

雌核发育银鲫和两性融合发育鱼 (红鲫和彩鲫)卵壳结构及其组成 的比较研究*

丁军 蒋一珪 单仕新 魏丽华

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

提要

作者以两性融合发育鱼(红鲫、彩鲫)为对照, 对雌核发育银鲫卵壳的表面结构及其可溶性蛋白的组成进行了研究: (1) 雌核发育银鲫卵壳表面比较平滑, 没有明显的嵴和沟; (2) 雌核发育银鲫卵壳可溶性蛋白的含量略高于两性融合发育鱼(红鲫、彩鲫), 并且在 II 区段存在一条分子量为 10 万 Dalton 的特异蛋白区带。并对银鲫卵壳结构及组成的特殊性与银鲫卵初级控制作用间的关系进行了初步探讨。

关键词 雌核发育银鲫, 两性融合发育鱼, 卵壳, 表面结构, 可溶性蛋白质

目前, 我们对银鲫雌核发育机制的研究表明, 银鲫卵具有抑制异源精核发育的初级控制作用, 该作用可能是由于卵子受精孔区域的卵膜(包括卵壳、卵黄膜以及卵质膜)上存在特异性受体所致^[1,2]。因此, 对上述可能存在初级控制作用位点的结构进行分析, 就成为分离银鲫雌核发育调控物质, 以进一步揭示银鲫雌核发育机理的关键。为此, 本实验以两性融合发育鱼(红鲫和彩鲫)为对照, 对雌核发育银鲫卵膜的重要组成成分之一卵壳的结构及组成进行了研究, 为今后阐明银鲫雌核发育机理提供一些实验依据。

1 材料与方法

1.1 本实验所用材料鱼(银鲫、红鲫和彩鲫)均取自本所关桥试验场。

1.2 银鲫、红鲫和彩鲫卵壳表面结构的扫描电镜观察

分别取银鲫、红鲫和彩鲫的未受精卵固定于 2.5% 戊二醛(以 0.1 MPBS 配制, pH7.2)溶液中, 4°C 下 2—4 h, 然后以 0.1 MPBS 冲洗, 再置于 1% 铼酸(以 0.1 MPBS 配制, pH7.2)中固定 1 h, 乙醇脱水, 临界点干燥, 真空喷金镀膜, AMARY—1830 扫描电镜观察。

* 获国家自然科学基金(39170602)、湖北省自然科学基金(87J17)和国家淡水生态和生物技术重点实验室(FEBL)基金资助。

1992年6月1日收到。

1.3 卵壳的提取与纯化(参照 Cotelli, 等的方法^[3]):

取少量未受精卵, 置于含 0.1% TritonX-100 的 TNE 溶液^[3]中
 ↓
 冰浴匀浆
 匀浆液置于含 0.5 M 蔗糖的 TNE 中, 自然沉降 1—2'
 ↓
 弃上层胞质
 卵壳沉淀以 TNE 溶液反复洗涤至上清液清亮
 ↓
 光镜镜检为纯净之卵壳

1.4 银鲫、红鲫和彩鲫卵壳可溶性蛋白的 SDS-PAGE 梯度凝胶电泳

1.4.1 按 Laemmli's 的方法^[4]稍改制备 4—15% SDS-PAGE 梯度胶。

1.4.2 将提纯的卵壳按 200 个/ml 的比例置于样品溶解液 (0.01MPBS, pH7.0, 1% SDS, 0.1 M 巯基乙醇, 10% 甘油, 0.001% 溴酚蓝) 中, 100℃ 煮沸 15', 上清液即为卵壳可溶性蛋白。

1.4.3 用微量注射器点样, 每孔点样量为 20 μ l, 室温下电泳, 电流从 22 mA 增至 60mA, 共电泳 6 h。

1.4.4 电泳结束后, 凝胶以 0.25% 考马斯亮蓝 (R-250)^[5] 染色, 7% 乙酸脱色至各区带清晰。

1.5 卵壳可溶性蛋白的分子量测定^[5]

标准蛋白按 0.5 mg/ml 溶于样品溶解液中, 100℃ 煮沸 3'。将标准蛋白与待测样品液按顺序点于预先制备好的 4—15% SDS-PAGE 梯度胶的点样孔中 (20 μ l/孔), 同前法电泳、染色及脱色, 计算各区带的相对迁移率 (m_R), 然后以标准蛋白的相对迁移率为横坐标, 标准蛋白分子量的自然对数值为纵坐标, 在半对数坐标纸上制作标准曲线, 并求出标准曲线的方程, 最后, 将待测样品中各蛋白区带的相对迁移率带入标准方程, 估算出各蛋白带的分子量 [整个数据处理过程均在计算机 (IBM-AT 兼容机) 上完成]。

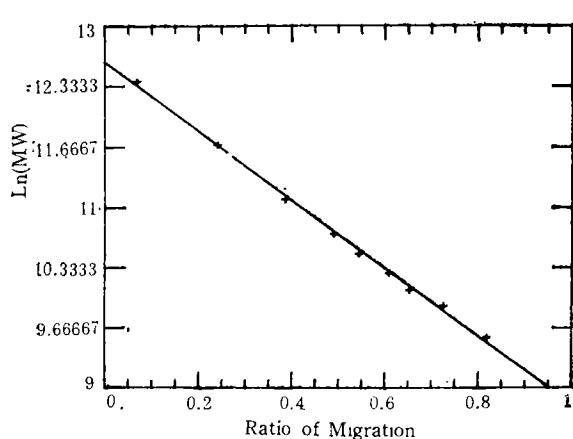


图 1 标准曲线 ($Y = 12.5977 - 3.77841X$)

Fig.1 The standard curve ($Y = 12.5977 - 3.77841X$)

的小孔, 但两类鱼卵壳的嵴与沟形状却明显不同。红鲫和彩鲫卵壳表面的嵴和沟清晰可

本实验所用标准蛋白 (专用于 SDS 电泳) 均购自 Sigma 公司, 其分子量分别为 14200, 20100, 24000, 29000, 36000, 45000, 66000, 120000, 240000 Dalton。

2 结果

2.1 银鲫(雌核发育)、红鲫和彩鲫(两性融合发育)卵壳表面结构的扫描电镜观察。

作者在扫描电镜下观察到, 银鲫、红鲫和彩鲫卵壳表面均存在着凸出的嵴、凹入的沟以及附于其上

辨[图版 I:1]; 而银鲫卵壳表面则相对平滑, 其上的嵴和沟不很明显 [图版 I:2]。

2.2 银鲫(雌核发育)、红鲫和彩鲫(两性融合发育)卵壳可溶性蛋白的 SDS-PAGE 梯度凝胶电泳比较

SDS-PAGE 梯度凝胶电泳结果显示, 银鲫(雌核发育)、红鲫和彩鲫(两性融合发育)卵壳可溶性蛋白的电泳谱式基本相似, 均可分三个区段。其中靠近阴极的为 I 区段, 中间为 II 区段, 靠近阳极的为 III 区段[图版 I:4]。

I 区段: 红鲫卵壳可溶性蛋白可分离出 6 条区带, 其中 I-2 和 I-3 为红鲫所特有 [图版 I:3,4(H)]; 彩鲫卵壳则只分离出 3 条区带, 这三条带分别对应于红鲫的 I-1、I-4 和 I-6 区带[图版 I:3,4(C)]; 银鲫可分离出 4 条分别对应于红鲫 I-1、I-4、I-5 和 I-6 的区带, 各带虽不具特异性, 但 I-1 和 I-4 区带的浓度明显增高[图版 I:3,4(Y)]。II 区段: 红鲫和彩鲫卵壳可溶性蛋白均可分离出 5 条区带, 各带浓度及带型均相同 [图版 I:3,4(H,C)]; 而银鲫卵壳则可分离出 6 条区带, 不仅 II-1--II-4 带的浓度明显大于红鲫和彩鲫, 而且还具有一条特异区带 (II-5) [图版 I:3,4(Y)]。

III 区段: 红鲫、彩鲫和银鲫卵壳可溶性蛋白的带型相同, 均可分离出 6 条区带 [图版 I:3,4], 其中银鲫的 III-1 和 III-2 区带浓度明显高于红鲫和彩鲫。

2.3 银鲫(雌核发育)、红鲫和彩鲫(两性融合发育)卵壳可溶性蛋白的分子量测定

表 1 银鲫、红鲫和彩鲫卵壳各蛋白的分子量

Tab.1 The molecular weight (Dalton) of solutable proteins in chorion of crucian carp, red goldfish and coloured goldfish

区段号 District No.	区带号 Band No.	红鲫各带蛋白分子量 MW of protein band in red goldfish	彩鲫各带蛋白分子量 MW of protein band in coloured goldfish	银鲫各带蛋白分子量 MW of protein band in crucian carp
I	1	283000	283000	283000
	2,3	250000,240000		
	4	220000	220000	220000
	5	181000		181000
	6	167000	167000	167000
II	1,2	150000,137000	150000,137000	150000,137000
	3	126000	126000	126000
	4,6	116000,92000	116000,92000	116000,92000
	5			100000
III	1,2	67000,61000	67000,61000	67000,61000
	3,4	54000,40000	54000,40000	54000,40000
	5,6	26000,11000	26000,11000	26000,11000

图 1 为根据标准蛋白分子量及其相对迁移率绘制的标准曲线, 曲线方程为 $Y = 12.5977 - 3.77841X$, 其中横标 (X) 为蛋白质相对迁移率, 纵标 (Y) 为蛋白质分子量的自然对数值。

表 1 为根据曲线方程测算的银鲫、红鲫和彩鲫卵壳各蛋白的分子量

上述结果表明, 雌核发育银鲫和两性融合发育红鲫和彩鲫卵壳在表面结构及其可溶性蛋白组成上的确存在差异, 银鲫卵壳具有一条分子量为 10 万 Dalton 的特异蛋白质, 且银鲫卵壳的大多数可溶性蛋白的浓度均明显高于两性融合发育鱼。

3 讨论

近年来, 对鱼类卵壳的研究发现, 卵壳属于初级卵膜^[3,6], 它能参与卵子的受精过程(如种特异性识别、阻止多精受精等)^[3,7~9]。特别是位于卵子受精孔区域的卵壳生物活性更强, 其上存在一些特异性因子, 这些因子能使精子聚集、激活并促其入卵^[10,11]。可见, 卵壳不仅是一个精子入卵的机械屏障, 它还是直接参与卵子受精过程的生物活性结构。大量分子生物学的研究也证实, 在鱼类及其它脊椎动物的受精过程中, 卵壳的各组成成分都有着各自不同的功能^[12~15], 卵壳结构及其组成上存在差异的卵子, 在受精过程中也会相应地表现出某些功能上的差别^[16]。本实验结果显示, 雌核发育银鲫和两性融合发育鱼(红鲫和彩鲫)的卵壳在结构及分子组成上都存在较明显的差异, 这也应与雌核发育银鲫与两性融合发育鱼卵在受精过程中的功能差异有关。进一步分析表明, 银鲫卵壳还具有一种分子量约为 10⁵ Dalton 的特异蛋白质, 而银鲫卵在受精过程中也存在着独特的抑制异源精核发育的初级控制作用机制^[2], 因此, 可以推测这种特殊蛋白质很可能是导致银鲫卵具有初级控制作用的原因之一。至于银鲫卵壳上可溶性蛋白的特异成分在银鲫卵初级控制中的作用及其机制还需进行更为深入的研究。

参 考 文 献

- [1] 丁军, 单仕新, 葛伟, 蒋一珪。银鲫卵对两类精子发育的初级控制作用模式的研究。中国科学(B辑), 1991, 11:1160—1165。
- [2] 葛伟, 蒋一珪。雌核发育银鲫卵抑制异源精子原核化的作用模式初探。水生生物学报, 1985, 9(3):203—208。
- [3] Cotelli F, Andronico F, Brivio M, Lamia C L. Structure and composition of the fish egg chorion (*Carassius auratus*). *J. Ultrastructure and Molecular Structure Research*, 1988, 99:70—78.
- [4] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. *Nature*, 1970, 227:680—685.
- [5] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛主编。生化实验方法和技术。北京: 高等教育出版社, 1981:112—124。
- [6] 丁汉波, 全允树, 黄浙主编。发育生物学。北京: 高等教育出版社, 1987:105。
- [7] Bela J Gulyas, Eli D Schamell. Sperm-egg recognition and binding in mammals. In: Bioregulators of reproduction (Georgiana Jagiello, Henry J Vogel eds). London: Academic Press INC. LTD. 1981, pp: 499—527.
- [8] Glabe C G, Vacquier DV. Species-specific agglutination of eggs by binding isolation from sea urchin eggs. *J. Cell Biol.*, 1977a, 75:410—421.
- [9] Kobayashi W, Yamamoto T. Fine structure of the micropylar apparatus of the chum salmon egg, with a discussion of the mechanism for blocking polyspermy. *J. Exp. Zool.*, 1981, 217: 265—275.
- [10] Suzuki R. Sperm activation and aggregation during fertilization in some fishes III. Non species-specificity of stimulating factor. *Annot. Zool. Jpn.*, 1959, 32:105—111.
- [11] Yanagimachi R. Some properties of sperm-activating factor in the micropyle area of the herring egg. *Annot. Zool. Jpn.*, 1957, 30: 114—119.
- [12] 吴伯良, 罗玉香, 刘杰森。花鲢(*Aristichthys nobilis* (Richardson))卵透明带大分子组成及其主要理化性质研究。暨南理医学报, 1982,(2): 118—129。
- [13] Bile J D, Wasserman P M. Mammalian sperm-egg interaction: Identification of a glycoprotein

- in mouse egg zonae pellucida possessing receptor activity for sperm. *Cell*, 1980, **20**:873—882.
- [14] Bile J D, Wasserman P M. Structure and function of zona pellucida: Identification and characterization of the protein of the mouse oocyte zona pellucida. *Dev. Biol.*, 1980b, **76**:185—203.
- [15] Bile J D, Wasserman P M. Mammalian sperm-egg interaction: fertilization of mouse eggs triggers modification of the major zona pellucida glycoprotein, ZP2. *Dev. Biol.*, 1981, **86**:189—197.
- [16] Yanagimachi R. Mechanism of fertilization in mammals. In: "Fertilization and embryonic development in vitro". (Mastroianni L Jr, Biggers J D eds), Plenum press. 1981.

THE COMPARATIVE STUDY ON THE STRUCTURE AND COMPOSITION OF CHORION IN GYNOGENETIC CRUCIAN CARP AND AMPHIMICTIC FISH

Ding Jun Jiang Yigui Shan Shixin and Wei Lihua

(Institute of Hydrobiology, the Chinese Academy of Sciences, Wuhan, 430072)

Abstract

The external structure and solutable proteins of chorion were studied comparatively in amphimictic fish, i.e. red goldfish, *Carassius auratus* red variety and coloured goldfish, *Carassius auratus* coloured variety, and gynogenetic crucian carp, *Carassius auratus gibelio*. The chorion surface was smoother in gynogenetic crucian carp than those in amphimictic fish. That is, the ridge and ditch on chorion were unclear in crucian carp. Contents of solutable proteins in chorion of gynogenetic crucian carp were slightly higher than in amphimictic fish, and electrophoretic pattern of chorion in crucian carp was characteristic of a protein band in district II with molecular weight of 10^5 dalton. The structure and composition of chorion were discussed in relation to the primary control of crucian carp eggs.

Key words Gynogenetic crucian carp, Amphimictic fish, Chorion, External structure, Composition of solutable protein