

子的最大吸附量是 85.1%，因此分子量较高的 DNA 部分大约可占 80% 左右。

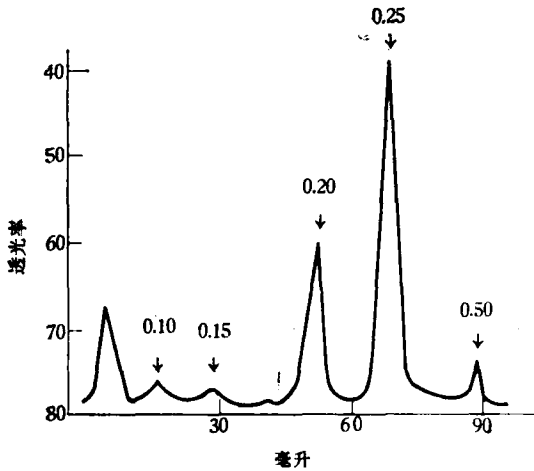


图 4 小牛胸腺 DNA 在羟基磷灰石柱上层析图谱

柱 1.3×7.5 厘米，流速 32 毫升/小时，第一峰为上柱流出峰，各峰上方数字代表洗脱的磷酸钾克分子浓度。纵座标以透光率表示，自动记录时基线是 80

而未被吸附的 DNA 样品再次以羟基磷灰石柱分离时，仍然可以获得正常 DNA 分离时所获得的图形。这种现象出现的原因有待于进一步研究，Bernardi 没有提到未吸附峰的存在。

经化学方法抽提的 DNA 造成分子间和分子内的聚合，一般难于解聚。经羟基磷灰石柱分离可以降低聚合现象。因此经过柱层析可以获得长链的 DNA 分子以及解聚的 DNA 分子。

DNA 按分子大小分级洗脱也从电镜观察获得了证明(见图版 I, 图 1—4)，图 1 是未经柱层析分离的 DNA 分子电镜照片，其 DNA 分

子长短不一。图 2 和图 3 是经过羟基磷灰石柱层析分离后，0.20 和 0.25M 磷酸钾缓冲液洗脱下来的 DNA 分子，这些分子是解聚的长链 DNA 分子。图 4 是 0.5M 磷酸钾缓冲液洗脱峰的电镜照片，看来象是未完全解聚的 DNA 分子。

## 总 结

经过初步摸索，我们确定了一套提取小牛胸腺 DNA 的方法，利用这套方法也提取了鼠肝 DNA。经过鉴定，这样制备的 DNA，蛋白和 RNA 的污染很低，熔点温度和碱基比例测定结果与资料报道的小牛胸腺 DNA 的这些性质一致。聚丙烯酰胺凝胶电泳和羟基磷灰石柱层析分析的结果说明，大部分属于大分子 DNA，也不排除少量短链 DNA 分子的存在。这样的 DNA 是保持了天然 DNA 的某些性质的。

## 主要参考资料

- [1] 上海实验生物研究所三室细胞研究组：《生物化学与生物物理进展》，见本期。
- [2] Kleinschmidt, A. K.: *Methods in Enzymology*, Vol. 12, Part B, 361, 1968.
- [3] Gordon, C. N. & Kleinschmidt, A. K.: *Biochem. Biophys. Acta*, 155, 305, 1968.
- [4] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951.
- [5] Schjeide, O. A.: *Anal. Biochem.*, 27, 473, 1969.
- [6] Burton, K.: *Biochem. J.*, 63, 315, 1956.

[本文于 1977 年 1 月 5 日收到]

# 小牛胸腺染色质的组成分析

上海实验生物研究所三室细胞研究组

高等真核细胞染色质是由 DNA、组蛋白、非组蛋白染色体蛋白(简称 NHC 蛋白)组成，有人提出在染色质的结构中还含有少量的 RNA，即所谓的 cRNA，然而这还是一个争论中的问题。

各组成成份一起不仅维持着细胞周期中染

色质的结构，而且通过各成分的有机联系和相互作用，也控制着细胞功能的表现。作为研究染色质结构与功能的起始点之一，我们以小牛胸腺为材料，对染色质的各组成成分的比值进行了定量分析，为通过染色质的重组研究染色质的结构与功能提供有关数据。

## 材料和方法

### 1. 材料

小牛胸腺由上海市牛奶公司提供, 实验前 2—3 小时由刚刚杀死的小牛取材, 置冰浴中, 实验亦在 4°C 以下进行。

### 2. 方法

(1) 染色质的制备 染色质的分离参照 Artman 和 Roth (1971) 的改进方法。胸腺组织剔除脂肪和结缔组织后剪碎, 加入 10 倍体积的 1.5% 柠檬酸溶液, 以组织匀浆器在 80 伏电压下匀浆 2 分钟, 然后以单层“512”锦丝斜纹绸(经 440/10 厘米, 纬 420/10 厘米)过滤三次, 滤液在  $1,500 \times g$  离心 10 分钟, 沉淀以 1.5% 柠檬酸洗涤一次。获得的粗制核经 50 伏匀浆 30 秒使其悬浮于 0.25M 蔗糖-1.5% 柠檬酸溶液中, 然后铺在 3 倍体积的 0.88M 蔗糖-1.5% 柠檬酸溶液上, 界面轻轻搅动造成粗糙的梯度, 经  $3,000 \times g$  离心 20 分钟去除细胞质颗粒物质。沉淀的核用 0.05M tris-HCl-0.15M NaCl (pH 7.5) 缓冲液洗 2—3 次, 以解除核的酸性环境, 则得到纯净的核。细胞核在 60 伏下与 0.01M tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液匀浆 2 分钟破核, 然后以  $10,000 \times g$  离心 1 小时获得染色质沉淀。

(2) DNA、RNA、蛋白质的定量测定 参考 Hill 等人 (1971) 的方法, 取得 3—5 克染色质制品, 加入 20 毫升 0.4N  $H_2SO_4$ , 抽提 1.5 小时, 于  $17,000 \times g$  离心 20 分钟, 沉淀再加入 10 毫升 0.4N  $H_2SO_4$ , 抽提 1 小时后离心, 合并两次抽提之上清液, 以 0.4N  $H_2SO_4$  稀释至 50 毫升, 以 Lowry<sup>[1]</sup> 法测定组蛋白, 以牛血清白蛋白为对照时测得的数值乘以 0.86 校正。

上述沉淀加入 5% 过氯酸 20 毫升, 于 95°C 水浴中水解 10 分钟后, 经  $17,000 \times g$  离心 20 分钟, 上清液以 5% 过氯酸稀释至 50 毫升, 以 Burton 法<sup>[2]</sup>测定 DNA。

所余沉淀溶解在 50 毫升 0.02N NaOH 溶液中, 以 Lowry 法测定酸性蛋白。

另取 3—5 克染色质制品, 加入 20 毫升

10% 三氯醋酸, 室温下提取 20 分钟, 经  $13,000 \times g$  离心 10 分钟, 沉淀重复洗涤一次后, 以乙醇-乙醚 (v/v = 3:1) 洗涤一次, 然后加入 20 毫升 0.3N KOH, 在 37°C 恒温下水解 18 小时, 用过氯酸调节 pH 值至 1.5, 于  $13,000 \times g$  离心 20 分钟, 上清液以 0.3N KOH-过氯酸 (pH 1.5) 溶液稀释至 50 毫升, 以 Schjeide 法<sup>[3]</sup>测定 RNA。

沉淀溶解在 50 毫升 0.02N NaOH 溶液中, 测定 DNA。

## 结果与讨论

### 1. 小牛胸腺细胞核和染色质

胸腺组织匀浆后经“512”锦丝斜纹绸过滤三次, 可以除去大量组织碎片和结缔组织等, 细胞核则顺利通过, 过滤效果较好。经光学显微镜和电子显微镜观察, 证明分离的细胞核基本排除了细胞质污染, 也很少见到破裂的细胞核。

在溶核前, 细胞核应以 0.05M tris-HCl-0.15M NaCl (pH 7.5) 洗涤 2—3 次解除酸性环境, 才能得到较好的溶核效果。为了得到纯净的染色质, 可以根据染色质的膨胀程度适当地选择离心速度。

### 2. 小牛胸腺染色质各组份的比值

以 DNA 为 1, 其它各组分相应 DNA 的比值如表 1 所示。

表 1 小牛胸腺染色质各组份的比值

成 份		DNA	蛋白质	组蛋白	NHC 蛋白	RNA
比 值	本实验室	1	1.82	1.23	0.59	0.043
	Shih 和 Bonner (1969)	1	1.75	1.00	0.75	0.0093

我们测定的结果, 与 Shih 和 Bonner (1969) 对同样组织测定的结果比较(见表 1), 除 RNA 外, 其它成份大体接近。组蛋白比值稍有增加, NHC 蛋白比值相应降低, 也许这是组成比例的真实情况, 但是也不能排除 0.4N  $H_2SO_4$  加入后, 有少量 NHC 蛋白被抽提。

Artman 和 Roth (1971) 认为 Shih 和 Bonner (1969) 分离 RNA 的方法是不严密的。而采用

柠檬酸分离细胞核时,柠檬酸与  $Mg^{2+}$  螯合,并抑制核酸酶的活力,从而减少 RNA 的损失。这可能是我们测得的 RNA 比值较高的原因,但是试验说明各种组织染色质中 RNA 的含量是很低的,这部分 RNA 的性质和功能有待进一步研究,现在还不能排除它是核内 RNA 的污染。

## 主要参考资料

- [1] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951.
- [2] Burton, K.: *Biochem. J.*, **63**, 315, 1966.
- [3] Schjeide, O. A.: *Anal. Biochem.*, **27**, 473, 1969.

[本文于1977年1月5日收到]

# 小牛胸腺染色质的电镜观察\*

上海实验生物研究所三室细胞研究组

细胞核里的染色质是调节控制生物体新陈代谢和遗传变异的物质基础。要了解染色质在细胞不同生理周期结构与功能瞬间变化的辩证统一关系,间期核染色质的构型是首先需要搞清楚的。近十多年来,这方面的研究也就相应比较活跃。

1965年, DuPraw 根据他本人在蜜蜂胚胎细胞染色质方面的工作,以及 Ris、Ris 和 Chandler、Wolfe 及 Callan 等在不同动、植物上的有关工作,提出“折叠的纤维”模型的设想<sup>[1]</sup>,企图用此说明高等真核细胞染色质和染色体的基本结构。

随着定量电镜检查法的应用, DuPraw 和 Bahr 根据人体白细胞和肝细胞染色质的研究指出,染色质是由两种不同程度螺旋卷绕的染色纤维, A 型纤维和 B 型纤维组成。Bahr<sup>[2]</sup>根据人体淋巴细胞第 13—15 组的染色单体的研究,又提出三级重复螺旋的模型。X 光衍射方面的工作也从另一角度提出核组蛋白和染色质的再(重)螺旋模型<sup>[3]</sup>。可是,他们都没有能够提供相关的、有充分说服力的电镜实物照片来证明他们的实验结果。

高等有机体间期核染色质的构型究竟是怎样的?这是我们进行此项工作的主要目的。

## 材料和方法

上海牛奶公司供应的初生小牛新鲜胸腺,

在 4℃ 中,剥除外附脂肪等组织和包膜,剪成碎片后,分别参考 Kleinschmidt 的“一步法”和 Artman 与 Roth 的生化抽提法分离细胞核内的染色质。

**一步法** 取少量剪碎胸腺,在玻璃匀浆管中研磨约半分钟,然后取出匀浆玻棒,迅速插入重蒸馏水中。匀浆玻棒四周所附细胞或细胞核遇水即因低渗作用而破裂,染色质从核膜内释放出来,吸附于水-空气界面的蛋白质单层薄膜上。用外涂石蜡的玻棒轻轻滚压在水面上漂浮的染色质,使其分散。持覆有碳-福尔蒙瓦尔膜的铜网沾取水样品。

**生化抽提法** 取 50 克左右剪碎的胸腺,加 10 倍体积的 1.5% 柠檬酸溶液,在电动破碎器中搅碎 2 分钟(在 80 伏电压下),经锦丝斜纹绸过滤三次后离心(2,000 转/分钟,15 分钟)。沉淀物(粗制细胞核)经上述柠檬酸溶液洗涤一次,再经蔗糖密度梯度离心和 0.05M Tris-HCl、0.15M NaCl, pH 7.5 洗涤两次,使之纯化。最后分别以 0.01M Tris-HCl, pH 8.0 和重蒸馏水破核,并经 30 分钟的离心(17,000 转/分钟),取上清液滴于蜡条上,用覆有碳-福尔蒙瓦尔膜的铜网取样。

从上面两种不同方法分离得到的染色质样品,用同一种方法固定、染色和脱水: 2.5% 戊

\* 电镜工作得到本所四室电镜组同志的大力协助,特此感谢。