

核仁和核仁染色质

韩玉珉

(中国科学院生物物理研究所)

真核细胞基因表达的调节控制是当前分子生物学领域最令人感兴趣的研究课题之一。但由于真核细胞基因组的复杂性,目前对此问题的了解还是不够深入的。随着生物化学、细胞化学和遗传工程技术的发展,使得基因表达的研究,尤其是特定基因表达的研究成为可能。

从动物细胞分离的核仁和核仁染色质,为研究核糖体基因(rDNA)的转录提供了一个比较理想的系统。第一、在核仁或核仁染色质中仅仅含有核糖体基因,并含有只负责核糖体基因转录的聚合酶 I。第二、核仁及核仁染色质的转录产物是核糖体 RNA (rRNA),它包括 28S, 18S, 5.8S RNA 和它们的前体 45SRNA。因此,检测核仁和核仁染色质在体外转录的“忠实性”就比较容易。第三、核仁比较容易分离。第四、一般认为 rRNA 的合成是通过改变核糖体基因转录的速率而被调节的,所以核仁及其染色质可以用来研究在转录水平上核糖体基因调节的机理。本文简介近年来这些方面的研究成果。

一、核仁及核仁染色质的制备

目前,分离核仁及核仁染色质所用的材料

多为大白鼠细胞^[1,2],蛙的卵母细胞^[3],四膜虫细胞^[4],以及多种人工培养细胞^[5,6]。首先,依材料的不同,选择适当的方法分离得到纯净的细胞核,再用超声波破碎细胞核,经蔗糖梯度离心得到核仁。然后按 Spelsberg^[7]和 Busch^[6]等人的方法,用不同盐浓度的溶液多次抽提核仁,即可得到核仁染色质。

二、核仁及核仁染色质的性质

核仁在细胞分裂前期消失,于细胞分裂后期在染色体核仁组织区重新形成。

核仁在形态上可以分为下述几部分^[8]:颗粒状成分、纤维状成分、核仁“光亮区”、核仁黑暗物质、核仁内染色质、核仁外周染色质和 DNA 纤维部分。

核仁的生物化学组成比较复杂,含有 RNA 聚合酶 I,核糖体蛋白质,核糖体 RNA 前体的特殊加工酶类,如修饰酶,裂解酶等,还含有一种低分子量的 RNA (U₃RNA),rDNA,以及其他成分等。核仁及核仁染色质的化学组成如表 1 所示。与细胞核及核染色质的化学组成相比,核仁及核仁染色质含有较高的 RNA 和蛋白质。这是由于在核仁及核仁染色质中存

[4] Inon, M. et al., 1977 *J. Biol. Chem.* 252: 7601—7613.

[5] Whitfield, J. F. et al., 1979 *Mol. & Cell Biochem.* 27:155—179.

[6] Weber, A. et al., 1973 *Physiol. Rev.* 53: 612—673.

[7] Heilmeyer, L. M. et al., 1970 *J. Biol. Chem.* 254:6649—6661.

[8] Nishizuka, Y. et al., 1979 *Mol. & Cell Biochem.* 23:153—263.

[9] Lin, Y.M. et al., 1974 *J. Biol. Chem.* 249: 4943—4952.

[10] Cheung, W.Y. et al., 1980 *Science*, 207: 19—27.

[11] Seamon, K.B. 1980 *Biochemistry*. 19:207—215.

[12] Grand, R.J. et al., 1979 *Biochem. J.* 183: 285—295.

[13] Decoster, C. et al., 1980 *Eur. J. Biochem.* 104:199—208.

[14] Stolc, V. et al., 1979 *Biochem. Biophys. Acta.* 569:267—276.

[15] Nishida, E. et al., 1980 *J. Biochem.* 87: 143—151.

表 1 核仁及核仁染色质的化学组成

	DNA	RNA	蛋白质
大鼠肝核仁 [1]	1	0.5	1.6
大鼠肝核仁 [2]	1	1.3	2.3
Novikoff 肝癌 细胞核仁 [9]	1	1	10
大鼠肝核仁染色质 [10]	1	0.45	3.8

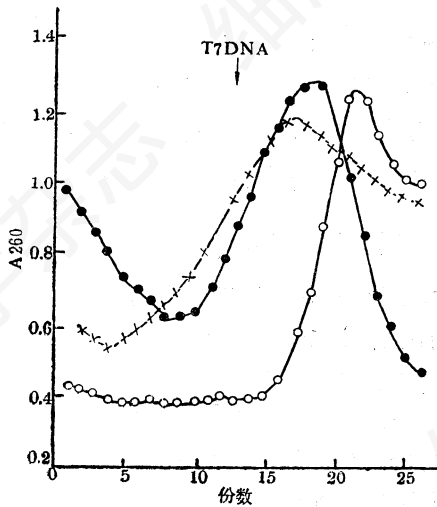


图 1 大鼠肝核仁 DNA 碱-蔗糖密度梯度离心图谱

+ + + 分离的核仁 o - o 核仁染色质
● - ● 核仁 DNA
箭头表示 T₇DNA (37S) 的峰

在着与之紧密结合的核糖体前体的结果。核仁来源不同，提取方法不同，都会影响 DNA、RNA 和蛋白质三者之间的比例关系。

DNA: 用碱-蔗糖密度离心比较了精制过的大鼠肝核仁 DNA 及核仁染色质 DNA 的大小，如图 1 所示。核仁 DNA 的分子量是 5.6×10^6 ，相当于 1.7×10^4 核苷酸。这样长度的 DNA 至少可以为一个 45S RNA 编码，这就为在体外用分离的核仁合成 45S RNA 提供了理论依据。在核仁染色质中，DNA 的分子量是 1.6×10^6 ，这说明在染色质的制备过程中有机械切割作用，或脱氧核糖核酸酶的降解作用。图 2 显示出在 4M 尿素中核仁 DNA、核仁染色质和核染色质的热溶解曲线，染色质的

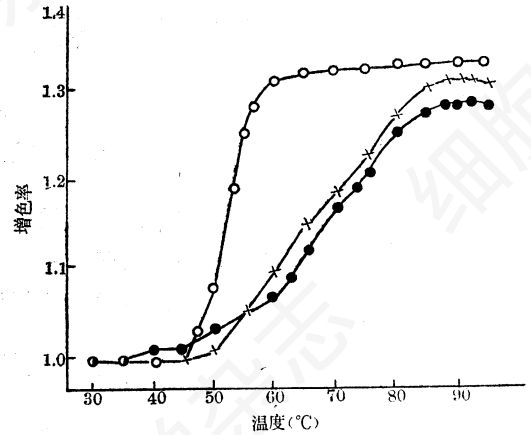


图 2 核仁染色质的热溶解图谱

+ - + 核染色质 o - o 核仁 DNA
● - ● 核仁染色质

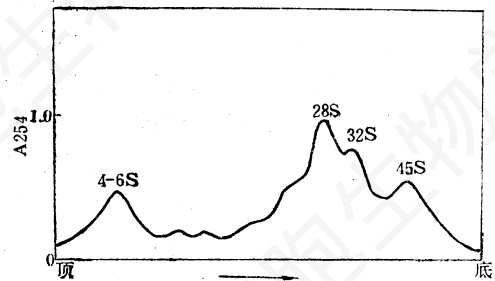


图 3 核仁 RNA 蔗糖密度梯度离心图谱

DNA 比去蛋白的 DNA 对热更稳定，而核仁染色质与核染色质之间的差异甚小。

RNA: 鼠肝核仁 RNA 的典型的蔗糖密度梯度离心图谱如图 3 所示。

蛋白质: 核仁中蛋白质的含量高，种类多，它包括核糖体颗粒蛋白，酶蛋白，染色质蛋白，如组蛋白，非组蛋白等。Orrick, L. R. 以及 Olson, M.O.J. 等^[11,12]，用双向凝胶电泳对此进行了分析研究。用 0.4N H₂SO₄ 从核仁中抽提出酸可溶性蛋白质，经双向凝胶电泳分离，可看到 100 多个斑点。核仁非组蛋白是相当不均一的，代谢活性异常活泼，并且高度磷酸化。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱表明，核仁和核仁外染色质之间有明显差别。核仁非组蛋白的种类和功能将是有关基因表达调控的进一步研究的目标。Busch 等^[8]还比较了

Novikoff 肝癌细胞和正常鼠肝细胞核仁蛋白质,发现两者之间的凝胶电泳图谱有许多斑点是不同的。可见,在不同生理条件下,核仁蛋白会发生变化,因此根据这些变化可研究核仁蛋白质的功能。

三、分离的核仁在体外的 RNA 合成

1. 45S RNA 的合成条件: Ro 和 Busch 等^[13]于 1964 年第一次证明用分离的核仁在体外系统中能合成 RNA,反应体系需要全部四种核苷三磷酸和二价阳离子。RNA 的合成几乎被放线菌素 D 所抑制,而被核糖核酸酶所降解。缺少一种核苷三磷酸, RNA 的合成便不能进行。Grummt 等^[14,15]也利用分离的核仁在体外合成了 45SRNA 和更大的 RNA。Onishi 等^[16]用从鼠肝及腹水癌细胞分离的核仁探讨了 45SRNA 合成的条件。他们的结果表明,要最大限度的合成 45SRNA,在合成的反应体系中二价镁离子和核糖核酸酶抑制剂是必不可少的,反应温度在 25—37℃ 之间, 25℃ 最好, 15—30 分钟即可完成反应。作为标记底物的 CTP 或 UTP,其浓度至少是 0.012mM。

2. 转录过程的忠实性: 可通过鉴定其转录产物 RNA 的大小,核苷酸组成,分子杂交行为,沉降图谱等加以分析。

(1) RNA 的大小 在真核生物体内,核糖体基因首先转录成核糖体 RNA 的前体,大约是 1.4×10^4 核苷酸,沉降系数 45S,经过加工成熟过程,最终形成 28S, 18S, 5.8S RNA。但是已有报道,分离的核仁在体外合成的 RNA 比在体内合成的 RNA 短,这可能是受到核仁纯度及其结构完整性的影响。因为在提取核仁过程中,超声波处理会使核仁 DNA 断裂,或者有核质的污染,致使核质内所含的核糖核酸酶将新合成的 RNA 降解成沉降系数更小的片段,甚至小到 4—8S。然而 Grummt 等也发现,在体外还可以合成大于 45S 的 RNA。

(2) 核苷酸组成和“指纹图谱”分析 分离的核仁体外转录产物 RNA 的核苷酸组成分析

表明,其 G、C 含量占 60—70%,这一数字与体内 rRNA 前体中 G、C 含量很相近。Buseh 等^[5,17]用改良的同系层析技术作了核糖核酸酶 T₁ 降解核仁转录产物的指纹图谱,发现在降解由体内提取的 45SRNA 的大约 200 个斑点中,只有四个斑点在核仁体外转录物中不存在。这就意味着,尽管 rDNA 仅占核仁 DNA 的 0.5%,但被转录的部分仅仅局限于核仁 DNA 中的 rDNA,足见在核仁中存在着某种控制系统,它们帮助聚合酶特异地识别核仁 DNA 中的 rDNA。

(3) 利用分子杂交技术分析 RNA 产物 分子杂交技术是鉴定转录过程忠实性的有效方法之一。当用分离的核仁在体外合成的 RNA 与 CsCl 梯度上离心分离得到的核仁 DNA 一起“退火”时,这些新合成的 RNA 便杂交到含有核糖体基因的重链 DNA 上,根据 DNA 转录时其转录产物的碱基与之互补的原则,说明这些新合成的 RNA 是由核仁 DNA 中的 rDNA 转录出来的 rRNA。另外,为鉴定转录忠实性,还可通过分子杂交竞争实验来进行。Grummt^[18]证明,分离的核仁在体外合成的 RNA 可与从体内提取的 45SRNA 对 rDNA 进行杂交竞争,其竞争率达 90%,而与 28S 加 18S RNA 的竞争率是 60%。这就表明了,在分离的核仁中核糖体基因在体外相当忠实地转录。然而,由于分离的核仁中含有内源 rRNA,使问题复杂化。目前多采用与过量的 DNA 杂交,或者把内源 RNA 与体外合成的 RNA (带汞原子) 通过 SH-琼脂糖亲和层析加以分开的办法来克服。

四、核仁染色质转录的特性

1. 核仁染色质的模板活性: 以核仁染色质为模板,外加 RNA 聚合酶进行体外转录,发现染色质的模板活力是去蛋白 DNA 模板活力的 10—20%。用 Spelsberg 等人的方法制备的核仁染色质可以作为 RNA 聚合酶 I、II 和大肠杆菌 RNA 聚合酶的模板进行体外转录^[10],在同一模板上三者的转录活性是不同

的。大肠杆菌聚合酶显示出最高的转录活性，RNA聚合酶 I 次之，RNA聚合酶 II 最低。无论是改变反应体系中 RNA 聚合酶的用量还是染色质模板的浓度，其结果都是如此。当以核仁染色质为模板，用 RNA 聚合酶 I 和大肠杆菌 RNA 聚合酶作叠加转录时，发现 $[^3\text{H}]$ -UMP 的掺入为两者之和。与 RNA 聚合酶 I 相比较，在核仁染色质模板上有更多的转录起始位点被大肠杆菌 RNA 聚合酶所利用，它也能够转录 RNA 聚合酶 I 所不能转录的核仁染色质的 DNA 区段。

2. 核仁染色质转录的特性：虽然核仁染色质可以作为 RNA 聚合酶 I、II 及大肠杆菌 RNA 聚合酶的模板进行体外转录，但其转录产物却很不相同。为进一步澄清不同 RNA 聚合酶转录核仁染色质的性质，将体外合成的 RNA 与核仁 DNA 杂交，或分别与 45SRNA 及 28S 加 18SRNA 混合物对 rDNA 作杂交竞争实验^[19]，结果表明，用 RNA 聚合酶 I 转录出来的产物比用 RNA 聚合酶 II 或大肠杆菌 RNA 聚合酶转录的产物对 rDNA 杂交的竞争能力更强。当大肠杆菌 RNA 聚合酶被用于转录核仁染色质时，其转录产物与 45S RNA 对 rDNA 的杂交竞争率仅达 10%，而 RNA 聚合酶 II 和 I 的转录产物与 45S RNA 对 rDNA 的竞争率分别达到 20% 和 40% 或更多。当用去蛋白的 DNA 作模板时，其转录产物几乎不能与 rRNA 对 rDNA 进行竞争杂交，此时，无论用那种 RNA 聚合酶其差别是不明显的。

五、存在问题与展望

1. 关于转录机制的研究：根据现在的研究，目前认为在分离的核仁体系中，体外新合成的 RNA 链的 80% 是在体内已经起始的 RNA 链上的延长，而不是重新起始。那么，rRNA 体外合成重新起始的问题是否如此，仍有进一步研究的必要。

如前所述，Grummt 等发现，用分离的核仁在体外合成的 RNA 大于 45S，而产生所谓

“转录过头”现象。他们认为造成这一现象的原因可能是转录终止阶段出现障碍。因此，转录是如何终止的，亦需研究。

2. 核仁和核仁染色质的转录控制因子：rDNA 仅占核仁 DNA 的 0.5%，而核仁的基因产物，无论是在体内还是体外系统中皆为 rRNA。Ballal, N.R. 等^[20]报告，用他们的方法得到的核仁染色质仍保留有 20% 的内源 RNA 聚合酶 I 的活性，体外转录产物与体外完整核仁转录产物的指纹图谱基本相同。用小于或等于 0.6 M NaCl 抽提核仁所得到的染色质仍保留有内源 RNA 聚合酶的活力和转录的特性，从外部添加 RNA 聚合酶 I 并不能显著增加转录能力，直到用 1 M NaCl 抽提核仁时，外加 RNA 聚合酶 I 才能起作用，并且转录产物与完全去蛋白的核仁 DNA 的转录产物相似，但这种转录是任意的，是不忠实的。这说明在核仁染色质部分确实有控制忠实转录的因子，并存在于某一特定浓度的盐溶液抽提的核仁染色质中。这一结果也反映了染色质结构对于核糖体基因忠实转录的必要性。

3. 不同生理条件对核仁的影响^[18]：rRNA 的合成速率与细胞增殖的速率密切相关，即与生物的生长、蛋白质合成有关。蛋白质合成抑制剂放线菌素酮、嘌呤霉素等直接抑制 rRNA 的合成。给鼠注射硫代己酰胺以后，刺激鼠肝细胞增长，此时，鼠肝核仁中 rRNA 合成增加。rRNA 合成速率改变的原因，可能与不同生理条件下核仁中 RNA 聚合酶量的多少或活性的高低有关。因此，从具有不同增殖速率的细胞中分离出的核仁，将适合于说明 rRNA 合成速率变化的机制，为研究基因表达的调节提供了一条途径。

4. 关于核糖体基因的“结构体制” (Organization)：限制性内切酶基因图谱表明，真核生物的核糖体基因可能是中度重复的，是以许多结构基因的重复单位成串组合排列的。图 4(a) 显示出蛙、小鼠及 HeLa 细胞的一个 45SRNA 前体结构基因和间隔区所组成的核

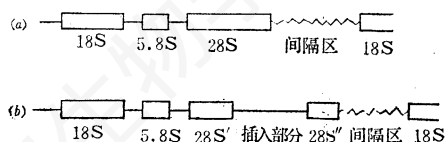


图4 rDNA的存在方式

糖体基因的重复单位。图4(b)是果蝇(*Drosophila*)的核糖体基因的重复单位,与(a)所不同的是在28SrRNA基因中有一长度不等的非编码插入序列。而酵母核糖体基因的重复单位是以18S, 5.8S, 25S的顺序排列的。由此看出,真核生物核糖体基因的存在方式依物种的不同而有差异。那么,核糖体基因的多样性与生物的进化有何关系将是今后研究的问题。

至于核糖体基因是否采取核小体结构仍有争议^[21]。用核酸酶消化的结果表明,核糖体基因具有核小体结构,而用电子显微镜并未观察到。因此,核糖体基因是否具有核小体结构,尚待研究。

5. 结构与功能的关系: Daskal, Y.等^[22]曾研究过核仁染色质的超结构(电镜扫描图谱分析)与转录活性之间的关系; Bombik^[23]及 Huaug等^[24]对核仁及核仁染色质作过溶液构象研究,发现RNA及蛋白质对核仁DNA的圆二色光谱椭圆率有明显影响。这说明RNA和蛋白质的存在与否可直接影响核仁DNA的构象。加强这方面的研究,可以揭示核仁DNA与蛋白质之间的相互作用。

6. rDNA的纯系繁殖: 尽管rDNA是中度重复的基因,特别是在蛙的卵母细胞中可以增加2000倍,但是,要想得到足够量的rDNA还是比较困难的。Higashinakagawa等^[3]从大量高纯度的核仁染色质仅仅得到1—2微克的rDNA。基因纯系繁殖技术提供了大量获得特定基因的手段。最近Grummt等^[25]利用这一技术,得到了含有18SRNA编码的rDNA片段。如果把用纯系繁殖技术得到的含特定基因的DNA片段与相应的染色体蛋白(包括组蛋白与非组蛋白)重组,构成所谓“微染色体”,便可深入地研究转录过程及染色体蛋白

对转录的调节机制。

参 考 文 献

- [1] Sadowski, P. D. et al., 1968 *J. Cell Biology.*, 37:147—161.
- [2] Higashinakagawa, T. et al., 1972 *Exp. Cell Res.*, 71:65—74.
- [3] Higashinakagawa, T. et al., 1977 *Develop. Biology.*, 55:373—386.
- [4] Gocke, E. et al., 1978 *Nucleic Acids Res.*, 5:3993—4006.
- [5] Matsui, Sei-ichi, et al., 1977 *Biochem.*, 16:39—45.
- [6] Muramatsu, M. et al., 1974 *Exp. Cell Res.*, 88:345—351.
- [7] Spelsberg, T. C. 1971 *Biochim. Biophys. Acta.*, 228, 201—221.
- [8] Busch, H. et al., 1978 *The Cell Nucleus V. (Chromatin B)* 415—468.
- [9] Busch, H. et al., 1970 *“The Nucleolus”*, Academic Press., 209—284.
- [10] Muramatsu, M. 1978 *Methods in Cell Biology.*, 17:141—161.
- [11] Orrick, L. R. et al., 1973 *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 70:1316—1320.
- [12] Olson, M. O. J. et al., 1975 *J. Mol. Biol.*, 97:611—619.
- [13] Ro, T. S. et al., 1964 *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 14:149—155.
- [14] Grummt, I. et al., 1973 *Eur. J. Biochem.*, 36:244—249.
- [15] Grummt, I. et al., 1976 *Cell*, 7:439—445.
- [16] Onishi, T. et al., 1978 *Methods in Cell Biology.*, XIX:301—315.
- [17] Ballal, N. R. et al., 1977 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 2446—2450.
- [18] Grummt, I. 1978 *The Cell Nucleus V, (Chromatin B)*:373—414.
- [19] Muramatsu, M. et al., 1975 *Biochemistry of the cell nucleus*, 33:325—330.
- [20] Ballal, N. R. et al., 1979 *Nucleic Acids Res.*, 7:919—934.
- [21] 岡纯, 上田国宽, 生物物理, 1979 19:36—43.
- [22] Daskal, Y. et al., 1978 *Exp. Cell Res.*, 111:153—165.
- [23] Bombik, B. M. et al., 1977 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:69—73.
- [24] Huaug, C. H. et al., 1976 *Biochem.*, 15: 2829—2836.
- [25] Grummt, I. et al., 1979 *Nucleic Acids Research.*, 6:1351—1369.