

未受精鸡蛋表层卵黄颗粒的染色质和 DNA

李玉安 李 莱 潘宗耀

阎巧云 王 强 贝时璋

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

摘 要

本文通过电子显微镜的研究, 证明未受精鸡蛋表层卵黄颗粒的染色质同受精未孵育鸡蛋的胚下表层卵黄颗粒的染色质一样, 都与核染色质的基本结构相类似; 其 DNA 的分子形态, 也同受精未孵育鸡蛋的胚下表层卵黄颗粒一样, 都与核的 DNA 相类似, 同为线型 DNA. 根据这些观察, 说明染色质和 DNA 在一定部位和发育时相的卵黄颗粒中, 是广泛存在的. 实验结果还进一步指出, 卵黄颗粒具有就地合成 DNA 的能力, 而且卵黄颗粒中的 DNA 可能与组蛋白结合, 通过自组织构成染色质.

Bruce 和 Emanuelsson 证明了鸡胚层细胞内的卵黄颗粒具有线型 DNA 分子^[1]. 我们观察到受精未孵育鸡蛋的胚下表层卵黄颗粒 DNA 分子, 也是线型的^[2]. 同时, 我们认为在卵黄颗粒中, 这些 DNA 分子可能通过自组织与组蛋白结合构成染色质纤维^[3]. 在未受精鸡蛋的表层卵黄颗粒中是否也存在染色质和 DNA? 它们的形态结构如何? 这是一个值得研究的问题. 为了寻求这一答案, 本文以不受精的鸡蛋为材料, 对其表层卵黄颗粒的染色质和 DNA 进行了提取和电子显微镜观察.

一、材料和方法

1. 染色质的制备 每次实验用新鲜的未受精莱克亨鸡蛋 300 个, 于 37°C “孵育” 12 小时. 对每个未受精鸡蛋先去掉相当于“原胚区”部分, 然后取其下表层卵黄 0.1 毫升, 继而进行卵黄颗粒的分离和染色质提取, 其方法同前文^[3]所述.

2. DNase I 消化染色质实验 将提取的染色质悬浮于 10mM Tris, 1mM MgCl₂ (pH8) 的溶液中, 用 DNase I (0.5 毫克/毫升) 在 37°C 下保温 30 分钟. 这样消化过的染色质样品供电子显微镜制样.

3. DNA 的提取 参照 Tung 等^[4] 制备 DNA 的方法, 将提取的卵黄颗粒染色质, 用 1.5M NaCl 溶液抽提 24 小时, 离心 (30,000 转/分, 40 分钟) 得上清液, 装入透析袋, 用 0.15M NaCl-0.015M 柠檬酸钠 (pH7.4) 溶液透析 24 小时. 随后如前文^[2]所述, 先用 RNase (500 微

克/毫升)在 37℃ 下保温 30 分钟,再用 Pronase (2 毫克/毫升)在 37℃ 下消化 22 小时。经过以上两种酶处理得到的 DNA 溶液供电子显微镜制样。

4. 电子显微镜样品的制备 染色质及其经 DNase I 处理过的样品,按胚细胞核和胚下卵黄颗粒染色质的电子显微镜制样方法^[3]进行。

DNA 样品,按程乃乾等^[5]展膜的方法铺 DNA 单分子层膜,捞网,7° 角下旋转喷涂铂铱合金,在 JEM-100CX 电子显微镜下观察、照像。

5. 染色质纤维和 DNase I 消化后珠粒的测量 用读数显微镜,测量电子显微镜照片中染色质纤维的宽度和染色质经 DNase I 消化后珠粒的大小。

二、结果和讨论

我们用一般从细胞核提取染色质的方法,对未受精鸡蛋“原胚区”下表层卵黄颗粒进行了分离、提取。提取物在电子显微镜下所呈现的结构与受精未孵育鸡胚细胞核的染色质相似,都是纤维状结构。这些纤维有的是由紧密相连的珠粒构成(图版 I, 2),有的呈珠粒和细丝相间排成一串珠结构(图版 I, 1, 3)。纤维的粗细也不完全一致(图版 I, 3)。我们随机测得 200 个数据,大致可分为四组,其值为:62 埃 $\pm$ 20、155 埃 $\pm$ 29、241 埃 $\pm$ 28、347 埃 $\pm$ 43 (见表 1)。与细胞核的染色质结构相比较,60 埃的纤维相当于染色质珠粒间的连丝,150 埃的相当于核染色质的一级结构,240 埃以上的纤维可能是它们的更高级结构。

表 1 染色质纤维的宽度

材 料	分组(埃)	测量数	均值(埃)	标准差(埃)	范围(埃)
未受精鸡蛋“原胚区” 下表层卵黄颗粒的染 色质纤维	60	60	62	20	21—98
	150	71	155	29	102—198
	240	49	241	28	201—293
	340	20	347	43	301—441

未受精蛋“原胚区”下表层卵黄颗粒提取物的电子显微镜照片与受精未孵育蛋胚下卵黄颗粒染色质的电子显微镜照片^[3]相比较,无论形态结构或珠粒大小和纤维宽度都是非常相近的;与胚细胞核染色质的电子显微镜照片相比较也看不出明显的差别。因此,把未受精鸡蛋表层卵黄颗粒的这一提取物也称为染色质,我们认为也是完全合理的。

近几年来,在染色质结构方面的研究进展显著,取得了一些比较一致的结果,认为染色质基本纤维是一条串珠状结构,它是由无数个亚单位——核小体(nucleosomes)组成,核小体由 DNA 串联起来。关于核小体的结构,前文^[3]已作了扼要介绍,这里不重复了。但有一点要在这里补充一下,即联系核小体的连丝是由 40—60 个碱基对 DNA 和组蛋白 H₁ 构成。联系部分的 DNA 对核酸内切酶有着特殊敏感的构象。

参照以上关于染色质基本结构的研究,我们进行了以下两个实验,以便进一步证明未受精鸡蛋表层卵黄颗粒中存在着染色质的真实性。

DNase I 消化实验: 我们将卵黄颗粒的染色质用 DNase I 作适度的消化,在电子显微镜下看到珠粒间的连丝消失(图版 I, 4),呈现为一个散在的珠粒。据我们测定,大部分的珠粒

为 $141 \text{ 埃} \pm 21$ (见表 2)。其形态、大小与染色质纤维上的珠粒可以相对应。以上结果说明, 这些散在的珠粒大部分可能是由八个组蛋白聚合而成的一聚体及其寡聚体。

表 2 染色质经 DNase I 消化后珠粒的大小

材 料	分组(埃)	测量数	均值(埃)	标准差(埃)	范围(埃)
未受精蛋“原胚区”下表层 卵黄颗粒的染色质珠粒	100 以下	2	67		45—89
	140	45	141	21	100—188
	230	3	230	20	209—249

我们还以未受精鸡蛋表层卵黄颗粒的染色质为材料,经浓盐抽提后再用 RNase 和 Pronase 消化。如果 Pronase 消化的不充分,照片中还可见到珠粒,有的散在,有的和 DNA 分子相连;如果 Pronase 消化的较彻底,照片中的珠粒则很少见,呈现的是一条条光滑、均匀的 DNA 线型分子,如图版 I, 5, 6 所示。这些结果指出,卵黄颗粒中染色质纤维上的珠粒,可能是 DNA 盘绕的组蛋白聚合体(核小体),而串联核小体的,则是 DNA 连丝。

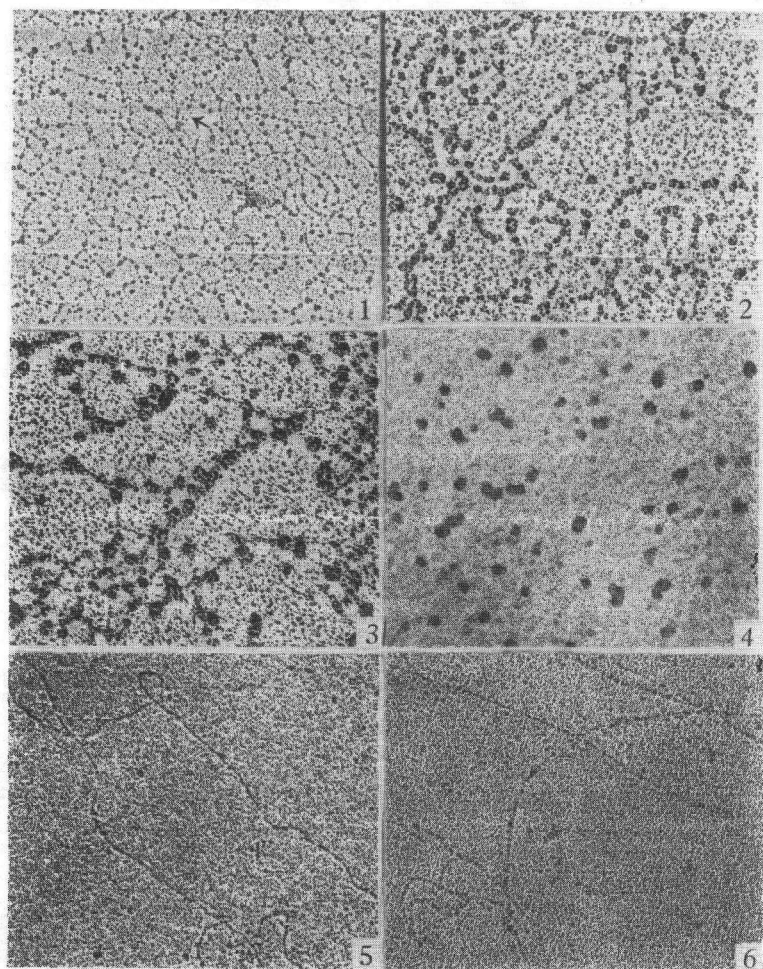
用未受精鸡蛋的表层卵黄颗粒为材料,提取出染色质和 DNA,这不仅从实验上而且也从理论上排除了来自胚细胞核的 DNA 任何可能的污染。根据我们实验室进行的放射自显影工作^[6]和本实验的结果,使我们确信,卵黄颗粒的 DNA 和染色质是就地合成和组织起来的。而且认为,这一功能在一定部位和发育时相的卵黄颗粒中是广泛存在的。至于各个部位和不同发育时相的卵黄颗粒,是否都能合成和组织其 DNA 和染色质以及在量和状态上如何? 尚有待今后作深入的研究。

在本实验室关于细胞重建的研究中^[7],观察到以卵黄颗粒为基础、以细胞质为基地进行核重建和细胞重建的现象。由于未受精鸡蛋表层卵黄颗粒中也能合成 DNA 和组织染色质,因此,我们就更有理由,来断定卵黄颗粒并非只是一个营养的储备,它还是鸡胚早期发育中核重建和细胞重建的重要基础。

此工作承本所六室电子显微镜组的协助,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Bruce, L. & Emanuelsson, H., *Exp. Cell Res.*, **92** (1975), 462.
- [2] 李玉安等,鸡胚细胞核和胚下卵黄颗粒 DNA 分子的电子显微镜观察,中国科学 B 辑, **12**: 1089—1091.
- [3] 李玉安等,鸡胚细胞核和胚下卵黄颗粒染色质的电子显微镜观察,中国科学 B 辑, **11**: 1007—1010.
- [4] Tung, F., Tsai, K. H. & Marfey, P., *Biochim. et Biophys. Acta*, **227** (1972), 117.
- [5] 程乃乾等,中华物理医学杂志, **2**(1980), 227.
- [6] 蓝碧霞等,未受精鸡蛋表层卵黄的细胞重建(待发表).
- 苏雅娴等,南京丰年虫卵黄颗粒内的染色质结构、DNA 和组蛋白(待发表).
- [7] 贝时璋等,细胞重建的研究,百科知识, **1**(1981), 46.



1—4. 未受精鸡蛋表层卵黄颗粒染色质的电镜图片。

1. 示染色质的串珠状结构，箭头指的是细丝。 $\times 21,000$

2. 示染色质纤维由紧密相连的珠粒构成。 $\times 46,200$

3. 示染色质的串珠状结构；纤维有粗细，箭头指的是细丝。 $\times 70,000$

4. 示染色质经 DNase I 消化后；珠粒间的连丝消失，成为一个个散在的珠粒。 $\times 70,000$

5—6. 未受精鸡蛋表层卵黄颗粒 DNA 的电子显微镜图片。

5. 示 DNA 的分子形态(线型 DNA)。 $\times 36,400$

6. 示 DNA 的分子形态(线型 DNA)。 $\times 46,200$