

海胆未受精卵子存在类副肌球蛋白*

吴厚余 施奠族

(中国科学院海洋研究所)

非肌肉运动蛋白近期已有综合报道^[2],主要叙述了肌动蛋白和肌球蛋白在真核细胞存在的形式、结构和功能。如在海胆、海星的精、卵子方面的报道;另外亦有少量的文献报道了原肌球蛋白在非肌肉细胞中存在的位置、结构和功能。至于对结构和功能尚不很清楚的副肌球蛋白,在精、卵子等非肌肉细胞里是否存在,至今还是一个谜。

从海胆亚历斯多顿灯笼齿肌中提取副肌球蛋白已有报道^[6]。我们从马粪海胆卵巢中得到像肌肉中制备的副肌球蛋白的类结晶。并利用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和免疫双扩散方法对海胆未受精卵子中存在类副肌球蛋白进行了测定。这对研究细胞的运动和分裂,卵子中蛋白质的来源以及细胞分化等方面将提供重要资料,并为非肌肉运动蛋白系统填补一个空白。

一、材料和方法

(一) 马粪海胆 *Hemicentrotus pulcherrimus* (A. Agassiz) 和细雕刻肋海胆 *Temnopleurus tereumaticus* (Leske) 采自青岛胶州湾。卵巢和亚历斯多顿肌基本按 Johnson 等^[4]的方法制成酒精干粉。精子和卵子用 KCl 溶液注入海胆体腔,让其自然排入过滤海水中,再分别离心收集;用冷的 0.1M 磷酸缓冲液 (pH6.0), 该液内含 1mM 叠氮钠 (以后所有的溶液都含有此浓度的溶液) 和 10mM EDTA-Na₂ 洗二次。将其置于以此溶液配成的 50% 甘油中,在零下 5℃ 左右保存约一个月。

(二) 亚历斯多顿肌 (以后简称“成体肌肉”) 和卵巢酒精干粉中抽提和纯化副肌球蛋白基本按 Johnson 和 Obinata 等方法,除去消化道的亚历斯多顿灯笼齿酒精干粉,先用研钵捣碎,再用石磨磨成粉,加约 10 倍体积的 1M KCl,

0.01M 磷酸钾缓冲液 (pH7.5), 内含 0.01M β -巯基乙醇,抽提两次,两次抽提液合并,12500g 离心 20 分钟,零度左右,沉淀弃去。上清液对 0.1M KCl, 0.01M 磷酸钾缓冲液 (pH6.0) 透析两天,每天换外透液三次,经 12500g 离心 20 分钟收集沉淀。加 0.05M KCl 和最终浓度为 10mM EDTA-Na₂ 及 5mM ATP-Na₂, 再用东德 VAC-602 型制备超离心机 32000r.p.m. (100000g) 离心 1 小时。沉淀溶于 0.6M KCl, 0.01M 磷酸钾缓冲液 (pH7.4) 0.01M β -巯基乙醇,并对此溶液透析过夜,12500g 离心除去不溶性物,上清液对 0.01M 磷酸钾缓冲液 (pH6.0) 0.01M β -巯基乙醇溶液透析即可产生针状结晶,共纯化 3 次。

卵巢酒精干粉与成体肌肉以同样方法制备类副肌球蛋白,但纯化 5 次。

(三) 未受精卵子粗提取液的制备。原保存在低温下的 50% 甘油的卵子用冷的 0.1M KCl, 0.01M 磷酸钾缓冲液 (pH6.0) 洗 2 次,离心收集的卵子湿重约 1.6 克和 1.8 克加入约 10 倍体积的提取液经日本 Nissei (AM-77 型) 组织捣碎器 15000r.p.m. (30 秒), 12500g 离心 30 分钟。上清液用冷的中性饱和硫酸铵加到 70% 饱和度,冰箱放置一小时左右,离心收集沉淀,并加少量提取液溶解保存或对 0.1M KCl, 0.01M 磷酸钾缓冲液 (pH6.0) 透析两天,每天换外透液三次,离心得到沉淀,溶于少量提取液备用。

(四) SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳按 Bullard^[2]等方法,蛋白经解离,透析。使用前

* 本文承蒙中国科学院上海生物化学研究所曹天钦教授的指导和支持;本所电镜室协助制作电镜照片;王可玲和毛元兴同志协助拍制电泳和双扩散照片;吴贤汉同志提供文昌鱼副肌球蛋白,作者表示诚挚谢意。

加等体积的3% SDS, 0.03M磷酸钠缓冲液(pH7.0), 2.6M β -巯基乙醇, 12%甘油、0.007%溴酚兰溶液在100°C水浴里煮沸5分钟。每根胶管分别加入20至50微升的样品, 电泳缓冲液包含0.1M磷酸钠(pH7.0)及0.1% SDS。电泳后胶管用50%甲醇(内含5%醋酸)固定, 0.25%考马斯兰R-250染色, 置脱色液(75ml醋酸、50ml甲醇和875ml水)在37°C左右脱色。

(五) 电子显微镜观察。原保存在0.6M KCl, 0.01M磷酸钾缓冲液(pH7.5)的蛋白溶液经20000g离心30分钟, 上清液对0.1M KCl, 0.01M磷酸钾缓冲液(pH6.0)透析所得的结晶。点样于喷有火棉胶、碳膜的铜网上, 1%醋酸铀负染, 在日立H-500型75kV电子显微镜下观察。

(六) 抗血清和免疫双扩散盘的制备。抗原为成体副肌球蛋白经三次重结晶, 除佐剂外附加卡加苗, 皮下或皮内注射三处, 每兔共接受抗原约8毫克, 最后一次注射后半月颈动脉放血。

免疫双扩散的冻粉经过纯化, 浓度为0.8%, 用考马斯兰0.25% R-250染色。7%醋酸脱色。

蛋白浓度以双缩脲法测定。

化学试剂全过程都用玻璃重蒸水, 除 β -巯基乙醇、双甲叉丙烯酰胺及考马斯兰R-250等进口外, 其余试剂均为国产。SDS(十二烷基硫酸酯钠)经重结晶。丙烯酰胺化学纯, 其余试剂都为分析纯。全过程(制备、纯化和透析)都在0—4°C进行。

二、结 果

从海胆成体肌肉中提取的副肌球蛋白, 经三次重结晶, 在0.1M KCl, 0.01M磷酸钾缓冲液(pH6.0)溶液中产生结晶, 在电子显微镜下观察到针状结晶(见图1)。从SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图形〔见图3(2)〕显示样品亦是较纯净, 与文昌鱼副肌球蛋白的迁移率类似〔见图3(1)〕。

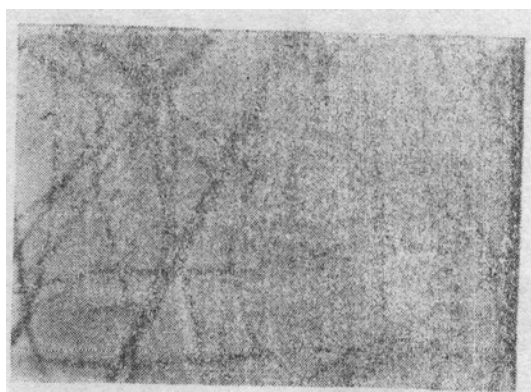


图1 海胆灯笼齿肌副肌球蛋白的结晶(电镜照片24000×)



图2 海胆卵巢中提取类副肌球蛋白结晶(电镜照片24000×)

马粪海胆卵巢的酒精干粉按成体肌肉的方法提取并经五次纯化亦能得到类针状结晶(见图2)。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳亦能得到与海胆、文昌鱼肌肉中提取的副肌球蛋白类似的迁移率〔见图3(3)〕。

经50%甘油浸泡的细雕刻肋海胆的未受精卵用制备成体肌肉副肌球蛋白同样的提取液, 再用70%饱和度的硫酸铵浓缩或用0.1M KCl, 0.01M磷酸钾缓冲液(pH6.0)透析, 使内透液pH值达到6.0, 再离心收集沉淀。然后直接加8M尿素等解离剂, 用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳都可得到与海胆和文昌鱼肌肉副肌球蛋白类似的迁移率的带〔见图3(4)〕。但从电泳图形中可以看出, 这种带是既细又微。

如将上述的硫酸铵沉淀或降低pH值由离心收集的沉淀再溶于少量的提取液, 并经此溶

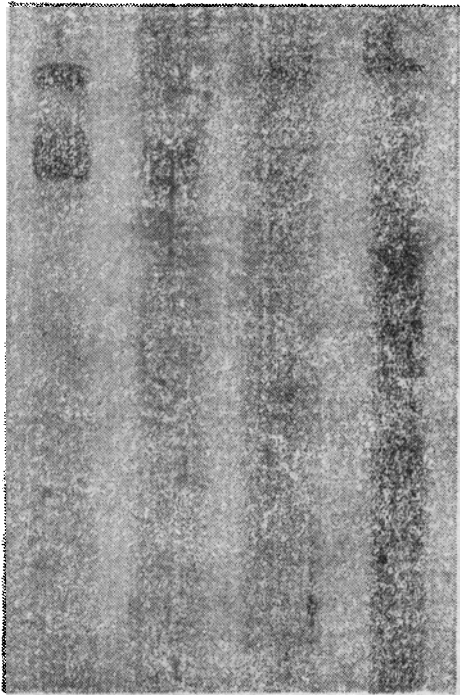


图3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (丙烯酰胺胶浓度7.5%)

1. 文昌鱼副肌球蛋白。
2. 马粪海胆成体肌肉副肌球蛋白。
3. 马粪海胆卵巢提取类副肌球蛋白。
4. 细雕刻肋海胆未受精卵子粗提取液。

液平衡或调pH到中性的蛋白溶液作为抗原与抗体进行免疫双扩散反应,即能获得清晰的沉淀条纹(见图4)。但从双扩散沉淀条纹的强弱程度看仍比肌肉和卵巢中提取的类副肌球蛋白为微。从以上结果说明,海胆未受精卵子中存在的类副肌球蛋白的量是很微的。

三、讨 论

肌动蛋白和肌球蛋白等主要肌肉运动蛋白已在不同动物的未受精卵子和精子中相继发现,而且存在于所有真核细胞中,已由Clarke等作了综合的评论。Kane^[5]等已在海胆卵子中分离出肌动蛋白,并对其与其他蛋白的关系进行了研究。Tilneg^[7]报道了海胆精子肌动蛋白存在的形式和位置。原肌球蛋白我们已在文昌鱼未受精卵子中证明它的存在^[1]。现在

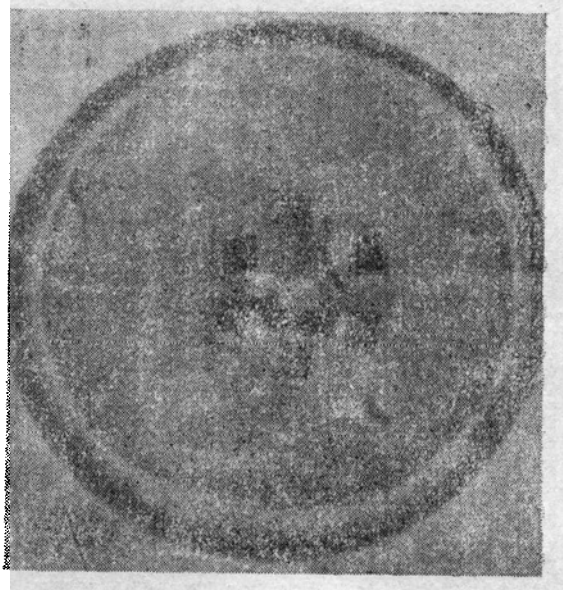


图4 免疫双扩散图形(中心为抗血清)

1. 成体肌肉副肌球蛋白。
2. 精子粗提取液。
3. 细雕刻肋海胆卵子粗提取液。
4. 少量四臂幼虫匀浆液。
5. 提取液(0.6M KCl,0.01M磷酸钾缓冲液pH7.0)。
6. 卵巢中提取类副肌球蛋白。

唯独副肌球蛋白在卵子、精子以及其他非肌肉细胞中究竟是否存在这个问题,至今还没有作出肯定的回答。我们在海胆卵巢的提取物和卵子的粗提取物里,就其溶解度、pH值、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳行为以及免疫双扩散等方面获得的初步结果,认为类副肌球蛋白在海胆未受精卵子中是存在的。Kane^[5]报道用保温办法从海胆卵子细胞质提取肌动蛋白时,分成两部分,一部分为肌动蛋白,另一部分分为包括分子量为58000和220000的两种蛋白,没有提及有类似副肌球蛋白分子量的成分存在。

然而从卵巢中分离类副肌球蛋白过程中,它的含量比成体肌肉的含量要少得多,并且类结晶的形成亦比成体肌肉难。从未受精卵子中制备的粗提取液,加SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的蛋白量和所得图形以及免疫双扩散所产生的沉淀条纹,都说明卵子中所含的类副肌球蛋白的量是极微的。但如用同样经50%甘油浸泡

保存的卵巢和未受精卵同样处理, 用约 1/4 卵子的量, 进行双扩散和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 可得到较粗的类似成体肌肉副肌球蛋白的迁移率带。故我们推论卵巢含类副肌球蛋白的量比卵子要高。这有待于进一步证实。至于其分布位置、存在形式和其他方面的工作我们正在进行中。

在研究卵子的同时, 我们亦收集并处理精子, 进行了免疫双扩散和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。但都没有得到与卵子类似的结果。Tilneg 在海胆成熟精子中研究肌动蛋白贮存形式时只报道了肌动蛋白是与分子量为 250000 和 230000 这两种蛋白相联系。究竟精子本身是否

存在类副肌球蛋白尚待进一步研究。

主要参考文献

- [1] 吴尚勳等; 1982. 《海洋与湖沼》13(3).
- [2] Bullard, B., B., Luke, and L. Winkelman, 1973. *J. Mol. Biol.* 75(2):359-367.
- [3] Clarke, M. and J. A. Spudich, 1977. *Ann. Rev. Biochem.* 46:797-816.
- [4] Johnson, W. H. et al., 1959. *Science* 130:160-161.
- [5] Kane, R. E., 1976. *J. Cell. Biol.* 71: 704-714.
- [6] Obinata, T., T., Shirao, and S. Murakami, 1975. *Int. J. Biochem.* 6:569-574.
- [7] Tilneg, L. G., 1976. *J. Cell. Biol.* 69: 73-89.

THE PRESENCE OF PARAMYOSIN-LIKE PROTEIN IN SEA URCHIN UNFERTILIZED EGG

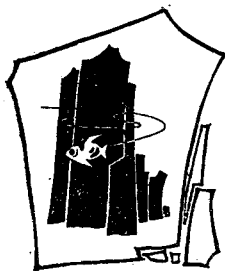
Wu Houyu and Shi Dianzu

(Institute of Oceanology, Academia Sinica)

Abstract

Paramyosin-like protein has been extracted and purified from ethanol powder of the maturing ovarian egg of sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus* (A. Agassiz), and the paracrystals of the muscle also obtained. The antibody of paramyosin protein of the lantern muscle of sea urchin exhibits the immuno-purification bands in the crude solution extracted from the unfertilized egg of sea urchin *Temnopleurus tereumaticus* (Leske). This crude solution has the same mobility on SDS-acrylamide gels electrophoresis as muscle paramyosin.

· 名词解释 ·



沿 岸 带

沿岸带是海洋与陆地相连的水域, 包括海湾、泻湖、河口和海滩等边缘海区。由于海陆气候条件的

不同, 以及江河排水和外海海水等因素的相互作用, 沿岸带的各项环境因素, 包括动、植物区系, 在时间上和空间上的变化都非常剧烈, 构成了一个极其复杂而特殊的环境系统。沿岸带的水产、矿产、土地等资源都很丰富;

同时, 与航运、旅游和排污等密切相关。所以, 沿岸带一直吸引着海洋学、海岸工程和环境管理等各学科和有关部门的广泛注意。

(崔玉珩)

