

用免疫细胞化学方法研究文昌鱼卵子成熟前后原肌球蛋白的分布及变化*

徐奇虹

吴尚勳

(北京师范大学)

(中国科学院海洋研究所, 青岛)

提要 本文用免疫细胞化学方法对文昌鱼原肌球蛋白在成熟前后的卵子中的分布及变化进行了观察和研究, 并将其在亚微结构上进行了定位。结果表明: 在卵巢中的较大的未成熟的卵母细胞上就已有原肌球蛋白的存在, 主要分布在内滤泡层及卵内的某些卵黄颗粒上, 皮质颗粒上也存有少量; 在成熟卵中, 原肌球蛋白则大量存在于所有的卵黄颗粒上, 皮质颗粒也有少量存在; 在量上是由动物极到植物极逐渐递增, 这和卵黄颗粒的分布是一致的。

早期胚胎的细胞分化问题是发育生物学研究的主要方面。文昌鱼的胚胎兼有发育典型、易于观察的优点, 加之在进化上的特殊地位, 长期以来就是进行细胞分化研究的理想材料。童第周等利用实验胚胎学方法^[1,2]证明: 文昌鱼卵子分化得很早, 在尚未受精的成熟卵子的卵质内已有了区域性分化。此外, 还制作了8细胞和32细胞时期的预定器官形成图谱。

关于“预定器官形成物质”是以什么形式存在和表现的, 细胞质及其内部诸因子如蛋白质、mRNA、细胞器在分化中的作用及两者的关系一直是人们研究的重点。许多人把注意力集中在寻找和研究组织分化的指标^[3], 特别是特殊蛋白质(包括酶)在胚胎中的出现及其区域性分布, 以期进一步探讨“预定器官形成物质”及细胞分化的本质。原肌球蛋白(Tropomyosin, TM)是肌肉中的一种主要蛋白质, 它在分化中的作用也得到了人们的重视。吴尚勳等^[2]用实验手术和生化方法证明: 在文昌鱼卵巢及成熟卵内都已存在TM; 成熟卵内偏动物性半球的1/3部分无TM, 而在下面的2/3部分则有TM。蔡难儿等^[4]用免疫荧光方法进行定位, 认为在卵巢中TM只存在于卵巢壁和滤泡细胞内, 卵母细胞中没有; 在成熟卵中卵表面膜及卵质外层有较多的TM, 植物性半球的TM多于动物性半球。本文应用免疫细胞化学方法对成熟前后的卵子中TM的分布及变化进行观察和研究, 目的在于利用灵敏度较高的方法对TM出现的时间及分布作进一步深入的研究, 同时对其在亚微结构水平上进行定位, 以期进一步探讨TM和细胞分化的关系。

一、材料和方法

1. 取材、固定及切片

材料系青岛沙子口的文昌鱼(*Branchiostoma belcheri tsingtaoense* Tchang et Koo)。分别取4月底的卵巢、7月中旬产卵季节早晨和晚上排卵时间的卵巢及已排出体外的成

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第1835号。收稿日期: 1988年3月24日。

1) 童第周、吴尚勳、叶毓芬, 1958。文昌鱼卵子受精前构造的研究。全国胚胎学学术会议论文集摘要, 31页。

熟卵。

以 2.5% 戊二醛(0.1mol, pH7.4PB 配制)在 4℃ 预固定两小时,以 4% 锇酸(0.1mol, pH7.4PB 配制)于 4℃ 后固定一小时。乙醇脱水。以 Embed 812 包埋。LKB-V 型切片机切片,镍网捞片。

2. 免疫细胞化学方法(抗体-胶体金法)^[1]

脱锇酸和树脂: 5% H₂O₂ 处理切片 5min。正常羊血清(1:20)封闭 1 h。兔抗 TM 的工作液(1:700)孵育过夜。以胶体金(15nm)标记的羊抗兔血清(Anti-Rabbit Goat Serum-Gold, ARGG)的工作液(1:10)孵育 1 h。以上实验均在室温下进行。

浅染色,醋酸双氧铀染 10min,柠檬酸铅染 3—4min。Jeol-CX100、H-500 型电子显微镜观察和拍照。

3. 对照实验

PBS 代替一抗。兔抗人促胃泌素释放激素(GRP)代替一抗。

二、结 果

1. 4 月底卵巢中的卵母细胞

电镜下可见此时卵巢内含三种不同类型的卵母细胞。A 类卵: 个体较小, 卵子直径为 5—10 μm。生发泡很大, 占卵子体积的 1/2—1/3, 具环状或块状核仁。细胞质中含有一定数量的线粒体, 也可见高尔基体。卵膜为单层质膜, 外被一层外滤泡层^[10](图版 I:2)。B 类卵: 个体较 A 类卵明显增大许多。具有大的生发泡和块状核仁。卵质中散在着少量的线粒体、高尔基体、光面内质网和皮质颗粒, 并可见卵黄核^[6]。该类卵的最重要特征是, 在质膜和外滤泡层之间有一层来自滤泡细胞的内滤泡层^[10]。C 类卵: 和 B 类卵相比, 除了个体明显增大及生发泡相对减小外, 该卵最明显的标志是卵质中已出现卵黄颗粒。另外在质膜和内滤泡层之间出现了滤泡细胞形成的滴形颗粒, 其中一些颗粒之间已有了溶合现象(图版 I:1)。

应用抗体-胶体金法, A 类卵没有显示出特异性的胶体金颗粒即 CG(图版 I:2)。对于 B 类卵, 生发泡和卵质上均无特异性的 CG, 但在内滤泡层上却显示了一定数量的特异性 CG(图版 I:3)。在 C 类卵中, 明显地在某些卵黄颗粒上出现了一定量的特异性 CG, 且多集中在电子密度较高的区域; 而在另一些卵黄颗粒上则没有或有很少的 CG(图版 II:1); 在皮质颗粒上也有少量的特异性 CG。在卵表面, 除了内滤泡层仍有 CG 外, 质膜、外滤泡层和滴形颗粒上均没有(图版 II:2)。

2. 7 月中旬卵巢中的卵母细胞

(1) 早晨固定的卵巢 卵巢内充满了即将成熟的卵母细胞, 生发泡尚未破裂。电镜下, 将之和 4 月底的 C 类卵相比, 可见卵黄颗粒有所增多, CG 仍只存在于某些卵黄颗粒上(图版 III:1)。质膜外的滴形颗粒已基本连成一圈, 且可见卵子有微绒毛伸向其中, 内滤泡层已变得很薄, 仍有少量的 CG 分布在上(图版 II:3)。

(2) 晚上固定的卵巢 在晚上产卵时间所固定的两个卵巢中的卵母细胞已发生了本质的变化。首先, 没有生发泡; 其次, 在电镜下可见皮质颗粒已迁移到表皮层; 再者卵外只包有一层由滴形颗粒连接而成的卵黄膜。由于这类卵母细胞和排出体外的成熟卵在形

态上和 TM 的分布上是一致的,可以认为是成熟了的、即将排出体外的卵母细胞,故将之
和成熟卵一起描述。

3. 成熟卵

电镜下,卵黄膜是由许多电子密度颗粒构成的,颗粒四周有突起,彼此连成网状结构,
膜的厚度大致均匀,内、外表面不被单位膜。卵黄膜和质膜间的距离不等,在两者相近的
地方可见有微绒毛伸向其中(图版 III:2)。应用抗体-胶体金法测定,在卵黄膜上没有 CG,
仅在皮质颗粒上则有少量的分布。卵基质、细胞器上仍不见有特异性 CG(图版 III:3, 图
版 IV:1)。在对卵黄颗粒进行观察时,发现有大量的 CG 分布在上面,且和未成熟卵有明
显的不同。首先,CG 由原来的主要分布于中央区域的高电子密度部位变成了主要存在
于表面和中央的低电子密度部位(图版 III:3);其次,我们发现,在成熟卵中的所有卵黄颗
粒上均没有 CG(图版 IV:1)。

此外,电镜下我们把荧光镜中看到的一些无荧光的块状区域进行放大,发现这些区域
是由许多光面内质网构成的,并且内质网之间都相互连接,这一结构吴尚勳等¹⁾称之为“小
岛”。小岛上没有特异性 CG 出现(图版 IV:2)。

4. 对照实验

兔抗人 GRP 的工作液代替一抗,GRP 是文昌鱼卵内不存在的抗原。结果为阴性。
PBS 代替一抗,呈阴性(图版 IV:3)。

三、讨 论

1. 关于 TM 出现的时间及形成方式

对于 TM,目前较多地集中在研究其亚微结构、分布和不同来源的 TM 的生化特性²⁾,
而对其进行发育生物学的研究,目前仅见于文献[2],[5]。吴尚勳等用生化等方法证明卵
巢内已有少量的 TM 存在,但不能确定其存在的位置。蔡健儿等使用免疫荧光法发现:
TM 只存在于卵巢内的滤泡细胞和卵巢壁上,而卵母细胞内没有。本实验应用免疫细胞
化学的方法证明,在 4 月底的 C 类卵内就已有少量的 TM 存在。考虑同蔡的结果不一致
的原因,是方法不同造成的。因为在未成熟卵内 TM 只存在于某些卵黄颗粒上,且此时卵
黄颗粒不多,故 TM 含量较少,使免疫荧光法较难测出,而灵敏度较高的免疫细胞化学方
法则可以测出。至于 TM 究竟出现在什么时候的卵母细胞内,还有待于进一步的实验观
察。但至少由本实验结果可以确认,在成熟前的卵母细胞内就已有少量的 TM 存在。

Reverberi 等认为,文昌鱼的卵黄核具有形成卵黄颗粒的能力^[1]。王德海²⁾对文昌鱼
卵母细胞进行超微结构观察,发现内质网、线粒体和高尔基体都可以形成卵黄颗粒。我们
分别对这些细胞器进行了详尽的观察,没有发现有特异性的 CG 分布。实验结果还表明:
在未成熟的卵母细胞中某些卵黄颗粒上有 TM,另一些则没有;一旦卵子成熟,所有的卵
黄颗粒上都有 TM。由此推测,TM 不是随着卵黄颗粒的形成而一同合成的,而可能是在
卵黄颗粒之外合成,通过某种途径运送上去的。

李明等^[3]从文昌鱼卵巢中的卵母细胞内提到少量的原肌球蛋白聚核糖体核糖核酸

1) 吴尚勳、宋裕昌,1983。文昌鱼卵子成熟前后的形态变化。1983 年全国细胞生物学会论文摘要汇编,163 页。

2) 王德海,1982。文昌鱼卵母细胞发生过程的细胞学研究。

(TM-pRNA),并由翻译和反转录的结果推测,该卵内很可能有 TM-mRNA 的存在。那么未成熟卵内的少量 TM 是如何形成的? 我们认为有两种可能:(1)由卵内的 TM-mRNA 翻译形成;(2)由内滤泡层输送到卵内,当卵子一旦成熟,TM 的含量明显增多,且所有的卵黄颗粒上都有。从图版 III:3 可以看到,即将成熟的卵母细胞的内滤泡层已变得很薄,其上的 TM 也已不多。由此,对于成熟卵中剧增的 TM 来说,无论是就其形成的量还是形成的速度看都不象是来自内滤泡层,而很可能是由于生发泡破裂时,放出或产生某种物质刺激了 TM 的翻译或转录及翻译系统,从而导致了 TM 迅速而大量的合成。

2. 原肌球蛋白的分布和预定器官物质形成图谱的相关性

吴、蔡和我们观察的结果都表明:文昌鱼成熟卵中 TM 已有了区域性分布,在动物性半球的上面一部分几乎没有 TM,以此向植物极呈递增分布^[2,5]。就目前的报道看, TM 存在于脑、神经、骨骼肌、平滑肌、血小板、结缔组织、胰脏等^[6],其中脑来自神经外胚层,胰脏来源于内胚层,其它均来自于原始中胚层。从童第周等所做的“8 细胞和 32 细胞预定器官形成物质分布图”^[5]可以看到,动物性半球的下半部分是预定神经区,植物性半球则包括预定中胚层和内胚层;另外未受精的成熟卵的切割实验证明,这个时期的卵质已有了区域性分化,且“和 8-细胞时期经过第三次分裂面分开是一样的”。在此我们推测,文昌鱼的成熟卵中可能已存有“预定图”的雏形,至少 TM 在成熟卵中已有了和“预定图”相应的区域性分布。进一步推测, TM 作为肌肉中的一种主要蛋白质,其特有的、和“预定图”相应的区域性分布,势必同细胞分化尤其是中胚层的分化有一定的关系。

3. 卵黄颗粒和细胞分化的关系

我们都知道卵黄颗粒在胚胎发育中的营养功能,但对它在发育过程中的其它作用却研究不多。Hanocq-Quertier^[8]等证明 *Xenopus laevis* 和 *Pleurdeles* 的卵黄颗粒上有 DNA。Perlmann^[10]证明,海胆 *Paracentrotus lividus* 受精卵中的六种蛋白质抗原,至少有两种存在于卵黄颗粒上。这些都间接地说明,卵黄颗粒作为早期胚胎发育过程中的临时性结构,不仅同此期重要的生命需要——营养有关,也同这一时期其它的生命活动有一定的关系。本实验表明,成熟卵中的 TM 主要存在于卵黄颗粒上, TM 的区域化是同卵黄颗粒的区域性分布相一致的。如果说 TM 的区域性分布影响了细胞分化,那么也可以说明卵黄颗粒在此也起了一定的作用,至少是一个载体。几乎所有的卵黄颗粒都有一定程度不同的区域性分布,由此可知,分布在卵黄颗粒上的蛋白质等在卵质中也出现了区域性分布,这就可能会影响到发育过程中细胞质对核的作用,进一步影响到细胞的分化。那么是什么引起卵黄颗粒的区域性分布? 这和细胞骨架之间有什么关系? 它又是如何影响细胞分化的? 这些都有待深入的研究和探讨。

参 考 文 献

- [1] 北京农业大学兽医学院胚胎组,1984. 免疫组织化学. 北京农业大学出版社, 100—103 页。
- [2] 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。
- [3] 李明、于富才、吴贤汉等,1982. 文昌鱼原肌球蛋白聚核糖体核糖核酸的分离. 海洋与湖沼 13(4): 325—330。
- [4] 童第周、吴尚勳、叶毓芬,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): 81—92。
- [5] 蔡难儿、吴贤汉、吴尚勳,1985. 文昌鱼原肌球蛋白在卵球成熟过程中的出现. 实验生物学报 18(3): 361—367。

- [6] Adiyodi, K. G. & R. G. Adiyodi, 1983. Reproductive Biology of Invertebrates. Volume I: Oogenesis, Oviposition, and Oosorption. John Wiley and Sons Ltd., pp. 735—752.
- [7] Fine R. E. & A. L. Blitz, 1975. A chemical comparison of tropomyosins from muscle and non-muscle tissues. *J. Mol. Biol.* **95**: 447—454.
- [8] Hanocq-Quertier, J., E. Baltus, A. Ficq et al., 1968. Studies on the DNA of *Xenopus laevis* oocytes. *J. Embryol. Exp. Morph.* **19**(2): 273—282.
- [9] Jeffery, W. R. & R. A. Raff, 1983. Time, Space, and Pattern in Embryonic Development. Alan R. Liss, Inc. New York, pp. 157—169.
- [10] Perlmann, P. & J. Couffer-Kaltenbach, 1964. Antigens in egg and developmental stages of the sea urchin II. Localization. *J. Cell Biol.* **22**: 307—316.
- [11] Reverberi, G., 1971. Experimental Embryology of marine and fresh-water invertebrates. North-Holland Publ. Co, Amsterdam, London, pp. 551—556.

DISTRIBUTION OF TROPOMYOSIN IN OVARIAN EGGS AND MATURE UNFERTILIZED EGGS OF AMPHIOXUS*

Xu Qihong

and

Wu Shangqin (S. C. Wu)

(Beijing Normal University)

(Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao)

ABSTRACT

Efforts are made to reveal the nature of differentiation through studying the distribution of some factors in cytoplasm, especially cell organelles, mRNA and special proteins (including enzymes). S. C. Wu (1982, 1985) was the first to study TM, a main kind of muscular proteins, in the field of developmental biology by using biochemistry and immunofluorescence methods. Her work showed that TM existing in mature unfertilized eggs of amphioxus with gradient distribution is less in animal half and more in vegetative half. But the method she used is incapable of locating antigen precisely and is not sensitive enough.

In this paper the distribution of TM in ovarian eggs and mature unfertilized eggs as well as the location of TM in submicroscopic levels are studied by using immunocytochemical method.

Branchiostoma belcheri tsingtauense (Tchang et Koo) was used in the study. Four kinds of specimens were fixed: (1) ovaries in April, (2) ovaries in the morning of the middle of July (the reproductive season), (3) ovaries in the evening (the reproductive time) of the middle of July, (4) mature unfertilized eggs, for 2 h at 4°C in 2% glutaraldehyde (0.1 mol, pH 7.4 PB), postfixed for 1 h at 4°C in 1% osmium tetroxide (0.1 mol, pH 7.4 PB), and dehydrated with ethanol and embed in Embed 812. The sections were placed on the nickel net by using immunocolloidal gold method. Two control experiments were performed.

The result of our experiments shows: (1) TM has already existed in those larger eggs in ovaries, mainly in some yolk granules and internal follicular layer, some in the cortical granules. (2) In mature fertilized eggs, a great deal of TM exists in each of the yolk granules and a little in the cortical granules. The amount of TM increases gradually to vegetative pole from animal pole corresponding to the distribution of the yolk granules.

* Contribution No. 1835 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.

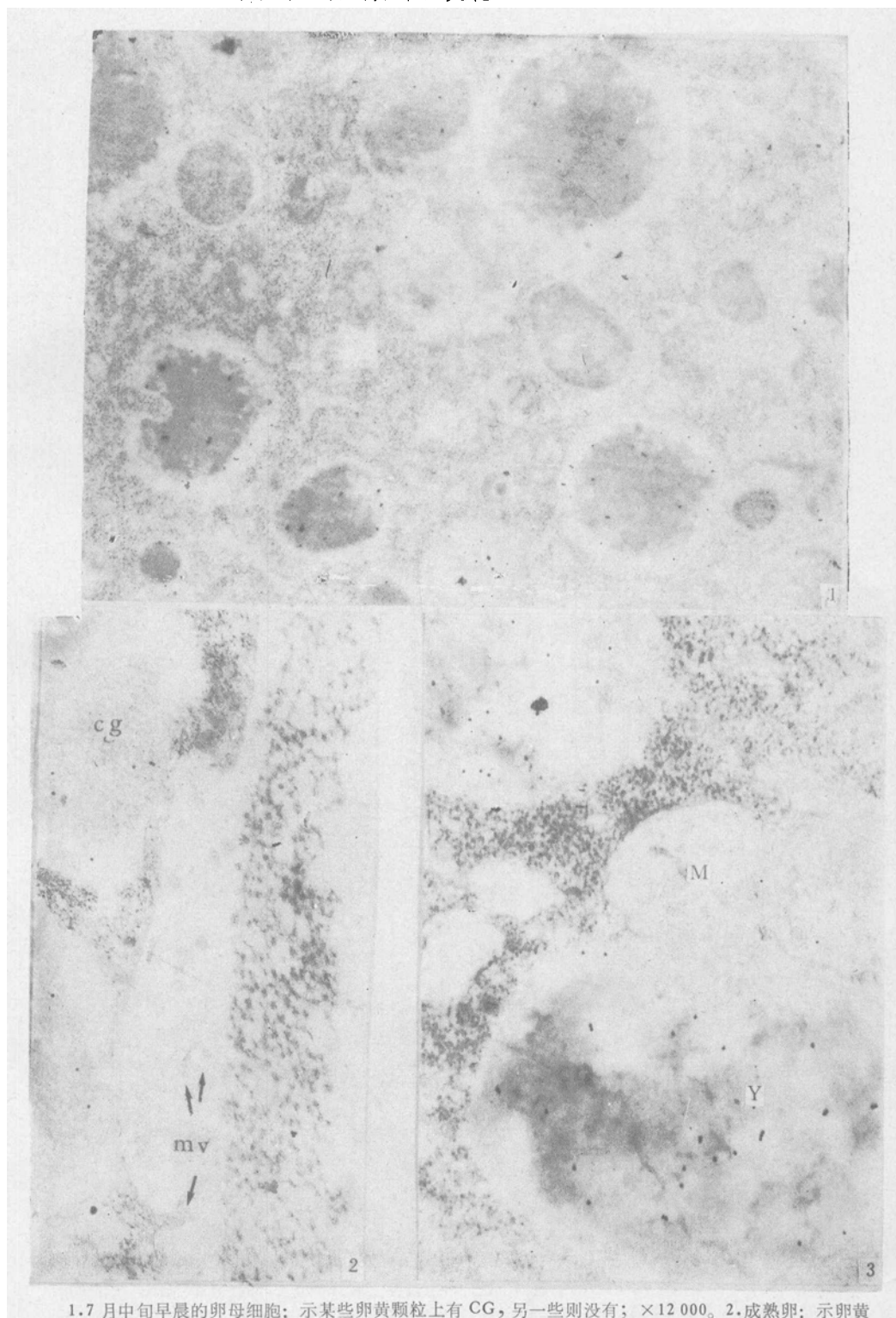


1. 4月底卵巢的B类卵和C类卵:cfe, 外滤泡层; cfi, 内滤泡层; D, 滴形颗粒; Y, 卵黄颗粒; YN, 卵黄核; $\times 3600$ 。2. 4月底的A类卵: 核(N)、质、膜上均无特异性CG; 箭头指非特异性的金颗粒; $\times 13000$ 。3. 4月底的B类卵: cfi上特异的CG, $\times 13000$ 。



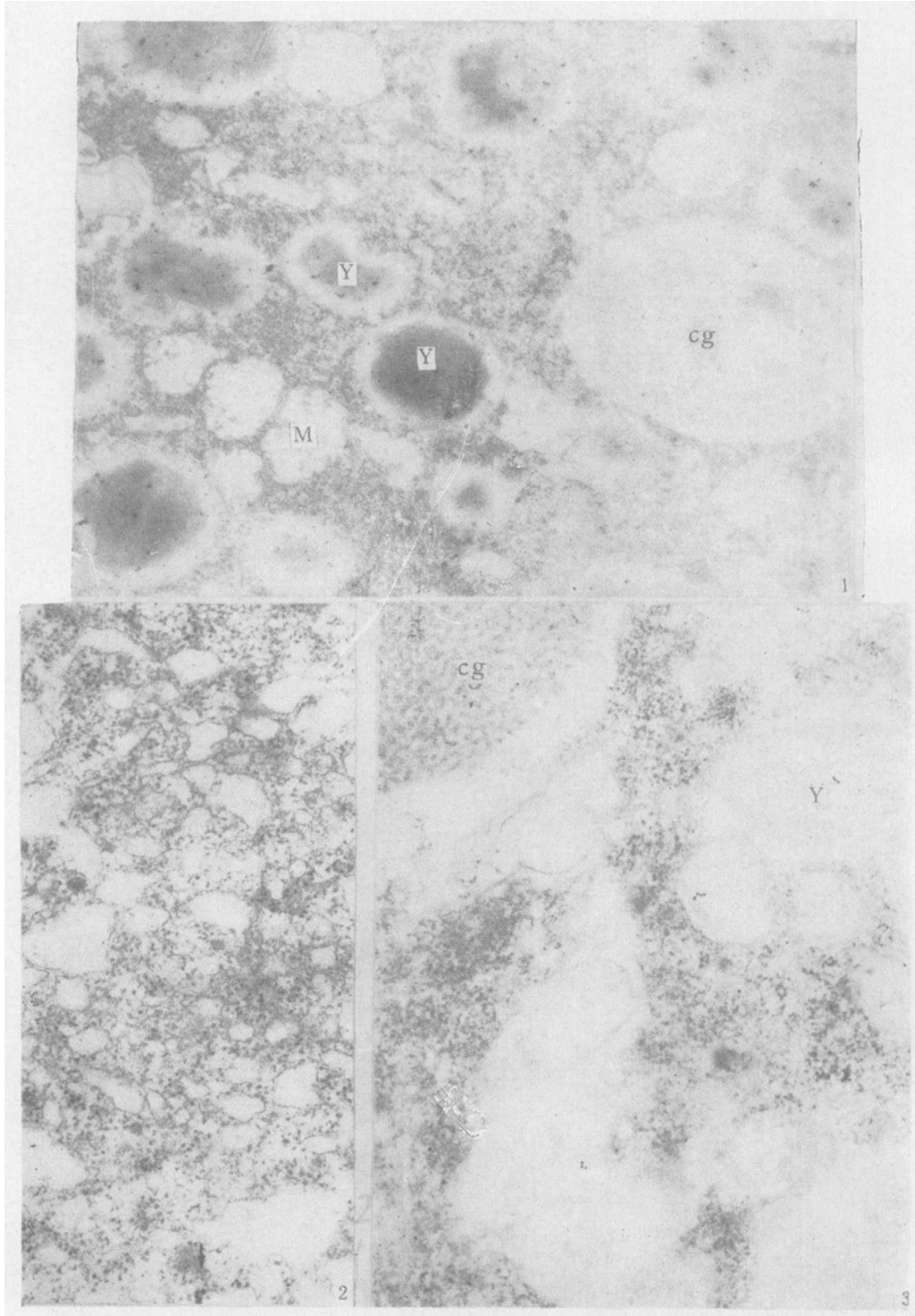
1. 4月底C的卵类:某些卵黄颗粒上有CG,另一些没有, $\times 10\,000$ 。2. 4月底的C类卵:示CG的分布;M,线粒体;Y,卵黄颗粒; $\times 8\,300$ 。3. 7月中旬早晨的卵母细胞:滴形颗粒已基本连成一片,微绒毛(mv)伸向其中;cfi已变得很薄,上面仍有少量CG; $\times 10\,000$ 。

徐奇虹、吴尚勳：用免疫细胞化学方法研究文昌鱼卵子成熟前 图版 (Plate) III
后原肌球蛋白的分布及变化



1.7月中旬早晨的卵母细胞：示某些卵黄颗粒上有CG，另一些则没有； $\times 12\ 000$ 。2.成熟卵：示卵黄膜，可见mv伸向其中；cg，皮质颗粒； $10\ 000$ 。3.成熟卵：示CG分布在Y中的低电子密度区域；M上没有； $\times 13\ 000$ 。

徐奇虹、吴尚勳：用免疫细胞化学方法研究文昌鱼卵子成熟前后原肌球蛋白的分布及变化 图版 (Plate) IV



1.成熟卵：所有的Y都有CG；cg上也有少量；M上没有； $\times 10\ 000$ 。2.成熟卵：示小岛无特异性CG的分布；箭头所指为非特异性CG； $\times 13\ 000$ 。3.对照实验：在成熟卵中PBC代替一抗；可见非特异性CG散在于各部分； $\times 10\ 000$ 。