

猪脾细胞核 ENA 与染色质成分分析

钟叔平 温博贵

(汕头大学医学院生化教研室 汕头 515031)

摘要 猪脾细胞核可提取核抗原(ENA)和染色质的组分分析的结果表明:两者紫外吸收光谱明显不同, ENA 呈现单一吸收峰,染色质则有两个吸收峰; ENA 中的非组蛋白(NHCP)含量高于染色质,而两者组蛋白(HP)含量基本相同;电泳行为显示, ENA 和染色质的 HP 图谱相似,但 NHCP 存在明显的差异。

关键词 可提取核抗原 染色质 非组蛋白 成分分析

细胞核是真核生物生长、增殖的主要细胞器,它蕴藏着大量的遗传物质和参与基因表达调控的蛋白质,细胞核成分十分复杂。采用不同的方法处理细胞核,可得到不同的组分。ENA 是细胞核中一种可提取核的抗原(Extractable nuclear antigen ENA),它是一种广泛用于自身免疫性疾病诊断重要的实验材料^[1];染色质(Nuclear chromatin)是细胞核中一类不溶性或难溶性物质,它是核酸与组蛋白(Histo-

ne protein HP)、非组蛋白(Non histone chromosomal protein NHCP)的复合物,其中 NHCP 随生理、病理情况不同有所变化,NHCP 与肿瘤的发生、发展密切相关^[2]。因此,对细胞核 ENA 和染色质进行对比分析,不仅有助于了解细胞核结构的化学组成,也可为自身免疫性疾病的临床诊断提供材料。我们制备了猪脾细胞核 ENA 和染色质并作对比分析,现将结果报告如下:

1 材料和方法

1.1 材料 猪脾取自屠宰场新鲜标本。

1.2 方法

1.2.1 细胞核的制备 参照 Chiu 法^[3]。组织用 0.8% NaCl 洗净,剪碎,剔除脂肪,按 1:5 加入 A 液 [0.25 mol/L 蔗糖, 3mmol/L MgCl₂, 10mmol/L Tris-HCl, 0.6% Triton X-100, 0.1 mmol/L 苯甲磺酰氟 (PMSF)], 分离器破碎细胞,镜检,1% 甲烯兰染色观察,见大部分核逸出,四层纱布过滤,离心(800g/10min, 4℃),沉淀加 A 液(1:8),电动 Teflon 头匀浆器匀浆至细胞核大都逸出,离心(800g/15min, 4℃),得粗核沉淀,沉淀悬浮于 20 倍体积 B 液 [2.2mol/L 蔗糖, 3mmol/L MgCl₂, 10mmol/L Tris-HCl, 0.1mmol/L PMSF], 轻轻匀化,用 1/4 体积 B 液垫于离心管底部,将细胞核悬液铺在蔗糖垫上,超速离心(51,900/60min, 4℃),弃上清,用 A 液匀化沉淀,离心(800g/10min, 4℃)得纯净细胞核。

1.2.2 染色质的制备^[4] 细胞核悬浮于 20 倍体积低渗裂解液 [10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH7.9] 中,冰浴中匀浆,离心(800g/15min, 4℃)反复数次,沉淀悬浮于 1:50 的溶液 [0.15mol/L NaCl, 1.5mmol/L 柠檬酸钠]中,充分匀化,离心(800g/20min, 4℃)反复两次,收集沉淀即得染色质。

1.2.3 ENA 的制备 参照 Sharp 法^[5]。组织用 A 液 [0.28mol/L 蔗糖, 0.004mol/L CaCl₂] 洗净,剔除脂肪,剪碎后分离器破碎细胞, A 液重洗,四层纱布过滤,反复二次,除去血液,离心(800g/10min, 4℃),沉淀置入 B 液 [0.25mol/L 蔗糖, 0.004mol/L CaCl₂] 匀浆,四层纱布过滤,离心(800g/10min, 4℃),沉淀按每 50g 组织加 C 液 [pH7.1, 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液] 50ml,匀浆后置超低温冰箱(-60℃)过夜,次日取出,反复冻融三次,至细胞核完全破裂,六层纱布过滤,滤液放 4℃ 冰箱过夜,出现粘稠状物质,四层纱布过滤,滤液超离心(106,000g/120min, 4℃),取上清,按每 ml 上清加 10mg

无水乙酸钠,搅拌至溶解(以下操作室温下进行),加 6 倍体积的无水乙醇后见絮状沉淀,离心(900g/15min),沉淀中按每 50g 组织加 20ml D 液 [0.15mol/L NaCl] 充分搅拌,离心(900g/10min),得略带乳白色透明上清液,分装小瓶,冻干,得白色粉末状结晶 ENA。

1.2.4 化学成分测定 见文献^[6]。

1.2.5 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)^[7] 采用 7.5% 分离胶, 3.5% 浓缩胶,考马斯亮蓝 R-250 染色。

1.2.6 紫外吸收光谱 样品溶于 5mol/L 尿素中,作 200—300nm 扫描。

2 结果

2.1 用 Chiu 法^[3]提取的猪脾细胞核为圆形或椭圆形(图 1A、B)。

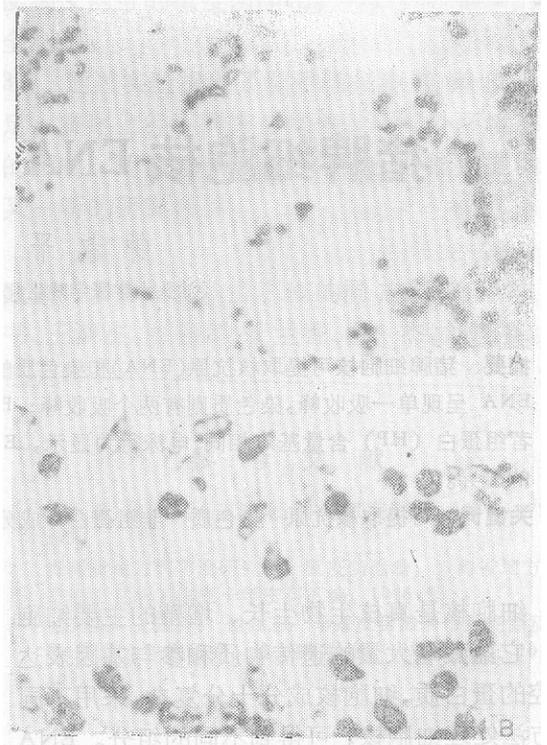


图 1A 提纯猪脾细胞核, 10×10; 图 1B 提纯猪脾细胞核 10×40

2.2 紫外吸收光谱显示(见图 2) 染色质出两个吸收峰,分别在 220nm, 255nm 处,峰谷位于 240nm 处; ENA 在 257nm 有一吸收峰,

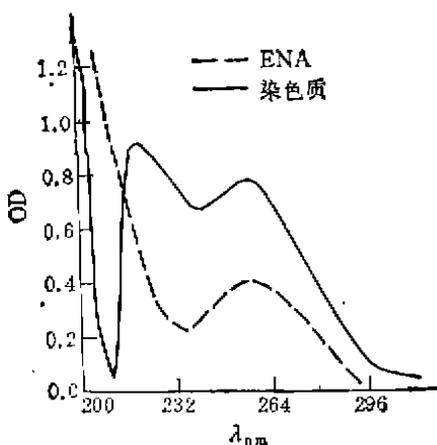


图2 猪脾 ENA、染色质紫外吸收光谱

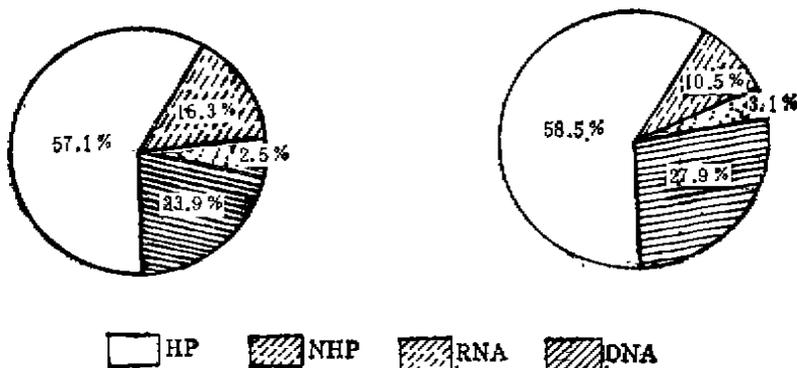


图3 猪脾 ENA、染色质化学组分示意图

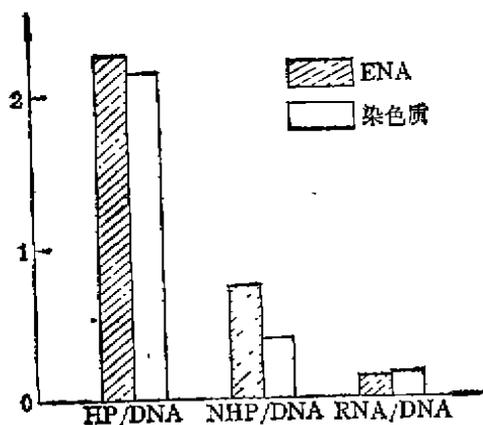


图4 猪脾细胞核 ENA、染色质 HP/DNA、NHCP/DNA、RNA/DNA 示意图

峰谷位于 234nm 处, 两者图形上的差异可能提示两者核酸蛋白成分不同。

2.3 猪脾 ENA、染色质化学成分的比较 结果表明, 两者的 HP、NHCP、RNA、DNA 百分含量有所不同(见图 3)。ENA 中的 NHCP 含量高于染色质, 两种样品 HP/DNA、NHCP/DNA、RNA/DNA 的比值也有差异(见图 4)。

2.4 SDS-PAGE 行为的分析 猪脾 ENA 的 SDS-PAGE 电泳行为(见图 5)与文献[8]报道一致。ENA 与染色质电泳图谱显示: 两者在 HP 区域内基本相似(见图 6); 而在 NHCP 区内 ENA 与染色质的电泳行为则存在多位点的差异。

核 ENA 和染色质, 它们的紫外吸收光谱存在差异, 这可能与 ENA、染色质的组成不同有关。化学成分分析证实了这种推测。两种样品组分分析表明, 两者的 HP/DNA、RNA/DNA 基本相同, 而 NHCP/DNA 却差异明显。ENA 样品中 NHCP/DNA 高于染色质, 提示该样品中含有更多的 NHCP。图 3 显示, 染色质的 DNA、HP 含量高于 ENA, 这显然与其化学组成相关。染色质是细胞核中一类难溶或不溶性物质。它是由众多核小体组成的串珠状结构。核小体主要由 DNA、HP 组成。核小体铰链部附着一些 NHCP, 它们参与基因的表达调控作用^[9]。ENA 是低盐抽提物, 它是一种可溶性物质, 其化学组成与染色质不同。电泳行为(见图 5、6)显示, 两者的 HP 区带基本相似, 其差异主要表现在 NHCP 方面。这表明,

3 讨论

作者参照文献 [3, 4, 5] 分别制得猪脾细胞

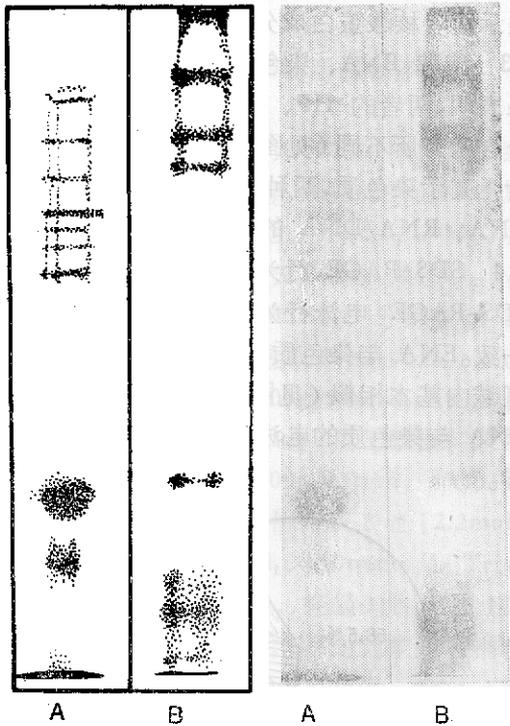


图 5 SDS-PAGE 图谱

A:ENA; B: 染色质(适用于图 6)

参与基因表达调控的 NHCP, 它们可能一部分与 DNA 结合构成染色质; 另一部分则游离于细胞核中。它们大多数是各种酶类, 激素受体, 抑或是一些基因调控蛋白^[9,10]。本文结果表明 ENA 与染色质的化学组成不同。以不同的方法对细胞核成分进行细致地分析, 对弄清基因表达调控的机制和规律, 以及癌基因的激活, 肿瘤发生的机理都是至关重要的。此外, 对 ENA 进行成分分析, 寻找自身免疫病的特异抗原, 以期为自身抗体的诊断提供一种新的方法作准备。

参 考 文 献

- 1 钟叔平, 温博贵。猪脾 ENA 的制备、分析及临床应用。上海免疫学杂志, 1989, 9(1): 5.
- 2 Pumo D. E., D. Viceps-Madore, J. F. Chiu. Enzyme-linked immunosorbent assay for use with nuclear protein-DNA complex antigens. *Mol. Cell*

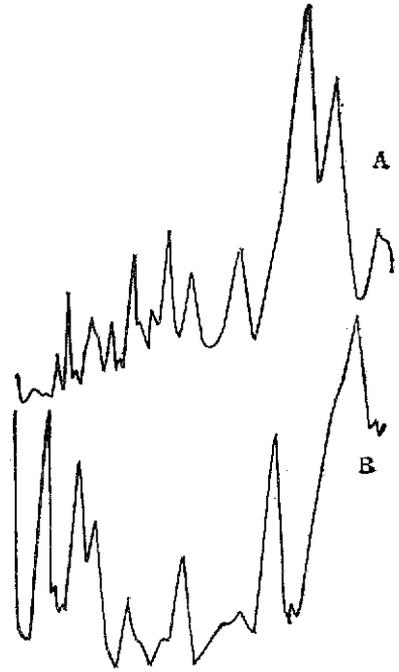


图 6 猪脾 ENA、染色质 SDS-PAGE 扫描图谱

A: ENA; B: 染色质

- Biochem.* 1983, 51: 133—139.
- 3 Chiu J. F. et al. *Methods in cell biology: Methods for selective of chromosomal nonhistone proteins.* Vol. XIV, New York, Acad Press, 1977, 283—296.
- 4 温博贵, 钟叔平。正常人血液白细胞的制备及组分分析。江西医学院学报, 1989, 29(1): 17—20.
- 5 Sharp G. C., W. S. Irvin E. M. Tan, et al. Mixed connective tissue disease—an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen(ENA). *Am. J. Med.*, 1972, 52: 148—159.
- 6 何开玲, 李茂深, 徐元鼎等。实验性肝癌形成过程中染色质组分的量的变化。实验生物学报, 1980, 13(1): 79—87
- 7 Laemmli U. K., Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 1970, 227: 680.
- 8 翰天玉, 刘建荣, 王建平等。猪脾可提取性核抗原的制备。生物化学与生物物理进展, 1986, (6): 37—40.
- 9 Sverén J., and R. Chalkley, The structure and assembly of active chromatin reviews. *Trends Genet.* 1990, 6(2):52.
- 10 Jaya T., et al. Multiple thyroid hormone binding sites on male rat liver nuclear matrices. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1987, 148: 1496.