

尾草履虫大核组蛋白的研究*

陈婉蓉

(镇江医学院,江苏)

摘要 本实验从分离提纯的尾草履虫大核染色质中抽提得碱性蛋白,经聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定,氨基酸含量分析以及等电点和分子量测定,证明属低等真核生物的尾草履虫与高等真核生物一样,在细胞核染色质中含有正常的组蛋白成份,且以恒定的比例(约 1:1)与 DNA 结合;这两类不同的真核细胞,组蛋白的成分和性质显示了相对的稳定性。

在高等真核生物中普遍存在相对恒定的 5 种组蛋白成分(组蛋白 H_1 , H_{2a} , H_{2b} , H_3 , H_4),但在低等真核生物中,关于组蛋白的研究还不全面,已证明在某些鞭毛虫中缺乏成套的组蛋白,而在某些纤毛原生动物如四膜虫(*Tetrahymena*)、棘尾虫(*Stylonychia*)和双小核草履

虫(*Paramecium aurelia*)中存在类似高等真核生物的组蛋白。本文试图对尾草履虫(*Paramecium caudatum*)大核组蛋白的性质、分布情况以及与哺乳动物组蛋白的异同等问题作一

* 本文得到华东师范大学张作人教授、庞延斌教授和沈锡祺副教授的指导,谨此致谢。

初步研究,为进而研究原生动物生命周期中组蛋白的代谢变化,组蛋白对纤毛虫遗传活性和生理功能的影响等提供有用的数据。

材料和方法

(一) 细胞培养 经鉴定为尾草履虫的细胞用稻草-麦粒混合培养液进行克隆培养(pH7.5, 温度 25°C)。

(二) 大核分离和核染色质制备 取对数生长期的细胞,参考 Lipps 分离棘尾虫大核的方法,用蔗糖密度梯度离心分离并纯化大核,染色镜检核形态和纯化程度,确定为无细胞质和小核污染后制备核染色质。用 0.4(mol/L) × 离子价数 H₂SO₄ 抽提染色质中的碱性蛋白,用 0.02(mol/L) × 离子价数 NaOH 抽提酸性蛋白。

(三) 染色质组份的测定 用 Lowry 法分别测定两种抽提液中的蛋白含量。用 Burton 的二苯胺显色法测定 DNA 含量,计算出含 1 mg DNA 的染色质中各种蛋白质的量。测定蛋白质和 DNA 所用的标准品分别是牛血清白蛋白和八嗜菌体 DNA。

(四) 全组蛋白的制备和分析

1. 制备 按 Lipps 的方法从大核染色质中制备全组蛋白。

2. 聚丙烯酰胺凝胶电泳 参考 Hardison 的方法,用 0.9mol/L 醋酸—4mol/L 尿素—12% 丙烯酰胺凝胶电泳系统。电极缓冲液用 0.9 mol/L 醋酸。以亚甲基绿作示踪染料。

3. 氨基酸含量分析 按徐秀璋介绍的方法水解蛋白样品,用 Hitachi 835 氨基酸自动分析仪进行氨基酸含量分析。

4. 等电点和分子量测定 按南京大学生物系介绍的等电聚焦凝胶电泳法测定等电点,按 Cooper 的 SDS-聚丙烯酰胺电泳法测定分子量,所用标准蛋白是小牛胸腺标准组蛋白 H₁, H_{2b}, H₄。

结果

1. 染色质组份的测定 尾草履虫大核染色质蛋白质(包括组蛋白和酸性蛋白)和 DNA 含

量测定结果见表 1。

表 1 尾草履虫大核染色质蛋白质和 DNA 含量

DNA	蛋白质*		蛋白质: DNA	组蛋白: 总蛋白	组蛋白: DNA
	组蛋白	酸性蛋白			
1	1.02	0.78	1.80:1	0.56:1	1.02:1

* 蛋白质含量以 mg/mg DNA 表示。

表中数值为三次测定的平均数。

2. 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析 在相同电泳条件下,用相等浓度的小牛胸腺全组蛋白与尾草履虫大核组蛋白作电泳分析,小牛胸腺全组蛋白分出 4 条带,从阳极端起依次为组蛋白 H₁, H₃, H_{2a}, H_{2b}, H₄ (见图 1,右),其中组蛋白 H_{2a} 和 H_{2b} 在本电泳系统中具有相同的泳动率,表现为一条较宽的带。尾草履虫大核组蛋白分出 6 条带(见图 1,左),其中 5 条主要带的泳动率类似小牛胸腺组蛋白和 Isaack 用同样方法得到的双小核草履虫组蛋白(见图 3)。

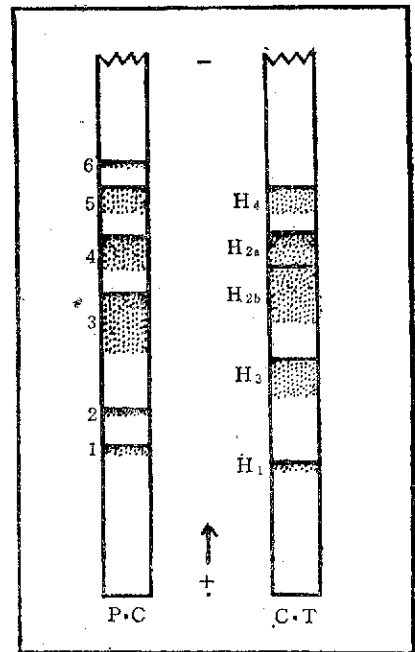


图 1 组蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳示意图
左: 尾草履虫 右: 小牛胸腺

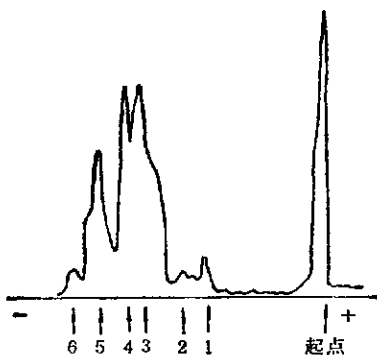


图2 尾草履虫组蛋白电泳扫描图

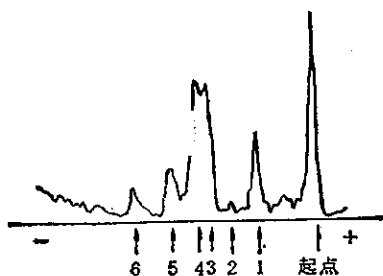


图3 双小核草履虫组蛋白电泳扫描图

小牛胸腺、尾草履虫、双小核草履虫五种组蛋白成分相对含量的比较(见图4)。

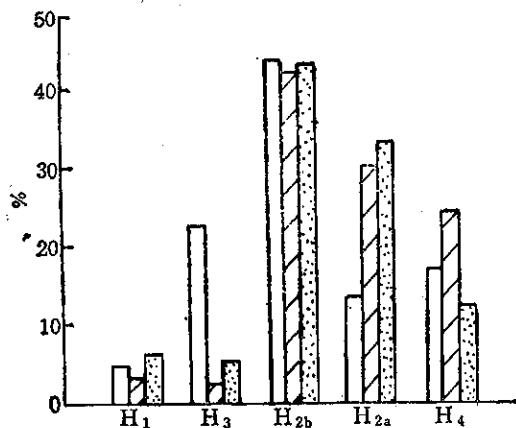


图4 小牛胸腺尾草履虫、双小核草履虫组蛋白相对含量比较

□ 小牛胸腺 ▨ 尾草履虫 ▩ 双小核草履虫

3. 氨基酸分析 小牛胸腺和尾草履虫全组蛋白氨基酸相对含量见表2。两者都富含赖氨酸、精氨酸、门冬氨酸、谷氨酸、丙氨酸、甘氨酸和亮氨酸等7种氨基酸，其总克分子数分别

占所出现16种氨基酸的67%和63%。小牛胸腺和尾草履虫中，碱性氨基酸分别占24.2%和20.2%；赖氨酸对精氨酸的比值分别为1.71和1.51；碱性氨基酸对酸性氨基酸的比值分别为1.67和1.09。小牛胸腺和尾草履虫都不含半胱氨酸和色氨酸。

表2 尾草履虫和小牛胸腺全组蛋白氨基酸相对含量

氨基酸	小牛胸腺	尾草履虫
门冬 (Asp)	5.09	8.42
苏 (Thr)	5.88	4.77
丝 (Ser)	5.92	6.16
谷 (Glu)	9.44	10.09
甘 (GLy)	8.42	7.70
丙 (Ala)	13.62	9.71
缬 (Val)	5.79	7.69
蛋 (Met)	0.58	0.82
异亮 (Ile)	3.94	3.05
亮 (Leu)	7.95	9.13
酪 (Tyr)	2.53	2.61
苯丙 (Phe)	1.71	4.30
赖 (Lys)	14.17	10.59
组 (His)	1.74	2.60
精 (Arg)	8.31	7.03
脯 (Pro)	4.91	4.73
赖/精 (Lys/Arg)	1.71	1.51
碱/酸(氨基酸)	1.67	1.09

表中氨基酸相对含量以氨基酸总克分子数的百分数表示。

表中数值为两次测定的平均数。

4. 分子量和等电点测定 尾草履虫组蛋白的分子量和等电点测定结果列于表3。尾草履虫5种主要组蛋白的分子量与小牛胸腺组蛋白的相应部分接近。

表3 小牛胸腺和尾草履虫组蛋白的等电点和分子量

	小牛胸腺 分子量	尾草履虫	
		分子量	等电点
H ₁	21,500	21,130	9.60
H ₃		15,490	9.20
H _{2b}	14,004	13,500	8.65
H _{2a}		12,300	8.20
H ₄	11,282	10,780	9.45

讨 论

尾草履虫与小牛胸腺全组蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱是十分类似的,两者仅在泳动速率和相对含量上略有不同。按泳动速度,自阳极至阴极依次为:尾草履虫全组蛋白带1相当于小牛胸腺组蛋白 H_1 ,带2相当于 H_3 ,带3相当于 H_{2b} ,带4相当于 H_{2a} ,带5相当于 H_4 (图1)。5种组蛋白成分相对含量上的不同主要表现在:尾草履虫组蛋白 H_3 含量明显较小牛胸腺低,而组蛋白 H_{2b} 和 H_{2a} 较小牛胸腺高(图4),在尾草履虫和双小核草履虫中组蛋白 H_{2b} 和 H_{2a} 都占全组蛋白的70%以上,而在小牛胸腺中这两种成分只占50%。

在尾草履虫全组蛋白的电泳图谱上,出现一条含量较低、泳动速度快的带6,Isaack用0.25 NHCl从双小核草履虫大核中直接抽提的组蛋白电泳图谱上也有类似本实验的6条带(图2,3),他认为带6是核内不与DNA连系的碱性蛋白,Lipps用稀盐酸分别从提纯的棘尾虫大核和大核染色质中提取的碱性蛋白,经电泳分出11条带,最后3条快速泳动的带的含量,在全大核中提取的比从染色质中提取的高。是否草履虫和棘尾虫大核内除了组蛋白外,还存在不与DNA连系的碱性蛋白,有待进一步研究。

已知组蛋白中色氨酸和半胱氨酸含量极微,若制品中这二种氨基酸含量高,则是由于提纯过程中非组蛋白成分的污染。本实验在小牛胸腺和尾草履虫都测出16种氨基酸,均未测出色氨酸和半胱氨酸,其中赖氨酸、精氨酸、亮氨酸、丙氨酸、谷氨酸、门冬氨酸、甘氨酸、缬氨酸等8种氨基酸占总氨基酸克分子数的70%以上。本实验表明,尾草履虫大核组蛋白碱性氨基酸含量,碱性氨基酸对酸性氨基酸比值以及等电点均较小牛胸腺组蛋白低,因此可以认为尾草履虫大核组蛋白是一种小分子量的弱碱性的蛋白质。

将尾草履虫组蛋白的氨基酸分析数据与酵

母(Yeast),四膜虫等比较,发现其氨基酸组成与酵母极为相似,而与同样属于纤毛原生动物的四膜虫有较大的不同,Isaack发现双小核草履虫的氨基酸组成与酵母也十分相似,其原因尚有待深入研究。但是,酵母与草履虫、草履虫与小牛胸腺组蛋白的类似性提示了,组蛋白不是发育和分化的控制因素,但它在生物进化中的重要作用是不可低估的。从原生动物的和哺乳动物组蛋白之间所观察到的相似和差别表示了从一个共同的祖先进化到原生动物的和哺乳动物过程中组蛋白的稳定性和变异性,显然,这种稳定性是大大地超过了变异性。可以推测,在真核生物发展进化的早期,组蛋白就以一定的格局、一定的比例(约1:1)与DNA结合参与染色质的结构,并且积极地维持着在漫长的生物进化过程中真核生物基本的生理功能的稳定性。

参 考 文 献

- 徐秀璋 1981 蛋白质样品水解方法的改进——盐酸水解中一种新的保护试剂 生物化学与生物物理进展 7(5): 73。
- 孙毓麟等 1978 尖尾藻(*Oxyrrhis marina*)染色质的酸性蛋白质的分析 实验生物学报 11: 297。
- Burton, K. et al. 1969 Determination of DNA concentration with diphenylamine. *Methods in Enzymology* 12(B): 163.
- Gorovsky, M. A. 1973 Studies on histones fraction in macromicronuclei F_{2a1} of *Tetrahymena*. *J. Cell. Biol.* 57: 773.
- Hardison, R. et al. 1977 Polyacrylamide gel electrophoretic fractionation of histones. *Methods in Cell Biology*. 17: 250.
- Isaack, R. E. 1973 Studies on nuclei of *Paramecium aurelia*. II. Amino acid composition and electrophoretic properties of the chromosomal basic proteins. *J. Protozool.* 20(3): 477.
- Lipps, H. J. et al. 1974 Histone of *Stylonychia mytilus*. *Chromosoma*. 45: 273.
- Lowry, O. H. et al. 1951 Protein measurement with folin phenol reagent *J. Biol. Chem.* 193: 265.
- Siddo, A. J. 1967 A method for the isolation of macronuclei from *Paramecium aurelia*. *J. Protozool.* 14(3): 412.
- Tonino, G. J. M. et al. 1966 Studies on the Yeast nuclei. II. The histones of Yeast. *Biochem. Biophys. Acta*. 124: 427.
- Yabuki, H. et al. 1971 Changes of histone in the cell cycle of *Tetrahymena*. *J. Biochem.* 70: 731.