

# 长毛对虾卵子发生的细胞化学研究

洪水根 朱燕\*

(厦门大学生物系)

## 摘 要

本文利用细胞化学的方法研究长毛对虾卵子发生中主要生物大分子：核酸、蛋白质、糖类及酶的变化特点，并探讨引起这些变化的原因。

卵子在卵巢中的形成是个体发育中极其重要的时期，卵子的形成不只是营养物质的积累，它也是遗传活动加紧进行的时期<sup>[1]</sup>。这些活动导致细胞内各种重要的大分子(DNA、RNA、蛋白质、酶、脂类和糖类等)的合成。这些大分子的合成及其在细胞的分布决定今后胚胎发育的方式和历程，所以研究卵子发生的细胞化学变化，有助于加深对卵子发生代谢活动的认识。目前这方面的资料相当缺乏，极需加强这方面的研究。本文首次报道长毛对虾卵子发生的细胞化学变化，并探讨引起这些变化的原因。

## 一、材料和方法

实验所用的材料取自厦门海区捕捞的不同成熟度的雌虾卵巢，进行如下处理。

用Carnoy固定液(0—4℃)固定，分别用Feulgen反应和Brachet反应检验DNA和RNA。对照组用5%三氯醋酸在90℃下预处理15分钟。

用Carnoy固定液，PAS反应显示糖类。对照组用过滤的唾液消化30分钟。

用Carnoy固定液，汞-溴酚蓝法显示中性蛋白质；碱性快绿法(pH8.0—8.1)显示碱性蛋白质，酸性快绿法(pH4.0—4.1)显示酸性蛋白质，并用显示DNA、多糖类、蛋白质的三色法作对照。

用冷丙酮(0℃)固定液，用钙-钴法(Gomori, 1952)显示碱性磷酸酶，用硫化铅法(Gomori, 1950)显示酸性磷酸酶。对照组在80℃下烤60分钟预处理。

## 二、观察结果

根据细胞的大小、核仁的形态、卵黄粒的有无、粘液泡(亦称周边体)的出现及卵母细胞与滤泡细胞的关系，长毛对虾卵子发生可划分为卵原细胞、卵黄发生前的和卵黄发生

本文于1988年2月25日收到，修改稿于1989年6月3日收到。

\* 现在在南京药学院工作。

的卵母细胞三个时期<sup>[2]</sup>。现将伴随卵子发生过程所发生的主要细胞化学变化报道如下。

### (一) 核酸

#### 1. DNA (去氧核糖核酸)

长毛对虾卵原细胞的核染色质在Feulgen反应中,被Schiff试剂染成红色,在三色法中被天青A-Schiff试剂染成蓝色,表现DNA强的阳性结果,细胞质呈阴性反应。卵黄发生前的卵母细胞核染色质的Feulgen阳性反应减弱,阳性反应物质呈细丝状分散在核的边缘及中央位置,而卵母细胞的细胞质从卵原细胞的阴性反应转为阳性反应,细胞质部分出现1—2个被Schiff试剂染成红色的小颗粒。卵黄发生期间,卵母细胞的核染色质Feulgen反应变为阴性,细胞质却染成淡红色,显现弱的Feulgen阳性反应。与此同时,利用Brachet反应,可观察到靠近细胞核外缘的细胞质部分有一个被甲基绿染成蓝绿色的帽状区域,表示细胞质中DNA集中分布的位置。

卵子发生中,滤泡细胞的核染色质均呈Feulgen阳性反应。

#### 2. RNA (核糖核酸)

在Brachet反应中,RNA具有嗜派洛宁的性质。卵原细胞的核仁呈弱的嗜派洛宁性,被染成鲜红色,而细胞质几乎不着色。进入卵母细胞时期,核仁的嗜派洛宁性增强,细胞质亦表现为Brachet阳性反应,而且随着核仁物质通过向核膜外排,进入细胞质,阳性反应最强。卵黄发生期间,核仁逐渐退化,核内Brachet反应减弱,直至消失。除粘液泡外,细胞质的Brachet阳性反应仍显示阳性结果。

### (二) 蛋白质

汞-溴酚蓝(Hg-BPB)可显示中性蛋白的分布位置。一般地说,长毛对虾卵原细胞中性蛋白含量少,随卵细胞发育,其含量增高。卵黄发生后期,中性蛋白主要集中于细胞质的一侧,显示出极性分布的特点(图版I-1,2)。

利用显示酸性蛋白的酸性快绿(pH4.0—4.1)染色法可以发现,早期卵母细胞核仁及细胞质都表现阳性结果。卵黄发生后期,酸性蛋白也集中分布在细胞质的一侧,另一侧则出现不被染色的区域,表现类似中性蛋白的分布特点(图版I-3)。

碱性快绿(pH8.0—8.1)可以用来显示碱性蛋白在细胞的分布位置。早期卵母细胞核仁对碱性快绿表现为阳性反应,细胞质却出现阴性结果,卵黄发生后期,碱性蛋白的分布出现区域化,在核外的一端出现一个类似于Brachet反应中被甲基绿染成蓝绿色的帽状区(图版I-4)。这个区域正好与中性蛋白和酸性蛋白不被染色的位置相吻合。

### (三) 糖类

细胞中的糖类物质可用过碘酸-Schiff试剂(PAS反应)来显示。长毛对虾卵原细胞在PAS反应中不染色,表现阴性结果。早期卵母细胞,细胞质出现1—2个被过碘酸Schiff试剂染为鲜红色的阳性反应颗粒(图版I-5)。这与利用三色反应所观察到的细胞质中出现被碱性品红-Schiff试剂染为红色的颗粒所得的结果是一致的。卵黄发生期间,随着卵

黄粒的出现，PAS阳性反应最先出现在核外周缘的细胞质部分，继而向整个细胞质扩散。卵黄发生后期，整个细胞质充满PAS阳性反应的小颗粒（图版 I - 6）。

卵子发生中，滤泡细胞显示PAS阳性反应。

#### （四）酶

利用Gomori 硫化铅法（1950）可以显示，酸性磷酸酶主要存在于各期卵细胞的核内、核仁及细胞质外周边缘，细胞质其余位置仅少量存在（图版 I - 7）。滤泡细胞中含有大量的酸性磷酸酶。

Gomori 钙 - 钴法（1952）可用来显示碱性磷酸酶在细胞中的存在位置。长毛对虾卵细胞的碱性磷酸酶主要存在于各期细胞的核仁和细胞质中（图版 I - 8）。滤泡细胞中含有少量碱性磷酸酶。

长毛对虾卵子发生的细胞化学变化列于表 1。

表 1 长毛对虾卵子发生中的细胞化学变化

生物大分子		卵子发育阶段 染色方法		卵原细胞 (20 μm)			卵黄发生前的卵母细胞 (20—40 μm)			卵黄发生的卵母细胞 (40—300 μm)			滤泡细胞
				细 胞 核		细 胞 质	细 胞 核		细 胞 质	细 胞 核		细 胞 质	
				染色质	核 仁		染色质	核 仁		染色质	核 仁		
核 酸	DNA	Feulgen 反 应	+++	-	-	++	-	+	+	-	+	+++	
	RNA	Brabhet 反 应	-	+	-	-	+++	+++	-	+	++	++	
蛋 白 质	中 性 蛋白质	汞 - 溴酚蓝法	+	+	+	+	++	++	+	+	+++	+	
	酸 性 蛋白质	酸性快绿 (pH4.0—4.1)	-	+	+	-	++	++	-	+++	+++	+	
	碱 性 蛋白质	碱性快绿 (pH8.0—8.1)	+	+	-	-	+++	-	-	+	+++	+	
糖 类		PAS反应	-	-	-	-	+	++	-	-	+++	+++	
酶 类	酸 性 磷酸酶	Gomori 硫 化铅法 (1950)	0	+	+	-	++	++	+	++	+	+++	
	碱 性 磷酸酶	Gomori 钙 钴法 (1952)	0	+	+	+	++	++	+	+	+	+	
说 明				0 = 不确定；+ = 弱反应；++ = 中等反应；+++ = 强反应；- = 无反应									

### 三、讨 论

卵子发生中细胞化学变化及其意义。利用Feulgen反应结合三色法可以看到，长毛对

虾卵子发生中核内染色质的Feulgen反应经历了由强到弱以至阴性的变化过程,细胞质的Feulgen反应却从阴性变为阳性。卵子发生中Feulgen反应的这一特征在许多动物类群都有报道<sup>[3-5]</sup>。对于这一现象有不同的解释。一部分学者认为,核内Feulgen反应的消失是由于染色体DNA的破裂或化学性质的改变。按照这个观点,在卵子发生的大部分时间内,在卵核中没有DNA存在,而仅在成熟分裂开始很短时间以前,DNA的再形成才发生<sup>[1,3]</sup>。另一部分学者认为,Feulgen阳性反应物质在卵核中消失,一方面是由于随着卵母细胞核膨大为胚泡,染色质的DNA被分散到这个巨大核的整个区域,因而引起可染物质冲淡所造成的视觉效应;另一方面核内染色质DNA在卵子发生中部分排到细胞质中,因而造成核内DNA量的减少。长毛对虾卵母细胞质出现Feulgen反应阳性颗粒的现象支持后一种关于核内Feulgen反应消失的解释。卵子发生中,卵母细胞质含有DNA或其前体物的现象在许多动物中也曾报道<sup>[3,4]</sup>。据Schrader和Leuchteuberger<sup>[6]</sup>认为,DNA从核到细胞质有两个途径:(1)通过核膜渗出;(2)当核崩解时,DNA分散到细胞质。长毛对虾卵母细胞出现核仁物质通过核膜孔外排到细胞质的现象<sup>[2]</sup>,很可能,核内DNA也随之通过核膜孔进入细胞质。实际上,卵子发生中,卵母细胞DNA总量用分光光度法测定量保持不变<sup>[1]</sup>。这就说明,在卵子发生中,大部分时间核表现Feulgen阴性反应并不意味着核中遗传物质的量有实质性的变化。卵子发生中,细胞遗传物质毫无损失地保留下来,以保证物种的稳定性。

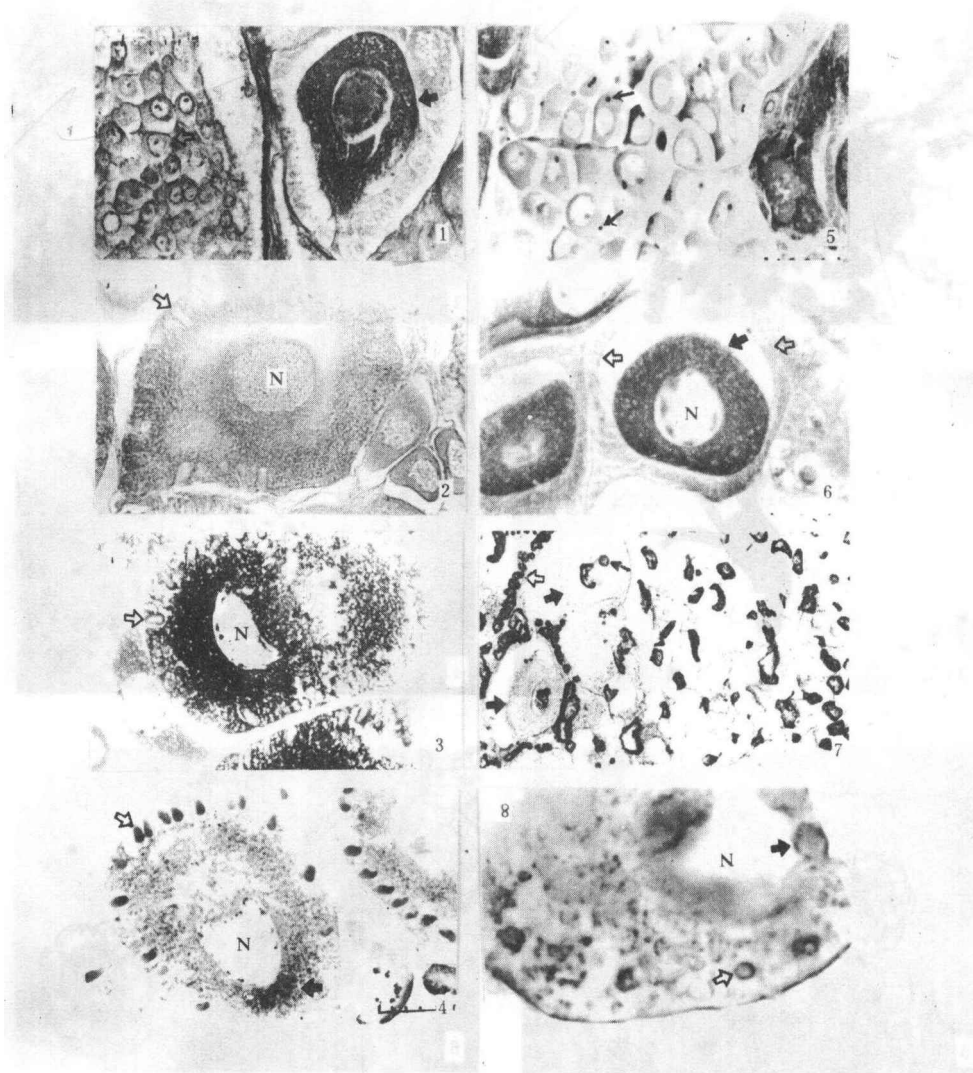
卵子发生中,RNA也发生很大变化。其变化的最大特点是细胞质和核仁Brachet反应表现出密切相关性。卵原细胞核仁的Brachet反应强于细胞质。卵母细胞时期,核仁和细胞质的Brachet反应表现同步增强。当细胞质出现核仁外排物时,细胞质Brachet反应最强。卵黄发生后期,随着核仁的退化,核仁Brachet反应逐渐减弱,细胞质的Brachet反应亦随之减弱,但慢于核仁的变化。大量的生化资料表明,核仁是rRNA合成的主要位置<sup>[7]</sup>。Miller和Beatty(1967)在两栖类*Triturus viridescens*发育的卵母细胞中,用电镜观察了rRNA在核仁转录的过程。核仁合成的rRNA通过核膜孔输送到细胞质,因此核仁和细胞质的Brachet反应表现出相关性。

RNA酶消化实验表明<sup>[7]</sup>,Brachet反应中细胞嗜派洛宁性主要来自核糖体的RNA。卵黄发生前卵母细胞质Brachet阳性反应增强,实际上是核糖体数量增加。这从电镜观察得到证实<sup>[2,8]</sup>。由于核糖体是蛋白质合成的场所,因此可以推断,含有丰富的核糖体的卵黄发生前的卵母细胞将合成大量的蛋白质为后一阶段卵黄粒的形成准备物质条件。这一点已为Brachet和Ficq(1956)有关放射自显影术研究证实<sup>[1]</sup>。长毛对虾卵母细胞这时期蛋白质反应同步增强也证实这一推断。

长毛对虾卵母细胞蛋白质反应的最大特点是在卵黄发生后期卵母细胞靠近核一端的细胞质部分出现一个碱性蛋白富集的区域(图版1-4)。这一区域在Brachet反应中被甲基绿染成蓝绿色而在汞-溴酚蓝和酸性快绿中不被染色。碱性蛋白主要指的是含碱性氨基酸的组蛋白。由于组蛋白对细胞分裂、胚胎发育和分化有抑制作用,因此推测,长毛对虾卵子发生中,成熟分裂延缓到受精之后才发生<sup>[9]</sup>,是否与核外这一帽状区域中的组蛋白抑制作用有关。有关这个问题尚待进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] J. 布拉舍, 严绍颐等译, 发育的生物化学, 科学出版社, 1964, 4—39.
- [2] 洪水根等, 长毛对虾卵子发生的研究 I, 卵子发生过程, 海洋与湖沼, **19** (1988), 3: 301—306.
- [3] P. C. 瑞温, 李汝祺等译, 卵子发生, 科学出版社, 1965, 108—119.
- [4] Bennett, J., The cytochemistry of *Limulus* eggs, *Biol. Bull.*, 1979, 156: 142—156.
- [5] Bonhag, P.F., Histochemical studies of the ovarian nurse tissue and oocytes of the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus* (Dallas), *J. Morph.*, 1955, 96: 381.
- [6] Schrader, F. and C. Leuchtenberger, The origin of certain nutritive substances in the egg of Hemiptera, *Exp. cell Res.*, 1952, 3: 136.
- [7] 汪德耀等, 普通细胞生物学, 上海科学技术出版社, 1988, 265—378.
- [8] 洪水根, 萤的卵黄发生, 海洋与湖沼, **18** (1987), 3: 286—290.
- [9] 厦门水产学院养殖系虾蟹组, 对虾, 农业出版社, 1978, 75—80.
- [10] J. 布拉舍, 傅文庆译, 分子胚胎学引论, 科学出版社, 1981, 41—48.
- [11] B. H. 威利尔等, 庄孝德等译, 发育分析, 科学出版社, 1956, 251—252.



1——卵原细胞(白箭头)和卵黄发生的卵母细胞(黑箭头)中性蛋白质的分布, 汞-溴酚蓝染色,  $\times 200$  2——卵黄发生的卵母细胞后期的中性蛋白质的分布, 汞-溴蓝染色, N: 核, 白箭头: 粘液泡,  $\times 200$  3——卵黄发生的卵母细胞后期酸性蛋白的分布(白箭头), 酸性快绿染色,  $\times 200$  4——卵黄发生的卵母细胞后期碱性蛋白的分布, 碱性快绿染色, 白箭头: 碱性蛋白富集的位置,  $\times 200$  5——卵黄发生前的卵母细胞质中的糖元颗粒(细箭头), PAS反应,  $\times 100$  6——卵黄发生的卵母细胞(黑箭头)糖类的分布, 白箭头示滤泡细胞, PAS反应,  $\times 200$  7——酸性磷酸酶在卵黄发生的卵母细胞(黑箭头)和滤泡细胞(白箭头)的分布, 细箭头示核仁, 硫化铅法(Gomori, 1950),  $\times 100$  8——卵黄发生的卵母细胞后期碱性磷酸酶分布, 黑箭头示核仁, 白箭头示粘液泡 钙-钴法(Gomori, 1952),  $\times 100$