

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。

备以及 DNA 依赖的 RNA 聚合酶的制备都另有报告^[2-3]。

化学分析

DNA、RNA 和蛋白质，分别按 Burton^[4]、Schjeide^[5] 和 Lowry^[6] 方法测定。总组蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析，按 Panyim^[7] 的方法进行。

小牛胸腺重组核组蛋白的制备

称取一定量的小牛胸腺 DNA 和总组蛋白，分别溶于 2M NaCl、5M 尿素、0.01M Tris-HCl (pH 8.3) 溶液中，使其最后浓度分别为 2 毫克/毫升和 4 毫克/毫升。重组时，按 0:1、0.5:1、1:1、1.2:1、1.5:1、2:1 等六种不同的组蛋白/DNA 比例，将两溶液混合。用 2M NaCl、5M 尿素、0.01M Tris-HCl (pH 8.3) 溶液补足，使最后体积均为 2 毫升。然后，装透析袋，依次对 100 倍体积的下述一系列溶液透析：2M NaCl、5M 尿素、0.01M Tris-HCl (pH 8.3) 溶液，6 小时；0.6M NaCl、5M 尿素、0.01M Tris-HCl (pH 8.3) 溶液，过夜；0.4M NaCl、5M 尿素、0.01M Tris-HCl (pH 8.3) 溶液，4 小时；0.15M NaCl、5M 尿素、0.01M Tris-HCl (pH 8.3) 溶液，4 小时。最后，再对 0.15M NaCl、0.01M Tris-HCl (pH 8.3) 溶液透析过夜，以除去尿素。

各透析后的溶液，分别用 0.15M NaCl、0.01M Tris-HCl (pH 8.3) 溶液补足至 3 毫升。于 17,000 转/分钟离心 20 分钟，测定上清液光密度、模板活力，并取样作电镜观察。沉淀用 0.04M Tris-HCl (pH 7.9) 3 毫升悬浮后，取样测定模板活力。余物再经 2,000 转/分钟离心 10 分钟，取上清液作为电镜观察的样品。最后的沉淀用于热变性熔化温度的测定。

模板活力的测定

DNA-组蛋白重组复合物的模板活力，通过测定标记核苷三磷酸于 15 分钟温浴过程内参入酸不溶性部分的量来加以确定。温育混合物的总体积为 0.5 毫升，内含 0.04M Tris-HCl (pH 7.9)；0.01M MgCl₂；0.1mM EDTA；0.1mM β-巯基乙醇；0.15M KCl；0.5 毫克/毫升的牛血

清白蛋白；0.8mM K₂HPO₄；0.15mM UTP、GTP、CTP 和 ¹⁴C-ATP；0.1 毫升 RNA 聚合酶以及 0.1 毫升待测之重组样品。上述反应系统于 37°C 温浴 15 分钟后，立即取出，置冰浴中终止反应。取 0.05 毫升反应物滴在 Whatman No. 3 滤纸上，先用 10% TCA 加 0.01M 焦磷酸钠洗涤 5 次，然后用 5% TCA 加 0.01M 焦磷酸钠洗涤 5 次，再用 95% 乙醇洗涤 3 次，最后用无水乙醚洗涤 1 次，烘干后作液体闪烁计数测定。

热变性熔点温度 (T_m) 的测定

DNA-组蛋白重组复合物的熔点(T_m)，是在 Unicam SP 700 紫外分光光度计的熔点测定装置上测定的。将重组样品溶于 0.001M Na(CH₃)₂AsO₂ (pH 7.0) 溶液，调节浓度，使 260 毫微米的光密度在 0.5—1.0 范围内。注入比色杯，加盖，按 1 度/1 分钟的升温速度加热，同时记录波长 260 毫微米处的光密度变化曲线。增值 1/2 处的温度，即为每个转化的熔点温度(T_m)。

电镜样品的制备

制片采用悬滴法，用碳-福尔蒙瓦尔膜的铜网取样。然后用戊二醛 (pH 7.4) 固定 10 秒钟，磷酸缓冲液 (pH 7.4) 洗涤，1% 磷钨酸和 1% 醋酸铀酒精溶液各染色 1 分钟，70%、95%、100% 酒精和醋酸戊脂分色、脱色，最后自然干燥。

由于喷碳的福尔蒙瓦尔膜较厚，影响 DNA 或未组合好的核组蛋白纤维的观察，我们又按 Gordon 和 Kleinschmidt 的方法^[8]，用载有福尔蒙瓦尔膜的铜网取样，醋酸铀-甲醇-丙酮溶液染色 30 秒钟，然后经 100% 酒精分色、脱水，自然干燥，以资补充。

实验结果

不同组蛋白/DNA 比例条件下组蛋白沉淀 DNA 能力的观察

我们通过各重组物上清液 260 毫微米光密度的测定，对不同组蛋白/DNA 条件下，组蛋白沉淀 DNA 的能力进行了比较。表 1 所列之结果说明，组蛋白沉淀 DNA 的能力，开始随组蛋

白/DNA 比例上升而增高, 至 1.2:1 时沉淀值不再增加。当比例升至 2:1 时, 组蛋白沉淀 DNA 的能力反而有所下降(见表 1, 以及图 1)。

表 1 不同组蛋白/DNA 条件下上清液 DNA 的光密度

项 目	重组起始物组蛋白/DNA 比例					
	0:1	0.5:1	1:1	1.2:1	1.5:1	2:1
光密度 260 毫微米	6.8	1.23	0.22	0.17	0.17	0.22
DNA 被沉淀 (%)	0	81.9	96.77	97.5	97.5	96.77

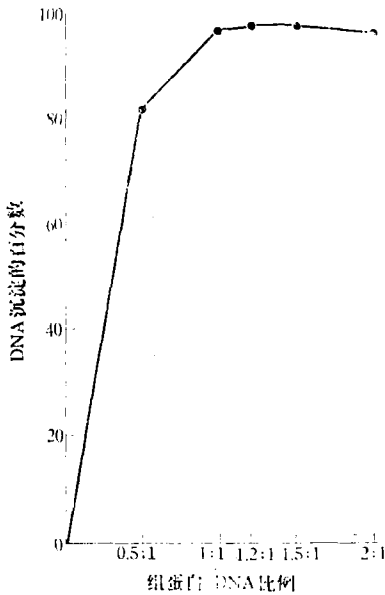


图 1 不同组蛋白/DNA 比例条件下的沉淀曲线

不同的组蛋白/DNA 比例对于重组核组蛋白模板活力的影响

不同比例的 DNA-组蛋白, 通过梯度透析重组后, 我们分上清液和沉淀两组, 分别取样, 测定了各样品的模板活力。从表 2 的结果可以看出, 无论上清液或沉淀, 其模板活力抑制曲线的走向均与组蛋白沉淀 DNA 的曲线相似。模板活力的抑制程度, 同样随组蛋白/DNA 比例上升而增高, 至 1.2:1 时达到最高水平, 而后又有所下降(见表 2, 以及图 2)。

不同的组蛋白/DNA 比例对熔点的影响

随着 DNA 的热变性过程, 其氢键破坏, 双链解开, 从而使碱基暴露, 引起紫外吸收的明显增加, 称之为增色效应。从熔点温度和增色效

表 2 不同组蛋白/DNA 条件下, 上清液和沉淀的模板活力

组别	项目	重组起始物组蛋白/DNA 比例					
		0:1	0.5:1	1:1	1.2:1	1.5:1	2:1
上清液	模板活力 (cpm)	2680	640	360	10	80	150
	活力抑制 (%)	0	76.1	86.6	99.6	97.1	94.4
沉淀	模板活力 (cpm)	2680	580	390	200	311	680
	活力抑制 (%)	0	78.4	85.4	92.5	88.4	74.6

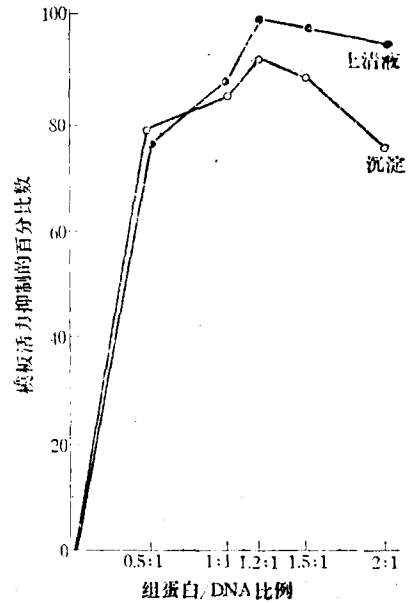


图 2 不同组蛋白/DNA 比例条件下模板活力的抑制曲线

应可以判明 DNA 分子内 G + C 的比例和核组蛋白中裸露 DNA 的比例。我们测定了 DNA 及重组核组蛋白的熔化曲线, 如图 3 所示。纯 DNA 的熔点温度为 55.5°C, 与组蛋白结合后形成的核组蛋白熔点升高到 81°C。组蛋白/DNA 比例为 0.5:1 和 1:1 时, 熔化曲线呈双相变化, 说明 DNA 分子中尚有部分未与组蛋白结合, 此部分 DNA 的熔点与纯 DNA 相同。当比例升至 1.5 或以上时, 其熔化曲线与染色质的熔化曲线相似, 呈单相的熔点变化。这些结果与 Shih 和 Bonner 的报道相符。

对以不同组蛋白/DNA 比例重组的核组蛋白的电镜观察

(1) 重组复合物的上清液 当组蛋白/

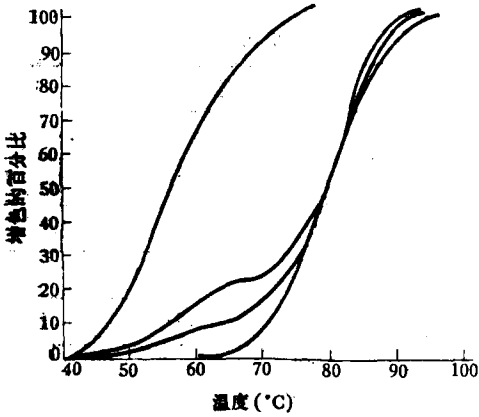


图3 DNA和重组的核组蛋白的熔化温度曲线

DNA比例为0.5:1时,其比值低于天然染色质。视野中,重组的核组蛋白纤维很少,一般为直径小于500埃的小片段的纤维,并可看到大量裸露的DNA以及与组蛋白未完全结合好的DNA纤维。有时也能看到由不同粗细的核组蛋白纤维组成的较大片幅的纤维。偶尔还能找到直径达500埃以上,甚至2,000埃以上的小段落的核组蛋白纤维(图版VI,图1—2)。

当组蛋白/DNA比例为1:1时,其比值近似天然染色质。重组的核组蛋白纤维的量显著增加,而裸露DNA以及与组蛋白未完全结合好的DNA纤维则相应减少。最常见的纤维直径为100—250埃,最粗的可达2,000埃以上。在这些纤维中,结节相互联接,并表现出斜行条纹。同时,在一定长度的核组蛋白纤维中,可以看到不同粗细的纤维交叉衔接,反映了它们相互转化的状态,也反映了它们的重螺旋构型(图版VI,图3—4)。

当组蛋白/DNA比例为1.2:1时,其比值与天然染色质相仿。重组的核组蛋白纤维的粗细、形态以及相互转化的状况均与组蛋白/DNA比例1:1时相似,唯直径在500埃以上的片段增多,粗纤维上的斜行条纹更为清楚,而裸露的DNA已几乎不复可寻(图版VII,图5—7)。

当组蛋白/DNA比例为1.5:1和2:1时,与天然染色质相比,组蛋白已经过量。但重组核组蛋白纤维的概貌与上基本相同(图版VII,图8;图版VIII,图9—12)。

(2) 重组复合物的沉淀 在组蛋白/DNA比例分别为0.5:1, 1:1, 1.2:1, 1.5:1, 和2:1的各組沉淀中,电镜所见与各相应上清液相类似。略有不同的是,直径在100埃以下的细纤维段落(裸露的DNA和未完全结合的核组蛋白)较多,甚至在组蛋白/DNA比例为1.5:1时,仍能找到。

综上所述,重组虽无非组蛋白参加,但重核组蛋白的电镜相貌与天然染色质相似^[9],均由不同粗细的核组蛋白纤维交替衔接而成,并且清晰的斜行条纹显示了不同程度的重螺旋构型。重组核组蛋白纤维的这些结构特征与天然染色质相似。

讨 论

1. 组蛋白作为一种结构蛋白,在维持真核细胞染色质结构方面所显示的独特作用,迄今已有大量的报道。最近,在染色质亚单位和染色质结构模型研究方面的进展,则更进一步提供了有力的证据。我们的初步实验结果表明,重组的小牛胸腺核组蛋白,同天然染色质相似,呈现典型的热变性熔化曲线和重螺旋结构的电镜图象。这也是对组蛋白结构作用的一种支持。

Paul和More的重组实验,虽然也对不同组蛋白/DNA比例的重组复合物的模板活力,磷酸根含量及电镜图象作了粗略的分析,但是他们对重组复合物的电镜图象未从重螺旋结构的角度作分析,故难以从他们所提供的电镜照片说明核组蛋白纤维的重螺旋构型。

2. 我们对不同组蛋白/DNA比例的重组核组蛋白进行的模板活力测定,同文献报道一致,说明组蛋白不仅是一种结构蛋白,而且在染色质DNA模板活力的抑制方面,起着关键性的作用。

我们在重组实验中注意到,在1.5:1前,随组蛋白/DNA比例升高,重组的核组蛋白纤维变粗,逐步出现呈斜行条纹的重螺旋结构。此时,溶液中的DNA随着被组蛋白沉淀而逐渐减少,模板活力也随之下降到较低的水平。有趣的是,DNA沉淀曲线的走向,同模板活力抑

制曲线相似。而且, DNA 沉淀最多和模板活力抑制最大以及结构上重螺旋的完整, 均出现在同天然染色质相类似的组蛋白/DNA 比例上。其间是否存在某种因果关系, 还值得深入探索。

我们还注意到, 当组蛋白/DNA 比例升至 2:1 时, DNA 沉淀反而稍有减少; 而模板活力在组蛋白/DNA 比例为 1.5:1 和 2:1 时, 也出现了回升的现象。Hoare 和 Johns 有过类似的报道^[10]。他们发现, 加入过量的组蛋白, 使 DNA-组蛋白复合物重新溶解, 模板活力反而升高。至于这种回升的机制, 是否同组蛋白的自身聚合有关, 也还有待实验判明。

3. 关于小牛胸腺染色质的组蛋白/DNA 比值, Shih 和 Bonner 曾报道为 1:1^[11], 而本实验室的染色质组分分析结果为 1.23:1。从上述重组实验的结果来看, DNA 沉淀最多和模板活力抑制最大, 均出现在 1.2:1 这个组蛋白/DNA 比值上。而且, 在模板活力抑制曲线的 1.2:1 处,

可以看到明显的跃过。这种一致性, 是对本实验室染色质组分分析结果的进一步支持。

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] 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》, 待发表。
- [3] 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》, 待发表。
- [4] Burton, K.: *Biochem. J.*, **62**, 315, 1956.
- [5] Schjeide, O. A.: *Anal. Biochem.*, **27**, 473, 1969.
- [6] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.* **193**, 265, 1951.
- [7] Panyim, S. & Chalkley, R.: *A. B. B.*, **130**, 337, 1969.
- [8] Gordon, C. N. & Kleinschmidt, A. K.: *B. B. A.*, **155**, 305, 1968.
- [9] 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。
- [10] Hoare, T. A. & Johns, E. W.: *B. B. A.*, **247**, 408, 1971.
- [11] Shih, T. Y. & Bonner, J.: *B. B. A.*, **182**, 30, 1969.

[本文于 1977 年 4 月 11 日收到]

γ 射线照射后对小白鼠外周血中 淋巴细胞卫星核的观察

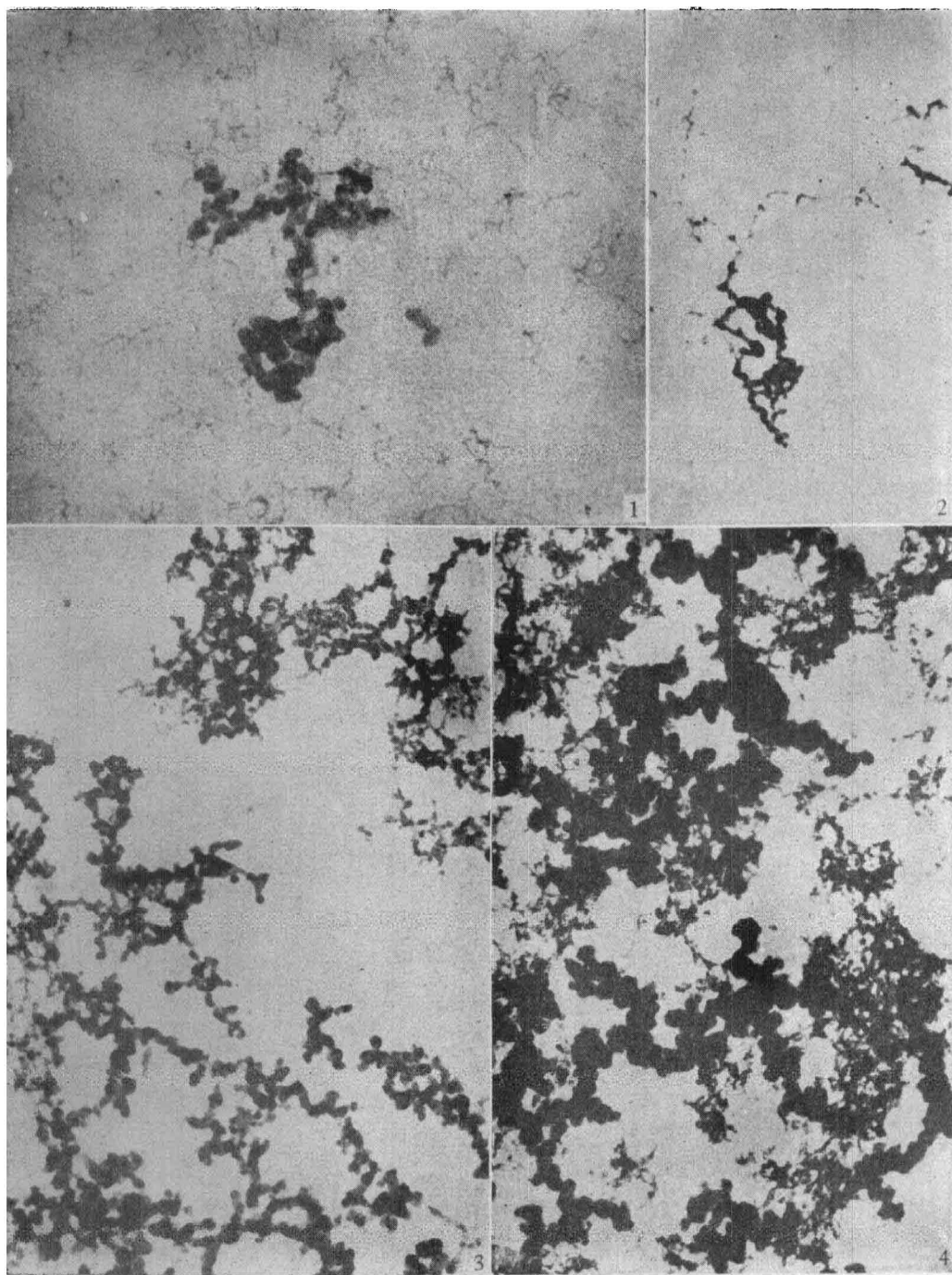
萧佩新 杨恩普 田成惠

(河北放射医学研究所·河北新医大学放射医学教研组)

通过对细胞形态学方面的多年观察, 证明淋巴细胞是对射线最敏感的细胞之一。机体受电离辐射照射后, 淋巴细胞的改变出现很早, 而且显著, 可直接从外周血中检查出来。因此, 依据淋巴细胞的变化作为诊断射线损伤的指标, 具有一定的优越性。

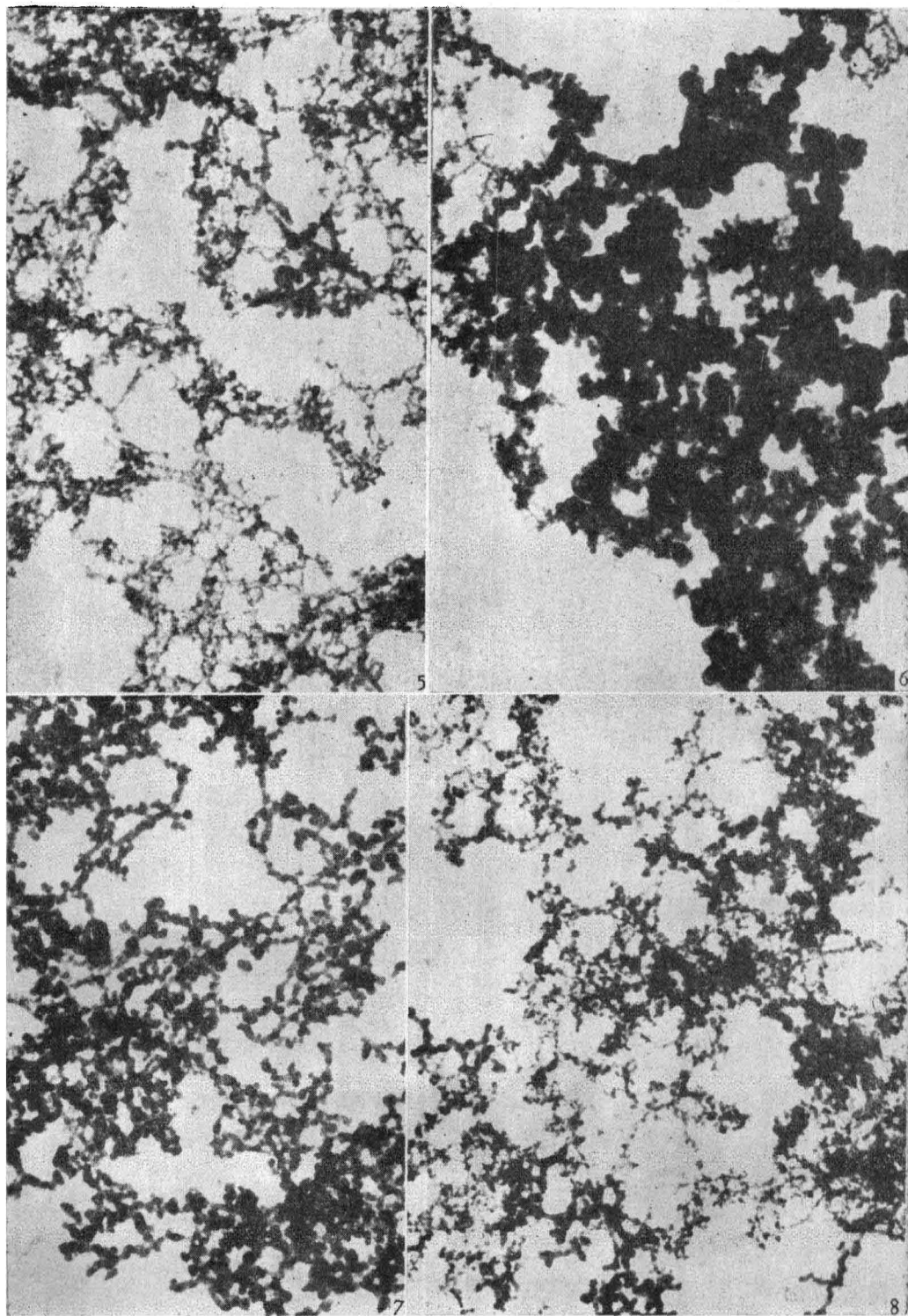
虽然过去对射线照射所致的淋巴细胞变化曾进行了广泛的研究, 但大都是一般变化的观察, 对淋巴细胞的特殊形态改变观察较少。有

人报道在照射后的外周血中出现双叶核淋巴细胞增多现象, 并将其视为射线损伤的血象特征^[1,2]。后来有人对双叶核淋巴细胞的意义提出怀疑, 因为它的出现率不受射线照射的影响^[3]。近些年来, 有些研究者应用遗传学方法, 分析照射后离体培养的淋巴细胞染色体畸变^[2,13], 表明此法对诊断射线损伤确是灵敏而可靠的指标。但操作复杂, 条件严格, 实验时间长, 目前难以推广。与此同时, 有些研究者直接观察照射后淋



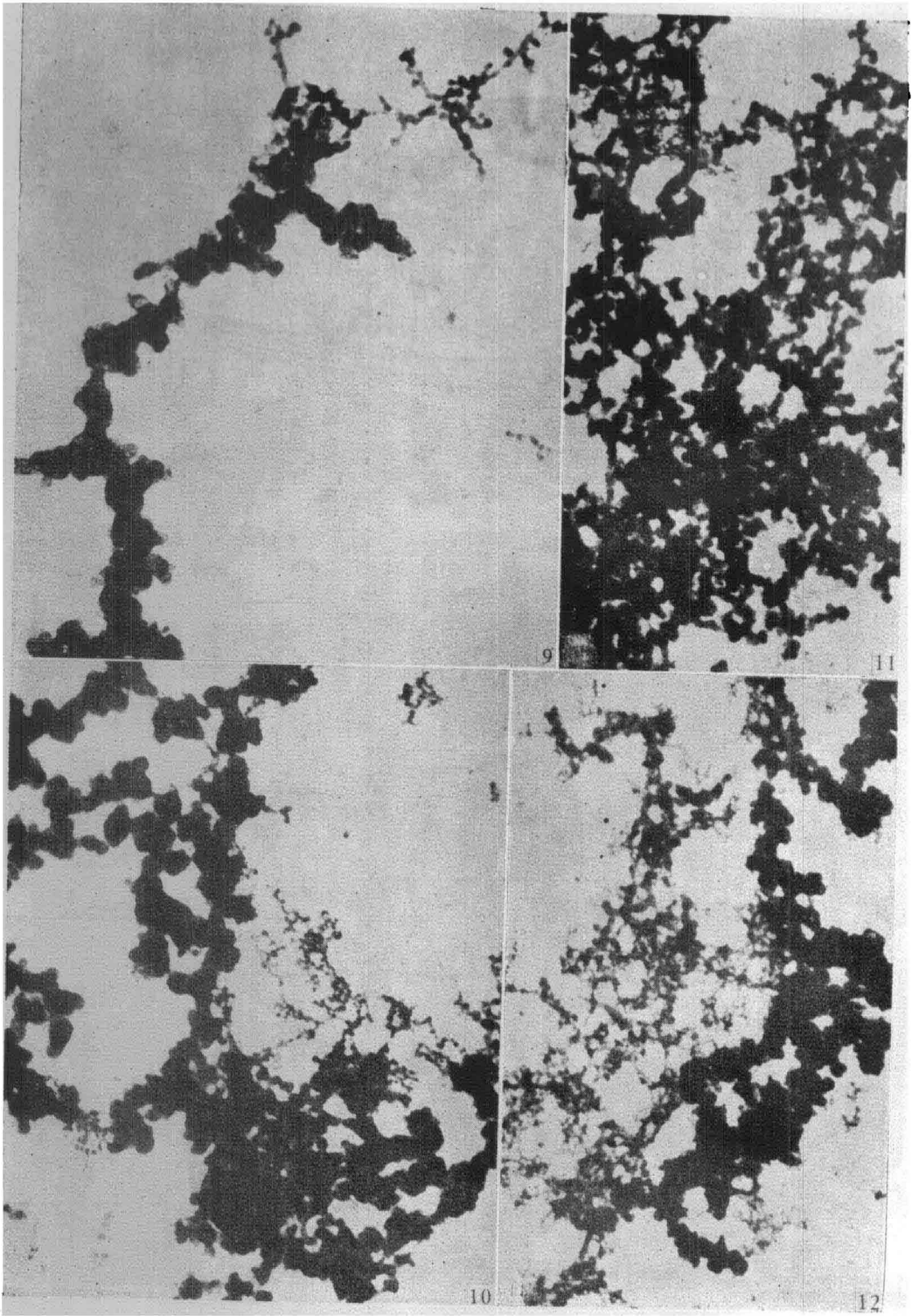
重组的核组蛋白上清液

- 图 1 组蛋白: DNA = 0.5:1 ($\times 40,000$)
- 图 2 组蛋白: DNA = 0.5:1 ($\times 36,000$)
- 图 3 组蛋白: DNA = 1:1 ($\times 40,000$)
- 图 4 组蛋白: DNA = 1:1 ($\times 40,000$)



重組的核組蛋白上清液

- 图 5 组蛋白: DNA = 1.2:1 ($\times 40,000$)
- 图 6 组蛋白: DNA = 1.2:1 ($\times 40,000$)
- 图 7 组蛋白: DNA = 1.2:1 ($\times 40,000$)
- 图 8 组蛋白: DNA = 1.5:1 ($\times 40,000$)



重組的核組蛋白上清液

- 图 9 组蛋白: DNA = 1.5:1 ($\times 40,000$)
- 图 10 组蛋白: DNA = 1.5:1 ($\times 36,000$)
- 图 11 组蛋白: DNA = 2:1 ($\times 36,000$)
- 图 12 组蛋白: DNA = 2:1 ($\times 36,000$)