

Anàlisi del espectre proteic a la maduració d'òocits en crustacis copèpodes.

J. G. VALERO

Departament de Citologia i Histologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, Barcelona 08028.

Abstract

It has been possible to obtain proteic pattern from few cells by using polyacrylamide gradient gels (0.25-0.27 mm in diameter). In this gels, amounts of protein down to  $10^{-10}$  gr can be detected with Coomassie Blue R 250.

Proteic pattern from oocyte extracts have been performed on two development phases: primary vitellogenesis and secondary vitellogenesis. We stated the existence of two groups of specific proteins in the oocytes. The first is very slow and its composition, at the present, is unknown. The second exhibit positive reaction with the Black Sudan B. This suggest an lipoproteic character and its possible likeness with vitelline proteins, previously characterized in others groups.

Introducció

L'estudi de la composició i natura del vitel·lus als crustacis va estar iniciada per Frenzt (1954,1960) utilitzant tècniques electroforètiques en l'estudi de l'hemolinfa de un cranc (Carcinus maenas), distingint tres fraccions i caracteritzant una d'elles com exclusivament femenina. Meusy et al. (1969) arriben a uns resultats semblants treballant amb amfípodes i d'altres autors ho fan amb diferents grups allunyats filogenèticament. Picaud (1980) identifica el lloc de síntesi de la vitel·logenina, en els crustacis, situant-lo en el teixit adipós, caracteritzant alhora la proteïna.

Amb aquest treball hem intentat la posta a punt de certes tècniques electroforètiques, per tal d'estudiar les proteïnes específiques del gàmete femení en els copèpodes, grup que afeigeix al interès de la seva desconeixença, la dificultat material i tècnica que representa el seu tamany (1.0-1.5 mm de llargada) (fig.1).

Material i metodologia

L'espècie en estudi és l'Acanthocyclops robustus, recollit

a les llacunes del Delta de l'Ebre.

Basats en les conclusions de una anàlisi morfològica anterior i mitjançant l'índex núcleo-citoplasmàtic o bé el diàmetre cel.lular (fig. 2), es poden separar, amb un grau alt de fiabilitat, els dos estadis esmentats anteriorment i situar-los anatómicament, en dues regions ben definides del animal. Així, els oòcits en vitel·logènesi primària es troben, fonamentalment, a la part anterior del oviducte (fig.3) i en una posició més dorsal que no pas els oòcits en vitel·logènesi secundària, que ocupen la regió posterior de l'oviducte, éssent aquesta més ventral (fig.4).

Els dos grups d'oòcits, homòlegs respecte el seu grau de maduració, són separats sota lupa, i, manipulant-los amb una micropipeta, són rentats dues vegades en aigua desionitzada i homogenitzats en 2.5  $\mu$ l de la mateixa aigua, deixant-los a 4°C durant una hora, afeigint-li a continuació un volum igual de ClNa 0.8 M, per a solubilitzar les lipoproteïnes (Picaud, 1980). Per tal d'estabilitzar la mostra se li afeigeix, optativament, glicerol fins a una concentració final del 50%.

Els gels d'"hemolinfa" han estat obtinguts per rentat dels animals, un cop ha estat oberta la cutícula i feta una punció dorsal, amb tampó fosfats pH 7.2, fent servir el preparat immediatament.

La tècnica electroforètica és, bàsicament, la descrita per Rùchel et al. (1973). Els gels són polimeritzats en tubs de 5  $\mu$ l de capacitat (corning Glass) i la constitució del microgradient és aconseguïda mitjançant les forces de capil·laritat, al difondre, dintre del mateix tub, dues solucions de diferent densitat, que donen, en el nostre cas una T<sub>max</sub>. del 40%. El tampó del gel és tris-sulfúric a un pH de 8.6, mentre que el de les cubetes de desenvolupament és de tris-glicina a un pH de 8.2.

La comprovació densitomètrica de la difusió de les solucions mitjançant un colorant afeigit a la segona solució, permet deduir una bona linearitat en el gradient del gel, arribant-se quasi a un 2% en l'extrem superior.

La mostra, a la que se li afeigeix prèviament una petita gota de blau de bromofenol al 1%, és introduïda en el capil·lar mitjançant una micropipeta.

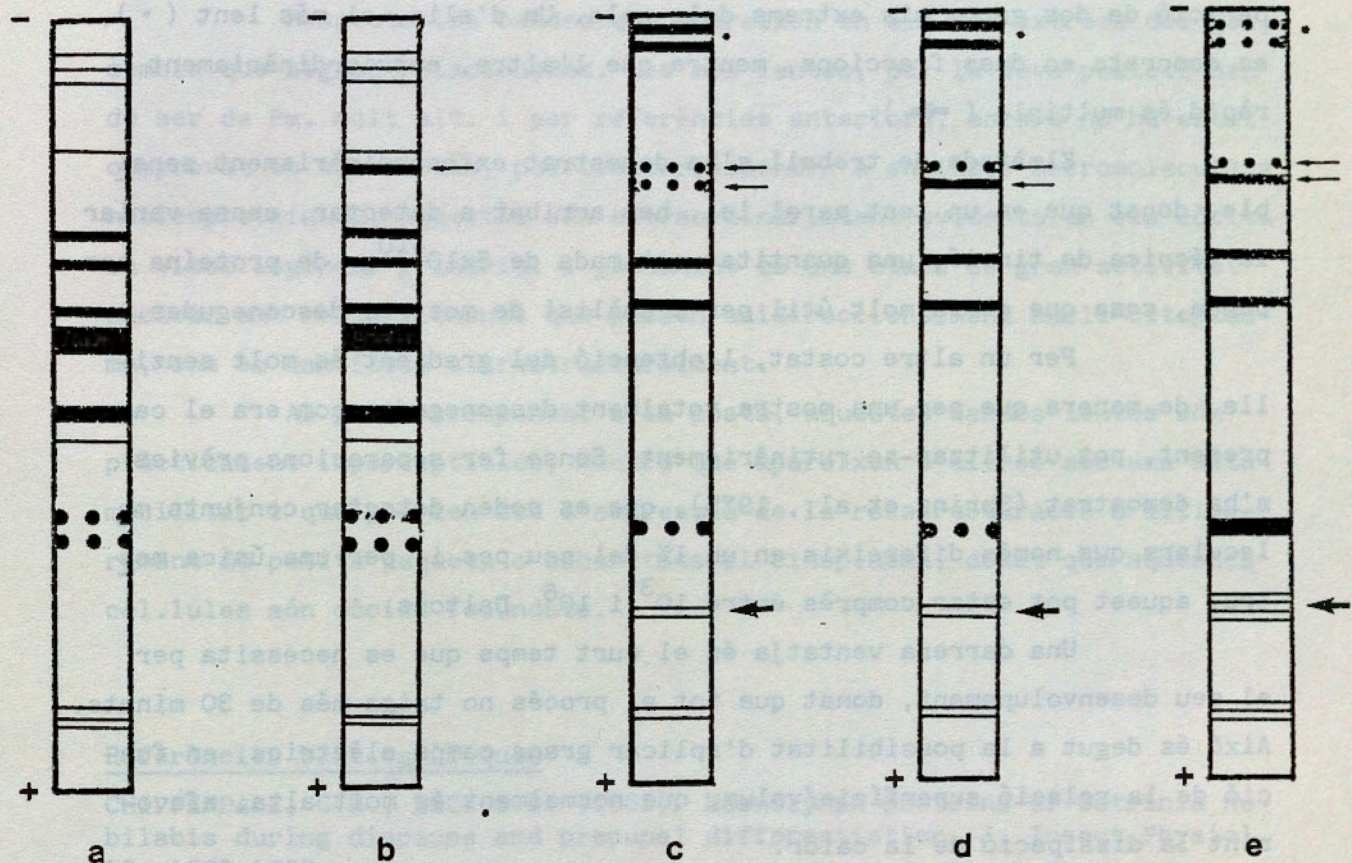
L'electroforesi és desenvolupada amb una font d'alimentació Pleuger CVC-E, éssent el camp elèctric aplicat de uns 100V/cm de

llargada de gel. Posteriorment, i manipulant el capil·lar amb pinces, per tal de no afavorir la difusió, es treu el gel amb un filferro de diàmetre adient, passant a tenyir-ho amb una solució de Coomassie Blue R 250 al 0.4% en metanol:àc. acètic:aigua (6:1:4), destenyint-lo amb la mateixa solució sense colorant, i conservant els gels en àc. acètic al 7%.

La detecció de grups glucídics a les proteïnes ha estat feta mitjançant la tècnica del P.A.S. descrita per Zachaius et al.(1969).

per la detecció de grups lipídics hem utilitzat la tècnica del Sudán B, descrita per Chippendale i Beck (1966).

### Resultats i discussió



a) "hemolinfa" mascles; b) "hemolinfa" femelles; c) oòcits vitel.logènesi primària; d) oòcits en vitel.logènesi secundària; e) posta

Els patrons electroforètics provinents de les extraccions "hemolinfàtiques", mostren com a única diferència detectable la banda ( → ) que apareix en el corresponent a la femella. Aquesta fracció és

relativament lenta, la qual cosa fa suposar, en principi, un gran pes molecular. Aplicant als gels la tècnica del Negre Sudán B dóna positiu, però no així amb la tècnica del P.A.S.

Els gels corresponents a les diferents etapes en que es troben els oòcits, tenen en comú la presència de la banda ja esmentada, però la seva tinció és molt feble, i apareix una altra, lleugerament més mòbil, que presenta un baix contrast a l'estadi de vitellogenèsi primària, però en els altres estroba, relativament, en una proporció més alta. El comportament d'aquesta, enfront les proves per a determinar el caràcter lipoproteic o glucoproteic és exactament igual al anterior, i són les úniques que reaccionen positivament front el colorant lipídic.

Juntament amb la no detecció d'algunes bandes, hi ha l'aparició de dos grups als extrems dels gels. Un d'ells, el més lent (•), es concreta en dues fraccions, mentre que l'altre, extraordinàriament ràpid, és múltiple (➔).

El mètode de treball s'ha demostrat extraordinàriament sensible, donat que en un test paral·lel, hem arribat a detectar, sense variar la tècnica de tinció, una quantitat estimada de  $5 \times 10^{-10}$  gr de proteïna per banda, cosa que el fa molt útil per l'anàlisi de mostres desconegudes.

Per un altre costat, l'obtenció del gradient és molt senzilla, de manera que per una mostra totalment desconeguda, com era el cas present, pot utilitzar-se rutinàriament. Sense fer separacions prèvies s'ha demostrat (Sprinz et al., 1975), que es poden detectar conjunts moleculars que només difereixin en un 1% del seu pes i, per una única mostra, aquest pot estar comprès entre  $10^3$  i  $10^6$  Daltons.

Una darrera ventatja és el curt temps que es necessita per el seu desenvolupament, donat que tot el procés no triga més de 30 minuts. Aixó és degut a la possibilitat d'aplicar grans camps elèctrics, en funció de la relació superfície/volum, que normalment és molt alta, afavorint la dissipació de la calor.

Respecte els patrons d'electroforesi, les dues bandes que apareixen en els oòcits i que una d'elles, també, és present al corresponent de l'hemolinfa de la femella, sembla que són equiparables a les descrites per Picaud (1983) i que identifica com la vitellogenina i la vitel·lina. La semblança establerta es pot basar en la seva, aparent, mobilitat; la reacció positiva al Negre Sudán B i la relació de tinció entre ambdues en els diferents estadis de la maduració, s'interpretaria

com que la banda més lenta correspondria al precursor (vitel.logenina) del producte oocitàri més important quantitativament (vitel.lina), que seria la més ràpida. Així semblaria que el model exposat en aquell treball també tindria una correspondència amb el model en estudi, en el sentit de que el precursor seria extraoocitàri (sola presència a l'hemolinfa) i passaria a l'interior del gamet, per ésser, finalment, minoritari, mentre que el seu producte es trobaria en una situació inversa, és a dir, majoritàriament en els oòcits de posta.

Malgrat totes aquestes coincidències, l'autor abans esmentat demostra que les dues fraccions són glucolipoproteïnes, i que, per tant, reaccionen amb la tècnica del P.A.S., mentre que per nosaltres la reacció glucídica sempre ha estat negativa.

Respecte les bandes que apareixen en els dos extrems del gel, sembla que siguin relacionades. Les més lentes, per la seva posició han de ser de Pm. molt alt, i per referències anteriors, encara no ha estat comprovat en aquest cas, podrien correspondre a entitats macromoleculares nucleoproteïques. Aquestes són extraordinàriament evidents en els oòcits en vitel.logènesi primària, i justament és una etapa de gran activitat nuclear amb molts elements que passen unidireccionalment nucli-citoplasma, com es manifesta ultraestructuralment.

Al gel corresponent a la posta, aquestes bandes lentes són pràcticament imperceptibles, mentre que apareixen d'altres amb una alta mobilitat i que podrien ser l'expressió de la reestructuració o alliberament de petits paquets o subunitats al citoplasma, donat que aquestes cèl.lules són oòcits fecundats.

#### Referències bibliogràfiques

CHIPPENDALE, G.M., BECK, S.D. (1966). Haemolymph proteins of *Ostrinia nubilalis* during diapause and prepupal differentiation. *J. Insect Physiol.* 12, 1629-1638.

FRENTZ, R. (1954). Electrophorèse sur papier des protéines du serum de *Carcinus maenas*. *C.R.Acad.Sci., Paris*, 239, 1867-1868.

FRENTZ, R. (1960). Contribution à l'étude biochimique du milieu intérieur de *Carcinus maenas* Linné. *Bull. Soc. Sci., Nancy.*, 19, 1-176.

MEUSY, J.J., CHARNIAUX-COTTON, H., CROISILLE, Y. (1969). Etude par électrophorèse chez *Orchestia gammarella* (Pallas) et *Orchestia mediterranea* Costa (Crustacés Amphipodes) des protéines de l'hémolymphe: comparaison

entre les mâles, les femelles et les intersexués. C.R.Acad.Sci., Paris 269, 741-743.

PICAUD, J.L.(1980). Vitellogenin synthesis by the fat body of *Pocellio dilatatus* Brandt (Crustacea, Isopoda). Int. J. Invertebr. Reprod., 2, 341-349.

PICAUD, J.L. (1983). Les protéines spécifiques femelles des Crustacés Isopodes. Constitution, synthèse et certains aspects du contrôle de leur synthèse et de leur libération. Thèse, Université de Poitiers.

RUCHEL, R., MESECKE, S., WOLFRUM, D.I., NEUHOFF, V. (1973). Mikroelektrophorese an kontinuierlichen Polyacrylamid-Gradientengelen I. Hoppe Seylers. Z. Physiol. Chem. 353, 1351-1382.

SPRINZL, M., WOLFRUM, D.I., NEUHOFF, V. (1975). Separation of aminoacyl-t-RNA-Phe and tRNAs-Phe with partially hydrolysed 3' end by polyacrylamide gradient micro-electrophoresis. FEBS Lett, 50, 54-61.

ZACHARIUS, R.M., ZELL, I.L., MORRISON, J.H., WOODLOCK, J.J., (1969). Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. Anal. Biochem., 30, 148-152.

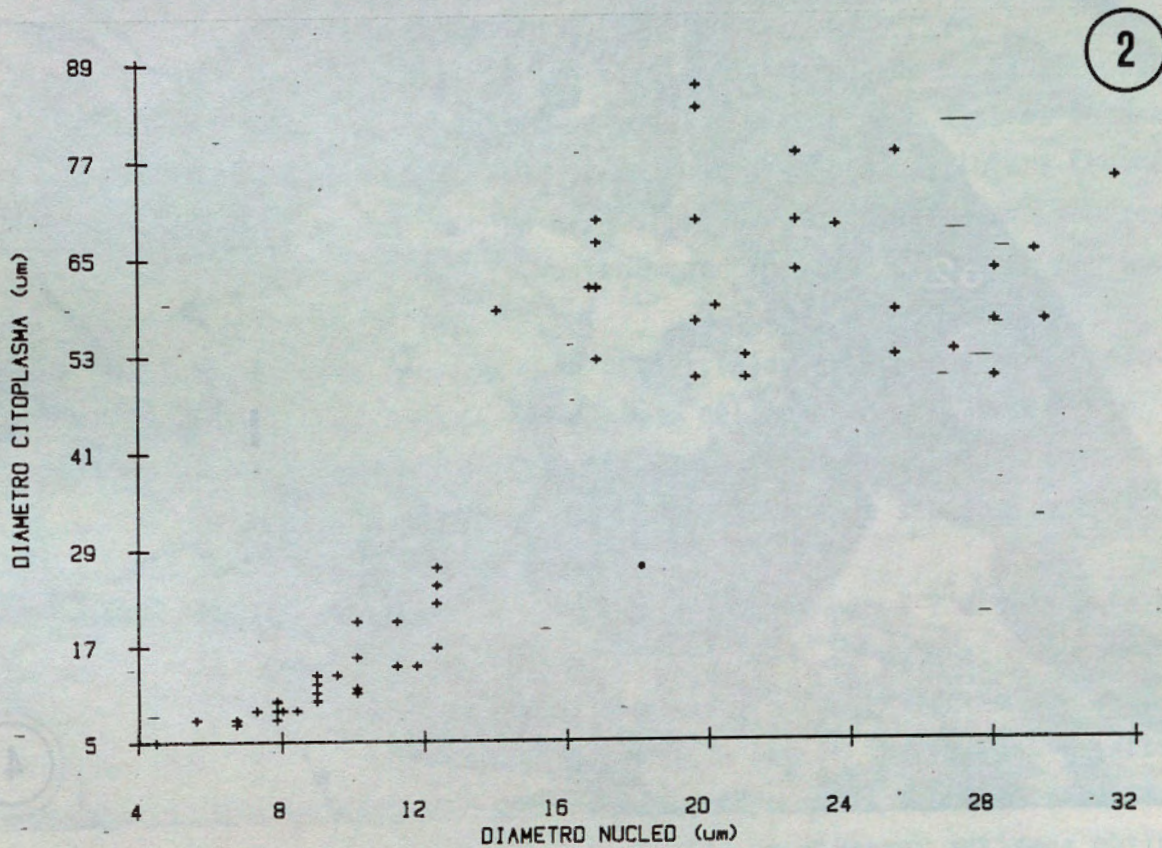
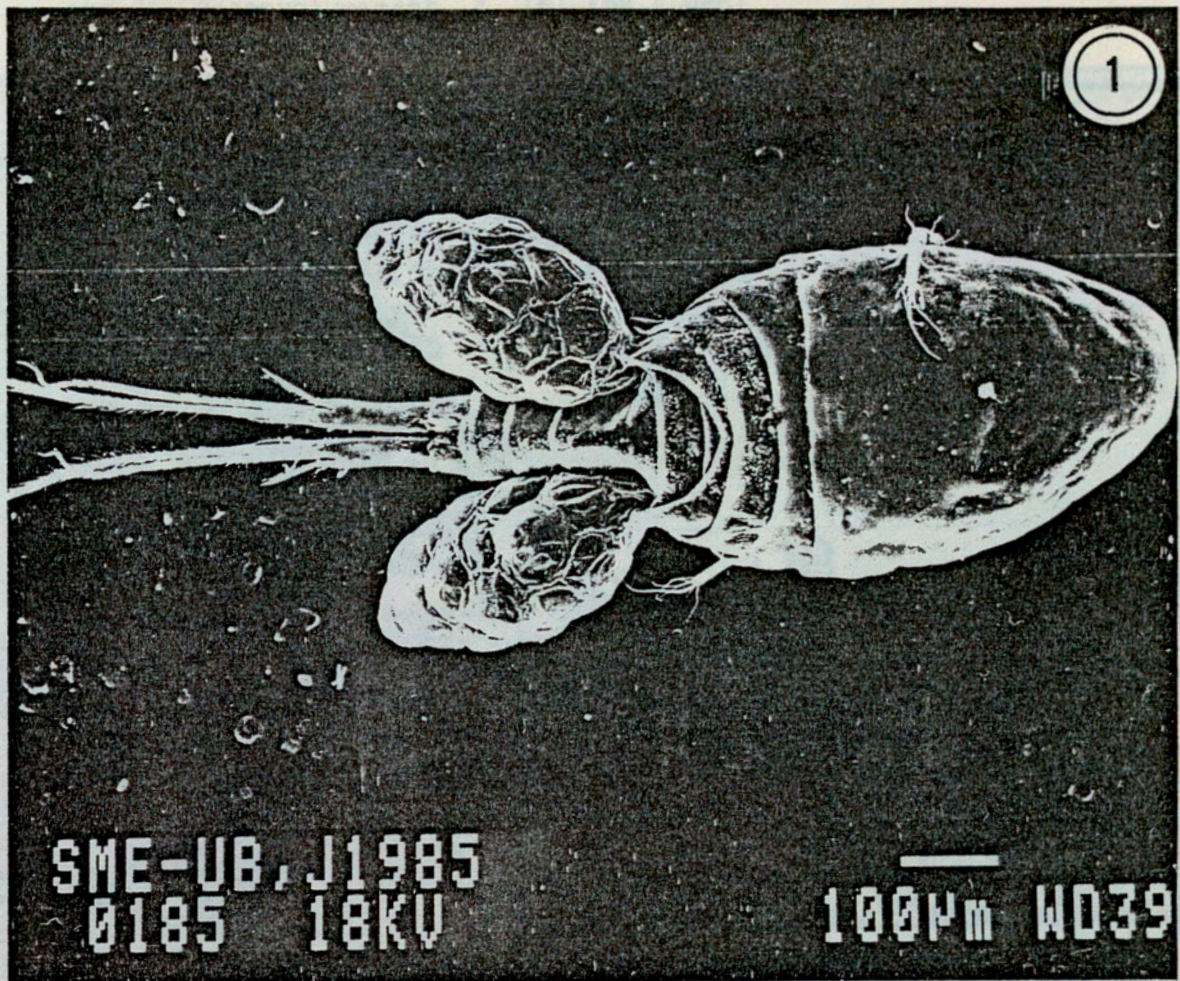


Fig.1. *A. robustus*, vista dorsal.

Fig.2. Distribució de les dues poblacions occitàries en relació l'índex nucleo-citoplasmàtic.



Fig.3. Tall sagital. ov, ovari; o1, oòcits en vitel.logènesi primària; I, intestí. x2600.

Fig.4. Tall sagital. o2, oòcits en vitel.logènesi secundària; I, intestí. x2600.