

半索动物门柱头虫副肌球蛋白 的分离与结晶*

吴厚余 施奠族

(中国科学院海洋研究所, 青岛)

邹永水

(中国科学院上海生物化学研究所)

提要 三崎柱头虫副肌球蛋白溶解在 0.6mol/L KCl (含 0.01mol/L 磷酸缓冲液, pH 7.0) 中, 然后分别对 0.1mol/L KCl (含 0.01mol/L 磷酸缓冲液, pH 6.0), 0.05mol/L MgCl₂, CaCl₂, BaCl₂ (后三者均含 0.05mol/L Tris-HCl, pH 8.0) 透析。副肌球蛋白的类晶体由于碱土金属离子不同而形成的形状亦有所不同。在电镜下观察到其类晶体或团聚体的轴周约 72 Å。从 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图表明柱头虫副肌球蛋白与紫贻贝 (*Mytilus edulis*) 副肌球蛋白的迁移率基本一致。

肌肉收缩蛋白之一的副肌球蛋白与其他几种收缩蛋白的分布范围不尽相同。自 Hodge^[1]首先从软体动物中分离出副肌球蛋白以来距今已整整三十年, 后来相继从环节、节肢、线形和棘皮等 7 个无脊椎动物门类中分离出并对某些物化特性进行了比较研究^[4,5]。国外有关学者^[8]认为副肌球蛋白广泛分布在无脊椎动物之中。

头索、尾索和半索动物门位于无脊椎动物和脊椎动物之间, 在动物进化上居于特殊的地位。Flood^[6]等利用电子显微镜从矛形文昌鱼 (*Branchiostoma lanceolatum*) 的脊索中观察到有副肌球蛋白 145 Å 的横纹周期以来, 邹永水等^[2,5]已从头索动物的青岛文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri tsingtaoensis* Tchang et Koo) 肌肉和尾索动物的玻璃海鞘肌肉中分离出副肌球蛋白和类副肌球蛋白。而半索动物门, 可能由于实验材料较难获得加上它们的肌肉系统又不发达之故, 至今未见有关报道。本文初步报道了从三崎柱头虫中分离出副肌球蛋白并对它在不同阳离子环境中形成的结晶和细微结构进行了观察, 对该蛋白在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的行为做了初步测定。

材料和方 法

1. 材料

三崎柱头虫 (*Balanoglossus misakiensis* Kuwano) 采自青岛附近海滩。用新鲜海水养

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 1267 号。

中国科学院海洋研究所电镜室拍摄电镜照片, 毛元兴同志协助制作照片, 表示诚挚谢意。

收稿日期: 1984 年 4 月 8 日。

一段时间让其吐出泥沙,然后用冷的 0.01mol/L 磷酸钾缓冲液 (pH7.0), 0.01mol/L 乙二胺四乙酸二钠, 0.001mol/L 氯化镁, 0.001mol/L 叠氮钠洗两次或用冷的重蒸水洗两次。然后浸泡于 95% 乙醇,隔日切成长约 2cm 的小段,制成酒精干制剂放干燥器里,并置于冰箱保存待用。

2. 副肌球蛋白的分离

基本按 Bullard^[9]的方法。每次用 50 条左右的柱头虫酒精干制剂,经石磨磨碎,然后将其浸泡于约 10 倍体积(V/W)的 1mol/L 氯化钾, 0.01mol/L 磷酸钾缓冲液 (pH7.5), 内含 0.01mol/L β -巯基乙醇, 0.001mol/L 叠氮钠(以后所有制备溶液中都含有此浓度的叠氮钠)的冷提取液内,放冰箱过夜,第二天再用组织捣碎器, 15,000r/min 匀浆 1 分钟,抽提两次。经 14,000g 离心 30 分钟,上清液对 0.1mol/L 氯化钾, 0.01mol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 6.0)透析,直至平衡。离心收集沉淀,将其溶于 0.6mol/L 氯化钾, 0.01mol/L 磷酸钾缓冲液 (pH7.4),并对同样溶液透析过夜。经东德 VAC-602 型超离心机 34,000r/min(约 100,000 g)离心 30 分钟,上清液再对上述 pH 6.0 溶液透析。反复纯化三次以上,每次离心为 100,000g 1 小时,最后一次纯化蛋白溶于 0.6mol/L 氯化钾, 0.01mol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.0)。在紫外分光光度计(国产 751-G)下测得 278 和 260 的比值为 1.5 左右。

3. 结晶的形成与观察

经三次以上纯化的蛋白溶液分别对 0.1mol/L 氯化钾(含 0.01mol/L 磷酸钾缓冲液, pH6.0), 0.05mol/L 氯化镁、氯化钙和氯化钡(后三者均各含 0.05mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸, pH8.0)透析,获得的结晶在相差显微镜下观察。

电子显微镜的观察与样品的制备基本同前^[6],用 2% 醋酸铀负染,在日立 H-500 型电子显微镜下观察。

4. 十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳

按 Bullard 等改进的 Weber & Osborn 方法^[9]。蛋白样品解聚处理后,对含有 1% SDS 的 0.01mol/L 磷酸钠缓冲液透析,加等体积的保温液(3% SDS, 0.03mol/L 磷酸钠缓冲液, pH7.0, 2.6mol/L β -巯基乙醇, 12% 甘油, 0.007% 溴酚蓝),在 100℃ 水浴里保温 5 分钟,冷至室温,每根胶管加 20 至 50 μ g 蛋白的样品。电泳后,凝胶条用 50% 甲醇内含 7% 醋酸溶液固定 30 分钟以上。0.25% 考马斯蓝 R-250 染色。在 40℃ 左右的脱色液里脱色。

实验全过程所用的试剂都用玻璃重蒸水配制。除甲叉双丙烯酰胺, β -巯基乙醇,考马斯蓝 R-250 等进口外,其余均为国产分析级试剂。蛋白浓度测定用双缩脲法。样品制备和离心的温度在 0—4℃。

结 果

从柱头虫的酒精干粉中抽提的副肌球蛋白,最后一次纯化溶解于 0.6mol/L 氯化钾, 0.01mol/L 磷酸钾缓冲液(pH7.0),蛋白浓度约 3mg/ml,分别对 0.05mol/L 氯化钡、氯化钙或氯化镁各含 0.05mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸(pH8.0)的溶液透析。在氯化钡溶液里形成的结晶在相差显微镜下观察到短而粗的针状结晶(图版 I:a),在电子显微镜下可以见到很多分叉的针状结晶(图版 II:a);在氯化钙溶液里却形成蜘蛛网状的结晶(图版 I:b);

而在氯化镁溶液里则可以聚合成松树枝状的结晶(图版 I:c)。从以上结果说明,在碱土金属离子环境里,由于介质不同,类结晶聚合的形状和大小也有所不同。

在碱土金属离子的盐溶液里形成的类晶体较大,不太适合用作电镜观察样品,故我们用于观察细微结构的样品主要是在 0.1mol/L 氯化钾, 0.01mol/L 磷酸钾缓冲液 (pH6.0) 条件下形成的结晶。其细微结构可以较为清晰地呈现横纹周期为 72—73 Å 的图象(图版 II:b)。图版 II:c 是高倍下拍摄经放大的横纹周期照片,但没有观察到象软体动物^[6]、节肢动物^[9]等 725 Å 左右的大横纹周期。我们的观察结果和一般软体动物副肌球蛋白结晶中的 70 Å 基本横纹周期相近。

图版 I:d 为紫贻贝和柱头虫副肌球蛋白以及兔横纹肌原肌球蛋白同时进行的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图形。从图版 I:d-2 中可以看出柱头虫副肌球蛋白主带的迁移率与软体动物紫贻贝的副肌球蛋白(图版 I:d-1) 基本一致,故我们推测它的亚单位分子量与紫贻贝副肌球蛋白的亚单位分子量大致相同。但从图版 I:d-2 可以明显看出在其主带下方有一条比兔原肌球蛋白(图版 I:d-3) 分子量大的染色带存在。

讨 论

副肌球蛋白又称为“不溶性”原肌球蛋白^[7]。在 pH 值 6.0—7.5, 离子强度 0.05—0.45 的范围可以形成结晶。但 Melson 和 Cowgill^[12] 亦在高离子强度、低 pH 值下纯化副肌球蛋白。我们从柱头虫酒精干粉中分离出副肌球蛋白,对有机溶剂稳定,在低离子强度 ($I=0.15$; pH6.0) 的条件下不溶解。这一特性与典型副肌球蛋白类同。

副肌球蛋白的横纹周期不尽一致,较为典型的象软体动物^[6]、昆虫^[9]等的副肌球蛋白,既有 725 Å 左右的横纹周期又有 145 Å 左右的横纹周期。但海胆^[14]却只有平均 154 Å 的轴周期。从 Winkelman^[13] 对 7 个无脊椎动物门 12 种动物的比较研究中可以看出,即使同一个纲而不同属的海参,其类结晶横纹周期亦不一样,如瓜海参属的 *C. lactea* 副肌球蛋白既有 725 Å 又有 145 Å,而海参属 *H. forskali* 却只有 145 Å 的横纹周期。最近陈明等^[4] 报道在蜜蜂间接飞翔肌里所分离的副肌球蛋白观察到 130 Å, 691 Å 和 362 Å 左右的横纹周期,而柱头虫副肌球蛋白在 0.1mol/L 氯化钾、0.01mol/L 磷酸钾缓冲液 (pH6.0) 或在 0.05mol/L 氯化镁、0.05mol/L 三羟甲基氨基甲烷 (pH8.0) 的条件下观察到只有平均横纹周期 72—73 Å。从以上分析的结果是否可以说横纹周期不一致是由于种属不同而产生或是反映 α 、 β -副肌球蛋白之故^[14],值得继续探讨。

副肌球蛋白的分子量一般在 200,000—220,000 道尔顿(Dalton)^[15]。我们从 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳所得到的图形可以看出,柱头虫副肌球蛋白的主带与双壳类的紫贻贝中制得副肌球蛋白的主带迁移率基本一致。但其主带下方尚有一条占蛋白量较大的染色带,该成分在第一次粗提取液所制备的电泳胶带上就出现,直至经多次超离心纯化样品所制备的电泳胶带上的位置和染色带的比例基本不变。它的成分是否是副肌球蛋白的亚基或其他蛋白组分,有待于进一步澄清。

副肌球蛋白分布在无脊椎动物中,而在低等的原生动物、海绵动物和腔肠动物中至今尚未见到报道。然而在文昌鱼的脊索中已发现它的存在^[10]。我们在文昌鱼未受精卵子中发现原肌球蛋白,它主要分布在植物性半球^[11]。最近,我们又在海胆未受精卵子中发现类

副肌球蛋白的存在^[3]。近几年研究结果说明, 副肌球蛋白广泛分布在头索动物及其以下的低等动物中, 至于比头索动物更高等动物的组织或器官中是否亦存在, 我们正在进一步研究。

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**(5): 254—257。
- [2] 邹永水、沈菊英, 1979。文昌鱼副肌球蛋白的分离与结晶。科学通报 **24**(13): 615—616。
- [3] 吴厚余、施奠族, 1982。海胆未受精卵存在类副肌球蛋白。海洋科学 **3**(总 21 期): 18—21。
- [4] 陈明、范世藩, 1982。蜜蜂间接飞翔肌肌纤维副肌球蛋白的鉴定。生物化学与生物物理学报 **14**(1): 94—96。
- [5] 邹永水、沈菊英、曹天钦等, 1980。脊索动物海鞘的类副肌球蛋白。生物化学与生物物理学报 **12**(4): 339—342。
- [6] 曹天钦、龚祖坝、邹永水等, 1963。原肌球蛋白和副肌球蛋白晶体的电子显微镜观察。生物化学与生物物理学报 **3**(2): 206—219。
- [7] Bailey, K., 1956. Invertebrate tropomyosin. *Biochem. J.* **64**: 9.
- [8] Bailey, K. and J. C. Rüegg, 1960. Further chemical studies on the tropomyosins of lamellibranch muscle with special reference to pecten maximus. *Biophys. Biochem. Acta.* **38**(2): 239—245.
- [9] Bullard, B., B. Luke and L. Winkelman., 1973. The paramyosin of insect flight muscle. *J. Mol. Biol.* **75**(2): 359—367.
- [10] Flood, P. R., D. M. Guthrie and J. R. Banks, 1969. Paramyosin muscle in the notochord of amphioxus. *Nature* (London) **222** (5188): 87—88.
- [11] Hodge, A. J., 1952. A new type of periodic structure obtained by reconstitution of paramyosin from acid solution. *Proc Natn. Acad. Sci. U. S. A.* **38**: 850—855.
- [12] Melson, G. L. and R. W. Cowgill, 1976. Comparison of the muscle protein paramyosin from different molluscan species. *Comp. Biochem. Physiol.* **55B** (4B): 503—510.
- [13] Merrick, J. P. and W. Johnson., 1977. Solubility properties of α -reduced paramyosin. *Biochem* **16** (10): 2260—2264.
- [14] Obinata, T., S. Takayuki and M. Satoru., 1975. Sea urchin paramyosin. *Int. J. Biochem.* **6**: 569—574.
- [15] Winkelman, L., 1976. Comparative studies of paramyosin. *Comp. Biochem. Physiol.* **55B**(3B): 391—397.
- [16] Zou, Y. S., C. Y. Shen and T. C. Tsao, 1980. Chordate paramyosin. *Nucleic acids and proteins, Proc. Symp.* Edited by Shen, Z. W., Sci. Press, Beijing, pp. 127—137.

ISOLATION AND CRYSTALLIZATION OF BALANOGLOSSUS PARAMYOSIN*

Wu Houyu, Shi Dianzu

(Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao)

and

Zou Yongshui

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica)

ABSTRACT

It has generally been accepted that *Balanoglossus misakiensis* Kuwan was an animal belonging to the Phylum Hemichordata. In this paper, the extraction, crystallization and characterization of paramyosin from ethanol-dried *Balanoglossus* muscle are briefly described.

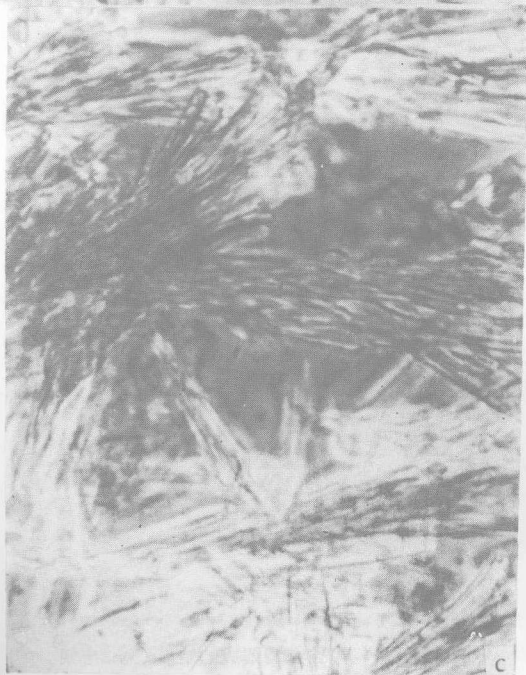
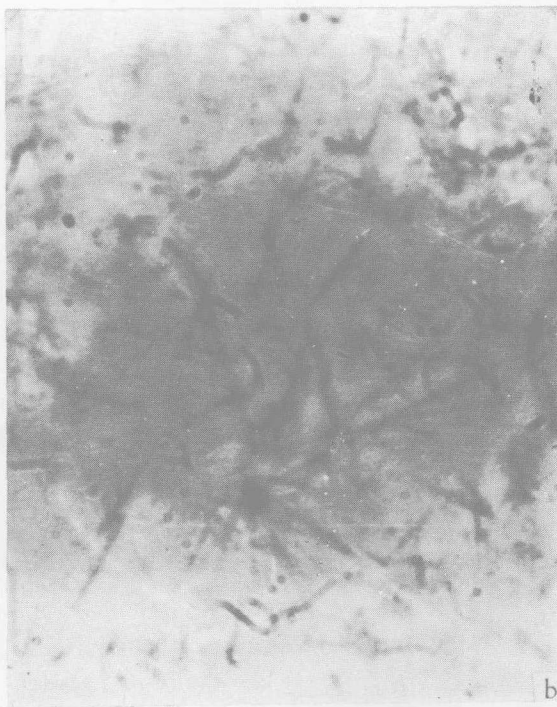
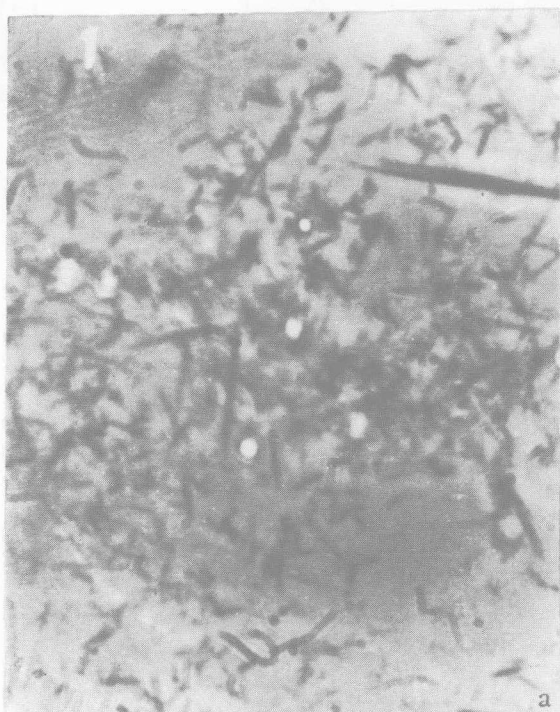
1. *Balanoglossus* paramyosin could be dissolved in 0.6 mol/L KCl containing 0.01 mol/L phosphate buffer (pH 7.0), and then precipitated and crystallized upon dialysis against either 0.10 mol/L KCl containing 0.01 mol/L phosphate (pH 6.0), or 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) containing 0.05 mol/L MgCl₂, CaCl₂ and BaCl₂, respectively. Paracrystals of *Balanoglossus* paramyosin thus formed showed differences in aggregate state according to its cationic conditions.

2. Under electron microscope the paracrystals or tactoids of paramyosin gave an axial periodicity of about 72Å, however, no striation of 725 Å has yet been found.

3. From the pattern of *Balanoglossus* paramyosin prepared in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, one could see a similarity in mobility comparing with that of *Mytilus edulis*.

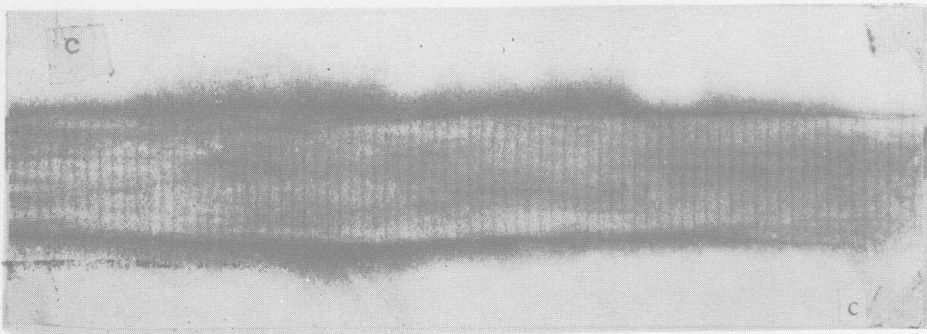
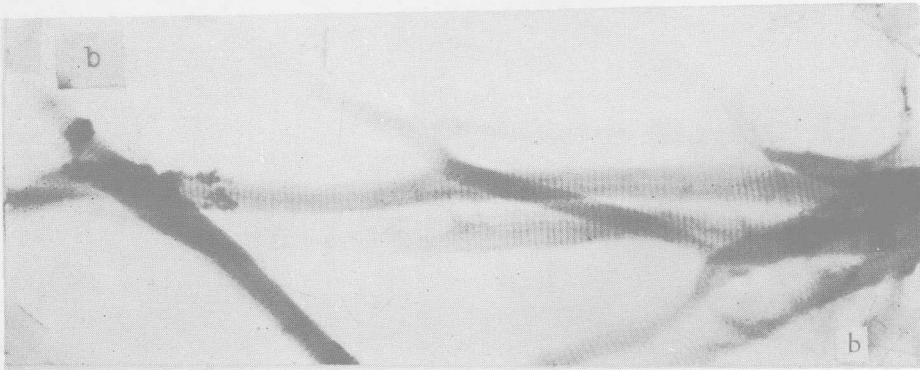
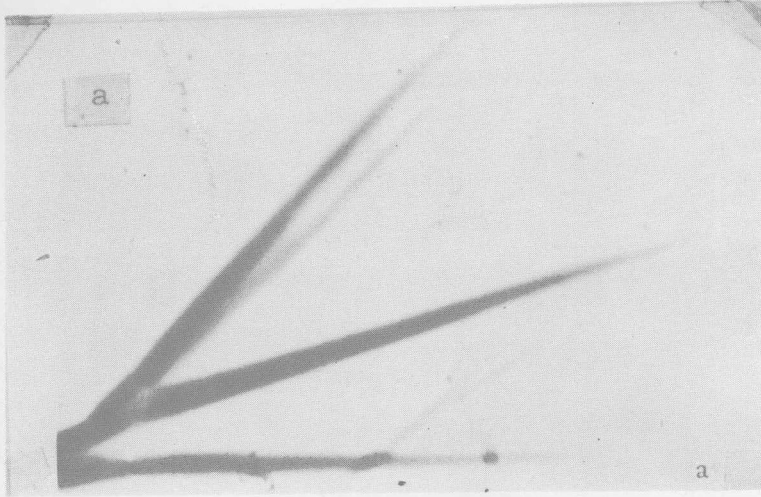
Conclusively, the establishment of paramyosin in *Balanoglossus* are just filling up the gap in the distribution of this contractile protein in animals from echinodermate to urochordate and cephalochordate.

* Contribution No. 1267 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.



a. 柱头虫副肌球蛋白在 0.05mol/L BaCl₂ 内含 0.05mol/L Tris-HCl (pH8.0)溶液里形成的结晶(相差显微镜照片); b. 柱头虫副肌球蛋白在钨盐溶液里形成的结晶 (相差显微镜照片); c. 柱头虫副肌球蛋白在镁盐溶液里形成的结晶(相差显微镜照片); d. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图(胶浓度 7.5%)

1. 紫贻贝副肌球蛋白; 2. 柱头虫副肌球蛋白; 3. 兔原肌球蛋白



a. 柱頭副肌球蛋白在 0.05mol/L BaCl₂ 内含 0.05mol/L Tris-HCl(pH8.0) 溶液里形成的结晶(低倍电镜照片); b. 柱頭蟲副肌球蛋白的微細結構(电镜照片); c. 柱頭蟲副肌球蛋白的微細結構(电镜照片)。