

组蛋白的紫外吸收光谱分析

上海实验生物研究所三室细胞研究组

组蛋白是组成真核细胞染色体的一类碱性蛋白质,主要成份有五种^[1],具有维持染色体结构和控制DNA活力表现等重要的生物学功能。近年来,已有许多完善的组蛋白的分离分析工作,在鉴别方面有聚丙烯酰胺凝胶电泳,柱层析分离,以及氨基酸残基的组成及序列分析等。Kirschenbaum 汇集的蛋白质光谱图集^[1],仅有组蛋白的一个组份 F_1 的光谱; Johns 曾对组蛋白各组份进行了光谱描述^[2],但未有深入的分析。本文就组蛋白各组份的紫外吸收光谱,着重分析其共同性和特异性,发现此特异性与各组份的碱性氨基酸的含量有相关性。

材 料 和 方 法

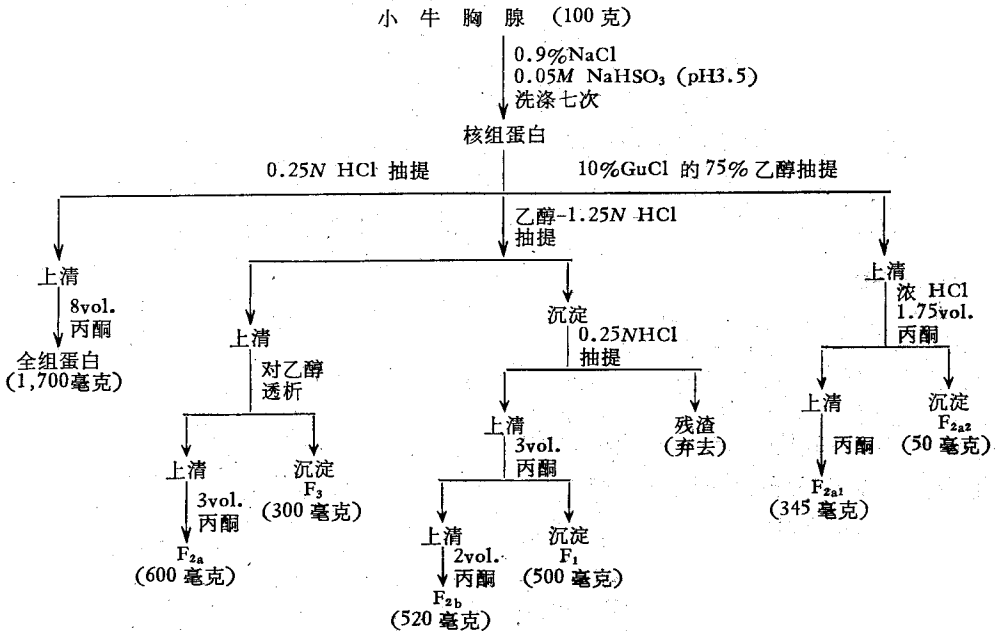
材料

新鲜小牛胸腺取材于上海市牛奶公司屠宰场。

方法

所有分离提纯操作均在 0° — 4°C 条件下进行。

核组蛋白、全组蛋白和组蛋白各组份的分离提纯,基本上参照 Johns 的方法^[3],略有改进,分离步骤图示如下:



定性和定量测定

- (1) DNA 定量测定按 Burton 法进行^[4]。
- (2) RNA 定量以 Orcinol 反应测定之^[5]。
- (3) 蛋白质定量按 Lowry 法进行^[6]。
- (4) 聚丙烯酰胺凝胶电泳按 Panyim 和

Chalkley 法进行^[7],胶的浓度为 15%,电泳时间两小时。

1) 本实验采用 Johns 和 Butler 的组蛋白分类系统,即分成 F_1 , F_{2a1} , F_{2a2} , F_{2b} 和 F_3 ,此工作在 1973 年进行。

(5) 组蛋白的光谱吸收分析, 用 Unicam SP700 分光光度计进行紫外扫描记录。

结果和讨论

本实验分离全组蛋白和组蛋白各组份的方法,基本上参照 Johns等人的一系列分离提纯技术,但有所改进。在分离核组蛋白时,除用生理盐水外,加入蛋白酶抑制剂——亚硫酸氢钠^[8],由此抑制了核内蛋白酶的活性,防止了组蛋白的降解,提高了组蛋白的纯度。同时在抽提全组蛋白时,把盐酸抽提时间从十几小时缩短为半小时,排除了非组蛋白的混杂,实验证明半小时抽提已足够,以后虽重复抽提,所得蛋白量极微。聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱和定量结果表明,全组蛋白五种组份齐全,占总抽提量的 98% 以上(图 1)。

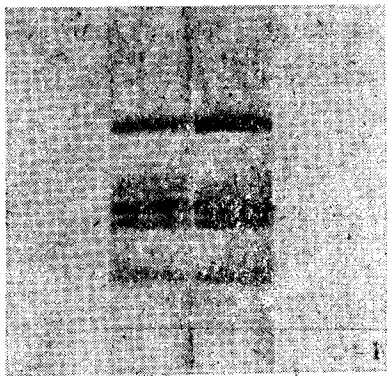


图 1 全组蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱
右边为全组蛋白经 0.7M 巯基乙醇温育处理 3 小时后组蛋白 F₃ 的还原,从上而下: F_{2a1}、F_{2a2}、F_{2b} F₃、F₁

Senshu 和 Iwai 亦采用 Johns 方法分离组蛋白各组份,从羧甲基纤维素柱层析后电泳鉴定说明,F₁中含有多量的 F₃和 F_{2b},F_{2b}中含 F_{2a2}和 F_{2a1},F₃成份更复杂,含 F₁、F_{2a2}和 F_{2b},相互交叉污染比较严重。本实验结合 Johns 和 Oliver 方法^[8]分离的各组份中,除 F₃含有少量 F_{2b}外,其余组份在电泳图谱上都呈单一的带,交叉污染很少(图 2,图谱中未说明 F₃)。测定 DNA 和 RNA 的污染,都在 0.5% 以下,在误差范围之内。

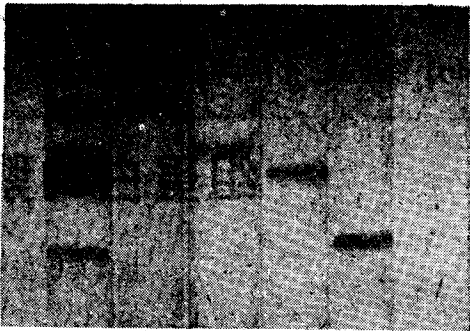
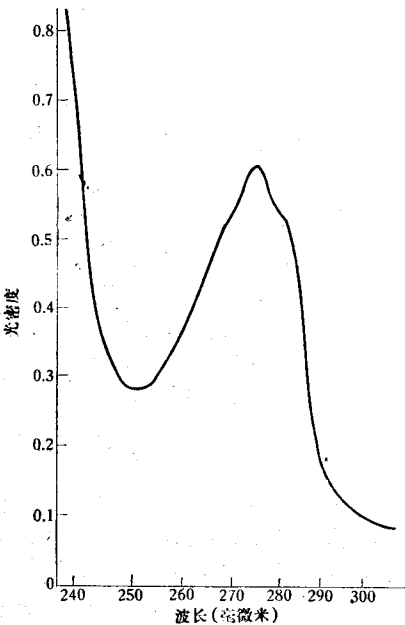
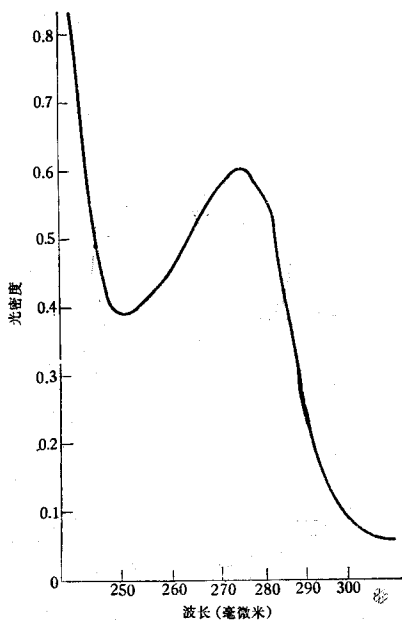


图 2 组蛋白各组份的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱
从左而右: 全组、F_{2a1}、F_{2a2}、F_{2b}、F₁

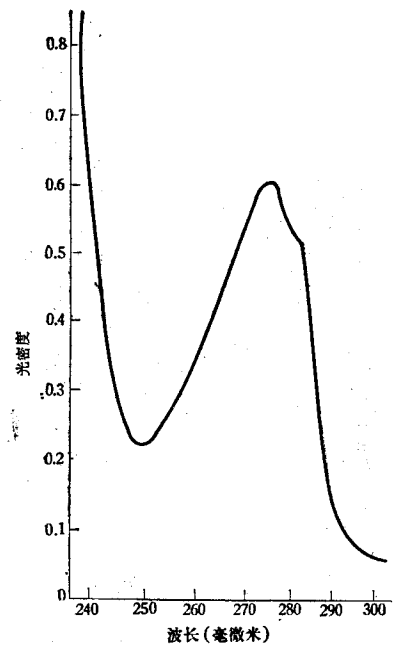
Kirschenbaum 汇集发表的蛋白质光谱图集,仅描绘了组蛋白 F₁ 的光谱,未对其它组份进行光谱分析。Johns 曾对组蛋白各组份进行了光谱描述,但未有深入的分析。我们对本实验分离的电泳纯的组蛋白各组份,进行了全面的光谱分析(图 3),显示出组蛋白的光谱吸收共同特征是:在波长 275 毫微米处有一吸收高峰,在 280 毫微米处有一“肩胛”,并且 280 毫微米和 275 毫微米的光密度比值各个组份基本一致(表 1)。



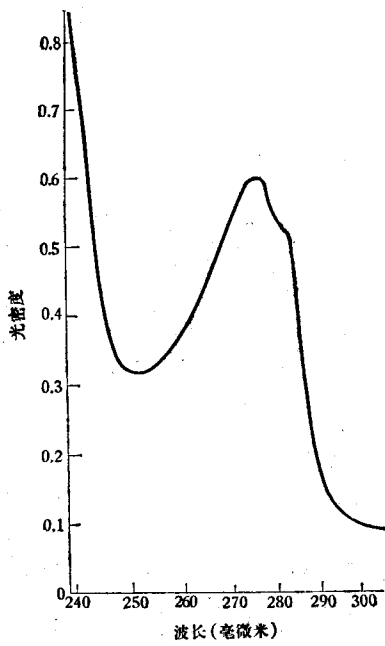
全 组



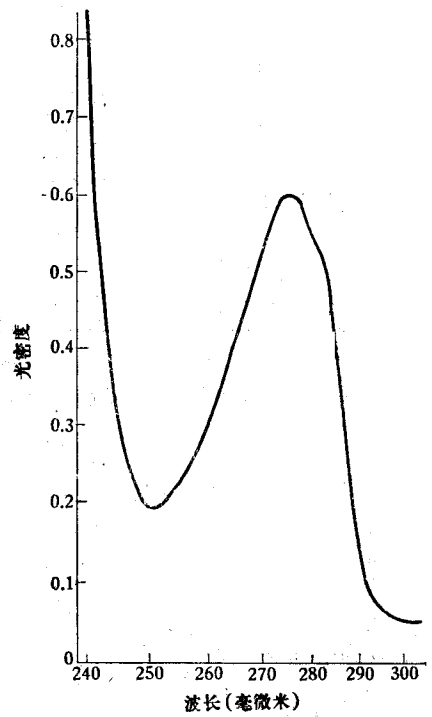
F_1



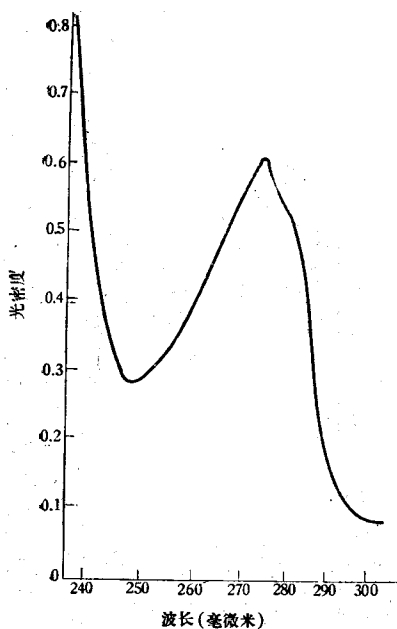
F_{2a}



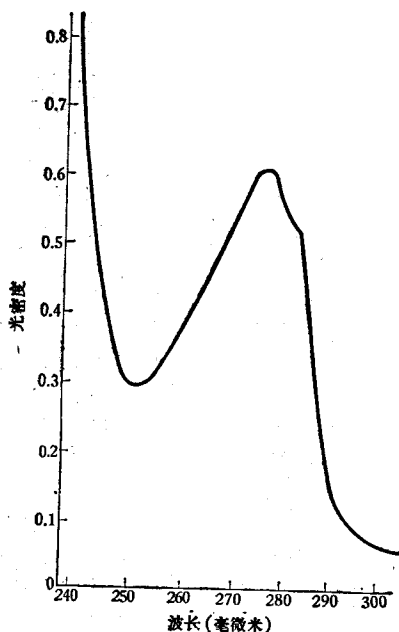
F_{2a1}



F_{2a2}



F_{2b}



F₃

图3 组蛋白各组份的紫外吸收曲线

表1 各种组蛋白紫外吸收特征

组份	O.D. $\frac{250}{275}$	O.D. $\frac{280}{275}$	碱性氨基酸数 氨基酸总数 (%)	克分子 百分比
F ₁	0.636	0.879	$\frac{64}{216} \times 100 = 29.6$	13.4
F _{2a1}	0.521	0.880	$\frac{27}{102} \times 100 = 26.5$	23.8
F ₃	0.483	0.874	$\frac{34}{135} \times 100 = 25.2$	18.3
F _{2b}	0.453	0.869	$\frac{31}{125} \times 100 = 24.8$	24.6
F _{2a2}	0.330	0.877		20.0
全组	0.464*	0.869		100.0

* 根据全组蛋白所含各组份的克分子百分比, 乘以各组份 O.D. $\frac{250}{275}$ 的数值, 计算出全组蛋白的 O.D. $\frac{250}{275} = 0.473$, 与实测数据基本相符

我们进而发现组蛋白各组份的吸收光谱各有其特异性, 表现在 250 毫微米与 275 毫微米的光密度的比值上, 而且此比值与碱性氨基酸所占的比例有对应关系: 即 250 毫微米与 275 毫微米光密度比值越大, 所含的碱性氨基酸越多。F₁, F_{2a1}, F₃, F_{2b} 的一级结构已经阐明, 若以碱性氨基酸/氨基酸总数为横坐标, 以 O.D. $\frac{250}{275}$ 的对数为纵坐标作图, 可得出一直线 (图 4)。

F_{2a2} 的一级结构尚未明了, 但依据上述关系, 可以根据 O.D. $\frac{250}{275}$ 的实测比值, 求得其碱性氨基酸数在氨基酸总残基数中所占的百分比为 19.2。

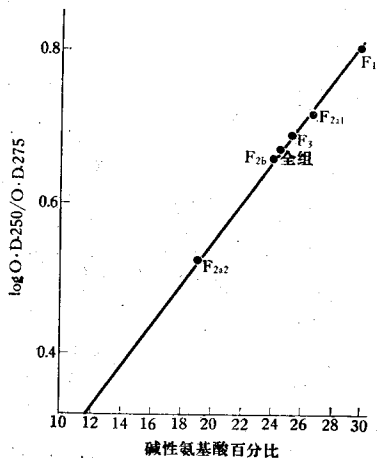


图4 组蛋白各组份中所含碱性氨基酸的百分比与 O.D. $\frac{250}{275}$ 的对数成直线函数关系

小 结

1. 本实验结合 Johns 和 Oliver 等人的技

术,并加以改进,制备出电泳纯的全组蛋白及其组份。

2. 对组蛋白的紫外吸收光谱分析表明,组蛋白的吸收光谱的共同特征是:吸收高峰在275毫微米,在280毫微米处有“肩胛”;而所含各组份的吸收光谱各有其特异性,与所含碱性氨基酸的多寡有对应关系,由此预测出 F_{2a2} 中所含碱性氨基酸的比值为19.2%。

参 考 文 献

[1] Kirschenbaum, D. M.: Atlas of protein spectra in

the ultraviolet and visible regions, p. 6, 132, 133, 1971.

[2] Johns, E. W.: Histones and nucleohistones, 1, 1971.

[3] Butler, J. A. V., Johns, E. W. & Phillips, D. M. P.: *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **18**, 209, 1968.

[4] Croft, D. N. & Lubran, M.: *Biochem. J.*, **95**, 612, 1965.

[5] Munro, H. N. & Fleck, A.: *Methods of Biochemical Analysis*, **14**, 113, 1966.

[6] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951.

[7] Panyim, S. & Chalkley, R.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **130**, 337, 1969.

[8] Oliver, D. et al.: *Biochem. J.* **129**, 349, 1972.

[本文于1977年4月11日收到]

电子显微镜冷冻制样技术

——冷冻超薄切片技术

龚 祖 垠 沈 菊 英

(中国科学院上海生物化学研究所)

电子显微镜超薄切片技术的发展开拓了组织学和细胞学的显微和亚显微结构的研究。二十多年来,人们对分子水平及亚显微水平的生物结构的认识与以前相比,在很多方面有不少本质的变化。结构是功能的基础。对生物结构的研究必然会导致对功能问题的进一步探索和阐明。因此近年来,基于普通超薄切片技术的细胞化学、细胞免疫学放射自显影等技术不断获得发展。普通超薄切片技术虽然还在不断发展和提高之中,但是目前在样品制备上还不可避免地需要进行固定、脱水、包埋、染色等一系列化学处理,这在一定程度上导致生物结构发生变化和破坏,同时使得很多物质丧失其原有的生物活性,例如酶的活力、蛋白质的抗原性等。此外,大部分可溶性生物高分子及其它物质也在这个过程中被抽提掉,因此限制了这些技术的发展和运用。人们较早就认识到,生物组织的快速低温冷冻不仅能较好地保存其原有结

构,而且在很大程度上能保持一些生物高分子的活性,所以从60年代中期开始,如何把低温冷冻和超薄切片技术结合起来,为高分辨率电子显微镜提供冷冻超薄切片样品先后在几个实验室中探索。七十年代初,冷冻超薄切片装置开始以商品生产供应,就进一步促进了这一技术的研究和发展。本文结合我们的初步工作,对冷冻超薄切片技术和它的应用范围作一比较系统的介绍,简单综述用冷冻超薄切片提供的样品观察结果和进展状况,以期这一技术在我国的研究中,发挥它应有的作用。

冷冻超薄切片样品的制备

原则上讲,经低温冷冻的样品,可以不经任何处理,直接进行冷冻超薄切片后进行电镜观察。例如 Bernhard^[1]等曾用新鲜的大白鼠肝脏组织经用液氮致冷的异戊烷冷冻后直接进行切片,但获得的切片质量较差,组织结构保存也不