

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^[1],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^[2]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^[3]。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。

二醛(pH 7.4)固定,磷酸缓冲液洗涤,1% 磷钨酸和1% 醋酸铀酒精溶液染色,然后经70%、95%、100% 酒精和醋酸戊脂分色和脱水,自然干燥。

实验结果

(一) “一步法”分离的染色质

小牛胸腺间期核的染色质是由许多直径粗细不一,或卷曲,或伸展的纤维组成。在电镜整封样品中,这些纤维任意散布,纵横交叉重叠,呈现为网状。网状结构的疏密度不一,有些部位纤维重叠界限难分,有些部位较分散,一根根纤维清晰可辨。上述形象和染色质在细胞核里的天然状态有关,但也不能排除可能反映样品制备过程中某些操作步骤的影响。这些纤维都是典型的外表不光滑,凹凸不平、多疙瘩或球状结节的染色纤维。卷曲的染色纤维较伸展的染色纤维球状结节更明显,在直径最细的100埃左右的纤维上念珠状结构很清楚(图版II,图1—5)。

在电镜观察下,满视野都是大片的直径100—250埃左右的纤维(图1、图2和图4),在这些纤维网上或附近,可以看到一些直径较粗(约500—1,000埃左右)、电子致密度较高的纤维(图2、图3和图5),和极少量直径更粗(约1,500—2,000埃左右)、电子致密度更高的纤维小段落(图3和图5)。这些染色纤维都是由不同等级粗细的段落交替衔接而成。那就是说,沿着一根染色纤维,直径粗细不等的段落相间排列,直径较粗的纤维段落解开成为直径较细的纤维,后者又往往再缠绕为直径较粗的纤维。相间排列的距离长短不等,短者仅数百埃。直径粗细不等的染色纤维相互转化的图象,有力地证明它们的重螺旋构型。此外,在这些染色纤维上,还可以看到很淡的斜行条痕,在直径1,500—2,000埃左右的染色纤维上,这样的横纹显得比较清楚,而且横纹间的距离差不多相等(图3和图5),这也说明直径粗的染色纤维是由较细的纤维重复螺旋形成。

(二) 生化抽提, 0.01M Tris-HCl (pH

8.0) 破核分离的染色质

参考 Artman 和 Roth^[4] 的生化抽提法制备的小牛胸腺细胞核,经 0.01M Tris-HCl (pH 8.0) 破核分离得到的染色质,在电镜整封样品中,呈现出和用“一步法”分离的染色质几乎完全相同的相貌——典型多球形结节的、直径粗细不一的染色纤维构成的疏密度不一的染色纤维网(图版 III, 图 6—9)。染色纤维的直径范围与电子致密度和用“一步法”制备的样品差不多。所不同的是,这里的染色纤维都是不同程度地卷曲着,没有看到像“一步法”分离的染色质样品中的作直线形伸展的直径 100—250 埃左右的纤维。

经大量样品观察,同样看到直径 100—250 埃左右的纤维最多,500—1,000 埃左右的纤维较少,1,500—2,000 埃左右的纤维更少。这些染色纤维也都是由不同等级粗细的纤维段落交替衔接而成。在直径最细的,即直径约 100 埃左右的染色纤维上,念珠状的结构很清楚,但电子致密度稍差(图 6);随着染色纤维直径的加粗,电子致密度也逐渐增强。图 7 左下方箭头所指处,可见一小段直径约 1,000 埃左右的纤维解开为直径 500 埃左右的纤维,后者又再解开为直径 250 埃左右的和 100 埃左右的纤维;类似的情况在其它各幅照片上也可以看到。这些纤维上的斜行条纹也相当清楚,尤其是图 9 右下方有一小段直径约 1,500 埃的纤维(箭头所指处),使人一望即知它是由较细纤维螺旋卷绕形成。上述实验结果进一步以实物真像证明染色质是 DNA、组蛋白和非组蛋白蛋白等组成成分的不同水平重螺旋包扎产物。

(三) 生化抽提,重蒸馏水破核分离的染色质

参考 Artman 和 Roth 方法制备的小牛胸腺细胞核,如果用重蒸馏水破核,分离得到染色质,在电镜观察下,呈现出和用“一步法”分离的染色质相同的图像——典型多结节的、直径粗细不一的、或卷曲或伸展的染色纤维构成的疏密度不一的染色纤维网。它们的直径范围、电子致密度高低、纤维上的斜行条纹,以及直径不

同粗细染色纤维间的转化情况,都和前两组用不同方法制备的小牛胸腺天然染色质上所具情况一般无二;这又进一步为染色质的重螺旋构型提出了明证。在直径约 100 埃左右的卷曲的细纤维上念珠状结构同样也很清楚(照片不再重复刊载)。

从小牛胸腺天然染色质的电镜观察,我们不仅提供足以阐明染色质重螺旋结构的实物照片,而且看到哺乳动物间期核的染色质是由直径约 100—2,000 埃左右粗细不等的染色纤维段落相间衔接组成。

讨 论

Pardon 等根据核组蛋白和染色质的 X 光衍射工作,曾提出它们的重螺旋模型。DuPraw 和 Bahr 按人体白细胞和肝细胞间期核染色质的定量电镜工作又指出,染色纤维 DNA 的包扎率是 56:1,染色质是由两种不同直径粗细的 B 型纤维和 A 型纤维组成, A 纤维是由 DNA 分子的双股螺旋和组蛋白、非组蛋白蛋白等相互结合成螺旋缠绕形成,直径约 50—110 埃, B 纤维是由 A 纤维进一步地螺旋缠绕形成,直径为 200—500 埃,最常见的纤维直径为 230 埃左右。1970 年, Bahr 按人体淋巴细胞第 13—15 组染色体的染色单体的测定, DNA 分子的长度和染色纤维长度的比值是 150:1, DNA 双股链至少必须相继重复螺旋三次,才能符合此数据。1969 年, DuPraw 和 Bahr 曾提供了三张电镜照片; 1970 年, Bahr 没有提供有关的照片。我们在小牛胸腺染色质的电镜观察中,看到了染色质的重螺旋结构,并以大量的实物照片阐明了高等哺乳动物间期核染色质的重螺旋构型。这些实验结果支持 Pardon、DuPraw 和 Bahr、Bahr 等提出的关于染色质重螺旋结构的模型;不过,我们看到的染色质不仅是由 A 纤维和 B 纤维两种纤维组成,也不仅是由 DNA 的二重螺旋形成。

通过对大量样品的分析和观察,我们看到小牛胸腺间期核的染色质是由直径 100—2,000 埃左右的染色纤维段落相互衔接组成。根据这些染色纤维段落电子致密度的高低、直径的粗

细和互相转化的情况,它们至少可以被分为六个等级,它们的直径粗细范畴大概分别为 100 埃、250 埃、500 埃、1,000 埃、1,500 埃和 2,200 埃左右。较常见到的染色纤维,除直径 250 埃左右的以外,还有 100 埃左右的。虽然,直径 500 埃以上的染色纤维段落较少,直径 1,500 埃以上的纤维段落更少,段落也很短;但是,它们都是组成染色质的染色纤维的一个部分。各种不同直径粗细的染色纤维交替排列,相互转化。

有比较才能有鉴别。我们同时采用三种不同方法分离小牛胸腺染色质,所得结果基本相同——它们都是由不同水平螺旋包扎的、有球状结节的染色纤维组成,各级纤维的形态结构与直径粗细也几乎都一样。至于在“一步法”分离的染色质中,和生化抽提经重蒸馏水破核分离的染色质中看到,而在生化抽提经 0.01M Tris-HCl (pH 8.0) 破核分离的染色质中没有看到伸展着的染色纤维,大概是因不同离子强度引起的。

小牛胸腺 DNA 和总组蛋白,如按其天然染色质中相似的比值,重新组合形成核组蛋白,在电镜观察下,也呈现重螺旋构型,与天然染色质相似^[5]。小牛胸腺 DNA、总组蛋白和非组蛋白蛋白的重组实验结果也一样。

高等生物的染色质既然是由 DNA、组蛋白和非组蛋白蛋白等组成成分的不同水平的螺旋缠绕形成,纤维本身粗细并不均匀,有些段落较细,有些段落较粗;如果忽视这一事实,仅仅笼统地依据染色纤维直径的微小差别,来区分不同种族或不同组织细胞核中的染色质,就没有什么意义。

最近, Kornberg 又提出了有关真核细胞染色质的念珠状模型,念珠状亚单位的直径约 70 埃。Oudet 等在选择性抽提去富赖氨酸组蛋白 f_1 的鸡肝染色质的电镜观察中,看到了上述念珠状的结构,经 2% 醋酸铀水溶液染色和铂投影制备的样品中,念珠状亚单位的直径为 130 埃左右。我们用磷钨酸和醋酸铀染色,未经投影的小牛胸腺天然染色质一级纤维是具有许多球形小结节的纤维,球形结节处的直径为 100

埃左右(见图版 II, 图 4 和图版 III, 图 6), 这和 Kornberg 与 Oudet 等的工作结果基本相符。可见, 一级纤维是高等真核细胞染色质的结构单位, 而在间期核中, 染色质是由这些基本结构的不同水平的重螺旋缠绕构成。

处于细胞分裂间期的细胞核, DNA 和 RNA 的合成都很旺盛。根据电镜放射自显影术的研究, 一般都看到在较细的、分散的染色质(所谓的常染色质)中同位素标记的 DNA 和 RNA 前身物掺入较活跃; 在包扎较紧的、凝结的染色质(所谓的异染色质)中掺入则很少或较迟缓。另外, Walker 曾经指出, 接近核膜表面的异染色质团块中的 DNA 具有许多重复顺序, 重复顺序可能与染色纤维的包扎模式有关。我们在小牛胸腺天然染色质的电镜观察中, 至少已经分辨出有六种不同粗细的染色纤维, 随着

纤维螺旋缠绕、再缠绕的变化, 随着纤维包扎水平的递增, 可能将导致染色质模板活力的变化, 这个变化的关键究竟在哪里? 这些不同水平的螺旋包扎是由什么因子控制的? 这些不同水平的重螺旋构型和常染色质、异染色质以及 DNA 重复顺序的关系又是如何? 这将都是有待今后研究的问题。

主要参考资料

- [1] DuPraw, E. J.: *Nature*, **206**, 338, 1965.
- [2] Bahr, G. F.: *Exper. Cell Res.*, **62**, 39, 1970.
- [3] Pardon, J. F. & Wilkins M. H. F.: *J. Mol. Biol.*, **68**, 115, 1972.
- [4] Artman, M. & Roth J. S.: *J. Mol. Biol.*, **60**, 291, 1971.
- [5] 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。

[本文于 1977 年 4 月 11 日收到]

重组小牛胸腺核组蛋白的初步研究*

上海实验生物研究所三室细胞研究组

将遗传信息从一个世代传递到另一个世代, 并对活细胞的复杂功能进行控制的基因, 均由 DNA 构成, 这早已是人们普遍接受的概念。但是, 从原核细胞裸露的 DNA 纤维, 发展到真核细胞 DNA 同组蛋白、非组蛋白蛋白及少量 RNA 紧紧包扎而成的染色体, 这一飞跃的奥秘还远未揭开。近年来, 随着分子生物学的发展, 组蛋白、非组蛋白蛋白以及 RNA 如何维持染色体的复杂结构, 并如何对基因活性进行调节控制的研究, 已日益成为现代生物学中最富挑战性的课题之一。

探索 DNA 同组蛋白各组分的相互作用及其复合物的理化、生物学性质, 是研究染色体结构和功能的一个重要方面。而由于近年来在纯化组蛋白各组分及其氨基酸顺序测定方面的进展, 已使核组蛋白或染色质的重组成为这类研究的有效手段之一。

DNA 和组蛋白重组时的相互作用, 是一个

极为复杂的问题。这类研究的一个主要障碍, 在于最佳 DNA-组蛋白复合物的制备。组蛋白同 DNA 在低盐浓度条件下混合时, 形成的复合物可溶性甚差。如果组蛋白先在高盐浓度条件下与 DNA 混合, 然后通过梯度透析逐步降低盐浓度, 则组蛋白同 DNA 重新组合而成的复合物可溶性较好, 同天然染色质更为接近。

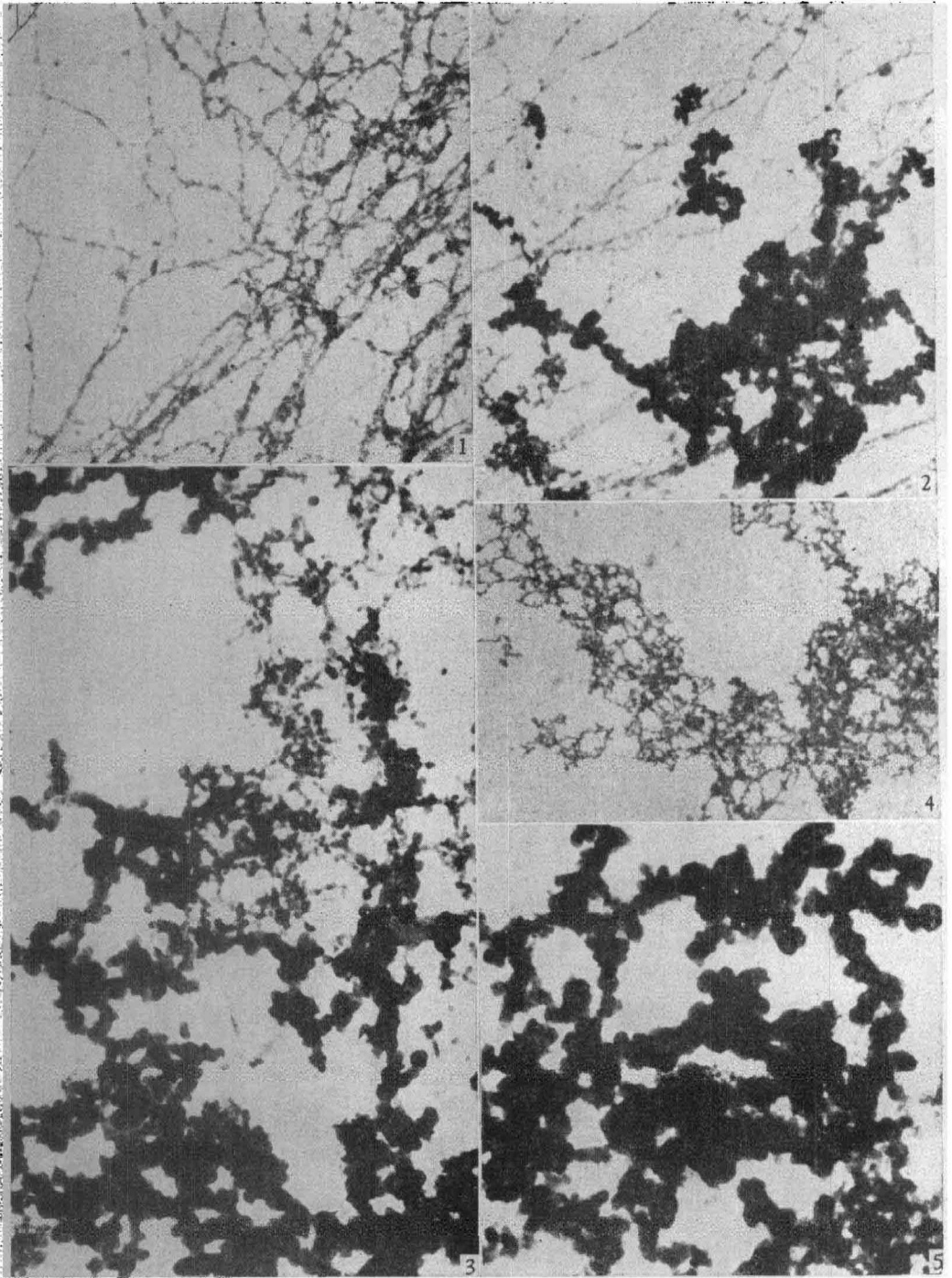
在本工作中, 我们采用梯度透析法, 使小牛胸腺 DNA 同小牛胸腺总组蛋白, 在不同比例条件下重组。然后, 通过光密度测定, 横板活力测定, 热变性熔化温度测定和电子显微镜观察, 对重组复合物作一初步研究。

材料和方法

材料

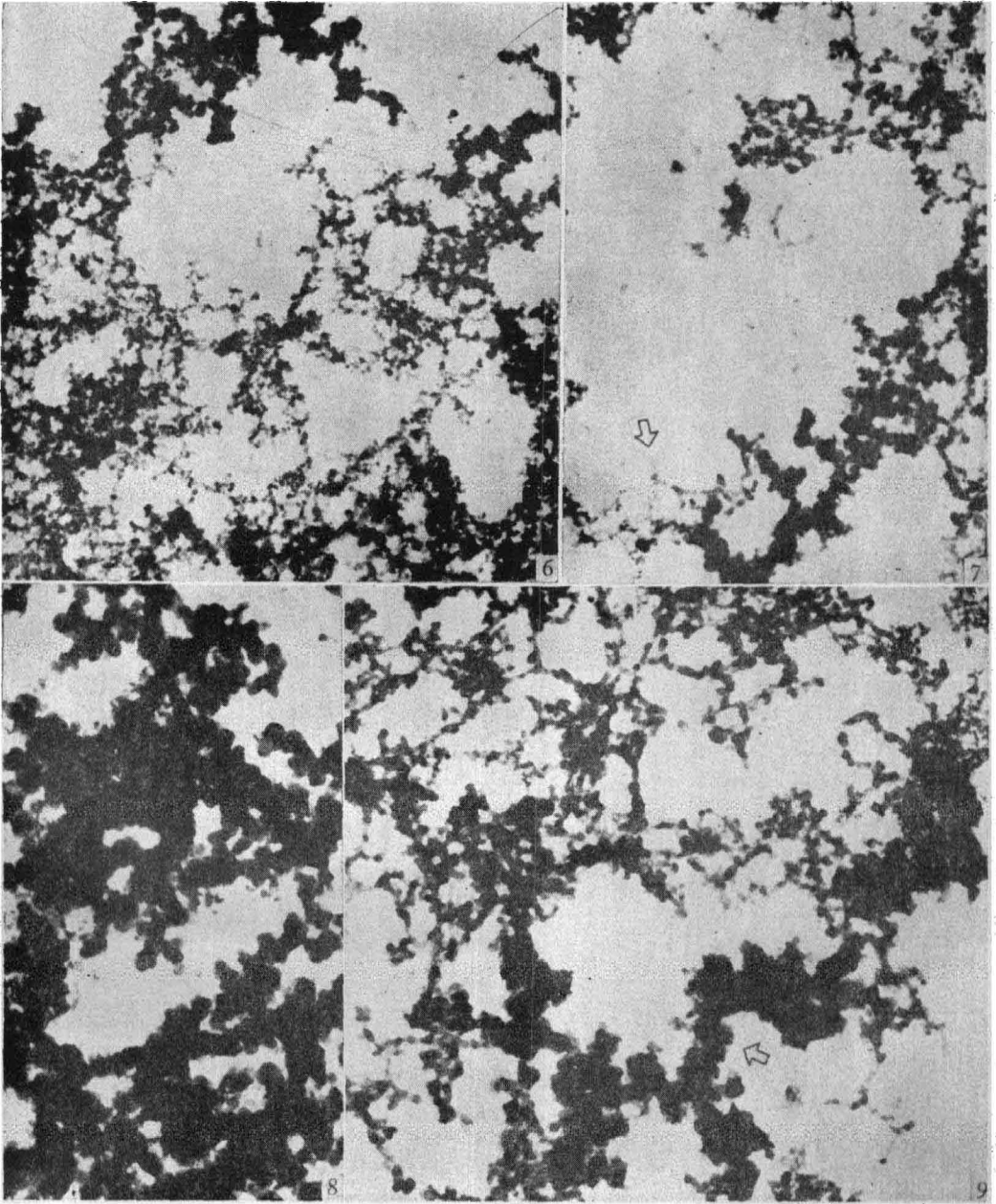
关于小牛胸腺 DNA 的制备、组蛋白的制

* 电镜工作得到本所四室电镜组同志的大力协助, 特此感谢。



用“一步法”分离的小牛胸腺染色质 $\times 40,000$

- 图 1 分散的、作直线形伸展的染色纤维,主要由直径 $100-250 \text{ \AA}$ 左右的纤维段落组成
- 图 2 在分散的染色纤维网上,有一小片较粗的染色纤维,主要由直径 $250-1,500 \text{ \AA}$ 左右的纤维段落组成
- 图 3 一小片较粗的染色纤维,主要由直径 $250-2,000 \text{ \AA}$ 左右的纤维段落组成
- 图 4 卷曲的染色纤维,主要由 $100-250 \text{ \AA}$ 左右的纤维段落组成。在直径 100 \AA 左右的纤维上,可以看到念珠状的结构
- 图 5 一小片较粗的染色纤维,主要由直径 $1,000-2,000 \text{ \AA}$ 左右的纤维组成,直径 $1,500 \text{ \AA}$ 以上的纤维段落比图 3 中所见稍长



生化抽提, 0.01M Tris—HCl (pH 8.0) 破核分离的小牛胸腺染色质 $\times 40,000$

- 图 6 分散的染色纤维, 主要由直径 $100-1,000 \text{ \AA}$ 左右的纤维组成, 排列成网状。直径 100 \AA 左右的纤维段落上, 念珠状结构很清楚; 直径不同粗细的纤维段落间的转化也很清楚
- 图 7 直径 $100-1,000 \text{ \AA}$ 左右的染色纤维, 在照片下方箭头所指处, 明显地看到不同水平螺旋缠绕的染色纤维段落相互转化的情况, 有力地证明它们的重螺旋结构
- 图 8 小片幅较粗的染色纤维, 主要由直径 $500-1,500 \text{ \AA}$ 左右的纤维段落组成
- 图 9 一小片较粗的染色纤维, 主要由 $250-2,000 \text{ \AA}$ 左右的纤维组成。照片下方有一小段直径 $1,500 \text{ \AA}$ 左右的纤维(箭头所指处), 螺旋构型特别清楚