

생쥐 초기배아의 단백질 합성양상에 미치는 돌연변이 유발원의 영향

이 양 립

(이화여자대학교 생물학과)

Effects of Mutagens on the Synthetic Patterns of Proteins
During the Early Developmental Stages in Mice

Yang Rim Lee

(Ewha Womans University)

(Received June 6, 1980)

SUMMARY

The effects of mutagens, MMS and captan, on the patterns of proteins synthesized during the early developmental stages in mice were analyzed using two-dimensional electrophoresis. Three classes of proteins were observed in terms of synthetic pattern during the preimplantation stages. The first class is synthesized from the m-RNA, which was made and preserved throughout oogenesis and activated at the fertilization. The synthesis of these proteins did not seem to be influenced by MMS. The second class, which may be stage-specific proteins synthesized by newly transcribed m-RNA, was selectively inhibited by MMS. The third class, the synthesis of which is also suppressed by MMS, is the proteins synthesized by the m-RNA transcribed in augmented fashion. While MMS inhibits protein synthesis dependent on the new transcription, this mutagen enhances a synthesis of a few proteins which were not observed in the untreated embryos. Captan did not affect protein synthesis at morula stage.

서 론

생쥐의 배아가 수정후 포배기까지 발생하는데 여러가지 단백질이 필요하다. 이러한 단백질로서는 난자형성시기에 합성누적된 단백질과 수정후 새롭게 합성되는 단백질이 있다 (Cullen *et al.*, 1980; Van Blerkom, 1980; Van Blerkom and Brockway, 1975).

새로 합성되는 단백질 중에는 난자형성기간 중에 합성보존된 masked messenger RNA가

본 연구는 1978년도 한국과학재단으로부터 지원받은 연구비로 수행된 것이다.

수정과 함께 활성화 되면서 합성하는 단백질 종류 (Bachvarova and Leon, 1977; Burkholder *et al.*, 1971; McLaren, 1976; Mintz, 1964; Tasca and Hillman, 1970)와 수정후 새롭게 전사되어 얻어진 m-RNA에 의하여 합성된 단백질로 대별된다 (Braude, 1979; Handyside and Johnson, 1978; Levinson *et al.*, 1978; Tucker and Schultz, 1978; Van Blerkom and Brockway, 1975; Manes, 1974).

이러한 동적인 단백질합성 양상을 가지고 있는 생쥐의 발생계를 이용하여 강력한 환경성 돌연변이원의 일종인 Methylmethane sulfonate (MMS)와 captan의 유전자 발현 (gene expression)에 미치는 영향을 연구하였다.

이러한 연구를 통하여 돌연변이원의 작용양상을 규명할 수 있을 것으로 기대하였다. 즉 돌연변이원의 효과가 단지 유전자에 대한 상해로서만 나타날 것인지 혹은 간접적인 방법에 의해서 형질표현을 간접할 것인지 확실해질 것으로 생각되었다. 일단 난자형성기 간중에 합성보존된 m-RNA에 의한 단백질합성은 MMS가 유전자 상해에만 관여된다면 영향을 받지 않아야만 할 것이다. 반면에 수정후 합성되는 m-RNA에 의한 단백질합성은 MMS에 의하여 선택적으로 저해될 것으로 생각된다.

재료 및 방법

1. 생쥐배아의 채취 및 배양

본 실험에서는 서울대학교 동물사육장에서 공급받은 A-strain 생쥐를 사용하였다. 생후 2개월된 암컷생쥐에 Pregnant mares serum (PMS, Sigma)와 Human chorionic gonadotropin (HCG, Sigma)를 각각 5 I.U.씩 48시간 간격으로 복강 주사함으로써 과다배란을 유도한 후 수컷과 합사시켰다. HCG 주사 2일, 3일, 4일 후에 각각 2세포기 배아, 상실배, 포배를 수란관, 자궁상부, 자궁에서 채취하였다. 자세한 채취방법은 Cho and Kwon (1979)에 의해 기술된 바와 같다.

채취된 배아를 미세관 배양법 (Cho, 1974)에 따라 37°C에서 5% CO₂를 공급받고 충분한 습도가 유지되는 정온기에서 배양하였다. 배아를 세척하거나 운반할 때는 표준배양액 (Standard egg culture medium (SECM), Biggers *et al.*, 1971)을 사용하였으며, 배양 시에는 0.4% bovine serum albumin (BSA, Sigma)를 첨가한 표준배양액을 Millipore filter로 여과하여 사용하였다.

2. 환경성돌연변이원 처리 및 ³H-leucine의 표지방법

암컷 20마리 정도에서 2~3시간에 걸쳐 채취한 70대지 130개의 2세포기, 4세포기 혹은 상실기의 배아를 Krebs's modified Ringer's medium에 보관하였다가 돌연변이원을 함유한 표준배양액에 옮겨 일정기간동안 배양함으로써 돌연변이원으로 처리하였다.

MMS 0.1 mM의 농도로 2시간동안 처리한후 MMS를 제거한 표준배양액에서 100 μCi/ml의 ³H-leucine (Amersham England, Sp. Act. = 46 Ci/mM)로 22시간동안 표지하였다.

N-(trichloromethylthio)-3a, 4,7, 7a-tetrahydrophthalimide (captan)으로 전처리하는 경우에는 4시간동안 전처리한 후 captan을 함유한 표준배양액에서 100 μCi/ml의 ³H-leucine으로 22시간동안 표지하였다. 일단 표지된 배아를 배양액으로 3회 세척한 후 lysis buffer (O'Farrell, 1975) 25 μl에 넣어 microhomogenizer로 분쇄한 후 -20°C에 보관하였다가

전기영동하였다.

MMS와 captan의 적정농도를 각각 0.1 mM과 0.125 mM로 결정하였다 (Kwon, 1978, personal communication). 2세포기, 4세포기 및 상실기의 배아를 여러가지 농도의 MMS나 captan으로 처리한 후 나머지 발생기간 동안 유발되는 이상발생율을 조사함으로써 적정농도를 정하였다. MMS의 경우에는 배아의 발생이 다소 억제되는 빈도가 처리하지 않았을 경우에 비해 다소 높지만 거의 대부분의 배아가 포배기까지 발생하였다. Captan의 경우는 0.25 mM과 0.125 mM을 가지고 시도하였다. 0.25 mM에서는 그 영향이 지나치게 과격하여 세포분해(cytolysis)를 일으켰다. 0.125 mM에서는 비록 뚜렷한 영향을 주지않은 것으로 보였으나 그 대신 오랫동안 처리함으로써 captan의 효과유발이 가능할 것으로 생각되어 0.125 mM을 적정농도로 간주하였다.

배아의 발생은 다소 억제하나 포배기까지 생존하는데에는 큰 영향을 주지않은 농도로서 예비실험에서 밝혀진 바에따라 적정농도로 간주하였다. N-(trichloromethylthio)-3a, 4, 7, 7a-tetrahydrophthalimide (captan)의 경우도 적정농도를 0.125 mM로 정하였다. Captan으로 처리하는 경우는 4시간동안 전처리한 후 captan을 함유한 표준배양액에서 100 μ Ci/ml의 3 H-leucine으로 22시간동안 표지하였다.

3. 이차원 전기영동법

돌연변이원으로 처리 혹은 처리되지 않은 배아를 앞에서 설명한 바와 같이 3 H-leucine으로 표지한 후 표지된 단백질을 O'Farrel (1975)의 이차원 전기영동법과 fluorography (Bonner and Lasky, 1974; Lasky and Mills, 1975)으로 분석하였다.

일차원인 Isoelectric focussing은 140 mm \times 2.4 mm I.D.의 유리관에서 수행하였다. Lysis buffer (O'Farrel, 1975)에 녹아있는 단백질을 일차원 겔에 옮기기 전에 200 Volt에서 15분, 300 Volt에서 30분, 400 Volt에서 30분간 prerunning 하였다. 일단 시료를 겔로 옮긴후 550 Volt에서 15시간, 800 Volt에서 한시간, 총 9050 Volt시간으로서 Isoelectric focussing을 수행하였다.

이차원 전기영동을 수행하기 위해서는 O'Farrel (1975)에 의해 설명된 두개의 유리판 (18 \times 14 cm) 사이에 높이 9cm 두께 0.7 mm의 9-15% exponential polyacrylamide gel gradient를 만든후, 일차원 겔을 1% agarose-in-equilibration buffer (10% glycerol, 5% β -mercaptoethanol, 2.3% sodium laurylsulfate (SDS), 50 mM Tris, pH 6.8)로 이차원 겔에 부착시켰다. 전기영동 상단부에 2%의 SDS buffer (0.3% Tris, 1.44% glycine, 2% SDS)를 넣고 하단부에 표준 SDS buffer (0.3% Tris, 1.44% glycine, 0.04% SDS)를 넣은 다음 겔당 20 mA의 전류로 20분동안 prerunning 하였다. 계속해서 상단부의 2% SDS buffer를 제거시키고 표준 SDS buffer로 채운다음 겔당 12.5 mA로 6시간동안 10 $^{\circ}$ ~12 $^{\circ}$ C에서 전기영동하였다.

Fluorography를 하기 위해서는 겔을 dimethyl sulfoxide (DMSO)에서 탈수시킨다음 20% PPO-in-DMSO (w/w)로 3시간동안 처리하였다. 겔을 증류수로 씻어낸 다음 Whatman 여과지 (No.3)에 얹어서 건조시켜 Lasky and Mills (1975)의 법에따라 표준화한 검광으로 preflash한 XR/1 X-ray film (Kodak, royal RP XO mat, 5 \times 7 in)에 밀착시켜 -70 $^{\circ}$ C에서 4~10일간 노출시켰다.

결 과

1. 발생 단계에 따른 단백질 합성 양상

착상이전의 초기발생 단계에 따른 단백질 합성양상은 Fig. 1A, 2A, 3A에서 보여주고 있는 fluorogram과 같다.

Fluorogram에 나타난 단백질의 종류를 위치에 따라 분석하기 위하여 거의 모든 fluorogram에서 고정적으로 나타나는 단백질의 위치를 1, 2, 3, 4, 5, 6으로 표시하였다. 따라서 고정된 단백질의 위치로 부터 상대적인 위치를 측정하여 fluorogram간의 단백질 합성양상을 비교하는데 용이하게 하였다.

Fig. 1A는 2세포기의 발생배를 2시간동안 배양한 후 ^3H -leucine으로 22시간동안 표시하여 분석한 결과로서 2세포기에서 4세포기에 이르는 사이에 합성된 단백질의 양상을 보여주고 있다. 이때 단백질의 총수는 203종이었다. 물론 본 실험에서 검출된 200여종의 단백질이 2세포기에서 합성된 단백질 전부를 대표하는 것이라고는 할 수 없으나, 상당히 많은 종류의 단백질이 발생초기에 합성되고 있음이 분명하였다. 이때 합성되는 단백질은 난자형성기간중 합성 축적되었던 m-RNA와 수정후 2세포기 내지 4세포기 이전에 합성되어 해독가능한 m-RNA에 의하여 합성된 것이라고 생각된다.

Fig. 2A는 4세포기에서 8세포기에 이르는 기간동안에 합성된 단백질의 양상으로 Fig. 1A에 제시한 4세포기 까지의 합성양상과 대부분 유사하나 최소한도 \vee 로 표시한 10개의 단백질은 4세포기에서 8세포기에 새로이 합성된 것들이다. 이러한 단백질은 수정후 새로이 전사되어 나온 m-RNA에 의존한다고 하겠다.

Fig. 3A는 상실기에서 포배기에 이르는 사이에 일어난 단백질합성양상을 보여 주고 있다. 이 기간동안에 특별히 합성된 단백질로서는 Fig. 3A에 \vee 로 표시한 3개의 단백질 뿐이며 그외에는 8세포기의 단백질 합성양상과 매우 흡사하였다.

이상 결과를 종합하면 생쥐의 2세포기에서 포배기까지 이르는 발생과정에서 발생 단계에 따른 특이한 단백질이 합성된다는 것이며, 특히 4세포기에서 8세포기에 이르는 동안에 가장 뚜렷한 변화를 보이고 있다는 것이다.

2. MMS의 단백질 합성에 미치는 영향

앞서 설명한 바와 같은 생쥐의 정상적인 초기발생과정에서의 단백질 합성양상에 미치는 돌연변이 유발원의 효과에 대하여 연구하였다. 돌연변이 유발원으로 알려져 있는 물질은 유전자와 작용하여 그 효과를 단백질합성양상에 반영할 것임으로 우선 돌연변이 유발원으로 처리한 발생배의 단백질 합성양상을 위에 기술한 바와 같은 방법으로 분석하였다.

2세포기의 발생배를 2시간동안 MMS로 처리한 후 분석한 단백질합성양상 (Fig. 1B)에 의하면 같은 시기에 정상적인 발생배에서 합성된 단백질이 합성되지 않은 경우를 볼 수 있었다.

즉 Fig. 1A에 \vee 로 표시된 6종의 단백질은 최소한도 MMS에 의하여 억제된 것들이다. Fluorogram상에 나타난 단백질 spot의 강도가 충분치 못하여 억제된 것처럼 보이거나 완전히 억제된 것이 아니고 미약하나마 합성되고 있음을 보여주고 있는 것이다. 2~4세

포기에 MMS에 의하여 억제된 단백질은 수정 후 전사되어 나온 m-RNA에 의하여 합성될 가능성이 높음을 시사해 주고 있다고 하겠다. 그러나 억제되지 않은 많은 단백질은 난자 형성기간중 합성된 m-RNA에 의한 지속적인 해독이든지 혹은 수정 후 반복되어 합성되는 m-RNA에 의한 해독에 기인하는 것 같다. 일단 합성된 m-RNA의 해독과정에 MMS는 크게 영향을 주지 않는 것으로 판단된다.

4세포기에서 8세포기에 이르는 발생기간중에 가장 많은 새로운 단백질이 합성되고 있음을 보여주었거니와 이러한 단백질의 합성 전부가 MMS에 의하여 억제되고 있다 (Fig. 2A와 B).

Fig. 2A에 \checkmark 로 표시한 단백질 전부가 Fig. 2-B에는 나타나지 않고 있음으로 보아서 새로운 전사에 의하여 합성되려는 단백질은 모두가 억제되는 것으로 보인다. Fig. 2B의 fluorogram은 사실상 Fig. 1B의 것과 거의 동일하다. Fig. 1B에서도 보여준 바와 같이 Fig. 2B에서도 좌측 상단 X라고 표시한 4개의 단백질은 억제되고 있음을 보여주고 있다. 이러한 단백질은 수정 후 계속해서 반복적으로 합성되어야 하는 종류로서 그 단백질들에 대한 m-RNA의 수명이 짧은 것으로 해석된다.

이상 4세포기에서 8세포기에 합성되는 단백질이 세가지 종류의 m-RNA에 의한 합성에 기인하는 것으로 풀이된다. 즉 1) 수정 후 최소한도 2세포기부터 8세포기에 이르는 사이에 MMS에 의하여 억제되지 않은 m-RNA. 2) 짧은 수명을 가진 m-RNA로서 수정 후 계속 전사되어 나오는 종류 3) 발생단계 특유의 단백질을 합성하는 m-RNA로서 새로이 전사된 종류이다.

상실기에서 포배기에 이르는 사이에 합성된 새로운 단백질이 3종인데 비하여 (Fig. 3A), 이 기간중에 억제된 단백질의 수는 뚜렷하게 증가하였다 (Fig. 3B). 상실기에서 포배기에 이르는 기간에 합성되는 단백질 뿐만 아니라 8세포기 까지 계속 합성되면서 MMS의 영향을 받지 않던 다수의 단백질중 Fig. 3B에 0으로 표시한 단백질의 합성이 억제되고 있다는 것이다. 특히 1과 2로 표시한 단백질의 합성이 전면적으로 억제되고 있다. 이 기간 중에도 특유의 단백질이 합성되고 있음을 보여 주고 있는 반면에 8세포기까지 합성되던 단백질의 억제는 새로운 의미를 가지고 있다고 하겠다. 즉 최소한도 수정 후 8세포기까지 활성을 가졌던 m-RNA의 수명이 끝나고, 동일한 단백질을 합성하기 위한 같은 m-RNA를 새로이 전사해야하는 경우로 풀이 해야만 하기 때문이다.

Fig. 3B에는 \checkmark 로 표시한 단백질이 있는데 이들 단백질들은 정상적인 포배에서는 찾아볼 수 없는 것들이었다. 즉 MMS에 의하여 새롭게 유도된 것들로 보인다.

이상과 같은 결과를 종합하면 MMS는 일단 유전자에 작용하여 전사과정에 변화를 주어 단백질 합성에 영향을 주는 것으로 생각된다. 거의 모든 단백질의 합성이 새로 합성된 m-RNA에 의존할 경우에는 MMS에 의하여 억제되고 있음을 보여 주었다. 몇개의 새로운 단백질이 MMS에 의하여 합성되는 것도 역시 MMS에 의한 유전자의 변화에서 부터 오는 것이라고 추측된다.

3. captan의 단백질 합성에 미치는 영향

본 연구에서 사용한 농도의 captan은 생쥐의 상실배에서 일어나는 단백질합성에 거의 영향을 주지 못하고 있는 것으로 나타났다 (Fig. 4A와 B).

Captan의 영향을 연구하기 위하여 준비실험을 통하여 효과농도를 결정함에 있어서 주

로 0.125 mM과 0.25 mM의 처리에 의한 발생배의 생존율을 조사하였다. 0.25 mM의 captan은 발생배에 대단히 과격한 영향을 주어 세포분해 현상을 일으키는 것으로 보아 막구조에 상해를 주는 것으로 해석되었다. 그러나 0.125 mM의 captan은 발생배의 생존에 큰 영향을 주지않을 뿐만아니라, 세포분해와 같은 과격한 영향을 주지 않았다. 따라서 본 실험에서는 0.125 mM의 captan의 효과를 연구하였다. 그러나 MMS를 이용하여 연구한 경우와는 달리 captan을 이용한 연구에서는 captan을 전처리 했을 뿐만 아니라 ^3H -leucine으로 표지하는 기간에도 계속 captan으로 처리하였다. 그러나 captan은 단백질 합성양상에 거의 아무런 영향도 주지 못하였다.

고 찰

생쥐의 초기 발생과정을 위하여 대개 3가지 범주에 속하는 m-RNA에 의한 단백질이 합성되고 있다.

첫째는 난자형성기간중에 합성된 m-RNA에 의한 단백질의 합성이며, 둘째로는 난자형성기간 중에 합성 누적된 m-RNA와는 다른 새로운 m-RNA에 의한 단백질 합성이다. 셋째로는 수정전 혹은 직후에 합성되어 수정 후 계속 이용되다가 파괴되고 비록 같은 종류지만 새로이 합성되는 m-RNA에 의한 단백질 합성이다. 이러한 발생과정에 따른 단백질 합성에 있어서 MMS는 새로 전사된 m-RNA에 기인하는 단백질의 합성은 거의 전면적으로 억제한 것으로 보인다. 이미 2세포기에서 4세포기에 이르는 사이에 합성된 6개의 단백질 합성이 새로 전사되어 나온 m-RNA에 기인하며 새로운 m-RNA의 전사가 MMS에 의하여 억제되었을 것이라는 추측은 다음과 같은 보고에 근거하고 있다. 수정후 일찍 부터 새로운 단백질을 합성한다고 보고 하였는데 (Cullen *et al.*, 1980; Levinson *et al.*, 1978; Schultz *et al.*, 1979) 특히 Cullen (1980)에 의하면 생쥐에서 이미 수정 후 14시간 이내에 새로운 단백질이 합성된다고 하였다. 4세포기에서 8세포기에 이르는 사이에 합성된 단백질과 상실배에서 포배기에 이르는 단백질 중에도 특별히 시기에 따른 (time-specific) 단백질의 합성이 있는 것으로 보이며, 그러한 단백질의 합성이 억제되는 것으로 생각된다.

Tucker and Schultz (1978)은 생쥐의 2세포기와 16세포기 배아에서 합성되는 단백질 합성에 대한 α -amanitin의 영향을 이차원 전기 영동법으로 분석하여 2세포기에서는 합성되지 않으나 16세포기에서는 새로 합성되는 단백질이 있다고 보고하였다. 세번째 범주에 속하는 단백질 즉 같은 종류이지만 새로이 만들어지는 단백질 합성에 대해서도 Tucker and Schultz (1978)의 연구에서 부분적으로 밝혀졌는데, 2세포기에서 부터 16세포기에 α -amanitin에 의하여 그 합성이 억제되는 단백질이 존재한다고 하였다. Bachvarova and Leon (1980)의 보고에 의하면 생쥐의 난자에서 부터 유래한 모계의 m-RNA는 포배기에 이르는 동안 약 70%까지 감소한다고 하였다. 이 보고에 따르면 포배기 이상 수명을 유지하는 모계의 m-RNA가 많지 않으므로 비록 모계의 m-RNA와 같은 종류의 m-RNA 일지라도 포배기에서 다시 전사되어야 할 것임을 강력히 시사하고 있는 것으로 보인다.

MMS가 새로이 전사된 m-RNA에 의한 단백질 합성을 거의 모두 억제하는 반면에

MMS에 의하여 오히려 새롭게 합성된 단백질이 있었다. 이와 유사한 경우가 생쥐배아의 단백질합성에 미치는 α -amanitin의 영향에 대한 연구에서도 보고된 바 있다 (Braude, 1979).

생쥐 발생배에 대한 MMS의 상해작용은 유전자에 상해를 줌으로서 일어나고 있는 것이 거의 확실하다. 정상적인 전사를 억제함으로써 정상적인 해독과정을 저해하는 것 뿐만 아니라 정상적인 발생배에서 볼 수 없는 단백질을 합성할 수 있도록 새로운 부분의 DNA를 전사시키도록 유도하는 과정도 일종의 MMS에 의한 상해라고 하겠다. 그외에 전사 및 해독과 관련된 효소를 억제함으로써 단백질 합성에 상해를 줄 가능성이 있으나 본 연구에서는 그렇게 추리될 만한 실험결과를 거의 찾아 볼 수 없었다.

적 요

생쥐 초기발생배에서 일어나는 단백질 합성양상에 미치는 환경성 돌연변이원인 MMS와 captan의 효과를 2차원 전기영동법과 fluorography를 이용하여 연구하였다. 착상이 전까지 크게 나누어 세 종류의 단백질이 합성되고 있음이 관찰되었다. 즉, 첫번째 종류는 난자형성기간동안에 합성, 축적되었다가 수정과 동시에 활성화된 m-RNA에 의하여 합성되는 단백질 종류이다. 이러한 단백질들은 거의 MMS에 의하여 영향을 받지 않은 것으로 보였다. 둘째번 종류로서는 새로 전사된 m-RNA에 의하여 합성된 시기에 따른 특유의 것들로서 MMS에 의해서 선택적으로 그 합성이 억제되는 단백질들이다. 세번째 종류로서는 수명이 끝난 m-RNA를 반복적으로 전사함으로써 합성되며, MMS에 의하여 억제되는 단백질들이다. 이와같이 MMS는 새로 전사된 m-RNA에 의한 거의 모든 단백질 합성을 억제하는 반면에, MMS로 처리되지 않은 정상적인 발생배에서는 관찰할 수 없는 새로운 단백질의 합성을 촉진하는 경우가 있었다. Captan은 생쥐 상실패의 단백질합성에 영향을 주지 못하였다.

References

- Bachvarova, R. and V. DeLeon, 1977. Stored and polysomal ribosomes of mouse ova. *Develop. Biol.* **58** : 248—254.
- Bachvarova, R. and V. DeLeon, 1980. Polyadenylated RNA of mouse ova and loss of maternal RNA in early development. *Develop. Biol.* **74** : 1—8.
- Biggers, J.D., W.E. Whitten and D.G. Whittingham, 1971. The culture of mouse embryos *in vitro*. In *Methods in mammalian embryology*. Ed. J.C. Daniel, Jr. Freeman Publishing Co. pp. 86—116.
- Bonner, W.M. and R.A. Lasky, 1974. A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* **46** : 83—88.
- Braude, P.R., 1979. Control of protein synthesis during blastocyst formation in the mouse. *Develop. Biol.* **68** : 440—452.
- Burkholder, G.D., D.E. Comings and T.A. Okada, 1971. A storage form of ribosomes in mouse oocytes. *Exptl. Cell Res.* **69** : 361—371.

- Cho, W.K., 1974. A microtubule culture method for mouse oocyte. *J. Reprod. Fert.* **37** : 437—440.
- Cho, W.K. and H.B. Kwon, 1979. Effects of progesterone on the macromolecular syntheses in mouse preimplantation embryos *in vitro*. *Kor. J. Zool.* **22** : 81—93.
- Cullen, B., K. Emigholz and J. Monahan, 1980. The transient appearance of specific proteins in on-cell embryos. *Develop. Biol.* **76** : 215—221.
- Lasky, R.A. and A.D. Mills, 1975. Quantitative film detection of ^3H and ^{14}C in polyacrylamide gels by fluorography. *Eur. J. Biochem.* **56** : 335—341.
- Levinson, J., P. Goodfellow, M. Vadeboncoeur, and H. McDevitt, 1978. Identification of stage specific polypeptides synthesized during murine development. *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.* **75** : 3332—3336.
- McLaren, A., 1976. Genetics of the early mouse embryos. *Ann. Rev. Genet.* **10** : 361—388.
- Mintz, B., 1964. Synthetic processes and early development in the mammalian egg. *J. Exp. Zool.* **157** : 85—100.
- O'Farrell, P.H., 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250** : 4007—4021.
- Schultz, R.M., G.E. Letourneau and P.M. Wasserman, 1979. Program of early development in the mammal: Changes in patterns and absolute rates of tubulin and total protein synthesis during oogenesis and early embryogenesis in the mouse. *Develop. Biol.* **68** : 341—359.
- Tasca, R.J. and N. Hillman, 1970. Effects of Actinomycin D and cycloheximide on RNA and protein synthesis in cleavage stage mouse embryos. *Nature* **225** : 1022—1025.
- Tucker, E.B. and G.A. Shultz, 1978. Two-dimensional electrophoresis analysis of proteins synthesized during the early cleavage period in rabbit embryos. *Exptl. Cell Res.* **114** : 438—443.
- Van Blerkom, J., 1977. Molecular approaches to the study of oocyte maturation and embryonic development. In *Clinical and experimental immunoreproduction 4. Immunology of gametes*. Ed. M. Edinin and M.H. Johnson, Cambridge University Press. pp. 187—206.
- Van Blerkom, J. and G.O. Brockway, 1975. Quantitative patterns of protein synthesis in the preimplantation mouse embryos. 1. Normal pregnancy. *Develop. Biol.* **44** : 148—157.
- Van Blerkom, J. and C. Manes, 1974. Development of preimplantation rabbit embryos *in vivo* and *in vitro*. II. A comparison of qualitative aspects of protein synthesis. *Develop. Biol.* **40** : 40—51.

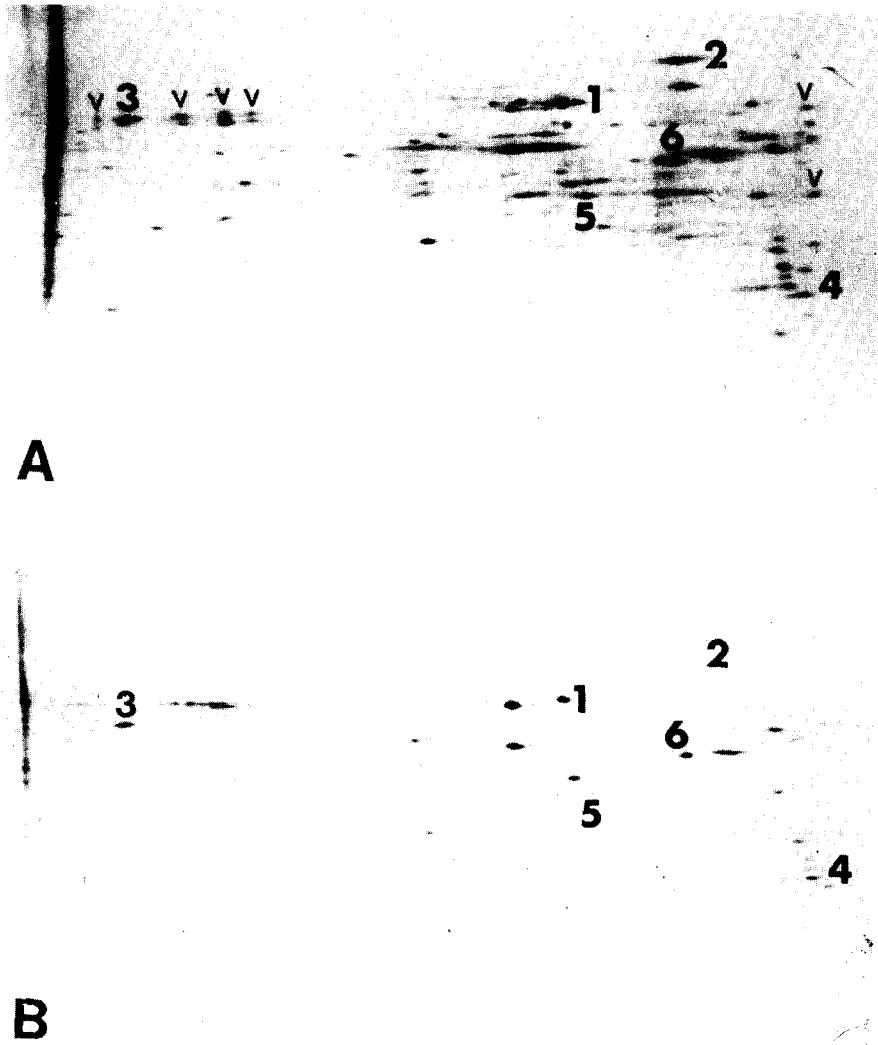


Fig. 1. Fluorograms of radioactively labelled proteins synthesized for 22 hours by 2 cell-stage embryos without (A) and after pretreatment with MMS (B). Separation of the polypeptides was achieved by isoelectric focussing between pH 4.5 and 8.5 and 9-15% exponential SDS-polyacrylamide electrophoresis. Proteins inhibited are marked by V. Six arbitrary fingerprints appearing consistently in most of the fluorograms are labelled with the numerals, 1 through 6, to make an easy comparison among fluorograms.

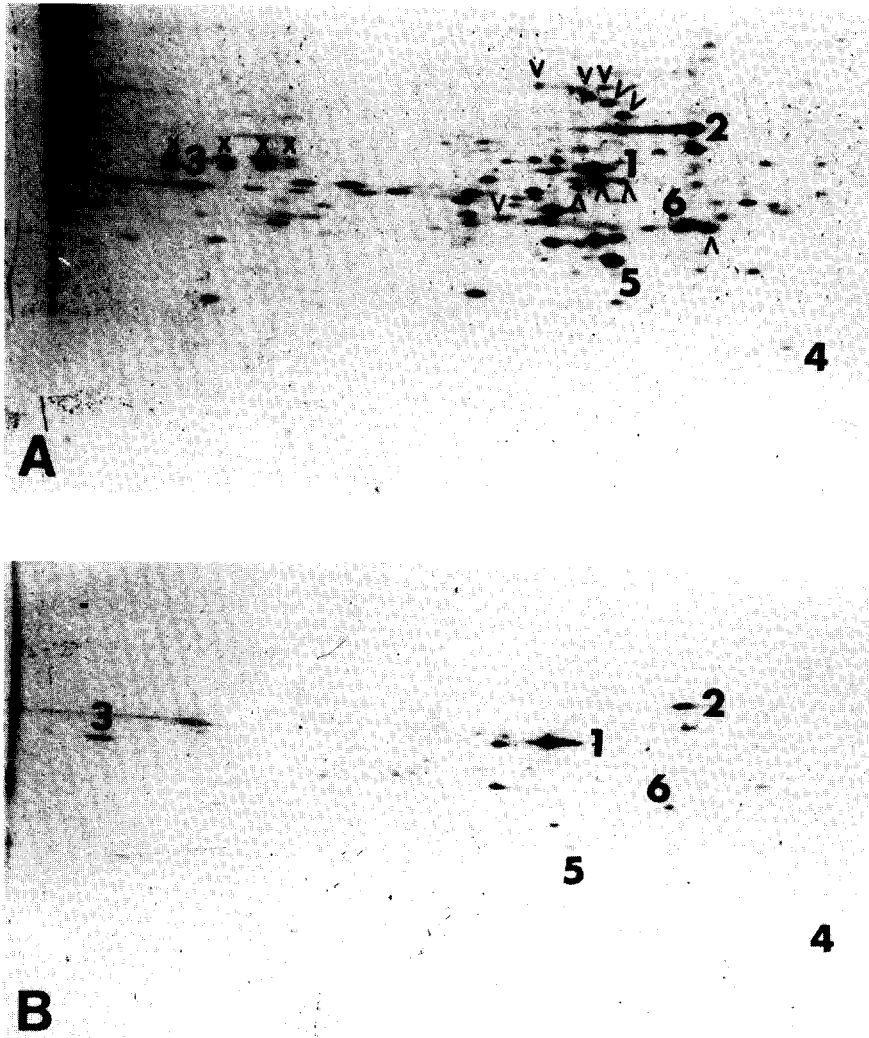


Fig. 2. Fluorograms of radioactively-labelled proteins synthesized for 22 hours by the 4 cell-stage embryos without (A) and after pretreatment with MMS (B). Proteins, synthesized specifically at 4-8 cell-stages (marked by V) and synthesized repeatedly every cell cycle (marked by X), were all suppressed by MMS.

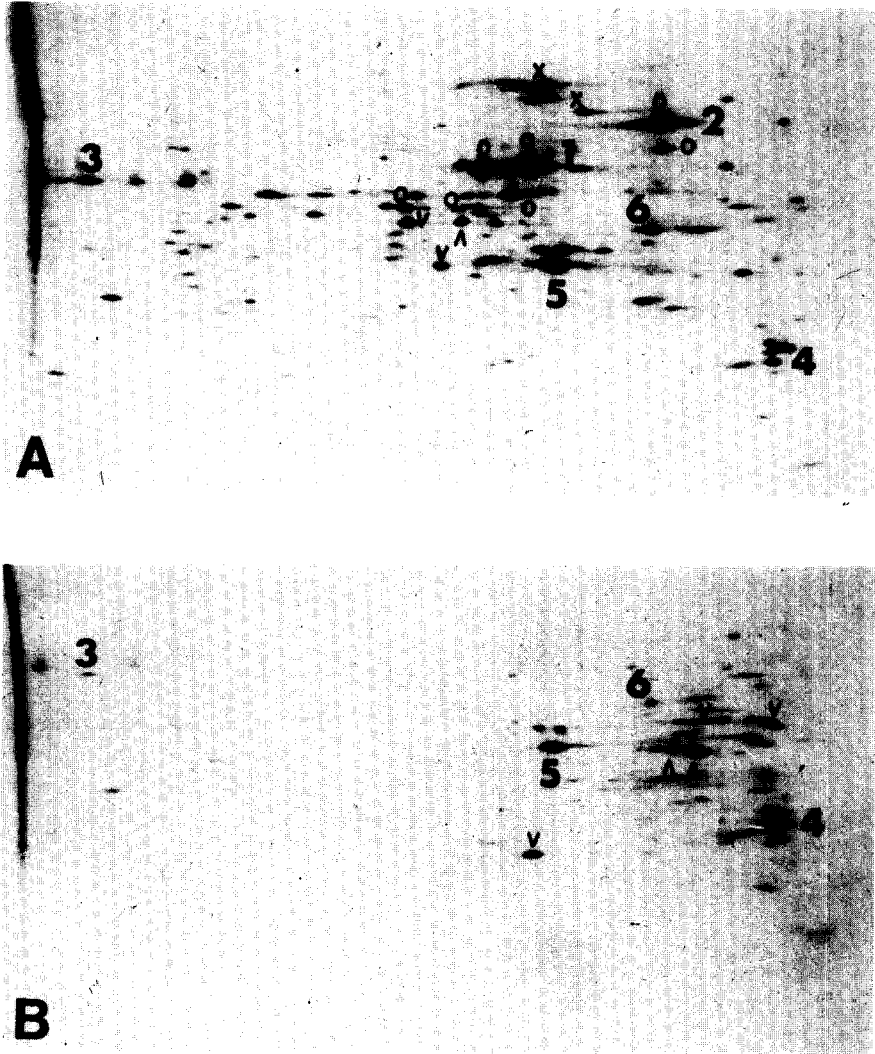


Fig. 3. Fluorograms of radioactively labeled proteins synthesized for 22 hours by morulae without (A) and after pretreatment with MMS (B). In fluorogram (A) proteins, synthesized specifically at morula-blastocyst stages (marked by V) and synthesized repeatedly since 2 cell (marked by X) and 4 cell stage (marked by O), are all inhibited by MMS. In fluorogram (B) the fingerprints marked by V are the polypeptides, the synthesis of which is enhanced by MMS.

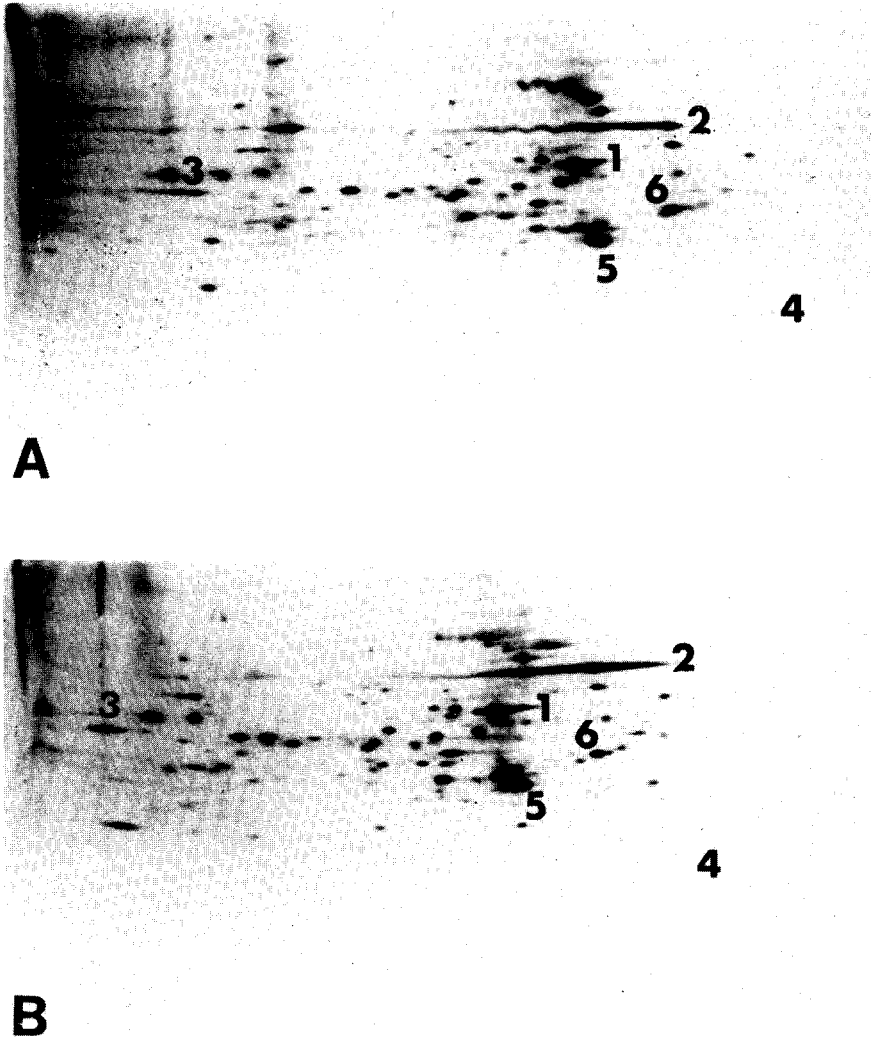


Fig. 4. Fluorograms of radioactively labelled proteins synthesized for 22 hours by morulae in the absence (A) and presence of captan (B). Protein synthesis is not inhibited.