

---

# 染色质的结构与功能

科学出版社

---

# 染色质的结构与功能

王幽兰 等 译



北林图 A00061456



265814

科学出版社

1981

## 内 容 简 介

本论文集包括选译自国外书刊的十篇文章。主要论述染色质的结构和功能,以及细胞分化中基因表达的调节与控制,俾能促进和配合细胞生物学研究在国内的开展。可供细胞生物学、分子生物学、生物化学、遗传学等方面的研究和教学工作者参考。

## 染色质的结构与功能

王幽兰 等 译

责任编辑 姜梦兰

科学出版社出版

北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

\*

1981 年 6 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16  
1981 年 6 月第一次印刷 印张: 14 3/4  
印数: 0001—5,210 字数: 339,000

统一书号: 13031·1576

本社书号: 2161·13—10

定 价: 2.30 元

# 目 录

|                            |                                                             |
|----------------------------|-------------------------------------------------------------|
| 胚胎发育和细胞分化过程中细胞核蛋白质的变化····· | Robert D. Platz et al. ( 1 )                                |
| 红血球样细胞终末分化期间基因表达的调节控制···   | A. A. Moscona, Alberto Monvey ( 15 )                        |
| 活性基因中染色质亚单位的构象变化·····      | H. Weintraub, M. Groudine ( 28 )                            |
| 染色质亚单位·····                | Hsueh Jei Li ( 41 )                                         |
| 真核生物的 DNA·····             | E. Southern ( 54 )                                          |
| 染色体蛋白质·····                | J. D. Johnson, A. S. Douvas, J. Bonner ( 82 )               |
| 非组蛋白·····                  | J. D. Johnson, A. S. Douvas, J. Bonner (109)                |
| 真核生物中基因表达的调节·····          |                                                             |
| ·····                      | Bert W. O'Malley, Howard C. Towle, Robert J. Schwartz (126) |
| 染色质激活和阻遏的机制·····           | Norman Maclean, Vaughan A. Hilder (155)                     |
| 培养的哺乳动物细胞的基因表达·····        | Rody P. Cox, James C. King (186)                            |

# 胚胎发育和细胞分化过程中细胞核蛋白质的变化

Robert D. Platz et al.

## 摘 要

海胆胚胎和大鼠精巢是两个很适合于研究分化过程中细胞核蛋白质调节功能的发育系统。海胆胚胎代表一个动态系统,其特点是,在细胞分化过程中,当细胞分道发育时,大分子的异质性增加。相反的,在大鼠精巢中,精子的发生代表一个单一的细胞类型的分化,其特点是,当精子细胞成熟时,功能和组成逐渐简化。在海胆胚胎中,我们集中注意力于一类酶促磷酸化的非组蛋白蛋白质的变化。非组蛋白蛋白质磷酸化的速率和专一性,看来反映了分化过程,因此这就表明,细胞核的磷蛋白可能涉及基因的调控。从精子发生的几个阶段(应用沉降速度分离的细胞)得到的细胞核蛋白质的分析指出,组蛋白和非组蛋白蛋白质渐渐被非常碱性的、低分子量的蛋白质所置换。绝大部分的细胞核蛋白质是在精子发生的早期积极合成的,只有三种低分子量的碱性蛋白质,是在精细胞的晚期积极合成的。这样,染色体蛋白质的合成和异质性定性地反映了精细胞分化的特定时期。

多细胞有机体的发育开始于一个具有全部遗传信息编码在它的 DNA 中的接合子。分化过程中出现了不同的细胞类型。虽然每一个细胞含有同样的信息 DNA,但只有一部分有效信息表达出来。DNA 所含信息的选择性利用,既发生于成熟细胞的正常功能活动中(例如,在激素活化下,再生,等等),也发生于发育中的胚胎建立不同类型细胞的时候。在这两种情况下,是否是由同样的调节机制操纵,还未能肯定。不过,问题是一样的:决定某些基因转录为 RNA,某些不转录的调节机制是什么?

转录的控制机理常以抑制-去抑制体系的语言来概念化,类似于 Monod 和 Jacob<sup>[1]</sup> 所提出的细菌基因调节的模型。虽然,缺少实验证据显示它在真核细胞中的运转;但是,这个模型的简单和美妙,确保了它的存留。另一方面, Britten 和 Davidson<sup>[2]</sup> 所提出的较高等的细胞的基因调节模型,绝大部分与真核系统的实验数据相一致。除一般的基因调节模型外,还有几个独特的控制机制,曾在发育系统中被描述过。这些包括蛔虫的染色体的选择性减小<sup>[3]</sup>,以及哺乳动物的 X 染色体的失活<sup>[4]</sup>。虽然这些独特的控制出现于稀有的情况下,并代表着相对稳定的变化;但是,它们提供了一个有利于正在分化中的细胞,并为这类细胞所利用的、可选择的控制机制的多样性的迹象。

当细胞比较稳定,或产生某些进一步的变化时<sup>[5]</sup>,按分化的广意的定义来说,细胞变化的程度和类型之间没有什么差别。根据这个定义,那就很清楚,分化既包括在转录水平上,也包括在翻译水平上调节的细胞变化。因此,在检查分化的基因调节时,必须证实细胞中所观察到的变化,是发生在 RNA 合成水平的调节活动的结果。

特异的基因作用是以细胞分化为基础的看法,导自基因控制的酶促合成,以及在不同类型细胞中出现不同酶系的证据。然而,细胞分化中特异基因的活化作用的最直接的证据,是在各种各样的细胞类型中出现不同聚居的 RNA 分子。特殊细胞类型中,合成的

RNA 产物的定性和定量分析的必要条件,是利用特殊蛋白质的信使 RNA 构成 DNA 的互补分子来满足<sup>[6]</sup>。于是,通过杂交试验,cDNA 便可以被用来鉴定少量的特殊 RNA 分子<sup>[7]</sup>。假使合成的 RNA 和特殊的细胞变化之间存在着直接的联系,这个体系对识别调控分子和在体外分析它们的作用机制,将可能是有用处的。

过去十年中,对调控分子的搜寻日益指出,细胞核的非组蛋白蛋白质是最可能包括调节特殊基因起作用的蛋白质的一类大分子。这些资料最近曾为 Stein、Spelsberg 和 Kleinsmith 评论过<sup>[8]</sup>。特别是,非组蛋白蛋白质在有活力的组织和染色质里存在的量逐渐增加,它们是高度异质的,并表现组织和种族的专一性;它们能够刺激无细胞系统中的 RNA 合成;它们之中的某些与 DNA 的结合特殊。同时,这些蛋白质中的某些特定种类的合成与基因活性的诱发有联系。

我们对细胞分化过程中核蛋白作用的两个系统感兴趣:大鼠精巢中精子的发生和海胆胚胎的早期发育。海胆胚胎代表一个动态系统,其特点是,在细胞分化过程中,当细胞分道发育时,大分子的异质性增加<sup>[9]</sup>。在另一方面,精子发生代表一个单向性的和高度有顺序的变化,其特征是大分子组成成分的逐渐简单化,以及正在成熟中的精细胞的 RNA 合成的奥妙的失活<sup>[10]</sup>。因此,就新基因的激活和新细胞类型的建立来说,在海胆胚胎中,我们有一个迅速扩张的体系,而在精子发生中,趋势是朝向基因转录的失活和功能的专一化。

### 大鼠精巢中的精子发生

精子的发生涉及到生精上皮细胞向由成熟精子为代表的、最终阶段的逐渐分化<sup>[11]</sup>。程序始自一个繁殖时期,在此期间,精原细胞分裂几次,以增加可能的生殖细胞的数目。少数细胞留下,以补充干细胞数目;但大多数,作为初级精母细胞,进入一个生长期。第一次减数分裂前期是延长的,在大鼠上持续约八天。值此期间,当同源染色体配对和染色体的重新排列出现时,细胞核内进行着剧烈的变化。第一次减数分裂后紧跟着第二次减数分裂,遂产生单倍体精细胞。在精细胞成熟的以后时期,细胞在形态上,从一个具有巨大细胞核的圆形细胞,转变为一个具有特殊形态的、DNA 紧密包裹和细胞质很少的细胞。这样,哺乳动物的精巢提供了一个在细胞形态方面合适的、特殊变化的顺序,这一顺序变化在成长动物上很容易被利用。这些变化是在激素控制下的;不过,它们进行的全部速度是与外界、或内部因子的改变高度对抗的。

由于分离精巢细胞成为相对纯一的部分的技术的发展<sup>[12]</sup>,利用哺乳动物精巢作为分化中细胞生化研究原料的可能性大大提高。我们所采用的一个技术是,利用在单位重力下的速度沉降法,按照它们的大小分离细胞(图 1)。应用这个技术于大鼠精巢细胞悬浮液,我们曾经得到富于特殊细胞类型的一些部分,如表 1 所示。富于粗线期精母细胞(B),圆形精细胞(E和F),以及晚期精细胞(H和I)的部分,被认为是精子发生的那些特殊细胞类型、或时期的代表。从这些特定部分分离的细胞核,经第二次“Staput”分离进一步纯化的实验<sup>[13]</sup>证实了这个设想。这个方法使我们得到含有 80—90% 粗线期或圆形精细胞细胞核的部分。因为精细胞晚期能耐受超声波处理,只要对整个精巢进行超声波处理,就可以得到大于 95% 的纯净度<sup>[14]</sup>。

各种 Staput 部分细胞核的酸抽提去除了大部分组蛋白和某些非组蛋白蛋白质。代

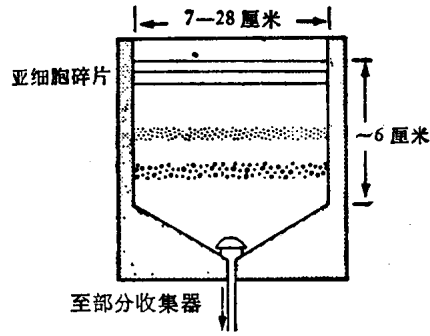


图1 在单位重力下,借速度沉降法分离细胞的圆柱形器皿或“Staput”装置的图解。细胞悬浮液装载在 Staput 底部,然后加上非直线形的 1—4% 牛血清白蛋白梯度<sup>[42]</sup>。三个半小时以后,细胞按它们的大小移动,形成分离的带。于是,将此器皿中的悬液卸到一个部分收集器中。高峰部分样品,借离心集中和浓缩。细胞核的分离,如另文所述<sup>[13]</sup>。

表 1

|                      | Staput 部 分 |           |     |           |           |           |           |     |
|----------------------|------------|-----------|-----|-----------|-----------|-----------|-----------|-----|
|                      | B          | C         | D   | E         | F         | G         | H         | I   |
| 平均沉降速度<br>(迁移毫米数/小时) | 14.0       | 11.2      | 9.1 | 7.0       | 5.3       | 3.8       | 2.4       | 1.0 |
| 细胞类型                 |            |           |     |           |           |           |           |     |
| 精原细胞                 | 1.5        | 1.2       |     |           | 1.0       | 8         | 1.1       | 0.2 |
| 精母细胞                 |            |           |     |           |           |           |           |     |
| 初级早期 <sup>a</sup>    | 4          | 4         | 5   | 4         | 9         | 6         | 0.8       | 0.2 |
| 粗线期                  | <b>61</b>  | <b>44</b> | 19  | 2         | 0.6       | 0         | 0         | 0   |
| 次级                   | 0.4        | 1.2       | 6   | 1.4       | 0.2       | 0         | 0         | 0   |
| 精细胞                  |            |           |     |           |           |           |           |     |
| 阶段 1—8               | 13         | 24        | 43  | <b>71</b> | <b>67</b> | 9         | 0         | 0.2 |
| 阶段 9—10              | 2          | 1.8       | 2   | 5         | 3         | 6         | 3         | 0.2 |
| 阶段 11—15             | 7          | 10        | 7   | 5         | 7         | <b>15</b> | <b>26</b> | 21  |
| 阶段 16—19             | 0.4        | 1.2       | 0.4 | 0.7       | 0.4       | 2         | 4         | 27  |
| 未知的和正在退化的            | 3          | 4         | 5   | 2         | 3         | 11        | 6         | 0.8 |
| 非生殖的 <sup>b</sup>    | 3          | 4         | 2   | 2         | 3         | 5         | 0.4       | 0   |
| 残余物 <sup>c</sup>     | 5          | 6         | 8   | 5         | 6         | 38        | 59        | 50  |

a 包括细线期、合线期和粗线期早期精母细胞。

b 包括足细胞、间介细胞和巨噬细胞。红血球没有计数。

c 残余物是指含有核酸蛋白质聚合物的细胞质碎片<sup>[43]</sup>。其它细胞质碎片没有计算。

大鼠精巢细胞类型的百分数,根据单位重力下,沉降 3 小时后所得部分测定。计数是在 Bouin 氏液固定、PAS-苏木精染色、空气中干燥的涂片上的任意区域中进行的<sup>[43]</sup>。每个部分中,至少检查 500 个细胞。每个部分中,在数量上占优势的细胞类型以黑体字表示。

表各种不同细胞类型部分的酸溶性蛋白质的电泳图谱明显地不同(图 2)。例如,富于精细胞晚期(G + H 和 L)部分的主要成分精细胞蛋白质(TP 和 S1),在富于粗线期精母细胞(B + C)和圆形精细胞(D + F)部分中,实际上是不存在的。TP 和 S1 的数量与 Staput 部分中精细胞晚期的存在紧密相关<sup>[45]</sup>。不同细胞类型具有不同的特定的碱性蛋白质的另一个例子,从两种富赖氨酸组蛋白 F1 和 X1 的比值(图 2)就很清楚。这个比

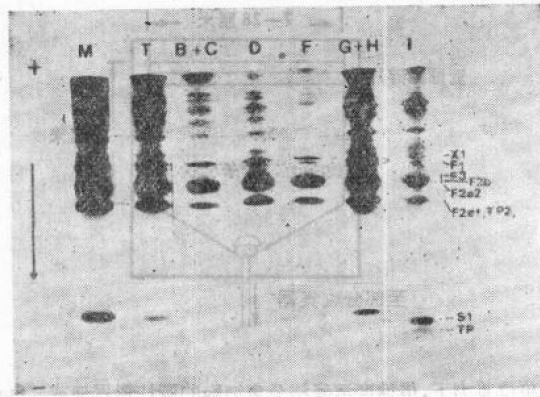


图2 不同 Staphylococcus aureus 部分酸溶性细胞核蛋白质的电泳图谱。从各种不同类型的细胞分离细胞核。用 0.25N 盐酸抽提的碱性蛋白质，借丙烯酰胺凝胶电泳，在 2.5M 尿素，pH2.7 下分离<sup>[45]</sup>。图示得自两个对照组和五个 Staphylococcus aureus 细胞部分的碱性蛋白质。

(M) 机械制备的大鼠精巢细胞中的酸溶性细胞核蛋白质。

(T) 经胰蛋白酶处理过的细胞的对照组样品，但未经 Staphylococcus aureus 分离。

(B + C) 主要含有晚期精母细胞 (61%)，和圆形精细胞，阶段 1—8 (14%) 的 Staphylococcus aureus 部分。

(D) 含有初级精母细胞 (19%)，加上圆形精细胞 (51%)，但少量晚期精细胞，阶段 9—19(9%) 的 Staphylococcus aureus 部分。

(F) 含有早期圆形精细胞 (56%) 和晚期精细胞 (27%) 的 Staphylococcus aureus 部分。

(G + H) 含有晚期精细胞 (33%) 和残余物 (48%) 的 Staphylococcus aureus 部分。

(I) 含有晚期精细胞 (82%) 和十分细小的残余物 (16%) 的 Staphylococcus aureus 部分。

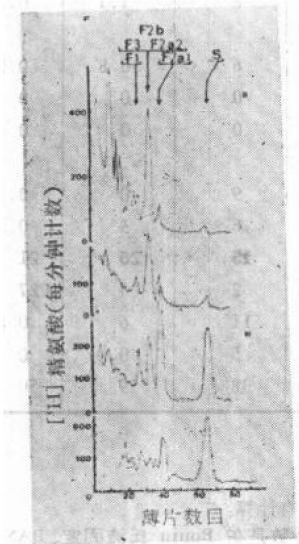


图3 酸性尿素聚丙烯酰胺凝胶分离后的 Staphylococcus aureus 部分中的酸溶性蛋白质的放射性图谱<sup>[45]</sup>。精巢内注射<sup>[3H]</sup>精氨酸 (100 微居里/精巢) 24 小时后，杀死大鼠。用 Gilson Aliquogel 碎片器将柱状凝胶切成 1 毫米薄片，并用液体闪烁光谱测定法计数。这里展示 Staphylococcus aureus 部分 B、F、H 和 I 的图谱。主要组蛋白的位置以箭头指示；S，结合着的精细胞蛋白质 TP 和 S1。

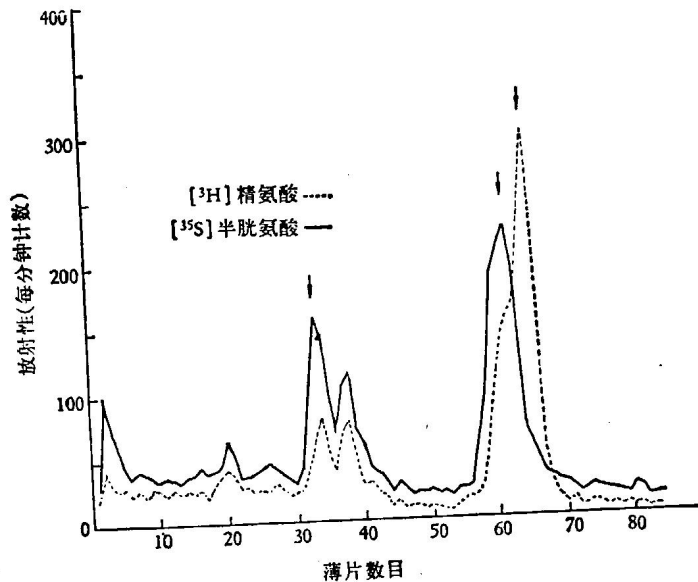


图4 从耐超声处理精细胞分离的酸溶性蛋白质的放射性图谱。将总体积 100 微升的 L-<sup>[3H]</sup>精氨酸 (100 微居里/精巢) 和 L-<sup>[35S]</sup>半胱氨酸 (250 微居里/精巢) 注射至精巢。酸溶性蛋白质用凝胶电泳分开<sup>[45]</sup>，并将凝胶每隔 1 毫米切开和计数。第 38 号薄片的峰是一个易变的组分，尚未被鉴定。TP2 位于第 33 号薄片。薄片 61 中的<sup>[35S]</sup>峰确定了 S1 与薄片 64 中的 TP 的相关位置。



值,从粗线期精母细胞(B+C),到精细胞早期(F),变化极大。粗线期细胞中,X1含量的高水准,与这部分组蛋白可能涉及减数分裂过程中染色体配对和重新排列的进行的假设是一致的<sup>[46]</sup>。

[<sup>3</sup>H] 精氨酸的掺入酸溶性蛋白质(图3)指出,在不同的 Stapur 部分中合成不同的组蛋白。在B部分中,富于粗线期精母细胞,掺入在组蛋白 F3、F2b、和 F2a2 区域占优势;而在H部分中,富于伸长的精细胞,掺入在组蛋白 F2a1 区域占优势。在B部分同样看到,在酸溶性非组蛋白蛋白质中有高水平的掺入,不过我们还没有对这些蛋白质定性。在部分I中富于晚期精细胞,大部分掺入发生在精细胞 TP 和 S1 蛋白质中。进一步纯化晚期精细胞达到大于 95% 的纯度后,掺入图谱指出,在精细胞晚期两个区域有活跃的掺入(图4)。这些区域的凝胶含有精细胞蛋白质、TP 和 S1,以及类似 F2a1 的蛋白质,此后称之为 TP2。

标明 TP 和 S1 的带子的鉴定,是根据超声波处理的精子头部分离的两个主要蛋白质的氨基酸分析(表2)。即使有少量其它蛋白质的轻微污染,从这些蛋白质所得到的氨基酸组成成分很接近于 Kistler 等的报告<sup>[47]</sup>。Kistler 的分析指出,移动较慢的 S1 蛋白质含有 65% 精氨酸和 9.4% 半胱氨酸;而移动较快的 TP 含有大约 20% 精氨酸和 20% 赖氨酸,

表 2

| 氨基酸               | 克分子/回收到的 100 克分子氨基酸 <sup>a</sup> |      |
|-------------------|----------------------------------|------|
|                   | TP                               | S1   |
| 赖氨酸               | 15.6                             | 5.6  |
| 组氨酸               | 4.2                              | 0.4  |
| 精氨酸               | 25.3                             | 56.8 |
| 天冬氨酸              | 6.1                              | 1.2  |
| 苏氨酸               | 3.0                              | 1.6  |
| 丝氨酸               | 12.6                             | 8.4  |
| 谷氨酸               | 1.0                              | 0.7  |
| 脯氨酸               | 1.9                              | 微量   |
| 甘氨酸               | 8.9                              | 0.5  |
| 丙氨酸               | 3.7                              | 1.8  |
| 半光氨酸 <sup>b</sup> | 3.2                              | 13.2 |
| 缬氨酸               | 1.6                              | 微量   |
| 甲硫氨酸              | 2.7                              | 微量   |
| 异亮氨酸              | 0.6                              | 微量   |
| 亮氨酸               | 4.7                              | 0.5  |
| 酪氨酸               | 4.0                              | 6.5  |
| 苯丙氨酸              | 0.5                              | 2.0  |

<sup>a</sup> 丝氨酸或苏氨酸的水解作用没有校正。

<sup>b</sup> 半胱氨酸是在过甲酸氧化后,当作磺基丙氨酸测定的<sup>[47]</sup>。

经超声波处理,并通过 1.5M 蔗糖离心分离的大鼠精巢精细胞。分解精细胞头部,把它们溶解在 5M 盐酸胍, 0.28β-巯基乙醇, 0.5M 三羟基氨基甲烷, pH8.5<sup>[48]</sup>。在 0.25N 盐酸中抽提的碱性蛋白质,通过用 0.01N 盐酸平衡的交联葡聚糖 G-75 柱分。含有迅速移动的精细胞蛋白质的最后峰部,对蒸馏水透析,冰冻干燥,并用 0.4N 硫酸抽提。不溶于硫酸的蛋白质在丙烯酰胺凝胶上像 S1 般移动(图2)。溶于硫酸的蛋白质用三氯乙酸分级分离;在 3—20%三氯乙酸中不溶解的物质被鉴定为 TP(图2)。将这两个部分在 6N 盐酸、110℃ 水解 24 小时,然后在改进的 Beckman Model 120C 氨基酸分析仪上分析。

表 3

| 氨基酸  | 克分子/回收到的 100 克分子氨基酸    |                        |                  |
|------|------------------------|------------------------|------------------|
|      | 小牛胸腺 F2a1 <sup>a</sup> | 大鼠精巢 F2a1 <sup>b</sup> | TP2 <sup>b</sup> |
| 赖氨酸  | 10.9                   | 8.9                    | 8.7              |
| 组氨酸  | 1.9                    | 1.9                    | (5.2)            |
| 精氨酸  | 13.9                   | 13.1                   | 14.2             |
| 天冬氨酸 | 5.0                    | 6.2                    | 5.0              |
| 苏氨酸  | 6.6                    | 7.7                    | 7.9              |
| 丝氨酸  | 2.5                    | 3.0                    | 22.2             |
| 谷氨酸  | 6.2                    | 7.8                    | 6.6              |
| 脯氨酸  | 1.3                    | 1.9                    | 13.4             |
| 甘氨酸  | 15.9                   | 15.9                   | 6.1              |
| 丙氨酸  | 7.5                    | 7.9                    | 4.5              |
| 缬氨酸  | 7.8                    | 8.7                    | 2.3              |
| 甲硫氨酸 | 1.0                    | 0.3                    | (0.9)            |
| 异亮氨酸 | 5.6                    | 5.9                    | 0.3              |
| 亮氨酸  | 8.0                    | 9.0                    | 2.1              |
| 酪氨酸  | 3.5                    | 0.05                   | (微量)             |
| 苯丙氨酸 | 2.2                    | 2.2                    | 0.8              |

<sup>a</sup> 文献号码 [27]。

<sup>b</sup> 丝氨酸或苏氨酸的分解作用没有校正。

在 0.4N 硫酸中, 抽提已纯化的精细胞, 分离精巢专一的精细胞蛋白质 TP2。在 5—20% 三氯乙酸中不溶解的部分富含 TP 和 TP2。在丙烯酰胺凝胶上分开后<sup>[45]</sup>, 切下已染色的带子, 按照 Houston<sup>[48]</sup> 的介绍, 准备氨基酸分析, 但未加  $\beta$ -巯基乙醇。

从整个大鼠精巢细胞核的酸性蛋白质电泳得到大鼠精巢 F2a1 组蛋白, 并以同样方法分析。为了估价实验程序的可靠性, 小牛胸腺 F2a1 的氨基酸组成成分包括在内以作比较。组氨酸、甲硫氨酸和酪氨酸的数值是不可靠的。

但无半胱氨酸。在精细胞晚期合成的另一种蛋白质 (TP2), 在长凝胶上, 比 F2a1 移动稍快, 且含有半胱氨酸。这个蛋白质的氨基酸组成与小牛胸腺组蛋白 F2a1 移动到一条带上, 如表 3 所示。

在不同类型细胞中, 有不同形式的组蛋白合成, 暗示这些蛋白质可能与精子发生过程中功能的变化有关。例如, 粗线期细胞中 [<sup>3</sup>H] 精氨酸掺入的峰 (图 3, B), 与组蛋白 F3、F2b 和 F2a2 迁移到的位置相一致。迁移到这个区域的大鼠精巢细胞的组蛋白, 已经证明还含有称作 X2 和 X3 的另外的碱性组蛋白<sup>[48]</sup>。因为这些蛋白质只在减数分裂的组织中找到, 它们可能是减数分裂过程中具有特殊功能的染色体结构成分, 或者它们可能作为配对的蛋白质, 这些蛋白质构成合线期精母细胞中同源染色体间的接合丝复合体<sup>[49]</sup>。

精细胞蛋白质功能上的意义仍不清楚。它们一般被认为, 在精细胞成熟过程中, 在细胞核凝聚和基因失活中起作用<sup>[20]</sup>。除细胞分离外, 动力学研究的证据<sup>[44]</sup> 指出, 具有半衰期约两天的 TP 是在 9—15 阶段间合成的; 而 S1 是在 15—18 阶段间合成的。精细胞蛋白质 TP2, 实质上以与 TP 同样的动力学合成和降解。这些精巢专一的蛋白质看来是精细胞成熟中暂时的组成成分, 它们可能起以精子蛋白质 S1 置换体细胞组蛋白的作用。在附睾里, 精子成熟过程、S1 分子间二硫键的形成, 致使细胞能够耐受种种机械的和化学的处理损伤<sup>[21]</sup>。不过在盐酸胍中, 在  $\beta$ -巯基乙醇的存在下, 精子头部是可溶性的<sup>[22]</sup>。

大鼠精巢中,精细胞晚期精细胞蛋白质的合成,与 Louie 和 Dixon<sup>[23]</sup> 在鲑鱼上, Monesi<sup>[24]</sup> 和 Lam 与 Bruce<sup>[25]</sup> 在小鼠上,以及 Loir<sup>[26]</sup> 在公羊上的发现是一致的。我们没有看到, [<sup>3</sup>H]-精氨酸掺入到从高度纯化的精细胞晚期分离的躯体的组蛋白质部分中去的证据。

与充分定性的组蛋白<sup>[27]</sup> 相对比,非组蛋白(酸不溶性的)蛋白质是高度异质的和定性很差的(图 5)。在 F 和 G 部分之间,异质性显著降低,换句话说,有几条蛋白质带缺失或大大缩减。连续在 H 和 I 间的趋势,代表精细胞的成熟日益进入较晚时期。根据表 1,从 F 到 G 的转变,相当于从圆形精细胞(阶段 1—8)到伸长的精细胞的形态变化。这么看起来,在染色质凝缩形成一个精子头部的过程中,许多非组蛋白蛋白质丢失了。这类凝缩发生在全套组蛋白仍旧存在的时期(阶段 1—8),并且和减数分裂后期细胞中观察到的 RNA 合成的抑制有关系<sup>[28]</sup>。在鸟类红细胞成熟期间,非组蛋白蛋白质中的类似变化曾经被注意到<sup>[29]</sup>。高分子量蛋白质的存在,主要在富于粗线期精母细胞的部分中(B 和 C),与最近所观察到的,高分子量非组蛋白蛋白质在大鼠精巢发育时期,直到精原细胞和精母细胞分化才出现,是相一致的<sup>[30]</sup>。

图 5 里面的几个非组蛋白,能够勉强地与某些特殊细胞类型相一致。例如,一条约 53,000 分子量的蛋白质带子,似乎是贯通精细胞早期正在发育中的生殖细胞的一个组成成分,但是大约在阶段 8 以后就不复存在。在 31,000 分子量处的带子是与精母细胞和精细胞早期(阶段 1—8)有联系,而在 48,000 分子量处的一条带子主要是与伸长中的精细胞(阶段 11—15)有联系。在 44,000 和 20,000 分子量处的带子似乎是精细胞晚期(阶段 16—19)的主要成分。在 20,000 分子量处的带子,和在 TP2 处的带子具有同样的迁移率;同时,可能与在 20,000 分子量以下的两个蛋白质一道,代表着用 0.25N 盐酸未将碱性蛋白质完全抽出的部分。<sup>[3H]</sup> 氨基酸的掺入非组蛋白蛋白质,揭示出在不同细胞类型中合成的细胞核蛋白质,在数量上和种类上有重要的变化<sup>[31]</sup>。最高的掺入发生在富于粗线期精母细胞的部分中;而在精细胞晚期的非组蛋白蛋白质中,掺入微不足道、或没有什么掺入可察觉。

我们曾检查过大鼠精巢细胞核蛋白质的磷酸化作用,并且发现,在体内和在体外许多细胞核蛋白质都是积极地进行磷酸化(图 6)。可是在大鼠精巢中,非组蛋白蛋白质磷酸盐的快速转换,妨碍我们从个别的细胞类型得到磷酸化作用的重复出现的轮廓。Louie 和 Dixon 曾证明鲑精巢中组蛋白的磷酸化,以及新合成的精子精蛋白。在晚期精细胞的

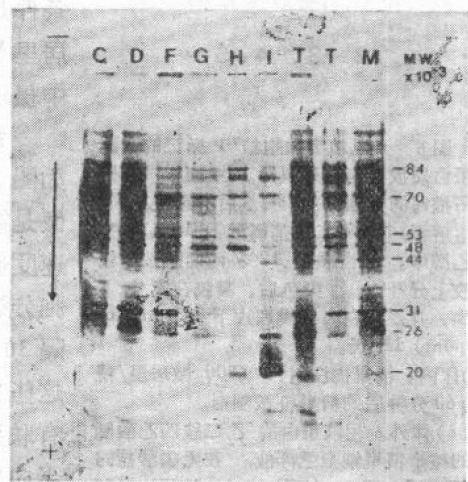


图 5 Staput 部分中的非组蛋白细胞核蛋白质。用 0.25N 盐酸抽提纯化的细胞核后,先将酸不溶解的残基溶解在 4% 十二烷基磺酸钠, 10%  $\beta$ -巯基乙醇中,然后进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺平板凝胶电泳<sup>[49]</sup>。细胞核分离前的 B—I 部分的细胞组成列于表 1。非组蛋白细胞核蛋白质是从 C、D、F、G、H 和 I Staput 部分分离出来的; T, 胰蛋白酶对照: 用胰蛋白酶制备整个精巢细胞悬浮液<sup>[15]</sup>,并保持在 4°C, 4 小时,以模仿 Staput 分级分离的条件; M, 机械的对照: 未用胰蛋白酶制备的整个精巢细胞悬浮液。注意 T 和 M 的非组蛋白实际上是同样的,这说明在用胰蛋白酶制备细胞悬浮液时,这些蛋白质不存在明显的降解。主要蛋白质分子量的估计值标明在右侧。

成熟期间,鱼精蛋白几乎完全脱去了磷酸。Kadohama 和 Turkington<sup>[30]</sup> 在成熟大鼠精巢中观察到的低水平的磷酸化作用,可能是细胞核磷酸酶活动的结果。

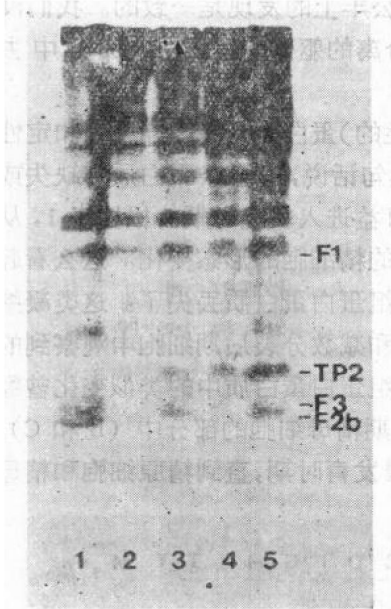


图6 大鼠精巢细胞核 $^{32}\text{P}$ 标记的细胞核蛋白质放射自显影照片。细胞核按在别处所描写的方法分离<sup>[41]</sup>,然后不经酸抽提,而溶解于4%十二烷基磺酸钠-10% $\beta$ -巯基乙醇中。蛋白质在12%丙烯酰胺平板凝胶上分开<sup>[42]</sup>。染色后,凝胶在真空下干燥,并暴露在X射线底片下(Cronex 6, Dupont)11天。

(1)体内。精巢内注射 $^{32}\text{P}$ (800微居里/精巢)60分钟后的精巢机械制剂。

(2,3)体外。用胰蛋白酶-乙二胺四乙酸制备的整个精巢细胞悬浮液。在无磷酸盐的McCoy 5A溶剂(Gibco)中,标记 $^{32}\text{P}$ (50微居里/毫升)60分钟后,反应借冰浴冷却中止,并立即分离细胞核。

(4,5)体外。除了分离细胞核前将细胞再悬浮在磷酸缓冲液牛血清白蛋白中,并置冰浴二小时外,其余处理程序同2、3。

## 海胆的早期发育

鉴于有证据指出磷酸化作用是调控中的一个重大事项,我们要在一个转录活动的重要变化能够预期发生的发育系统中,去观察这个现象。因此,我们研究海胆(紫海胆)早期发育过程中细胞核蛋白质的磷酸化作用。

我们开始调查几个量变对整个胚胎磷酸化作用的动力学的影响。在体内,用 $^{32}\text{P}$ 标记非组蛋白蛋白质的条件是:胚胎浓度,20—40,000胚胎/毫升;2—5微居里 $^{32}\text{P}$ /毫升;培育30分钟。胚胎非常迅速地从溶剂中摄取合用的磷酸盐,并且保存起来。

受精后开始三小时内 $^{32}\text{P}$ 的累积的掺入被跟踪着,如图7A中所示。虽然 $^{32}\text{P}$ 进入到未受精的卵球,它不像是掺入到染色质蛋白质。可是在受精后,磷酸化的速度显著增加。显著的增加领先于90分钟第一次细胞分裂,和150分钟第二次细胞分裂。受精以后,每间隔30分钟,脉冲标记胚胎30分钟,得到同样的结果。这些实验数据反映了 $^{32}\text{P}$ 掺入速度的变化与细胞周期有联系。同HcLa细胞上的观察相一致<sup>[32,33]</sup>,非组蛋白质磷酸化的速度,在细胞周期中,在细胞真正分裂以前( $G_2$ ),是比较高的。

我们对从受精到长腕幼虫时期,大约受精后72小时的各个点进行了 $^{32}\text{P}$ 掺入的测定(图7B)。值此期间, $^{32}\text{P}$ 掺入的速度几乎是直线式地增加。囊胚期胚胎孵化过程中,我们看到偏离直线的情况;同时在45—72小时之间,当稜柱幼虫转变为长腕幼虫的时候,也看到了偏离直线的情况。在这个较晚的掺入增加时期,胚胎正在开始增长质量。图7B上面的部分表示孵化后从各个点分离的染色质的蛋白质与DNA的比例,也反映了与DNA相联系的非组蛋白蛋白质的量的增加<sup>[34]</sup>。看来似乎在稜柱幼虫到长腕幼虫期间,掺入速度保持恒定,只有在细胞核中非组蛋白蛋白质的累积离开平衡时才显现增加<sup>[35]</sup>。当RNA合成被放线菌素D屏闭,或者当蛋白质合成被嘌呤霉素抑制时,稜柱幼虫期胚胎磷酸化作用的速度没有明显降低。那末,总的说来,非组蛋白细胞核蛋白质受精后便立刻快速磷酸化;同时贯穿胚胎发育时期,以逐渐增长的速度继续被磷酸化。

其次,我们问个问题:“是否专一性非组蛋白蛋白质在不同发育时期被磷酸化?”按Gershey和Kleinsmith<sup>[37]</sup>的叙述分离磷蛋白,并在十二烷基磺酸钠-丙烯酰胺凝胶上将它

们分开<sup>[38]</sup>。采用这个方法,早到32细胞时期(受精后5小时),我们就可以证实专一性非组蛋白蛋白质的活跃磷酸化作用。标记的典型图样出现于囊胚早期,并一直保持到原肠胚和稜柱幼虫(图8)<sup>[39]</sup>。通过稜柱幼虫时期,单一的磷酸化峰高耸于放射性图谱中。

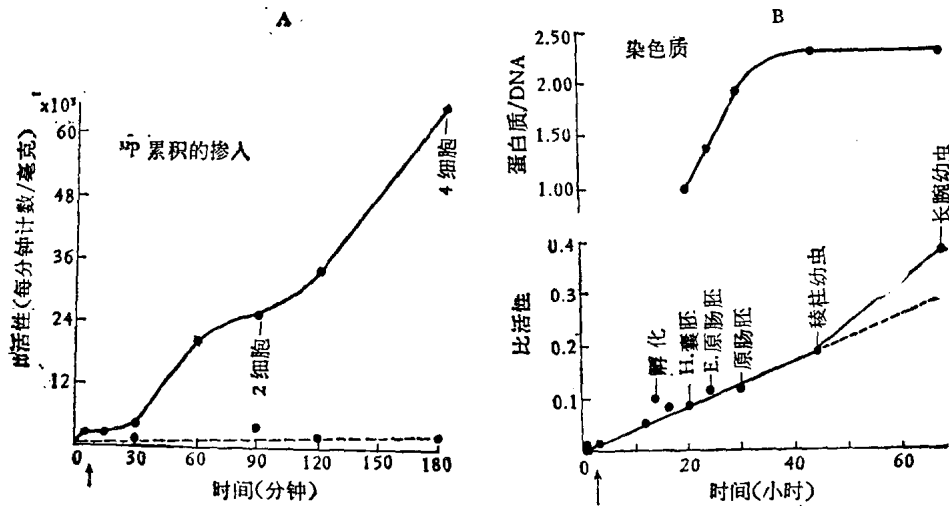


图7 早期发育期间, $^{32}\text{P}$ 的掺入海胆染色质的非组蛋白蛋白质。

A 从受精到4—细胞时期的累积掺入。卵球用 $^{32}\text{P}$ 预处理30分钟,然后在0时(箭头)受精。在指定的间隔时间,取出一部分样品,测定分离的染色体<sup>[21]</sup>中的碱性不稳定的磷酸盐<sup>[40]</sup>。比活性以每毫克非组蛋白染色体蛋白质的每分钟碱性不稳定 $^{32}\text{P}$ 计数表示之。虚线表示未受精卵染色质的 $^{32}\text{P}$ 掺入。

B 从受精到长腕幼虫期,不同时间的,30分钟脉冲期间的掺入。在海水中用 $^{32}\text{P}$ 标记胚胎,收集这些胚胎,并从纯化的细胞核中分离染色体。在提取碱性蛋白质、核酸和脂类后,不溶解的残基用作碱性不稳定的磷酸盐的检定。每一个点上的比活性,除以酸性库的比活性,以校正摄取中可能存在的差异。图中的上面部分,表示在染色体中与DNA相结合的总的蛋白质的增加量。

在我们用过滤代替离心收集标记前的长腕幼虫以前,从长腕幼虫期胚胎分离这种磷酸化蛋白质的反复努力都没有成功。受精后大约50小时,随着坚硬的骨骼的发育,离心时胚胎变得更容易损伤。从离心的长腕幼虫制备的磷蛋白缺少高度磷酸化的细胞核蛋白质<sup>[39]</sup>,但通过400网眼尼龙耐心过滤浓缩的长腕幼虫,显示出在较早时期观察到的同样的磷酸化蛋白质(图9)。这类蛋白质在十二烷基磺酸钠凝胶中具有大约28,000道尔顿的分子量。氨基酸分析(表4)指出一个以苏氨酸、谷氨酸、丙氨酸和脯氨酸为主要氨基酸的少有的组成成分。

体外磷酸化作用动力学的研究被用来进一步确定这个蛋白质部分的特性。因为这个部分含有内源的激酶活力,在 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 和25mM氯化镁存在下,培育全部磷蛋白部分,结果导致 $^{32}\text{P}$ 掺入到磷蛋白底物中<sup>[40]</sup>。这些研究指出,损伤了的长腕幼虫期底物蛋白质的缺失是有选择性的。从凝胶图谱明显看到的在长腕幼虫中底物的缺失<sup>[39]</sup>,已经体外标记长腕幼虫磷蛋白的尝试所证实(图10A)。当我们发现,缺少底物的长腕幼虫磷蛋白可以磷酸化稜柱幼虫的底物,蛋白质专一性的丧失就显得很清楚。那就是说,即使底物已被破坏,从损伤了的长腕幼虫得到的磷蛋白仍保留着激酶活力。

把海胆磷蛋白加热60℃,3分钟,破坏80%以上的内源激酶活力(表5)。长腕幼虫磷蛋白与经加热处理的稜柱幼虫磷蛋白的混合物,比预料的每个部分的单独掺入的 $^{32}\text{P}$ 数目的总和超过30%。这就是说,稜柱幼虫的激酶不能有效地将长腕幼虫磷蛋白磷酸化,

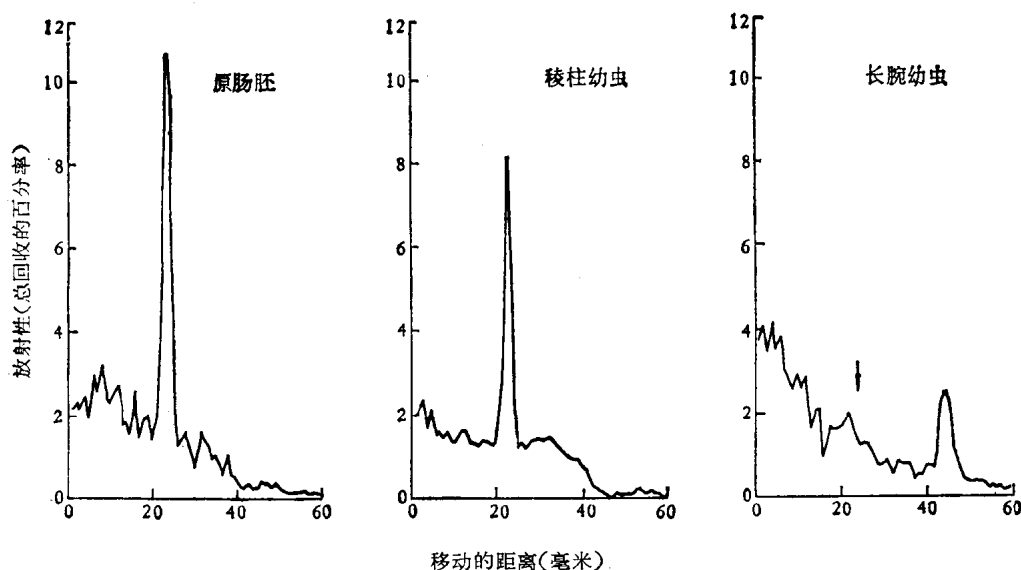


图8 在10%十二烷基磺酸钠-丙烯酰胺凝胶上分开后的海胆磷蛋白放射性图谱<sup>[39]</sup>。不同发育时期的胚胎借离心浓缩,并用<sup>32</sup>P标记1小时<sup>[39]</sup>。每个薄片的放射性以从凝胶回收的总放射性的百分数表示之。在原肠胚和棱柱幼虫(分别为3,000每分钟计数和1,200每分钟计数)中的主要磷酸化峰,在长腕幼虫期基本上不存在(箭头)。

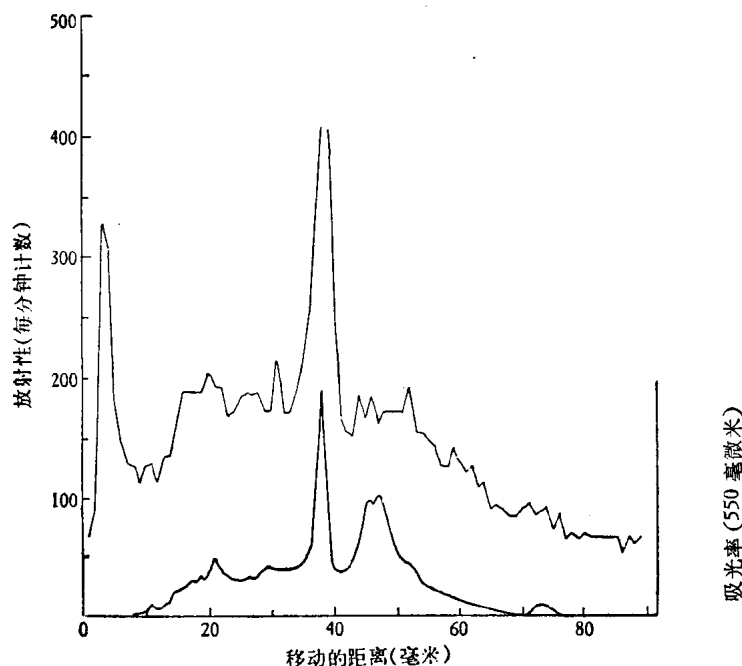


图9 从长腕幼虫期胚胎分离,并在10%十二烷基磺酸钠-丙烯酰胺凝胶上分开的磷蛋白的放射性和吸光率图谱。在用<sup>32</sup>P标记30分钟前,胚胎借过滤浓缩。注意,在较早时期观察到的主要的磷酸化蛋白质既存在于长腕幼虫期胚胎,也被磷酸化。

因为底物已经被破坏;但是长腕幼虫磷蛋白具有激酶活性,可以把棱柱幼虫底物磷酸化。底物被长腕幼虫时期胚胎激酶磷酸化的显著的特性,已为十二烷基磺酸钠-丙烯酰胺凝胶电泳证实(图10B)。

这些资料所指出的非组蛋白染色质磷蛋白的选择性遗失,能够在多种情况下出现。

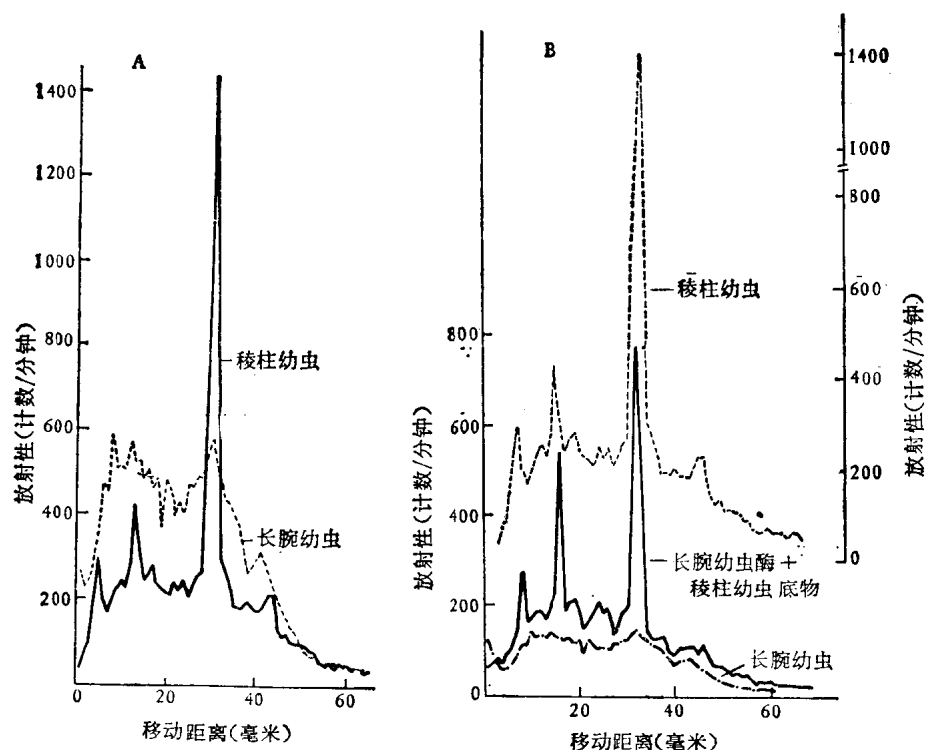


图 10 从离心浓缩的胚胎分离得到的海胆磷蛋白的体外磷酸化作用。

A 长腕幼虫期磷蛋白在稜柱幼虫磷酸化峰的地方没有重要的掺入。长腕幼虫样品中的蛋白质浓度约 8 倍于稜柱幼虫,这是长腕幼虫的掺入具有较高水平的原因。

B 虚线仅表示进入稜柱幼虫(上面的)和长腕幼虫(下面的)磷蛋白部分的  $^{32}\text{P}$  掺入。实线表示进入与没有底物的长腕幼虫磷蛋白部分混合后的稜柱幼虫底物(激酶已加热失活)的  $^{32}\text{P}$  掺入。

表 4

| 氨基酸  | 克分子总数的百分数 | 近似值残基/分子 | 氨基酸  | 克分子总数的百分数 | 近似值残基/分子 |
|------|-----------|----------|------|-----------|----------|
| 赖氨酸  | 5.4       | 11       | 甘氨酸  | 5.0       | 10       |
| 组氨酸  | 3.9       | 8        | 丙氨酸  | 10.0      | 22       |
| 精氨酸  | 4.2       | 9        | 缬氨酸  | 3.2       | 7        |
| 天冬氨酸 | 7.2       | 15       | 甲硫氨酸 | 4.8       | 10       |
| 谷氨酸  | 10.3      | 22       | 异亮氨酸 | 2.9       | 6        |
| 苏氨酸  | 12.0      | 25       | 亮氨酸  | 2.9       | 6        |
| 丝氨酸  | 6.8       | 14       | 酪氨酸  | 6.6       | 14       |
| 脯氨酸  | 10.0      | 21       | 苯丙氨酸 | 4.4       | 9        |

经丙烯酰胺凝胶电泳测定的稜柱幼虫期胚胎的高度磷酸化蛋白质的氨基酸组成。切下染上颜色的带子,在  $\beta$ -巯基乙醇的存在下制备<sup>[48]</sup>。残基/分子的数目是用一个 28,000 分子量估计值,根据在十二烷基硫酸钠凝胶中的迁移率估计的<sup>[31]</sup>。

最可能的解释是,底物蛋白质对于释自己损伤的细胞的非专一性的蛋白水解活力特别敏感。换言之,如果在完好的胚胎中,底物蛋白质是迅速地在转换着,细胞的分解可以中止其合成,听任正常的降解途径不受约束。

我们经常进行从不同发育时期胚胎分离的磷蛋白激酶的分级分离。采用 Kish 和

表 5

|              | 计数/分钟   |         |     |
|--------------|---------|---------|-----|
|              | 观察到的    | 预期的     | 百分数 |
| 原肠胚          | 230,000 |         | 100 |
| 稜柱幼虫         | 295,400 |         | 100 |
| 长腕幼虫         | 18,000  |         | 100 |
| 加热的稜柱幼虫      | 54,300  |         | 18  |
| 加热的长腕幼虫      | 3,000   |         | 17  |
| 稜柱幼虫+加热的长腕幼虫 | 101,200 | 149,200 | 68  |
| 长腕幼虫+加热的稜柱幼虫 | 47,500  | 36,200  | 131 |

在 pH 7.5, 反应体积 0.3 毫升, 包含: 13 微克分子三羟甲基氨基甲烷-盐酸, pH 7.5; 3.5 毫微克分子  $[r-^{32}P]$  腺苷三磷酸 (700 微居里/微克分子); 7.5 微克分子氯化镁, 和 3.5 微克磷蛋白中测定的三个发育时期的磷蛋白制剂中的激酶活力。在 37°C, 培育 12 分钟后, 加入冷却的 25% 三氯乙酸-3% 焦磷酸钠中止反应。用预浸 1 毫克分子腺苷三磷酸的微孔滤膜收集沉淀物。每张滤膜用 5% 三氯乙酸-1.5% 焦磷酸洗三次, 用 95% 乙醇洗二次, 空气中干燥和计数。

在 60°C 加热 3 分钟, 破坏 80% 以上的激酶活力。在混合实验中我们看到, 长腕幼虫期磷蛋白的激酶磷酸化来自稜柱幼虫期磷蛋白底物的活动。预期的数值是作为各部分各自掺入数值的总数的一半来计算的。

Kleinsmith<sup>[41]</sup> 在牛肝上所描述的方法, 海胆胚胎蛋白质激酶活力可以被分离为 10—12 个不同的部分。初步结果指出, 囊胚期胚胎酶活力的图谱与原肠胚晚期和长腕幼虫显著不同。

在早期发育阶段, 非组蛋白蛋白质迅速磷酸化。磷酸化作用速度的显著增加, 看来与受精和孵化有关。发育系统中, 专一性的细胞核蛋白质的磷酸化作用在功能上的意义, 尚有待解决。了解细胞核蛋白质在基因调控中的作用, 磷酸化作用仍将是一个有用的工具。

## 结 论

我们现在对真核细胞中基因调控的作用机制的了解非常地有限。非组蛋白蛋白质的选择性分级分离, 以及对它们的合成和修改的进一步研究, 该有助于特种染色质蛋白质成分的鉴定和定性。用 cDNA 去检测特种 mRNA 分子的杂交技术的发展, 使检定特种蛋白质对转录的影响成为可能。应用这些技术去分析正在分化中的细胞, 将对分化的分子机制的基础提供重要线索。

[王幽兰译自 Stein, Gary S. and Lewis J. Kleinsmith (ed.): 《Chromosomal proteins and their role in the regulation of gene expression》, 1975, pp. 67—93]

## 参 考 文 献

- [1] F. Jacob. *Science* **152**: 1470 (1966).
- [2] R. J. Britten and E. H. Davidson. *Science* **165**: 349 (1969).
- [3] A. Tyler. In: "Analysis of Development", B. H. Willier, P. A. Weiss and V. Hamburger, eds. W. B. Saunders, Philadelphia, p. 170 (1955).
- [4] M. F. Lyon. *Nature* **190**: 372 (1961).
- [5] O. A. Schjeide and J. deVellis. In: "Cell Differentiation", O. A. Schjeide and J. deVellis, eds. Van Nostrand Reinhold, New York, p. 7 (1970).
- [6] P. R. Harrison, A. Hell, G. D. Birnie and J. Paul. *Nature* **239**: 219 (1972).
- [7] R. S. Gilmour and J. Paul. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **70**: 3440 (1973).
- [8] G. S. Stein, T. C. Spelsberg and L. J. Kleinsmith. *Science* **183**: 817 (1974).
- [9] G. Giudice. "Developmental Biology of the Sea Urchin Embryo," Academic Press, New York (1973).
- [10] K. Marushige and G. H. Dixon. *Develop. Biol.* **19**: 397 (1969).
- [11] M. Courrot, M. T. Hochereau-de Reviers and R. Ortavant. In: "The Testis", Vol. 1 p. 339, A. D. Johnson, W. R. Gomes and N. L. Vandemark, eds. Academic Press, New York.
- [12] D. M. K. Lam, R. Furrer and W. R. Bruce. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **65**: 192 (1970).
- [13] M. L. Meistrich and V. W. S. Eng. *Exp. Cell Res.* **70**: 237 (1972).
- [14] S. R. Grimes, R. D. Platz, M. L. Meistrich and L. S. Hnilica, submitted for publication.
- [15] R. D. Platz, S. R. Grimes, M. L. Meistrich and L. S. Hnilica. *J. Biol. Chem.*, in press (1975).
- [16] S. R. Grimes, Ph. D. Thesis, Department of Biochemistry, University of North Carolina (1973).
- [17] W. S. Kistler, M. E. Geroch and H. G. Williams-Ashman. *J. Biol. Chem.* **248**: 4532 (1973).
- [18] R. E. Branson, S. R. Grimes, G. Yonuschot and J. L. Irvin. *Arch. Biochem. Biophys.*, in press (1975).
- [19] D. E. Comings and T. A. Okada. *Adv. in Cell and Mol. Biol.* **2**: 309 (1972).
- [20] J. R. Davis and G. A. Langford, In: "The Testis", Vol. 2, p. 259, A. D. Johnson, W. R. Gomes and N. L. Vandemark, eds. Academic Press, New York (1970).
- [21] Y. Marushige and K. Marushige. *J. Biol. Chem.* **250**: 39 (1975).
- [22] J. P. Coelingh, C. H. Monfoort, T. H. Rozijn, J. A. G. Leuven, R. Schiphof, E. P. Steyn-Parve, G. Braunitzer, B. Schrank and A. Ruhfus. *Biochim. Biophys. Acta* **285**: 1 (1972).
- [23] A. J. Louie and G. H. Dixon. *J. Biol. Chem.* **247**: 5490 (1972).
- [24] V. Monesi. *Exp. Cell Res.* **39**: 197 (1965).
- [25] D. M. K. Lam and W. R. Bruce. *J. Cell. Physiol.* **78**: 13 (1971).
- [26] M. Loir. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* **12**: 411 (1972).
- [27] L. S. Hnilica. "The Structure and Biological Functions of Histones," Chemical Rubber Company Press, Cleveland, Ohio (1972).
- [28] V. Monesi. *J. Reprod. Fert., Suppl.* **13**: 1 (1971).
- [29] A. Ruiz-Carrillo, L. J. Wangh, V. C. Littau and V. G. Allfrey. *J. Biol. Chem.* **249**: 7358 (1974).
- [30] N. Kadohama and R. W. Turkington. *J. Biol. Chem.* **249**: 6225 (1974).
- [31] R. D. Platz, S. R. Grimes, M. L. Meistrich and L. S. Hnilica, manuscript in preparation.
- [32] R. D. Platz, G. S. Stein and L. J. Kleinsmith. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **51**: 735 (1973).
- [33] J. Karn, E. M. Johnson, G. Vidali and V. G. Allfrey. *J. Biol. Chem.* **249**: 667 (1974).
- [34] K. Marushige and H. Ozaki. *Develop. Biol.* **16**: 474 (1967).
- [35] R. L. Seale and A. I. Aronson. *J. Mol. Biol.* **75**: 633 (1973).
- [36] R. D. Platz and L. S. Hnilica, manuscript in preparation.
- [37] E. L. Gershey and L. J. Kleinsmith. *Biochim. Biophys. Acta* **194**: 331 (1969).
- [38] K. Weber and M. Osborn. *J. Biol. Chem.* **244**: 4406 (1969).
- [39] R. D. Platz and L. S. Hnilica. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **54**: 222 (1973).
- [40] L. J. Kleinsmith and V. G. Allfrey. *Biochim. Biophys. Acta* **175**: 123 (1969).
- [41] V. M. Kish and L. J. Kleinsmith. *J. Biol. Chem.* **249**: 750 (1974).
- [42] R. Miller and R. Phillips. *J. Cell. Physiol.* **73**: 191 (1969).
- [43] M. L. Meistrich, W. R. Bruce and Y. Clermont. *Exp. Cell Res.* **79**: 213 (1973).
- [44] J. C. Vaughn. *J. Cell Biol.* **31**: 257 (1966).
- [45] S. Panyim and R. Chalkley. *Arch. Biochem. Biophys.* **130**: 337 (1969).