

ファースト・システムを用いたラット卵子の初期発生胚の構成タンパク質パターンの変化の検討

青島 義明・松本 浩道・梅津 元昭・菅原 七郎

東北大学農学部動物生殖科学講座 宮城県仙台市 〒981

要旨：ラットの排卵卵子から早期胚盤胞までそれぞれ5個ずつの着床前胚をキャピラリーチューブに吸引し、ドライアイスと温水(50°C)に交互に漬けてチューブ内の胚を破碎した。それらの胚はファースト・システム(ファルマシア社製)を用いたSDS電気泳動-銀染色法により蛋白パターンを出現させ、イメージマスター(ファルマシア社製)で画像処理し解析した。50-52 KDと15-16 KDのバンドが桑実期までの胚では認識されたが、これらのバンドは早期胚盤胞では顕著に減少した。ラットの血清、子宮液、顆粒層細胞の蛋白パターンと比較した時、これらのバンドは胚に特異的であった。さらに、ラット体液と顆粒層細胞の主要な構成であるアルブミンに位置するバンドはラット胚では顕著に少なかった。6~11個のラット卵子の透明体を胚と同条件で処理した時にはバンドは現れなかった。従ってこれらの胚に特徴的なバンドは胚の実質に存在するものと考えられた。

キーワード：タンパクパターン、ラット胚、初期発生、ファースト・システム、銀染色。

近年、種々の動物種で、卵子の成長、成熟及び初期発生時における、卵母細胞や受精卵子の生化学的組成の変化、特にそれらの過程での、卵子細胞のタンパク質合成能の変化が中心に解析されている[1-3]。

卵子の成熟段階では、MPF(成熟促進因子)[4]やCMOS(第2成熟分裂中期抑制因子)と呼ばれているものの本質や役割が重要であり、哺乳類(マウス[5]、ハムスター[6]、ヤギ[7-8]、ウシ[9-13]、ブタ[14, 15]、ヒツジ[16])においても幅広く研究されている。

受精卵の発生段階においては、研究対象となる動物の範囲が広く、また研究課題も多岐に亘っているために、報告の大部分は、発生のある時期に限定し、詳しく研究

されている。げっ歯類においてはラットでは、“CELL BLOCK”とその解除について、発生阻害効果と卵子のタンパク質との変化の関係を調べるために、様々な組成の培養液で培養した2細胞期胚について解析した報告がある[17]。さらにマウス胚では、着床前コンパクションに関連して4細胞期胚から8細胞期胚のタンパク質の変化について解析されている[18-20]。また胚盤胞に存在する内細胞塊や栄養外胚葉の胚盤胞腔中へのタンパク質の分泌に関するもの等が挙げられる[21-24]。

しかし、これらの多くは、体外でのタンパク質合成に関し、放射性物質のタンパク質分画の一定時間内での取り込みをみたものであり、その時点でのそれぞれの合成能を表すものと考えられる。従って、それらは生体内での特定の時期における構成タンパク質の実体を示したものではない。さらにこれらの方法では³⁵Sメチオニン等の放射性物質を用いているため、インキュベーション、オートラジオグラフィー等の処理等が複雑であり、時間を要する。そのため目的とした時点でのタンパク質組成の動きを探る上でこの方法は適切ではない。

近年ファルマシア社から開発されたファーストシステムという電気泳動装置は、泳動、染色に要する複雑な処理を容易にプログラムすることができ、自動的にしかも短時間で行うことができる。特にタンパク質を超感度で検出できる。さらに従来手作業では高度な技術を要する銀染色法が自動化され、簡易化されている。この方法を哺乳動物の卵子に適用した報告はなく、具体的にどの程度可能性があるのか明かではない。

そこで本実験は、この方法により当研究室で累代繁殖しているWistarラットを用いて生体から採取した直後の卵子の構造、構成タンパク質を解析することを目的とした。すなわちラットの排卵卵子、1細胞期胚、2細胞期胚、4細胞期胚、8細胞期胚、桑実胚、胚盤胞のそれぞれの各発生時での構成タンパク質について解析した。そこで得られた結果をラットの体液(血清、子宮液)、血清成分(アルブミン、 γ グロブリン、トランスフェリン)、顆粒

(受付 1994年10月7日／受理 1994年12月28日)

別刷請求先：〒981 仙台市青葉区堤通雨宮町1-1
東北大学農学部動物生殖科学講座

層細胞のタンパク質のパターンと比較した。

材料および方法

生体試料の採取方法：研究室で累代繁殖している、ウイスター系成熟雌ラットで2周期以上正しく4日の性周期を示す個体を使用した。発情前期の日の午後に雄ラットと同居させ、交尾させた。交尾の有無は、翌朝に腔栓、もしくはスメア中の精子の存在によって確認し、その日をDAY 1とした。

採卵：排卵直後の未受精卵子及び初期発生卵子をそれらの発生段階にしたがって適切な時期に採卵した。すなわち排卵卵子は、DAY 1 の 6:00~8:00, 1 細胞期胚は、DAY 1 の 17:00~20:00, 2 細胞期胚は、DAY 2 の 2:00 から Day 3 の 12:00, 4 細胞期胚は、DAY 3 の 10:00~18:00, 8 細胞期胚は、DAY 4 の 8:00~14:00, 桑実胚は、DAY 4 の 12:00~19:00, 胚盤胞は、DAY 5 の 9:00~14:00 に断頭により屠殺し採卵した。DAY 2 までは卵管を、DAY 3 以後は卵管と子宮を摘出した。摘出した卵管、子宮の外側を滅菌生食水で洗い、卵管の漏斗部に還流用毛管ピペットを挿入し、還流して採卵した。子宮の還流は、子宮と卵管を切り放さずにともに還流した。還流液には 0.85% 生理食塩水 (10 mg/ μl) ストレプトマイシン、250MG ポリビニルピロリドン (シグマ社製) を用いた。

血清、子宮液、顆粒層細胞の採取：ラット血清はエーテル麻酔下で心臓採血後遠心により上清を得て、また子宮液は採血後子宮角当たり 0.4 ml の生理食塩水で還流した液を遠心して得た上清を用いた。また、体細胞の例として顆粒層細胞を電気泳動に供試したが、その処理法は、0.2% ヒアルロニターゼ処理で卵子と分離させた顆粒層細胞を生理食塩水に懸濁と遠心を数度繰り返して洗浄したもの用いた。

透明帯の採取：上述の方法で採取した2細胞期胚を数回生食で洗浄後、再留水にいれ、中の細胞質が破壊されたことを確認後、予め作製して置いた卵子の大きさよりも先端を細くしたピペットで強制的に卵子を吸い込むことにより、卵実質を除去した透明帯を実験に供した。

泳動に必要な卵子数：電気泳動に際し、卵子を5個ずつ1セットとして処理し、泳動に供した。同じ細胞期である2細胞期胚でも時間によってタンパク質合成が変化することや、同じ時間帯でも2細胞期胚から4細胞期胚のように2つ以上の細胞期が共存するなどがあることから、可能な限り少數の卵で泳動を行った。

予備実験として、ラット卵子1個では全くバンドが検知できなかったが、3個にすると同定できるバンドが少し増加するが、なお不鮮明であった。卵子数が5個以上

になると明らかにバンド数が増大した。さらに10個の卵子で泳動すると、濃さに違いはあったが、識別できるバンド数は5個の時とほとんど差がなかった。ラットでは1頭の排卵数が10~12個程度であるが、8細胞期胚以上桑実胚までは、5個以上定期的に採取するのが困難なことを考慮して、卵子数は1チューブ当たり5個が適切であると判断し、各発生時期の卵子のタンパク質の解析においては、卵子数を5個に統一して泳動を行った。また溶媒の量をほぼ一定にするため、キャピラリーチューブをエッペンドルフチューブと比較した結果、エッペンドルフチューブでは溶媒の量を一定にすることが出来なかつたため、キャピラリーチューブを用い、その中にメディウムと一緒に卵を吸い込む方法で卵子の処理と調整を行った。

排卵直後の未受精卵子は、卵丘細胞を0.2% ヒアルロニターゼ処理で除去した。その後卵子は、前記生理食塩水で数回洗浄し、5個ずつキャピラリーチューブ (1~5 μl用) 内に約1 μlの生食と共に吸いし、-60°Cで凍結し、使用まで保存した。顆粒層細胞も同様に処理した。

卵子の破碎には、ドライアイスと温水との温度差による凍結融解を行う凍結融解法を用いた。すなわち、キャピラリーチューブを数本ずつビニール袋にいれ、ポリシーラーでチューブに沿って封をした。ドライアイスと約50°Cの温水との温度差による凍結融解を5~6回繰り返し、チューブ内の卵子を破碎した。顆粒層細胞も同様に処理した。

破碎した卵子内のタンパク質の融解性を均一にするために、キャピラリーチューブ内に SDS (SODIUM DODECYL SULFATE) と2-メルカプトエタノールをそれぞれ最終的に1%ずつになるように混合した。すなわち、あらかじめ、作製して置いた3% SDS, 3% 2-メルカプトエタノールの溶液を、破碎卵を含む液に対して、1/2 になるように卵を含む溶液と離して、チューブ内に吸い込み、軽く遠心 (5000RPM, 1 SEC) して混ぜ合わせた。その後反応を進ませるために、一昼夜室温に放置した。

ファーストシステム：電気泳動と染色には、ファーストシステム (ファルマシア) をそのまま手順に従って用いた [25]。ゲルは、GRADIENT 10-15 (M,W,10-25 KD), もしくは GRADIENT 8-25 (M, W, 6-30 KD), サンプルアプリケーターは 8/1 を用いた。染色は銀染色を行った。SDS電気泳動と染色プログラムは、マニュアルを一部改変して行った。なおマーカーとしてファルマシア社製の HIGH MOLECULAR (H.M.) (ミオシン: 212KD, α₂ マクログロブリン: 170KD, β-ガラクトシダーゼ: 116KD, トランスフェリン: 76KD, グルタミク・デヒドロゲナーゼ: 53KD) を用いた。また、ラット血清の既知蛋白のマーカーとしては、アルブミン, γ-グ

ロブリンとトランスフェリン（シグマ社製、それぞれ結晶）を用いた。

泳動パターンの分析：泳動パターンの分析にはイメージスター（ファルマシア社製）を用いた [26]。H.M.の濃度を変えて泳動し、マーカー中のトランスフェリンの質量から、検量直線を描き、未知の成分のタンパク質質量を求めた。この機種の画像解析により、質量 $0.15\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のバンドまで検知できることが分かった。検量直線より求められたラット卵子の構成タンパク質の総タンパク質量は、1細胞期胚から胚盤胞までおおよそ $20\sim40\text{ }\mu\text{g}$ の範囲にある（1細胞期胚は $36.6\pm4.6\text{ }\mu\text{g}$ 、2細胞期胚は $32.5\pm4.3\text{ }\mu\text{g}$ 、8細胞期胚は $32.8\pm5.2\text{ }\mu\text{g}$ 、桑実胚は $29.0\pm4.1\text{ }\mu\text{g}$ 、初期胚盤胞は $27.7\pm4.5\text{ }\mu\text{g}$ ）。即ち、総タンパク質量の500分の1程度までは検出できると推測された。グループ中のバンドのピークの濃度の度数分布をピークODとして、レーン中の合計濃度に対する、それぞれのバーの濃度の割合の分布を比較パーセント（RELATIVE PERCENT）として示した。

結 果

発生の各段階におけるラット卵子内タンパク質分画の変動

ラット卵子の電気泳動では、発生の各段階において18から20数本のバンドが検出された（Fig. 1）。その中で、特に注目すべきタンパク質分画をTable 1に示した。これら5つないしは6つのバンドは明らかに他のバンドよりも濃く染色され、そして量的に多かった。これらの中でも $50\sim52\text{KD}$ と $15\sim16\text{KD}$ にあらわれたタンパク質分画は、際だって量が多くかった。これらは、初期発生のどの段階でもほぼ10%近くの割合を占めた。しかもこのタンパク質は、1細胞期胚から4細胞期胚までを通して同じ分子量を持つ分画として存在した。この分画は8細胞期胚、桑実胚へと発生が進むに従い、分子量が少しづつ増加した分画として認められた。しかし胚盤胞期に達すると、この分画の周辺には大量に存在したタンパク質が著しく減少した。さらに排卵卵子から桑実胚でみられたタンパク質分画と関連していると推測されるタンパク質も急激に減少した。

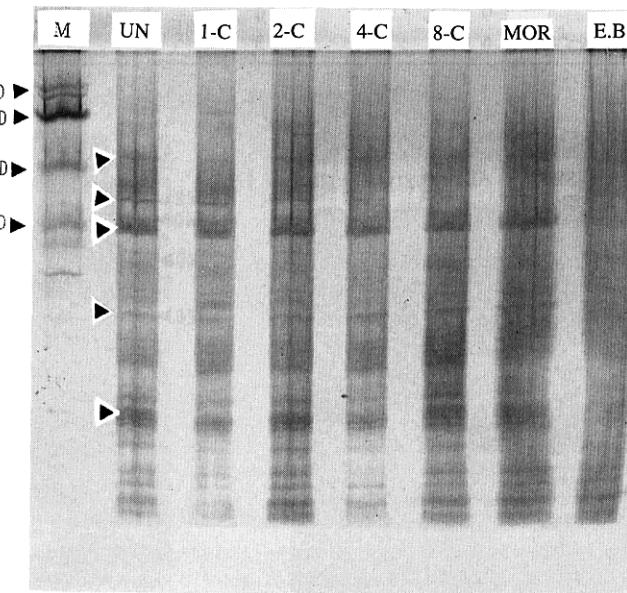


Fig. 1. Analysis of components of proteins with Phast system in rat preimplantation embryo during early development.
Marker (M)170KD, 116KD, 76KD and 53KD correspond with α_2 -macroglobulin, β -galactosidase, transferrin and glutamic dehydrogenase, (High molecular marker: Pharmacia), respectively. UN, 1-C, 2-C, 4-C, 8-C, MOR and E. B mean the pattern of unfertilized ova, 1-cells, 2-cells, 4-cells, 8-cells, morulas and early blastocysts, respectively. Arrows show main bands of preimplantation embryos in SDS-electrophoresis with silver staining.

また20~25KD分画に現れたタンパク質は排卵卵子の時には一つのタンパク質としてしか認められなかつたが、1細胞期胚以後では2つのタンパク質分画が認められた。その他65~71KD分画のタンパク質は、1細胞期胚から4細胞期胚にかけて減少する傾向が認められた。

ラット卵子とラット血清、顆粒層細胞、子宮液との泳動パターンの比較

マーカー、4細胞期胚、子宮液、顆粒層細胞、血清アルブミン、 γ -グロブリン、トランスフェリンの泳動パターンを示した(Fig. 2)。卵子は血清、顆粒層細胞、子

宮液と明らかに異なる泳動パターンを示した。そのなかで特徴的なのは顆粒層細胞、子宮液では血清中の主成分であるアルブミンの相対的割合が大きく、卵子ではアルブミンの相対的割合が非常に小さかった。また、卵子では50KD、15KD付近の2つのバンドの相対的な割合が顆粒層細胞、子宮液と比べて際立って大きかった。

透明帯のタンパク質パターン

キャピラリー中に卵子とほぼ同じ量の生理食塩水中にキャピラリー当たり透明帯を6個~11個を吸入し電気泳動に供したが、バンドは検出できなかった。

Table 1. Comparison of several ratio (%) of proteins in rat embryos at different cell stage

Cell stage of development	Relative ratio (%) of proteins with molecular weight of				
	80-78	72-65	52-50	27-22	16-15 (KD)
Unfertilized	4	7	11	9	14
1-cells	3	9	12	17	11
2-cells	3	4	9	10	9
4-cells	8	2	11	11	11
8-cells	4	2	11	11	6
Morulas	9	2	10	8	12
Early blastocysts	6	2	3	8	2

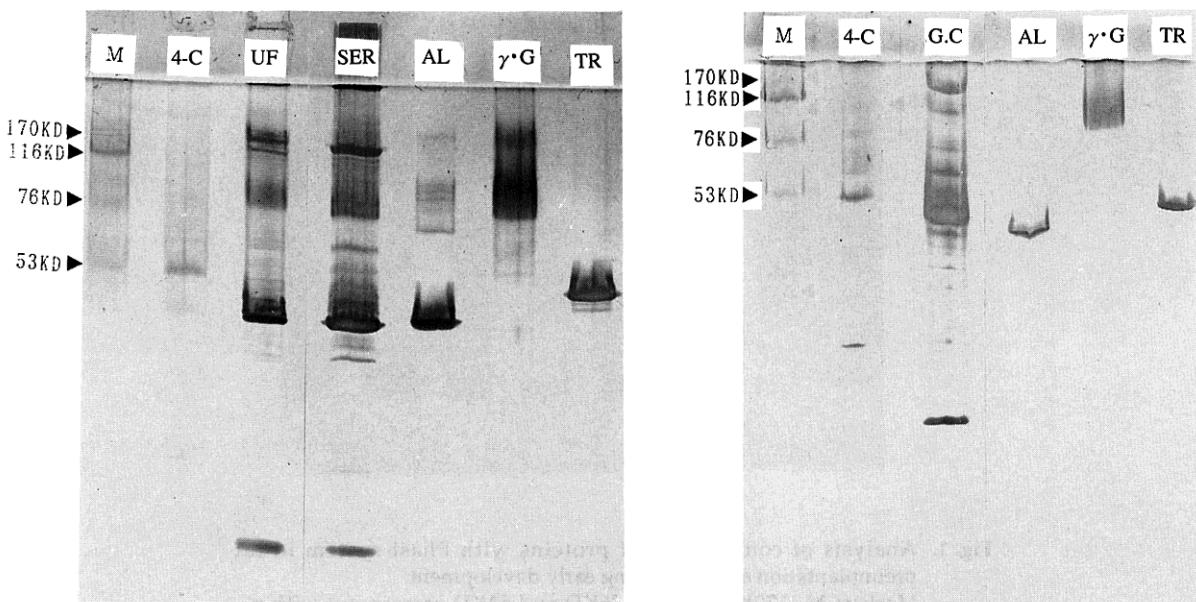


Fig. 2. Analysis of components of proteins with Phast system in 4-cell embryo, serum, uterine fluid and granulosa cells in rat. Marker(M) 170KD, 116KD, 76KD and 53KD correspond with α_2 -macroglobulin, β -galactosidase, transferrin and glutamic dehydrogenase, (High molecular marker : Pharmacia), respectively. 4-C, UF, G.C., SER, AL, γ -G and TR mean the pattern of 4-cells, uterine fluid, granulosa cells, serum, alubumin, γ -globulin and transferrin in rat origin, respectively.

考 察

可能であれば最少限度の卵子、つまり1個の卵子のタンパク質の泳動を行い、分析することを当初の目標にしたが、本実験では検知可能な鮮明なバンドが得られるラット卵子の最少単位として5個の卵子の泳動を確立できた。従来、SDS-PAGEによる哺乳動物卵子の解析には数十個の卵子数を要したことと比較すると、キャビラリーに卵子を注入したファーストシステムへの適応により非常に少ない卵子のタンパクパターンの解析が可能となった。なお、予備実験としてウシ卵子の解析を同手法により行っているが、1個で可能であることを観察している。予備実験でクマシー染色をした場合、銀染色による5個と同じ程度の識別ができるバンドを得るには、60個以上の卵を必要とした。それ故以後の分析には銀染色法に統一した。また鮮明に染色されるように増感液を6分から15分へ、硝酸銀を13分から20分へ、2回目の現像液を4分から8分へ処理時間を規定のプログラムより長くすることにより染色が改善された。

この卵子の泳動のための前処理の条件については、厳密な意味では、卵子の融解液量、均一化液、マウント液量等は常に一定量(1μl)とすることは不可能であったが、なお改良の余地があるかも知れない。

各発生段階の卵子を5個ずつ泳動した結果、排卵卵子から桑実胚まで、全体のバンドに対する50KD付近のバンドは10%存在し、卵子1個当り、マーカーのトランスフェリンに換算して、0.2~0.4ngのタンパク質であり、また15KD付近のバンドは約10%存在し、卵子1個当たり0.1~0.5ngのタンパク質が共通して存在することが分かった。これら2つのバンドは、胚盤胞では急激に減少した。

これらのことから、ラット卵子では桑実胚から胚盤胞にかけて、これら2つのバンドの急激な減少を反映している。発生過程の卵子の構造、構成タンパク質の急激な変化が示唆された。

ラット卵子の構造・構成タンパク質のバンドについては今まで殆ど同定されていない。ラット血清起源のアルブミンと同等のバンドは子宮液、顆粒層細胞では多量に存在し、各試料タンパクの主成分であった。一方、卵子ではアルブミン様バンドが全体の割合では非常に少なく、これもラット卵子のタンパク・パターンの一つの特徴であることが判った。

透明帯はZP1、ZP2、ZP3と称される3つの糖タンパク質から成っていることが明らかになっており、これらの糖タンパク質のラット卵子の成熟時における変化が調べられている[27]。しかしラット胚の初期発生での報告はない。本研究でラットにおける透明帯の糖タンパク

質組成を知るために前記のような処理後、透明帯についての分析を試みたところ、透明帯を6個と11個泳動した場合1本のバンドも検出できなかった。5個の卵子の2倍以上の透明帯を泳動しても全くバンドが検出されなかつたこの結果から、前述の泳動された卵子中には、透明帯由来のタンパク質は含まれていても同定できるほどの量がないことが示唆された。

このことからラットの透明帯を構成するタンパク質の検討には、さらに透明帯の融解性も考えられるので、SDS以外での均一化についても検討する必要があると考えられる。

謝 辞

この研究を進めるにあたりイメージ・マスターの使用について懇切丁寧に御教示頂いたファルマシア・ジャパン社の佐野康子氏に深謝する。

研究の一部は文部省科学研究費(一般A No.02404018)によって行った。

文 献

- Schults, P. M. and Wasserman, P. M. (1977): Specific changes in the pattern of protein synthesis during meiotic maturation of mammalian oocytes *in vitro*. Proc. Soc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 538-541.
- Golbus, M. and Stein M. P. (1976): Qualitative patterns of protein synthesis in the mouse oocytes. J. Exp. Zool., 198, 337-342.
- Wasserman, P. M., Schults, R. M., and Letourneau, G. E. (1979): Protein synthesis during meiotic maturation of mouse oocytes *in vitro*. Synthesis and phosphorylation of protein localized in the germinal vesicle. Dev. Biol., 69, 94-107.
- Hashimoto, N. and Kishimoto, T. (1988): Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation promoting-factor during mouse oocytes maturation. Dev. Biol., 69, 94-107.
- Tsutsumi, O., Satoh, K., Taketani, Y. and Kato, T. (1992): Determination of enzyme activities of energy metabolism in the maturing oocytes. Molec. Reprod. Dev., 33, 333-337.
- Plancha, C. A. and Albertini, D. F. (1992): Protein synthesis requirements during resumption of meiosis in the hamster oocytes: early nuclear and microtubule configurations. Molec. Reprod. Dev., 33, 324-332.
- Smedt, V. De., Crozet, N., Ahmed-Ali, M., Martino, A. and Cognie, Y. (1992): *In vitro* maturation and fertilization of goat oocytes. Theriogenology, 37, 1049-1060.
- Gall, F. Le., Gall, L. and Smedt, V. De. (1992): Changes in protein synthesis pattern during *in vitro* maturation of goat oocytes. Molec. Reprod. Dev., 32,

- 1–8.
- 9) Kruip, T. A. M., Cran, D. G., van Beneden, T. H. and Dielman, S. J. (1983): Structural changes in bovine oocytes during final maturation *in vivo*. Gamete Research, 8, 29–47.
 - 10) Hunter, A. G. and Moor, R. M. (1983): Stage-dependent effects of inhibiting ribonucleic acids and protein synthesis on meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*. J. Dairy Sci., 70, 1646–1651.
 - 11) Sirard, M. A., Florman, H. M., Leibfried-Rutledge, M. L., Barnes, F. C., Sims, M. L. and First, N. L. (1987): Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. Biol. Reprod., 40, 1257–1263.
 - 12) Kastrop, P. M. M., Bevers, M. M., Destree, O. H. J. and Kruip, Th. A. M. (1990): Changes in protein synthesis and phosphorylation patterns during bovine oocyte maturation *in vitro*. J. Reprod. Fert., 90, 305–310.
 - 13) Kastrop, P. M. M., Bevers, M. M., Destree, O. H. J. and Kruip, Th. A. M. (1990): Analysis of protein synthesis in morphologically classified bovine follicular oocytes before and after maturation *in vitro*. Molec. Reprod. Dev., 26, 222–226.
 - 14) McGaugher, R. W. and van Blerkom, J. (1977): Patterns of polypeptide synthesis of porcine oocytes during maturation *in vitro*. Dev. Biol., 56, 241–254.
 - 15) Ding, J., Clarke, N., Nagai, T. and Moor, R. M. (1992): Protein and nuclear changes in pig eggs at fertilization. Molec. Reprod. Dev., 31, 287–296.
 - 16) Moor, R. M. and Gandorfi, F. (1987): Molecular and cellular changes associated with maturation and early development of sheep eggs. J. Reprod. Fert., suppl., 34, 55–69.
 - 17) Poueymirou, W. T., Conover, J. C. and Schults, R. M. (1989): Regulation of mouse preimplantation development: differential effects of CZB medium and Whitten's medium on rates and patterns of protein synthesis in 2-cell embryos. Biol. Reprod., 41, 317–322.
 - 18) Biggers, J. D., Lavittes, J. A. and Lechene, C. P. (1993): The protective action of betaine on the deleterious effects of NaCl on preimplantation mouse embryo. Molec. Reprod. Dev., 34, 380–390.
 - 19) Anbari, K. and Schults, R. M. (1993): Effect of sodium and betaine in culture media on development and relative rates of protein synthesis in preimplantation mouse embryos *in vitro*. Molec. Reprod. Dev., 35, 24–28.
 - 20) Paynton, S. V., Rampel, R. and Bachvarova, R. (1988): Changes in state of adenylation and time course of degradation of maternal mRNAs during oocyte maturation and early embryonic development in the mouse. Dev. Biol., 89, 397–408.
 - 21) Cascio, S. M. and Wasserman, P. M. (1982): Program of early development in the mammal : post-transcriptional control of a class of proteins synthesized by mouse oocytes and embryos. Dev. Biol., 89, 397–408.
 - 22) van Blerkom, J. (1981): Structural relationship and posttranslational modification of stage-specific proteins synthesized during early preimplantation development in the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 78, 7629–7633.
 - 23) Lopo, A. C. and Calargo, P. G. (1982): Stage-specific changes in protein phosphorylation during preimplantation development in the mouse. Gamete Research, 5, 283–290.
 - 24) Kidder, G. M. and McLachlin, J. R. (1983): Timing of transcription and protein synthesis underlying morphogenes in preimplantation mouse embryos. Dev. Biol., 112, 265–275.
 - 25) Phoxy, Manual (1990): フアルマシアLKBバイオテクノロジー.
 - 26) Image Master Software (1993): User Manual, Pharmacia LKB Biotechnology.
 - 27) Rufos, O. and Shalgi, R. (1990): Maturation associated changes in the rat zona pellucida. Molec. Reprod. Dev., 26, 324–330.

Protein Patterns of Rat Embryos during Early Development Using Phast System

Yoshiaki Aoshima, Hiromichi Matsumoto, Motoaki Umezawa and Shichiro Sugawara

Laboratory of Animal Reproduction, Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai 981, Japan

Rat preimplantation embryos were subjected to analysis of programmed SDS-electrophoresis with silver staining using Phast system (Pharmacia Co.Ltd.). Embryos in early development with ovulated ova, one cells, 2 cells, 4 cells, 8 cells, morulas, and early blastocysts were aspirated into 1 μ l capillary tube and kept at -60 °C until used. The embryos of each developmental stage were collapsed by repeating a temperature difference with dry ice and warm water (50 °C) several times and SDS-solution (1.5%) including 2-mercaptoethanol were aspirated into the tube, kept overnight, and applied to the electrophoresis. By examining a minimum number of embryos per a lane (a capillary) for Phast gel to apply silver staining, five embryos were known to be the minimum number for the visual recognition of protein patterns and the number was standerized for each stage later on. The pattern of protein bands of preimplantation embryos development were scanned and calculated for molecular

weight, relative percentage and protein content with Image Master (Pharmacia Co.Ltd). Typical bands of 50–52KD and 15–16kD were recognized in ovulated ova, 1-cells, 2-cells, 4-cells, 8-cells, and morulas but the relative percent of the 2 bands was remarkably decreased in early blastocysts. When the protein patterns of serum, uterine fluid and granulosa cells of rat origin were compared with those of embryos, the band 48–51KD and 15–16KD was found to be specific for embryos. In addition, albumin, which is one of the main constituents of protein in serum, uterine fluid, and granulosa cells, was found to be remarkably less in the rat embryos. When zona pellucida originated from 6–11 ova were subjected to Phast system, no band was visible. Therefore, the pattern of protein band was considered to exist in substantial region of embryos.

Key words: Protein patterns, Rat embryos, Early development, Phast system, Silver staining.