

小鼠肝模板活性染色质和模板非活性染色质的比较研究

张玉瑛 韩玉珉 赵予*

(中国科学院生物物理所二室)

由 DNA、蛋白质和少量 RNA 构成的染色质是真核生物的遗传物质。它负责遗传信息的贮存、复制、转录及其调节控制等重要功能。在研究染色质结构的基础上研究它的结构同其转录功能之间的关系,有可能在分子水平上阐明高等生物的遗传、变异、细胞分化、生长、发育等生命现象。

在高等生物生活史的不同阶段,不同组织的细胞只选择了基因组中特定基因或基因组进行转录。这种选择性转录的分子机制是什么?要回答这个问题,必然涉及到染色质的物理结构,尤其要涉及到转录活性区域的结构及其转录调控等问题。

本文介绍用 DNaseII 降解小鼠肝染色质,分成转录活性和转录非活性两部分及这两部分性质的比较研究。通过这些研究,寻找人工“启动”和“关闭”某些基因的手段,为定向控制生长、发育和衰老提供一些理论和实践依据。

材 料 和 方 法

实验动物为成年雄性小白鼠。GTP, CTP, UTP 系中国科学院上海生物化学研究所东风海厂产品。 $[^3\text{H}]$ ATP (29 居里/毫克分子)系上原子能研究所产品。脱氧核糖核酸酶 I 和 II 均系 SIGMA 公司产品(DNase II 为 1810 单位/毫克)。小鼠肝 DNA 由本组自己提取。E. Coli RNA 聚合酶系本所生化试剂厂产品。

一、小鼠肝细胞核的制备和小鼠肝 DNA 的提取 参照 Higashinakagawa, Windnell 和 Tata^[1,2]等人的方法并略加修改。把 60—65 天成年雄性小白鼠饥饿 24 小时,断头取肝立刻放入经冰浴预冷的 0.25M 蔗糖缓冲液(内含 25

mMKCl, 3mM MgCl_2 , 0.1mM 巯基乙醇)中洗涤后,称重,加入 5 倍肝重的上述蔗糖溶液后用玻璃匀浆器匀浆,四层纱布过滤,除去结缔组织等碎片。滤液在 6000 rpm 离心 25 分钟,弃去上清液取沉淀的粗核。加 3 倍肝重的 2.3M 蔗糖缓冲液(内含 25mM KCl, 3mM MgCl_2 , 0.1mM 巯基乙醇) 36,000rpm 超离心 40 分钟,沉淀即为纯净的小鼠肝细胞核,此核在 0.34M 蔗糖缓冲液(内含 2.5mM KCl, 3mM MgCl_2 , 0.1mM 巯基乙醇)中于 -60°C 可保存两星期。以上各步均在 0°C 操作。

小鼠肝 DNA 的提取,参照 Maria Gross^[11,12]等人方法略加修改。主要是使用蛋白酶 K 水解蛋白质,用核糖核酸酶除去 RNA,用酚抽提。

二、染色质的制备及其化学组成 参照 Bursh 等人方法^[3,4]并略加修改。将保存在 -60°C 的核于 8000rpm 离心 15 分钟,弃去上清,沉淀的核用 0.34M 蔗糖缓冲液洗一次。然后用逐步降低离子强度,使核慢慢膨胀的方法制备染色质。即依次分别用 0.9% NaCl-0.1 mM PMSF (对苯甲基磺酰氟), 10 mM Tris-HCl (pH8.0)-0.1mM PMSF, 1mM Tris-HCl (pH 8.0)-0.1 mM PMSF, 0.1 mM Tris-HCl (pH8.0)-0.1 mM PMSF 洗核并 10,000rpm 离心 20 分钟,弃去上清液,核逐渐膨胀。当用 0.1 mM Tris-HCl-0.1mM PMSF 洗时,核已经完全膨胀,15,000rpm 离心 30 分钟,弃去上清液,制备出的染色质呈蛋清样的粘稠液。

化学组成成份分析 染色质中 DNA, 蛋白质, RNA 的分离抽提按 Sinclair 等人的方

* 北京大学一分校毕业实习生。

法^[7]进行。DNA、RNA、蛋白质的测定分别按 Burton^[8] Schjeide^[9]和 Lowry^[10]的方法进行。

三、转录活性和转录非活性染色质的制备及氯化镁浓度试验 参照 Bonner 及 Gottesfeld 等人方法^[5,6]制备活性和非活性染色质。氯化镁浓度试验是将 48 O. D₂₆₀ 的染白质样品按 Bonner 和 Gottesfeld 的方法^[5,6]分离出 S₁, 再将其

分成六份,其中一份不加氯化镁,其余五份分别加 1mM、2mM、4mM、6mM、8mM 氯化镁。冰浴中搅拌 30 分钟,冰箱放置 20 分钟,17000rpm 离心 20 分钟,测其上清液 (S₂) 和沉淀 (P₂) 中的 O. D₂₆₀ 读数,如图 3。

四、转录活性的测定 保温反应混合物总体积为 0.1ml。其中含 40mM Tris-HCl (pH 8.0) 10 mM MgCl₂, 1mM 巯基乙醇, GTP、CTP、UTP 皆为 0.66 mM, [³H]-ATP 2 微居里。各染色质样品相当于 5μg DNA。E. Coli RNA 聚合酶 2 单位。于 37℃ 保温 20 分钟,在冰浴中终止反应。用纸片法测酸不溶产物的放射性,液闪计数。

五、熔点温度测定 按 Hsueh、Jeili^[11] 的方法进行。把分离得到的染色质 S₂ 及 DNA 分别对 0.25mM EDTA 溶液 (pH8.0) 透析过夜,使样品浓度为 0.7—1 A₂₆₀/ml,真空除掉溶液内的气泡,测定其在不同温度下波长 260nm 的紫外吸收值。

六、DNase I 降解染色质和 DNA 的动力学测定 参照 Gottesfeld^[6]的方法进行。反应总体积为 2ml,其中含 10mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM MgCl₂, 5—10μg DNase I, 小鼠肝 DNA 或染色质浓度为 0.5A₂₆₀/ml 左右。在“556 型”分光光度计的恒温池中 (37℃) 连续测定染色质或 DNA 在波长 260nm 的紫外吸收。

结果和讨论

一、细胞核 DNA 的制备 按上述方法制备的小鼠肝细胞核很完整,干净。见图 1。在整个实验过程中制备出纯净的完整的核十分重要。我们在实验过程中看到,在蔗糖溶液中加入钾离子、镁离子及巯基乙醇能保护核在制备过程中不被破坏。保证核的完整性。

制备的小鼠肝 DNA 为白色纤维状, DNA 含量为 90% 以上。

二、染色质的制备及其化学组成成份 采用逐渐降低离子浓度的梯度洗脱方法制备小鼠肝染色质呈蛋清状粘稠液,同文献中所报道的

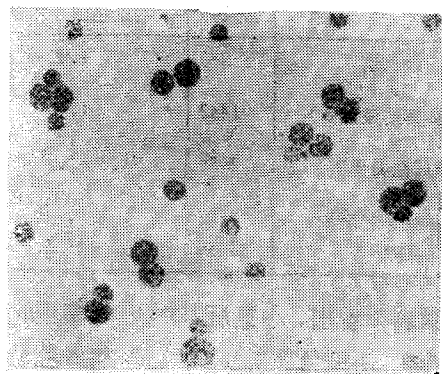


图 1 纯化的小鼠肝细胞核
(放大 400 倍)

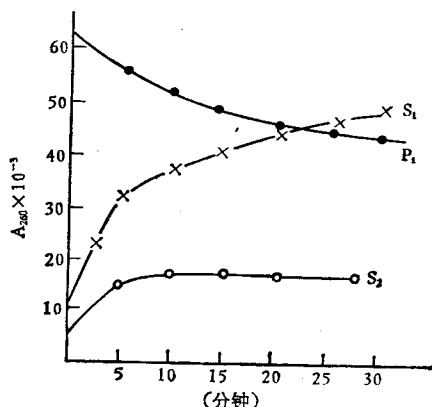


图 2 DNase II 消化染色质的时间曲线

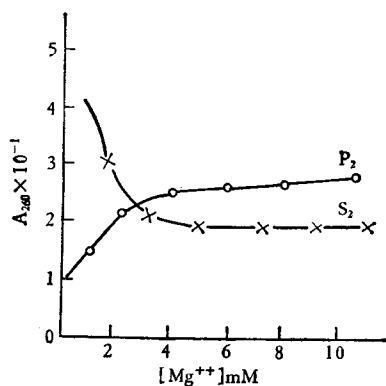


图 3 氯化镁沉淀非活性染色质的 Mg⁺⁺ 浓度试验

相似,这种制备方法条件温和。染色质的溶解度较好,而且生物活性较高。

染色质化学组成的分析结果如表 1 所示。

表 1 染色质各部分的组成分析

组分 染色质部分	组蛋白/ DNA	非组蛋白/ DNA	RNA/DNA
P ₁	1.27	0.70	0.054
P ₂	1.10	0.80	0.065
S ₂	0.96	1.12	0.152
染色质	1.01	0.53	0.052

测定结果表明,活性和非活性染色质都是由 DNA、蛋白质和少量 RNA 组成。由于它们的功能不同,故含量上也有差异。活性和非活性染色质中组蛋白含量基本相同,而非组蛋白的含量差异较大。活性染色质非组蛋白的含量明显高于非活性染色质内的含量。从而可推断非组蛋白在基因转录的调节控制中起重要作用。而组蛋白是染色质的结构蛋白,不是基因表达的特异调节因子,它没有种、属和组织的特异性。而非组蛋白大多数为酸性蛋白质,且种类繁多,具有种、属、组织和发育年龄的特异性,其含量与细胞的生理状态有关。其次,二者 RNA 的含量不同。活性染色质中 RNA 含量高于非活性染色质,这是由于活性染色质转录活力高,因而被转录的 RNA 也多。或者,可能由于 RNA 与模板和非组蛋白以某种特异的构象出现,才导致转录活力高,有人报道 RNA 也可能对转录有调节作用。

三、转录活性和非活性染色质的制备及其分离 在实验过程中,实验条件的微小变化都可能影响到染色质的性质,因此要特别小心谨慎。我们认为最好的制备方法是酶法。因为酶法处理染色质条件温和,接近体内染色质的天然状态且更少破坏其生物活性。比物理化学及机械切割的条件易掌握,重复性好。DNase II 降解染色质的时间曲线见图 II。实验结果表明, DNase II 作用时间控制在 5—7 分钟最好。降解产率为 11—17%。根据文献报道 DNase II 降解染色质后,活性染色质可溶在氯化镁中,我

们又做了氯化镁浓度实验,从图 III 中看出,氯化镁浓度在 2—3mM 之间为宜。

四、染色质模板活力测定 在外源 RNA 聚合酶催化下, DNA 和染色质模板活力测定结果如下表(表 2 所示)。此结果是多次实验的平均值。

表 2 各部分染色质的模板活力

模 板	计数 (分钟)	染色质各部分计数 与染色质计数的比
染色质	980	1.0
P ₁ (未降解的染色质)	1442	1.47
P ₂ (非活性染色质)	2450	1.3—1.5—2.0
S ₂ (活性染色质)	4782	4.9
DNA	12980	13.2

从表 2 看出,小鼠肝 DNA 为模板时转录活力最高,是染色质的 13 倍。P₁ 和染色质为模板时转录活力相近。S₂ 的模板活力是染色质的 4.9 倍。P₂ 为模板时转录活力是染色质的 2 倍,高于染色质。这是因为离心之后,沉淀本身很少,将含 S₂ 的上清倒出之后, P₂ 界面上仍粘有 S₂, 故干扰测定。如果用水或缓冲液把沉淀洗一次,离心后取出分析, P₂ 的模板活力为染色质的 1.3—1.5 倍,或相当于染色质。在转录活力测定中,如果不加外源 RNA 聚合酶或染色质,其模板活力只相当于空白对照水平。这说明该染色质无内源 RNA 聚合酶活力。当不加染色质时,因无模板,故而也不转录。

五、溶解温度 我们的实验结果表明(图 4) S₂ 与 DNA 的熔点温度极为接近, DNA 在 54—55℃ 之间, S₂ 在 56—58℃ 之间。染色质的熔点温度有三个: 35—40℃, 73—78℃, 82—85℃。这与 Huseh Jei 和 Gottesfeld 等人所作的大鼠肝染色质的结果相近。在染色质中,组蛋白与 DNA 以某种构象紧密结合的区域,熔点温度就高。组蛋白与 DNA 结合较松的区域,熔点温度就偏低。而模板活性区域中,组蛋白与 DNA 结合的很松散,相互束缚力很小,故熔点温度与 DNA 的熔点温度相似。

六、DNase I 降解小鼠肝 DNA, 染色质

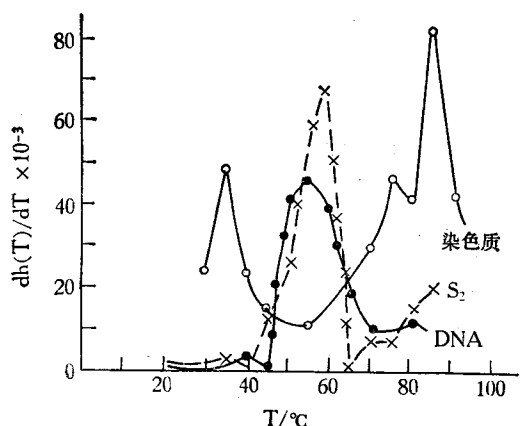


图4 小鼠肝染色质,活性染色质和 DNA 的熔点温度曲线

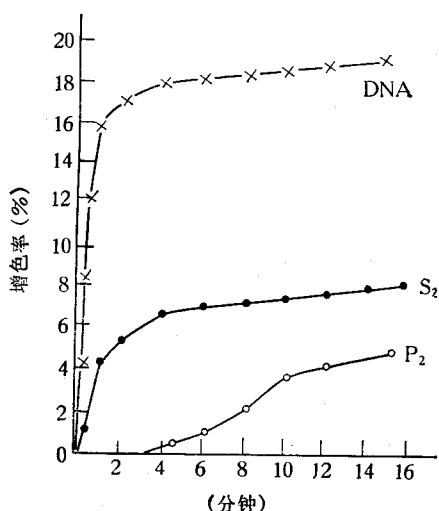


图5 DNase I 降解 DNA 和染色质的动力学曲线 (S_2 和 P_2) 的动力学曲线 (见图 5) 从图 5 看出, S_2 对 DNase I 降解的敏感性与 DNA 相

似。即在反应进行 4 分钟后增色率已无明显变化。 P_2 对 DNase I 的敏感性却不同于 S_2 , 当反应进行到 4 分钟时几乎无增色效应。说明 P_2 对 DNase I 不敏感。然而对 DNase I 降解的敏感性差异正是区别活性与非活性染色质的特点之一。

从转录活性,组成成份、热变性和对 DNase I 的敏感性综合分析,可以看出,转录活性染色质模板活性高, RNA 和非组蛋白含量丰富,转录非活性染色质与组蛋白结合更紧密。活性染色质是一个更松散的构象,类似于 DNA。要想阐明活性染色质与非活性染色质之间的关系,尚需更进一步研究染色质构象的变化。

参 考 文 献

- [1] Higashinakagawa, T. et al.: *Exp. Cell Res.*, **71**, 65, 1972.
- [2] Widneü & Tata: *Biochim. Biophys. Acta*, **123**, 478, 1966.
- [3] Reeder, R. H. *J. Mol. Biol.*, **80**, 229, 1973.
- [4] H. Busch. *Exp. Cell Res.*, **109**, 151, 1977.
- [5] *Methods in Enzymology* Vol. XL Hormone Action part. E No. 8—No 14, 1975.
- [6] Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. **283**, 343, 1978.
- [7] Sinclair, G. D. et al.: *Exp. Cell Res.*, **111**, 1978.
- [8] Burtonk, *Biochem. J.* **62**, 315, 1956.
- [9] Schjeiele, O. A.: *Anal. Biochem.* **27**, 473, 1969.
- [10] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.* **193**, 265, 1951.
- [11] Maria Gross-Bellard *Eur. J. Biochem.* **36**, 32, 1973.
- [12] 《分子生物方法》[西德 P. Chancelra W. Appel 1973 57--61], 李中德译, 吴曼校

(本文于1983年2月2日收到)

(上接第65页)

能彼此分开。用于其它肽段的分离也得到较满意的结果。

本工作曾得到戚正武和陈远聪、罗珊珊同志的指导, 慕见风同志参加部分工作。庄熙孟、张晋明拍摄照片, 一并致谢。

参 考 文 献

- [1] Wittmann Liebold, B. 在上海有机所举办的“蛋白质微量顺序测定技术”讲习班资料, 1980, 10.
- [2] Kamp, R. et al., *FEBS Letters*, **121**, 117, 1980.
- [3] Chang, J. Y., *FEBS Letters*, **93**, 205, 1978.
- [4] 俞鹤年、泮家秀, 《生物化学与生物物理进展》, **1**, 41, 1981.

(本文于1983年1月18日收到)