



小牛胸腺染色质核小体核心 颗粒的 ultrogel 柱层析分离和鉴定*

卫林祥 黄加陵 张志新

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

真核细胞染色质的研究引人注目的进展之一,就是真核细胞染色质亚单位结构的发现^{1,2}。愈来愈多的证据证明,几乎所有真核细胞的染色质均存在着念珠状相间排列的亚单位结构——核小体(nucleosome)³。研究者们曾采用多种方法分离、提纯核小体,并进行分析研究。本文报导用一种树脂(ultrogel AcA 22)分离核小体核心颗粒,同样获得预期的效果,而且效率较高,周期短。

材料和方法

1. 细胞核的制备 取新鲜的小牛胸腺(上海市牛奶公司提供),参照Jerzmenwshi等人的方法⁴制备细胞核。

2. 细胞核的消化 将细胞核按 $10 A_{260}/$ 毫升的浓度悬于酶消化液(0.25M蔗糖、0.01M tris-HCl、1mM氯化钙、pH7.3)中,然后加入小球菌核酸酶(10单位/毫升),于37°C温育不同时间。在冰浴中加入0.1M NaEDTA (pH7.0),使最后浓度为10mM,以终止反应。

3. 核小体的柱层析分离 使用ultrogel AcA22树脂,柱型 2.5×45 厘米,以0.7 mM EDTA、10mM trisHCl (pH7.3)溶液平衡柱体和洗脱。

4. DNA片断的聚丙烯酰胺凝胶电泳 将柱分的峰部样品按marmur的方法⁵分离DNA片断。聚丙烯酰胺凝胶电泳参照Maniat-is⁶和Varshavsky⁷的方法。板胶大

小为 $0.3 \times 18 \times 20$ 厘米。以溴酚兰为移动标记,电泳后凝胶用甲苯胺兰染色,蒸馏水脱色。

5. 电镜标本的制备 经柱分得到的各峰部样品用洗脱液稀释至适当浓度,用载有碳膜的铜网取样。然后经戊二醛(pH7.4)固定,1%磷钨酸和1%醋酸铀酒精溶液染色,最后经水洗涤后自然干燥。部分样品染色后,再用铂丝旋转投影。

结果和讨论

1. 核小体核心颗粒的分离

我们的方法包括三个主要步骤:

首先,分离制备细胞核。我们曾于预备实验中注意到,如先破核然后再行消化时,破核后逸出的染色质极易形成溶解性很差的胶状团块。这种染色质团块不如均匀分散的细胞核那么容易消化,结果导致核小体产率的下降。在文献中,也有染色质在分离时容易断裂损伤以致影响核小体结构完整性和产量的报导⁸。所以,我们采用了在离子强度比较适宜的溶液和温和的匀浆条件下分离核,再用上述同样溶液,而非另一些研究者所用的易于破核的酶消化液进行洗涤⁹的方法。如此获得的细胞核,不仅纯度高,而且避免了染色质的机械损伤,使染色质依然保持了对核酸酶的天然敏感性。这就为进一步分离制备奠定了良好的基础。

* 电镜工作得到王幽兰、高奇蓉以及电镜室同志的协助,谨致谢意。

第二, 细胞核的消化。由于染色质蛋白质沿着DNA链的有规则的排列, 染色质在以小球菌核酸酶作短时间的温和处理时, 使首先在亚单位之间的DNA区域切开, 而得到核小体和核小体的各种寡聚物。随着消化的继续, 核小体DNA片断末端降解而转化为含有140碱基对DNA和8个组蛋白分子的核心颗粒。如作进一步消化, 核心颗粒一面逐步积累, 一面也开始了核心颗粒内部的降解^{3,4}。所以选择合适的消化时间, 往往是保证核心颗粒高产率的一个重要关键。我们通过不同消化时间的比较(图1)发现, 在我们的消化条件下, 60分钟消化时, 大部分酶解片段已转化为核心颗粒, 而核心颗粒内部的降解又不很明显, 因而这个消化时间较为适宜。

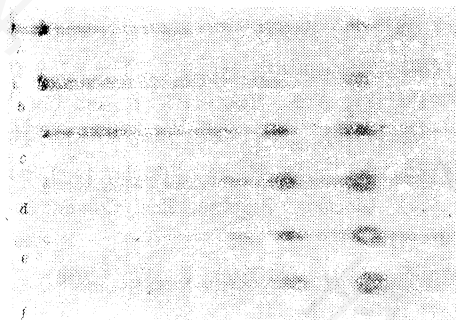


图1. 从不同消化时间的酶解液中抽提的DNA样品的电泳图谱

图中 a, b, c, d, e, f 分别表示 5, 10, 30, 60, 90, 120 分钟消化时间的样品

关于酶消化液盐浓度的选择, 一方面有使用0.1M—0.5M NaCl可以避免电荷效应而有利于核小体分离的报导^[8], 但也有在NaCl溶液中一些染色质蛋白质可被抽提, 另一些可能重新安排的报导^[10]。为了尽量保持核小体的天然状态, 我们选用了不含NaCl的酶消化液, 结果表明对分离效果并没有什么不良的影响。

第三, ultrogel AcA22柱层析分离。洗脱峰形如图2所示。峰I为核小体的寡聚体, 峰II为核小体的核心颗粒。我们把ultrogel-AcA22树脂同Sephrose 2B树脂作一比较, 除洗脱峰形大体相似外, 前者优于后者: 一、

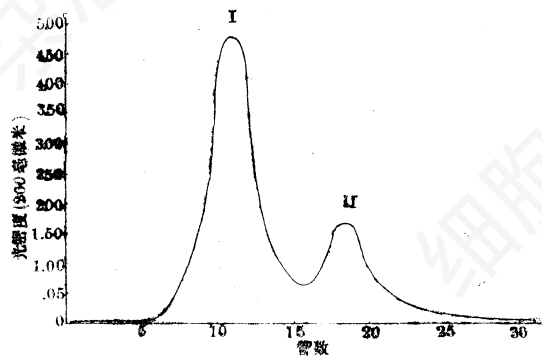


图2. 小球菌核酸酶酶解—ultrogel AcA22柱分洗脱型

ultrogel AcA22柱的流速快, 从而使实验周期大为缩短; 二. ultrogel AcA22柱装好之后, 可反复上柱分离达10次之多, 而流速和分离效果仍无明显改变。三. ultrogel AcA22柱分离核小体核心颗粒的产率, 可达起始DNA量的20%左右。

2. 核小体核心颗粒的鉴定

(1) 聚丙烯酰胺凝胶电泳 首先, 直接将ultrogel AcA22柱分的峰II部分(DNP), 放在浓度为5%的聚丙烯酰胺凝胶板上进行电泳鉴定。结果如图3所示。未经柱分的酶解

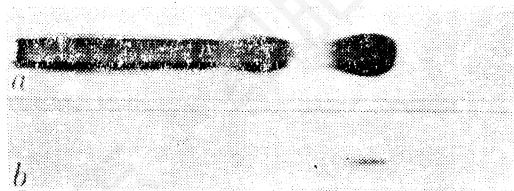


图3. DNP在5%聚丙烯酰胺凝胶上的电泳图谱

- a. 未经柱分的酶解液。
- b. 经ultrogel AcA22柱分后的峰II。

液, 经电泳分离为四条带; 而经柱分之后的峰II, 却以一条单一的带子, 在相应于酶解液移动最快的带子处出现。这无疑表明, 峰II所含的就是酶解液中迁移最快的组分, 通过柱分之后, 它已同其它组分完全分离。

然后, 我们再将由峰II抽提得到的DNA, 放在浓度为3.5%的聚丙烯酰胺凝胶板上进行鉴定。电泳结果表明, 峰II的DNA同样在相应位置以单带出现(图4)。我们测定了这条电泳带相对于溴酚兰的相对迁移率, 然后根据

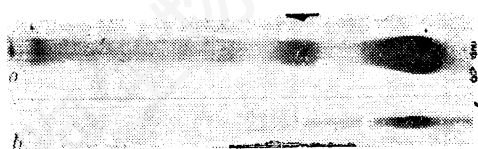


图4. DNA在3.5%聚丙烯酰胺凝胶上的电泳图谱

- a. 未经柱分的酶解液中抽提的DNA,
b. 经ultrogel AcA22柱分峰II中抽提的DNA.

Maniatis^[6]的已知长度DNA片段的相对迁移率进行了换算,发现这条带子所代表的DNA片段的长度为 140 ± 5 碱基对,这同迄今已为大多数研究者确认的核心颗粒的DNA长度140碱基对正好相符^[3],从而证明了我们通过ultrogel AcA 22柱得到的峰II部分,确系核小体的核心颗粒。

(2) 电镜观察 用电镜对ultrogel AcA 22柱分得到的各峰部样品进行鉴定。峰I样品在电镜下虽然可以看到有大小与核小体相仿的球形颗粒,但却有大量的、大小不等、形状各异的染色质片段,镜面显得十分混杂。相反,峰II部分在电镜下已看不到染色质片段。满视野基本上尽是均一整齐的球形颗粒(图5)。

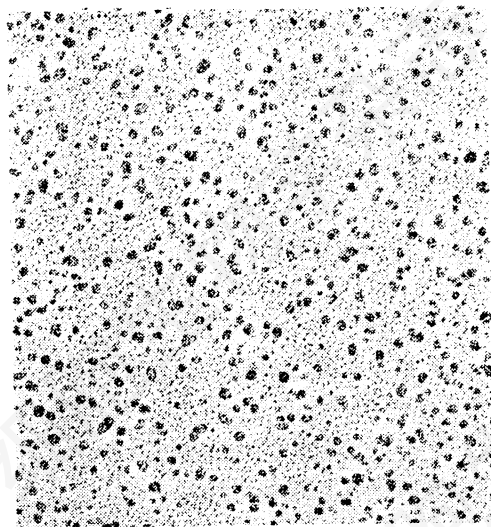


图5. 经ultrogel AcA22柱分的峰II样品的电镜照片(投影) $\times 72000$

颗粒的直径一般为 $75-100 \text{ \AA}$,投影后略有增加。因此,无论颗粒的形状或颗粒的大小,均同其它研究者报导的^[11]极为相似,说明我们

得到的峰II,确是较纯净的核小体核心颗粒。

总之,在分离核小体核心颗粒的过程中,由于我们注意掌握了较为合适的细胞核分离和酶解的条件,和选用了ultrogel AcA22这种较为理想的树脂,而使本文报导的方法,成了一个速度快、效率高,而分离效果又好的核小体核心颗粒的分离法。

参 考 文 献

- [1] Hewish, D. R. and Burgoyne, L. A. (1973). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 52: 504-510.
- [2] Kornberg, R. D. (1974). *Science* 184: 868-871.
- [3] Kornberg, R. D. (1977). *Ann. Rev. Biochem.* 46: 931-954.
- [4] Jerzemswhi, A., et al., (1976). *FEBS Letters.* 62: 251-254.
- [5] Marmur, J. (1961). *J. Mol. Biol.* 3: 208-218.
- [6] Maniatis, T., Jeffrey, A. and Hans van de Sande (1975). *Biochemistry* 14: 3787-3794.
- [7] Varshavsky, A. J., Bakayev, V. V. and Georgiev, G. P. (1976). *Nuc. Acids Res.* 3: 477-492.
- [8] Woodcock, C. L. F. and Frando, L.-L. Y. (1975). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 66: 403-410.
- [9] Woodhead, L. and John, E. W. (1976). *FEBS Letters* 62: 115-117.
- [10] Hancock, R. (1974). *J. Mol. Biol.* 86: 649-663.
- [11] Varshavaky, A. J. and Bakayev, V. V. (1975). *Mol. Biol. Reports* 2: 247-254.

文 摘

不同靶器官的糖皮质激素 细胞受体的功能相同吗?

近年来发现,大鼠的胸腺、肾、白脂肪及肝等不同靶组织的皮质激素受体具有相同的生物学功能: 1) 不同靶组织结合的活性相同 2) 与其它甾体激素如孕酮、睾酮、雌二醇、地塞米松的竞争抑制物的亲和性以及与其它甾体激素的结合情况也彼此相同。然而,不同的靶细胞对同一种皮质激素却表现出不同效应,例如地塞米松能刺激肾细胞合成磷酸烯醇丙酮酸羧激酶,但激素对脂肪细胞中的该酶的合成有抑制作用,这可能反映了激素对不同靶细胞的作用除通过与受体的结合外,还有其它的作用途径

摘自 *J. Steroid Biochem* 1978. 9. 141-145

张仕明