

## 与大鼠 Morris 肝癌7777相关的染色质蛋白的免疫亲和层析分离与鉴定

温博贵

邱政夫

(江西医学院生物化学教研室 南昌)

(美国佛蒙特大学医学院生物化学系 柏林顿)

### 摘 要

用5mol/L 尿素, 将大鼠 Morris 肝癌7777染色质解离为染色质非组蛋白(UP组分)及染色质沉淀(UC组分)。UP(含90—95%非组蛋白)用免疫亲和层析(与大鼠Morris 肝癌7777去组蛋白染色质抗体交联)分级, 经2mol/L NaSCN及8mol/L 尿素分部洗脱。将UP及UC, 来自UP亲和层析的2mol/L NaSCN及8mol/L 尿素洗脱组分同时进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。以大鼠Morris 肝癌7777去组蛋白染色质抗体作探针, 进行免疫显迹(Immunoblot)测定。在UP部分出现二条阳性带, 分子量为: 200K及116K。UC部分有三条染色不很深的阳性带, 分子量为200K, 118K及91K。来自UP亲和层析的2mol/L NaSCN及8mol/L 尿素洗脱部分分别有一条浓而清晰的阳性带, 分子量分别为74K及83K。用酶联免疫吸附法(Elisa)测试从UP凝胶上切割下的阳性区带, 其免疫特异性显著。

关键词: 肝癌; 非组蛋白; 染色质结构; 免疫亲和层析; (大鼠肝)

### 前 言

许多学者对癌变过程中某些非组蛋白的鉴定与特化做了不少工作。但由于核染色质非组蛋白是一群高度非均一的蛋白组分, 用常规的方法难以察觉其微细的改变, 因而采用免疫学方法去寻找癌变过程中核染色质非组蛋白免疫特异性的异常<sup>[1,2]</sup>。Chiu 实验室曾用Morris肝癌7777及3'-甲基奶油黄(3'-MDAB)诱发的大鼠肝癌作为模型, 研究动物肿瘤及诱发肝癌基因表达的改变<sup>[3-5]</sup>。同时, 从大鼠Morris 肝癌7777的细胞核中提取非组蛋白染色质作为

抗原, 免疫家兔后获得对肝癌染色质特异的抗血清。免疫显迹法证明, 该抗血清能识别一组肿瘤染色质蛋白, 分子量范围为 42K—200K<sup>[6]</sup>。为了对这一系列的阳性蛋白带作进一步分析, 我们采用免疫亲和层析法将此抗血清与琼脂糖 4B 交联, 然后将染色质蛋白组分作亲和层析分级。各级分再进行 SDS-PAGE 分析, 最后用免疫显迹法显示各级分中的相关抗原, 获得单一的阳性蛋白带。

## 材 料 和 方 法

一、动物及肿瘤: 移植的 Morris 肝癌接种于 Buffalo 大鼠(150—200g)的大腿肌肉, 瘤体直径达 1 ~ 2 厘米, 断头杀死, 收获瘤组织并留取 1 克肿瘤组织继续接种动物<sup>[6]</sup>。

二、细胞核及染色质的制备: 同前文<sup>[7]</sup>

非组蛋白染色质兔抗血清由 A. L. Burkhardt 赠给。经正常 Buffalo 大鼠肝染色质免疫吸收二次<sup>[6]</sup>。

三、染色质蛋白的分级及免疫亲和层析 染色质蛋白的分级按 Chiu 法<sup>[7]</sup>, 如 Fig. 1 所示。

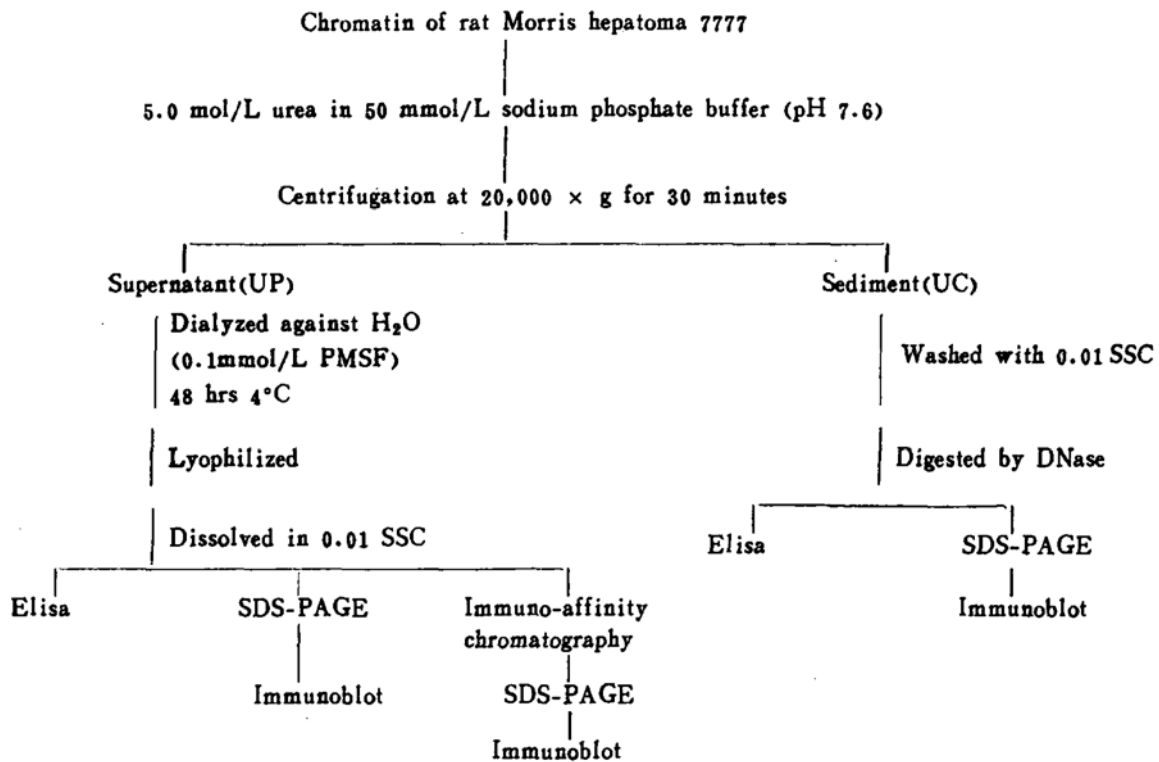


Fig 1. Scheme for fraction and identification of chromatin proteins from rat Morris hepatoma 7777

免疫亲和层析柱的制备选用溴化氢活化的琼脂糖-4B(Pharmacia产品), 每克溶胀后体积为3.5ml, 结合蛋白量为30mg。用于交联的抗血清 2 ml加等体积磷酸缓冲液(PBS)稀释, 然后缓缓滴入 4 ml饱和硫酸铵溶液, 在冰浴上磁力搅拌 1 小时。8000 × g离心30分钟, 沉淀溶于适量 PBS 中, 对水(含0.1mmol/L PMSF, Phenylmethyl-Sulfonyl fluoride)透析48小时(4°C, 换水3次)。1000 × g离心30分钟, 沉淀溶于交联缓冲液(0.1mol/L NaHCO<sub>3</sub>缓冲液, pH8.3, 含0.5mol/L NaCl)中, 交联备用。

取溴化氢活化的琼脂糖4B1克用 1mmol/L HCl 充分洗涤, 悬浮于交联缓冲液。将制备好

的交联抗血清与琼脂糖 4B 混合, 温和搅拌, 4°C 过夜。用 1 mol/L 乙二胺(pH9)封闭未交联的活性基团, 经交联缓冲液, 0.1mol/L醋酸(pH4)洗涤后, 再用交联缓冲液洗一次, 装柱后置 4°C 冷室备用。

**四、染色质UP组分的层析分离:** 亲和层析柱用 2.5mol/L 尿素/PBS 液平衡后, 将 40OD<sub>280</sub> 的大鼠 Morris 肝癌7777的UP 组分溶于 20ml 2.5mol/L 尿素/PBS 中。上柱流速 0.5ml/分, 流出液重上一次柱。然后用 2.5mol/L 尿素/PBS 洗柱直至流出液 OD<sub>280</sub> 近于零。继用 2mol/L NaSCN/ 2.5mol/L 尿素/PBS、PBS 及 8mol/L 尿素/PBS 进行分步洗脱, 收集所有各部分洗脱液, 对水 (含 0.1m mol/L PMSF) 充分透析, 冻干。以上全部操作均在 4°C 冷室中进行。

**五、SDS-PAGE 及免疫显迹:** 方法见前文<sup>[6]</sup>, 电泳图谱用银染显示<sup>[8]</sup>。

**六、免疫显迹阳性蛋白带分子量的测定:** 根据染色质蛋白分子量范围, 选用 Sigma 公司出品的高分子量标准蛋白质: 200K 的肌球蛋白; 116K 的  $\beta$ -半乳糖苷酶; 94K 的磷酸化酶 B; 68K 的牛血清白蛋白(BSA); 43K 的碳酸酐酶。与进行电泳的染色质蛋白作同样的处理, 并进行 PAGE 分离。然后转移至硝酸纤维素纸上, 用氨基黑染色显示这五种标准蛋白。以其相对迁移率为纵坐标, 分子量的对数(lg)为横坐标, 得出一条工作曲线(Fig 2)。依据酶标显示的阳性蛋白带的电泳相对迁移率从坐标图上找出其对应的 lgMW, 根据 lgMW 可求出该抗血清认识的抗原蛋白带的分子量(Fig. 2)。

**七、SDS-PAGE 分离蛋白区带的 Elisa 测定:** 为了将 UP 中的某些电泳区带切下作 Elisa 测定, 我们制作 3 mm 厚的凝胶板, 成层胶不放梳齿, 直接在连续的样品槽内加 UP 样品 (约 1 mg 蛋白量)。电泳毕, 用考马氏蓝 G<sub>250</sub> 显色, 切下分子量为 200K, 170K 及 120K 的相应条带, 用适量 1.5m mol/L NaCl/1.5m mol/L 柠檬酸钠缓冲液(0.01 × SSC)提取凝胶中的蛋白, 并取等量的正常大鼠肝染色质蛋白充阴性对照, 按 Pumo 法<sup>[9]</sup>作 Elisa 测定。

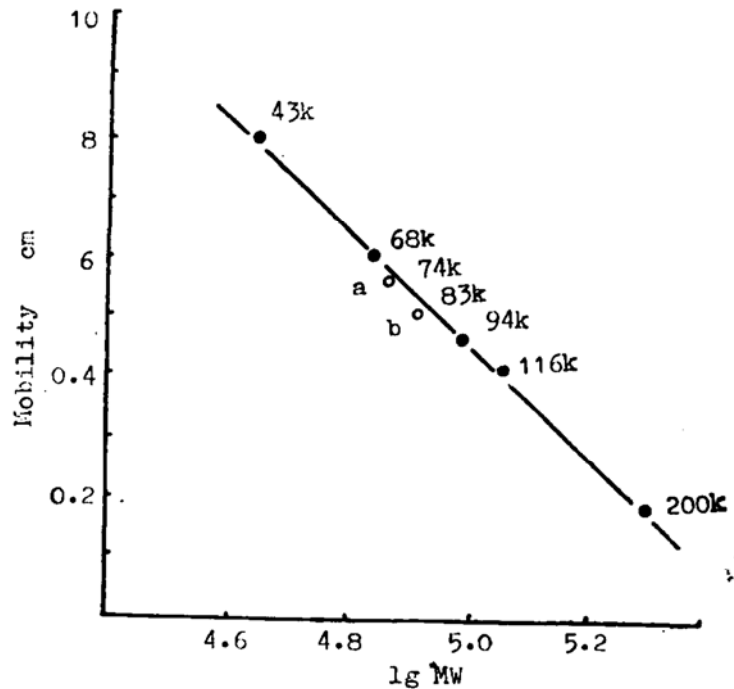


Fig2. Molecular weight determination of the positive bands marked by immunoblot  
Standard protein markers, myosin (200 k daltons),  $\beta$ -galactosidase (116 k daltons), phosphorylase B (94 k daltons), BSA (68 k daltons), Carbonic anhydrase (43k daltons).  
a, positive band (83 k daltons) in the fraction eluted with 8 mol/L urea.  
b, positive band (74 k daltons) in the fraction eluted with 2 mol/L NaSCN.

## 结 果

### 一、大鼠 Morris 肝癌7777染色质组分的 SDS-PAGE 分析

染色质经5.0mol/L 尿素裂解后, 获得 UP 及 UC 两个组分(Fig.1)。后者经 DNase 作用去除 DNA。UP、UC (去 DNA), 来自 UP 亲和层析的2mol/L NaSCN、PBS 及 8mol/L 尿素洗脱部分一道电泳, 银染图谱见 Fig.3。

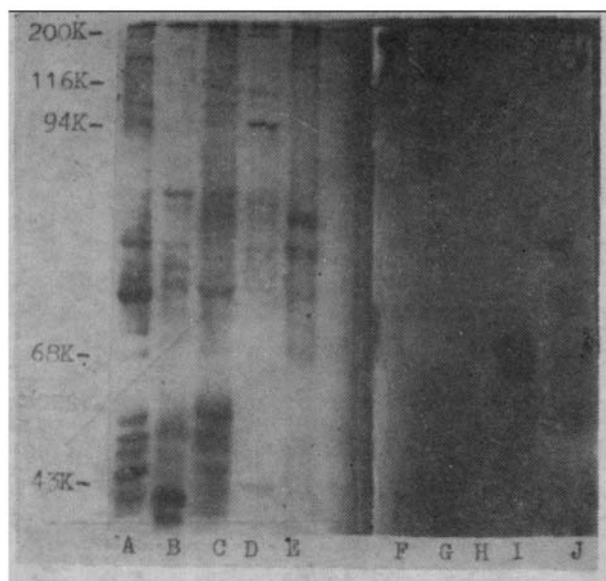


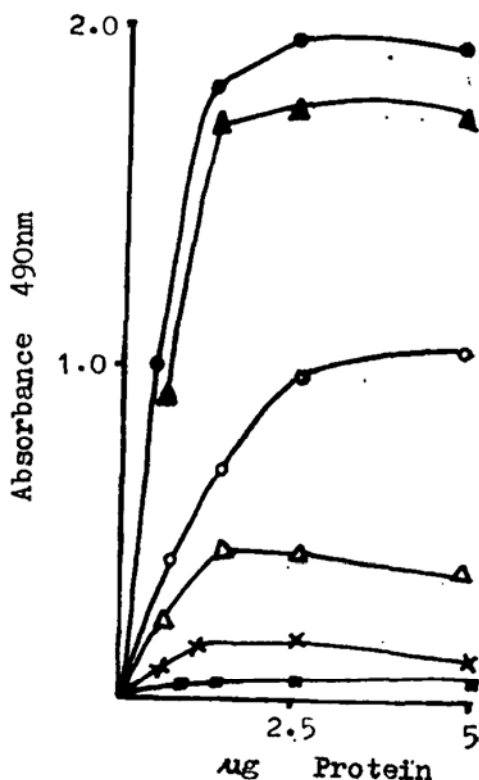
Fig3. Electrophoretic patterns of fractions from chromatin of rat Morris hepatoma 7777 on SDS-PAGE gel stained with silver stain(lane A UP, B UC, C 2mol/L NaSCN elution, D PBS elution, E 8mol/L urea elution). Each sample  $15\mu\text{l} = 15\mu\text{g}$  protein. Same proteins on another section of the gel were electrophoretically transferred from the PAGE gel on nitrocellulose sheets, or detected immunologically for reactive chromosomal proteins (lane F, UP, G, UC, H, PBS elution, I, 2mol/L NaSCN elution, J, 8mol/L urea elution). Standard protein markers, myosin(200 K),  $\beta$ -galactosidase(116 K), phosphorylase B(94 K), BSA (68 K) and carbonic anhydrase(43K).

## 二、大鼠 Morris 肝癌7777染色质组分的免疫显迹

Morris 肝癌7777去组蛋白染色质抗血清可认识 UP 的二条蛋白带, 分子量为 200K 及 116K, 前者宽且色深。在 UC 出现三条阳性带, 分子量为: 200K, 118K 及 91 K, 但 200K 条带很细。UP 经亲和层析后 PBS 洗脱部分为阴性。2mol/L NaSCN 及 8mol/L 尿素洗脱部分均显示出单一而清晰的区带, 分子量分别为 74K 及 83K(见 Fig.3)。

## 三、用 ELISA 测试 UP, UC 及 UP 中 200K, 174K 及 120K 蛋白带的免疫活性

Fig.4 Comparison of immunoreactivity of fractions from chromatin of rat Morris hepatoma 7777. UP fraction( $\bullet$ ), UC fraction( $\circ$ ), 200 K protein in UP ( $\blacktriangle$ ), 174 K protein in UP( $\triangle$ ), 120 K protein in UP ( $\times$ ) and chromatin of normal rat liver( $\square$ ) were assayed with 2X preabsorbed antisera to Morris hepatoma 7777 dehistonized chromatin at 1,1000 dilution by Elisa.



ELISA 测定结果见 Fig. 4, UP 及 UC 均具显著的肿瘤核抗原性, 两者相比较, UP 的抗原性比 UC 强。这和免疫显迹染色深度是相符的。UP 中 200K 蛋白带的抗原性远大于 174K 蛋白, 120K 蛋白免疫活性甚低, 但比正常大鼠肝染色质蛋白高。

## 讨 论

真核基因的表达要求染色质的结构与功能密切相适应。因此, 制备各种活性染色质蛋白组分以探讨其功能是很有意义的。许多学者力图对染色质进行分离, 期望找出各别而专一的功能成分。本实验首先用 5 mol/L 尿素缓冲液选择性地解离染色质蛋白, 在该缓冲液中, 基本上所有的染色质蛋白被解离开<sup>[7]</sup>。然后采用免疫亲和层析法(交联去组蛋白染色质抗体), 通过不同的洗脱过程, 将 UP 中的组分再一步拆开。UP, UC 及层析级分通过 SDS-PAGE 再分成若干区带(Fig. 3)。通过以上程序, 即: 5mol/L 尿素裂解—免疫亲和层析—SDS-PAGE 后, 大鼠 Morris 肝癌 7777 染色质被有效地“解剖”开。然后再通过大鼠 Morris 肝癌 7777 去组蛋白染色质抗体去识别各组分的肿瘤相关抗原带, 所得结果更为清楚。Burkhardt<sup>[6]</sup>用该抗血清为探针测出大鼠 Morris 肝癌 7777 染色质中存在一组分子量范围很广(42—200 K)的阳性蛋白区带, 但图谱欠清晰。本实验所见阳性区带亦是在 47~200K 范围, 两者结果基本相同。但由于我们对染色质组分作了多层次的“解剖”, 阳性条带分散在各个不同的级分中, 免疫染色更为清楚, 这可能是层析分离等步骤将一些分子量相近而且重叠在一起的非特异性组分去除有关。众所周知, 免疫亲和层析是一种专一性较强的分离手段, 而且不损伤抗原的结构。加上所用的大鼠 Morris 肝癌 7777 去组蛋白染色质抗血清经过二次正常大鼠肝染色质的免疫吸收, 去除了与正常大鼠肝染色质反应的抗体部分, 保留了抗 Morris 肝癌 7777 去组蛋白的抗体<sup>[6]</sup>, 因此能较好地从一个复杂的肿瘤染色质蛋白中分离出相关的抗原组分。本文用 5mol/L 尿素解离染色质, 其固有的免疫组织特异性不受影响, 所以无论用免疫显迹法及 Elisa 法均能同时反映这些阳性区带蛋白所具有的特异免疫原性, 可以设想, 将这些阳性区带切割下来, 提出蛋白质免疫动物可能得到对某一染色质组分更专一的抗血清, 而且用某一阳性区带作为抗原制备相应的单克隆抗体, 比用完整的染色质免疫动物更容易获得阳性克隆。从而制备出更敏感更特异的肿瘤核抗原的抗体探针, 为研究肿瘤染色质结构与基因表达的关系提供有效工具。

从所获得的免疫显迹图谱(见 Fig. 3)看出, 某些阳性区带与 PAGE 银染图谱的染色深度不完全平行, 甚至在银染条带很淡的区域却出现免疫酶标显色很深的区带, 这可能与免疫显迹反应的高度特异性及灵敏性有关。Maul 曾指出<sup>[10]</sup>, 通过电转移后的硝酸纤维素纸, 在蛋白染色并不深的区域, 经特异抗体作用后免疫酶标染色却异常明显。Vaessen 称, 免疫显迹法灵敏度在 0.1ng 以下<sup>[11]</sup>。而本工作所用的银染法是在 10ng 水平<sup>[6]</sup>。因此, 在一些银染着色淡的区域存有的极微量蛋白也可被敏感的酶标染色显示出来。

但是, 也不能排除电转移之前, 用转移缓冲液漂洗去 SDS 使蛋白质复性的过程中, 凝胶长度的改变对结果的影响。Bowen 等<sup>[12]</sup>曾发现, 经长时漂洗去除 SDS 的凝胶条, 其长度及宽度可增加 20%。虽然在我们的实验中未曾发现如此剧烈的胀大现象, 但是这种变化多少会导致免疫显迹阳性条带与电泳图谱不完全对应的状况。为了避免这种误差, 在计算阳性条带的分子量时, 应以电转移后硝酸纤维素纸上显示出的标准蛋白区带的相对移动距离为标

准, 按此数据求得的阳性蛋白带的分子量显然更为可信。

### 参 考 文 献

- [1] Chiu, J.F., et al. (1985), *Oncology*, 42, 26—32.
- [2] Wen, B.G., et al. (1985), *Fed. Proc.*, 44, 873.
- [3] Wen, B.G., et al. (1984), *Proc. AACR. Cancer Res.*, 25, 2.
- [4] Huang, D.P., et al. (1984), *Cancer Let.*, 22, 143—149.
- [5] Chiu, J.F., et al. (1983), *Arch. Biochem. Biophys.*, 222, 310—320
- [6] Burkhardt, A.L., et al. (1984), *Biochem. Biophys. Acta*, 781, 165—172.
- [7] Chiu, J.F., et al. (1977), *Method in Cell Biology*, Vol. XIV, p283—296, Academic press, New york.
- [8] Wray, W., et al. (1981), *Anal. Biochem.*, 118, 197—203.
- [9] Pumo, D.E., et al. (1983), *Mol. Cell. Biochem.*, 51, 133—139.
- [10] Maul, G.G. (1984), *Monoclonal Antibodies and Functional Cell Lines*, p388, Plenum press, New york.
- [11] Vaessen, R.T.M.J., et al. (1981), *FEBS Let.*, 124, 193—196.
- [12] Bowen, B., et al. (1980), *Nucl. Acids Res.*, 8, 1—20.

## THE ISOLATION AND IDENTIFICATION OF RAT MORRIS HEPATOMA 7777-ASSOCIATED CHROMOSOMAL PROTEINS BY IMMUNO-AFFINITY CHROMATOGRAPHY

Wen, Bo-gui

(Department of Biochemistry  
Jiangxi Medical College,  
Nanchang)

Chiu, Jen-fu

(Department of Biochemistry  
College of Medicine, University  
of Vermont, Burlington)

### ABSTRACT

In order to isolate and identify a group of hepatoma-associated nonhistone chromosomal proteins (MW 42—200 k daltons), rat Morris Hepatoma chromatin was dissociated in 5.0 mol/L urea and then, subjected to immuno-affinity chromatography, SDS-PAGE and immunoblot or the enzyme-linked immunosorbent assay. The UP fraction in the chromatin contains 90—95% of chromosomal non-histone proteins. Immunoblots with the antisera against Morris hepatoma 7777 dehistonized chromatin showed that two positive bands with MW 200K and 116K were found in UP fraction, and three weakly positive bands with MW 200, 118 and 91K were present in UC fraction. Upon fractionation of the UP fraction by immunoaffinity-chromatography on a column cross linked with hepatoma antibody, single bands of 74K and 83K protein positive to immunoblot were identified in 2 mol/L NaSCN and 8 mol/L urea eluted fractions respectively.

**Key words:** Hepatoma, Non-histone chromosomal protein, Chromatin structure, Immuno-affinity chromatography, Rat liver.