

Московская гимназия на Юго-Западе №1543
Лаборатория эволюционной геномики НИИ
физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ

Связь пролактина с родительским поведением у
Amatitlania nigrofasciata

М. Давитадзе
Ф. Ли
М. Трегубенко

Научный руководитель:
к.б.н. Т.В. Неретина

Москва
2019

Оглавление

Список терминов и сокращений	1
Введение	2
Материалы и методы	4
Подготовительная часть	5
Лабораторная часть	6
Результаты	11
Моногамность <i>A.nigrofasciata</i>	11
Концентрация РНК	12
Проведение электрофореза	12
Секвенирование по Сэнгеру	16
Обсуждение	17
Заключение	17
Благодарности	17
Список используемой литературы	17
Интернет-ресурсы	19
Приложение	19
Поведение мальков <i>A.nigrofasciata</i>	19
Филогенетическое дерево	20

Список терминов и сокращений

Prl — пролактин.

Prl-lh — пролактин-подобный гормон.

A.nigrofasciata — *Amatitlania nigrofasciata/Cichlasoma nigrofasciatum/convict cichlid/zebra cichlid*.

Аликвота — часть образца, сохраняющая все его свойства.

Гомогенизировать — довести до однородного состояния.

Интеркалирующие агенты, интеркаляты — молекулы, способные встраиваться (интеркалировать) между двумя комплементарными парами оснований в двуспиральной ДНК или РНК.

Катадромный организм — организм, живущий в пресной воде, и мигрирующий из пресной воды в солёную при нересте.

Клеточный дебрис — это органические отходы, остающиеся после смерти клеток в результате апоптоза или лизиса.

Половой мономорфизм — отсутствие явных различий между полами.

Солюбилизация — проникновение молекул низкомолекулярного вещества, нерастворимого в какой-либо жидкости, внутрь находящихся в ней мицелл.

Супернатант — надосадочная жидкость.

Флуориметр — прибор, позволяющий определить концентрацию вещества в пробе по уровню возбуждаемого в ней свечения, разновидность спектрофотометра.

Элюция, элюирование — извлечение вещества из твердого носителя вымыванием его подходящим растворителем.

Введение

Пролактин (prl) — многофункциональный полипептидный гормон, присутствующий у всех позвоночных, за исключением бесчелюстных рыб (Whittington и Wilson, 2013). Пептидная цепь пролактина состоит из приблизительно 190-200 аминокислот у разных видов (Wallis, 1992) (у *A.nigrofasciata* из 206 аминокислот). Ген пролактина включает четыре экзона и пять интронов (Huang et al., 2009).

В отличие от млекопитающих, у которых есть только одна форма пролактина, у рыб и некоторых других позвоночных есть пролактин-подобный гормон (prl-lh) или несколько других подобных гормонов. Их также называют prl-1 и prl-2 соответственно. Prl-lh имеет высокую степень гомологии с ранее известным prl и способен активировать пролактиновый рецептор. Как правило, prl-2 содержит меньше аминокислот, чем prl-1. Также в отличие от prl-1 всех рыб, в составе которого имеется лишь два дисульфидных мостика, у prl-2 рыб присутствуют три. Основная секреция prl у всех животных осуществляется гипофизом (Huang et al., 2009).

Prl имеет более трёхсот известных функций, охватывающих поддержание водно-солевого баланса, роста и развития, функционирования эндокринной системы и обмена веществ. Он влияет на мозг и поведение, участвует в репродукции и иммунорегуляции (Bole-Feysot et al., 1998).

Prl наиболее известен своими функциями, связанными с размножением млекопитающих: он необходим для осуществления лактации, также он стимулирует рост и развитие молочных желёз (Bachelot и Binart, 2007; Bole-Feysot et al., 1998). Исследования функций пролактина в основном фокусировались на млекопитающих, тогда как в размножении таких животных, как рыбы, амфибии, рептилии и птицы, prl также играет важную роль. (Bachelot и Binart, 2007; Bole-Feysot et al, 1998; Hoar, 1965; Schradin and Anzenberger, 1999; Ziegler, 2000).

У рыб prl наиболее известен как осморегуляторный гормон, в частности, как гормон, позволяющий рыбам адаптироваться к пресной воде (Pierce et al., 2007). О репродуктивной же функции prl рыб известно довольно немного. Во многих исследованиях, изучавших влияние prl на рыб, была показана положительная корреляция между секрецией пролактина и проявлением родительского поведения.

Fiedler (1962) показал, что инъекции prl млекопитающих усиливали обмахивание (некоторые рыбы обмахивают икру плавниками, способствуя притоку свежей воды) у *Crenilabrus ocellatus*. Инъекции небольших доз prl млекопитающих усиливали

обмахивание у *Symphysodon aequifasciatus* и у *Pterophyllum scalare* (Blum, 1974). У некоторых других цихлид не было замечено обмахивания после инъекций prl (*Cichlasoma severum*, *Aequidens latifrons* и *Astronotus ocellatus*) (Blum и Fiedler, 1965), но было замечено снижение агрессии, уменьшение питания и успокоение. Влияние prl, по-видимому, зависит от вводимой дозы: (Smith и Hoar, 1967) не смогли найти связь prl и обмахивающего поведения у трёхиглой колюшки (*Gasterosteus aculeatus*). Однако, Molenda и Fiedler (1971) выяснили, что низкие дозы prl усиливали обмахивание у самцов трёхиглой колюшки, тогда как высокие дозы, близкие к тем, что использовали Smith и Hoar, уменьшали обмахивание у самцов с гнёздами. Ещё одни исследователи (Bender et al., 2008) обнаружили, что у неразмножающихся самок *Neolamprologus pulcher* более высокий уровень prl в отличие от размножающихся. Это был единственный случай, когда была найдена обратная связь между содержанием prl и заботой о потомстве

Копание, поведение, наблюдаемое при заботе о потомстве у *Aequidens latifrons*, также может стимулироваться пролактином (Blum, 1974). Инъекции l-дофа, который считается ингибитором prl, уменьшил обмахивание у *A. nigrofasciata* (Fiedler et al., 1979). L-дофа и апоморфин подавляли родительское поведение у пар *Hemichromis bimaculatus*.

Blum и Fiedler (1974) обнаружили чувствительные к пролактину нейроны в переднем мозге *Lepomis gibbosus*, *Astronotus ocellatus* и *Tilapia mariae*; видов, у которых есть обмахивание. Напротив, у ряда тилапий, инкубирующих икру во рту, у *Idus idus* и *Carassius auratus*, не проявляющих заботу о потомстве, prl оказывал лишь незначительный эффект на активность переднего мозга.

Prl также стимулирует увеличение количества клеток, вырабатывающих эпидермальную слизь. Этот эффект ярко выражен у дискусов, у которых этот секрет обычно является дополнительной подкормкой для молодняка (Blum и Fiedler, 1965; Blum, 1974). Такие же изменения в поведении и секреции слизи были вызваны у *Symphysodon* паралактином, пролактином костистых рыб (Blum, 1974).

Мы выбрали в качестве объекта исследования вид *Amatitlania nigrofasciata*, так как у него есть ярко выраженная забота о потомстве со стороны обоих родителей, и при этом он не является катадромным видом. Благодаря этому трудностей в разделении осморегуляторной функции prl и его влияния на проявление заботы о потомстве не предполагается. Таким образом, на выбранном нами объекте можно лучше изучить роль prl в заботе о потомстве.

В нашей работе мы смотрели, происходит ли экспрессия prl у нерестящихся и не нерестящихся рыб, чтобы выяснить его функцию и понять, играет ли он роль при нересте. Мы надеемся, что наше исследование поможет лучше понять механизм заботы о потомстве у рыб и роль пролактина в нём.

Цель работы: определение наличия/отсутствия экспрессии пролактина у нерестящихся и не нерестящихся цихлид — представителей вида *Amatitlania nigrofasciata*.

В нашей работе мы смотрели, экспрессируется ли пролактин у нерестящихся и не нерестящихся рыб, чтобы выяснить его функцию и понять, играет ли он роль при нересте. Интереснее всего было бы сравнить уровни экспрессии у разных групп рыб, но для этого требовалось провести ПЦР в реальном времени, что выходит за рамки нашей работы. Мы надеемся, что наше исследование поможет лучше понять механизм заботы о потомстве у рыб и роль пролактина в нём.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Отработка методики разведения и размножения
2. Получение препаратов мозга экспериментальных рыб
3. Отработка методики выделения РНК из полученных препаратов и постановки обратной транскрипции
4. Построение множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей гена *prl* у представителей класса костистых рыб и сравнение экзон-интронной структуры.
5. На основании полученного выравнивания написание праймеров для постановки ПЦР
6. Амплификация фрагмента транскрипта *prl* с помощью ПЦР с матрицы кДНК с применением написанных праймеров и визуализация полученных результатов
7. Секвенирование по Сэнгеру полученных продуктов ПЦР

Материалы и методы

Для изучения связи пролактина и проявления родительского поведения у рыб мы выбрали вид *A. nigrofasciata*, представителя семейства Cichlidae. Вид известен проявлением во время нереста заботы о потомстве со стороны обоих родителей и проявлением территориальности.

Для комфортного существования виду необходимы условия с температурой +26°C– +29°C (Wisenden B. D., 1995) и выше, подвижной водой и наличием укрытий. (Donald Conkel, 1993)

Всего в ходе работы мы использовали 9 рыб: 2 самца и 3 самки в период размножения, а также 2 самца и 2 самки вне нереста (табл. 1).

табл. 1 Рыбы, использованные в эксперименте

Номер рыбы	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Пол	М	Ж	М	М	Ж	Ж	М	М	Ж
Откуда (№ аквариума)	1	1	2	2	Прямо из магазина	2	2	2	2
Нерест	+	+	-	-	-	-	+	+	+

Подготовительная часть

Для содержания рыб мы использовали два аквариума с длиной/шириной/высотой 80/35/40 и 75/32/40 см и заполняли их на 90–100 литров. Перед заселением *A.nigrofasciata* мы подготавливали воду с помощью раствора с бактериями «Tetra» по инструкции фирмы, мы добавляли по 5 мл бактерий на каждые 6 л воды в аквариуме. Дно заполняли 14–16 кг мелкого грунта диаметром 3–5 мм. Также в каждом аквариуме мы установили фильтр «Fan filter 2 plus» и нагреватель «Comfort zone gold 200» от фирмы Aquael. На последнем установлена температура +28°C.

Раз в неделю мы меняли приблизительно 30 л аквариумной воды на ту, которую предварительно отстаивали в течение 3-7 дней. Чтобы убрать осевшую за время подготовки пыль, мы пропускали воду через марлю.

Взрослых рыб мы кормили мини-гранулами для цихлид производителя «Tetra» 1-2 раза в день. Для новорождённых-недельных мальков нам приходилось измельчать сухие гранулы до состояния порошка. Следующие полтора месяца жизни мальки получали 2-3 раза в день порцию микропланктона «Prime», которая составляет около 100 мг на 1 малька. Нами была проведена попытка кормления микропланктоном от «ЭкоКорм». Но тот образовывал крупные комочки, измельчить которые молодые рыбы не имели возможности. По достижению мальками возраста в 1,5 месяца мы перевели их на сухой корм.

При кормлении взрослых рыб из аквариума №2 мы столкнулись с рядом проблем. Главенствующая пара рыб отгоняла остальных особей на край аквариума, из-за чего им была недоступна основная часть корма. В статье (Gagliardi-Seeley J. at al., 2009) приводилась гипотеза о том, что мелкие самцы в соседстве с крупными набирают вес медленнее, чем они это делали бы в одиночном аквариуме, из-за испытываемого стресса. Мы в свою очередь предполагаем, что отчасти недобор веса можно объяснить и невозможностью подчинённых рыб добраться до корма без боя с более крупными и агрессивными сородичами.

A.nigrofasciata достигает полового созревания в 4-6 месяцев (Noakes D.L.G., 1991). Тогда же становится возможным определить пол, так как брюшко у самок дикого типа приобретает местами рыжеватую или жёлтую окраску. Неполовозрелые рыбы мономорфны.

A.nigrofasciata не нуждается в особых условиях для нереста, кроме отсутствия более крупных представителей вида и наличия укрытий. Но в аквариуме последнее, как выяснилось в ходе наблюдений желательнее, но не обязательно. Рыбы 1 и 2, образовавшие пару, самостоятельно создали укрытия. На протяжении примерно пяти дней они переносили во рту грунт из двух соседних углов аквариума, пока не добрались до дна. При этом рыбы держались рядом, хотя до того, как они начали проявлять подобное поведение, они перемещались независимо друг от друга. Также при вхождении в нерест особи приобрели более контрастную окраску.

Первоначально образовавшиеся пары в аквариуме №2 также предпочитали держаться рядом. При приближении чего-либо (особи своего вида, тени от руки

наблюдателя и т.п.) рыбы проявляли агрессию: резкоплыли навстречу предполагаемой угрозе.

От отложения икры до вылупления мальков, как правило, проходит 2-3 дня. После отложения икры, самки предпочитали находиться в гнёздах, подгоняя свежую воду плавниками к своему потомству. Самцы патрулировали территорию (подробнее о поведении — см. Приложение).

Лабораторная часть

Препарирование рыб

Для дальнейшего исследования нам было необходимо извлечь мозг из имеющихся особей. Все инструменты для препарирования, а именно глазные ножницы и глазной пинцет, мы предварительно обрабатывали антисептиком.

Мы декапитировали рыб. Затем для получения доступа к черепу мы срезали ткани с верхней части головы. После чего, аккуратно введя ножницы через спинномозговой канал и разрезав черепную коробку, мы раздвигали края черепа. Таким образом и был получен доступ к мозгу рыбы.

Извлечённый с помощью пинцета мозг был незамедлительно помещён в пробирку с лизирующим кислым буфером, содержащим гуанидин. Количество буфера было таким, какое покрывает всю поверхность материала. Когда мы непосредственно не использовали полученные образцы, они хранились в пробирках с буфером в холодильнике при температуре -80°C .

Выделение РНК

Для того, чтобы выделить РНК, в первую очередь нам было необходимо получить однородную массу. Мы добились этого, растерев вручную лабораторным пестиком мозги. От гомогенизированного образца мы взяли только 0,1 часть. Остальное мы поставили вновь храниться в холодильнике на -80°C . На такой низкой температуре РНКазы не работают, поэтому материал останется невредим.

Для работы мы взяли лишь небольшую часть образца, потому что использование большей доли материала вероятность, что в будущем совыделится ДНК, повышается. А нас интересует именно экспрессия генов, а не их наличие. Далее мы работали в ламинаре, мы выделяли РНК тризольным способом из образцов согласно протоколу (Евроген). При работе с образцами 4-9 мы использовали фермент ДНКазы, чтобы очистить их от геномной ДНК. До следующих этапов работы мы хранили РНК в холодильнике при $+4^{\circ}\text{C}$.

Определение концентраций РНК

Для определения концентрации полученной РНК мы использовали флуориметр Qubit от компании Invitrogen, предварительно добавив интеркалирующий краситель Qubit® RNA HS Assay Kit. Мы провели элюцию водой, не содержащую РНКаз.

Чтобы приготовить раствор для флуориметра, мы предварительно разводили буфером краску в 200 раз: 199 мкл буфера и 1 мкл краски. Полученную смесь мы перемешивали на приборе Vortex. Конечный раствор содержал 197 мкл буфера с краской и 3 мкл образца РНК.

Синтез кДНК

Для дальнейшей работы нам было необходимо амплифицировать полученный материал. Но фермент, участвующий в ПЦР не способен взаимодействовать с интересующей нас РНК. Поэтому с помощью обратной транскриптазы фирмы Eurogen на основе выделенных ранее РНК мы синтезировали кДНК.

Праймеры для обратной транскрипции брались рандомные декануклеотидные, обратная транскриптаза MMLV, буфер с dNTP. Полученную в ходе работы кДНК по протоколу синтеза (Евроген) мы хранили на -20°C .

Выделение ДНК

Наша цель – выявить наличие или отсутствие экспрессии prl. Для того, чтобы убедиться, что при ПЦР с нашими праймерами не поднимется геномная ДНК, мы провели контроль с ДНК, выделенной из плавника.

Выделение ДНК из плавника мы проводили с помощью набора реагентов Diatom™ DNA Prep100 согласно протоколу. Метод основан на использовании Лизирующего реагента с гуанидинтиоцианатом, который предназначен для лизиса клеток, солюбилизации клеточного дебриса, а также для денатурации клеточных нуклеаз. В присутствии реагента ДНК активно осаждается на NucleoS-сорбенте, откуда его можно легко смыть, предварительно отмыв от белков и солей спиртовым раствором.

Для того, чтобы воспользоваться методом, нам было необходимо довести плавник до однородной массы. Чтобы сделать это, мы использовали в течение 500 секунд с частотой 300 движений в секунду гомогенизатор TissueLyser II от фирмы QIAGEN.

ПЦР

После получения необходимых ДНК нужно провести ПЦР, чтобы амплифицировать материал. В противном случае его будет слишком мало для работы.

ПЦР нужно проводить осторожно, чтобы никак не загрязнить материал. Поэтому при подготовке к ПЦР при использовании пипетки мы брали носики с фильтром. ПЦР мы проводили согласно протоколу проведения ПЦР (Евроген) на амплификаторе “Thermofisher”, 96×0,2 мл/микропланшет, алюминиевый блок, Veriti, во второй раз “Bio-Rad”, 96×0,2 мл, T100 Thermal Cycler. Мы использовали смесь Screen mix, в состав которой входят высокопроцессивная Taq ДНК-полимераза, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов, Mg^{2+} , ПЦР буфер, красители.

табл. 2 Цикл ПЦР

	первый раз	цикл (35 раз)			охлаждение
температура	+95°C	+95°C	+60°C	+72°C	+4°C
время (сек)	60	15	15	60	до остывания

Для проведения ПЦР помимо фермента, матрицы, буфера и нуклеотидов, необходима затравка для ДНК-полимеразы: прямые и обратные праймеры. Мы не пользовались приложениями, которые создают их автоматически, потому что часто такие праймеры в итоге не подходят.

Прежде всего мы взяли в базе данных NCBI последовательность мРНК пролактина *A.nigrofasciata*. Чтобы узнать её экзонно-интронную структуру, мы провели выравнивание в программе Mega X двумя способами: Muscle algorithm и ClustalW algorithm между интересующей нас мРНК и геномной ДНК пролактина *Maylandia zebra*, близким родственником изучаемого нами вида, т.к. геномной ДНК *prl A.nigrofasciata* в базе NCBI нет. Это было необходимо, чтобы написать праймеры на стыке экзонов и избежать синтеза геномной ДНК при ПЦР. Ещё одним способом избавиться от геномной ДНК при ПЦР является использование фермента ДНКазы сразу после выделения РНК. Алгоритмы показали нам разные места вероятного нахождения интронов.

Провести выравнивание было необходимо, так как в дальнейшем мы амплифицировали кДНК, чтобы впоследствии было возможным провести электрофорез и сделать выводы о наличии или отсутствии экспрессии пролактина у *A.nigrofasciata*. Для того, чтобы точно амплифицировалось не ДНК, мы брали участки мРНК для праймеров, которые находились на стыке двух экзонов.

Мы подбирали такие последовательности для праймеров, чтобы они не были комплементарны самим себе или своей паре и их температура отжига равнялась 60°C ($\pm 2^\circ\text{C}$). Для этого мы использовали программу OligoCalc. После мы проверяли выбранные нами последовательности на наличие перекрытий с другими генами *A.nigrofasciata* с помощью ресурса Nucleotide BLAST. Лучшим вариантом является полное отсутствие перекрытий с другими мРНК этого вида. Но совпадения последовательности нуклеотидов (или query cover) имелись во всех случаях. Мы выбирали такой праймер, у которого query cover с генами других белков была меньше, чем у остальных, и так, чтобы в одной паре прямого и обратного праймера не было перекрытий с одними и теми же генами.

Для обратного праймера мы брали последовательность, комплементарную выбранному нами участку мРНК *prl*.

Таблицы праймеров

Чтобы посмотреть, насколько нуклеотидная последовательность написанных нами праймеров совпадает с участками генов *A.nigrofasciata*, мы воспользовались

ресурсом Nucleotide BLAST. С его помощью мы узнали количество генов, которые могут амплифицироваться с нашими праймерами. Это количество обозначено числами в столбце BLAST. В столбце отражен максимальный процент комплементарности праймера и гена, исключая ген prl. Для обратных праймеров мы проверяли комплементарную им последовательность.

табл. 3 Прямые праймеры.

Назв. форвард	Последовательность 5'-3'	Длина	T отжига	BLAST
prl_2f	AGCCGTCCCCATCAGCGA	18	60,8	101, max 50%
prl_3f	CCATAGACAAGGAACGCGCA	20	60,5	118, max 80% (1)
prl_4f	CTCTCACTTCCCTCCTTTTGG	21	61,2	238, max 85%
Cichl_Prl_F	GCTGGACTCTCACTTCCCTCCT	22	65,8	104, max 95%

табл. 4 Обратные праймеры

Назв. реверс	Последовательность 3'-5'	Длина	T отжига	BLAST
prl_2r	GTCACAGGAGAGTTTGCACAC	21	61,2	128, max 90% (2)
prl_3r	CAACAGAAGGAGTCACAGGAG	21	61,2	135, max 85% (1)
prl_4r	CCTCCTCATGTTTGTCTCTG	21	61,2	200, max 90%
Cichl_Prl_R	ATCCGACTCTGGTACTTGAAGTG C	24	65,2	100, max 79%

табл. 5 Фрагменты последовательности ДНК prl *A.nigrofasciata*, ограниченные парами праймеров

Последовательность 5'-3'	Длина	BLAST
AGCCGTCCCCATCAGCGACCTGCTCGAGCGAGCCTCTCAACACTCTGACA AACTGCACTCGCTCAGCACAATGCTGACCCAGGAGCTGGACTCTCACTTC CCTCSTTTTGGCAGGGTGAGCATGCCGCGTCCCTCGATGTGCCACACCTC CGCTCTGCAGACGCCATAGACAAGGAACGCGCACTTCAAGTACCAGAGT CGGATCTGCTGTCCCTGGCTCGCTCTTTGCTCCAAGCCTGGTTCGGATCCT CTCGTCGTCTGTCTCCTCCGCTAACAGCCTCCCTCACCCAGCCCAAAG CAGCATATCCAACAAGATCCAAGAGATACAGGAGTACTCCAAAAACCTCA AAGATGGCCTGGATATACTATCTAGCAAGATGGGTCCAGCTGCTCAGACC ATCACTACACTGCCCTACACAGAAAGCAACAACATCGGCCAGGACAAGAT ТАССАААСТGCTGTCTCTGCTTTTCGTCGGGACTCTCACAAGATTGACAGTT TCCTGAAAAGTCTCTGCGCTGCCGGGCAGCAAAGATCGAACCCGAAATGTGC TGAAGCGTGAGCGGCCAGCTTGACCCTGTGGGGAGATCGTTCTTAAAGCT TGTATTGCTTACCAAGTAAAGAATGCTCACGCTAGGAATTTACTATCTTA GATATTATCCAGTTTGCTAATTAGTAAGCATCATGAAGTTTCAGAGGACA	839	1 PRL

AACATGAGGAGGAATTTAAAGGCCTATGCACACAGGAAGTCATCCTTTGT TTGATATTTTAAAGCACAGTCCACAAAACATTGATCATAGTGTCCACTGGT CACTAGGGAGGAAAATCTGTGTGCAAACCTCTCCTGTGAC		
CCATAGACAAGGAACGCGCACTTCAAGTACCAGAGTCGGATCTGCTGTCC CTGGCTCGCTCTTTGCTCCAAGCCTGGTTCGGATCCTCTCGTTCGTCCCTGTC CTCCTCCGCTAACAGCCTCCCTCACCCAGCCCAAAGCAGCATATCCAACA AGATCCAAGAGATACAGGAGTACTCCAAAAACCTCAAAGATGGCCTGGAT ATACTATCTAGCAAGATGGGTCCAGCTGCTCAGACCATCACTACACTGCC CTACACAGAAAGCAACAACATCGGCCAGGACAAGATTACCAAACCTGCTGT CCTGCTTTTCGTGCGGACTCTCACAAGATTGACAGTTTCTGAAAGTCCTG CGCTGCCGGGCAGCAAAGATCGAACCCGAAATGTGCTGAAGCGTGAGCGG CCAGCTTGACCCTGTGGGGAGATCGTTCTTAAAGCTTGTATTGCTTACCA AGTAAAGAATGCTCACGCTAGGAATTTACTATCTTAGATATTATCCAGTT TGCTAATTAGTAAGCATCATGAAGTTTTCAGAGGACAAACATGAGGAGGAA TTAAAGGCCTATGCACACAGGAAGTCATCCTTTGTTTGATATTTTAAAGC ACAGTCCACAAAACATTGATCATAGTGTCCACTGGTCACTAGGGAGGAAA ATCTGTGTGCAAACCTCTCCTGTGACTCCTTCTGTTG	686	1 PRL
CTCTCACTTCCCTCCTTTTGGCAGGGTGAGCATGCCGCGTCCCTCGATGT GCCACACCTCCGCTCTGCAGACGCCCATAGACAAGGAACGCGCACTTCAA GTACCAGAGTCGGATCTGCTGTCCCTGGCTCGCTCTTTGCTCCAAGCCTG GTCGGATCCTCTCGTCTCCTGTCCCTCCGCTAACAGCCTCCCTCACCC CAGCCCAAAGCAGCATATCCAACAAGATCCAAGAGATACAGGAGTACTCC AAAAACCTCAAAGATGGCCTGGATATACTATCTAGCAAGATGGGTCCAGC TGCTCAGACCATCACTACACTGCCCTACACAGAAAGCAACAACATCGGCC AGGACAAGATTACCAAACCTGCTGTCCTGCTTTCGTGCGGACTCTCACAAG ATTGACAGTTTCTGAAAGTCTGCGCTGCCGGGCAGCAAAGATCGAACCC CGAAATGTGCTGAAGCGTGAGCGGCCAGCTTGACCCTGTGGGGAGATCGT TCTTAAAGCTTGTATTGCTTACCAAGTAAAGAATGCTCACGCTAGGAATT TACTATCTTAGATATTATCCAGTTTGCTAATTAGTAAGCATCATGAAGTT TCAGAGGACAAACATGAGGAGG	622	1 PRL
GCTGGACTCTCACTTCCCTCCTTTTGGCAGGGTGAGCATGCCGCGTCCCT CGATGTGCCACACCTCCGCTCTGCAGACGCCCATAGACAAGGAACGCGCA CTTCAAGTACCAGAGTCGGAT	121	1 PRL

Электрофорез

После проведения ПЦР мы провели электрофорез. Для этого необходима основа — гель. Мы делали его из агарозы. На 100 г буфера мы добавляли 1,5 г агарозы, тщательно перемешивали и прогревали до полного растворения агарозы, при этом не доводя до кипения, чтобы в геле не образовывались пузыри. При остывании смеси до такой температуры, что из колбы переставал идти пар, мы добавляли 6 мкл бромистого этидия. После этого мы заливали массу в ванночку, куда вставляют гребёнки. Из-за них гель застыл с несколькими рядами лунок для того, чтобы раскапать в них образцы. Когда гель полностью застыл, мы переложили его в устройство для электрофореза.

После этого мы капали в лунки по 3 мкл каждого образца. Также мы добавили в каждую из линий маркер длин ДНК — вещество, которое позволяет определить длину фрагментов, которые позже будут видны под UV (мы использовали GeneRuler 100 bp). Её нужно 2 мкл.

Сделав все приготовления, мы приступили к самому электрофорезу. Закрыли крышку так, чтобы правильно присоединить электроды, и подали напряжение 180 В в течение 15 минут — времени, за которое наш образец не успел бы полностью пройти сквозь гель.

Секвенирование по Сэнгеру

Для очищения полученного ранее ПЦР-продукта перед секвенированием нужно взять 3 мкл образца, 20 мкл смеси для переосаждения (этанол 96%-ный 43,8 мл, ацетат аммония 5М 1,5 мл, очищенная вода 4,7 мл). Далее поставить в центрифугу на 9-12 мин при 2600 об./мин. Супернатант аккуратно вытряхнуть из пробирки. Снова центрифугировать 2 мин при 300 об./мин, но крышкой вниз. Затем нужно просушить при температуре +40°C 15 мин.

Секвенирование требует 0,3 мкл реагента BigDye, 1,9 мкл буфера, 1 мкл праймера (прямой и обратный праймер для 2 отдельных реакций), 6,8 мкл воды. Если на стенках есть капли, то их нужно сбросить вниз, прокрутив на центрифуге пару секунд. Пробирки нужно поставить в амплификатор на программу “BigDye Std”.

табл. 6 Программа работы амплификатора для проведения секвенсовой реакции

	первый раз	цикл 25 раз			охлаждение
температура	+96°C	+96°C	+50°C	+60°C	+4°C
время	01:00	00:10	00:05	04:00	до полного остывания

После секвенсовой реакции нужно добавить 50 мкл смеси для переосаждения. Оставить всё на 2-20 мин на столе при комнатной температуре. Затем поставить в центрифугу на 15 мин при 4680 об./мин. Потом нужно вытряхнуть супернатант и центрифугировать 2 мин при 300 об./мин в перевёрнутом виде. После этого нужно просушить при температуре +40°C 20 мин. А потом раскапать по 12 мкл формамида в каждую пробирку и поставить в секвенатор.

Результаты

Моногамность *A.nigrofasciata*

A.nigrofasciata принято считать моногамным видом, однако, в ходе нашей работы выяснилось, что при определённых условиях самец в период нереста может сформировать несколько «пар».

Во время проведения работы из-за отсутствия достаточного количества аквариумов для воссоздания идеальных условий эксперимента, шесть особей (три самки и три самца) были помещены в один аквариум.

В аквариуме №2 на протяжении двух с половиной дней обитали одновременно три пары. В первый вечер после заселения никто из рыб не проявлял признаков агрессии. Однако, уже на следующий день самый крупный самец вынудил всех рыб, кроме его самки, прятаться или за фильтром в углу аквариума, или у поверхности воды рядом с подогревателем. Что примечательно, главенствующая самка гнала со своей территории других самок, если те приближались.

Второй по размеру самец по началу нахождения в аквариуме старался отгонять от своего угла всех, кроме его пары, но по окончании второго дня перестал проявлять территориальность.

Для лабораторной части нашей работы нам было необходимо извлечь мозг рыб. И сперва мы хотели препарировать нерестящихся рыб. Но в ходе транспортировки мы допустили ошибку. Вместо одной из самок, переставших проявлять признаки нерестового поведения, мы взяли главенствующую самку. Это стало ясно, так как самец агрессивно реагировал на оставленную в аквариуме особь.

Из-за того, что рыб очень сложно отличать, мы приняли решение вернуть всех самок обратно в аквариум и, исходя из их поведения, позже определить среди них главенствующую.

Но на следующее утро нами было обнаружено следующее. Самец отгонял с основной территории аквариума лишь одну самку, с двумя другими он находился поблизости. На пятый день после изъятия рыб из аквариума обе самки с разницей в 12-18 часов отложили икру.

После этого самки предпочитали не покидать свои укрытия. При приближении самца, патрулирующего территорию, они делали резкий выпад в его сторону, отгоняя. Последний не оказывал сопротивления. Пример такого поведения, при котором самки находятся в гнезде с потомством, а самцы на некотором расстоянии, можно найти в результатах в статье (Wisenden B. D., 1995)

Поведение мальков *A.nigrofasciata*

Длина новорождённых мальков составляла около 1 миллиметра. В то же время, за исключением глаз, их тело было почти полностью прозрачным. На фоне грунта выделить малька было проблематично. Из-за этого факта мы не знаем точной даты вылупления мальков пары из аквариума №1. Самки из другого аквариума отложили икру в заранее подготовленные нами светлые глиняные горшочки, благодаря чему мы без труда заметили появление потомства у наших рыб.

После того, как мы обнаружили мальков пары из аквариума №1, мы не сразу изъяли родительских особей. Они находились с потомством ещё пять дней и на протяжении этого времени проявляли заботу. Обе особи сгоняли мальков в построенные гнёзда, от которых не отплывали сами. С наступлением ночного времени мальки плотно сгруппировывались в углу аквариума (в объём не более 1 см³) В дневное

время взрослые рыбы периодически «выгуливали» мальков, то есть выводили из на относительно открытое пространство аквариума вне гнезда.

После того, как мы изъяли рыб 1 и 2 из аквариума, мальки на протяжении первой недели предпочитали кучно находиться в гнезде. На второй половине первой недели они начали совершать попытки всплыть вверх, прежде они могли перемещаться только вдоль дна.

Что примечательно, мальки из аквариума №2, от которых мы удалили родителей практически сразу, не проявляли настолько выраженной тяги к уплотнению группы.

Примерно за месяц у потомства рыб 1 и 2 выработался рефлекс. При резком приближении чего-либо с дистанции около 5 метров к аквариуму, мальки всплывали к поверхности. Но такое поведение рыбы проявляли только в том случае, если вокруг аквариума некоторое время не было никакого активного движения объектов.

Концентрация РНК

Работа с флуориметром. Концентрация РНК особей после выделения.

21,4 нг/мкл — особь 1 (не использовали фермент ДНКазы для очистки от геномной ДНК)

$2,22 \times 10^{-3}$ нг/мкл — особь 4

$3,08 \times 10^{-3}$ нг/мкл — особь 5

$5,68 \times 10^{-3}$ нг/мкл — особь 6

$4,24 \times 10^{-3}$ нг/мкл — особь 7

$2,83 \times 10^{-3}$ нг/мкл — особь 8

$3,32 \times 10^{-3}$ нг/мкл — особь 9

Проведение электрофореза

В ходе нашей работы мы провели 3 разных электрофореза. Они отличались использованными праймерами.

Маркер длин ДНК размечен по схеме (рис. 1).

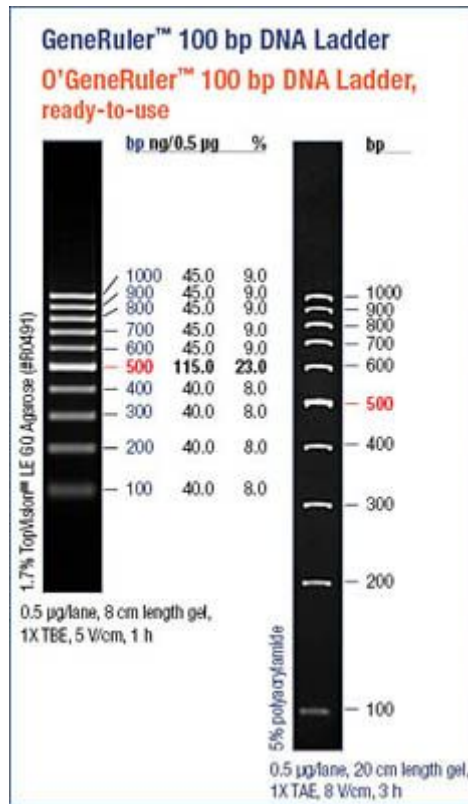


рис. 1 Разметка для маркера длин ДНК

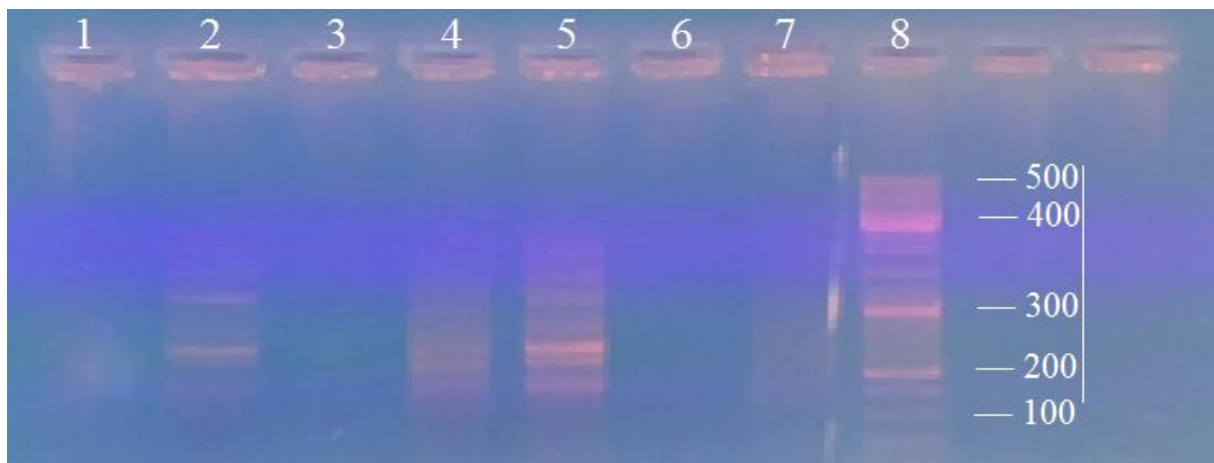


рис. 2 Электрофорез №1

1) пустая лунка, 2) РНК особи 1 без обратной транскриптазы (безревертазный контроль), 3) вместо ПЦР-продукта была добавлена вода (отрицательный контроль), 4) - кДНК особи 2, 5) - РНК особи 2, 6) - отрицательный контроль, 7) - кДНК особи 1, 8) - маркер длин ДНК. Использовались праймеры prl_2f и prl_2r.

В лунках №4 и №7 не видно чёткой линии, которая должна была обозначать амплифицированный участок prl, на который мы писали праймеры. Это означает, что написанная нами пара праймеров не подходит. Мы могли бы предположить, что у *A.nigrofasciata* отсутствует ген prl, но в статье (Munchrath L.A. et al., 2010) выделили этот ген, секвенировали и занесли в базу данных NCBI.



рис. 3 Электрофорез №2

ПЦР-продукт, полученный из: 1) кДНК особи 1, 2) кДНК особи 4, 3) кДНК особи 5, 4) кДНК особи 6, 5) кДНК особи 7, 6) кДНК особи 8, 7) кДНК особи 9, 8) геномной ДНК, выделенной из плавника. В двух последних лунках 9) отрицательный контроль, 10) маркер длин ДНК. Использовались праймеры pr1_4f и pr1_4r.

Аналогично электрофорезу №1, результаты электрофореза №2, рис.3 показывают, что эта пара праймеров не подходит. На фотографии нет светящихся полос на геле, кроме маркера длин ДНК.



рис. 4 Электрофорез №2

ПЦР-продукт, полученный из: 1) кДНК особи 1, 2) кДНК особи 4, 3) кДНК особи 5, 4) кДНК особи 6, 5) кДНК особи 7, 6) кДНК особи 8, 7) кДНК особи 9, 8) геномной ДНК, выделенной из плавника. В двух последних лунках 9) отрицательный контроль, 10) маркер длин ДНК. Использовались праймеры pr1_3f и pr1_3r.

Аналогично электрофорезу №1, результаты электрофореза №2, рис.4 показывают, что эта пара праймеров не подходит.



рис. 5 Электрофорез №2

ПЦР-продукт, полученный из: 1) кДНК особи 1, 2) кДНК особи 4, 3) кДНК особи 5, 4) кДНК особи 6, 5) кДНК особи 7, 6) кДНК особи 8, 7) кДНК особи 9, 8) геномной ДНК, выделенной из плавника. В двух последних лунках 9) отрицательный контроль, 10) маркер длин ДНК. Использовались праймеры p_{rl_2f} и p_{rl_2r}.

Данный электрофорез говорит о том, что эта пара праймеров не подходит для проведения ПЦР. На агарозном геле под UV виден только маркер длин ДНК.



рис. 6 Электрофорез №2

ПЦР-продукт, полученный из: 1) кДНК особи 1, 2) кДНК особи 4, 3) кДНК особи 5, 4) кДНК особи 6, 5) кДНК особи 7, 6) пустая лунка, 7) кДНК особи 8, 8) кДНК особи 9, 9) геномной ДНК, выделенной из плавника, 10) пустая лунка. В двух последних лунках 11) отрицательный контроль, 12) маркер длин ДНК. Использовались праймеры 28s для того, чтобы проверить полученной кДНК. Ген 28s — высококонсервативная последовательность у эукариот, поэтому ПЦР с него обязательно должна пройти, если мы правильно выделили РНК и синтезировали кДНК. Это положительный контроль на неё.

Проведённый электрофорез подтверждает, что ПЦР с 28s праймерами прошла. Это доказывает, что мы получили качественный материал.

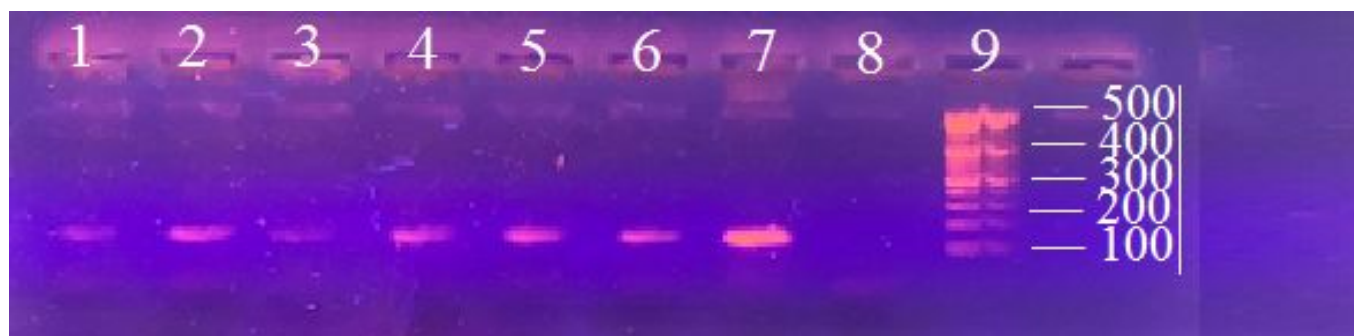


рис. 7 Электрофорез №3

ПЦР-продукт, полученный из: 1) кДНК особи 4, 2) кДНК особи 5, 3) кДНК особи 6, 4) кДНК особи 7, 5) кДНК особи 8, 6) кДНК особи 9, 7) геномной ДНК, выделенной из плавника. В последних двух лунках 8) отрицательный контроль, 9) маркер длин ДНК. Использовались праймеры *Cichl_Prl_R* и *Cichl_Prl_F*.

Полученный электрофорез доказывает, что эта пара праймеров подходит. Получена заданная нами длина последовательности (между 200 и 100 нуклеотидов на линейке).



рис. 8 Электрофорез №3

ПЦР-продукт, полученный из: 1) кДНК особи 4, 2) кДНК особи 5, 3) кДНК особи 6, 4) кДНК особи 7, 5) кДНК особи 8, 6) кДНК особи 9, 7) геномной ДНК, выделенной из плавника. В последних двух лунках 8) вместо ПЦР-продукта была добавлена вода (отрицательный контроль), 9) маркер длин ДНК. Использовались праймеры 28s.

Данный электрофорез — контрольный, как и электрофорез №2, рис.6. С его помощью мы проверили качество наших ПЦР-продуктов.

Секвенирование по Сэнгеру

Чтобы убедиться в том, что полученная нами нуклеотидная последовательность — это *Prl*, мы провели секвенирование по Сэнгеру. Полученная после секвенирования последовательность нуклеотидов соответствует последовательности *Prl Amatitlania nigrofasciata* из базы данных NCBI.

Обсуждение

Мы выявили, что экспрессия пролактина идет у *A. nigrofasciata* как во время нереста, так и без него. Это означает, что prl помимо предполагаемой функции стимуляции заботы о потомстве регулирует и другие процессы, происходящие у всех рыб, что подтверждает известные данные. Мы не можем сказать, играет ли prl особую роль при нересте, поскольку не знаем интенсивность экспрессии prl у нерестящихся и нерестящихся рыб.

В качестве продолжения нашей работы было бы интересно провести ПЦР в реальном времени, чтобы выявить концентрацию ДНК, кодирующей prl, и сравнить ее у рыб при нересте и нерестящихся рыб. Если у нерестящихся рыб экспрессия prl окажется интенсивнее, можно будет утверждать, что prl играет роль при нересте. Также идея для дальнейшей работы — эксперименты с ингибитором prl бромкриптином. Если особи изменят привычное поведение, то prl всё же связан с ним.

Заключение

В ходе нашей работы мы выявили, что prl экспрессируется у всех исследуемых нами рыб как нерестящихся, так и нерестящихся. Также нами были получены праймеры для ПЦР. Мы научились разводить рыб, строить выравнивание нуклеотидных последовательностей, писать праймеры для ПЦР. Нами была отработана методика выделения РНК, постановка обратной транскрипции и ПЦР. Также мы научились проводить электрофорез и секвенировать полученные ПЦР-продукты.

Благодарности

Мы благодарим С.М. Глаголева за организацию практики и нашего научного руководителя Т.В. Неретину, а также всех сотрудников лаборатории, в которой мы работали. Благодарим за предоставленные аквариумы Н.С. Мюге и биокласс гимназии 1543. Отдельное спасибо за помощь с лабораторной частью нашей работы Н.С. Павловой, Е.С. Глаголевой и Максиму Григорьяну. Спасибо Анастасии Столяровой за помощь с Mega X и деревьями и Е.П. Альтшулера за предоставленную рецензию.

Список используемой литературы

- Bachelot A., Binart N. Reproductive role of prolactin. *Reproduction*, 133 (2), 361-369, Feb 2007
- Bender N., Taborsky M., Power D.M. The role of prolactin in the regulation of brood care in the cooperatively breeding fish *Neolamprologus pulcher*. *Journal of experimental zoology*, 309A, 515-524, 2008
- Blum V. Die Rolle des Prolaktins bei der Cichlidenbrutpflege. *Fortschr. Zool.*, 22, 310-333, 1974
- Blum V., Fiedler K. Hormonal control of reproductive behavior in some cichlid fish. *General and Comparative Endocrinology*, 5, 186-196, 1965

- Bole-Feysot C., Goffin V., Edery M., Binart N., Kelly P.A. Prolactin and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in prolactin receptor knockout mice. *Endocrin.Rev.*, 19, 225-268, 1998
- Conkel D. Cichlids of North & Central America. TFH Publications, 1993
- Fiedler K. Die Wirkung ocellatus (Forskål). *Zool. Jahrb., Abt. Anat. Zool. Physiol. Tiere*, 69, 609–620, 1962
- Fiedler, K. Hormonale Kontrolle des Verhaltens bei Fischen. *Fortschr. Zool.*, 22, 268-309, 1974
- Fiedler K., Brüss R., Christ H. and Lotz-Zoller R. Behavioural effects of peptide hormones in fishes. In: "Brain and Pituitary Peptides" (W. Wuttke, A. Weindl, K. H. Vogt and R. R. Dries, eds.), 65–70. Karger, Basel., 1979
- Gagliardi-Seeley J., Leese J., Santangelo N., Itzkowitz M. Mate choice in female convict cichlids (*Amatitlania nigrofasciata*) and the relationship between male size and dominance. *Journal of ethology*, 27 (2), 249-254, 2009
- Hoar W.S. Comparative physiology: hormones and reproduction in fishes. *Annu. Rev. Physiol.*, 27, 51-70, 1965
- Huang X., Hui M.N.Y., Yun L., Yuen D.S.H., Zhang Y., Chan W.Y., Lin H.R., Cheng S.H., Cheng C.H.K. Discovery of a Novel Prolactin in NonMammalian Vertebrates: Evolutionary Perspectives and Its Involvement in Teleost Retina Development. *PLoS One*, 4, 61-63, 2009
- Molenda W. and Fiedler K. Die Wirkung von Prolaktin auf das Verhalten von Stichlings (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Tierpsychol.*, 28, 463-474, 1971
- Munchrath L.A., Matthews B.J. and Hofmann H.A. Neural basis of paternal care in a monogamous cichlid, *Amatitlania nigrofasciata*. Institute of Cell and Molecular Biology, University of Texas at Austin, 2401 Speedway, Austin, TX 78705, USA, unpublished, 2010
- Noakes D.L.G. Ontogeny of behaviour in cichlids.; In: Keenleyside M.H.A(ed.) *Cichlid Fishes: Behaviour, Ecology and Evolution*, Chapman and Hall, London, 209-224, 1991
- O'Connell L.A, Matthews B.J., Hofmann H.A. Isotocin regulates paternal care in a monogamous cichlid fish. *Hormones and Behavior*, 61, 725-733, 2012
- Pierce A.L., Fox B.K., Davis L.K., Visitacion N., Kitahashi T., Hirano T., Grau E.G. Prolactin receptor, growth hormone receptor, and putative somatolactin receptor in Mozambique tilapia: tissue specific expression and differential regulation by salinity and fasting. *Gen Comp Endocrinol.*, 154, 31–40, 2007
- Rentier-Delrue F., Swennen D., Prunet P., Lion M. and Martial J.A. Tilapia prolactin: molecular cloning of two cDNAs and expression in *Escherichia coli*. *DNA*, 8 (4), 261-270, 1989
- Ronald G. Old, Rayna M. Harris, Dean A. Hendrickson, Hans A. Hofmann. Arginine vasotocin and androgen pathways are associated with mating system variation in North American cichlid. *Hormones and behaviour*, 64, 44-52, 2013
- Schradin C., Anzenberger G. Prolactin, the Hormone of Paternity. *News Physiol Sci.*, 14, 223-231, 1999

- Smith R. J. F. and Hoar W. S. The effects of prolactin and testosterone on the parental behaviour of the male stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *Anim. Behav.*, 15, 342-352, 1967
- Wisenden B.D., Lanfranconi-Izawa T.L., Keenleyside M.H.A. Fin digging and leaf lifting by the cichlid fish *Cichlasoma nigrofasciatum*: examples of parental food provisioning. *Animal Behaviour*, 49 (3), 623-631, March 1995
- Wallis M. The expanding growth hormone/prolactin family. *J. Mol. Endocrinol.*, 9, 185–188, 1992
- Whittington C. M., Wilson A. B. The role of prolactin in fish reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 191, 123–136, 2013
- Wisenden B.D. Reproductive behavior of free-ranging convict cichlids, *Cichlasoma nigrofasciatum*. *Environmental Biology of Fishes*, 43, 121-134, 1995
- Wisenden B.D. Female convict cichlids adjust gonadal investment in current reproduction in response to relative risk of brood predation. *Canadian Journal of Zoology*, 71 (2), 252-256, 1993
- Ziegler T.E. Hormones associated with non-maternal infant care: a review of mammalian and avian studies. *Folia Primatol.*, 71, 6–21, 2000

Интернет-ресурсы

База данных NCBI: <http://ncbi.nlm.nih.gov>

Протокол для набора Diatom™ DNA Prep100:

http://www.galartdiag.ru/files/diatom_dna_prep_100.pdf

Программа OligoCalc: <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>

Nucleotide BLAST:

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome

Протокол выделения РНК (Евроген): <http://evrogen.ru/kit-user-manuals/extractRNA.pdf>

Протокол проведения ПЦР (Евроген):

<http://www.evrogen.ru/kit-user-manuals/ScreenMix.pdf>

Протокол синтеза кДНК (Евроген): http://evrogen.ru/kit-user-manuals/MMLV_SK022.pdf

Программа “BigDye Std”:

http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_081527.pdf

Последовательность мРНК prl *A. nigrofasciata*;

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/295821924>

Приложение

Филогенетическое дерево

Мы построили филогенетическое дерево по гену prl в программе Mega X по алгоритму Maximum likelihood.

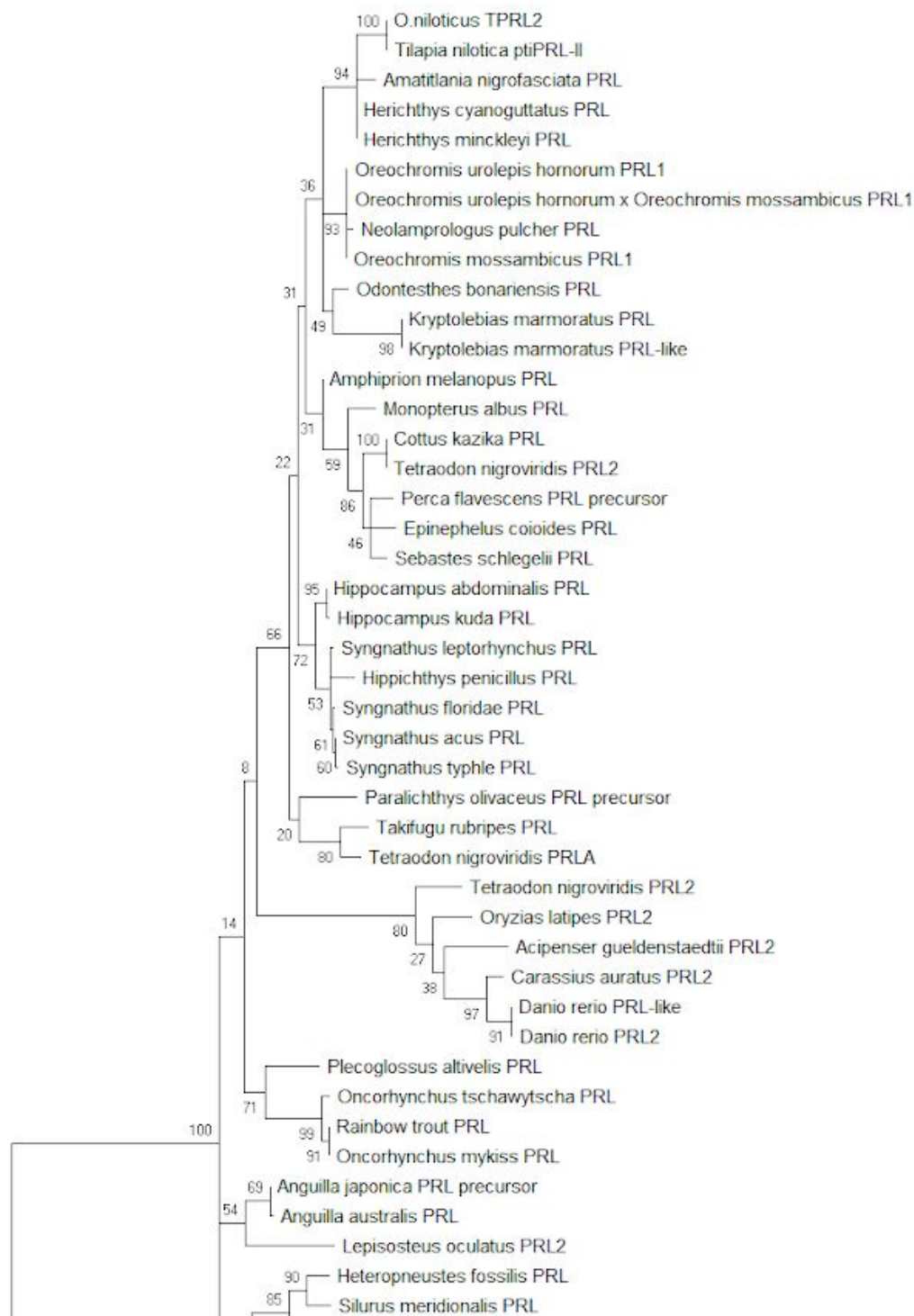


рис. 9 Филогенетическое дерево

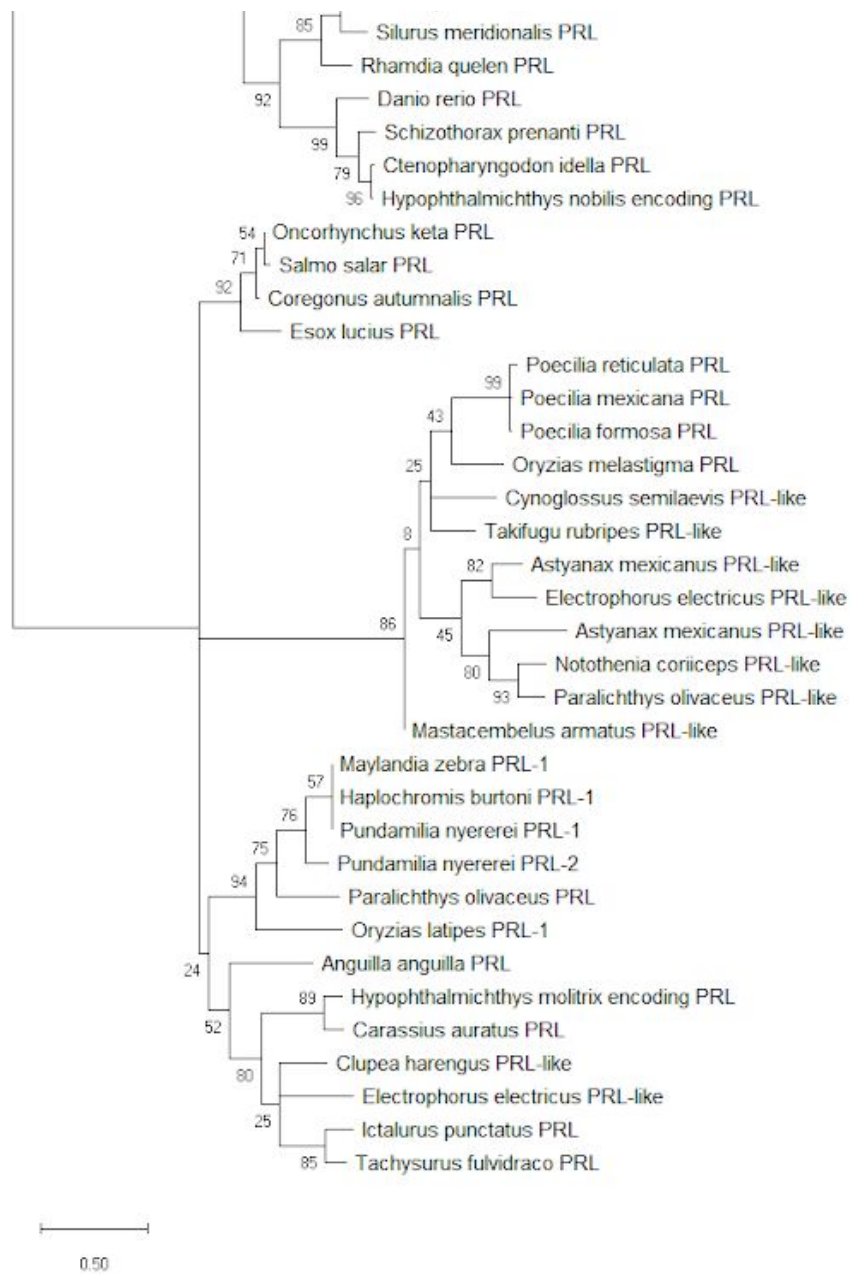


рис. 10 Филогенетическое дерево