

调节。凡此种种，再加上各种实验动物模型和体内外细胞功能重组的实验条件的确立等等，都使应用免疫活性细胞来研究上述问题比起其他生物学材料更为合适。

免疫学在最近二十多年的发展大大借助于

其他生物科学的理论和技术，形成了免疫生物学这一新的学科领域，我们相信，今后免疫生物学中一些基本问题的阐明，必将反过来推动整个生物科学的前进。

染色体非组蛋白及其对真核细胞 基因转录的调节

韩 玉 珉

(中国科学院生物物理研究所)

近十年来，有关真核生物细胞核生物化学的研究最显著的发展之一，是对染色体非组蛋白(简称 NHP)的重要性给予了充分肯定。现已知道，染色体非组蛋白是相当不均一的，它含有许多有关细胞核代谢的酶类，如RNA、DNA聚合酶等，但人们最感兴趣的是它们含有能控制基因表现的蛋白。人们已从许多真核生物中分离出了NHP，并与DNA、组蛋白一起进行体外染色质重组实验，以期了解NHP对DNA或染色质特异性转录活性的调节作用。

一、染色体非组蛋白的制备

染色质的制备和组成：制备NHP一般是从染色质开始的，分离染色质的方法基本上是除去动物组织细胞的细胞质和可溶性的核成分，然后得到核蛋白复合物。通常分两步进行：首先用适当的含盐缓冲液匀浆动物组织，经过滤除去未破裂的细胞和膜碎片，用低速离心收集粗制细胞核沉淀，再通过蔗糖密度梯度离心制备纯净的细胞核；其次是用适当的含盐缓冲液破碎细胞核，经高速离心，除去可溶性核成分，制备染色质。

染色质包括四种主要成分，即DNA、组蛋白、非组蛋白和少量的RNA。DNA含量随细胞种类的不同而有变化。DNA的含量约占染色

质重量的30—40%，若把它作为1，其它三种成分的含量与之相比较，从表1可以看到，在不同生物和不同细胞中，组蛋白与DNA的比率大约是1:1，而NHP的变化甚大。

染色体非组蛋白的制备：迄今为止，得到

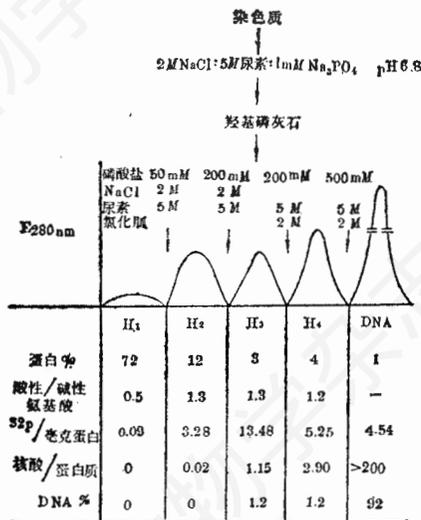
表1 染色质的化学组成

来 源	DNA	RNA	组蛋白	非组蛋白
鼠 肝	1	0.04	1.15	0.95
猪 小 脑	1	0.13	1.6	0.5
鸡红细胞	1	0.02	1.08	0.64
牛 胸 腺	1	0.05	0.89	0.21
Hela细胞	1	0.05	1.08	0.7

NHP 还是比较困难的，因为它不易溶解，很容易与DNA、组蛋白形成复合物，给分离造成许多困难。尽管如此，还是报道了许多纯化制备NHP的方法。(1)用稀酸处理染色质，去除组蛋白，然后用酚或SDS溶解，离心除去DNA，也可用牛胰脱氧核糖核酸酶水解DNA，抽提出NHP。(2)为避免用强酸强碱处理染色质，可采用高浓度的盐(NaCl)溶液或“高浓度盐(NaCl)——尿素溶液”(近中性pH)抽提染色质，通过超离心或凝胶过滤除去DNA，再通过离子交换层析，把组蛋白与NHP分开。常用的树脂是Bio-Rex 70(阳离子树脂)，NHP

不被树脂吸附直接流出。NHP可进一步用树脂分离。用Sephade SE树脂,通过盐梯度洗脱,可以大量制备 NHP。MacGillivay 等⁽¹⁾用羟基磷灰石柱层析,把小鼠胚肝染色质分成五部分,其纯化方法及分析结果见表2。从表2可见,鼠胚肝NHP在羟基磷灰石柱上的分级分离部分地依赖于蛋白质磷酸化的程度。组分H₁是组蛋白,组分H₂₋₄是NHP。组分H₂有“激活”胚肝DNA-组分H₁复合物转录珠蛋白mRNA的能力,而组分H₃“激活”能力较差,组分H₄则不能“激活”。组分H₂₋₄都含有少量的核酸(RNA),可用CsCl梯度离心除去。(3)另外,还可根据NHP的专一性集团(如磷蛋白、HMG蛋白等)来分离。

表2 小鼠胚肝染色体蛋白质的分离及其分析



近年来,由于蛋白质分离技术的改进,人们已从种类繁多的NHP复合物中分离出一些单一的NHP^(2,3)。通常是在常规分离的基础上,如硫酸铵分级沉淀、凝胶过滤、柱层析等,再借助于高灵敏度的凝胶电泳技术,及DNA-琼脂糖(或DNA-纤维素)亲和层析来实现。如NHP_{C14}的分级分离,先用0—30%, 30—60%, 60—95%硫酸铵沉淀,而后再用双向凝胶电泳分离制得单一的NHP_{C14};非组蛋白NH₃₀₀₀₀的制备,便是先通过羟基磷灰石柱分离得到一组不均一的非组蛋白,而后再经过DNA-琼脂糖

亲和层析分离。自从Knecht等⁽⁴⁾1971年第一次分离得到单一的NHP_{B15}以来,目前已分离得到十几种单一的NHP,并对它们的性质进行了一些研究(见表3)。但是在这些单一的NHP中直接与基因转录控制有关的蛋白质还是比较少的。其中NHP_{C14}能促进(³H)-UTP的掺入,使DNA的转录模板能力增加30%。

二、染色体非组蛋白的特点和性质

组成和非均一性:染色体非组蛋白通常也称酸性蛋白。其氨基酸组成与组蛋白的不同,所含酸性氨基酸(谷氨酸、门冬氨酸)多于碱性氨基酸(精氨酸、赖氨酸和组氨酸)。如表2所示,NHP的酸性氨基酸与碱性氨基酸的比率大于1,然而也有少数NHP呈中性或碱性,所以把这类染色体蛋白质称为染色体非组蛋白比称“酸性蛋白”更为确切。

表3 纯的染色体非组蛋白

来源	蛋白质	酸性/碱性氨基酸	N-末端	分子量
Novikoff 肝癌	NHP B15	1.7	丝氨酸	65000
鼠肝	O ₂	2.7	谷氨酸	49100
牛胸腺	低分子量 NHP	1.4	甘氨酸	31200
牛胸腺	HMG ₁	1.1	甘氨酸	27500
	HMG ₂	0.7	甘氨酸	27500
	HMG ₇	0.6	甘氨酸	
	HMG ₁₇	0.7	脯氨酸	
狗肝	低分子量 NHP	2.6	丝氨酸	7900
牛胸腺	A ₂₄	0.93	甲硫氨酸	27000
Ehlich 腹水瘤	转录抑制剂	1.42		10—11000
小鼠肝	磷蛋白			10—11000
牛淋巴细胞	NH ₃₀₀₀₀	1.4	精氨酸	30000
Novikff 肝癌	NAg-1 蛋白	1.4—1.0	精氨酸	26000
Novikff 肝癌	C ₁₄	1.8	精氨酸	70000
鼠肝染色体	BA 蛋白	0.9	精氨酸 (羧基末端)	31000

由不同来源的染色质分离得到的NHP是非常不均一的,含有许多有关细胞核代谢的酶类,如与DNA合成和修复有关的DNA聚合酶及连接酶,与RNA合成有关的RNA聚合酶,与蛋白质加工、降解有关的蛋白酶,以及与核

酸和蛋白修饰有关的酶类（甲基化酶，乙酰化酶，磷酸激酶，去甲基化酶，去乙酰化酶，磷酸酶等）。除酶类以外，在 NHP 中还有一些具有结构功能的蛋白质。然而，更引起人们注意的 NHP，是那些可能含量很少而对基因表现有调节作用的成分。

NHP 中磷酸含量是相当高的，其中丝氨酸和苏氨酸易被磷酸化，而且磷酸盐的转换速率很快，所以 NHP 的磷酸化是 NHP 重要的代谢性质。NHP 还含有硫醇基。更值得注意的是 NHP 存在色氨酸，而组蛋白中无此氨基酸，这可作为特异标记 NHP 的基础。

用 SDS 凝胶电泳分析 NHP，发现 NHP 比组蛋白复杂得多，包括 12—18 种主要成分，和 50 种稀有成分，其分子量范围是 1 万—10 万。由于 NHP 的不均一性，引起人们更进一步研究。利用双向凝胶电泳如“酸—尿素系统”电泳法，或丙烯酰胺凝胶电泳的等电聚焦电泳与 SDS 凝胶电泳联合技术，发现啮齿类动物和鸡组织的染色体 NHP 具有范围较广的分子量和等电点，通过染色测到 50—100 种蛋白质。利用 Peterson 等⁽⁵⁾所介绍的同位素标记细胞蛋白质，与高分辨率的双向凝胶电泳（等电聚焦 SDS 电泳）相结合的技术，可将 HeLa 细胞染色质的 NHP 分离成 450 种之多。大多数是稀有成分，然而其中有 60 多种蛋白质类似于在核质和细胞质中所测到的。

目前要准确地估计存在于真核生物细胞核中的基因调节蛋白的数量还是比较困难的。通常认为调节一个基因的特异蛋白的拷贝数为 10^3 — 10^4 ，因而用一般的凝胶电泳测定不能满足要求，Peterson 等人所介绍的方法可以部分地完成这一任务。

NHP 的这种不均一性可能与抽提它时所用去垢剂（SDS）的浓度有关系，因为 SDS 是一种解聚剂，它的浓度不同可以引起 NHP 解聚程度的差异。另外，NHP 的数目和种类也与分离和分级分离它的方法有关。因此在解释 NHP 的不均一性时必须谨慎。

组织和种属特异性：有不少学者利用 SDS 凝胶电泳技术，对 NHP 的组织 and 种属特异性进行了比较研究。许多实验表明：不同种属动物的相同组织，如大白鼠，小白鼠和鸡的肝脏，其染色体非组蛋白电泳图谱是相似的。在鼠肝发育再生时期，其 NHP 的差异主要也是数量的变化。然而，同一种动物的不同组织其染色体 NHP 的电泳图谱却是有组织专一性的。如发现鸡网织红细胞 NHP 的电泳图谱比鸡肝脏染色体 NHP 多一条带；鸡脑的 NHP 与其网织红细胞 NHP 大部分是相同的，而少量的 NHP 却非常不同。Wu 等⁽⁶⁾利用 SDS 凝胶电泳比较了鼠的肝、肾、脾、肺、胸腺、甲状腺和脑组织染色体 NHP，发现大部分电泳带是相同的，只有少数 NHP 是组织专一的，特别是脑组织的 NHP 与其它组织的 NHP 差异更大。Wu 等也比較了不同种属的相同组织的 NHP，他们把除鱼以外的多种脊椎动物如鼠、猪、乳牛、鸡、海龟和蛙的肝脏与肾脏的 NHP 进行了凝胶电泳比较，资料表明，在这些动物中，NHP 的变化比组蛋白大，而有少数电泳带对所有组织似乎是不变的。

上述事实说明，NHP 有其组织和种属特异性。在不同动物组织中存在着大量相同的 NHP，这些 NHP 大概就是酶蛋白和结构蛋白，对各种组织是共同的。由于这些蛋白质的大量存在，可能掩盖了集中在核内的为数不多的基因调控蛋白，因为数量少不易检测出来，但这却是一类更重要的有组织专一性的蛋白。

合成与转换：早已知道，NHP 和组蛋白先在细胞质核糖体上合成，而后再进入细胞核中。但是，组蛋白主要是在细胞周期的 S 期合成，而 NHP 的合成则发生在整个细胞周期。NHP 的合成速率比组蛋白快，激素刺激细胞后 NHP 的合成速率明显增加。

翻译后修饰：翻译后 NHP 的修饰引起人们极大注意，翻译后 NHP 可被磷酸化，乙酰化，甲基化等修饰，最主要的是磷酸化。表 2 表明 NHP 经羟基磷灰石柱层析后各部分的含磷程

度。NHP磷酸化与改变基因的表现有关系。另外，有人报道了NHP翻译后能发生多聚腺苷二磷酸核糖基化作用。

三、染色体非组蛋白对真核细胞 基因转录的调节

关于DNA、染色质或染色质中特定基因转录性质的研究，多采用体外染色质重组技术和分子杂交方法。所谓染色质体外重组技术，是把不同来源的染色质预先分成它的组分DNA、组蛋白和非组蛋白，然后再将不同来源的不同组分以不同的比例在体外组合起来，研究各个组分之间的相互作用。实验证明，体外重组的染色质和天然染色质所转录的RNA是极相似的。所谓分子杂交方法，是利用DNA变性后成为单链，并能与相应的RNA有互补作用这一特性，来测定DNA样品中某一基因的存在。它既用来测定某个基因的存在，也可测定由特定基因所转录的RNA产物。在研究特定基因转录时，所用的分子杂交技术与上述有所不同，是反过来作的，即利用特定基因的RNA转录产物为模板，以四种脱氧核苷三磷酸（一种是用同位素标记的）为底物，在依赖于RNA的DNA聚合酶（即逆转录酶）存在下，得到与RNA模板互补的标记DNA，以互补的DNA作为一个探针，经过分子杂交来检测是否存在特定基因的转录产物RNA。

1. 染色体非组蛋白对DNA选择性转录的调节⁽⁷⁾

NHP选择性激活DNA转录：在Ehrlich腹水肿瘤细胞RNA聚合酶反应体系中，以与RNA聚合酶同源的DNA作模板，当加入由腹水肿瘤细胞提取的NHP时，激活了RNA的体外合成。这一激活作用对DNA模板和RNA聚合酶体系都是专一的。因为以牛胸腺、鼠肝和鸡红细胞来源的DNA代替肿瘤DNA作模板时，则肿瘤细胞NHP对RNA合成并没有激活作用，如图1所示。当改变RNA聚合酶体系时，这一NHP对RNA的合成也无激活作用。事实上

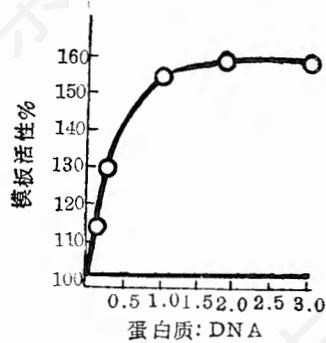


图1 NHP 选择性激活 DNA 转录
—○—腹水肿瘤 DNA
—●—牛胸腺 DNA、鼠肝 DNA、鸡网织红细胞 DNA

这一NHP是用与其同源的DNA-纤维素亲和层析制得的，因而表明了NHP的某些成分能够识别并结合到腹水肿瘤DNA特异的核苷酸序列上。把上述腹水肿瘤DNA降解成大约500—600个核苷酸对长的片段，与NHP作结合实验，发现起激活作用的NHP仅仅结合到单拷贝DNA序列上，没有或很少结合到重复的DNA序列上（见图2）。

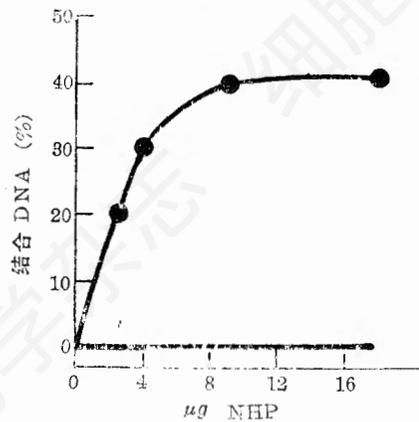


图2 NHP 与 DNA 的选择性结合(¹²⁵I-DNA)
—●—单拷贝 DNA
—重复 DNA 序列

NHP激活以单拷贝序列DNA为模板的RNA转录的起始反应：NHP专一地结合到单拷贝DNA序列上，并引起转录活性增加。用[r-³²P]、ATP、GTP和[³H]-UTP作RNA聚合酶反应体系的标记底物，在NHP存在或

缺少的情况下进行RNA的合成。当NHP存在下合成RNA时, $[r-^{32}P]$ -ATP的掺入速率成倍的增加, $[^3H]$ -UTP掺入是平行增加, 而对 $[r-^{32}P]$ -GTP的掺入没有什么影响。在RNA的合成反应中, 不管NHP存在与否, RNA产物的平均链长大约是相同的。一般认为RNA的合成是以ATP或GTP作为5'末端核苷酸开始的, 所以上述结果表明NHP只激活RNA的起始反应, 并不促进RNA链的增长(见图3)

综上所述, 起激活作用的NHP, 能够识别并专一地结合到同源的单拷贝DNA序列上, 从而激活其转录, 并通过激活RNA合成的起始反应来实现。

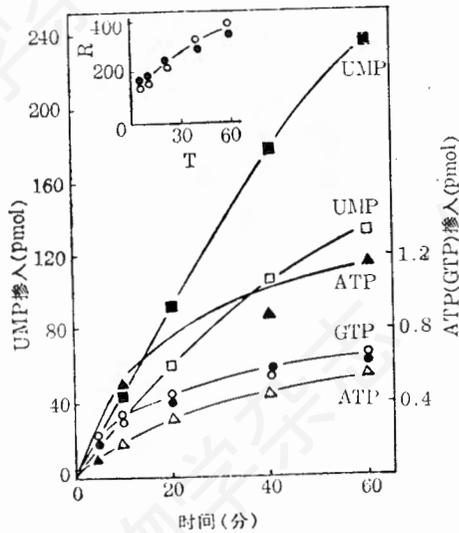


图3 腹水肿瘤 NHP 对 RNA 合成和链起始的影响

●■▲—— 有NHP 存在
○□△—— 无 NHP 存在

另外, 从Ehrlich腹水肿瘤细胞染色质分离得到另一类NHP, 它们对DNA体外转录有抑制作用。

NHP与DNA的结合: 为确定这类起抑制作用的NHP与DNA的相互作用是否有选择性, 首先把Ehrlich腹水肿瘤细胞DNA降解成含有重复序列和单拷贝序列的DNA片段, 利用硝酸纤维素膜过滤的结合分析法, 检查了这类NHP与DNA相结合的能力, 发现NHP仅仅

结合到重复的DNA序列上, 很少结合到单拷贝DNA序列上。

NHP对DNA转录的抑制: 把这类NHP加到以同源的双链DNA为模板, RNA聚合酶II反应体系中, 可以看到, RNA的合成受到抑制。当以变性的DNA为模板时则无抑制作用(见图4)。当用大肠杆菌RNA聚合酶时, 也无抑制作用。同时发现, NHP抑制RNA的合成是发生在用重复的DNA序列作模板, 而不是用单拷贝的DNA序列作模板。

NHP抑制以重复的DNA序列为模板的

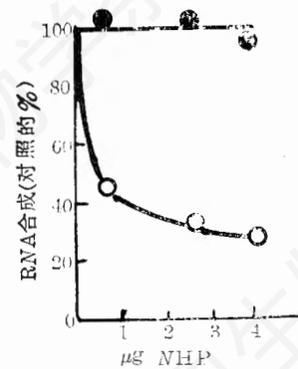


图4 Ehrlich 腹水肿瘤 NHP 对依赖于 DNA 的RNA 合成的抑制

RNA链合成的起始反应, 而对RNA链的延长并不起作用。

因此, 起抑制作用的NHP优先地抑制同源的重叠DNA序列的转录活性, 有组织专一性, 对RNA聚合酶也有严格要求。

然而, 更多的研究证明, NHP与“裸露”的DNA相复合时, 不能改变DNA的模板活性, 而只有与DNA-组蛋白复合物相作用时才增加DNA的模板活性, 关于这一点下面将述及。

2. 染色体非组蛋白对染色质转录的调节

利用染色体体外重组技术, 对真核细胞基因表现, 染色质的结构与功能进行了许多研究, 而天然的或重组的染色质则是研究基因转录功能的理想模板。实验指出, 染色质的转录模板活性只是游离DNA转录模板活性的十分之一左右, 其原因就在于: 组蛋白在基因表现的调

节控制中作为非特异的抑制者，与DNA的任何区段都可作用，掩盖了RNA合成的起始位点，从而降低了那一区段的模板活性。与此相反，NHP可能“激活”DNA-组蛋白复合物的模板活性，或者说是解除组蛋白的抑制作用，从而促进DNA-组蛋白复合物中DNA的模板活性。

Bekhor 等人^(8,9)从兔肝染色质中分离出三种不同成分的NHP M₀、M₁和M₃，他们研究了这三部分NHP对DNA-组蛋白复合物转录及圆二色性光谱的影响。结果发现这三部分NHP不影响“裸露”DNA的转录活性，但对DNA-组蛋白复合物却有不同程度的影响（见图5）。在限制聚合酶酶量的条件下，以复合物为模板，M₀刺激 [³H]-UTP 掺入到RNA中的量，达到以DNA为模板时掺入量的44%，M₃的影响大于M₀，可以达到47%，M₁对DNA-组蛋白复合物的转录几乎没有影响。他们发现M₀和M₃以不同的机理增加RNA的合成，M₀是通过全面影响DNA-组蛋白复合物的构象来刺激RNA的合成，而M₃则是通过增加RNA聚合酶结合到DNA-组蛋白复合物上的数量来增加RNA的合成，这一结论是与圆二色性光谱的测定结果相吻合的。由于M₀对DNA-组蛋白复合物的作用，使其圆二色椭圆率由5100增加到6900（度·厘米²/克分子），这反映了M₀使复合物构象发生变化的结果。

Gilmour 等⁽¹⁾按图6设计了兔胸腺和骨髓细胞染色质重组实验，在聚合酶存在下，重组的兔胸腺和骨髓细胞染色质分别能转录胸腺RNA和骨髓RNA，当把胸腺和骨髓的DNA、组蛋白混合在一起，加入胸腺NHP时，重组的染色质能转录出胸腺RNA，而把胸腺与骨髓的DNA、组蛋白混合在一起，加入骨髓的NHP时，则重组染色质转录出骨髓RNA。实验有力地说明，组织专一性非组蛋白的出现，就决定组织中那个基因的转录。当NHP“激活”转录时，NHP的组织专一性还可以通过组织同源的NHP“激活”能力大于组织异源的NHP这样的事实来说明（如图5所示）。

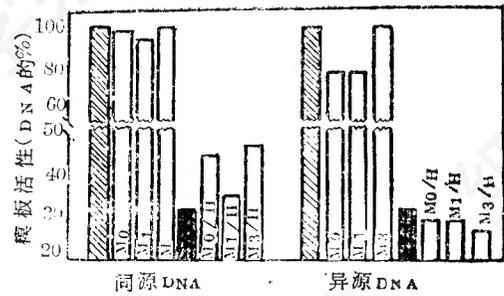


图5 NHP 对 DNA 和重组染色质模板活性的影响
 斜线 DNA
 黑 DNA+H(1:1) (H: 组蛋白)
 M: DNA+NHP(M₀ M₁ M₃)
 M/H: DNA+H+NHP(M₀ M₁ M₃)
 同源: 兔
 异源: 鸡 DNA+H
 M₀ M₁ M₃ 由兔染色质得到

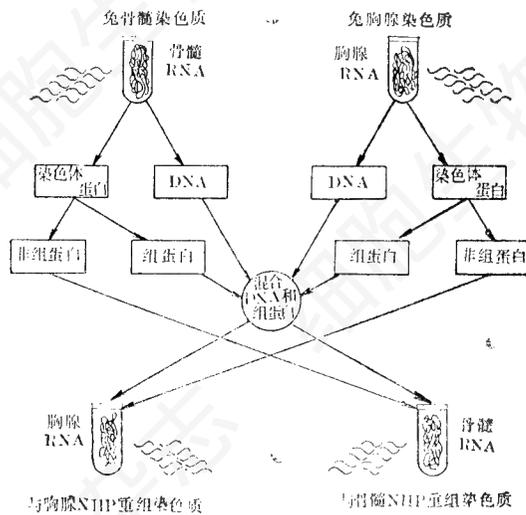


图6 染色质重组实验

3. 染色体非组蛋白对真核细胞特定基因转录的调节

关于真核细胞特定基因（有专一性生物功能的基因）表现的研究大都集中在rRNA基因、5SRNA基因、组蛋白基因、珠蛋白基因和卵白蛋白基因。因为这些基因在真核细胞中有很大的重复性，或存在于特定组织的细胞中（如输卵管细胞等），或存在于细胞周期的特定时期，便于分离纯化，分析鉴定。

Stein 等⁽¹¹⁾以Hela细胞的不同周期作为

研究真核细胞特定基因表现调节的模式系统，对其组蛋白基因的表现作了较为广泛的研究。他们以与组蛋白 mRNA 互补的 [³H]-标记的单链DNA作为探针，来分析组蛋白mRNA序列的存在与否。他们发现，在细胞周期的S期，亦即DNA复制期，在其染色质转录物中含有组蛋白mRNA序列，而在细胞周期的G₁期却没有组蛋白mRNA序列。染色质重组实验证明，当在DNA复制的细胞周期时，NHP对组蛋白基因转录的活化起着一种关键性的作用。为验证NHP在调节组蛋白基因方面的功能，如图7所表示的，他们把G₁期、S期染色质进行了分解，设计了一系列重组实验，结果见表4。通过上述实验说明，同一基因在不同细胞周期的活动状况不同，而不同细胞周期的NHP对同一基因的影响不同，只有S期NHP才是组蛋白基因转录的调节蛋白，对组蛋白基因的活化起着关键作用。

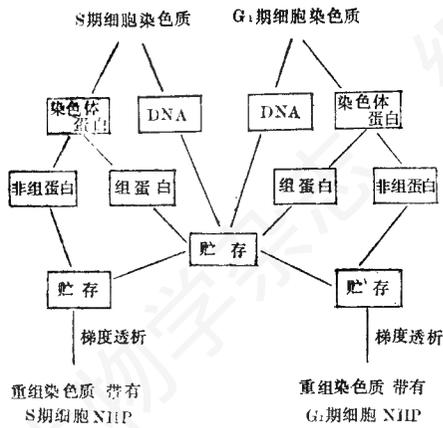


图7 HeLa 细胞染色质重组实验

MacGillivray等人⁽¹⁾研究了NHP对珠蛋白基因转录的调节。他们以十四天小鼠胚肝为材料，提取了胚肝染色质，在大肠杆菌RNA聚合酶存在下进行了体外转录，以与珠蛋白mRNA互补的DNA为探针，作分子杂交，发现在转录产物中含有珠蛋白mRNA。把染色质溶解在含2M NaCl-5M尿素的tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液中，此时染色质DNA与蛋白质分离，再

用梯度透析技术使之重组，其转录活性与天然

表4 NHP 对Hela 细胞组蛋白基因转录的调节

模板类型	外加蛋白质类型	转录产物 (组蛋白-mRNA)
S期重组染色质		有转录产物
G ₁ 期重组染色质		无转录产物
G ₁ 期重组染色质	S期NHP	有转录产物, 随NHP量而增加
G ₁ 期重组染色质	S期组蛋白	无转录产物
G ₁ 期重组染色质	G ₁ 期NHP (其它类型)	无转录产物
S期重组染色质	G ₁ 期总染色质蛋白	对S期染色质转录无影响

染色质转录活性的程度相似。如前所述，他们进一步用羟基磷灰石柱层析，把胚肝染色质分成为H₁、H₂、H₃和H₄四部分 (H₁为组蛋白，H₂-H₄是对羟基磷灰石亲和力不同的NHP部分)，将DNA-H₁复合物分别与H₂、H₃和H₄重组，可以观察到这些重组染色质对珠蛋白mRNA转录的程度是不同的，其中H₂部分对转录的活化最高 (见图8)。上述实验证明，鼠胚肝珠蛋白基因的转录是由胚肝中特异的一类NHP控制的。

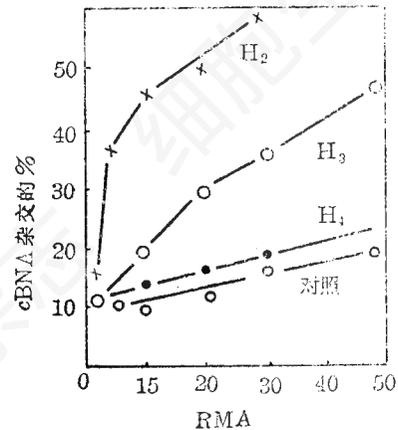


图8 由DNA、组蛋白和经羟基磷灰石层析的NHP重组染色质的RNA转录物对互补DNA的滴定

通过羟基磷灰石分析，分别将鼠胚肝染色质和成年鼠脑染色质的蛋白质部分分离成组蛋白和NHP，将胚肝或脑的NHP与鼠的DNA和组蛋白重组，进行体外转录实验，以珠蛋白互补DNA为探针检测转录物，发现只有与胚肝

NHP 重组的染色质才有杂种分子形成,对脑的 NHP 是无效的。这一实验说明,决定珠蛋白基因转录的组织专一的 NHP,只存在于胚肝而在脑组织中并不存在。这进一步说明,同一基因在不同组织中活动状况不同。

Chiu 等⁽¹²⁾也对鸡的网织红血球珠蛋白基因进行了研究,得到了与上述类似的结果,证明只有网织红血球染色质的 NHP 的某一部分,可专一地调节珠蛋白基因的转录,并且具有组织专一性。

鸡输卵管是研究基因表现调节控制的一个理想的模式系统。O'Malley 等⁽¹³⁾利用类固醇激素处理未成熟的母鸡,引起输卵管的急剧生长和分化,诱导出专一性的卵白蛋白。他们从激素处理的鸡输卵管中分离出染色质,把它们作为研究体外转录的模板,为了解类固醇激素调节基因表现的机理,他们作了多年的工作,并提出了类固醇激素调节鸡输卵管卵白蛋白基因表现的作用模型。概括起来,即类固醇激素进入靶细胞,与细胞质激素受体相结合,形成激素-受体复合物,随后转移到细胞核里,通过与染色质的相互作用行使调节功能。应该指出的是,激素刺激鸡输卵管卵白蛋白 mRNA 合成的同时,鸡输卵管染色质 NHP 的合成也相应增加,这与其他研究者关于 NHP 调节基因表现的结论是一致的,并认为是在转录水平上行使功能。

四、真核细胞基因转录的调节机理

基因表现的调节和控制是当前分子生物学集中研究的问题之一。其基本问题是,如何选择地转录基因组的特定区域,或者确定的基因如何被“打开”和“关闭”。关于真核细胞基因表现的调节和控制有多种解释,认为(1)可能存在类似于原核细胞如乳糖阻遏蛋白那样的调节蛋白,负责真核基因转录的调节。研究表明,某些特异的 NHP 以一种专一的方式结合在 DNA 上,而对同源 DNA 的一定序列有其特异性。(2)各种 RNA 聚合酶对基因表现的

调节,如真核细胞 RNA 聚合酶 I 负责 rRNA 的合成, RNA 聚合酶 II 负责 mRNA 的合成, RNA 聚合酶 III 负责 5S RNA 和 tRNA 的合成。用同源的 RNA 聚合酶 II 由染色质转录珠蛋白 mRNA 序列时的转录产物比用大肠杆菌 RNA 聚合酶时约高出三倍,鸡输卵管 RNA 聚合酶比异源的 RNA 聚合酶转录更多的卵白蛋白 mRNA 序列。

(3) 染色质亚单位局部构象的改变可能是调节基因表现的重要环节之一,这种调节作用可能与结合在染色质上的蛋白质有关系。体外重组实验表明, NHP 对 DNA-组蛋白复合物的调节作用,大概是它能使 DNA-组蛋白复合物的构象发生变化。(4) 染色质 RNA 对基因表现也可能有调节作用。

关于 NHP 对基因表现的调节问题,目前的看法是,作为染色质 NHP 主要成分的磷酸化的 NHP,在调节真核细胞基因转录中起着关键作用。Stein 等⁽¹⁰⁾用分离出磷酸化的 NHP 和把已磷酸化的 NHP 再去磷酸化的方法,来确定 NHP 磷酸化对特定基因 (Hela 细胞组蛋白基因) 转录的影响。他们从 Hela 细胞染色质中分离出四种磷酸化程度不同的 NHP,分别与 G₁ 期染色质重组,同时检测组蛋白、mRNA 序列产物的多少,发现只有两种磷酸化程度较高的 NHP 对 G₁ 期染色质有“活化”或“去抑制”作用,有组蛋白 mRNA 的产物,其它两种 NHP 没有这一作用。没有转录产物,因为 G₁ 期染色质本身是不能转录组蛋白 mRNA 的。用固相碱性磷酸单酯酶将 Hela 细胞 S 期 NHP 部分地去磷酸化(约去掉 60% 的磷酸基团),然后再与 DNA 及 S 期组蛋白重组,进行体外转录,发现组蛋白 mRNA 序列转录物减少了 70% 以上。上述两个实验有力地说明了 NHP 磷酸化对特定基因转录调节的重要性。

总之,关于 NHP 对基因表现调节的机理,目前尚未完全阐明。通常认为 NHP 能识别特定的 DNA 序列及其特异的空间结构。由于 NHP 磷酸化,使带负电荷的 NHP 在 DNA 识别位点附近与带正电荷的组蛋白相结合,导致 DNA-组蛋

白复合物构象发生变化, 这时组蛋白-非组蛋白复合物可能发生部分地转移, 使DNA裸露, 暴露出更多的RNA聚合酶结合位点, 从而促进了模板活力, 使转录活性增加, 起着正调控的作用。

近年来的研究表明, 虽然染色体非组蛋白具有调节基因表现的功能, 然而迄今还未解决在真核细胞中用某种单一的NHP专一地调节基因表现的问题, 要解决这一问题, 就需要分离单一的NHP。假如我们能将有调节基因活动功能的特异的蛋白分离出来, 用它调节和控制某种基因的表现, 有可能实现人类对疾病及生物生长发育的控制。另一方面, 我们还可以分离纯化具有特定生物功能的DNA片段, 与组蛋白、非组蛋白进行体外重组, 研究这一具有特定功能的重组染色体的体外调控机理, 更进一步阐明真核细胞基因表现的调节问题。

本文承陈德高同志审阅, 特此致谢

参 考 文 献

- (1) R. Stewart Gilmour and A. J. Mac Gillivray: The molecular Biology of Hormone Action, 15—27, 1978.
- (2) Gordon T. James, et al.: Biochem. 16, 2384—2389, 1977.
- (3) Joseph J. Catino, et al: Biochem. 17, 983—987, 1978.
- (4) Margarete E. Knecht and Harris Busch: Life Science 10, 1297—1309, 1971.
- (5) Jane L. Peterson, and Edwin H. McConkey: J. Biol. Chem. 251, 548—554, 1976.
- (6) Wu, F. C., et al.: Biochem. 12, 2792—2797, 1973.
- (7) Tung. Y. Wang, et al.: Progress in nucleic acid research and Molecular Biology 19, 447—462, 1976
- (8) Babrubahan Samal and Isaac Bekhor: Arch. Biochem. Biophys. 179, 527—536, 1977.
- (9) Isaac Bekhor et al.: Arch Biochem. Biophys. 179, 535—544, 1977.
- (10) Gary S. Stein, et al.: Scientific American 232, 47—59, 1975.
- (11) Gary S. Stein, et al.: Biochemical Society Symposium Number 42, "Biochemistry of the cell nucleus", 137—163, 1977.
- (12) Jen-Fu Chiu, et al.: J. Biol. Chem. 250, 9431—9433, 1975.
- (13) Bert W. O'Malley and Anthony R. Means: Progress in nucleic acid research and Molecular Biology 19, 403—419, 1976.

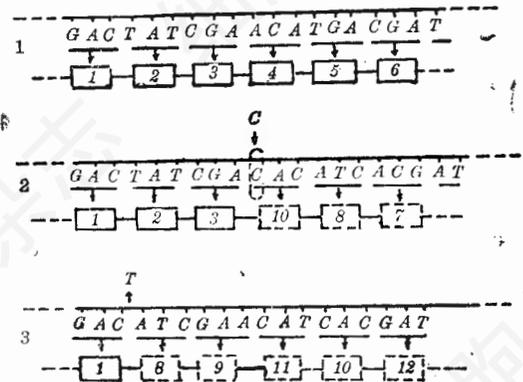
名 词 解 释

移码解读

正常情况下, DNA上的核苷酸顺序, 转录在mRNA上后, 在翻译过程中, 每三个核苷酸为一组决定一个氨基酸, 结果产生一正常的多肽(右图1)。但如果DNA模板的正常核苷酸顺序中插入或缺失一个或多个(只要不是3或3的倍数)的核苷酸, 在解读时即因起点移位, 被“读”出的是一系列新的三联密码, 翻译成一系列不同的氨基酸, 结果在肽链合成中插入了一段不正确的氨基酸顺序(右图2, 3)。这样引起的突变叫移码突变(Frameshift mutation)。这种突变可由校正抑制补偿。

组织者 (Organizer)

德国胚胎学家史培曼 (Spemann) 在1928年发现



把蝾螈早期原肠胚的背唇移植到另一胚胎腹面时, 能形成次级胚胎。移植的背唇能诱导外胚层形成神经系统, 同时还能和寄主组织一起, 调整成为中轴器官, 因此称为“组织者”。由背唇的初级诱导作用发动的一连串诱导锁链, 导致各种器官的逐步发育。