

文昌鱼原肌球蛋白在胚胎分化过程中 出现的时间和位置*

吴尚勳 吴厚余 施奠族
(中国科学院海洋研究所)

文昌鱼卵子分化较早,根据预定器官形成物质分布图,童第周等^[1]认为在8细胞期,中胚层物质分布在植物性半球;32细胞时期,绝大部分在植物性半球的第一层,它构成胚胎肌肉的大部分,小部分在植物性半球第二层,形成胚胎前端的肌节。

Ries, Gersch^[2]和Whittaker^[27]等认为海鞘卵受精后不久可以看到器官形成物质的分区,用组织化学方法可以测出在这些物质中已有特殊蛋白质的出现,如氧化酶、乙酰胆碱脂酶等。

文昌鱼预定器官物质,不仅在受精卵已经确定,而且成熟的未受精卵也已存在。童第周等^[2]将未受精卵纵切和横切后再受精,纵切的两部分能发育成完整的胚胎,而横切两半部却不能形成完整的幼虫,这可能与外胚层物质在动物性半球,而内、中胚层物质在植物性半球有关。

肌肉蛋白质在细胞分化方面的研究报道为数不多,主要在鸡胚发育中肌球蛋白质的变化。Ogawa^[3]利用血清学方法测知,肌球蛋白在孵后16小时、肌动蛋白在72小时、肌球蛋白在96小时出现。Couffer-Kaltenbach^[4]和Perlmann^[4]用海胆未受精卵和受精卵,以不同离心力和不同温度做免疫电泳和双扩散等方法,发现卵子里有6条沉淀线,从而证明未受精卵和胚胎不同时期的蛋白相似。Wang^[5]利用荧光标记法研究了肌动蛋白在海胆卵早期发育中的分布。本文用免疫双扩散方法对文昌鱼卵子中的原肌球蛋白在胚胎发育时期出现时间和位置等进行了测定,并对卵子在受精前后的分化情况作了阐明。

材料和方法

本实验大部分工作在1964—1966年进行,1978年后又作了补充。

1. 动物材料

青岛附近的沙子口和太平角两处的文昌鱼(*Branchiostoma belcheri tsingtauense* Tchang et Koo)。

2. 原肌球蛋白的抽提、净化和结晶

将活的水文昌鱼剪去消化道和生殖腺,用冷重蒸水洗两遍,在低温下用石磨磨两遍。按

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第705号。本文承中国科学院上海生物化学研究所邹永水同志协助测定血清 γ 球蛋白的紫外检测和原肌球蛋白等电聚焦电泳的数据;本所宋华中、王可玲、毛元兴等同志代为拍照和冲洗照片,在此表示诚挚谢意。

本刊编辑部收到稿件日期: 1980年10月13日。

Bailey^[7]方法抽提,再用酒精净化,硫酸铵盐析方法纯化4次。将纯化的原肌球蛋白做结晶试验即可得到针状结晶。

蛋白质浓度测定按潘家秀等^[3]双缩脲法。

3. SDS-凝胶电泳和等电聚焦电泳

十二烷基硫酸酯钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳,按 Weber 等^[10]的方法。胶浓度10%,考马斯兰染色。等电聚焦电泳按化同人^[6]的方法。Ampholine pH4—10(上海生化所东风试剂厂),胶浓度5%,电泳缓冲液,上槽(-)用0.02M NaOH,下槽(+)用0.01M H₃PO₄。

4. 抗原的制备

(1) 注射用抗原:取一定量经4次纯化的样品硫酸铵糊,加少量蒸馏水,用1N NaOH调pH近中性,对蒸馏水透析2—3天,然后转入0.15M NaCl溶液平衡,测蛋白浓度,置冰箱待用。

(2) 用于冻粉双扩散的胚胎发育各时期的抗原制备:从接近成熟的文昌鱼中剥离出精、卵巢各5个左右,用过滤海水洗两次,转入小玻璃匀浆器中,用滤纸吸干海水,匀浆约1分钟,加入几滴1.0M KCl—0.05M KPO₄缓冲液,pH7.0,低温抽提12—24小时。其他不同胚胎发育期的材料处理同上,数量200个以上。将未受精成熟卵子,沿与赤道线平行横割,动物性半球与植物性半球的比例(A/V)为1/2,数量约200至700个,处理过程同精、卵巢。

5. 抗血清的制备和净化

(1) 取体重2—3公斤的公兔,用3mg/ml的原肌球蛋白(注射用的抗原)2ml,加佐剂(外加卡介苗),注射兔子臀部皮下几处。隔周注射1次,最后一次注射后10—15天心脏抽血或颈动脉放血。

(2) 普通血清和抗血清的净化:粗 γ 球蛋白的分离系根据 Coons^[9]的方法。抗血清进一步纯化经 DEAE11 柱层析(经 HD-73-4 型蛋白质检测仪 280nm,中国科学院上海生物化学研究所仪器室)收集各峰溶液,加等体积饱和硫酸铵。普通血清净化方法同上。

抗原抗体沉淀反应,根据潘家秀等^[4]方法。

实验结果

1. 纯度鉴定和样品的均一性

经硫酸铵3次纯化,按 Bailey 的方法得到针状结晶(见图版 I:1)。纯化4次,经水透析,在100℃水浴里煮1分钟无沉淀产生。

SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(见图版 I:2a),表明原肌球蛋白的主带是明显的,但还有2个分子量较大的物质。

通过等电聚焦电泳表明样品是均一的,为一条带(见图版 I:2b)。

2. γ 球蛋白的分离

纯化普通血清或抗血清经50%饱和度的硫酸铵盐析后,获得粗 γ 球蛋白,经 DEAE11 柱层析可得4个峰,通过免疫双扩散反应证明: γ 球蛋白在峰 I;在峰 II 和峰 III 部分不存在 γ 球蛋白(见图 1 和图版 I:3)。

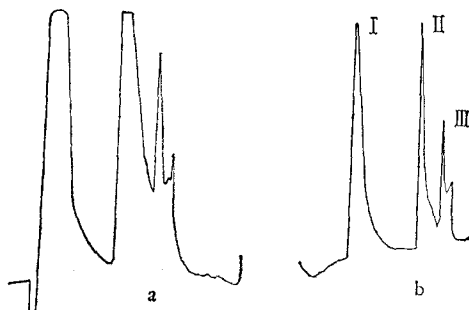


图1 粗 γ 球蛋白经DEAE11柱层析,通过蛋白检测仪280nm,缓冲液 $0.175M NaPO_4$, pH6.3,分别得4个峰。
a. 兔普通血清; b. 抗血清。

3. 原肌球蛋白在胚胎发育中出现的时间

双扩散反应: 分别用接近成熟的精巢、卵巢、未受精成熟卵、囊胚、原肠和肌节出现等不同发育时期的胚胎,经匀浆提取抗原作双扩散反应。加样后,保温($25^{\circ}C$)12小时,除精巢外都出现沉淀线,两天后反应完全(见图版I:4)。

4. 原肌球蛋白在未受精卵中的分布

将成熟的刚排出的未受精卵子,沿与赤道平行线横割。为避免由于切面倾斜而将中胚层物质切入动物性半球,切面略在赤道之上,使切下的动物性半球部分(A)约占卵子的 $1/3$,植物性半球部分(V)占 $2/3$ 。切割先后重复8次,V约200个,由于A比V小,所以增加到700个。结果A与抗血清没有产生沉淀线,而V则有明显的沉淀线出现(见图版I:6)。由此可见,原肌球蛋白存在于未受精的卵子里且分布不均匀,大多分布在卵子靠近V的部分,在A附近则没有。

讨 论

1. 样品的均一性

从SDS-凝胶电泳图中可以看出,除原肌球蛋白主带外,还有两个较大分子量的物质,其中一部分很可能是副肌球蛋白。从等电点聚焦电泳(图版I:3)和成体抗原以及卵巢提取抗原的双扩散反应(图版I:5),所用的成体抗原是刚提取不久的,反应条纹较少。而以盐溶液保存在冰箱内约1个月左右的原肌球蛋白,即可分离成很多肽键(如图版I:7所示),这一现象与潘家秀等^[4]在软骨鱼系原肌球蛋白的免疫反应结果类似。

2. 原肌球蛋白在卵子中出现的时间和位置

Conklin 和 Whittaker 认为在海鞘卵子上,受精以后即出现物质分布的区域化,即外胚层物质分布在动物性半球,中内胚层物质分布在植物性半球。童第周等用卵块受精的方法证明,文昌鱼的成熟卵子,在受精以前,器官形成物质已经分布到预定的地点了。本实验用免疫双扩散方法证明,在受精之前的成熟卵子,已经出现了原肌球蛋白。用切割的方法证明:在受精前,虽然肌肉组织尚未出现,而将来构成肌肉组织之一的原肌球蛋白,却已分布到了植物性半球,这与童第周等的无核卵块受精结果一致。虽然在受精过程中细胞质有极为激烈的流动现象,但这种细胞浆内物质的区域化,似与受精作用无关。

在双扩散实验里, 卵巢匀浆与原肌球蛋白抗体呈阳性反应, 但是由于卵巢的成分复杂, 既包含着未成熟的卵母细胞, 又有卵巢的结缔组织和肌肉, 因此不能肯定原肌球蛋白的来源。在卵巢中即将成熟的卵母细胞里, 是否已含有原肌球蛋白, 需进一步探索。

关于原肌球蛋白在卵子内怎样产生, 为什么在成熟卵子中分布在植物性半球? 通过什么样的过程集中到这里? 这些有关细胞质分化的过程亦需深入地进行探讨。

我们的实验结果可以说明原肌球蛋白不但在受精卵已经存在, 早在受精前就已经出现了, 而且主要分布在植物性半球。Clarke^[8] 等报道许多细胞中有非肌肉的原肌球蛋白及其他调节蛋白存在。Fine^[11,12] 从鸡胚脑和老鼠成纤维细胞、小牛的血小板、胰脏和脑中分离出与肌肉原肌球蛋白相似的原肌球蛋白。而我们的结果是原肌球蛋白的分布与预定中胚层物质的分布一致的。

参 考 文 献

- [1] 童第周等, 1960. 文昌鱼卵子的预定器官形成物质分布区域的研究。实验生物学报 7(1—2): 82—90。
- [2] 童第周等, 1961. 文昌鱼卵子受精前构造的研究。1959年全国胚胎学学术会议论文摘要汇集。科学出版社, 62—63页。
- [3] 潘家秀等, 1962. 蛋白质化学研究技术。科学出版社, 第12页。
- [4] 潘家秀等, 1964. 肌肉蛋白的免疫化学研究 I. 软骨鱼系原肌球蛋白的免疫化学特性与其结构的关系。生物化学与生物物理学报 4(1): 71—84。
- [5] 薛社普, 1966. 细胞分化机制研究的新进展。生物科学动态 5: 1—22。
- [6] 化同人, 1974. 生化实验讲座。日本生化学会编, 15: 64。
- [7] Bailey, K., 1948. Tropomyosin: A new asymmetric protein component of the muscle fibril. *Biochem. J.* 43(2): 271—279。
- [8] Clarke, M. and Spudich, J. A., 1977. Non-muscle contractile proteins: The role of actin and myosin in cell motility and shape determination. *Ann. Biochem.* 46: 797—822。
- [9] Coons, A. H., 1958. Fluorescent antibody methods. General cytochemical methods (Danielli, J. F. ed.) Academic Press, inc., New York. 1: 399—422。
- [10] Couffer-Kaltenbach, J. and Perlmann, P., 1961. Antigens in eggs and developmental stages of the sea urchin: I. Immunological and physicochemical properties. *J. Biophysic. Biochem. Cytol.* 9(1): 93—104。
- [11] Fine, R. E. and Blitz, A. L., 1973. Tropomyosin in brain and growing neurones. *Nature (New Biol.)* 245(145): 182—186。
- [12] Fine, R. E. and Blitz, A. L., 1975. A chemical comparison of tropomyosin from muscle and non-muscle tissues. *J. Mol. Biol.* 95(3): 447—454。
- [13] Ogawa, Y. et al., 1958. Serological determination of developing muscle protein in chick embryo. *Nature* 181(4609): 621—622。
- [14] Perlmann, P. and Couffer-Kaltenbach, J., 1964. Antigens in eggs and developmental stages of the sea urchin: II. Localization. *J. Cell Biol.* 22(2): 307—316。
- [15] Wang, Y. L. and Taylor, D. L., 1979. Distribution of fluorescently labeled actin in living sea urchin eggs during early development. *J. Cell Biol.* 81(3): 672—679。
- [16] Weber, K. and Osborn, M., 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244(16): 4406—4412。
- [17] Whittaker, J. R., 1980. Acetylcholinesterase development in extra cells caused by changing the distribution of myoplasm in ascidian embryos. *J. Embryol. Exp. Morph.* 55: 343—354。

TIME AND SITE OF OCCURRENCE OF TROPOMYOSIN IN AMPHIOXUS EGG*

Wu Shangchin (S. C. Wu) Wu Houyu and Shi Dianzu

(*Institute of Oceanology, Academia Sinica*)

ABSTRACT

The differentiation of *Amphioxus* (*Branchiostoma belcheri tsingtauense* Tchang et Koo) egg occurs pretty early. Tung et al (1960) had successfully mapped the distribution of the formative substances during the 8-cell and 32-cell stages respectively. But so far, this has not yet been proved from muscle protein. This paper, therefore, undertakes to prove the time and site of occurrence of the tropomyosin in *Amphioxus* during their development, using the techniques of double diffusion in agar gel.

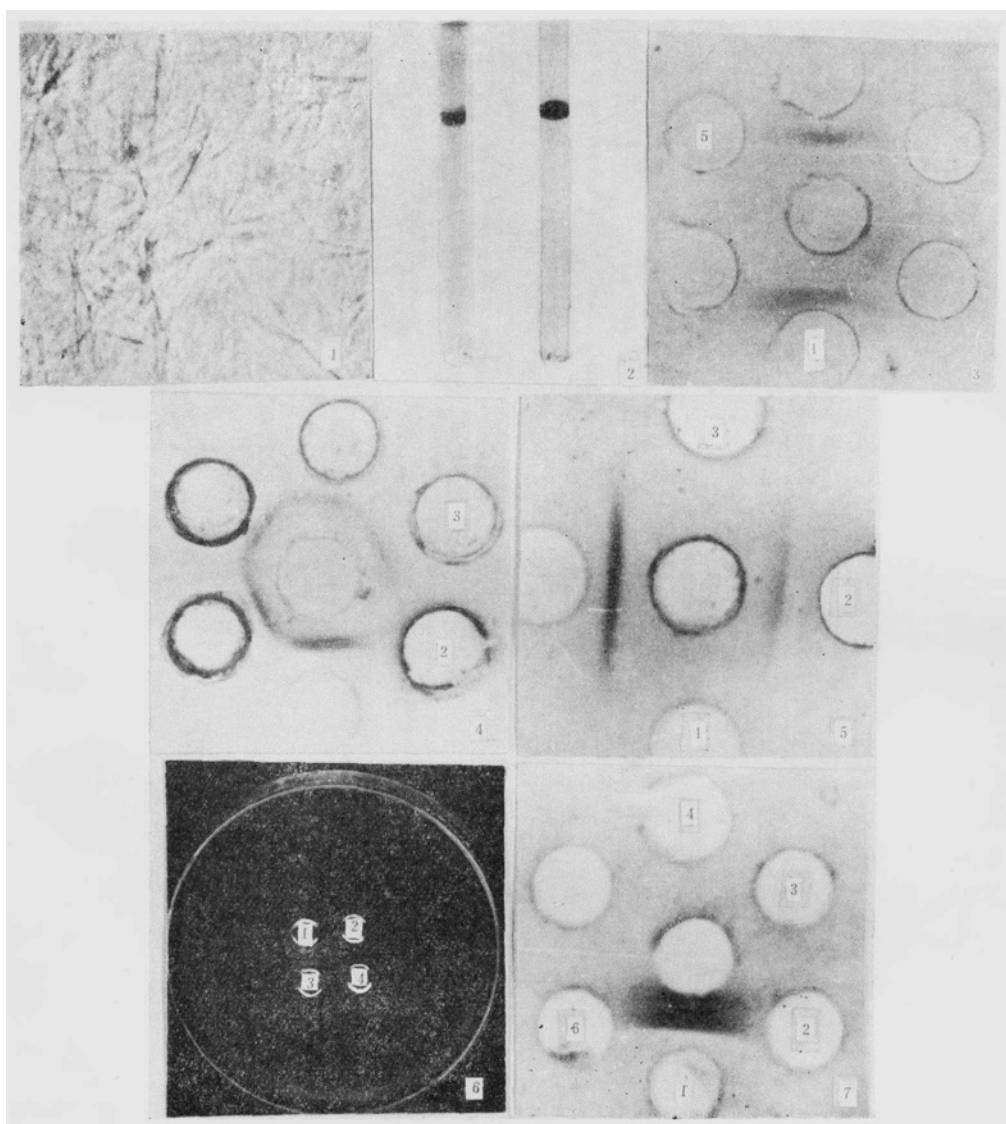
1. Tropomyosin was extracted from the muscle of adult *Amphioxus* and the classical crystal was obtained (Pl. I:1). Samples showing only one band as tested by the isoelectrofocusing (with gels 5% acrylamide plus 0.135% bisacrylamide included 1% Ampholine, pH 4—10, and with 1% amido black stain, see Pl. I:2b) Proves its purity. By means of sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis, an essential band was found in addition to two high molecular weight polypeptide (with gels being stained with Coomassie brilliant blue R 250, Pl. I:2a). Antibody of tropomyosin was obtained from rabbit.

2. The embryo of the different developmental stages (spermary, ovary, unfertilized egg, blastula and myomere) were homogenized and extracted as antigen of double diffusion. When antibody and antigen were added after 24 hours (25°C), all these occur in immune-precipitation bands apart from spermary (Pl. I:4 and I:5). Owing to the complex structure of the ovary, we can not decidedly say from the result mentioned above that tropomyosin was present in the ovarian oocyte.

3. The mature unfertilized egg was cut latitudinally to make the ratio of the animal to vegetal hemisphere 1:2, and double diffusion in agar gel, the vegetal half gives positive reaction whereas the animal half is negative (Pl. I:6).

4. We are of the opinion that the egg of *Amphioxus* has already its segregation along the A—V axis before fertilization.

* Contribution No. 705 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.



1. 文昌鱼原肌球蛋白结晶(相差显微镜 3375×)
2. a. SDS-凝胶电泳; b. 等电聚焦电泳。
3. 兔抗血清粗 γ 球蛋白, 经 DEAE11 柱层析后各峰对抗原双扩散反应
1, 4. 为峰 I; 3, 5. 为峰 II; 2, 6. 为峰 III
4. 胚胎发育各时期的双扩散反应
1. 成体抗原; 2. 精子; 3. 未受精卵; 4. 囊胚; 5. 原肠; 6. 肌节, 中心孔为抗血清。
5. 中心孔为抗血清
1, 3. 为精巢; 2. 卵巢; 4. 成体抗原。
6. 未受精卵横剖
1. 抗血清; 2. 动物性半球; 3. 植物性半球; 4. 提取液。
7. 抗原在水溶液状态保存一个月左右双扩散反应; 中心孔为抗血清; 1. 抗原。