

鼠肝、小牛胸腺染色质非组蛋白的提取 及对模板活力的激活作用

上海实验生物研究所三室细胞研究组

前 言

一般认为染色质蛋白是基因活力调节的重要因素,而组蛋白在维持染色质的结构与基因活力的抑制上起着重要作用,但由于它缺乏专一性,成份又较简单,似乎难以解释真核染色质的复杂基因表现,所以目前大家的注意力已逐渐转向非组蛋白。

非组蛋白的种类繁多,还包括了一系列功能极为复杂的酶系。它与组蛋白不同,对于染色质的结构与功能上起着积极的调节作用。

通常认为非组蛋白能认识特定的基因次序,并与之结合。通过非组蛋白分子的磷酸化,使它带有负电荷,与带正电荷的组蛋白结合,使DNA裸露,从而促进了模板活力,起着正调节作用。最近有人从果蝇卵部分纯化了一种蛋白^[1],能解开DNA的超螺旋,并能稳定单股DNA链,这是否也暗示了有一类非组蛋白也可能影响染色质的结构,尤其对染色质的念珠状亚单位的展开或形成上起着积极的调控作用。

非组蛋白除了正调节作用外,最近也有人从小牛胸腺中分离出一种非组蛋白肽,能有效地抑制体外转录,似乎非组蛋白又包含着负调节的因子。

为了了解非组蛋白在真核染色质的结构与功能中的作用,我们采用硫酸铵与硫酸链霉素去除DNA的简易方法,从小牛胸腺与大白鼠肝脏提取了染色质非组蛋白,并观察了它对模板活力的激活作用。

一、非组蛋白的提取与鉴定

(一) 非组蛋白的提取

1. 小牛胸腺非组蛋白的提取

小牛胸腺染色质 200 毫升(三只小牛胸腺)

加一倍半体积解离液: 0.8M 盐酸胍

10M 尿素 0.8M 磷酸缓冲液(pH7.0)

临用时加入 0.4 毫升 1M 的巯基乙醇

捣匀,放置过夜(4℃),超声破碎(功率:

50 瓦频率: 20 千周)三分钟,每分间隔

十五秒经超声破碎后染色质液体

科技消息

水母的脉动启示飞机的有效设计

水母和飞机在其喷射推进的方式上有重大的区别。以色列技术研究所的一位科学家研究了水母的运动情况,考虑飞机设计师有否选择了错误的方案。

飞机由连续的喷气发射而推进,而许多水生动物是由脉冲式喷射推进的。Daniel Weihs 说:“从单纯的解剖学观点来讲,动物身上发展连续的喷射推进是可行的。而动物身上可能有一些进化上的原因采用脉冲式喷射。”他对水生动物的研究表明,脉冲式运动能使推力增强。Weihs 解释说,用又有冲击又有滑翔的方式前进,可以最有效的使用力量或滑行。这样平均下来,既可以节省能量,又可以最充分地利用能量所产生的功率。

译自 Science News (1977.6.25).

↓ 加固体硫酸铵达 70% 饱和度(冰浴)
 对 70% 硫酸铵液(2,000 毫升 × 2 次)透
 析 4 小时
 ↓ 40,000g 离心 1 小时
 沉 淀 溶解于 400 毫升 0.01M 焦磷酸钠缓冲
 液 (pH7.8)
 ↓ 加硫酸链霉素达 0.8%, 放置 2 小时 4℃
 ↓ 4,600g 离心 20 分钟
 上清液 加固体硫酸铵达 70% 饱和度, 静置 30
 分钟
 ↓ 40,000g 离心 30 分钟
 沉 淀 溶解于 CM-Sephadex C-50 柱平衡液
 50 毫升再对相同溶液 500 毫升, 透析过
 夜
 [柱平衡液: 0.4M 盐酸胍, 5M 尿素
 0.01M 焦磷酸钠缓冲
 液(pH7.8)]
 ↓ CM-Sephadex C-50 柱(30 厘米 × 2.5 厘米)
 非组蛋白用平衡液洗脱, 收集非组蛋白
 峰, 加固体硫酸铵达 70% 饱和度, 对
 2,000 毫升
 70% 硫酸铵溶液透析过夜, 10,000g 离
 心 20 分钟
 ↓ 沉 淀 溶解于少量重蒸馏水(约 10 毫升)
 ↓ 再对 20,000 毫升蒸馏水连续透析
 冰冻干燥

2. 鼠肝非组蛋白的提取

提取方法与上述方法基本相同, 只是将经
 CM-Sephadex C-50 柱分离获得的非组蛋白, 再
 用 QAE-Sephadex A-50 柱(30 厘米 × 1.5 厘米)
 进一步分离纯化, 洗脱液是: 300 毫升 0.01N
 NaCl (溶解于 5M 尿素, 1mMEDTA, 0.01M
 Tris-HCl 缓冲液 pH8.3, 0.5mM 氯化镁, 1mM
 巯基乙醇)对 300 毫升 0.6N NaCl (溶解于同样
 溶液中)进行梯度洗脱, 非组蛋白峰再经硫酸铵
 沉淀, 离心(10,000g × 20 分钟)沉淀溶解于
 RNA 聚合酶贮藏液保存。

另外我们将解离的大鼠肝染色质直接用羟

基磷灰石柱进行分离, 收集非组蛋白峰, 对水充
 分透析, 在透析过程中, 有部分非组蛋白先沉淀
 下来, 离心(10,000g × 20 分钟)后的沉淀称水
 沉淀部, 其上清液加固体硫酸铵达 70% 饱和
 度, 又有沉淀出现, 离心(10,000g × 20 分钟),
 此沉淀称硫酸铵沉淀部。

(二) 含有两性电解质的聚丙烯酰胺凝胶电泳测定

根据 Gronow 和 Giriffiths 方法^[2] 进行:
 5% 聚丙烯酰胺, 含有 8M 尿素与 5% (v/v)
 Ampholine (40% pH3→10)。

(三) 模板活力测定

总体积为 0.5 毫升, 内含有 0.04M Tris-HCl
 缓冲液 pH7.9; 0.01M MgCl₂; 0.1mM EDTA;
 0.1mM 巯基乙醇; 0.15M NaCl; 0.5 毫克/毫升
 牛血清白蛋白; 0.15mM UTP; 0.15mM CTP;
 0.15mM GTP 和 0.15mM ¹⁴C-ATP (0.125 微
 居里, 比强 600 毫居里/毫克分子), 50 微克
 小牛胸腺或鼠肝 DNA, 0.8mM 磷酸氢二钾,
 RNA 聚合酶 0.1 毫升(相当于 1.5 酶单位)37℃,
 温育 15 分钟。

冰干状态的非组蛋白活力比液态容易保
 存, 在同位素测活前, 必需经过对水与 Tris-HCl
 缓冲液 (pH7.8) 透析, 离心去上清液, 蛋白沉淀
 重新悬浮于重蒸水中, 否则会影响非组蛋白的
 激活作用, 推测在透析过程中有可能去除了某
 些抑制因素之故。

(四) RNA 聚合酶的提取

参照 Burgess, Richerd, (1969) 方法, 从
 E. Colik 12 中提取^[3]。

(五) 蛋白测定

参照 O. H. Lowry, 等人(1951)方法^[4]。
 染色质的抽提按 Artman 和 T. S. Roth,
 (1971) 方法^[5]。

DNA 与组蛋白的抽提参考本实验室有
 关的文章^[6-7]。

二、实验结果与讨论

(一) 染色质非组蛋白的提取

在提取过程中, 我们发现染色质的解离程

度与解离液的性质及盐浓度有密切关系。我们曾用 6M NaCl, 0.015M Tris-HCl 缓冲液 (pH7.8) 或采取 Wang (1967) 的方法用 1M NaCl 溶液解离, 染色质解离不够完全。因此我们加以改进, 采用高浓度的尿素溶液, 染色质解离的较好; 再结合超声破碎的方法, 染色质解离则更为完全。

染色质解离后, 先将核酸与蛋白分开, 然后将蛋白分离成组蛋白与非组蛋白。目前, 去除 DNA 大致采用柱层分离法 (Macgillivray, 1972) 和超速离心法 (Gilmour 等, 1970), 有人也采用 LaCl₃ 去 DNA (Yoshida 等, 1975)。我们结合自己的实际情况作了改进, 采用硫酸铵与硫酸链霉素相结合的方法去除 DNA, 这就可避免目前国外所采用的冗长费时的超速离心或柱层分离去除 DNA 的方法。我们的实验结果证明: 应用此方法获得的非组蛋白, 没有 DNA 的污染, 对模板活力有显著的激活作用, 非组蛋白电泳图谱与采用羟基磷灰石分离获得的非组蛋白图谱基本一致。所不足的是用硫酸链霉素去 DNA 时, 蛋白质溶解于 0.01M 焦磷酸缓冲液, 可能引起部分染色质的重组, 对回收率有所影响 (因为在高盐解离液中, 用硫酸链霉素去除 DNA 比较困难)。

(二) 非组蛋白的层析分离与电泳鉴定

小牛胸腺非组蛋白 CM-Sephadex C-50 柱分离图谱和凝胶电泳见图 1—2, 大鼠肝非组蛋白

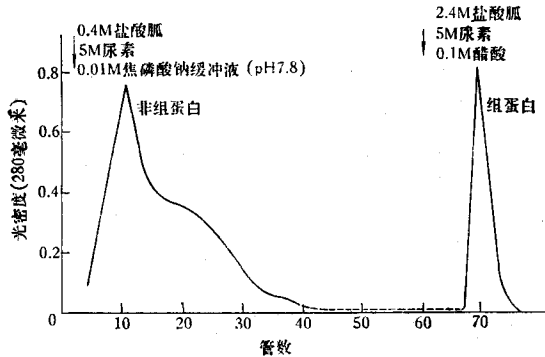


图 1 小牛胸腺非组蛋白的 CM-Sephadex C-50 柱分离图谱

组蛋白有共同的带子, 也各自具有特异的带子, 显示了不同组织染色质非组蛋白的异质性。



图 2 小牛胸腺非组蛋白(经 CM-Sephadex C-50 柱分离)的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

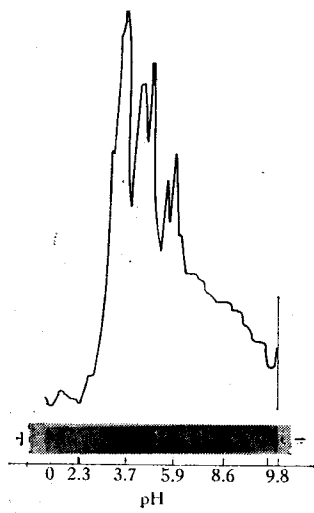


图 3 鼠肝非组蛋白(经 CM-Sephadex C-50 柱分离)聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

为了更深入地了解染色质非组蛋白对真核细胞基因表达的调节控制, 必须对成份极为复杂的非组蛋白进行分离与纯化, 目的在于获得性质、作用不同的各种组份, 甚至是单一的成份。为此, 我们将经 CM-Sephadex C-50 柱分离之后的大白鼠肝脏的非组蛋白, 再用 QAE-Sephadex

A-50 分离纯化 (图 6), 进一步分得了 56—67 管的几个非组蛋白组份。从它们的电泳图谱 (图 7) 中可以看出, 这几个组份的等电点在

pH3.7 左右。另外我们将解离的鼠肝染色质直接用羟基磷灰石柱进行分离, 分离图谱 (见图 4) 中峰 II、

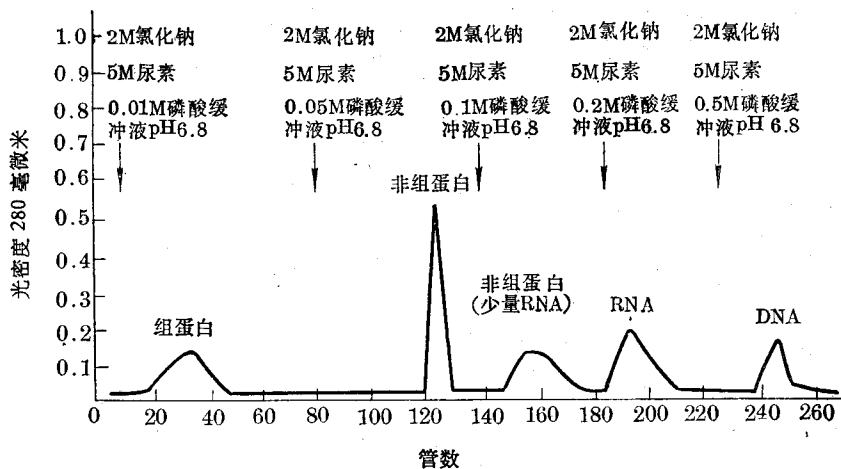


图 4 鼠肝非组蛋白的羟基磷灰石柱分离图谱

峰 III 即是非组蛋白。这与 Macgillivray 等人 1972 年的实验结果是相吻合的。此外, 我们在实验中发现: 峰 II 部在对水透析过程中部分产生沉淀, 利用这一特性我们又进一步将它分成水沉淀部和硫酸铵沉淀部, 这两部分非组蛋白

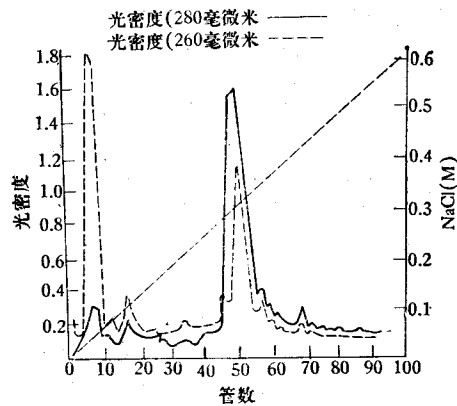


图 6 鼠肝非组蛋白的 QAE-Sephadex A-50 柱分离图谱

——光密度 280 毫微米; ---光密度 260 毫微米

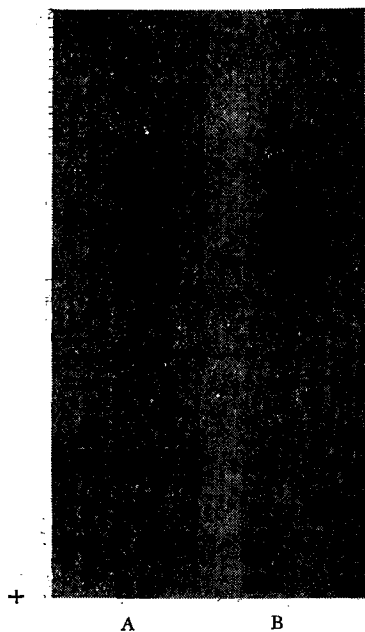


图 5 鼠肝非组蛋白(经羟基磷灰石柱分离)的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

A——硫酸铵沉淀部分; B——水沉淀部分

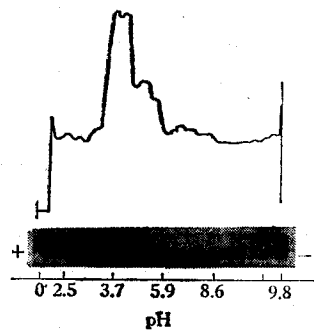


图 7 鼠肝非组蛋白经 QAE-Sephadex A-50 柱分离后 (No. 56—67) 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

对鼠肝 DNA 模板都有激活作用(表 2—3)。两者的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱有所不同。其中有几条带子为两者所共有,但各自都有特异的带子。如果把这两部分的带子合并起来,则与 CM-Sephadex C-50 柱分离获得的非组蛋白凝胶电泳带子基本一致(图 5)。

(三) 非组蛋白对核组蛋白模板活力的激活作用

1. 小牛胸腺非组蛋白对小牛胸腺核组蛋白模板活力的激活作用

Paul 和 More (1973)^[8] 采用重组的方法证明,小牛胸腺的非组蛋白,组蛋白和 DNA 形成的重组染色质其模板活力相似于天然染色质,看到非组蛋白对模板活力有明显的激活作用。我们采用硫酸链霉素去 DNA 的方法,从小牛胸腺制备的非组蛋白对胸腺 DNA 的模板活力有显著的激活作用(表 1),而且基本上没有 DNA 与 RNA 聚合酶的污染(表 1),证明是非组蛋白本身对模板活力的激活作用。

表 1 小牛胸腺非组蛋白对模板活力的激活作用

小 牛 胸 腺			RNA	模板活力	活 力	实际
DNA (微克)	组蛋白 (微克)	非组蛋白 (微克)	聚合酶 (毫升)	(cpm)	(%)	促进 (%)
50	—	—	0.1	5,688	100	—
50	95	—	0.1	672	11.8	—
50	95	140	0.1	3,192	56	44.2
—	95	140	0.1	432	7.5	0
50	95	140	—	24	0.4	0

2. 鼠肝非组蛋白对核组蛋白模板活力的激活作用

用羟基磷灰石柱分离获得的非组蛋白(峰 II),进一步分成水沉淀部与硫酸铵沉淀部,这

表 2* 鼠肝非组蛋白**对模板活力的激活作用

DNA (大鼠肝) (微克)	组蛋白 (小牛胸腺) (微克)	非组蛋白 (大鼠肝) (微克)	模板活力 (cpm)	活 力 (%)	实际促进 (%)
50	—	—	3,340	100	—
50	79.5	—	990	30	—
50	79.5	44	1,460	44	14

* 此表中 RNA 聚合酶都为 0.1 毫升;

** 羟基磷灰石硫酸铵沉淀

两部分对鼠肝 DNA 模板活力都有明显的激活作用(表 2—3)。

表 3 鼠肝非组蛋白对模板活力的激活作用
及有无 DNA 及 RNA 聚合酶污染的鉴定

DNA (鼠肝) (微克)	组蛋白 (小牛胸腺) (微克)	非组蛋白 (鼠肝) (微克)	RNA 聚合酶 (毫升)	模板活力 (cpm)	活 力 (%)	实际 促进 (%)
50	—	—	0.1	1,660	100	—
50	79.5	—	0.1	220	13	—
50	79.5	105*	0.1	580	35	22
50	79.5	(同上)	—	0	0	0
—	79.5	(同上)	0.1	140	8	0
50	79.5	15.6**	0.1	620	37	24
50	79.5	(同上)	—	0	0	0
—	79.5	(同上)	0.1	0	0	0

* 羟基磷灰石水沉淀部分;

** CM-Sephadex C-50 分离

从 CM-Sephadex C-50 柱分离提取的鼠肝非组蛋白及进一步用 QAE-Sephadex A-50 柱分离提取的鼠肝非组蛋白部分(pH3.7 左右)都初步观察到对鼠肝 DNA 模板活力有明显的激活作用,这些部分的非组蛋白都没有 DNA、RNA 聚合酶的污染(表 4)。

表 4 鼠肝非组蛋白对模板的激活作用以及污染情况鉴定

DNA (大鼠肝) (微克)	组蛋白 (大鼠肝) (微克)	非组蛋白 (大鼠肝) (微克)	RNA 聚合酶 (毫升)	模板活力 (cpm)	活 力 (%)	实际 促进 (%)
50	—	—	0.1	1,110	100	—
50	100	—	0.1	230	21	—
50	100	68*	0.1	640	58	37
—	100	同上	0.1	0	0	0
50	100	同上	—	0	0	0
50	100	52**	0.1	890	80	59
—	100	同上	0.1	110	9.9	0
50	100	同上	—	30	2.7	0

* CM-Sephadex 分离;

** QAE-Sephadex 分离的 56—67 管

从以上初步的实验结果中可以看出:经过 QAE-Sephadex A-50 的柱分离,能将 CM-Sephadex C-50 柱洗脱时混杂于非组蛋白峰尾的组蛋白去除,这就进一步提高了非组蛋白的纯度。而且,非组蛋白经 QAE-Sephadex A-50 柱进一步分离成若干组份,这对于深入分析成份复杂的非组蛋白的各种不同组份创造了有利

条件。这方面的工作我们将进一步加以研究。

综上所述,可初步归纳出三点结论:

(1) 我们采用硫酸铵与硫酸链霉素相结合的方法去除 DNA, 已从小牛胸腺与大白鼠肝脏提取了染色质非组蛋白, 对 DNA 模板都有明显的激活作用, 而且基本上都没有 DNA 和 RNA 聚合酶的污染, 说明此种抽提方法简便可行。

(2) 小牛胸腺与大白鼠肝脏的非组蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱可以观察到两者具有共同的成份(可能是两种组织共同具有酶系或结构蛋白), 各自也具有特异的成份。

(3) 无论用羟基磷灰石柱分离获得的两部分的鼠肝非组蛋白或用 QAE-Sephadex A-50 柱分离获得的鼠肝非组蛋白组份(pH3.7 左右)都初步观察到对鼠肝 DNA 模板活力有明显的激

活作用。

主要参考资料

- [1] Basse, W. A. and Wang, J. C.: *Biochemistry*, 13, 4,299—4,303, 1974.
- [2] Gronow, M. and Griffiths, G.: *FEBS Lett.*, 15, 340, 1971.
- [3] Burgess, Richard, R.: *J. Biol. Chem.*, 244 (22) 6160, 1969.
- [4] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951.
- [5] Artman, M., Roth, T. S.: *J. Mol. Biol.*, 60, 291, 1971.
- [6] 上海实验生物所细胞研究组: 《生物化学与生物物理进展》1977年, 第5期, 第3页。
- [7] 上海实验生物所细胞研究组: 《生物化学与生物物理进展》1978年, 见本期。
- [8] Paul, J. and More, I. A. B.: *Exptl. Cell Res.*, 82, 399—410, 1973.

[本文于1977年8月9日收到]

细胞电泳测量条件及影响因素

施永德 梁子钧

(上海第一医学院生物物理教研组)

细胞电泳技术是测量细胞表面电荷性质和密度, 以研究细胞表面结构和功能变化的一种精密的生物物理方法。为便于细胞电泳技术在临床医学和生物学上的应用, 我们曾试制了一种操作简便且样品用量少的方形毛细管式细胞电泳装置^[1,2], 并应用于诊断肿瘤、细胞免疫反应、活血化瘀等中医理论的探讨、中风及冠心病的防治等方面^[1-6]。细胞电泳技术在国外还应用于探知癌细胞与正常细胞的表面结构及带电特点, 了解药物对细菌等微生物表面的作用, 研究血液中有形成分(红细胞、白细胞及血小板), 在正常及病理条件下, 表面结构及电荷密度的变化, 特别是血小板在凝集、粘附、血栓形成、血液凝固中所起的作用与其表面结构及电荷密度变化的关系等^[1]。

细胞电泳的应用是比较广泛的, 但其测量

条件较严, 受干扰的因素较多, 只有严格地控制好操作条件, 才有可能把细胞表面结构及带电状况准确地反映出来。为此本文对细胞电泳测量条件及影响因素作一讨论。

1. 不同介质的电泳率-深度曲线

在直流电场的作用下, 质点的电泳率观察小室(即方形玻璃毛细管)的深度呈对称抛物线关系, 人红血球也同样如此。分别把人血液稀释在9%蔗糖和0.145M NaCl 溶液中, 离心, 弃上清液, 分别把如上经清洗的血球悬于这两种溶液中, 即成为供细胞电泳用的红血球悬液。当人血液加入自身血清或血浆中配制红血球悬液时, 事先不需经过清洗(以下同)。图1示人红血球在9%蔗糖、0.145M NaCl 和自身血清中测得的电泳率与深度的关系(见图1)。可以看出在这三种不同的介质中, 均呈对称抛物线关