

正常及白血病小鼠白细胞染色质和 DNA的酶切分析

陈石根 周润琦 郑 升

(复旦大学, 上海)

摘 要

本文应用的核酸酶为 DNase II、微球菌核酸酶与限制性内切核酸酶 BstNI、EcoR II、Hpa II 和 Msp I, 将它们作用于正常小鼠 615 和可移植性白血病小鼠 L7712 脾脏白细胞染色质及其 DNA, 根据酶切电泳谱及水解动力学分析表明: 1. 白血病小鼠染色质相对正常小鼠染色质易被 DNase II 微球菌核酸酶水解; 2. 白血病小鼠染色质比正常小鼠者易被 Msp I 水解, 但其 DNA 的 Msp I 酶切电泳谱无明显差别; 3. 白血病小鼠染色质及其 DNA 较正常小鼠染色质及其 DNA 易被 EcoR II 水解。这些观察说明, 白血病小鼠脾脏白细胞染色质有较活跃的构象状态; 其染色质 DNA 的 CCAGG 区段内有较低的甲基化程度。

关键词 染色质, 限制性内切核酸酶, 消化 DNase II, 微球菌核酸酶

前 言

基于核酸酶和染色质 DNA 的可接近性, 应用各种 DNase 包括非专一的 DNase、位点专一的 (site-specific) DNase 以及限制性内切核酸酶、特别是它的异源同工酶 (isoschizmer) 作用染色质及其 DNA, 然后根据其酶切电泳图谱、水解动力学分析等, 人们获得了许多有关染色质 DNA 结构和状态特点的知识^[1-4]。由于染色质的结构和构象状态与基因表达、细胞分化有密切关系^[5-8], 因此比较、分析正常细胞和癌变细胞染色质的酶切结果, 有可能为了解癌变机制与规律提供某些信息。

本文分别以 DNase II、微球菌核酸酶以及限制性内切核酸酶 BstNI、EcoR II、Hpa II 和 Msp I 作用于正常小鼠 615 与可移植性白血病小鼠 L7712 (以下分别简称 615 小鼠与 L7712

小鼠)的脾脏白细胞染色质与腹水白细胞染色质及其DNA,酶切电泳图谱及动力学分析结果表明,核酸酶和615小鼠脾脏白细胞染色质DNA的可接近性与核酸酶和L7712小鼠脾脏及腹水白细胞染色质DNA的可接近性明显不同;其DNA的甲基化情况也有某些差别。

材 料 和 方 法

一、实验动物 18—22克之615小鼠与接瘤后3—9天之L7712小鼠,雌雄各半;由上海市医药工业研究院提供^[9]。

二、酶和化学试剂 DNase II和微球菌核酸酶为Worthington生化试剂公司产品;限制性内切核酸酶EcoR II、Hpa II为BRL产品,BstNI和Msp I为New England Biolabs产品。Sarkosyl为ICN产品,琼脂糖为东海制药厂产品。其它试剂成为化学纯级或为分析纯级。

三、染色质制备^[4,10] 615小鼠或小鼠用颈椎离位法处死后,分别取出胸腺、脾脏及腹水细胞,并用预冷至0℃之生理盐水悬浮分散、洗涤,脾脏及腹水在洗涤前先用预冷的0.05mol/L Tris-0.14mol/L NH₄Cl(pH7.56)处理除去红细胞。获得的白细胞分别悬于TEDP溶液(50mmol/L Tris-HCl、1mmol/L EDTA、1mmol/L DDT、10%甘油、60μg/ml PMSF, pH7.8),置于水浴中匀浆6,000g中离心,沉淀再悬于TEDP溶液,匀浆、离心。如此反复三次;然后沉淀悬于TEDP溶液,并铺于2.2mol/L蔗糖溶液上,于75,000g中离心2小时,最后得到的纯化的染色质悬于预冷的含1mmol/L PMSF之10mmol/L Tris-HCl、pH7.0中。

染色质中的DNA含量测定^[11]。将适量染色质悬于7%PCA 1mmol/L NaCl溶液,然后在75℃中保温45分钟,再于260nm和320nm读取A₂₆₀和A₃₂₀,最后按下式计算:

$$mgDNA/ml样品 = (A_{260} - A_{320}) / 20 \times \text{稀释倍数}$$

染色质DNA的制备按Marmur方法^[12]。染色质悬于10mmol/L Tris、0.3mol/L NaCl、0.5% SDS(pH7.5)中,并相继用RNase(终浓度100μg/ml)、Pronase(终浓度100μg/ml)处理,再加等体积氯仿-异戊醇(24:1)处理2—3次,取水层,加二倍预冷之无水乙醇沉淀即得。

四、染色质的酶促水解与检定

1. DNase II或微球菌核酸酶水解^[11]: 反应体系为0.75—1.20mg DNA/ml之染色质与75—120U/ml之酶;DNase II的反应介质为10mmol/L Tris-HCl pH7.0;微球菌核酸酶为10mmol/L Tris-HCl, pH7.2、0.1mmol/L CaCl₂。反应于37℃中进行,然后于反应不同时间取出适量反应液,加相应的试剂停止反应,进行分析测定。在电泳分析时,加等体积之20mmol/L EDTA-0.8% Sarkosyl 停止反应,并相继用RNase(终浓度0.1mg/ml)和Pronase(终浓度0.5mg/ml)于37℃处理30分钟除去RNA与蛋白质。然后再加等体积之20%蔗糖-0.01%溴酚兰,混合后取约0.05A₂₆₀之混合液20μl于1%琼脂糖胶上进行电泳。电泳介质用TEA缓冲液(40mmol/L Tris-HCl、20mmol/L NaAc、2mmol/L EDTA、18mmol/L NaCl、20mmol/L HAc, pH8.4),电压5V/cm,电泳4小时;电泳胶用0.5μg/ml溴乙啶染色,最后在紫外灯下观察摄影。为了定量测定酶促消化程度,反应液加等体积预冷之14%PCA-2mol/L NaCl于冰浴中停止反应。然后离心,取上清液测定A₂₆₀与A₃₂₀,最后相对染色质中DNA的总含量计算水解(消化)百分率。

2. 限制性内切核酸酶水解^[13]: 水解采用Molecular cloning推荐之系统;BstNI、Hpa II

和 Msp I 采用低盐介质, 即 10mmol/L Tris, pH7.5、10mmol/L MgCl₂、1mmol/L DTT, EcoR II 采用高盐介质, 即 0.1mol/L NaCl、50mmol/L Tris, pH7.5、10mmol/L MgCl₂、1mmol/L DTT, 酶用量为 2U/μg DNA。37℃ 反应 2 小时后, 加 Sarkosyl 与 EDTA (最终浓度分别为 0.4% 与 10mmol/L) 终止反应, 并加等体积之 20% 蔗糖-0.01% 溴酚兰, 最后在上述条件下进行电泳检定。

实 验 结 果

一、DNase 水解

本文采用了 DNase II 对 615 小鼠及接瘤后不同天数之 L7712 小鼠的脾脏及腹水白细胞染色质进行了酶切水解, 获得了如下结果:

1. 用 DNase II 消化正常及癌变小鼠细胞染色质, 从酶切电泳图谱表明, 动物性别无明显差别。Fig.1 示 DNase II 水解雌雄 615 小鼠脾脏白细胞染色质的结果;

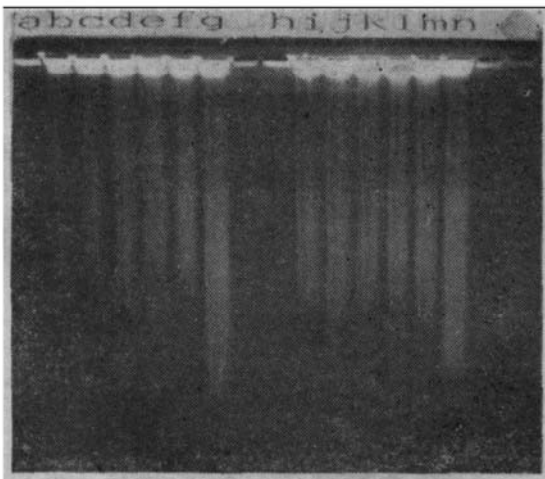


Fig.1 The digestion of chromatin from normal mouse (615) spleen leucocytes with DNase I chromatin DNA, ~1.2mg/ml. DNase I, 50U/ml the time of digestion is 0', 10', 30', 60', 120', overnight as shown in a→g (male), h→n (female).

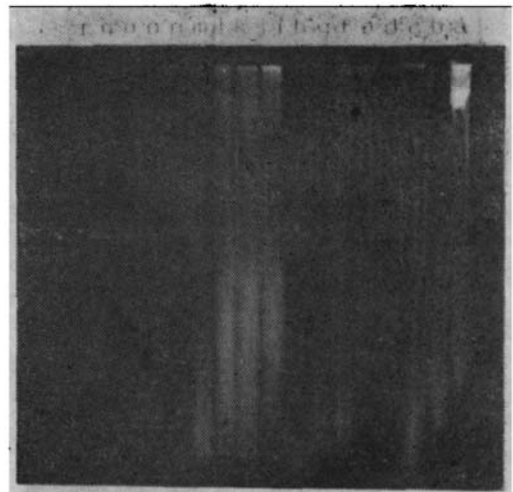


Fig.2 The digestion of chromatin from normal mouse (615) and leukemia mouse (L7712) spleen leucocytes with DNase I chromatin DNA, ~1.2mg/ml DNase I, 100U/ml, the time of digestion is 1', 30', 60' as shown in a→c (L7712 on the 5th day after inoculation), the time of digestion is 1', 5', 15', 30', 60' as shown in d→h (L7712 on the 7th day after inoculation), n→r L7712 on the 9th day after inoculation; i→(615).

2. 比较 615 小鼠与 L7712 小鼠脾脏白细胞染色质的 DNase II 的酶切图谱表明, 癌变细胞染色质比正常细胞染色质易被 DNase II 水解, 而且有随接瘤天数增加愈易被水解的趋势见 Fig.2)。

3. 从水解程度看, L7712 小鼠脾脏白细胞染色质被 DNase II 的水解百分比值略高于 615 者 (Fig.3)。

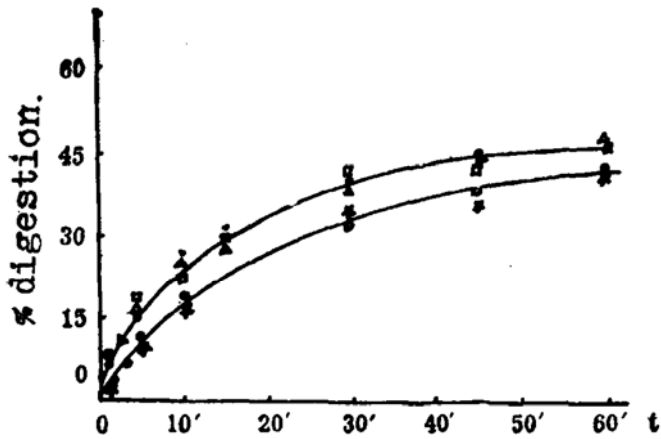


Fig.3 The kinetic curves of digestion on the chromatin of spleen leucocytes from normal mouse(615)and leukemia mouse(7712)with DNase I chromatin DNA, 0.75mg/ml, DNase, 120U/ml.
 ○*, 615
 •□▲, L7712, the 5th,7th,9th after inoculation

未观察到明显差别(Fig.5)



Fig.4 The electrophoresis pattern of digestion on the chromatin and its DNA of spleen leucocytes from 615 mouse and L7712 mouse with micrococcal nucleases (MN)
 chromatin DNA, 1.0 mg/ml, micrococcal nuclease, 75U/ml 37°C, 5min,
 a, b, DNA of L7712, 615,
 d, h, chromatin of L7712 digested with tsed MN,
 c, g, chromatin of 615 digested with MN,
 e, f, chromatin of L7712, 615,
 i, j, -DNA digested with BstNI, Msp I,

二、微球菌核酸酶水解

应用微球菌核酸酶水解 615 小鼠与 L7712 小鼠 (接瘤 7 天) 的脾脏细胞染色质, 结果表明:

1. L7712 小鼠来源的染色质较易被水解 (图略);
2. 两种来源的染色质酶切电泳谱带无明显差别 (Fig.4)^[15]。

三、限制性内切核酸酶水解

应用限制性内切核酸酶 BstNI 等水解 615 小鼠及接瘤 7 天的 L7722 小鼠脾脏白细胞染色质, 获得了如下结果:

1. 应用 BstNI、Hpa II 分别水解上述两种来源的染色质, 酶切电泳图谱上



Fig.5 The electrophoresis pattern of digestion on the chromatin of spleen leucocytes from normal mouse(615)and leukemia mouse(L7712) with restriction enzymes 2U restriction enzyme/mg DNA (chromatin) 37°C, 2hr.
 a, f, chromatin of 615,
 b, g, chromatin of L7712,
 c(615), d(L7712), chromatin digested with Hpa I,
 h(615), i(L7712), chromatin digested with BstNI,
 e, j, -DNA digested with Msp I, BstNI.

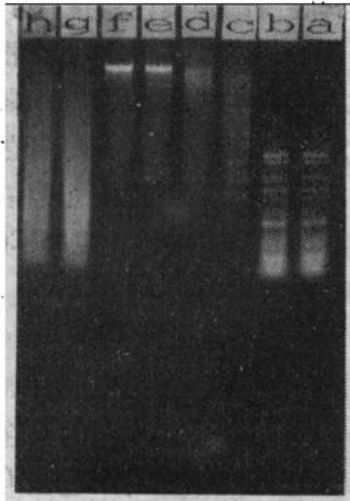


Fig.6 The pattern of digestion on the chromatin and its DNA of spleen leucocytes with restriction enzyme MspI a, b, λ -DNA digested with MspI, c, d, chromatin of L7712, 615 digested with Msp I, e, f, chromatin of L7712, 615, g, h, DNA of L7712, 615 digested with Msp I, rest as in Fig.6.



Fig.7 The pattern of digestion on the chromatin and its DNA of spleen leucocytes with restriction enzyme EcoRI a, b, λ -DNA digested with BstNI, c, d, chromatin of 615, L7712 digested with Eco R I, e, f, chromatin of 615, L7712, g, h, DNA of 615, L7712 digested with Eco R I, rest as in Fig.6

2. 应用 Msp I 水解上述两种来源的染色质酶切电泳图谱表明, L7712 来源者较易被水解, 但它们的 DNA 的酶切电泳图谱相同(Fig.6);
3. 应用 EcoR II 水解上述两种来源的染色质与 DNA, 酶切电泳图谱表明, L7712 来源者都比 615 来源者易被水解(Fig.7)

讨 论

DNase II、微球菌核酸酶以及 DNase I 是研究染色质结构与构象状态常用的探针。由于组蛋白对染色质 DNA 中的某些区段的“保护作用”因而这些核酸酶与染色质 DNA 的“可接近性”受到不同程度的影响, 表现为不同的酶切电泳图谱。一般地说, 分化细胞和基因表达活跃的细胞, 其染色质相对地处于较松弛的状态, 组蛋白等的保护掩盖作用相对地减弱, 酶和染色质 DNA 的可接近性相对地升高, 表现为染色质较易为核酸酶所水解。本文应用 DNase II 和微球菌核酸酶水解了 615 小鼠与 L7712 小鼠细胞染色质, 酶切电泳图谱表明, L7712 小鼠来源的染色质较易被上述二种酶水解, 而且随接瘤天数增加更趋明显。这一结果似乎与癌变分化的特点一致。

Lohr 等应用微球菌核酸酶研究了不同类型的细胞染色质^[15], 认为转录活性较高的染色质有不同长度的核小体间间隔, 而转录活性较低者其间间隔较为一定。但本文实验表明, 615 小鼠和 L7712 小鼠来源的染色质在微球菌核酸酶水解后显示出相同的酶切电泳谱带, 未观察到 Lohr 等所报道的差别。

限制性内切核酸酶是研究染色质的结构与构象状态的另一有用手段, 由于它对 DNA 的核苷酸排列顺序有严格要求, 因而可能提供更多的信息。本文应用限制性内切核酸酶 BstNI、

EcoR II、Hpa II 和 Msp I 对615小鼠与 L7712 小鼠的脾脏白细胞染色质进行了研究。在这四种核酸酶中, Hpa II 和 Msp I 都专一于 CCGG 的识别顺序, 但 Hpa II 敏感于脊椎动物 DNA 中较普遍的 Cm⁵CCGG, 而 Msp I 敏感于 m⁵CCGG; 本文发现, 以 Hpa II 作用615小鼠和 L7712 小鼠脾脏白细胞的染色质与其 DNA 时, 获得的酶切电泳谱相同, 而以 Msp I 作用它们时, DNA 的酶切电泳谱虽然没有不同, 但染色质的酶切电泳谱却显示 L7712 小鼠来源者有较易被水解的迹象。这种现象可能是由于不同细胞来源的染色质构象状态不同, 从而使 m⁵CCGG 在核酸酶可接近的范围内出现的频率不同。与此对应的, 另一组同源同工酶 EcoR II 和 BstNI 都专一于 CCAGG, 但切点不同, EcoR II 为 ¹CCAGG, 且敏感于 C 的甲基化; BstNI 则为 CC¹AGG, 对甲基化不敏感。本文发现, BstNI 作用 615 小鼠和 L7712 小鼠来源的染色质以及与之相应的 DNA 时, 都有相同的酶切电泳谱; 但是 EcoR II 则不同, L7712 小鼠来源的染色质及 DNA 较之 615 小鼠来源者都易被水解。这一现象说明, 615 小鼠脾脏白细胞的染色质 DNA 在 CCAGG 区段内可能有较高程度的甲基化。此推论与本实验室应用 HPLC 测得的 615 小鼠脾脏白细胞相对 L7712 小鼠者其染色质 DNA 有较高的甲基化程度的结论一致^[16]。

综上所述, 可见: 1. 可移植性白血病小鼠 L7712 脾脏白细胞染色质相对正常小鼠 615 来源者较易被 DNase II 与微球菌核酸酶水解, 且这种趋势随接瘤天数增加更为明显; 2. 应用 Msp I 水解, L7712 小鼠来源的染色质比 615 小鼠来源者更易被水解, 但其 DNA 没有差别; 3. L7712 小鼠脾脏白细胞的染色质及其 DNA 相对 615 小鼠者都较易被 EcoR II 水解。基于以上观察, 说明 L7712 小鼠脾脏白细胞染色质可能有较松弛的构象状态, 而且在其 DNA 中 CCAGG 区段内可能有较低程度的甲基化。

参 考 文 献

- [1] Igo-Kemenes, T. et al. (1982), *Ann. Rev. Biochem.*, 51, 89.
- [2] Mazrimas, J.A. et al., (1979), *Nucleic Acid Res.*, 7, 935.
- [3] Pfeiffer, W. & Zachau, H.G. (1980), *idid.*, 8, 4621
- [4] Chen, S. & Srivastava, Sahai B.I., (1983), *FEBS Letters*, 161 (2), 217.
- [5] Ehrlich & Wang, R.Y.H. (1981), *Science*, 212, 1350
- [6] Gruenbaum, Y. et al. (1980), *Nature*, 292, 860.
- [7] Adams R.L.P. & Burdon, R.H., (1981), *CRC Critical Rev. Biochem.*, 13, 349.
- [8] Reilly, J.G. et al. (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, 697, 53
- [9] 郑升等, (1981) 《肿瘤》2 (1) 235
- [10] Adams, R.L.P. et al., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, 561, 345.
- [11] Schrader, W.T. & Omalley, B.W. (eds.), *Lab Methods Manual of Hormone Action and Mol. Endocrinology*, 5-th.
- [12] Marmur, J. (1961), *J. Mol. Biol.*, 3, 208.
- [13] Maniatis, T. (1982), *Molecular Cloning, CSH Lab.*
- [14] Creusot, F. et al. (1980), *Anal. Biochem.* 103, 343.
- [15] Lohr, D. et al. (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 74(1), 79
- [16] 朱徽明等, (1985), 《自然杂志》, 2 (6) 477

**A COMPARISON OF THE DIGESTION OF CHROMATIN
FROM NORMAL AND LEUKEMIA MOUSE LEUCOCYTES
WITH DNases**

(Chen, Shi-gen Zhou, Run-qi Zhen, Sheng)

(*Fudan University, Shanghai*)

ABSTRACT

Limited nuclease digestion of chromatin has been proved to be useful for recognition of the conformation and the structure of chromatin. In this paper we have compared the enzymatic digestion patterns of chromatin and its DNA of spleen leucocytes from normal and leukemia mice. We found that chromatin from leukemic mouse leucocytes is more susceptible to DNase II than chromatin from normal cells. The chromatin from leukemic mouse leucocytes was also more easily digested by Msp I than that from normal mouse leucocytes, but the digestion patterns of the chromatin DNA from both were about the same. We also found chromatin from leukemic mouse leucocytes, were more susceptible to digestion by Eco RII. Our observations suggested that more active conformation may exist in chromatin of spleen leucocytes from leukemic mouse.

Key words: Chromatin, DNase II, Micrococcal nuclease, Restriction endonuclease digestion