

鲢鱼早期发育阶段核组蛋白的比较研究*

孙建民 李国华 王祖熊

(中国科学院水生生物研究所)

提 要

用15%聚丙烯酰胺凝胶电泳分析比较了鲢鱼早期发育的四个重要阶段:原肠后期、心跳期、出膜期幼鱼和眼色素出现期幼鱼的细胞核组蛋白。这四个时期细胞的核心组蛋白(H_4 、 H_{2a} 、 H_{2b} 、 H_3)没有明显的变化。但是,随着细胞分化的进程, H_1 表现出明显的差异。在这四个时期中也可看到红细胞特有的组蛋白 H_2 。文章讨论了组蛋白 H_1 在鲢鱼早期发育阶段对细胞分化的可能调节作用。

组蛋白是染色质的重要结构成分。四种核心组蛋白(H_4 、 H_{2a} 、 H_{2b} 、 H_3)具有高度的保守性。大量资料表明,植物和动物细胞中的核心组蛋白几乎都是相同的,而 H_1 则表现出种和组织的特异性。近几年来,一些人以组蛋白基因作为研究基因表达调节的模型,对动物个体发育中组蛋白的变化进行了一些研究,报导了海胆、果蝇、蟾蜍、蛙等动物早期胚胎发育中组蛋白合成的变化^[1-5]。Flynn等人(1980)的实验说明,爪蟾发育时期核心组蛋白的合成没有明显的改变,但 H_1 变体的比率发生了变化^[2]。Shin(1980)在蛙的幼体中发现 H_4 的合成与其它组蛋白是不同的^[6]。大量的工作集中于研究动物早期胚胎(从受精卵到囊胚期)的组蛋白变化,尚少见对组织细胞高度分化时期的组蛋白变化研究。

材 料 和 方 法

实验材料取自本所试验场。鲢鱼胚胎在解剖显微镜下观察鉴定,实验共用六批材料。

制备染色质 按Marushige和Bonner的方法^[4]稍加修改。取新鲜胚胎约5克,出膜前的胚胎用皮头吸管冲打破膜,清除卵膜。胚体放于EDTA-NaCl缓冲液(pH8)中,匀浆、过滤、以8000rpm离心15分钟,经过EDTA-NaCl缓冲液和0.05M Tris缓冲液洗涤三次,经30000×g超速离心,收集到纯染色质。

制备组蛋白 先后用0.2N H_2SO_4 和0.4N H_2SO_4 抽提纯染色质约20分钟,4000

* 华中农学院78级邵雪玲同志参加部分工作。本所试验场热情支持。湖北省农科院测试中心协助凝胶扫描。谨致谢意。

rpm 离心,收集上清液加六倍体积无水乙醇,于 -10°C 静置 48 小时,离心收集沉淀,冰冻干燥。

凝胶电泳 按 Panyim 法^[6],采用醋酸—尿素系统,15%聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳,凝胶长 10cm。电泳条件,1mA/管,电泳 9 小时,氨基黑 B 染色。凝胶于 HITACHI 557 型光度计扫描记录,扫描波长 700nm。

实验结果

从胚胎细胞的组蛋白凝胶电泳图谱(图 1)可见,它们的核心组蛋白(H_4 、 H_{2a} 、 H_{2b} 、 H_3)是一致的,而且与成体肝脏的这四种组蛋白也是相同的。

组蛋白 H_1 及其变体的数目和含量表现出明显的差异。从电泳图谱可见,原肠后期 H_1 的电泳谱带数少且含量很低;扫描图谱可见四个低峰。心跳期以后即显现一条较强的 H_1 主带,扫描出六个峰。出膜期扫描出七个峰,也有一条主带。眼色素出现期 H_1 变体的数目更多,扫描出八个峰,也有一条清晰可辨的主带(图 2-5)。可以看出,随着胚胎发育的进展,胚胎细胞逐渐分化,染色质的 H_1 变体增多。

组蛋白 H_5 首先在鸟类有核红细胞中发现,以后又在某些鱼类和两栖类的红细胞中找到^[6]。我们的实验也观察到鲢鱼红细胞中有 H_5 ,与来航鸡红细胞的组蛋白比较,可看到鲢鱼红细胞中 H_5 的迁移率与之相同(图 6)。鲢鱼眼色素出现期幼鱼的组蛋白电泳图谱中,可在 H_1 和 H_5 谱带之间观察到一条弱带,它的迁移率与成体红细胞的 H_1 相同。心跳期、出膜期也可找到这条弱带。

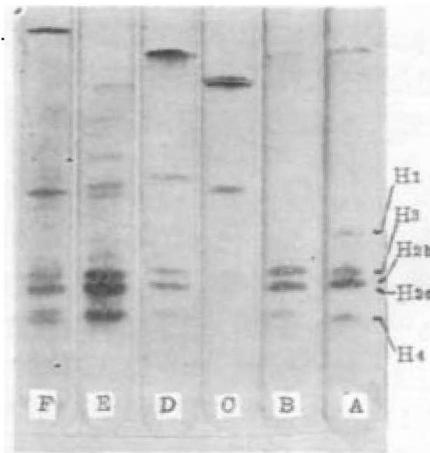


图 1 鲢鱼早期发育阶段组蛋白凝胶电泳图谱

A. 小牛胸腺(对照); B. 原肠后期; C. 心跳期;
D. 出膜期幼鱼; E. 眼色素出现幼鱼; F. 成体肝脏

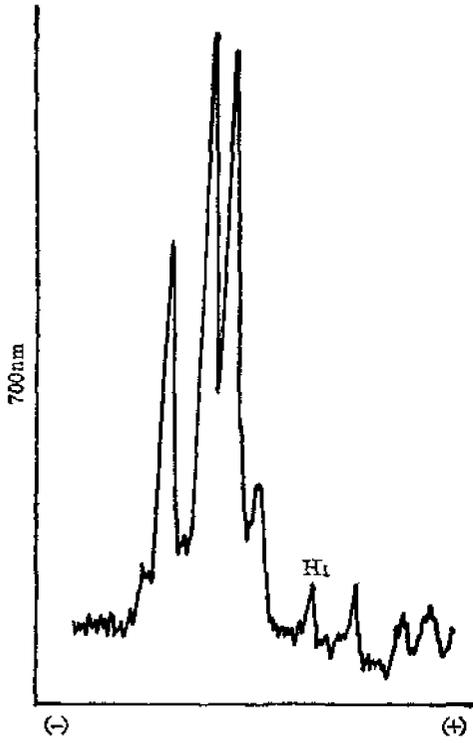


图2 鲢鱼原肠后期胚胎组蛋白扫描图

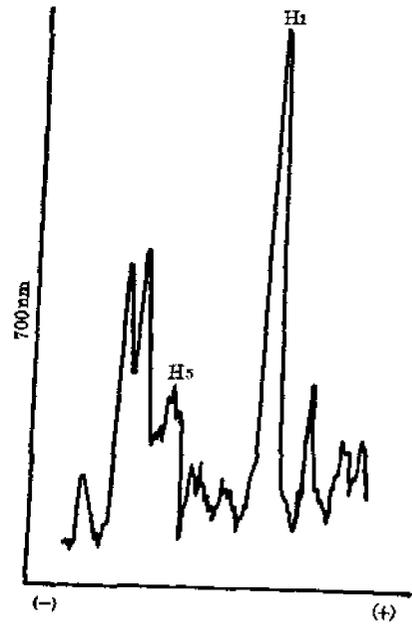


图3 鲢鱼心跳期胚胎组蛋白扫描图

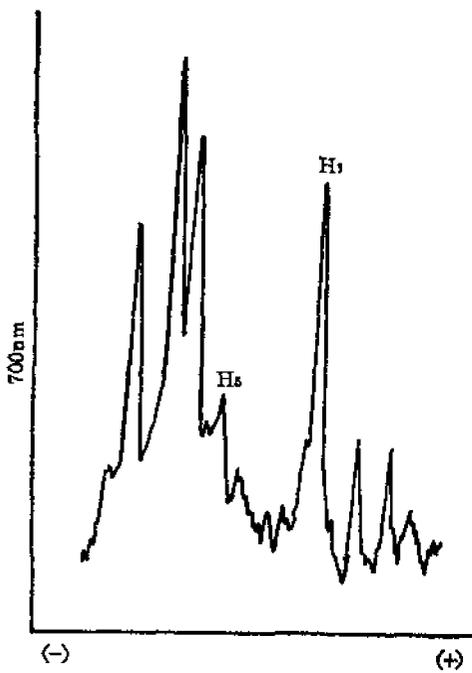


图4 鲢鱼出膜期幼鱼组蛋白扫描图

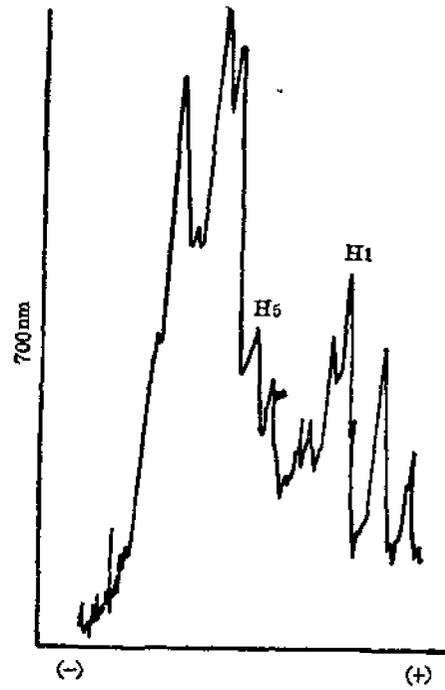


图5 鲢鱼眼色素出现期幼鱼组蛋白扫描图

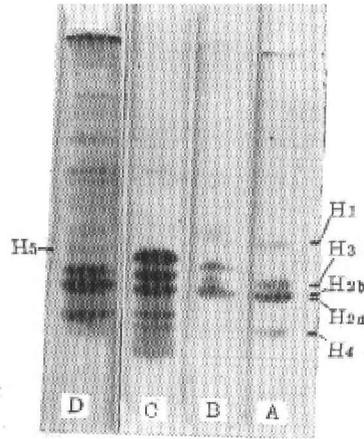


图6 来航鸡红细胞、鲑鱼红细胞与鲑眼色素出现期幼鱼的组蛋白比较

A.小牛胸腺 (H_1 和 H_2 之间无谱带); B.来航鸡红细胞 (H_1 和 H_2 之间有 H_2); C.鲑鱼红细胞(可见 H_2); D.鲑眼色素出现期幼鱼(在与成体细胞 H_2 相应区域可见到 H_2)

讨 论

真核细胞染色质中四种核心组蛋白具有高度的保守性,已被 Nadean^[5]在不同的植物, Panyim^[7]在不同的脊椎动物组织得到证实。我们的实验也可以看出,鲑鱼胚胎发育的各个时期,这四种核心组蛋白也与成体完全一致。

Adamson 等人认为,发育胚胎在很大程度上利用贮存的组蛋白,也激活母体 mRNA 的贮存库。Koster, Flynn, Risley 等人研究爪蟾胚胎时都发现,核心组蛋白合成没有明显的变化,但是发现 H_1 变体比率变化^[8]。

近代细胞生物学的研究表明, H_1 主要占据核小体间的细丝状连接区,即所谓“游离”DNA 区域(约 30—70 个碱基对)。多方面的证据说明,组蛋白是一种非特异性的抑制剂,它不具备识别特异基因位点的能力。Panyim 等人的实验表明, H_1 有种和组织的特异性。看来, H_1 的质和量可能调节“游离”DNA 区域的松紧程度,从而可以非特异性地控制染色质模板活力。

原肠期以后,细胞分裂速度减慢,而细胞分化逐渐加强。随着不同组织细胞的分化,它们所特有的 H_1 变体逐渐出现,因而表现出 H_1 变体数的增加。鲑鱼胚胎发育期间 H_1 的质和量的变化与细胞分化程度呈平行相关,暗示着 H_1 对细胞分化有一定的调节作用。

近来的研究也表明,组蛋白乙酰化、磷酸化、甲基化具有重要的生物学意义。有人认为这与转录的激活相伴存在或相伴进行^[9],如激素或 cAMP 的刺激都能导致组蛋白侧链的修饰,从而产生新的变体。这些修饰有的是可逆的,有的是不可逆的,从而在一定程度上调节染色质的“游离”DNA 开闭程度。

胚胎时期,这些 H_1 变体的增加是由什么原因引起的目前尚不清楚;看来,更令人感

兴趣的却是了解在不同分化组织中 H_1 是否与某些非组蛋白或其它的因子结合起来，并在复制或转录水平上进行调节。

组蛋白 H_1 已在一些脊椎动物的有核红细胞中发现。从我们的实验也可以看出，鲢鱼红细胞也存在组蛋白 H_1 。在原肠后期即可发现有微量 H_1 存在，这可能是由于红细胞在此时已开始分化或是由母体带来，尚需深入研究。

鱼类由于它独特的进化位置以及它容易得到种间、属间或科间的杂交后代，因而成为研究发育遗传的好材料。这方面的工作几乎都是以基因表达的产物—同工酶为指标，探讨其差别基因表达^[10]。如果从染色质本身着手，了解其复制或转录水平的控制，可能更有助于深入了解其机制。

参 考 文 献

- [1] 钱若兰等, 1982. 鳙鲢红细胞与网织红细胞染色质蛋白的比较研究, *实验生物学报*, 15(1): 19.
- [2] Flynn, J. M. et al, 1980. The synthesis of histone H_1 during early amphibian development. *Dev. Biol.* 75(1): 220—230.
- [3] Hentschel, C. C., 1981. The organization and expression of histone gene families. *Cell*, 25(2): 301—313.
- [4] Marushige, K. and Bonner, J., 1966. Template properties of liver chromatin. *J. Mol. Biol.*, 15(1): 160—174.
- [5] Nadean, P. et al, 1974. Electrophoretic study of plant histones: Comparison with vertebrate histones. *Arch. Biochem. Biophys.*, 161(1): 171—177.
- [6] Panyim, S. et al, 1969. High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones. *Arch. Biochem. Biophys.*, 130(2): 337—346.
- [7] Panyim, S., 1971. An electrophoretic comparison of vertebrate histones. *J. Biol. Chem.*, 246(13): 4206—4215.
- [8] Shin, R. J. et al, 1980. Rates of histone synthesis during early development of *Rana pipiens*. *Dev. Biol.*, 75(2): 329—342.
- [9] Stein, G., 1976. Proteins of chromatin, their role in the regulation of gene expression. *Bioscience*, 26(8): 488—499.
- [10] Volpe, E. P. et al, 1981. Differential gene expression during fish development. *Bioscience*, 31(4): 322—323.

A COMPARATIVE STUDY ON THE NUCLEAR HISTONES DURING THE EARLY DEVELOPMENT OF SILVER CARP (*HYPOPHthalmichthys molitrix*)

Sun Jianmin, Li Guohua and Wang Zuxiong

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica)

Abstract

By using 15% polyacrylamide disc gel electrophoresis, nuclear histones of four early developmental stages in silver carp were studied, these four stages are: the late gastrulation, the heart beating, immediately after hatching and the larvae of eye

pigmented stages.

In these four stages, the core histones (H_4 , H_{2a} , H_{2b} , H_3) do not show any change. Nevertheless, there are many remarkable changes in number and quantities of H_1 histone in accompany with the degree of cell differentiation, and the histone H_1 which has been discovered in the erythrocytes of some other fishes also appears in these stages of silver carp likewise.

The possible regulating actions of histone H_1 in cell differentiation of the early developmental stages in silver carp were discussed in this paper.