

蜜蜂飞翔肌收缩蛋白的电子显微镜鉴定

陈明 周念辉 范世藩

(中国科学院上海生理研究所)

自五十年代肌丝滑行模型建立以来,关于脊椎动物骨骼肌的蛋白质成分,肌丝排列以及肌肉收缩时结构变化的研究取得了很大的进展。骨骼肌肌原纤维由粗、细肌丝有规律地排列所组成。对于肌肉收缩蛋白的选择性抽提,专一性抗体标记以及重组肌丝的研究,证实肌球蛋白存在于粗肌丝;肌动蛋白、原肌球蛋白和原宁蛋白存在于细肌丝 (Huxley, A. F., 1957; Huxley, H. E., 1972)。昆虫间接飞翔肌的结构和生理特性有许多不同于脊椎动物骨骼肌的特点。蜜蜂飞翔肌肌原纤维虽然也包含有粗、细两组肌丝,但其粗肌丝从Z线伸展至邻近的另一Z线。分离出的粗肌丝的长度不定,在 2.0μ 至 4.5μ 之间(范世藩、洪明霞、陈明, 1966a)。经甘油抽提过的蜜蜂肌原纤维在肌小节长度大于按滑行模型所计算的粗、细肌丝长度之和时,在ATP作用下仍能发生收缩(洪明霞、范世藩, 1963)。拉长肌原纤维, A带和I带平均蛋白浓度之比随肌小节长度的增加单调上升(范世藩、洪明霞, 1962)。最近,我们成功地从蜜蜂飞翔肌肌原纤维中得到了副肌球蛋白类晶体(陈明、范世藩, 1982) 本工作又利用电子显微镜观察了经系统选择性抽提过的肌原纤维以及不同抽提液中所含收缩蛋白, 并据此分析了肌原纤维几种主要收缩蛋白的定位。

材 料 和 方 法

1. 材料 用蜜蜂 (*Apis mellifera ligustica* Spin.) 作材料。

2. 蜜蜂间接飞翔肌肌原纤维的分离和纯化 (Bullard, B., Luke, B. & Winkelman, L., 1973)。将新鲜的或经甘油处理过的蜜蜂胸节,放入10倍体积的含300mM-蔗糖, 100mM-KCl, 10mM-磷酸钾缓冲液 (pH7.0), 1mM-MgCl₂, 1mM-EGTA 和 10mM-NaN₃ 的溶液(4℃), 用搅碎器匀浆, 1000g离心10分钟, 除去浮渣和上层溶液。沉淀上层为肌原纤维, 下层为几丁质壳, 小心地取出肌原纤维。以10倍体积的300mM-蔗糖溶液洗涤肌原纤维8—10次, 每次洗涤后以1000g离心10分钟, 可以得到纯的肌原纤维。

3. 肌原纤维的选择性抽提。肌原纤维选择性抽提的步骤见图1。

4. 肌原纤维收缩蛋白的聚合和晶体的生成。经选择性抽提的上清液II包含肌球蛋白, 副肌球蛋白和C-蛋白。在30%饱和硫酸铵条件下, 肌球蛋白可以沉淀析出。在30—40%饱和硫酸铵条件下, 副肌球蛋白析出, 将沉淀分别以含有600mM-KCl, 10mM-磷酸钾缓冲液 (pH7.0), 1mM-NaN₃ 的溶液溶解, 再经微酸性的低离子强度溶液透析3—5天, 可以得到肌球蛋白聚合体和副肌球蛋白类晶体。

上清液III中包含肌动蛋白和原肌球蛋白。将上清液III经含50mM-KCl, 1mM-MgCl₂ 和 0.3mM-NaHCO₃, pH为7.0的溶液透析, 可以得到F-肌动蛋白 (Bullard, B., Dabrowska, R. & Winkelman, L., 1973)。上清液III经含50mM-KCl, 1mM-MgCl₂, pH5.1 (原肌球蛋白的等电点) 的溶液透析, 则获得原肌球蛋白晶体。

5. 粗、细肌丝的分离。与 H. E. HUXLEY 所用之方法基本相同 (Huxley, H. E., 1963)。

本文于1981年10月收到。

宋秀娥同志参加技术工作。蜜蜂由上海金山县亭新蜂场提供, 谨致谢意。

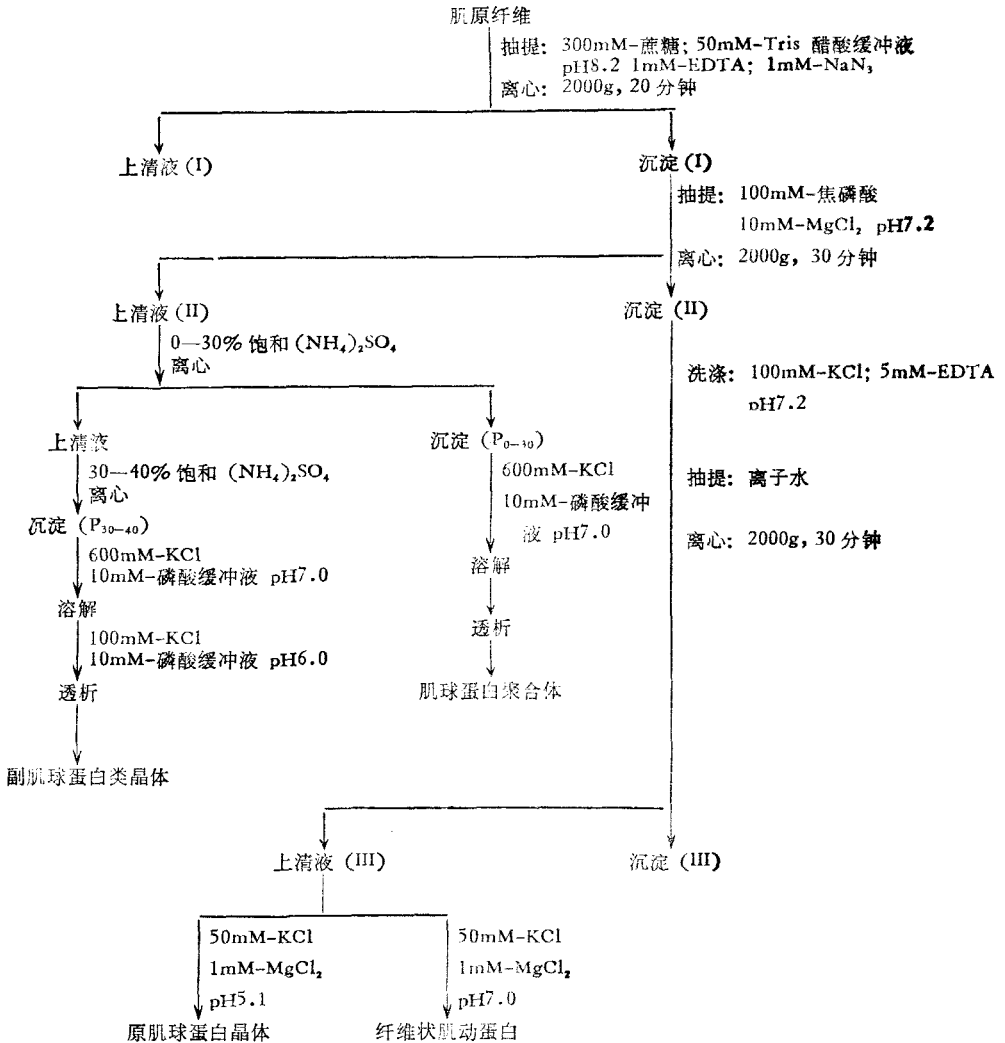


图1 肌原纤维的选择性抽提

6. 电子显微镜观察。将肌原纤维, 肌丝以及蛋白质的聚合体或晶体悬浮液滴于标本栅上, 经 1% 醋酸铀染色约 1 分钟, 借日立 H-500 电子显微镜进行观察。

结 果 和 讨 论

一、肌原纤维的结构

我们利用负染技术, 直接在电子显微镜下观察了分离的蜜蜂飞翔肌肌原纤维。在分离出的肌原纤维上, 可以看到有 A 带、I 带、Z 线和 M 线(图版 I:A, B)。肌丝走向和肌原纤维长轴相平行。大多数肌小节的长度和活肌肉静息时的相同, 约为 2.6 微米(图版 I:A), 比在固定标本中见到的略长。也能经常见到一些长度达 3.1 微米的肌小节(图版 I:B)。

在图版 I:A, B 中尚难分辨粗、细肌丝, 但从分离的肌丝中, 我们可以清楚地看到直径不同的两组。图版 I:C 是一根分离的粗肌丝, 长 2.2 微米, 两端呈圆锥形。图版 I:D 是分离的细肌丝, 由两股微丝相互缠绕而成。从外形上来看, 它们各自与脊椎动物横纹肌的粗、细肌丝颇为相似。

二、肌原纤维的选择性抽提

肌原纤维经低离子强度的溶液抽提(图 1)可以溶去 M 线及 Z 线, 只是溶去 Z 线需要较长时间。图版 II A 是经含有 300mM 蔗糖, 50mM-Tris 醋酸缓冲液 pH8.2, 1mM-EDTA 之溶液抽提 16 小时后的肌小节, M 线和 Z 线均被溶去。

经低离子强度溶液较短时间处理之肌原纤维, 继续以含有 100mM 焦磷酸钠, 10mM-MgCl₂, 10mM-磷酸缓冲液 pH7.2 之溶液抽提可以使 A 带的蛋白质浓度大大降低, 残留 Z 线以及附着在它上面的细肌丝(图版 II:B)。两 Z 线的中心间距约为 3.1 微米。

当 A 带蛋白浓度降低后, 再以去离子水抽提, 细肌丝变短和逐渐稀疏(图版 II:C,D)。

三、收缩蛋白质的鉴定

我们以选择性抽提液系统地抽提蜜蜂飞翔肌肌原纤维蛋白, 然后介负染技术在电子显微镜下观察和鉴定抽提液中所包含的主要收缩蛋白。

以含 100mM-焦磷酸钠, 10mM-MgCl₂, 10mM 磷酸缓冲液 pH7.2 的溶液抽提肌原纤维, 抽提液经不同饱和度的硫酸铵分级沉淀, 再经中性高离子强度的溶液溶解, 对微酸性的低离子强度溶液透析, 可以得到聚合的肌球蛋白丝和副肌球蛋白类晶体。肌球蛋白聚合体为长杆状, 两端呈圆锥形, 沿其长轴方向具有周期约 400 Å 的突起(图版 III:A), 与脊椎动物骨骼肌肌球蛋白聚合体形态相似。副肌球蛋白类晶体呈针状, 具有 360 Å 或 140 Å 的周期(图版 III:B)。

经上述溶液处理后的肌原纤维继续以去离子水抽提, 水抽提液对低离子强度的中性溶液透析得到 F-肌动蛋白丝(图版 III:D)。将去离子水抽提液对 50mM-KCl, 1mM-MgCl₂, pH5.1 (原肌球蛋白的等电点)的溶液透析, 则得到原肌球蛋白晶体, 周期为 400 Å (图版 III:C)。

上述实验结果表明, 含 100mM-焦磷酸钠, 10mM-MgCl₂ 的溶液可以使 A 带蛋白浓度下降, 抽提液中主要含有肌球蛋白和副肌球蛋白。去离子水可以溶去剩余的蛋白质, 抽提液中含有肌动蛋白和原肌球蛋白。

从蜜蜂飞翔肌分离的细肌丝呈双股螺旋。电子显微镜观察表明去离子水抽提液中含有肌动蛋白和原肌球蛋白。在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中, 我们看到蜜蜂肌原纤维蛋白中含有原肌球蛋白。因此看来, 蜜蜂飞翔肌的细肌丝的蛋白成分和结构与脊椎动物骨骼肌细肌丝是相同的。蜜蜂飞翔肌与脊椎动物骨骼肌粗肌丝的外形相似。但实验结果表明, 飞翔肌粗肌丝除含有肌球蛋白外, 还含有副肌球蛋白。我们曾经提出(范世藩、洪明霞、陈明, 1966b)蜜蜂间接飞翔肌粗肌丝大概是由一个贯穿整个肌小节, 在 A 带处为中空的内芯及一层包含只位于 A 带的 6 根微丝的外套所组成。从分离的微丝来看, 它很像是肌球蛋白, 至于构成内芯的蛋白质是什么, 当时还不清楚。现在看来, 构成内芯的蛋白质可能就是副肌球蛋白。

参 考 文 献

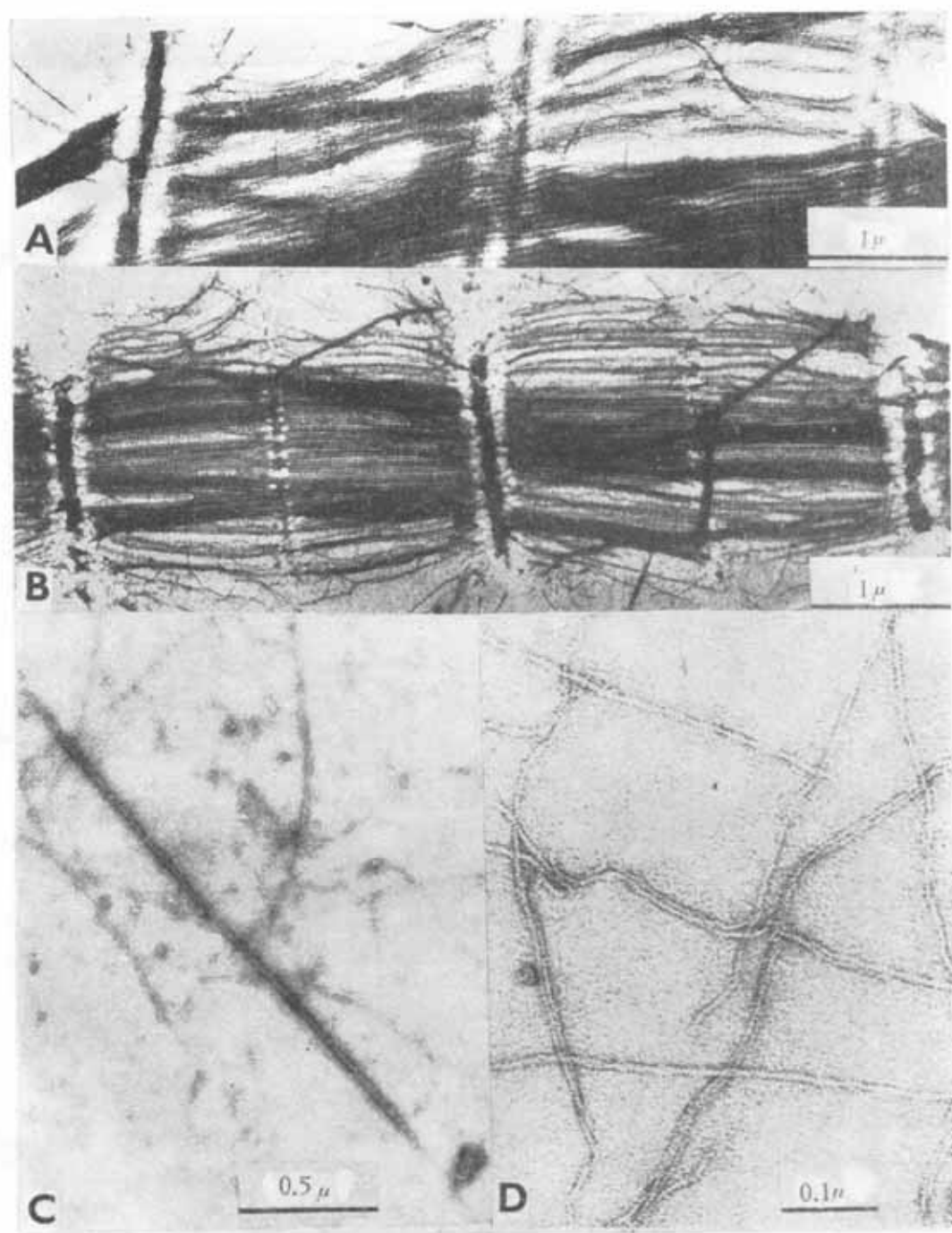
- 陈明、范世藩 1982 蜜蜂间接飞翔肌肌原纤维副肌球蛋白的鉴定。生物化学与生物物理学报 14(1): 94—6。
范世藩、洪明霞 1962 伸长不同程度的蜜蜂间接飞翔肌肌原纤维 A 带和 I 带蛋白浓度的比例。生物化学与生物物理学报 2(2): 79—83。
范世藩、洪明霞、陈明 1966a 蜜蜂飞翔肌肌原纤维蛋白细丝的排列和结构的电子显微镜观察。生理学报 29(1): 81—96。
范世藩、洪明霞、陈明 1966b 蜜蜂飞翔肌肌原纤维粗蛋白细丝的电子显微镜观察。科学通报 17(5): 219—22。
洪明霞、范世藩 1963 关于蜜蜂横纹肌肌原纤维能够收缩的最大肌小节长度。生理学报 26(1): 35—8。
Bullard, B., R. Dabrowska and L. Winkelmann 1973 The contractile and regulatory proteins of insect flight muscle. *Biochem. J.*, 135: 277—86。
Bullard, B., B. Luke and L. Winkelmann 1973 The paramyosin of insect flight muscle. *J. Mol. Biol.*, 75: 357—67。
Huxley, A. F. 1957 Muscle structure and theories of contraction. *Prog. Biophys. Chem.*, 7: 255—318。
Huxley, H. E. 1963 Electron microscopic studies on the structure of natural and synthetic protein

filaments from striated muscle. *J. Mol. Biol.*, 7: 281—308.

Huxley, H. E. 1972 Molecular basis of contraction in cross striated muscles in "the structure and function of muscle" (G. H. Bourn, ed). Vol 1 pt. 1, pp. 301—87. Academic press, New York and London.

ELECTRON MICROSCOPIC IDENTIFICATION OF CONTRACTILE PROTEINS OF HONEY BEE FLIGHT MUSCLE

CHEN MING ZHOU NIAN-HUI FAN SHIH-FANG
(*Shanghai Institute of Physiology, Academia Sinica*)

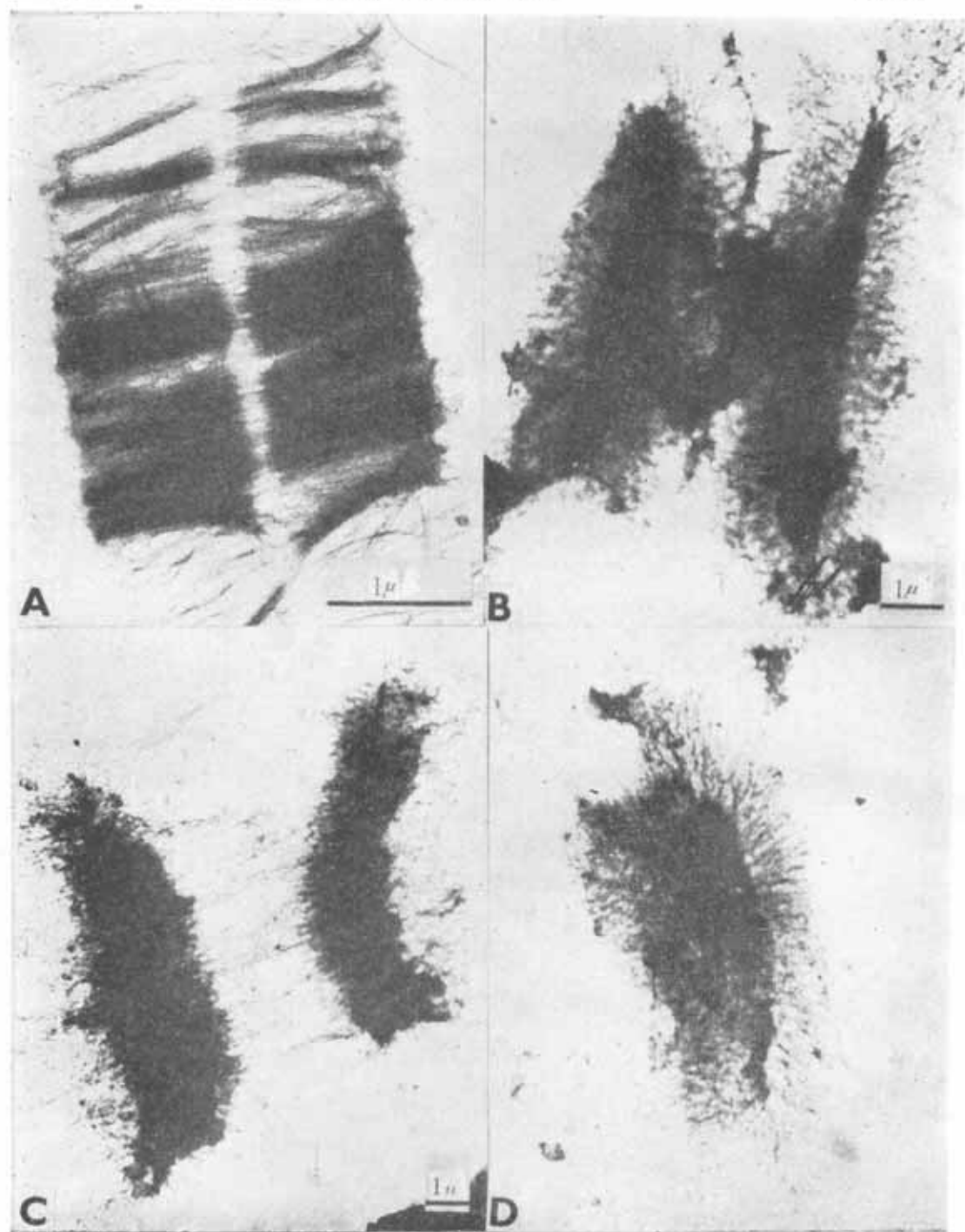


分离的蜜蜂飞翔肌肌原纤维和粗、细肌丝。

A, B 为分离的肌原纤维, 肌小节长度分别为 2.6μ 和 $3.1\mu \times 21000$ 。

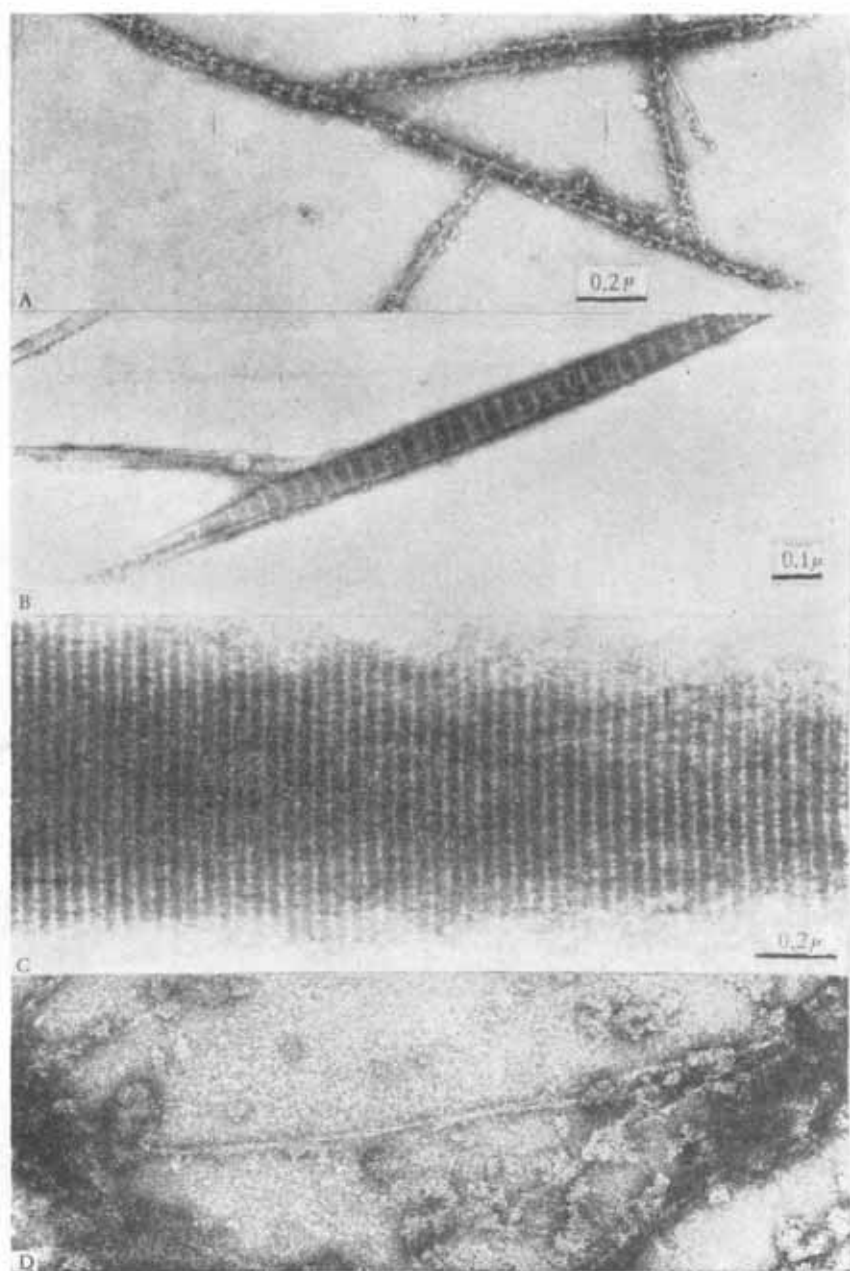
C 为一根粗肌丝, 长 $2.2\mu \times 42000$ 。

D 为分离的细肌丝, 呈双股螺旋结构。 $\times 144000$ 。



经选择性抽提的蜜蜂飞翔肌肌原纤维片段。

- A 为含 300mM-蔗糖, 50mM-Tris 盐酸缓冲液 (pH8.2), 1mM-EDTA 的溶液处理 16 小时, M 线和 Z 线溶去 $\times 22500$ 。
- B 为经低离子强度溶液短时间处理后, 以含 100mM-焦磷酸钠, 10mM-MgCl₂, 10mM-磷酸缓冲液 (pH7.2) 的溶液处理 4 小时, A 带蛋白浓度下降, $\times 96000$ 。
- C 为继而以去离子水处理 40 分钟, 剩余蛋白部分溶去, 细肌丝变短和逐渐稀疏, $\times 7000$ 。
- D 同上, $\times 9000$ 。



蜜蜂飞翔肌肌球蛋白、副肌球蛋白、肌动蛋白和原肌球蛋白晶体。

- A 为肌球蛋白聚合体,可见周期约为 $400 \text{ \AA}$ 的突起 $\times 48000$ 。
 B 为副肌球蛋白类晶体,周期为 $360 \text{ \AA}$ 或 $140 \text{ \AA} \times 83000$ 。
 C 为 F-肌动蛋白, $\times 115200$ 。
 D 为原肌球蛋白晶体,周期为 $400 \text{ \AA}$, $\times 55200$ 。