

А. М. Андреева, Р. А. Федоров, Е. А. Шилова, О. Ю. Слынько, А. К. Гришанин

## ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ФРАКЦИОННОГО СОСТАВА НЕФЕРМЕНТНЫХ ВОДОРАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ В РАННЕМ РАЗВИТИИ ВЕСЛОНОГО РАКА *CYCLOPS KOLENSIS*\*

Проведен анализ белкового разнообразия, степени дифференциации водорастворимых белков по заряду и молекулярной массе в электрофорезе, а также динамики относительного содержания высоко- и низкомолекулярных белков на ранних стадиях онтогенеза пресноводного веслоного рака *Cyclops kolensis*, особенностью эмбрионального развития которого является диминуция хроматина (ДХ) во время 4-го деления дробления. Выявлена четкая согласованность динамики формирования белкового состава *C. kolensis* с основными этапами его развития — дробление, личинки и половозрелые дефинитивные копеподы. На этапе дробления фракционный состав белков был стабилен, максимальное относительное содержание белка приходилось на три желточных фракции, в составе которых обнаружены несколько резервных пластических белков в виде белковых ассоциатов. У личинок количество водорастворимых белков больше, чем у зародышей, а относительное содержание белка в основной желточной фракции было минимальным. Максимальное разнообразие водорастворимых белков выявлено у дефинитивных копепод.

Яйца веслоного рачка *C. kolensis* содержат мало желтка, дробление яиц голобластическое полное. Особенность эмбрионального развития *C. kolensis* состоит в прохождении во время 4-го деления дробления диминуции хроматина. Процесс ДХ у представителя пресноводных ракообразных вида *C. kolensis* был достаточно подробно изучен рядом исследователей [1–9]. Известно, что в ДХ вовлечены белки. О данных белках известно крайне мало, и эти сведения касаются других групп животных. Одним из таких белков является ядерный белок аскарид CDAF1, связывающийся с поврежденной ультрафиолетом двухцепочечной ДНК [10]. Предполагается, что этот белок действует как вспомогательный фактор в ходе эксцизионной репарации в эмбриональных клетках.

Сведения о белках копепод, участвующих в ДХ, отсутствуют. О водорастворимых неферментных белках копепод в раннем развитии известно немного. Основной желточный белок яиц копепод липовителлин образуется из белка-предшественника вителлогенина Vg [11, 12], похожего по структуре и свойствам на белок позвоночных [13–15]. Экспрессия генов Vg выявлена не только у самок взрослых копепод, но в незначительной степени и у личинок [16, 17]. Кроме липовителлина в составе желтка обнаружены ассоциированные с ним белки, выполняющие, предположительно, запасную функцию, например, белок паразитической копеподы *Lepeophtheirus salmonis* LsYAP — yolk-associated protein [18]. На науплиальных стадиях этой копеподы выявлен высокий уровень активности генов, сопоставимый со взрослыми копеподами [19].

Для выработки подходов к решению проблемы участия белков копепод в ДХ на

\* Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 10-04-01376а).

© А. М. Андреева, Р. А. Федоров, Е. А. Шилова, О. Ю. Слынько, А. К. Гришанин, 2012

начальном этапе работы может быть целесообразен анализ фракционного состава водорастворимых белков зародышей у видов, имеющих и не имеющих в раннем развитии ДХ. К первым относится пресноводная копепода *C. kolensis*, ко вторым — *C. insignis*. Такое исследование позволит получить общие и пока отсутствующие представления о формировании белковой микросреды зародыша на начальных стадиях развития и приблизиться к пониманию механизмов диминуции хроматина, касающихся ее инициации. Поэтому на начальном этапе работы мы анализировали динамику формирования фракционного состава и в целом разнообразие водорастворимых белков, формирующих белковую микросреду в эмбриогенезе пресноводной копеподы *C. kolensis*.

### Материалы и методы исследования

Материал был собран в апреле 2009 и 2010 гг. в Марьинском пруду на Воробьевых горах и отобран для работы в виде зародышей, личинок (науплеусы) и взрослых копепод *C. kolensis* согласно разработанному ранее методу [3]. Зародыши отбирали на стадиях: 1–2, 4, 5–6 и 7–10-го делений дробления; личинки — на 1-й науплиальной стадии; дефинитивные копеподы — самцы и оплодотворенные и неоплодотворенные самки. Для консервации материала использовали стандартные методики [20–22]: эмбрионы, личинки и взрослые копеподы помещали в пробирки с раствором 20%-ной сахарозы, пробирки замораживали и хранили при  $-18...-20^{\circ}\text{C}$  не более месяца. После размораживания проб водорастворимые белки оказывались в результате криогенного лизиса клеток в растворе сахарозы. В полученной после центрифугирования надосадочной жидкости измеряли концентрацию белка с помощью микробиуретового метода [23]. В разных образцах она составила от 10 до 13 мг/мл. Белки надосадочной жидкости анализировали с помощью диск-электрофореза в 5%-ном и 7,5%-ном ПААГ [24, 25] в градиенте концентраций ПААГ 5–40% [26], в 11%-ном ПААГ с 8М мочевиной [26] и SDS-ПААГ [27]. В электрофоретическую лунку вносили от 20 до 40 мкл пробы в зависимости от электрофоретической системы. Для расчета величин молекулярной массы (ММ) белков зародышей, личинок и взрослых копепод в неденатурирующих условиях в качестве маркеров молекулярной массы использовали полимерные формы сывороточного альбумина человека (ЧСА) (67, 134, 201, 268, 335 кД и выше) и овальбумина (ОА) (45, 90, 135, 170 кД и выше); в ПААГ с мочевиной — ЧСА, ОА и миоглобин (Мг) 17 кД; в SDS-ПААГ — маркер PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas) (11, 17, 28, 36, 55, 72, 95, 130, 250 кД). Для расчета величин ММ и относительного содержания белков использовали программный пакет “OneDscan”.

### Результаты исследования и их обсуждение

**Дифференциация водорастворимых белков зародышей, личинок и дефинитивных копепод *C. kolensis* в диск-электрофорезе.** Основными белками зародышей являются загруженные в оогенезе матери желточные белки. На всех стадиях дробления на электрофореграмме выделялась одна доминирующая желточная фракция с  $R_f$  0,45 и две с меньшим содержанием белка ( $R_f$  0,25 и 0,53) (рис. 1). Общее количество белковых фракций в период дробления не менялось и сохранялось примерно на одном уровне — 6, однако, по мере развития относительное содержание отдельных фракций менялось существенно. Так, доля доминирующей желточной фракции на

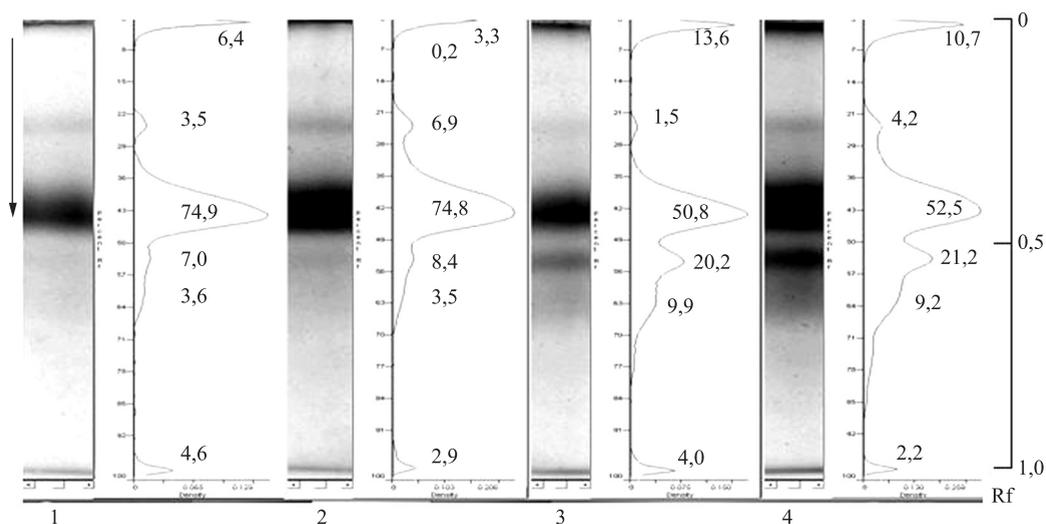


Рис. 1. Электрофореграммы и денситограммы водорастворимых белков зародышей *C.kolensis* на стадиях 1–2-го (1), 4-го (2), 5–6-го (3) и 7–10-го (4) делений дробления

Вертикальная стрелка указывает направление диск-электрофореза. Rf — шкала электрофоретической подвижности белков от 0,0 до 1,0. Цифры на денситограммах обозначают относительное содержание соответствующих белковых пиков (в %).

первых делениях дробления (1–2-е и 4-е деления) достигала максимальных показателей — 74,9%, а к концу делений снижалась до 50,8–52,5%, доля другой желточной фракции с Rf 0,53 нарастала с 7 до 21,2% (см. рис. 1).

Количество белковых фракций у личинок, как показано на электрофореграмме, было больше (до 15 компонентов), чем у зародышей, что приближало их ко взрослым копеподам (рис. 2). У личинок, отобранных в 2009 г., доля доминирующей желточной фракции была низкой — 9,2% (Rf 0,45), доля фракции с Rf 0,25, наоборот, была выше, чем у зародышей — 21,6%, доля фракции с Rf 0,53 составила 6,3%. У личинок 2010 г. эти фракции были представлены в следовых количествах (0,2, 1,4, 0,2% соответственно) (см. рис. 2). Такие отличия можно объяснить условиями среды, прежде всего, температурой и, соответственно, разной скоростью утилизации материнских белков личинками.

#### **Дифференциация водорастворимых белков копепод по молекулярной массе.**

В градиенте концентраций ПААГ, как и в диск-электрофорезе, среди белков зародышей на стадиях дробления обнаружены три основные фракции материнских белков (одна доминирующая, две с более низким содержанием белка) и пять-девять минорных (рис. 3).

Увеличение степени дифференциации белков в градиенте концентраций ПААГ связано с тем, что каждая белковая фракция на диск-электрофореграмме содержала несколько белков с разной ММ (рис. 4).

По мере развития зародыша количество белковых фракций увеличивалось с восьми на стадии 1–2-го деления дробления до двенадцати на стадии 7–10-го деления дробления и до четырнадцати-пятнадцати у личинок. Максимальное количество белковых фракций (20) выявлено у взрослых копепод (см. рис. 3; рис. 5). В неденатурирующих

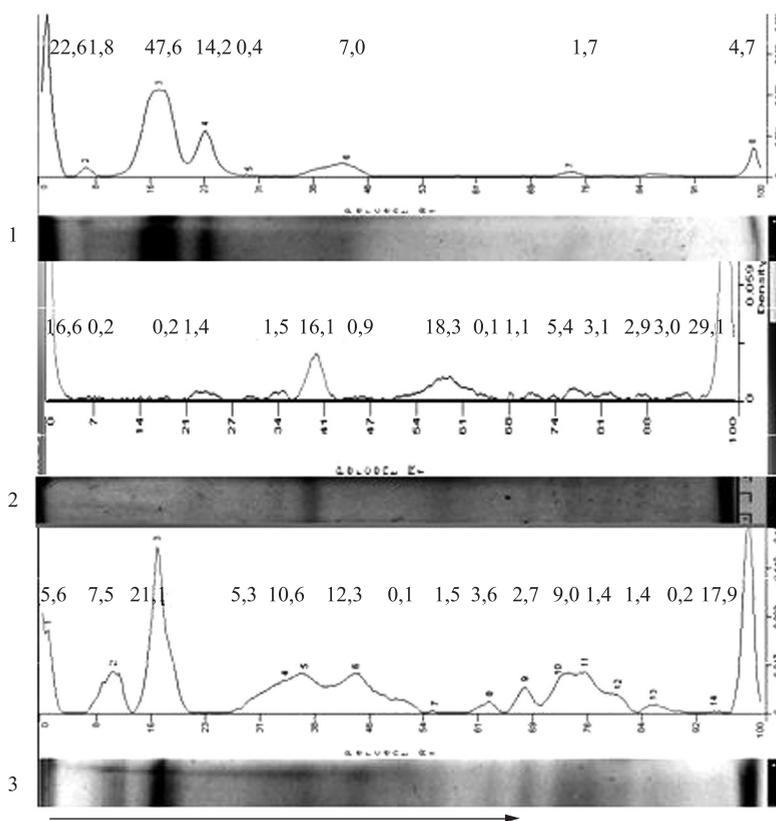


Рис. 2. Электрофореграммы и денситограммы водорастворимых белков зародышей *C. kolensis* на стадиях деления дробления (1); личинки (2) и дефинитивных копепод с яйцевыми мешками (3)

Горизонтальная стрелка указывает направление диск-электрофореза. Цифры на денситограммах обозначают относительное содержание соответствующих белковых пиков (в %).

условиях молекулярная масса макрокомпонента доминирующей желточной фракции зародыша составила около 156 кД, минорных желточных фракций — около 270 и 105 кД; низкомолекулярные белки зародыша на стадии 1-2-го деления дробления имели ММ в диапазоне от 50 до 90 кД, на стадии 7–10-го деления — от 25 до 90 кД, а у личинок — от 10 (и менее) до 90 кД в неденатурирующих условиях (см. рис. 3).

Относительное содержание макрокомпонента доминирующей желточной фракции с ММ около 156 кД снижалось по мере развития зародыша от 49,9% на первых этапах деления дробления до 25,7% к 7–10-му делению дробления, доля фракции с ММ около 270 кД нарастала с 26,5 до 34,8%, а фракции с ММ около 105 кД снижалась с 4,8 до 0,7% (см. рис. 5). Относительное содержание низкомолекулярных белков зародыша с ММ от 25 до 90 кД в ходе делений дробления снижалось с 3% на стадии 1–2-го деления дробления до 1,1% на стадии 7–10-го деления дробления, при этом количество низкомолекулярных белков на электрофореграмме нарастало, но представлены они были в следовых количествах.

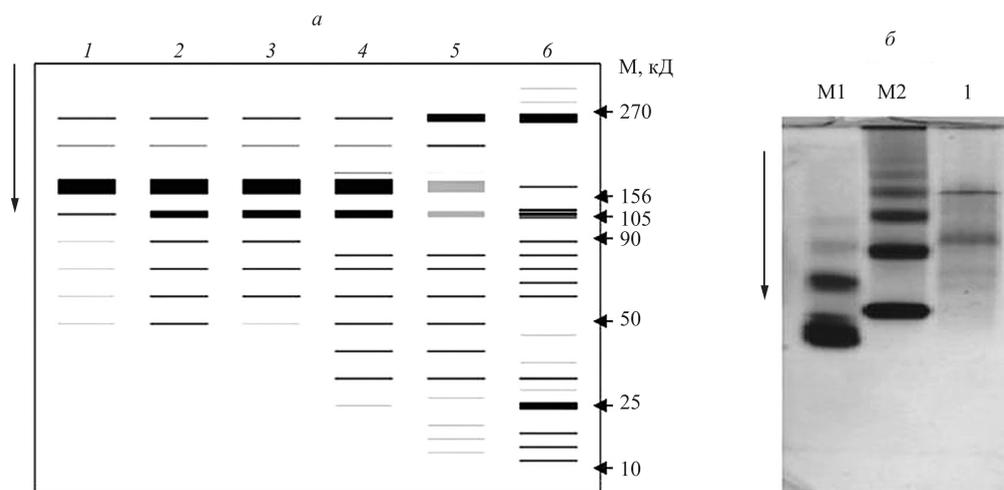


Рис. 3. Электрофорез водорастворимых белков зародышей, личинок и половозрелых копепоид *S.kolensis* в градиенте концентраций ПААГ (5–40%) на стадиях:

а (схема) — 1–2-го (1), 4-го (2), 5–6-го (3), 7–10-го делений дробления (4); личинок (5) и взрослых копепоид с яйцевыми мешками (6). б — определение величин ММ белков у зародыша 1–2-го деления дробления (1), М1 и М2 — маркеры молекулярной массы ЧСА и ОА соответственно. Вертикальная стрелка указывает направление электрофореза. Горизонтальные стрелки указывают на локализацию фракций желточных белков с ММ около 270, 156, 105, 90, 50, 25 и 10 кД.

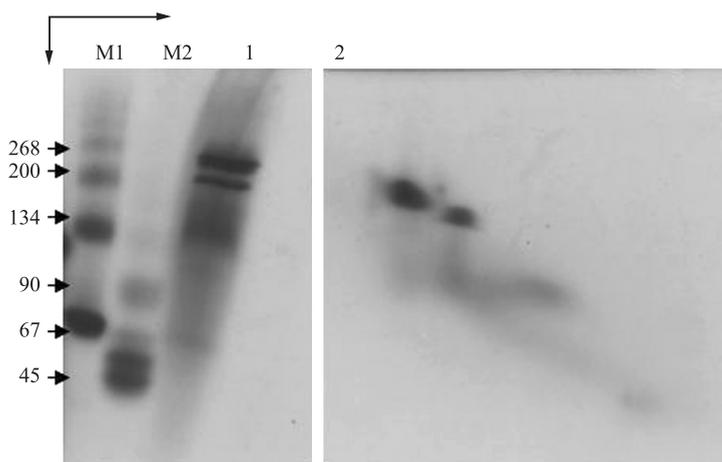


Рис. 4. 2D-электрофорез в градиенте концентраций ПААГ (5–40%) водорастворимых белков зародышей *S.kolensis* в конце этапа дробления (1, 2)

Горизонтальная стрелка указывает направление диск-электрофореза, вертикальная — электрофореза в градиенте ПААГ. М1 и М2 — маркеры молекулярной массы ЧСА и ОА соответственно. Цифры слева указывают величины ММ маркеров (в кД).

Несмотря на большее количество белковых фракций на электрофореграмме в градиенте концентраций ПААГ, у личинок по сравнению с зародышами фракционный состав белков в целом напоминал таковой у зародышей. Относительное содержание трех желточных фракций у личинок, отловленных в разные годы (2009 и 2010), различалось

существенно — 1,8 и 37,1% (даны общие доли (в %) трех желточных фракций); при этом у личинок с высокими показателями содержания этих фракций основная доля белка была сосредоточена во фракции с Rf 0,25 (21,6%). У дефинитивных копепод с яй-

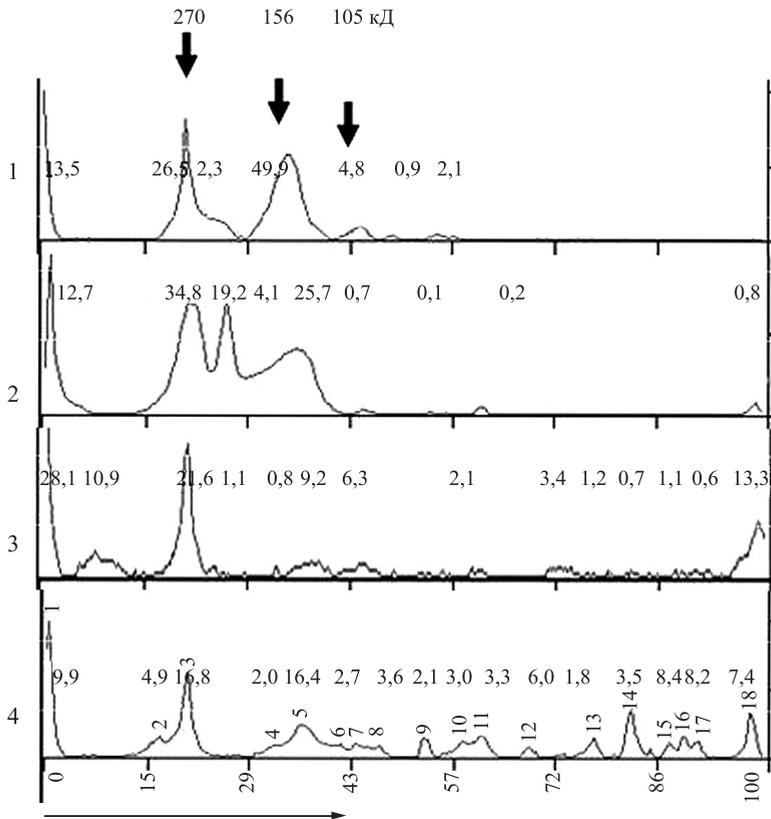


Рис. 5. Электрофореграммы и денситограммы водорастворимых белков зародышей *S.kolensis* на стадиях 1–2-го (1), 7–10-го делений дробления (2); личинки (3) и дефинитивных копепод с яйцевыми мешками (4)

Горизонтальная стрелка указывает направление электрофореза в градиенте концентраций ПААГ (5–40%). Цифры на денситограммах обозначают относительное содержание соответствующих белковых пиков (в %). Маленькие вертикальные стрелки указывают на дорожки белков с ММ 270, 156 и 105 кД.

цевыми мешками на желточные фракции с ММ около 270, 156 и 105 кД приходилось 16,8, 16,4 и 3,6% соответственно (см. рис. 5).

Таким образом, по фракционному составу водорастворимых белков личинки занимают промежуточное положение между зародышами и дефинитивными копеподами, а по распределению белка по отдельным фракциям характеризуются максимально низким содержанием основной желточной фракции с ММ 156 кД, что говорит о ее активном расходовании.

**Субъединичный состав белков доминирующей желточной фракции на стадиях дробления.** В SDS-электрофорезе в составе белков основной желточной фракции зародыша на стадиях дробления выявлено до 15 субъединиц с ММ от 17 до 120 кД (рис. 6).

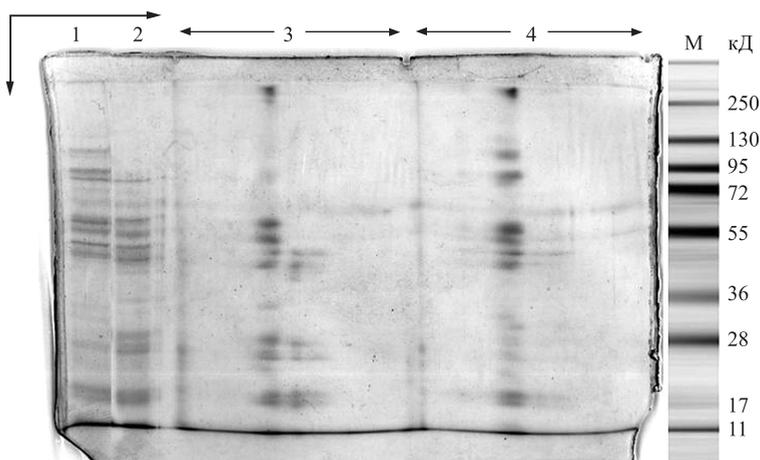


Рис. 6. SDS-электрофорез водорастворимых белков зародыша *C.kolenssis* на стадиях 4-го (1) и 7–10-го делений дробления (2)

Левая и правая стрелки по обе стороны цифр 3 и 4 показывают область 2D-электрофореграмм белков зародышей на стадиях 4-го (4) и 7–10-го (3) делений дробления. М — маркер молекулярной массы PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas), цифры рядом с маркерными белками обозначают величины их ММ (в кД). Вертикальная стрелка указывает направление SDS-электрофореза, горизонтальная — диск-электрофореза.

В ПААГ с мочевиной на дорожках желточных фракций ( $R_f$  в диск-электрофорезе 0,45 и 0,53) у зародышей на последних стадиях дробления выявлено по пять и семь компонентов соответственно, тогда как у личинок — всего по одному или два компонента (рис. 7).

Сопоставление степени дифференциации белков зародышей в ПААГ с SDS и ПААГ с мочевиной позволяет предположить, что в состав желточных фракций входят разные белки, связанные друг с другом нековалентно. Наличие таких ассоциатов на основе

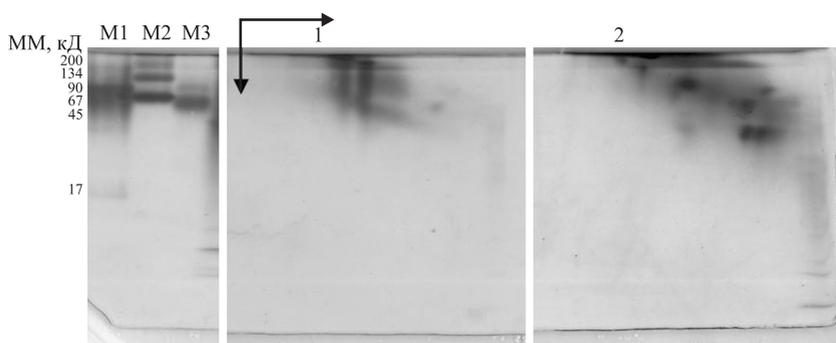


Рис. 7. 2D-электрофорез в ПААГ с 8М мочевиной водорастворимых белков зародыша *C.kolenssis* на стадиях 7–10-го деления дробления (1) и личинки (2)

М1, М2 и М3 — маркеры молекулярной массы Мг, ЧСА и ОА; цифры рядом с маркерными белками обозначают величины их ММ (в кД). Вертикальная стрелка указывает направление электрофореза в ПААГ с мочевиной, горизонтальная — диск-электрофореза.

желточного липовителлина описано для яиц как позвоночных, так и беспозвоночных, поскольку липовителлин выполняет не только пластическую функцию, но и является структурной основой для сидящих на поверхности загруженных в оогенезе белков [22, 28–30].

Отсутствие доминантного белка в SDS-спектре основной желточной фракции *C. kolensis* является, вероятно, особенностью состава его желтка, объяснить которую можно незначительным содержанием желтка в яйцах *C. kolensis* и наличием среди желточных белков копепод нескольких резервных пластических белков, помимо липовителлина, как и у паразитической копеподы *Lepeophtheirus salmonis* [18].

В SDS-электрофорезе в составе желточной фракции зародыша с ММ около 105 кД обнаружены те же субъединицы, что и в составе доминирующей желточной фракции с ММ 156 кД, а именно субъединицы с ММ в диапазоне 17–50 кД. И если на стадии 4-го деления дробления доля белков желтка, перешедших в цитозоль, еще незначительна, то к концу дробления (7–10-е деление дробления) процесс перехода белков из основной желточной фракции в цитозоль значительно возрастает (см. рис. 6).

Перекрытие субъединичного состава разных желточных фракций и перераспределение одних и тех же белков между ними можно объяснить ослаблением и последующим разрывом связей между низкомолекулярными желточными белками и структурной основой желточных глыбок — липовителлином — с последующим освобождением низкомолекулярных белков в цитозоль, где они могут присутствовать свободно или, как у зародышей *C. kolensis*, в виде ассоциатов, аналогично тому, как это описано для копеподы *Lepeophtheirus salmonis* [18]. Данный процесс можно рассматривать в качестве одного из звеньев транспорта желточных белков в цитозоль для последующей их деградации до аминокислот и синтеза зародышевых белков.

Итак, полученные результаты выявили четкую согласованность динамики формирования электрофоретических спектров водорастворимых белков пресноводной копеподы *C. kolensis* с прохождением ею основных этапов развития — зародыша, личинки, половозрелых дефинитивных копепод. На этапе дробления степень дифференциации белков по заряду у зародышей практически не менялась, у всех зародышей было выявлено по три основных желточных фракции белков и по две–три минорных. Основные желточные фракции были представлены белковыми ассоциатами, в ходе развития зародыша между ними происходило перераспределение белков. Перераспределение происходило по принципу перемещения белков из доминирующей желточной фракции с максимальным содержанием белка (до 75%) в другую желточную фракцию с невысоким относительным содержанием белка (до 4,8%). Целесообразность такого перераспределения заключается, вероятно, в постепенном переходе материнских белков в цитозоль для их последовательной деградации до аминокислот, используемых далее зародышем для синтеза собственных белков и энергообеспечения. Действительно, анализ степени дифференциации белков по величинам молекулярных масс в неденатурирующих условиях выявил нарастание низкомолекулярных белков по мере развития зародыша: от восьми фракций на стадии 1–2-го деления дробления до двенадцати на стадии 7–10-го деления дробления, причем появление на электрофореграмме дополнительных низкомолекулярных белков с ММ 25–50 кД приходилось на завершающую стадию 7–10-го деления дробления. Появление новых низкомолекулярных белков на этапе дробления, предположительно, связано не с активацией генов зародыша, а с выходом белков из ассоциатов оогенетических белков в цитозоль.

Особенностью белкового состава *C. kolensis* является наличие в SDS-спектре основной желточной фракции большого количества (до 15) белков, относительное содержание каждого из которых не превышало 7%. В многожелтковых яйцах и зародышах рыб, например, доля основного желточного белка липовителлина достигает 90% и выше, а на электрофореграммах водорастворимых белков таких зародышей на липовителлин приходится до 99% всех белков [20–22, 26]. Вероятно, выявленную особенность белкового состава зародышей *C. kolensis* можно объяснить незначительным содержанием желтка в яйцах *C. kolensis* и наличием в нем нескольких резервных пластических белков, помимо липовителлина, как и у паразитической копеподы *Lepeophtheirus salmonis* [18]. Данное предположение подтверждается не только снижением относительного содержания желточной фракции в ходе развития, но и «обеднением» ее состава: у зародышей на последней стадии дробления в составе желточных фракций с Rf 0,45 и 0,53 выявлено 5 и 7 белков соответственно, а у личинки — 1 и 2 (в ПААГ с мочевиной).

У личинок доля основной желточной фракции была минимальной по сравнению с зародышами и дефинитивными копеподами. Это можно объяснить активным расходом желтка в ходе морфогенеза. Количество белковых фракций, как видно на электрофореграмме, у личинок было больше, чем у зародышей, что приближало их ко взрослым копеподам (см. рис. 2). Максимальное разнообразие водорастворимых белков выявлено у дефинитивных копепод.

Таким образом, формирование белковой микросреды в процессе развития зародыша *C. kolensis* имеет свои особенности: оно определяется маложелтковым типом яиц, активным использованием не одного пластического белка (липовителлина), а нескольких резервных пластических белков, ассоциированных в составе желточных фракций и постепенно переходящих в цитозоль. Активное потребление желточных белков приходится на стадии, следующие за 4-м делением дробления, когда доля основной желточной фракции зародыша резко снижается с 75 до 50,8%, достигая минимальных показателей у личинок, а количество белков, ассоциированных в составе основной желточной фракции зародыша, также достигает минимума.

Полученные данные не позволяют сделать какие-то определенные предположения о вовлеченности водорастворимых белков в процесс ДХ. Однако последующее изучение фракционного состава белков у близкородственного вида, не претерпевающего в раннем развитии ДХ (*C. insignis*) и сравнение динамики основных преобразований белковой микросреды зародышей у видов с ДХ и без нее может быть информативным. Ведь у близкородственных видов количество генов, вовлеченных в функционирование соматических тканей, совпадает; между тем разница в количестве ДНК в диплоидных ядрах *C. insignis* и *C. kolensis* после ДХ у *C. kolensis* составляет 5,5 пг [31].

## Выводы

1. Выявлена четкая согласованность динамики формирования электрофоретических спектров водорастворимых белков с основными этапами развития пресноводной копеподы *C. kolensis* — этапами дробления, личинки и половозрелых дефинитивных копепод.

2. Этап дробления характеризуют 1) относительно стабильный фракционный состав белков и 2) максимальное относительное содержание желточных фракций. Среди

водорастворимых белков зародыша *C. kolensis* обнаружены три основные желточные фракции, представленные белковыми ассоциатами. Начиная с 4-го деления дробления зародыша выявлен активный переход белков из доминирующей желточной фракции в цитозоль.

3. Этап личинки характеризуется 1) увеличением количества водорастворимых белков по сравнению с зародышами, 2) минимальным содержанием основной желточной фракции вследствие ее активного расходования и 3) снижением числа белков, ассоциированных в составе основной желточной фракции, по сравнению с зародышами.

4. Максимальное разнообразие водорастворимых белков выявлено у дефинитивных копепод.

5. Формирование белковой микросреды в процессе развития зародыша *C. kolensis* определяется маложелтковым типом яиц, активным использованием не одного пластического белка (липовителлина), а нескольких резервных пластических белков, ассоциированных в составе желточных фракций и постепенно переходящих в цитозоль.

## Литература

1. Акифьев А. П., Гришанин А. К. Некоторые биологические аспекты диминуции хроматина // Журн. общ. биол. 1993. Т. 54, № 1. С. 5–16.

2. Einsle U. Crustacea, Copepoda: Calanoida und Cyclopoida // Süßwasserfauna von Mitteleuropa. Bd 8. Hf. 4. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag. 1993. S. 1–209.

3. Диминуция хроматина у *Cyclops kolensis* и *Cyclops strenuus strenuus* (Copepoda, Crustacea) — уникальный пример геной инженерии в природе / А. К. Гришанин, Г. А. Худойлий, З. Г. О. Шайхаев, В. Я. Бродский, В. Б. Макаров, А. П. Акифьев // Генетика. 1996. Т. 32. С. 492–499.

4. Grishanin A. K., Akifyev A. P. Interpopulation differentiation within *C. kolensis* and *C. strenuus strenuus* (Crustacea: Copepoda): evidence from cytogenetic methods // Hydrobiology. 2000. Vol. 417. P. 37–42.

5. The molecular structure of the DNA fragments eliminated during chromatin diminution in *Cyclops kolensis* / S. Degtyarev, T. Boykova, A. Grishanin, S. Belyakin, N. Rubtsov, T. Karamysheva, G. Makarevich, A. Akifyev, I. Zhimulev // Genome Research. 2004. Vol. 14. P. 2287–2294.

6. Акифьев А. П., Гришанин А. К. Некоторые заключения о роли избыточной ДНК и механизмах эволюции эукариот, которые можно сделать на основании изучения диминуции хроматина у Cyclopoida // Генетика. 2005. Т. 41(4). С. 466–479.

7. Проблема диминуции хроматина на рубеже XX и XXI веков / А. К. Гришанин, А. К. Шеховцов, Т. В. Бойкова, А. П. Акифьев, И. Ф. Жимулев // Цитология. 2006(а). № 5. С. 379–397.

8. Консерватизм структуры генома в двух популяциях *Cyclops kolensis* (Copepoda, Crustacea), обитающих в прудах Москвы и оз. Байкал // А. К. Гришанин, Т. В. Бойкова, Т. Л. Маршак, Н. Г. Мельник, Е. Ю. Наумова, М. В. Загоскин, А. П. Акифьев, И. Ф. Жимулев // ДАН. 2006(б). Vol. 408(5). С. 684–687.

9. Загоскин М. В., Маршак Т. Л., Муха Д. В., Гришанин А. К. Диминуция хроматина регулирует число генов рРНК у веслоногих раков // Acta Natura. 2010. Т. 2, № 4. С. 75–81.

10. Seidl C., Moritz K. B. A novel UV-damaged DNA binding protein emerges during the chromatin-eliminating cleavage period in *Ascaris suum* // Nucleic Acids Res. 1998. Vol. 26. P. 768–777.

11. Volz D. C., Chandler G. T. An enzyme-linked immunosorbent assay for lipovitellin quantification in copepods: a screening tool for endocrine toxicity // Environ Toxicol Chem. 2004. Vol. 23(2). P. 298–305.

12. Molecular cloning, phylogenetic analysis and developmental expression of a vitellogenin (Vg) gene from the internal copepod *Tigriopus japonicus* / K. W. Lee, D. S. Hwang, J. S. Rhee, J. S. Ki, H. G. Park, J. C. Ryu, S. Raisuddin, J. S. Lee // Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 2008. Vol. (4). P. 395–402.

13. Hartling R. C., Kunkel J. G. Proteolytic cleavage of yolk protein during flounder (*Pleuronectes americanus*) development: characterization of lipovitellin from eggs and embryos // *Mol. Biol. Cell.* 1995. Vol. 6. P. 321.
14. Sappington T. W., Raikhel A. S. Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors // *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 1998. Vol. 28(5–6). P. 277–300.
15. Tufail M., Takeda M. Molecular characteristics of insect vitellogenins // *J. Insect. Physiol.* 2008. Vol. 54(12). P. 1447–1458.
16. Hwang D. S., Lee K. W., Lee J. S. Cloning and expression of Vitellogenin 2 gene from the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* // *Ann. New York. Acad. Sci.* 2009. Vol. 1163. P. 417–420.
17. Molecular characterization and expression of vitellogenin Vg genes from the cyclopoid copepod, *Paracyclops nana* exposed to heavy metals / D. S. Hwang, K. W. Lee, J. Han, H. G. Park, J. Lee, Y. M. Lee, J. S. Lee // *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 2010. Vol. 151(3). P. 360–368.
18. Functional characterisation of the maternal yolk-associated protein (LsYAP) utilizing systemic RNA interference in the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) (Crustacea: Copepoda) / S. Dalvin, P. Frost, E. Biering, L. A. Hamre, C. Eichner, B. Krossoy, F. Nilsen // *Int. J. Parasitol.* 2009. Vol. 39(13). P. 1407–1415.
19. Salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) transcriptomes during post molting maturation and egg production, revealed using EST-sequencing and microarray analysis [Электронный ресурс] / C. Eichner, P. Frost, B. Dysvik, I. Jonassen, B. Kristiansen, F. Nilsen // *BMC Genomics.* 2008. doi:10.1186/1471-2164-9-126.
20. Андреева А. М. Особенности проявления генов лактатдегидрогеназы в раннем развитии леща *Abramis brama* (L.), плотвы *Rutilus rutilus* (L.) и их реципрокных гибридов F<sub>1</sub> // *Вопр. ихтиологии.* 2005. Т. 45, № 3. С. 411–417.
21. Андреева А. М. Особенности проявления генов аспартатаминотрансферазы в раннем развитии леща *Abramis brama* (L.), плотвы *Rutilus rutilus* (L.), синца *A. balltrus* (L.) и их межродовых гибридов F<sub>1</sub> // *Онтогенез.* 2007. Т. 38, № 1. С. 1–8.
22. Andreeva A. M. The role of internal fluid environment for regulation of germ genes expression in early development of some cyprinid fishes and their intergeneric F<sub>1</sub> hybrids // *Developmental Gene Expression Regulation.* New York: Nova Science Publisher Inc., 2009. P. 263–283.
23. Itzhaki R. F., Gill D. M. A micro-biuret method for estimation protein // *Anal. Biochem.* 1964. Vol. 9. P. 401–410.
24. Davis B. J. Disk-electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins // *Ann. New York. Acad. Sci.* 1964. Vol. 121. P. 404–427.
25. Ornstein L. Disc-electrophoresis. I. Background and theory // *Ann. New York. Acad. Sci.* 1964. Vol. 121. P. 321–349.
26. Андреева А. М. Структурно-функциональная организация белков крови и некоторых других внеклеточных жидкостей рыб: автореф. дис.... д-ра биол. наук. М.: Изд-во МГУ, 2008. 40 с.
27. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage // *Nature.* 1970. Vol. 4(227), N 5259. P. 680–685.
28. Нейфах А. А., Тимофеева М. Я. Молекулярная биология процессов развития. М.: Наука, 1977. 310 с.
29. Shaklee J. B., Whitt G. S. Patterns of enzyme ontogeny in developing sunfish // *Differentiation.* 1977. Vol. 9(1). P. 85–95.
30. Корочкин Л. И. Введение в генетику развития. М.: Наука, 1999. 253 с.
31. Содержание ДНК в ядрах *Cyclops kolensis* и *C. insignis* (CRUSTACEA, COPEPODA) / В. Ф. Семешин, Л. В. Омелянчук, А. Л. Алексеева, Е. А. Иванкина, Н. Г. Шевелева, И. Ф. Жимулев // *Цитология.* 2011. Т. 53, № 3. С. 285–289.

Статья поступила в редакцию 15 декабря 2011 г.