

细胞核单一种类非组蛋白的提取

刘庆莹

(大连医科大学生物化学教研室 116027)

细胞核内非组蛋白蛋白质 (non-histone proteins, 以下简称非组蛋白) 是染色质结构的重要组成部分, 影响染色质的结构与功能^[1]。在细胞周期变化过程中对染色体结构的变化非组蛋白也起至关重要的作用^[2]。此外, 非组蛋白还可以调控核内基因的表达^[3]。所以提取核内非组蛋白用以研究上述诸方面的作用是很有意义的。提取单一种类的非组蛋白一般需多种技术的配合使用, 特别是层析技术的反复使用, 步骤尤为复杂^[4]。本人在加拿大研修期间参考与比较以往方法的优劣, 建立了一种简化提取细胞核单一种类非组蛋白的技术。应用该技术所提取的非组蛋白用于氨基酸顺序分析、制备抗体等多方面研究, 效果很好。鉴于国内有关非组蛋白功能及提取研究报道的较少, 特介绍如下。

材料与方 法

1. 材料

雄性天竺鼠重 180—200 克, 取自加拿大多伦多大学儿童医院动物室。苯甲基磺酰氟(PMSF)、 β -巯基乙醇购自美国 Sigma; 尿素(超纯)氯仿、盐酸和氯化镁系美国 J.T. Baker 公司产品; 十二烷基磺酸钠(SDS)、乙二胺四乙酸钠(EDTA-2Na)为 Schwarz/Mann 公司产品; 两性载体 Ampholine 系 Pharmacia 公司产品; 三羟基氨基甲烷(Tris), Boehringer Mannheim 公司产品。其余试剂皆为分析纯, 购自 BDH。仪器: ϕ 34 pH 计; Unicam sp 1800 紫外分光光度计; Beckman Model J-6 B 型离心机; Beckman Model L 5-50 型超速离心机及 Pharmacia 公司出产电泳装置等。

2. 方法

(1) 鼠肝细胞核提取 大鼠实验前禁食一夜, 断头取肝 60 克, 剪碎, 于溶液 A(0.25 mmol/L 蔗糖、10 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 3 mmol/L Mg-

Cl₂、0.1 mmol/L PMSF) 中匀浆。纱布过滤除去粗残渣、0—4℃离心 2000×g 10 分钟, 弃上清。重复上述步骤, 获取沉淀。沉淀悬浮于溶液 B[0.1% (v/v) Triton-X 100 的溶液 A], 混匀, 0—4℃离心如前, 弃上清。再于沉淀中加入溶液 C(2.2 mol/L 蔗糖、10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 3 mmol/L MgCl₂、0.1 mmol/L PMSF), 混匀。此为肝细胞核悬浮液。取数支超速离心管, 每支管底垫溶液 C 1ml。然后将细胞核悬浮液小心导入上层。重量平衡后, 0—4℃113000×g 离心 1 小时, 弃上清。于白色沉淀中加入溶液 A, 搅拌均匀, 0—4℃2000×g 离心 5 分钟, 弃上清, 沉淀即为纯的细胞核^[5]。

(2) 细胞核酚溶性非组蛋白提取 用 0.14 mol/L NaCl 液(内含 0.1% PMSF) 悬浮细胞核沉淀, 冰浴磁力搅拌 20 分钟。0—4℃2000×g 离心 10 分钟, 弃上清。继用 0.25 mol/L HCl 液悬浮沉淀, 冰浴磁力搅拌 20 分钟。0—4℃2000×g 离心 10 分钟, 弃上清。于沉淀中加入氯仿-甲醇 [1:1(v/v)] 液, 冰浴磁力搅拌 10 分钟。0—4℃离心 10000×g 10 分钟, 弃上清。继用氯仿-甲醇 [2:1(v/v)] 液重复以上步骤。再用乙醚重复上述步骤。将沉淀悬浮于溶液 D(0.1 mol/L Tris pH 8.4, 0.01 mol/L EDTA-2Na, 0.14 mol/L β -巯基乙醇) 中, 室温下加入溶液 D 的饱和酚液进行酚抽提。小心吸取下层酚相, 将酚相液导入透析袋内对缓冲液 I (0.1 mol/L 醋酸、0.14 mol/L β -巯基乙醇) 透析。至袋内酚相为原体积 1/4 时终止透析。除去透析袋内上层水液。再对缓冲液 II (9 mol/L 尿素、0.05 mol/L 醋酸、0.14 mol/L β -巯基乙醇) 透析过夜。最后对缓冲液 III (8.6 mol/L 尿素、0.01 mol/L EDTA-2Na, 0.14 mol/L β -巯基乙醇、0.1 mol/L Tris pH 8.4) 透析 2 小时。

(3) 非组蛋白双向电泳 将酚抽提全非组蛋白浓缩适当体积进行双向电泳。第一向等电聚焦电泳, 总胶浓度 10.5% 含 pH 3.5—10 的两性载体, 胶内尿素浓度为 8.3 mol/L。控制每管电流 1mA, 电压 400V, 电泳 5 小时。第二向 SDS-10% PAGE 平板电泳, 参

照 Laemmli 方法^[6]进行。

(4) 胶内单一非组蛋白提取 将不同板胶内同一位点的非组蛋白切下,用蒸馏水洗涤几次,然后切碎,继用缓冲液(0.05 mol/L Tris pH 7.9、1% SDS、0.1 mmol/L EDTA、1%巯基乙醇)室温浸泡24小时。离心 2000 × g 15 分钟。将上清转移至4%硅油处理过的干净试管内,加4倍体积丙酮于-70℃沉淀蛋白30分钟。离心 10000 × g 15 分钟,弃上清,继用80%冷丙酮将沉淀下来的非组蛋白转移至1.5 ml eppendorf 管内,15000 × g 离心15分钟,倾弃上清,真空干燥后于-70℃储存备用。

结果与讨论

本文报道的单一非组蛋白提取包括细胞核纯化、酚溶性非组蛋白抽提、双向电泳以及胶内单一非组蛋白的提取等步骤。照片系酚抽提后非组蛋白的双向电泳图谱。酚溶性非组蛋白电泳图谱重复性极佳见图版。从不同胶内同一位点切下点非组蛋白,即为同一非组蛋白。继用缓冲液浸泡洗脱下来,最后用丙酮低温沉淀。经本法提取的非组蛋白用于氨基酸顺序分析及其他研究证明确为同一非组蛋白。应用此法近曾提纯了过去加用柱层析过程提取的定名为 B₂ 的磷蛋白^[7],制备了相应的抗体 IgG₂,该磷蛋白经 CNBr 降解获得两个多肽分别为 28 kd 及 14 kd,部分氨基酸序列测定分别是 gly-ile-his-gly-asp-lys-ser-gln-gln-glu-gly-asp-lys-val-leu-asn-glu-pro-ser-tyr 及 val-gly-val-ala-gln-thr-gly-ser-gly-val-thr-lys-ser-tyr-lys。并以此氨基酸顺序为基础进行了基因的研究(文章待发表)。与此同时也用此法纯化了其他6种非组蛋白,制备了其中2种非组蛋白的相应抗体。只有用单一非组蛋白才能更好地进行氨基酸顺序分析^[8]、磷酸化、制备抗体^[9]及对基因调控^[10]的研究。迄今有关单一非组蛋白提取方法

的报道较少,一般都采用层析技术,且需多次层析。因为柱层析费时耗工,而本方法省去层析步骤,在获取核内酚溶性非组蛋白后用双向电泳分离,再切点蛋白获得所需的单一非组蛋白可用于蛋白氨基酸序列分析、制备抗体等研究,因为这种分离单一非组蛋白的方法具有简便可行、重复性好的特点,一般实验室都可以进行,有利于非组蛋白结构与功能的研究。

摘 要

本文报道了一种提取单一非组蛋白的简化方法。在获得核内酚溶性非组蛋白后进行双向电泳。切下胶内点蛋白于缓冲液浸泡抽提,离心得到上清,继用丙酮低温沉淀蛋白。

关键词: 染色质非组蛋白 双向电泳

参 考 文 献

- [1] Nissen, M. S. et al, 1991, *J. Biol. Chem*, 266: 19945—19952.
- [2] Disney, J. E. et al, 1989, *J. Cell. Biol*, 109: 1975—1982.
- [3] Belikov, S. V. et al, 1993, *Nucleic Acids. Res*, 21: 1031—1034.
- [4] Ge, H and Roeder, R. G. 1994, *J. Biol. Chem*, 269: 17136—17140.
- [5] Liew, C. C. and Chan, P. K. 1976, *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, 73: 3458—3462.
- [6] Laemmli, U. K. 1970, *Nature (London)*, 227: 680—685.
- [7] Liew, C. C and Chen, H. Y, 1989, *FEBS. Lett*, 258: 116—118.
- [8] Lewis, J. D. et al, 1992, *Cell*, 69: 905—914.
- [9] Cowan, D. B. et al, 1991, *Biochem. J*, 274: 687—691.
- [10] Stelzer, G. et al, 1994, *Mol, Cell, Biol*, 14: 4712—4721.

THE EXTRACTION OF SINGLE KIND NONHISTONE PROTEIN FROM NUCLEUS

LIU Qing Ying

(Department of Biochemistry Dalian Medical University, 116027)

ABSTRACT

This paper describes a simple method for extracting single kind chromatin nonhistone protein. After obtaining the phenol-soluble nonhistone proteins, the proteins were subjected to two-dimensional gel electrophoresis. The gel containing spot protein was cut off soaked and extracted in the buffer solution. Through centrifuge the supernatant was obtained and then precipitated with acetone at low temperature.

Key words: Chromatin nonhistone protein Two-dimensional gel electrophoresis

经验交流

RT-PCR 法检测大鼠脑组织及 C 6 细胞中 β -APP 的表达

马 磊 舒 宁 谢昌平 陈小爱 陈素珍 赵寿元

(复旦大学遗传学研究所遗传工程国家重点实验室 200433)

阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease, 简称 AD)是一种常见的老年性痴呆, 它的特征性病理改变主要是: 脑组织中出现老年斑(senile plaque)和神经纤维缠结(neurofibrillary tangles)及造成神经元细胞死亡(neuronal cell loss)。老年斑的主要组分是 β -淀粉样蛋白(β -amyloid protien, 简称 β -AP)。AD 的发病与 β -AP 的代谢存在着直接的联系。 β -AP 是 β -淀粉样前体蛋白(β -amyloid precursor protein, 简称 β -APP)剪切后的产物, 长度在 40 个氨基酸左右。 β -APP 在哺乳动物细胞中广泛表达, 它是一个膜结合蛋白, 由一段很长的胞外 N 端片段, 一个跨膜区及一段很短的胞内 C 端组成, 分子量约 100—140 KDa。 β -AP 是 β -APP

近膜的一小段, 它 2/3 是胞外部分, 1/3 是跨膜部分^[1]。

β -APP 在体内的表达方式很特别, 它的转录物要经过多种方式的剪接, 形成至少五种不同长度的 mRNA, 其中最主要的 3 种为 β -APP₇₇₀, β -APP₇₅₁, β -APP₆₉₅(数字表明相应蛋白质所含的氨基酸数目)。它们 3 者的区别是 Kunitz 丝氨酸蛋白酶抑制区(Kunitz Protease inhibitor domain, 简称 KPI)编码序列的存在和缺失。 β -APP₇₇₀ 保留了 225 个核苷酸的 KPI 编码区; β -APP₇₅₁ 经部分剪接保留了 168 个核苷酸的 KPI 编码区; β -APP₆₉₅ 则完全不含此编码区^[2-4]。大量文献表明: β -APP₆₉₅ 主要表达在正常哺乳动物中枢神经系统中, 而