

文昌鱼肌动球蛋白的一些生物化学 与免疫化学特性*

施奠族 吴厚余 吴尚勳
(中国科学院海洋研究所, 青岛)

提 要

从文昌鱼肌肉中提取并纯化了肌动球蛋白(简称AM)。实验证明: 该蛋白在ATP存在下, 粘度明显下降, 随着时间增加, 粘度有一定程度回升, 这一过程能反复, 但不能恢复到原有粘度水平。AM本身具有ATP酶活性, Ca^{2+} 对此有激活作用。AM兼具有胆碱酯酶活性。

利用文昌鱼不同胚胎发育时期及其切割材料, 通过免疫双扩散沉淀反应, 表明AM在成熟未受精卵就已存在, 并位于植物性半球。

肌动球蛋白(以下简称AM)是肌球蛋白与肌动蛋白多肽链的复合物, 形成肌肉收缩的关键物质。从本世纪六十年代起类似的收缩蛋白陆续在一些高等动物的非肌肉组织如脑、血小板和单细胞的变形虫, 植物绿海藻以及粘菌中发现。非肌肉系统的类肌肉蛋白与细胞分裂、分化、细胞支架, 细胞运动以及细胞膜功能活动等有着密切关系。前文已报道了原肌球蛋白(TM)在文昌鱼胚胎分化过程中出现的时间和位置^[1]。但是AM与TM在生物化学和免疫化学特性以及它们的生理功能之间存在着差异。目前对文昌鱼肌肉蛋白的研究发展较快^[2,9,11], 而对AM的特性报道至今尚未见到。

本文对文昌鱼AM的粘度、ATP酶活性、胆碱酯酶活性以及免疫化学等特性作了测定。

材 料 和 方 法

本实验主要工作在1963至1966年进行, 1979至1980年又作了部分补充。

1. 动物材料

文昌鱼(*Branchiostoma belcheri tsingtauense*, Tchang et Koo), 采于青岛市沙子口近海。

2. AM的制备与纯化

基本按 Mommaerts^[13]方法, 先将活文昌鱼去消化道与生殖腺, 在0°至4°C, 用石磨将文昌鱼磨碎, 肌肉糊以3至5倍体积之0.15M KCl洗涤5分钟后, 用2,000 r/min, 0°至2°C, 离心1小时, 弃上层液。肉渣以5倍体积之KCl-KPO₄缓冲液, 离子强度为1.0, pH 7.2, 置0°至4°C, 抽提18到24小时。混合物以2,000r/min离心1小时, 弃沉淀。上层液

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第1096号。
收稿日期: 1983年1月8日。

对 KCl-KPO₄ 缓冲液, 离子强度为 0.2, pH 6.6 透析, 待内外 pH 平衡, 充分沉淀后, 内透物以 10,000r/min 离心 35 分钟, 所得沉淀为 AM 粗制品。按此法反复以 pH 7.2, 离子强度 1.0 和 pH 6.6, 离子强度 0.2 之 KCl-KPO₄ 缓冲液交替进行溶解与沉淀而纯化三次以上, 最后溶解在 pH 7.2, 离子强度 1.0 之 KCl-KPO₄ 缓冲液中待用。

3. 粘度测定

按 Schachman 方法^[16]。双管奥氏粘度计, 毛细管长 12.5cm, 管直径 1.64mm, 蛋白浓度 18.1 mg/ml, 测定温度 25°C。对照组: KCl-KPO₄ 缓冲液, 离子强度 1.0, pH 7.2。

4. ATP 酶活性测定

基本按 Perry 方法^[15], 取 2.5 ml 0.2M 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液, pH 9.1, 在 25°C 水浴保温 10 分钟, 加 1ml 0.05M ATP-Na₂, 再加 1ml AM(18.1 mg/ml) 混和后立即取 0.5ml 混合液加入 1ml 15% 三氯醋酸中停止反应, 以后分别按 5, 10, 15, 20, 30 分钟取样, 按上法停止反应, 离心, 取上层液, 按 Summer 方法^[17]测定释放的无机磷。

5. 胆碱酯酶活性测定

依 Kövér 等人方法^[10], 乙酰胆碱的释放量按 Hestrin 方法^[8]测定。

6. 免疫双扩散反应

按 Coons 方法^[6], 将 6 次以上提纯的 AM 作抗原, 蛋白浓度为 7mg/ml, 加佐剂(生理盐水:无水羊毛脂:石蜡油:卡介苗=1:1:2:0.04), 每次注射 2ml, 注射兔皮下多部位。以后每隔一星期注射一次, 4 星期后心脏抽血或颈动脉放血。血清以 50% 饱和硫酸铵盐析纯化三次, 得抗体。琼脂经纯化后以 0.8% NaCl 混和, 加热溶解成 1% 浓度, 冷却后作免疫双扩散凝胶。

7. 化学试剂

ATP-Ba₂, 用时转化成钠盐。或直接用含量 85% 以上的 ATP-Na₂ (上海生化所东风生化试剂厂出品), 其余试剂均为分析纯, 皆用重蒸水配制。

实 验 结 果

1. AM 粘度特性

ATP 与 AM 之间能相互作用, 在 ATP 存在下, AM 粘度下降, 其结果见图 1。从图 1 可以看出, AM 粘度降低后, 随时间增加而有所恢复, 继加 ATP, 粘度再次下降, 每次恢复达不到原有水平, 下降幅度也不如开始时大。以 KCl 代替 ATP 作对照实验时, 其开始时的粘度下降, 前者远不如后者, 粘度恢复也不及实验组, 而且 KCl 的浓度远较 ATP 为高。说明粘度下降主要不是因为加盐溶液后使样品浓度降低所致, 而是 ATP 使 AM 解聚的结果。

2. ATP 酶特性

AM 和肌球蛋白(Myosin) 一样, 本身具有 ATP 酶活性, 在 Ca²⁺ 激活下, AM 能水解 ATP, 结果见表 1。从表 1 中可以看出, 在缺钙情况下 AM 所显示的 ATP 酶活力远较钙离子激活时为低。为了找到最适 Ca²⁺ 浓度, 测定了在不同钙浓度下对 ATP 酶活力的影响。结果见图 2。

从图 2 可知, 在 Ca²⁺ 最终浓度为 4mM 时, 就足可使 AM ATP 酶活力达到极大值。

3. 胆碱酯酶特性

文昌鱼 AM 不仅具有 ATP 酶活性, 而且还有水解乙酰胆碱的胆碱酯酶活性, 其结果

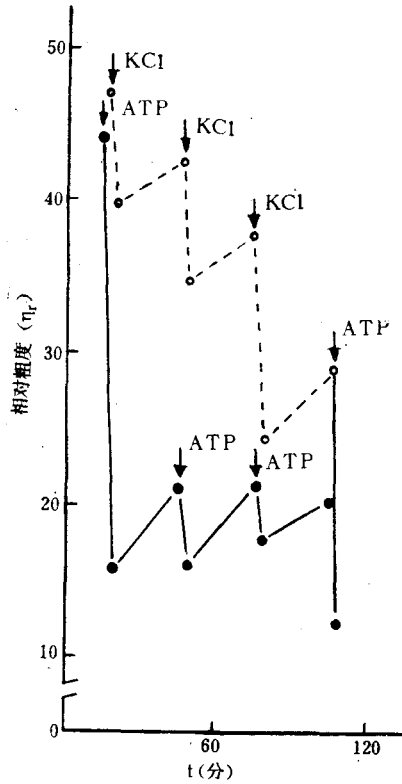


图 1 AM 粘度特性

--- ATP 影响; -○-○- KCl 影响。
(KCl 离子强度 1.0; ATP 浓度 0.05M)

表 1 文昌鱼 AM ATP 酶活力

Ca ²⁺	保温时间(分)	比活力 (Q _p)*
缺	10	0.03
缺	30	0.10
有	10	0.22
有	30	0.31

* Q_p = μmol 磷/mg 蛋白/min, Ca²⁺ 浓度为 0.1M。

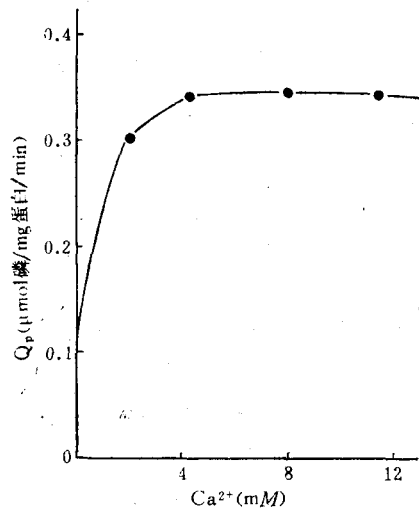


图 2 不同钙离子浓度对 AM ATP 酶活力影响

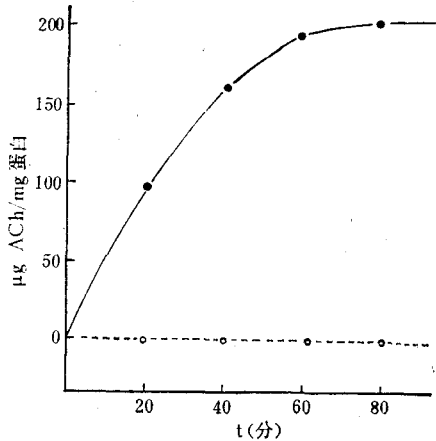


图 3 文昌鱼 AM 胆碱酯酶活性
(ACh 为乙酰胆碱)

--- 实验组;
...○... 对照组。

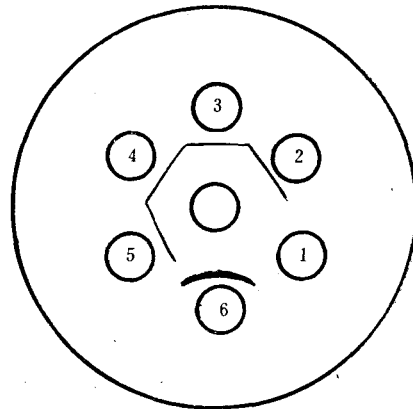


图 4 文昌鱼 AM 抗体与胚胎发育阶段
各不同时期抗原的双扩散沉淀反应
中心孔为 AM 抗体; 1. 精子; 2. 未受精卵; 3. 肌
节; 4. 原肠; 5. 卵膜; 6. 成体 AM 抗原,

	7	17		+++	--											(16细胞)				
1965	2	28																		
	6	13	+																	
	6	16		+	+		-													
	6	29					+													
	6	30	+	+	-															
	7	2		+	+															
	7	18					+													
	7	20		++	+-															
	8	5	+																	
		实验总数	11	11	10	5	5	5	5	6	6	5	5	5	5	6	6	5	5	1
			(+ 10)	(+ 11)	(+ 4)	(+ 5)	(+ 2)	(+ 6)	(+ 5)	(+ 2)	(+ 6)	(+ 5)	(+ 2)	(+ 5)	(+ 6)	(+ 4)	(+ 3)	(+ 3)	(+ 1)	(+ 1)
			(- 1)	(- 0)	(- 6)	(- 0)	(- 3)	(- 0)	(- 0)	(- 0)	(- 0)	(- 0)	(- 3)	(- 0)	(- 0)	(- 2)	(- 1)	(- 0)	(- 0)	(- 0)

* V 植物性半球; A 动物性半球; + 阳性反应; - 阴性反应。

** 表示同一日期连续做二次实验(余同)。

见图3。从图3可见,文昌鱼AM胆碱酯酶活力为每小时、每mg蛋白水解乙酰胆碱203 μg 。随着时间的变化,水解乙酰胆碱的产物增加,但水解速率在逐渐降低。

4. 免疫化学特性

利用文昌鱼AM抗体与胚胎发育时期各不同阶段抽提物作双扩散沉淀反应,结果见图4和表2。从图4和表2可以看出,文昌鱼AM在未受精的成熟卵子中就已存在,并分布在成熟未受精卵的植物性半球。

讨 论

从脊椎与无脊椎动物中制备AM的方法很多^[3-5,14],但基本上也是从兔肌中提取AM的各种改进方法,我们利用Mommaerts方法所提取的文昌鱼AM,同样具有和其它动物相类似的生化特性。

文昌鱼AM生化特性,目前尚缺乏同类的具体对比资料。Matsumoto^[12]曾报道过ATP对乌贼AM粘度的影响,认为ATP可使乌贼AM溶液的粘度下降,以后随着ATP的分解,粘度又恢复。我们的实验表明两者有类似的结果。

Flood^[7]曾利用组织化学方法证明在文昌鱼的运动中枢终板和神经脊索接合处存有胆碱酯酶,但Flood所用的是矛形文昌鱼(*Branchiostoma lanceolatum*, Pallas),而且未能直接用生化方法加以证明。我们用生化方法测定的青岛文昌鱼AM的胆碱酯酶活力,大致上和软体动物蛤与蜗牛的肌球蛋白胆碱酯酶活力^[10]相近,其结果比较见图5。

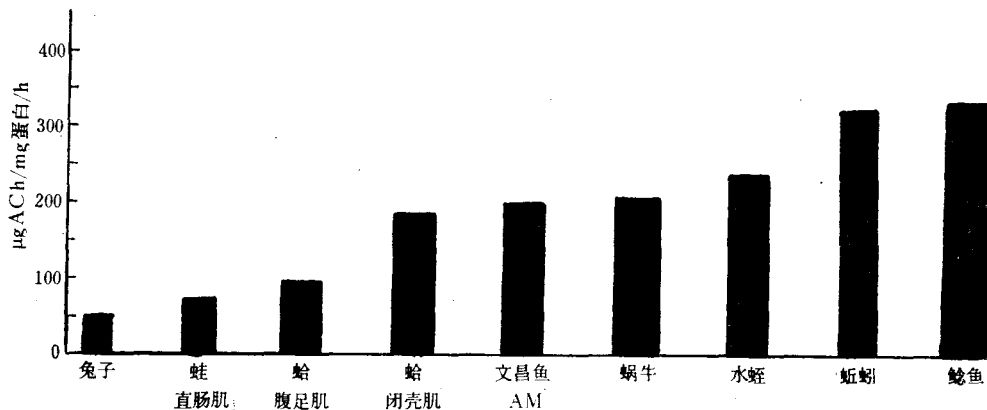


图5 从各种不同动物制备的肌球蛋白质胆碱酯酶活力比较
(ACh 为乙酰胆碱;文昌鱼为本实验数据,余为文献资料^[10])

森康益^[4]及高士令二^[3]等人曾分别对乌贼及鲤鱼的AM ATP酶活性作过测定,他们均认为 Ca^{2+} 对AM ATP酶活性有促进作用。森康益等人认为 Mg^{2+} 对 Ca^{2+} 效应有压抑作用,而高士令二等人认为 Mg^{2+} 存在时,KCl浓度高时(660mM),活力受影响,浓度低时,影响不大。 Ca^{2+} 对文昌鱼AM ATP酶活力同样具有明显的促进作用,但因未作 Mg^{2+} 实验, Mg^{2+} 是否对文昌鱼AM ATP酶活力有影响有待进一步证实。

前文已用免疫双扩散法肯定TM在文昌鱼未受精卵中存在,并分布在植物性半球部分,动物性半球未曾发现。本实验对胚胎发育不同阶段的处理以及切割方法均如前文所

述,其结果有所区别。AM 除植物性半球存在外,动物性半球也有出现。考虑到 AM 的分布范围比 TM 要广泛,在动物性半球存在 AM 是有可能性的,但因实验数据前后并不一致,尚难于定论,有待今后进一步探索。卵膜和精巢各作了一次实验,均为阳性反应,从 Tadashi 等人^[18]对海胆 TM 的实验,并考虑到 AM 和 TM 相配合的作用机理,AM 在卵膜中存在是可能的,但因实验数据尚不足,尚难作结论。精巢的情况较复杂,因其中可能含有结缔组织和肌肉组织,亦有待进一步试验。

参 考 文 献

- [1] 吴尚勳、吴厚余、施奠族,1982。文昌鱼原肌球蛋白在胚胎分化过程中出现的时间和位置。海洋与湖沼 **13**(3): 254—258。
- [2] 邹永水、龚祖坝,1978。文昌鱼副肌球蛋白纤维及其细微结构。生物化学与生物物理学报 **10**(4): 375—379。
- [3] 高士令二、新井健一、斎藤恒行,1970。鱼类肌肉構成たんぱく質に関する研究—II。コイ筋肉からアクトミオシンの調製について。日本水産学会誌 **36**(2): 169—172。
- [4] 森康 益、堀江 登、土屋隆英,1980。イカ筋アクトミオシン ATPase の性質(英文)。日本水産学会誌 **46**(12): 1533—1537。
- [5] Connell, J. J., 1958. Studies on the proteins of fish. 5. Molecular weight and shape of cod fibrillar proteins. *Biochem. J.* **70**(1): 81—91.
- [6] Coons, A. H., 1958. Fluorescent antibody methods. In *General Cytochemical Methods*. Danielli, J. F. ed., Academic press, New York. Vol. 1: 399—443.
- [7] Flood, P. R., 1974. Histochemistry of cholinesterase in Amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*, Pallas) *J. Comp. Neurol.* **157**(4): 407—437.
- [8] Hestrin, S., 1949. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical application. *J. Biol. Chem.* **180**(1): 249—261.
- [9] Kohler, L., J. A. Cox and E. A. Stein, 1978. Sarcoplasmic calcium-binding proteins in protochordate and cyclostome muscle. *Mol. Cell. Biochem.* **20**(2): 85—93.
- [10] Kövér, A. and T. Kovács, 1961. Investigations on the physiological role of myosin cholinesterase in phylogenesis. *J. Cell. Comp. Physiol.* **57**(2): 73—79.
- [11] Lucia, C-C. and L. Giulio, 1980. Structural and biochemical analysis of Amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*) paramyosin. *Eur J. Cell. Biol.* **22**(1): 319.
- [12] Matsumoto Juichiro J., 1958. The effect of ATP on the viscosity of squid actomyosin. *Bull. Japan. Soc. Scient. Fish.* **24**(5): 355—362.
- [13] Mommaerts, W. F. H. M., 1958. *Methods in Medical Research*. J. V. Warren, et al. eds. Year Book Medical Publishers, Inc, Chicago. Vol. 7: 1—68.
- [14] Nakayama, T., E. Niwa, I. Hamada, et al., 1979. Viscosity changes in carp actomyosin solution. *J. Food Science.* **44**(4): 1106—1109.
- [15] Perry, S. V., 1955. Myosin Adenosinetriphosphatase. *Methods in Enzymology*. (Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., eds, Academic Press Inc, Publishers, New York. Vol. II: 582—588.)
- [16] Schachman, H. K., 1957. (2) Ultracentrifugation, diffusion, and viscometry: IV. Viscometry. In "Methods in Enzymology" S. P. Colowick, and N. O. Kaplan, eds, Academic Press Inc, Publishers, New York. Vol. IV: 95—102.
- [17] Summer, J. B., 1944. A method for the colorimetric determination of phosphorus. *Science* **100**(2601): 413—414.
- [18] Tadashi Ishimoda-Takagi., 1979. Localization of tropomyosin in sea urchin eggs. *Exp. Cell. Res.* **119**(2): 423—428.

SOME BIOCHEMICAL AND IMMUNOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF AMPHIOXUS ACTOMYOSIN*

Shi Dianzu Wu Houyu and Wu Shangqin

(Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao)

ABSTRACT

Actomyosin (AM) from the muscle of adult *Amphioxus* whose digestive system and genital gland had been rejected was extracted and purified as described by Mommaerts^[13].

Using double-capillary tube-Ostwald viscometer we have demonstrated that the viscosity of AM greatly decreased in the presence of ATP and resumed to a certain extent with the hydrolysis of ATP. Ca^{2+} revealed marked activation at a final concentration of 4 mM to ATPase of AM. Its cholinesterase activity could break down 203 micrograms of acetylcholine/mg protein/h, which was similar to that of the myosin from the clam adductor and from the snail sole muscle^[10].

As described in previous paper^[11], by means of immunodiffusion tests we proved that AM existed in unfertilized mature egg and mainly distributed in vegetal hemisphere, but sometimes in animal hemisphere. Whether this is due to its wider distribution or to some other reason should be further investigated.

* Contribution No. 1096 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.