DOI:10.16016/j.1000-5404.1986.01.007

大鼠肝转录活性染色质的分离及某些理化性质的研究

周度金 导师：易禄康教授

（生化教研室）

提 要 作者参照Gottesfeld的DNase Ⅰ温和消化、配合Mg^{++}溶解的方法，结合本实验室条件加以改进，将大鼠肝染色质分离成S_2、P_1、P_2三个组份。比较分析了它们的化学组成，模板活性及对DNase Ⅰ消化的敏感性。结果显示：S_2染色质组份富含RNA和非组蛋白，具有高模板活性和高度的DNase Ⅰ消化敏感性，其RNA含量为P_1、P_2 RNA含量的2倍以上，S_2的模板活性分别为P_1、P_2的7.7倍和3.2倍，它对DNase Ⅰ的消化敏感性分别是P_1、P_2组份的20倍和7倍以上。说明此法分离的S_2染色质组份为肝细胞核内的转录活性染色质，而P_1、P_2组份为转录非活性染色质。

关键词 染色质；活性染色质；脱氧核糖核酸酶Ⅰ；转录活性

七十年代以来许多研究工作证明，真核染色质中能够转录的基因只占基因组的10～20%，核内大部分基因DNA处于被抑制的非活性状态[1][2]。由于具有转录活性的染色质在结构、组成和功能上都与整个染色质不同[3]，基因的激活和转录过程只能在活性染色质这一特定的染色质结构形式中进行。因此，将活性染色质从整个染色质中分离出来，分析其结构、组成和功能特征以及某些外加因素对它的结构和功能的影响，无疑是研究真核细胞基因表达调控机理的重要途径之一。近年来，国外学者们曾采用机械剪切[4]、超声粉碎[5]、梯度离心[6]、层析[7]等方法分离活性染色质。但这些方法大都因为不同程度地造成染色质蛋白质的重排，破坏了活性染色质的天然构型而受到限制。由于活性染色质具有更伸展的构型，易于被核酸酶优先释放，近几年来，核酸酶被广泛用于分离活性染色质。核酸酶消化法温和、简便且具序列特异性。本实验参照Gottesfeld[1]的DNase Ⅱ温和消化，配合$MgCl_2$溶解的方法，根据本实验室的条件，重新摸索了消化、离心和测活条件，在本实验室建立了分离活性染色质的方法，为进一步探讨辐射对转录的影响或其它因素对转录调控的机理提供一条有用的研究途径。

材料与方法

1. 材料、试剂

实验动物为健康雄性大白鼠，体重170～220 g。

试剂：DNase Ⅰ（320Kunitz units/mg蛋白质）系Sigma公司产品。E. Coli RNA聚合酶（1 u/μl）中国科学院生物物理研究所生化试剂厂产品。^{3}H-UTP（17Ci/mM）中国科学院上海原子核研究所产品。ATP、GTP、CTP、UTP系上海东风试剂厂产品。

2. 方法

（1）肝细胞核制备：按照Pflugfelder[8]等的方法稍加改良。

（2）肝染色质制备：参照王智等[9]改进的Huang氏梯度洗脱法。

（3）染色质化学成份分析：DNA含量测定：用Burton[10]法，以小牛胸腺DNA为标准。RNA含量测定：按David[11]法水解RNA后用Orcinol[12]法

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

测定RNA含量，以酵母RNA为标准。总蛋白含量测定：用0.02N NaOH稀释染色质后用Lowry[13]法测定，以小牛血清白蛋白为标准。组蛋白和非组蛋白的含量测定：用0.4N H_2SO_4 按Bonner法[14]提取组蛋白，以Lowry法[13]测组蛋白与非组蛋白的含量。

（4）大鼠肝转录活性与转录非活性染色质的分离，参考Gottesfeld[1]等法稍加改进，经梯度洗脱法所制备的肝染色质悬浮于10倍体积的10mM Tris-HCl缓冲液（pH8.0），4℃下匀浆，所得染色质溶液对25mM醋酸钠（pH6.6）透析过夜。4℃下高速（17,000rpm）离心20分钟。收集沉淀悬浮于25mM醋酸钠（pH6.6），匀浆，调染色质浓度为$O.D_{260nm}^{1cm}=10$。将染色质溶液置25℃水浴预热5分钟后，加入0.1M Tris-HCl缓冲液（pH 11）使反应液pH升至7.5左右。将反应管置冰浴冷却至0～4℃，于17,000rpm离心20分钟，得沉淀部分P_1、上清液S_1。小心吸取S_1置冰浴中，逐滴加入$MgCl_2$使最终浓度为2 mM，搅拌半小时，于17,000rpm离心20分钟，所得上清液S_2为Mg^{2+}溶解组份，沉淀P_2为Mg^{2+}不溶解组份。

（5）染色质模板活性测定：反应总体积100 μl内含：30mM Tris-HCl缓冲液（pH8.0）、10 mM $MgCl_2$、1 mM β-硫基乙醇、ATP、GTP、CTP各1mM、^{3}H-UTP 1μCi，各染色质组份相当于10 μgDNA，E. Coli RNA聚合酶1单位。于37℃恒温水浴振荡保温20分钟后加入10%TCA（三氯醋酸）—20mM $Na_4P_2O_7$终止反应。水浴放置15分钟后，酸不溶性物质经玻璃纤维滤膜过滤，相继用10% TCA、5%TCA、95%乙醇各5ml抽洗三次，滤膜在80℃干燥30分钟，浸于5ml 0.4%ppo—0.01%popop-甲苯闪烁液内，于FJ-2101G液闪计数器计数。

（6）DNase Ⅰ对肝活性与非活性染色质的消化动力学测定，参考王智等[15]的方法进行。

消化百分率

$$=\frac{\text{消化上清O.D260nm}-\text{对照组上清O.D260nm}}{\text{染色质O.D260nm}}$$

结果与讨论

严格控制DNase Ⅱ用量及酶与染色质共同保温的温度和时间，是分离活性染色质成功的关键。我们按以下两条标准确定分离条件：（1）上清S_2组份的DNA含最控制在占总染色质DNA量的10～20%[1]；（2）S_2组份模板活性应明显地高于其他组份。结果表明，固定消化时的温度（25℃）和DNase Ⅱ用量（10u/A260nm），S_2组份DNA含量随消化时间的延长而增加。如表1所示，用DNase Ⅱ（10u/A260mn）消化5分钟，16%的染色质DNA处于上清S_2部分，延长消化时间，S_2组份DNA含量逐渐增加。但随着消化时间的延长，S_2模板活性逐渐降低。这是因为，虽然转录活性染色质由于它的更伸展的构型易于被核酸酶消化释放，但延长消化亦能降解部分非转录活性DNA，且使释放的DNA片断更短[2]。这种较小分子的DNA难于在本实验所用的离心力下沉淀下来，仍处于上清部分，造成非活性染色质的污染，导致S_2组份模板活性下降。为满足S_2组份（即转录活性染色质组份）的DNA含量不超过总染色质DNA的20%和高模板活性两个条件，本

表1 消化不同时间S_2、P_1、P_2的DNA含量比例（%）及模板活性（cpm/μgDNA）

消化时间(分)	5			10			15		
染色质组分	P_1	P_2	S_2	P_1	P_2	S_2	P_1	P_2	S_2
DNA含量比(%)	70.9	12.5	16.6	60.3	19.4	20.3	59.6	16.4	24.0
模板活性 (cpm/μg DNA)	126.2	192.7	327.2	145.6	131.0	291.2	168.2	89.1	248.9
以P_1之模板活性为1的比值	1.0	1.5	2.6	1.0	0.9	2.0	1.0	0.5	1.5

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

实验选定 DNase Ⅱ 10u/A260nm、25℃ 水浴保温 5 分钟为分离活性染色质的消化条件。

为检测S_2组份是否即活性染色质，实验分别在模板功能、对 DNase Ⅰ 消化敏感性和化学组成三方面比较分析 S_2、P_1、P_2 染色质组份。结果表明S_2组份具有如下特征：

1. 高模板活性 已有实验[16]证明Gottesfeid的DNase Ⅱ/Mg^{2+}溶解法所得的Mg^{2+}溶解组份（S_2组份）DNA包含一系列单拷贝顺序和中度重复顺序，而且来自不同细胞类型的活性染色质组份含有不同的DNA顺序。这部分 DNA 富含为总细胞 RNA[1]、胞浆 mRNA[17]、rRNA[18]所编码的 DNA 顺序。体外检测分离的S_2模板活性亦明显高于P_1、P_2等非活性染色质组份，其程度随活性染色质分离方法和细胞来源而异，一般为P_2组份的模板活性的 2～3 倍[1][19]。本实验S_2组份的模板活性亦明显高于P_1、P_2组份（表 2），

表2 S_2、P_1、P_2染色质组份模板活性比较（$\bar{X}\pm SE$）

		染色质组份		
		P_1	P_2	S_2
紫外吸收法	模板活性 (cpm/μg DNA)	119.7±7.0 (3)*	205.6±11.5 (3)	317.9±17.4 (3)
	以P_1之模板活性为1的比值	1.0	1.72	2.66
二苯胺法	模板活性 (cpm/μg DNA)	112.0±8.6 (3)	237.6±10.4 (3)	862.2±15.6 (3)
	以P_1之模板活性为1的比值	1.0	2.12	7.7

*括号内数字为实验次数

但其程度受用于测定S_2、P_1、P_2DNA 含量的方法影响。由紫外法改为二苯胺法测染色质各组份的 DNA含量，所计算的 S_2 模板活性由为P_1的 2 倍增至7.7倍，由为 P_2的1.5～1.7倍增至3.2倍。其原因可能是本室用于分离活性染色质的DNase Ⅱ 比活性太低（320u/mg 蛋白质），消化时所需酶量较大，这些酶蛋白溶解性好，保留于上清S_2可能性大。酶蛋白本身在260nm处亦有光吸收，使紫外法测得的 S_2组份 DNA 含量较它的实际含量高，则以单位DNA 计算的 S_2 模板活性比实际活性低。改用二苯胺法测定染色质各组份DNA含量发现S_2的 DNA 含量明显低于紫外吸收法的测定值，而P_1、P_2的 DNA 含量则与紫外吸收法测定值十分接近（未发表资料）。因此，我们认为在 DNaes Ⅱ 比活性太低时，应以二苯胺法测得的DNA值计算各染色质组份的模板活性。

2. 对DNase Ⅰ 消化的高度敏感性 已知 DNase Ⅰ 能特异地优先消化转录活性基因[20]，因此对DNase Ⅰ 消化敏感性的高低可能作为衡量染色质某些组份是否为活性染色质的重要指标。图 1 显示S_2对 DNase Ⅰ 的消

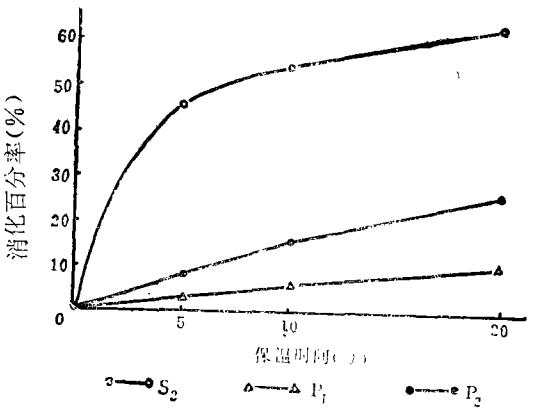


图 1 DNase Ⅰ 对S_2、P_1、P_2染色质组份的消化动力学

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

化敏感性远远地高于P_1、P_2，分别是P_1、P_2的20倍和7倍以上。保温5分钟，S_2的消化率高达49%，而P_1、P_2的消化率仅分别为2.3%和7.0%。S_2组份对DNase I高度敏感性提示S_2组份富含对DNase I高度敏感的转录活性基因。本文虽缺乏对S_2组份DNA进行特异基因顺序分析的直接证据，但已有不少文献[1][17][18]证明用DNase Ⅱ/Mg^{2+}溶解法分离的Mg^{2+}溶解组份富含转录活性基因。

3. 富含RNA　本实验S_2的RNA含量为P_2的RNA含量的2倍多（表3）。此与Arnold[19]的结果相近。S_2中非组蛋白/DNA（0.63）稍高于P_2的非组蛋白/DNA(0.49)与Bonner[21]所报告的活性染色质非组蛋白/DNA（0.46）稍高于非活性染色质（0.29）的结果类似。但S_2组蛋白含量高于染色质和P_1、P_2染色质组份的组蛋白含量，此与文献中活性染色质组蛋白/DNA值低于[21]或接近于[22]非活性染色质中的组蛋白/DNA的结果不一致。其原因可能有：（1）消化染色质时加入的DNase Ⅱ本身使蛋白质量增加，直接影响蛋白质含量测定，使S_2组份总蛋白含量较高，组蛋白含量较高可能与此有关；（2）已有实验[22]证明从S_2提取的组蛋白组份含有酸提取的非组蛋白。

表3　肝染色质各组份的化学成份分析

	蛋白质/DNA	组蛋白/DNA	非组蛋白/DNA	RNA/DNA
染色质	1.95	1.01	0.74	0.080
P_1	1.78	1.22	0.65	0.068
P_2	1.81	1.13	0.49	0.056
S_2	2.44	1.69	0.65	0.138

鉴于本实验中S_2组份具有与多数文献的活性染色质基本相同的高模板活性、高度的DNase I消化敏感性和富含RNA等特点，说明S_2组份相当于肝细胞内转录活性染色质，而P_1、P_2为非活性染色质。本文所介绍的方法可以较成功地分离活性染色质。

参考文献

1. Gottesfeld JM, et al. Partial purification of the template-active fraction of chromatin. A preliminary report. Proc Natl Acad Sci USA 1974; 71:2193～2197

2. Billing RJ, et al. The structure of chromatin as revealed by deoxyribonuclease digestion studies. Biochem Biophys Acta 1972; 281; 453～462

3. 周度金：转录活性染色质。（综述）生物科学动态 1985；2:8～15

4. Murphy EC, et al. Fractionation of mouse mycloma chromatin. Biochemistry 1973; 12:3843

5. Reeck GR, et al. Resolution of a spectrum of nucleoprotein species in sonicatied chromatin. Proc Natl Acad Sci USA 1972; 69:2317～2321

6. Slayter HS, et al. Electron microscopy and circular dichroism studies on chromatin. Biochemistry 1972; 11:3044

7. Reeck GR, et al. Distribution of histones and nonhistone protein in the ECTHAM cellulose fraction of chromatin from several tissues. Eur J Biochem 1974; 49:407

8. Pflugfelder GO, et al. Oligonucleosome as a modle system for chromatin transcription. Transcription with E. coli DNA-dependent RNA polymerase, J Mol Biol 1982; 158:365～389

9. 王智等：不同方法制备的大鼠肝染色质化学组成及模板活性的比较研究。生物化学及生物物理进展 1982; 4:62～65

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

10. Burton K:Determination of DNA concentration with Diphenylamine in Methods in Enzymology. 1968; 12(B):163, Ed by Grossman L and Moldave K, Academic Press, New York and London

11. David I, et al: Preparation of chromatin varation in the template properties of chromatin dependents on the method of perparation. Eur J Biochem 1974; 46:461～471

12. Schneider WC: Determination of nucleic acid in tissuses by pentose analysis in Methods in Enzymology. 1957; 3:680,Ed by Colowick SP and Kaplan NP, Academic Press, Inc Publishers, New York.

13. Lowry DH, et al: Protein measurement with the Folin phenal reagent. J Biol Chem 1951; 193:265～275

14. Bonner J, et al: Isolation and characterization of chromosomal nucleoproteins in Methods in Enzymology. 1968; 12(B):3, Ed by Grossman L and Moldave K, Academic Press, New York and London.

15. 王智等：小鼠腹水肝癌细胞染色质的转录活性及对DNase I 消化敏感性的研究。中国医学科学院学报 1983; 5(2):85～88

16. Gottesfeld JM,et al: Sequence composition of the template-active fraction of rat liver chromatin. Biochemistry 1976; 15:2472～2483

17. Gottesfeld JM, et al: Distribution of messenger RNA-coding sequences in fractionated chromatin. Cell 1977; 12:953～962

18. Matsui S, et al: Isolation and charaterization of rDNA-containing chromatin from nucleoli. Exptl Cell Res 1977; 109:151～156

19. Arnold EA, et al: Heterogenity of chromatin. Fractionation of sonicated rat liver chromatin by partial precipitation with Mg^{2+}. Arch Biochem Biophys 1974; 164:73～89

20. Groudine M, et al: Chromatin structure of endogenous retroviral genes and activation by an inhibitor of DNA methylation. Nature 1981; 292:311～317

21. Bonner J, et al: Isolation of template active and inactive regions of chromatin in Methods in Enzymology. 1975; 15(E):97, Ed by O'malley W, Academic Press, New York.

22. Lau AF, et al: Proteins of transcriptionally active and inactive chromatin from Friend Erythroleuoemia cells. Exptl Cell Res 1977; 107:35～46

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Studies on Fractionation of Transcriptionally Active Chromatin of Rat Liver and Its Physical & Chemical Characteristics

Zhou Dujin Tutor: Prof. Yi Lukong

(Department of Biochemistry, Third Military Medical College)

Rat liver chromatin was fractionated according to the modified procedure of Gottesfeld into three fractions, that is, P_1, S_2, and P_2. Fraction S_2 was found to be characterized by its higher transcriptional activity, highgr sensitivity to DNase I degradation, and higher content RNA and nonhistone protein than the other two. Its transcriptional activity was 7.7 times and 3.3 times more active than that of fractions P_1 and P_2 respectively; it was 20 times and 7 times more sensitive to DNase I degradation than fractions P_1 and P_2 respectively; and it contained twice more RNA than fractions P_1 and P_2. All the evidences support that fraction S_2 is the transcriptionally active part and fractions P_1 and P_2 the transcriptionally inactive parts of rat liver chromatin

Key words: Chromatin; Active chromatin; DNase Ⅱ; Transcriptional activity

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net