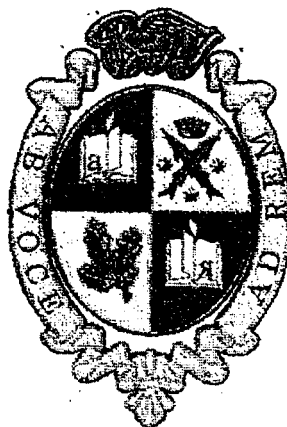
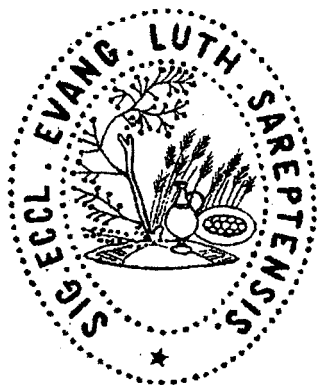
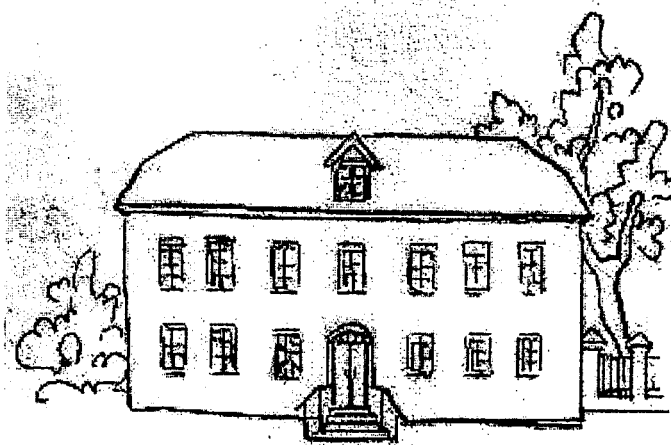


Волгоградский государственный университет
Кафедра Биологии
Музей-заповедник «Старая Сарепта»



**ПЕРВЫЕ
МЕЖДУНАРОДНЫЕ
БЕККЕРОВСКИЕ ЧТЕНИЯ
(27 – 29 мая 2010)**

Часть II



Волгоград
-2010-

Методом ОТ-ПЦР показано, что на стадии вылупления экспрессируется мРНК 5-HT_{3A}-рецептора *Xenopus laevis*, тогда как на стадиях неоплодотворенной яйцеклетки и поздней бластулы транскриптов этого гена не выявлено. Обсуждается возможность существования и функционирования в ходе онтогенеза различных форм 5-HT₃-рецепторов

Исследования нейромедиаторных веществ в эмбриогенезе, начатые в конце 50-х гг. XX в., продемонстрировали их участие в регуляции клеточного цикла зародышей, межбластомерных взаимодействий, а также эмбриональной моторики, гаструляции и т.д. (Бузников, 1967; Шмуклер, 1981). Однако молекулярно-биологические исследования рецепторного звена этих процессов начались сравнительно недавно и остаются малочисленными. В частности, экспрессия серотониновых рецепторов продемонстрирована в раннем эмбриогенезе *Caenorhabditis elegans* (Hamdan et al., 1999), дрозофилы (Colas et al., 1995) и мыши (Amireault, Dubé, 2005).

На ранних стадиях развития шпорцовой лягушки *Xenopus laevis* показаны присутствие и функциональная активность серотонина (Baker, 1965; Бузников, 1987). Антагонисты 5-HT₂- и 5-HT₃-рецепторов в период делений дробления воздействуют на процесс формирования лево-правой асимметрии зародышей (Fukushiro et al., 2005). Данная работа посвящена изучению экспрессии 5-HT₃-рецептора *X. laevis* на разных стадиях эмбриогенеза.

Работу проводили на лягушках *Xenopus laevis* (Daudin), эмбрионы получали оплодотворением *in vitro* (Sive et al., 1999). Стадии развития определялись по: Nieuwkoop, Faber, 1967. Материал собирали и фиксировали в пятикратном объеме RNAlater (Ambion) на стадиях неоплодотворенной яйцеклетки (стадия 0), поздней бластулы (стадия 9) и вылупления (стадия 34). Выделение тотальной РНК производили гуанидинтиоцианатным методом с использованием TRI Reagent (Sigma). Тотальную РНК обрабатывали ДНКазой (Силекс) и использовали для постановки ОТ-ПЦР. Специфические олигонуклеотиды подбирали в программе PrimerSelect (Lasergene) на основе международной базы данных NCBI. К последовательности мРНК 5-HT_{3A}-рецептора (NM_001086077) подобраны праймеры 5'-ACGGCCAAATGTCOOSTAACT-3' (прямой) и 5'-TGCCCAAAACAATAATAAGAAATA-3' (обратный), длина продукта 391 пн. В качестве положительного контроля использовали праймеры к мРНК орнитин декарбоксилазы *Odc1* (NM_001086698): 5'-GGGCAAAGGAGCTTAATGTG-3' (прямой) и 5'-CATTTGGCAGCATCTTCTTCA-3' (обратный), длина продукта 387 пн (Schuff et al., 2006). Для постановки ОТ-ПЦР использовали наборы «Синтез первой цепи кДНК (олиго(dT)₁₈)» и «Амплификация ДНК с Colored Taq полимеразой» (Силекс). ПЦР проводили на амплификаторе Eppendorf Mastercycler, параметры амплификации подбирали в зависимости от нуклеотидной последовательности специфических олигонук-

леотидов. По 15 мкл реакционной смеси использовали для электрофореза в 1% агарозном геле (агароза Helicon, буфер TAE), окрашенном бромистым этидием (Sigma, 0,5 мкг/мл геля), для оценки молекулярной массы продуктов использовали 100 бп ДНК Маркер (Медиген).

На рис. 1 представлены продукты, полученные методом ОТ-ПЦР с использованием мРНК, выделенной из неоплодотворённых яйцеклеток (стадия 0), поздних бластул (стадия 9) и вылупляющихся личинок (стадия 34), и специфических праймеров для мРНК *Odc1* и 5-HT_{3A}-рецептора. Продукт ПЦР-амплификации кДНК гена *Odc1* расчётной длины, выявленный во всех пробах, указывает на присутствие мРНК орнитин декарбоксилазы на данных стадиях эмбриогенеза, что подтверждает работоспособность полученных библиотек кДНК. Расчётный продукт ПЦР-амплификации кДНК гена 5-HT_{3A} был выявлен только на стадии вылупления, но не в неоплодотворённых яйцеклетках и поздних бластулах.

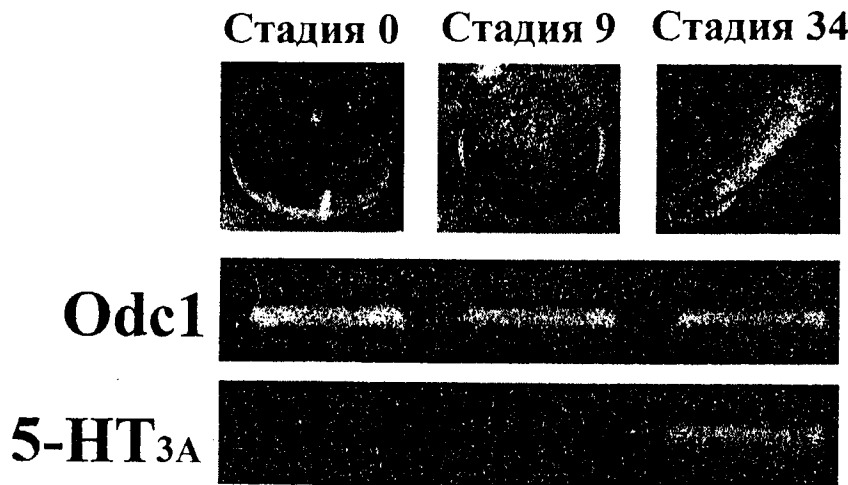


Рис. 1. Экспрессия рецептора 5-HT_{3A} в эмбриогенезе *Xenopus laevis*.

Экспрессия проанализирована методом ОТ-ПЦР с использованием тотальной РНК, выделенной из неоплодотворённых яйцеклеток, поздних бластул и вылупляющихся личинок (стадии развития по: Nieuwkoop, Faber, 1967). Орнитин декарбоксилаза (*Odc1*) использовалась в качестве положительного контроля.

Полученные данные свидетельствуют о том, что мРНК 5-HT_{3A}-рецептора экспрессируется на стадии вылупления *X. laevis*. Аналогичный результат был получен ранее при исследовании экспрессии рецептора 5-HT_{3A} в эмбриогенезе *Brachydanio rerio* (Nikishin et al., 2009).

Предьдущими исследованиями показано, что фармакологические характеристики медиаторных рецепторов на ранних стадиях эмбриогенеза существенно отличаются от таковых на поздних стадиях развития и у взрослых организмов (Бузников, 1987). Это дает основания предполагать и отличия их структуры. Наличие физиологических эффектов антагонистов 5-HT₃-рецепторов (Fukumoto et al., 2005) на стадиях 0 и 9 в отсутствие экспрессии исследуемого гена 5-HT_{3A}, может объясняться тем, что в раннем развитии функционируют иные варианты 5-HT₃-рецепторов. Дальнейшая работа будет посвящена изучению экспрессии серотониновых рецепторов в онтогенезе, в том числе их эмбриональных вариантов.

Литература. 1. Бузников Г.А. Низкомолекулярные регуляторы развития. М.: Наука, 1967. 265 с. 2. Бузников Г.А. Нейротрансмиттеры в эмбриогенезе. М.: Наука, 1987. 232 с. 3. Шмуклер Ю.Б. Межклеточные взаимодействия у ранних зародышей морских ежей. III. Влияние нейрофармакологических препаратов на тип дробления половинных зародышей // Онтогенез. 1981. Т. 12. № 4. С. 404–409. 4. Amireault P., Dubé F. Intracellular cAMP and calcium signaling by serotonin in mouse cumulus-oocyte complexes // Mol. Pharmacol. 2005. V. 68. № 6. P. 1678–1687. 5. Baker P.C. Changing serotonin levels in developing *Xenopus laevis* // Acta embryol. et morphol. exp. 1965. V. 8. № 3. P. 197–204. 6. Colas J.-F., Launay J.-M., Kellermann O., Rosay P., and Maroteaux L. Drosophila 5-HT₂ serotonin receptor: Coexpression with fushi tarazu during segmentation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 5441–5445. 7. Fukumoto T., Kenji I.P., Levin M. Serotonin Signaling Is a Very Early Step in Patterning of the Left-Right Axis in Chick and Frog Embryos // Current Biology. V. 15. P. 794–803. 8. Hamdan F.F., Undrin M.D., Abramovic M., Ribeiro P. Characterization of a novel serotonin receptor from *Caenorhabditis elegans*: cloning and expression of two splice variants // J. Neurochem. 1999. V. 72. № 4. P. 1372–1383. 9. Nieuwkoop P.D., Faber J. Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). North Holland, Amsterdam. 1967. 10. Nikishin D.A., Ivashkin E.G., Mikhaylov A.S., Shmukler Y.B. Expression of serotonin receptors during early embryogenesis // Simpler nervous systems IX East European Conference of the International Society for Invertebrate Neurobiology. St. Peterburg, Russia. September 9–13, 2009. Abstracts. P. 70. 11. Schuff M., Rössner A., Donow C., Kriechel W. Temporal and spatial expression patterns of FoxN genes in *Xenopus laevis* embryos // Int. J. Dev. Biol. 2006. V. 50. P. 429–434. 12. Sive H.L., Grainger R.M., Harland R.M. Early Development of *Xenopus laevis*. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999. 338 p.

SUMMARY. It was shown by RT-PCR assay that the 5-HT_{3A} mRNA of *Xenopus laevis* is expressed at the hatching stage, whereas not detected in eggs or late blastulae. The existence and functioning of various forms of 5-HT₃-receptors during ontogenesis are discussed.

ГОМОЛОГИЯ СТРУКТУРЫ И АНАЛОГИЯ ФУНКЦИИ ИНВЕРСИЙ ХРОМОСОМ У КРИПТИЧЕСКИХ ВИДОВ

ANOPHELES MESSEAE

Ю.М. Новиков

Томский государственный университет, e-mail: novikov@bia.tsbu.ru

Исследованы связи хромосомных инверсий с размером тела, плодовитостью и скоростью развития особей А и В криптических видов *Anopheles messeae* Fall. Обнаружена связь между суммарной длиной инвертированных сегментов хромосом самок и продолжительностью развития их потомков. Не выявлено влияния инверсий на признаки их носителей. Самки В более плодовиты, чем А (p = 0,001). Различий по плодовитости носителей разных инверсий внутри А и В не найдено. Выявленное ранее на смешанной совокупности особей прибли-