

不同日龄大鼠肝脏中非组蛋白染色体 蛋白 (NHCP) 两相电泳图谱比较

丁邦裕* 姜文昌** 周碧华 杨瑞琨

(中国科学院昆明动物研究所)

摘 要

本文报导了不同日龄大鼠肝脏中非组蛋白染色体蛋白 (UP) 和 (NP), 在高分辨率的等电聚焦—SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱上蛋白斑点出现规律性变化。并讨论了这一变化与大鼠不同发育阶段的激素水平和基因调节的关系。

非组蛋白染色体蛋白是真核生物染色体结构的组成成份之一, 其组成的不均一性组织和种属特异性, 是这类蛋白的主要特征, 这些特征在基因调控中起着极为重要的作用 (Chiu, J. F. 1977, Elgin, S. C. R. et al., 1975)。非组蛋白指导 DNA 进行 RNA 合成具有选择性刺激 (Tene, C. S. et al., 1971), 以及非组蛋白的免疫特性 (Kono, N. et al, 1977. Bustin, M. et al, 1978), 核抗原特性 (Fujitani, H. et al, 1978) 等已早有论述, Kanungo (1979) 和 Medvedev (1979) 用盘电泳技术分别报导了不同年龄的大鼠脑、肝组织中非组蛋白染色体蛋白带型的差异。

本文在上述工作的基础上, 进一步从不同日龄的大鼠肝脏染色质中, 分离出与 DNA 疏松结合的非组蛋白染色体蛋白 (UP) 和与 DNA 紧密结合的非组蛋白染色体蛋白 (NP), 并用高分辨率的等电聚焦 (IF)—SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分析。

材 料 与 方 法

实验动物系本所饲养场提供的雄性健康大白鼠, 日龄分别为40天(体重80~114克); 60天(体重210~240克); 90天(体重300~340克); 取材前12小时停食, 但不断水, 取材时断颈处死, 剖腹取肝。

染色质制备, 用 Marushige (1966) 方法, 染色质制备到 UP 和 NP 组分的分离均在 (4°C) 条件下操作, 在制备大鼠肝染色质的所有试剂中均加入蛋白水解酶抑制剂—

* 现在通讯地址: 江苏省 (南京) 肿瘤防治研究所。

** 现在通讯地址: 江苏省 (南京) 生化制药研究所

本文1980年10月3日收到, 1981年10月29日收到修改稿。

0.2mM氯化磷酸苯甲烷(PMSF)。取自10克鲜肝的染色质,加15毫升5M尿素—50mM磷酸钠缓冲液(pH7.6),匀浆后电磁搅拌两小时,在20,000g冰冻(4°C)离心30分钟。所得上清液即为UP部分,沉淀加40毫升上述缓冲液匀浆,20,000g(4°C)离心30分钟,弃去上清液中残存的UP组分,加10毫升5M尿素—2M KCl—1mM磷酸钾缓冲液(pH6.8)匀浆,冰浴中超声处理至清亮,超声液经20,000g冰冻离心1分钟,所得上清液,再经羟基磷灰石柱(1×10cm)分离。分别用5M尿素—2M KCl—1mM和50mM磷酸钾缓冲液(pH6.8)洗脱,流速5分钟3毫升。50mM磷酸钾缓冲液洗脱峰为NP组分,收集UP和NP组分对蒸馏水透析(4°C),冻干浓缩成每毫升2毫克(Macgillivray, A. J. et al, 1972; Chiu, J. F. et al 1975)。供电泳分析用。

非组蛋白染色体蛋白等电聚焦(IEF)—SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(2D-PAGE)按照O'Farrell (1975)方法,浓缩的UP和NP样品直接加入第一相凝胶中,600微克蛋白样品/每毫升凝胶,安福林Ampholine pH3.5~10:pH5~7(0.01:0.04毫升),凝胶浓度为4%。第一相IEF电泳结束经平衡液0.75M Tris-HCl pH8.8,25毫升;10% SDS 15毫升;甘油5毫升; β -巯基乙醇2.5毫升;水2.5毫升混合,平衡10分钟,然后直接移入第二相电泳。10%电泳胶,4.75%浓缩胶,电流25毫安/块板,待示踪染料走到离底部0.5厘米处停止电泳,约需5~6小时。电泳后的胶板用10%三氯醋酸,内含5%磺基水杨酸,室温固定1小时后移入0.1%考马斯亮兰R250(溶解在95%乙醇:冰乙酸:水=50:10:40)染色液中,染色2~5小时。染色后用脱色液(乙醇:冰乙酸:水=25:10:65混合)脱色(避免用甲醇),脱至凝胶背景着色反差大为止,凝胶可保存在7%冰乙酸中或直接照相。

pH梯度测定按O'Farrell (1975)叙述的方法。

非组蛋白染色体蛋白分子量的测定按Weber等人(1969)叙述的方法,用已知分子量的蛋白作为标准,按上述的电泳条件进行比较。

结果与讨论

不同日龄大鼠肝脏中与DNA疏松结合的非组蛋白染色体蛋白(UP)和与DNA紧密结合的非组蛋白染色体蛋白(NP)经等电聚焦—SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离表明:pH梯度从4.7—7.8(图1)两者基本一致。根据图2 NP组分的分子量范围主要是在40,000—90,000,UP组分在34,000—80,000,不同日龄的大鼠肝UP组分和NP组分的电泳图谱也基本类似,说明大鼠在日龄为40—90天这一发育阶段其基因调节水平和代谢类型可能差异不很大,但蛋白电泳中某些蛋白斑点也发生一些变化。

UP组分可分出110个分子量和pH梯度不同的蛋白斑点(图3,4,5)将图谱中变化较大的部分分成几个区来加以说明。A区日龄为40天的大鼠肝有3个斑点,60天时有两个斑点显色微弱,在该区域分子量为 6.8×10^4 pI 5.0,相当于40天A区中间一点,蛋白斑点则明显加深。C区60天、90天逐渐出现明显的pH不同的四个蛋白斑点,随着日龄的增加而加深。蛋白斑点D,40天时清楚可见,而60、90天则模糊不清。

NP组分(图6、7)蛋白斑点A,90天时几乎看不到,而B斑点则特别明显;40天

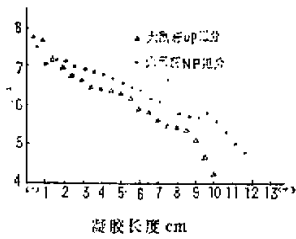


图1 大鼠肝UP和NP组分IF的pH梯度

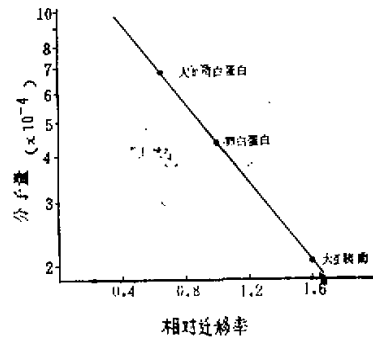


图2 标准蛋白质的分子量

的蛋白斑点A比较清楚而B斑点则不清；在C区，40天时只见到一个蛋白斑点；60天时见到两个蛋白斑点；90天时可看到四个蛋白斑点。

90天大鼠肝UP和NP组分电泳图谱虽较类似，但是相似部分的Rf值不相同，反应出分子量的不一致，并非UP部分与NP部分互相污染所造成。

UP组分(2D-PAGE)图形的蛋白斑点有随日龄的增加而减少的趋势。40和60天大鼠肝UP约有110个蛋白斑点，而90天时减至约70个蛋白斑点。NP部分蛋白斑点只有UP组分蛋白斑点的一半。这一结果与Kanungo, M. S.等人(1979)报导大鼠肝非组蛋白染色体蛋白随着年龄的增加在蛋白带型中有些带消失，只出现个别新带的结果类似。

Kanungo, M. S. et al 还报导用 β -雌二醇，影响年轻大鼠核非组蛋白的磷酸化作用，但对老年大鼠的影响却很小。核非组蛋白磷酸化后酸性增强并带有较多的负电荷，因此对起阻遏作用的组蛋白吸引力加强，这就使覆盖在该DNA节段基因上的组蛋白脱落，从而使基因活化并增强转录作用。本文UP和NP组分(2DPAGE)图谱中A、B和C等蛋白斑点的变化，很可能是由于大鼠发育不同时期，激素水平的不同(表1)，在电泳图谱中蛋白斑点发生规律性改变。

表1 不同日龄大鼠睾丸重量占体重的百分比

项目 \ 日龄	40	60	90*
体重(克)	105.93 ± 4.65	221.09 ± 2.93	319.64 ± 7.31
睾丸重(克)	0.88 ± 0.05	2.44 ± 0.06	3.08 ± 0.13
睾丸重/体重(%)	0.83 ± 0.00	1.10 ± 0.00	0.96 ± 0.00

* 为5只大鼠，其余均为10只大鼠。

本实验还用相同方法比较了60天日龄的大鼠脾脏和肝脏UP组分2D-PAGE图谱(图8, 4)，发现电泳图谱完全不同，进一步证实非组蛋白染色体蛋白具有组织特异性，还表明采用这一手段进行比较研究，有可能对动物种属和组织特异性及动物年龄，提供

一个可能的探讨途径。

已知NHCP包括许多核酶,对于机体的代谢和DNA转录具有调节作用。不同日龄大鼠肝UP组分在2D-PAGE图谱中发生有规律的改变,表明大鼠发育不同阶段代谢水平,转录活性的相应变化,这对于年龄的鉴别将具有一定的意义。可见非组蛋白染色体蛋白不仅具有种属和组织特异性,而且也随着年龄发生相应的改变。

参 考 文 献

- Bustin, M., B. Roswitha, B. Hopkins, and I. Isenberg 1978 *J. Biol. Chem.*, 253(5): 1694—1699.
- Chiu, J. F., Y. H. Tsal, K. Sakuma and L. S. Hnilica 1975 *J. Biol. Chem.*, 250(24): 9431—9433.
- Chiu, J. F., and L. S. Hnilica 1977 Nuclear nonhistone proteins, chemistry and function. In "Chromatin and Chromosomal Structure" (Hsueh Jci Li, Ronald A. Eckhardt ed.) Academic Press, New York, pp. 193—254.
- Elgin, S. C. R., & H. Weintraub 1975 *Ann. Rev. Biochem.*, 44: 725—764.
- Fujitani, H., J. F. Chiu, L. S. Hnilica 1978 *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 75(4): 1942—1946.
- Kono, N., I. Shima and G. Ohta 1977 *J. Biochem.*, 81(5): 1549—1555.
- Kanungo, M. S. and M. K. Thakur 1979 *Biophys. Res. Commun.*, 86(1): 14—19.
- Marushige, K. and J. Bonner 1966 *J. Mol. Biol.*, 15: 160—174.
- Macgillivray, A. J., A. Cameron, R. J. Krauze, D. Rickwood, and J. Paul 1972 *Biochem. Biophys. Acta.*, 277: 384—402.
- Medvedev, Z. A. 1979 *Gerontology.*, 25(4): 219—227.
- O'Farrell, P. H. 1975 *J. Biol. Chem.*, 250(10): 4007—4021.
- Teng, C. S., C. T. Teng, and V. G. Allfrey 1971 *J. Biol. Chem.*, 246(11): 3597—3609.
- Weber, K. & M. Osborn 1969 *J. Biol. Chem.*, 244(16): 4406—4412.

ANALYSIS OF NONHISTONE CHROMOSOMAL PROTEINS BY TWO-DIMENSIONAL GEL ELECTROPHORESIS FROM VARIOUS AGES OF RATS

Ding Bangyu, Jiang Wenchang, Zhou Bihua and Yang Ruikun
(Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica)

We used rats of different days of age to analyse their liver nonhistone chromosomal proteins UP and NP by high resolution isoelectric focusing-SDS polyacrylamide gel electrophoresis the proteins spots showed regular changes. This paper also discusses the relationship between the hormone metabolic level and gene regulation at different stages of development.