

参 考 文 献

- [1] Tomita, M.: *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 667, 1976.
- [2] Delaunay, J.s *Pathol. Biol.*, **26**(2), 117, 1978.
- [3] Findlay, J. B. C.: *J. Biol. Chem.*, **249**, 4398, 1974.
- [4] Kahane, I. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **426**, 464, 1976.
- [5] Liljas, L. et al.: *ibid.*, **426**, 526, 1976.
- [6] Bouma, S. R. et al.: *J. Biol. Chem.*, **252** 6759,

1977.

- [7] Wennogle, L. P.: *J. Mol. Biol.*, **124**, 689, 1978.
- [8] Wells, E. et al.: *Biochem. J.*, **187**(3), 719, 1980.
- [9] Fairbanks, G. et al.: *Biochemistry*, **10**, 2607, 1971.
- [10] Harel, D. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **193** 158, 1979.
- [11] 喜田:《高分子》, **10**, 962, 1961.
- [12] 喜田和川口:《土肥学会讲演要旨》, 第6集, 1960.

[本文于1981年6月18日收到]

不同方法制备的大鼠肝染色质化学组分 及模板活性的比较研究

王 智 李士谔 马金鉴

(中国医学科学院基础医学研究所生物化学及分子生物学研究室)

在真核细胞内, DNA 的转录、复制和修复都与染色质上的组蛋白、非组蛋白、RNA 有密切关系,因此染色质结构和功能的研究,是当前分子生物学及分子遗传学的重要课题。近年来许多资料表明,肿瘤的发生可能与细胞内 DNA 的转录、修复和复制的异常有关,因此染色质结构与功能的研究,也是癌变原理研究中的重要课题。我们初步观察到在二乙基亚硝胺诱发大鼠肝癌过程中某些酶活性的变化,是由于酶蛋白生物合成速度的改变。看来癌变过程中酶的变化是由于酶的基因调控异常引起的。为此我们开展了肿瘤染色质与基因调控的研究。

染色质是非常复杂的大分子复合物,其结构受许多因素的影响,因此制备染色质所用的方法不同,所得的结果也可能不同。我们比较了用不同方法制备的染色质的理化性质以及体外转录,为进一步研究肿瘤染色质的结构与功能打下基础。

一、材 料 和 方 法

1. 试剂 对苯甲基磺酰氟 (PMSF)(Merck) 0.1M 异丙醇贮存液。Triton X-100 (BDH), 精胺盐酸盐 (Sigma), [³H]-UTP, 比放射性为 25 毫居里/毫克分子 (上海原子能研究所),

ATP (Boehringer), GTP (Serva), CTP (BDH), 小牛胸腺 DNA (BDH 及中国科学院生物物理所制), 40 号玻璃纤维滤膜 (上海红光造纸厂), PPO-POPOP 闪烁液 (3 克 PPO 与 0.3 克 POPOP 溶解在 1000 毫升甲苯中)。E. coli RNA 聚合酶, 4100 单位/毫升 (Miles)。其余试剂都为分析纯。

2. 细胞核的制备 将 Wistar 大鼠 (250 克左右, 雄性) 饥饿过夜, 断头处死, 迅速用冷的 0.154M KCl 作肝静脉灌注或取出肝脏漂洗, 称重。以下操作在 0—4℃ 进行。剪碎肝组织, 按 1:10(W/V) 比例加入 0.25M 蔗糖缓冲液 (10mM Tris-HCl, pH7.6, 5mM MgCl₂, 3mM KCl, 0.1mM PMSF, 0.1% Triton X-100), 于 Teflon 玻璃匀浆器中匀浆 1—2 次, 或用普通玻璃匀浆器匀浆 4—5 次。用 200 目单层尼龙布过滤, 除去血管, 结缔组织。滤液离心 (900g, 15 分钟, 4℃)。将沉淀悬浮于 2.2M 蔗糖缓冲液 (10mM Tris-HCl, pH7.6, 5mM MgCl₂, 3mM KCl, 0.1mM PMSF, 0.1% Triton X-100)。另取一个离心管, 以 1/5 体积的 2.2M 蔗糖缓冲液垫底, 铺上 2.2M 蔗糖粗核悬液, 离心 (105,000×g, 30 分钟)。再将细胞核用 0.25M 蔗糖缓冲液洗 1—2 次, 离心 (900×g, 5 分

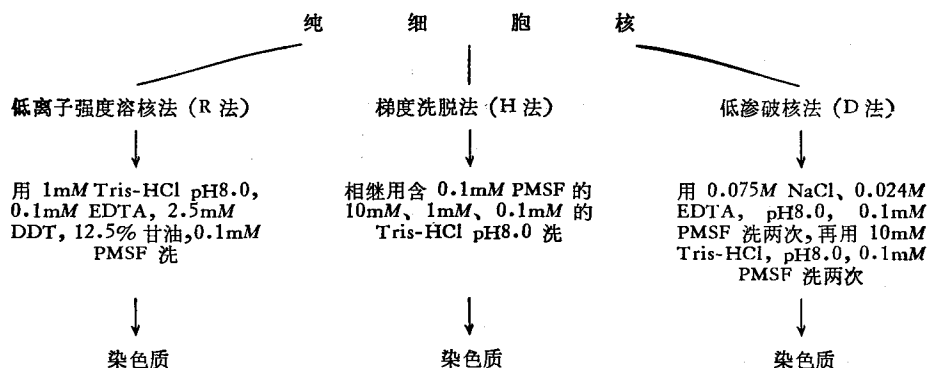


图 1 染色质的制备

钟),得纯的细胞核,产率为1—1.5毫克DNA/克肝。将纯核悬浮于0.32M蔗糖缓冲液(10mM Tris-HCl, pH8.0, 2mM $MgCl_2$, 0.1mM PMSF),置于0—4℃冰箱保存,核转录活性可保持2—3天。

3. 染色质的制备 在0—4℃进行。参考并改进了 Reeder^[1], Huang^[2], Doty 等人的方法^[3],建立了三种制备染色质的方法(简称“R法”“H法”“D法”)。其制备流程如图1。

每次溶核、破核或洗核都在玻璃匀浆器中进行,即用手磨动数次,离心 $900 \times g$, 5分钟4℃。染色质悬浮于含0.1mM Tris-HCl, pH8.0, 0.1mM PMSF的缓冲液中,于0—4℃保存备用。从处死动物至制备染色质整个过程约3—4小时。

4. 细胞核转录活性的测定 转录系统的总体积为200微升,含有60mM Tris-HCl, pH8.0, 2mM $MnCl_2$, 6mM $MgCl_2$, 1mM精胺, 100mM $(NH_4)_2SO_4$, 0.5mM DTT, 1.5mM NaF, ATP、CTP、GTP, 各为0.3mM, UTP为0.1mM, $[^3H]$ -UTP 2微居里,细胞核悬液(含0.32M蔗糖, 10mM Tris-HCl, pH8.0, 2mM $MgCl_2$, 0.1mM PMSF)的DNA含量为0—80微克。37℃保温30分钟,置于玻璃纤维滤膜上,相继用10%TCA, 95%乙醇洗。于Beckman LS800液闪计数器计数。

5. 紫外吸收光谱分析 取0.1ml染色质悬液,加入等体积的0.1N NaOH溶解,用双蒸水稀释到3—5ml。在岛津UV-300分光光度计波

长190—340nm范围内扫描,分别计算 A_{220}/A_{260} , A_{260}/A_{280} , A_{320}/A_{260} 的比值。

6. 染色质的化学组分分析

(1) DNA测定 按Burton^[4]改良的二苯胺法,用小牛胸腺DNA做标准。

(2) RNA测定 参考David等人^[5]的方法。取0.2毫升染色质悬液,加入0.1ml的0.9N NaOH溶液(NaOH最终浓度为0.3N),37℃水解60分钟,滴加1.7毫升冷的5%过氯酸,置冰浴5分钟,离心($1000 \times g$, 15分钟,4℃)。上清液于90℃水解15分钟后按Orcinol方法^[6]测定。用*E. coli* tRNA做标准。

(3) 蛋白测定 按Lowry法^[7],用牛血清白蛋白做标准。

(4) 组蛋白和非组蛋白测定^[8] 采用0.2N H_2SO_4 (含0.1mM PMSF)分离组蛋白和非组蛋白,分别再用Lowry法测蛋白。

7. DNA和染色质模板活性的测定 反应总体积为100微升,含有10mM Tris-HCl, pH8.0, 1mM $MgCl_2$, 0.25mM $MnCl_2$, 3mM β -巯基乙醇, ATP、GTP、CTP均为0.1mM, $[^3H]$ -UTP为1微居里, DNA和染色质DNA分别为0—20微克, *E. coli* RNA聚合酶为3.2单位/毫升。37℃保温10分钟后,用含0.02%焦磷酸钠的10%TCA终止反应。置于玻璃纤维滤膜上,相继用10%TCA, 5%TCA, 70%乙醇, 95%乙醇抽洗。于Beckman LS800液闪计数器上记数。

二、结 果

由本实验制备的大鼠肝细胞核,经 HE 染色,显微镜下观察未见胞浆污染,核完整。在 0—80 微克核 DNA 范围内,具有体外转录活性;在 60 微克 DNA 时,转录活性达最高(图 2)。

在纯核基础上分别用上述三种方法制备染色质都得到较好的产率,其中“R 法”较高,“D 法”最低,一般为 0.5—1 毫克染色质 DNA/g 肝,并能较好地溶于 Tris-HCl 缓冲液 (pH8.0),其中又以“H 法”制备的染色质溶解度最好。

染色质的紫外吸收光谱基本相似(图 3)。在波长 220nm 及 260nm 出现高峰, A_{220}/A_{260} 比值分别为 3.0 (“R 法”), 2.2 (“H 法”), 1.9 (“D 法”)。 A_{260}/A_{280} 比值分别为 1.79 (“R 法”), 1.78 (“H 法”), 1.79 (“D 法”)。 A_{320}/A_{260} 的比值都小于 0.05。

染色质化学组分的比较见表 1。“D 法”和“H 法”制备的染色质的数据较为接近,其中组

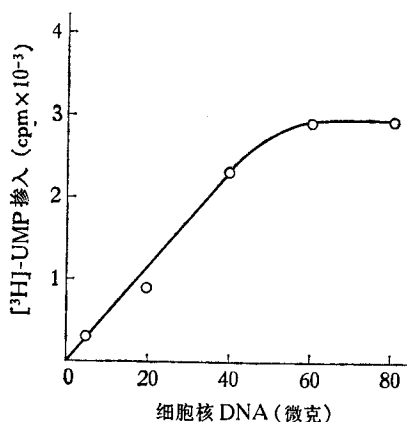


图 2 细胞核转录
转录系统见“材料与方法”

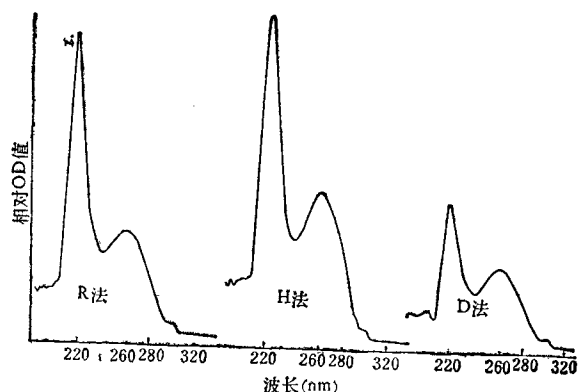


图 3 染色质的紫外吸收光谱

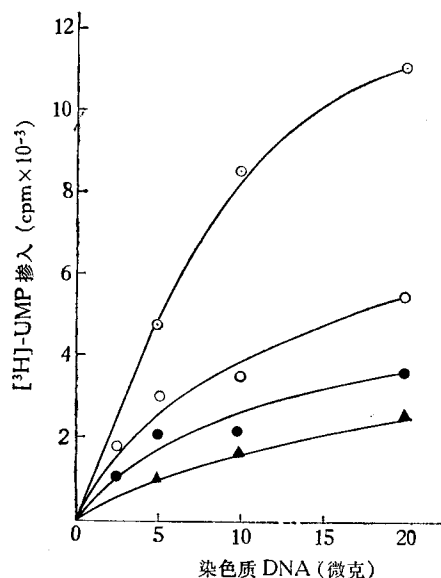


图 4 不同方法制备的染色质模板活性
○: DNA ○: R 法 ●: H 法 ▲: D 法

蛋白:DNA=(0.96—0.99):1; 非组蛋白:DNA=(0.56—0.41):1; RNA:DNA=(0.08—0.076):1; 而“R 法”制备的染色质的数据较高,其中组蛋白:DNA=1.18:1; 非组蛋白:DNA=0.85:1; RNA:DNA=0.153:1。

表 1 三种方法制备大鼠肝染色质化学组成的比较 (DNA = 1)

方 法	组 份	总 蛋 白	组 蛋 白	非组蛋白	非组蛋白	RNA
					组 蛋 白	
R 法		2.05±0.13	1.18±0.01	0.85±0.11	0.73±0.09	0.153±0.001
H 法		1.52±0.06	0.96±0.01	0.56±0.04	0.59±0.04	0.080±0.052
D 法		1.42±0.02	0.99±0.04	0.41±0.03	0.40±0.03	0.076±0.013

表中数据是第三批动物测定的结果(平均值±标准误)。每批是由三只以上动物的肝混合后测定的。

在无细胞体外转录系统中,由上述三种方法制备的染色质的模板活性都较小牛胸腺 DNA 为低。其中由“R 法”制备的染色质的模板活性较“H 法”制备的染色质高,“H 法”制备的染色质的模板活性又较“D 法”制备的染色质高(图 4)。

三、讨 论

我们综合了当前常用分离鼠肝细胞核的蔗糖法,以及分离肿瘤细胞核的去污剂法,并比较了用不同浓度 Triton X-100 (0.1%, 0.25%, 0.5%, 1%) 处理的结果,发现正常大鼠肝在 0.5—1% 的 Triton X-100 条件下,细胞核破裂,核仁溢出。如果采用 0.1% 浓度的 Triton X-100,并同时加入使核脆性减弱的 K^+ 离子和 Mg^{++} 离子,基本可以得到完整的、无胞浆污染的细胞核。我们还比较了肝灌注与不灌注,不同 pH 的缓冲液以及离心条件,采用角头和甩头,不同超速离心时间(30 分钟和 60 分钟)、离心转数(28000r. p. m. 和 37,000r. p. m.) 等的影响,从而建立了本文介绍的制备鼠肝细胞核的方法。由本实验制备的肝细胞核,在显微镜下未见胞浆污染,并具有体外转录活性,从这些细胞核制备的染色质具有符合文献标准的理化性质和生物活性。

在制备染色质时我们注意到: 1. 以采用低盐浓度的方法为好。因为高盐浓度可以引起染色质蛋白的交换和重组,不利于保持染色质的天然状态。2. 制备过程的时间要短,以防止染色质间的集聚。3. 染色质的溶解度要好,在这些原则下,我们参考了一些人的方法,并且进行了一些修改。在 Doty 的原法中未见染色质化学组分的分析结果。我们的分析结果是: DNA: 蛋白质:RNA = 1:1.42:0.07。在采用 Huang 等逐渐降低离子强度的方法中,我们将起始浓度 50mM Tris-HCl 改为 10mM Tris-HCl,然后依次降低浓度三次离心。原方法所得的染色质其 DNA:蛋白质:RNA = 1:2.7:0.08。我们制备的染色质其 DNA:蛋白质:RNA = 1:1.52:0.08,其中蛋白质含量较原法报告的低。在采

用 Reeder 方法制备染色质时,整个过程都有所改动。原法所得的染色质其 DNA:蛋白质:RNA = 1:4.5:0.3。我们的结果是 DNA:蛋白质:RNA = 1:2.05:0.153,更接近于 Bonner 等^[9]提出的标准(蛋白质:DNA 小于 2, RNA:DNA 小于 0.1)。

在染色质的紫外光谱分析中,我们观察到除在 260nm 处有吸收峰外,在 220nm 处还有一个吸收峰。最近有人发现小牛胸腺染色质多肽在 200nm 左右有吸收峰^[10]。它与我们所观察到 220nm 的吸收峰是否有关,正在研究中。

从三种染色质的化学组分分析结果来看,“R 法”制备的染色质含非组蛋白的量(0.85)大于“H 法”(0.56)和“D 法”(0.41)。同时“R 法”制备的染色质其 RNA 含量(0.153)也大于“H 法”(0.08)和“D 法”(0.076)。从紫外吸收光谱来看, A_{220}/A_{260} 比值也是以“R 法”制备的染色质为最高。这些结果是否与“R 法”制备的染色质的模板活性较高有关,值得进一步研究。

从以上结果,可见用上述三种方法制备的染色质的理化性质和模板活性略有差异。根据文献标准,我们认为“H 法”和“D 法”制备的染色质较好。由于“H 法”制备的染色质的溶解度较其他二法制备的染色质好,在我们以后的实验中都采用此法。

郝检林同志参加了模板活性测定。

参 考 文 献

- [1] Reeder, R. H.: *J. Mol. Biol.*, **80**, 229, 1973
- [2] Huang, R. C. C. et al.: *J. Mol. Biol.*, **39**, 369, 1969.
- [3] Doty, P.: *J. Mol. Biol.*, **1**, 1, 1959.
- [4] Burton, K.: *Methods in Enzymology*, **12**(13), 163, 1969.
- [5] David, I.: *Eur. J. Biochem.*, **46**, 461, 1974.
- [6] Schneider, W. C.: *Methods in Enzymology*, **3**, 680, 19.
- [7] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951.
- [8] Bonner, J. et al.: *Methods in Enzymology*, **12** (B), 3, 1969.
- [9] Bonner, J.: *Chromatin Structure and Function* (Part A), **11**, 1978.
- [10] Hiller, M. et al.: *Biochem Biophys. Acta*, **564**, 246, 1979.

[本文于 1981 年 10 月 4 日收到]