстрации открытой нами мембранной формы эстеразы на этом геле, множественное возникновение серийных артефактных полос E4 эстеразы предотвращено введением в среду измельчения растительной ткани слабого анионита АН-15, намного большее количество свободных аминогрупп которого связали DIMBOA и защитили аминогруппы E4 эстеразы от алкилирования. В этих условиях E4 эстераза представлена одной нативной формой и её серийные линии не накладываются на полосы других изоферментов. Мембранная форма эстеразы Em является типичной формой α -эстеразы и присутствует в колеоптиле и щитке, но отсутствует в корнях. Наибольшая активность Em эстеразы проявляется в щитке. Изоформа Em солюбилизирована нами путем введения в среду измельчения растительной ткани детергентов дигитонина, холата, дезоксихолата натрия, додецилсульфата натрия. Наибольшую сохранность всех изоферментов проявляет дигитонин, однако при его применении на геле появляется слабый затеняющий фон. Холат и дезоксихолат натрия несколько снижают активность полос и также не свободны от затеняющего фона. Совершенно прозрачный гель с сохранением высокой активности Em дает применение детергента додецилсульфата натрия, однако при этом снижаются активности иных изоферментов, таких как E4 и E8.

Чувствительность обнаружения изоферментов в значительной степени определяется методикой обнаружения изоферментов на геле. Нами найдено, что с одним индоксилацетатом чувствительность определения изоферментов на геле ниже, чем с использованием нафтилацетата совместно с азокомпонентой. Но и этот метод является все же недостаточно чувствительным для обнаружения ферментов, находящихся в эндосперме кукурузы. В результате теоретического рассмотрения механизмов действия различных субстратов в ферментативных реакциях нами предложена новая субстратная смесь, состоящая из 1 мг/мл индоксилацетата и 0,1 мг/мл тетранитротетразолия синего в 0,05 М фосфатном буфере с pH 8,2. Эта смесь обладает чувствительностью обнаружения эстеразы в 5-10 раз большей, чем используемая до сих пор смесь из нафтилацетата и азокомпоненты. В новом методе соль тетразолия выступает в качестве окислителя белого индиго, появляющегося в результате действия эстеразы на индоксилацетат. Восстанавливаясь, тетразолий образует интенсивно окрашенный формазан, а индоксил, окисляясь, образует в свою очередь интенсивно окрашенное индиго. Отсюда результирующая окраска является их суммарным действием [2, 5]. В этой энзиматической реакции обе исходные компоненты смеси дают интенсивно окрашенные синим цветом нерастворимые осадки коллоидного индиго и мелкокристаллического формазана.

Интенсивность окраски формазана, образующегося при восстановлении тетразолия, намного превышает интенсивность окраски азокрасителей, образующихся в результате азосочетания нафтола с азокомпонентой. Максимальная чувствительность этой смеси достигается при отсутствии кислорода в инкубационной среде, куда гель помещается для окраски. Удобно использовать ванночку с раствором субстрата, выдержанным 2-3 часа в эксикаторе над поглотительным раствором из 10% смеси сульфита и карбоната натрия. Эффективность удаления кислорода возрастает, если в поглотительный раствор внести еще и гидрохинон. При использовании этой методики выявления изоферментов эстеразы на геле и при измельчении растительной ткани в присутствии анионита АН-15, нам удалось получить значительно более интенсивный спектр эстеразы на геле (рис. 5).

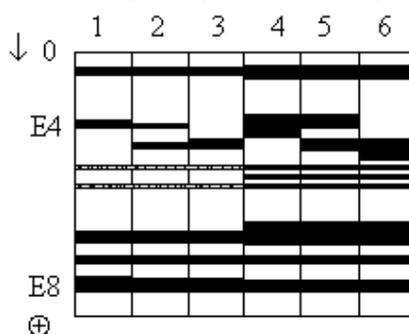


Рис. 5. Эстераза из первого листа проростков инбредных линий и гибрида Пионер: 1,2,3 – инкубация гелей в среде азосочетания; 4,5,6 – инкубация в индоксилацетате совместно с тетранитротетразолием синим; 1,4 – линия П-346; 2,5 – гибрид П-346хП-502; 3,6 – линия П-502.

Из рисунка 5 видно, что интенсивность окраски изоферментов намного выше в среде индоксилацетата с тетранитротетразолием синим. Преимущество нашей инкубационной среды наиболее сильно видно при электрофорезе белков из эндосперма прорастающих семян, где многократно увеличивается количество полос и их интенсивность.

Высокая подвижность E8 в этих условиях свидетельствует о том, что этот изофермент является кислым белком с большим количеством карбоксильных остатков. Значительно меньшее содержание боковых аминогрупп лизиновых остатков делает его устойчивым к инактивирующему ферментативную активность действию присутствующего в тканях кукурузы циклического гидроксамата ДИМБОА путем алкилирования им свободных аминогрупп белков и ферментов. При этом на геле это видно как по значительному уменьшению интенсивности окраски линий изоферментов, так и по их некоторой размытости, вызванной вариацией подвижности вследствие случайного изменения молекулярного веса изофермента и различной степени алкилирования его аминогрупп. Однако из-за малого содержания аминогрупп E8 эстераза почти не инактивируется, мало размывается и на геле видна резко и ярко.

Димерность E8 эстеразы и способ ее разделения на мономеры описаны в более ранней публикации [4]. Способ состоял из процедуры выращивания семян кукурузы в среде алкилятора свободных сульфгидрильных групп белков и последующего электрофореза. Так, при проращивании семян кукурузы в течение 6 дней в растворе, содержащем 1 мг/мл N-этилмалеинида, алкилирующего белки и ферменты по свободным SH группам, и последующем выделении фермента эстеразы и его электрофорезе в щелочной буферной системе, найдено раздвоение одиночной полосы E8 эстеразы на две. Однако при введении этого ингибитора в среду измельчения, на геле полоса E8 не раздваивалась. Это свидетельствует о том, что после окончания трансляции на рибосомах, мономеры E8 эстеразы некоторое время еще существуют со свободными SH-группами, когда они доступны для алкилирования, а затем димеризуются в последующем процессинге в цитоплазме путем образования между мономерами дисульфидной связи. Этот способ позволяет разделить E8 эстеразу на мономеры. При этом оказалось, что E8 эстераза является гетеродимером.

Выводы

Описан изофермент эстеразы E4 из корней проростков кукурузы. Показана локализация его на общем виде электрофоретически разделенных эстераз. Доказано, что серии полос E4 эстеразы, представленные в сообщении Харриса, являются артефактами и результатом алкилирования лизиновых остатков E4 эстеразы циклическим гидроксаматом ДИМБОА. Предложен способ идентификации топоизомеров эстеразы на общем геле. Все эстеразы методом специфического окрашивания разделены на α - и β -топоизомеры. Инбредные линии кукурузы идентифицированы по аллелям E4 эстеразы. Методом электрофореза гибридов из этих линий показано, что E4 эстераза является мономером и в гибридах представлена механической смесью аллельных изозимов. Описана мембранно-связанная эстераза Em, присутствующая в колеоптилях и щитках проростков кукурузы, продемонстрировано её расположение на геле. Приведен метод выделения этой эстеразы. Найден способ разделения димерной E8 эстеразы на мономеры и показано, что E8 эстераза является гетеродимером, связанным дисульфидной связью. В соответствии с таким строением и по субстратной специфичности E8 эстераза идентифицирована как ацетилхолинэстераза. Найдена более чувствительная субстратная смесь, состоящая из индоксилацетата и тетранитросинего тетразолия, для обнаружения изозимов эстераз на геле. Чувствительность ее более чем в 5 раз превышает чувствительность применявшейся до сих пор среды для инкубации гелей со способом выявления полос путем азосочетания.

Литература:

1. БАБИЦКИЙ, А.Ф., КАНИЩЕВА, Е.Ф. Особенности электрофореза изоферментов эстеразы кукурузы. В: *Селекционно-генетические методы повышения урожайности, качества и устойчивости полевых культур. Труды Кишиневского СХИ*. Кишинев, 1988, с.56-61.
2. БАБИЦКИЙ, А.Ф., ТОМА, З.Г. Высокочувствительный метод выявления зон эстеразной активности с индоксилацетатом и солью тетразолия на электрофореграммах белков эндосперма инбредных линий и гибрида кукурузы. В: *Analele Științifice ale Universității de Stat din Moldova. Seria: Științe chimico-biologice*. Chișinău, 2006, p.313-316.

3. БАБИЦКИЙ, А.Ф., ТОМА, З.Г. E4 эстераза инбредных линий и гибридов кукурузы. В: *Plant agrobiodiversity*. Chișinău, 2006, с.102-112.
4. БАБИЦКИЙ, А.Ф. Разделение на мономеры E8 эстеразы кукурузы. В: *Biotehnologii avansate – realizării perspective al III-lea Simpozion național cu participare internațională. TEZE, 24-25 octombrie 2013*. Chișinău, 2013, p.31.
5. БАБИЦКИЙ, А.Ф., ТОМА, З.Г. Высокочувствительный метод выявления эстеразы при электрофорезе белков эндосперма кукурузы. В: *Украинская научно-исследовательская станция карантина растений ИЗР НААН. Информационный бюллетень № 44: Фитосанитарная безопасность и контроль сельскохозяйственной продукции*. Бояны, 2013, с.20-24.
6. ПЕТРОВА, Н.Л., СУХОРЖЕВСКАЯ, Т.Б., ВОЙНИКОВ, В.К. Изменения изоферментов эстеразы у прорастающих семян кукурузы. В: *Оперативные информационные материалы СИФИБР*. Иркутск, 1983, с.25–28.
7. ПЕТРОВА, Н.Л., СУХОРЖЕВСКАЯ, Т.Б., ВОЙНИКОВ, В.К. Выявление изоферментов эстеразы у проростков кукурузы методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле. В: *Оперативные информационные материалы СИФИБР*. Иркутск, 1983, с.28-32.
8. РОЗОВ, С.М., БЕРДНИКОВ, А.В. Определение числа остатков лизина, положительного заряда и молекулярной длины гистонов H1 и H5 методом неполного сукцинилирования. В: *Биохимия*, 1982, т.47, № 8, с.1378-1385.
9. СИМИНЕЛ, В.Д., БАБИЦКИЙ, А.Ф. E1 эстераза инбредных линий и гибридов кукурузы. В: *IV съезд генетиков и селекционеров Молдавии*. Кишинев, 1986, с. 99.
10. ТУРБИН, Н.В., ПАЛИЛОВА, А.Н., ПИКО, В.Н. Электрофоретическое изучение набора ферментов в пыльниках кукурузы с цитоплазматической мужской стерильностью. В: *Генетика*, 1976, том 12, № 8, с.14-21.
11. ШЕЛПАКОВА, О.Л. О возможности использования изоферментов при изучении апомиксиса у растений. В: *Генетические основы селекции*. Ред. Д. В. Петров. Новосибирск, 1982, с. 81–85.
12. VABITSKY, A., TOMA, Z. Esteraza membranică la porumb. În: *Rezumatetele lucrărilor simpozionului național de fiziologia plantelor*. București, 1995, nr.13, p. 5.
13. BRAUN, A.H., ALLARD, D. Inheritance of isozyme differences among the inbred parents of reciprocal recurrent selection population of maize. In: *Crop Sci.*, 1969, vol.9, no1, p.72–75.
14. DAVIS, B.I. Disc electroforesis. II. Method and application to human serum proteins. In: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1964, vol.121, p.404-428.
15. HARRIS, J.W. The E4 esterase. In: *Maize Genet. Coop. New Letter*, 1966, vol. 40, p.53–56.
16. HARRIS, J.W. Location of the E4 esterase locus on chromosome 3. In: *Maize Genet. Coop. New Letter*, 1968, vol.42, p.72-74.
17. HENDRICH-SORBINO, E., CORDEIRO, A.R. Codominant isozyme alleles of markers of genetic diversity correlated with heterosis in maize. In: *Theoret. App. Genet.*, 1975, vol. 46, no4, p.197–199.
18. HUNTER, R.B., KONNENBERG, L.W. Isozyme characterization of corn inbreds and its relationship to single cross hybrid performance. In: *Canad. J. Genet. Cytol.*, 1971, vol.13, no4, p.649–655.
19. KLEASE, R.A., PHILIPS, R.L. Electrophoretic mutants as useful markers for chromosome abberations. In: *Genetics*, 1972, vol.72, no3, p.537-540.
20. NEWTON, K., GOODMAN, M., STUBER, C. Localization of esterase E 8 on the short arm of chromosome 3. In: *Maize Genet. Coop. New Letter*, 1982, vol. 56, p.154–155.
21. PEREZ, F.J., NIEMEYER, N.N. Reaction of DIMBOA with amines. In: *Phytochemistry*, 1989, vol.28, no7, p.1831-1834.
22. SCANDALIOS, I.G. Tissue specific isozyme variations in maize. In: *Journ. Hered.*, 1964, vol.55, no4, p.281-285.

Prezentat la 16.09.2013