

蛙胚胎細胞染色質上的酸性蛋白質

史金燾

摘 要

蛙胚胎在高濃度的蔗糖溶液中被攪碎，經高速離心後，多數胞核仍能保持完整的形狀懸於液中。色素體沉於管底，細胞碎片及卵黃粒則浮於液上，故很容易將胞核收集。胞核經清潔劑處理後，即得染色質。染色質先經酸的處理，除去鹼性蛋白質，再以 SDS 將酸性染色質蛋白質 (nonhistone chromosomal proteins) 抽出。經電泳法 (SDS gel electrophoresis) 的分析，囊胚期，原腸期以及紅血球染色質上的酸性蛋白質在質和量上均有差異，結果顯示胚胎細胞在發生時期，其染色質上可能附有質量不同的酸性蛋白質。

緒 言

近年來許多對細胞分化有興趣的學者，化了不少時間研究細胞核內染色體的構造。其原因是：(一)一個生物體內不論是何細胞，其 DNA 的質與量都是一樣，換句話說，即每一個細胞內所含之基因皆相同；(二)在一個細胞生命之中任何時期，僅有 5-20% 的 DNA 是從事製造 RNA；(三)細胞在不同的狀況時，例如生長，分化或受激素影響時，可以改變其基因的表現方式。至於某段 DNA 在何時方能製造 RNA，又在何時不製造 RNA，則是大家所期望知道的。當然，欲知 DNA 何時有表現，何時不表現則勢必要先知道染色質 (chromatin) 的構造。

多細胞生物的 DNA 不像微生物那樣簡單，它是被兩種不同性質的蛋白質所包裹着。其中一類為鹼性蛋白質 (histones)，另一類為酸性蛋白質 (nonhistone proteins)。至今雖然對鹼性蛋白質有較多的瞭解，但因其只有五至七種，而不像是控制基因的關鍵。相反地，酸性蛋白質的種類很多，極可能是控制基因的主角 (Stein and Stein, 1976)。例如 Lac operon 就是一種酸性蛋白質，它能控制大腸菌 (E. coli) 的基因 (Beckwith and Zipser, 1970)。也因此，促使學者研究多細胞生物，希望能發現類似 Lac operon 的蛋白質，甚

或希望能發現更多的控制因子，進而能明白基因的表現方式。

作者選用蛙 (*Rana pipiens*) 的囊胚期及原腸期胚胎作為抽取染色質的材料，進而分析染色質上的各種蛋白質，期望能在這些正在分化的細胞染色質上，找到隨發生的時期，而有異樣的蛋白質出現

材料及方法

一、細胞核及染色質

蛙卵經人工受精後，置於 $18 \pm 1^\circ\text{C}$ 室內，24 及 44 小時後即得囊胚期及原腸期的胚胎。細胞核的分離是根據 Asao (1969) 的方法，不過操作程序中稍有改進。胚胎外的膠層先經剪除或經 papain 處理後被除去。去膠層之胚胎再經 1.0M sucrose buffer (10.0mM Tris-HCl and 3mM CaCl_2 , pH 7.4) 洗滌，以下步驟與 Asao (1969) 之方法相同。為避免蛋白質在分離過程中變性，一切 buffer 中均加以 10mM NaHSO_3 與 1mM dithiothrietol (DTT)。在分離過程中之每一階段，均取標本置於相位差顯微鏡下觀察，以決定細胞核是否仍完整。

二、染色質的分離及純化

將上述所分離出之細胞核放入 0.5% Triton x-100 (in 0.25M sucrose buffer) 在 4°C

下攪拌 20 分鐘。經離心 (1000 xg) 後, 以 0.25M sucrose buffer 清洗三次, 以下步驟與 Paoletti and Huang (1969) 相似, 不過一切 buffer 中均加以 10mM NaHSO₃ 及 1mM DTT。當染色質以蒸餾水洗滌時, 即不加 NaHSO₃ 及 DTT。洗滌後, 將染色質置於水中 30 分鐘, 以使其膨脹。再以 0.4N H₂SO₄ 將鹼性蛋白質抽出, 剩下之 DNA 及酸性蛋白質混合體, 即依 Elgin and Bonner (1970) 法將 DNA 與酸性蛋白質分開。

三 染色質酸性蛋白質的分析

染色質酸性蛋白質的分析, 是以 SDS gel system (Laemmli, 1970) 處理, gel 的濃度是 10%, pH 8.6。電泳是在 120 Volt, 2mA/m tube, 22°C 的情況下經 6 小時完成。將 gels 取出後以 0.1% coomassie blue 染色一小時, 然後以 7% acetic acid 脫色。膠上蛋白質經染色後的色度是以 microdensitometer (Gilford, Model 2000) 描繪。

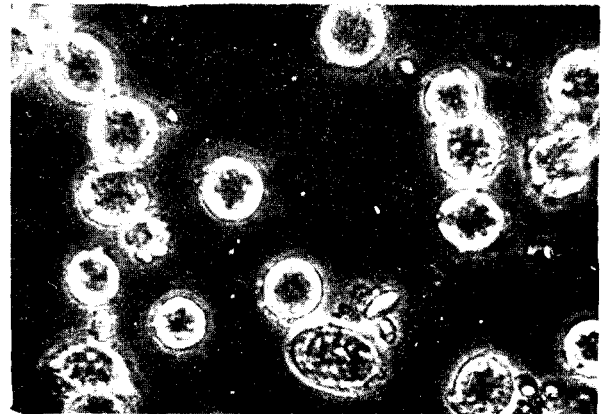
結 果

一 細胞核及染色質

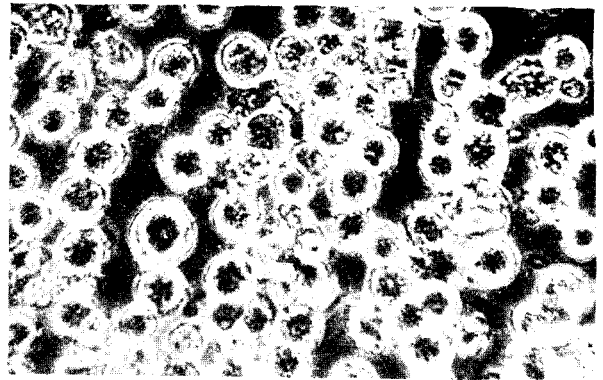
圖一顯示細胞核經高速離心分離後, 在 0.25 M sucrose 液中的顯微照像。照片上只見細胞核, 沒有細胞, 細胞碎片或成塊的細胞質。不過可見色素體及少許卵黃粒。分離後之細胞核也經電子顯微鏡的切片檢查, 結果顯示細胞核均仍完整, 並未破碎 (Shih, 1975)。

在每一次細胞核分離步驟完成時, 均取少許標本, 以 methylgreen-pyronin 染色後, 放在血球計算器中, 計算細胞核的數目, 以測定分離細胞核的效率。從囊胚期胚胎中, 約可得到 30—35% 的收穫率, 從原腸期胚胎則可得 35—48% 的收穫率。

染色質的純度常以 UV 光譜來判斷, 表一顯示胚胎細胞染色質的 UV 光譜在 A230/A260 的比值約為 0.90, 而紅血球染色質的比值為 0.77。此結果表示胚胎細胞染色質含有較多的蛋白質。同表中也列出蟾蜍 (*Xenopus laevis*) 紅血球及胚胎細胞染色質的比值, 各為 0.75 及 1.10—1.50, 與本實驗結果很接近 (Destree 等 1973)。



a



b

Figure 1. Phase-contrast photomicrographs of *Rana pipiens* blastula and gastrula nuclei. After the initial high speed centrifugation, the nuclear pellets were resuspended in 0.25M sucrose buffer. No whole cells, broken cells or cytoplasmic aggregates are evident in either blastula (a) or gastrula (b) nuclear preparation.

二 染色質酸性蛋白質

圖二顯示胚胎細胞染色質酸性蛋白質的描繪, 由於蛋白質的種類相當多, 並且彼此很接近, 所以描繪的曲線並不十分清晰。如以肉眼觀察, 每條膠上至少可數出 30—35 類不同的蛋白質。其分子量在 10,000 至 170,000 之間。圖二(c)是紅血球的染色

Table 1. Absorbance Ratios of Chromatin Preparation From Early Embryos of *Rana pipiens*

Source	A ₂₈₀ /A ₂₆₀
<i>Rana pipiens</i>	
blastula	0.91
Gastrula	0.90
Erythrocytes	0.77
<i>Xenopus laevis</i>*	
blastula	1.50
Gastrula	1.10
Erythrocytes	0.75

* Results are taken from Destree, *et. al.*, (1973)

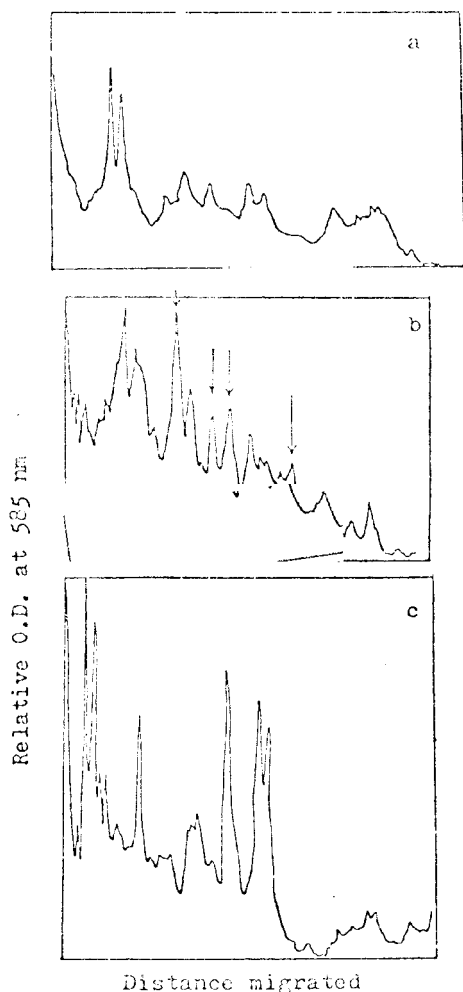


Figure 2. Optical density scans of SDS gels of chromatin-associated nonhistone proteins of blastulas (a), gastrulas (b) and erythrocytes (c) of *Rana pipiens*.

質酸性蛋白質，在此僅作參考用，如與胚胎染色質酸性蛋白質比較，至少可看出其間的差異。如果比較圖二(a)及圖二(b)，有些蛋白質（見箭頭）僅見於原腸期，而不見於囊胚期。在圖二(b)中（原腸期），蛋白質分子量大的種類較多，而圖二(a)中（囊胚期）大分子量的蛋白質種類較少。

討 論

在分離細胞核時，最令人頭痛的問題是將細胞質內物質沾染在核膜上，甚而滲入已破碎的核內，影響細胞核的純淨度。如欲分離兩棲類早期胚胎的細胞核，則更為困難，其原因是細胞內含有許多卵黃粒。Destree 等 (1973) 曾試用清潔劑，citric acid 及 0.3M sucrose 分離 *Xenopus laevis* 胚胎的細胞核，但結果不甚理想，顯示染色質上有多量的蛋白質（見表一 Destree 等之結果），很可能是沾染了胞質。Asao (1969) 曾以高濃度的 sucrose buffer 分離蠨蠨 (*Triturus pyrrhogaster*) 胚胎的細胞核，其細胞核的收穫率很高，約為 90%。但他並未測量細胞核的化學成分，所以不知細胞核的純淨度。本實驗雖仿效 Asao (1969) 之法操作，起初遇到重重困難，經多次試驗，方知在高速離心之前，必須測出液體之正確比重，此比重為 1.2200 至 1.2300 之間。如得此正確之比重，經高速分離後，色素體沉於管底，卵黃粒及細胞碎片浮於上層，細胞核則懸於糖液之中。由此法而得的細胞核收穫量是胚胎細胞數的 30-55%。因為囊胚期的胚胎細胞正值分裂旺盛期，許多細胞沒有完整的核膜，以致在分離時即失去，而使收穫量偏低。原腸期胚胎細胞分裂減慢，所以收穫量較高。此結果比 Asao (1969) 在分離蠨蠨胚胎細胞核的收穫量為低，原因不明。

為證明染色質沒有被胞質沾染，曾用以下二法處理。第一，將兩百個囊胚期胚胎與 20 個有放射性蛋白質的受精卵一起磨碎，依法將染色質分離，經測定在染色質上僅有非常微量的放射性，第二，在磨碎兩百個囊胚期胚胎的同時，加入 ^3H -leucine ($\times 10^6$ dpm)，也依法將染色質分離，經測定在染色質上不含放射性，因此胞質對染色質的沾染可能性是非常低。

至目前為止，染色質酸性蛋白質對細胞分化究竟有何關係，尚未瞭解。以海胆為例，從早期胚胎細胞抽出之染色質酸性蛋白質，經電泳法分析後，依蛋白質的分子量分類，則其分佈很廣，小者為 9,000，大者為 100,000 (Hill 等 1971 ; Cognetti 等 1972 ; Seale and Aronson , 1973) 。 Elgin 等 (1973) 在哺乳類各種組織中抽出染色質酸性蛋白質，經電泳法分析後，也發現其種類很多，其分子量的分布亦廣。Elgin 等 (1973) 曾以電泳法分析果蠅 (*Drosophila melanogaster*) 胚胎的染色質酸性蛋白質，他們發現一期 (受精後兩小時) 至二期 (受精後 6-18 小時) 幼胚的酸性蛋白質，在質和量上均有顯著的區別。

在兩棲類，學者曾將蝾螈 (*Triturus*) 的卵核 (germinal vesicle) 取出，直接以電泳法分析，發現在膠上至少可見 25 種酸性核蛋白質，而鹼性蛋白質 (histones) 的量既少也欠明顯 (Somerville , 1973 ; Somerville and Hill , 1973 ; Hill 等 1974) 。 Theriault and Landeman (1974) 從 *Xenopus laevis* 的原腸期胚，神經胚及蝌蚪中抽出染色質酸性蛋白質，經分析後，發現早期胚胎分子量大的蛋白質種類較少，而後期胚胎則有較多的大分子蛋白質。本實驗以蛙 (*Rana pipiens*) 的紅血球作為參考，與囊胚期及原腸期染色質酸性蛋白質作比較，也發現三者之間在質和量上均有差異。並且與 *Xenopus laevis* 的結果相似，即早期胚胎大分子蛋白質的種類較後期者為少。

染色質酸性蛋白質在質和量上的差異，常與細胞或組織的生理狀態有關，這種差異也常被認為能直接影響染色質上基因的狀況 (Elgin and Weintraub , 1975 ; Paul , 1975 ; Stein 等 , 1975 ; Stein and Stein , 1976) 。也有許多報告顯示，當細胞或組織代謝旺盛或基因從事製造 mRNA 時，其染色質上酸性蛋白質的量會很高，相反，如果基因不製造 mRNA，或其代謝不旺盛時，其含量即少 (Dingman and Sporn , 1964) 。一個細胞中，染色質的構造也不一樣。正在製造 mRNA 的染色質 (euchromatin) 上就會有多量的酸性蛋白質，而不製造 mRNA 的染色質 (heterochromatin) 所含的量即少，這也說明了染色質酸性蛋白質與基因的密切關係 (Frenster 等 , 1963 ; Marushige

and Bonner , 1971 ; Reeck 等 , 1972 ; Birnie 等 , 1973 ; McCarthy 等 , 1973 ; Gottesfeld 等 , 1974) 。

胚胎在早期發生時，細胞分裂速度很快，染色質上有多量的酸性蛋白質。又因此期細胞正值分化，所以在染色質上也可找到許多不同種類的酸性蛋白質。如能利用胚胎的染色質來研究酸性蛋白質對基因的影響，的確是很好的題材。此篇報告提供一個簡易分離胚胎細胞核的方法，並將染色質酸性蛋白質作初步之分析，盼日後對這方面的研究有所幫助。

參考文獻

1. Asao, T. 1969. Behavior of histones and cytoplasmic basic proteins during embryogenesis of the Japanese newt, *Triturus pyrrhogaster*. *Exptl. Cell Res.* 58 : 243-252.
2. Beckwith, J. R., and D. Zipser. 1970. The Lactose Operon. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
3. Birnie, G. D., D. Rickwood, and A. Hell. 1973. Buoyant densities and hydration of nucleic acids, proteins, and nucleoprotein complexes in metrizamide. *Biochim. Biophys. Acta* 331 : 283-294.
4. Cognetti, G., D. Settineri and G. Spinelli. 1972. Developmental changes of chromatin nonhistone proteins in sea urchin. *Exptl. Cell Res.* 71 : 465-468.
5. Destree, O. H. J., H. A. d'Adelhart Toorop and R. Charles. 1973. Analysis of histones from different tissues and embryos of *Xenopus laevis* (Daudin). II. Qualitative and quantitative aspects of nuclear histones during early stage of development. *Cell Differentiation.* 2 : 229-242.
6. Dingman, C., and M. Sporn. 1964. Studies on chromatin. I. Isolation and characterization of nuclear complexes of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid, and protein from embryonic and adult tissues of the

- chicken. *J. Biol. Chem* 239 : 3483-3492.
7. Elgin, S., and J. Bonner. 1970. Limited heterogeneity of the major nonhistone chromosomal proteins. *Biochemistry* 9 : 4440-4447.
8. Elgin, S., J. B. Boyd, L. E. Hood, W. Wray and F. C. Wu. 1973. A prologue to the study of the nonhistone chromosomal proteins. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 38: 821-833.
9. Elgin, S., and H. Weintraub. 1975. Chromosomal proteins and chromatin structure. *Annu. Rev. Biochem.* 44 : 725-774.
10. Frenster, J. H., V.G. Allfrey, and A. E. Mirsky. 1963. Repressed and active chromatin isolated from interphase lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 50 : 1026-1032.
11. Gottesfeld, J. M., W. T. Garrard, G. Badi, R. F. Wilson, and J. Bonner. 1974. Partial purification of the template-active fraction of chromatin: a preliminary report. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 71: 2193-2197.
12. Hill, R. J., D. L. Poccia, and P. Doty. 1971. Towards a total macromolecular analysis of sea urchin embryo chromatin. *J. Mol. Biol.* 61 : 445-462.
13. Hill, R. J., K. Maundrell, and H. G. Callan. 1974. Nonhistone proteins of the oocyte nucleus of the newt. *J. Cell Sci.* 15 : 145-161.
14. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature.* 227: 680-685.
15. Marushige, K., and J. Bonner. 1971. Fractionation of liver chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 68: 2941-2944.
16. McCarthy, B. J., J. T. Nishiura, D. Donecke, D. S. Nasser, and C. B. Johnson. 1973. Transcription and chromatin structure. *Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol.* 38 : 763-771.
17. Paoletti, R. A., and R. C. C. Huang. 1969. Characterization of sea urchin sperm chromatin and its basic proteins. *Biochemistry.* 8 : 1615-1625.
18. Paul, J. 1975. *Biochemistry of Cell Differentiation.* University Park Press, Baltimore, Md.
19. Reeck, G. R., R. T. Simpson, and H. A. Sober. 1972. Resolution of a spectrum of nucleoprotein species in sonicated chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 69 : 2317-2321.
20. Seale, R. L., and A. I. Aronson. 1973. Chromatin-associated proteins of developing sea urchin embryo. I. Kinetics of synthesis and characterization of nonhistone proteins. *J. Mol. Biol.* 75 : 633-645.
21. Shih, R. J. 1975. Nuclear proteins of *Rana pipiens* oocytes and embryos. Doctor's Dissertation. Purdue University.
22. Sommerville, J. 1973. Ribonucleoprotein particles derived from the lampbrush chromosomes of newt oocytes. *J. Mol Biol.* 78 : 487-503.
23. Sommerville, J. and R. J. Hill. 1973. Proteins associated with heterogenous nuclear RNA of newt oocytes. *Nature (New Biology).* 245 : 104-106.
24. Stein, G. S., J. L. Stein, and L. J. Kleinsmith. 1975. Chromosomal proteins and gene regulation. *Sci. Am.* 232 : 46-57.
25. Stein, G. S., and J. L. Stein. 1976. Chromosomal proteins : Their role in the regulation of gene expression. *BioScience.* 26 : 488-498.
26. Theiault, J., and R. Landesman. 1974. An analysis of acidic nuclear proteins during the development of *Xenopus laevis*. *Cell Differentiation.* 3 : 249-257.

Preliminary Studies on Nonhistone Chromosomal Proteins of
Rana pipiens Embryos

Abstract

Dejellied blastulas or gastrulas of Rana pipiens were homogenized in sucrose buffer (2.6M) using a glass homogenizer with loose fitted Teflon pestle. After high speed centrifugation, nuclei were suspended in the buffer and pigments were sedimented at the bottom of the tube. Whole cells, cell fragments and yolk granules were packed as a solid layer on top of the tube. Nuclei were collected by diluting the concentrate buffer and further centrifugation. Chromatin prepared from nuclei showed minimal cytoplasmic contamination. After acid extraction of histones, nonhistone proteins were prepared by SDS method. The pattern of SDS gels of nonhistone proteins of erythrocytes, blastulas and gastrulas differed qualitatively from each other. The possible function of the embryonic nonhistone proteins is discussed.

- multiple molecular forms of enzymes in plants. *Biochem. Genet.* 3 : 37-79.
22. Schneider, E. A. & F. Wightman. 1974. Metabolism of auxin in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25 : 487-513.
23. Sefueira, L. & L. Mineo. 1966. Partial purification and kinetics of indoleacetic acid oxidase from tobacco roots. *Plant. Physiol.* 41 : 1200-1208.
24. Shannon, L.M. 1969. Plant isoenzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 38 : 189-210.
25. Siegel, B. E. & A.W. Galston. 1967. Indoleacetic acid oxidase activity of apoperoxidase. *Science* 157 : 1557-1559.
26. Siegel, S.M., 1955. The biochemistry of liguin formation. *Physiologia Plant.* 8 : 30-32.
27. Tang, Y. W. & J. Bonner. 1947. The enzymatic inactivation of indole-acetic acid. I. Some characteristics of the enzyme contained in peaseedlings. *Arch. Biochim.* 13 : 11-25

Abstract

The fractions of the cytoplasm, cell membrane and cell wall from the hypocotyl of *Phaseolus radiatus* contained both peroxidase and IAA oxidase activities. The distribution of these two enzyme activities in various fractions revealed that the cytoplasmic fraction was the highest, the cell membrane fraction was inferior and the cell wall fraction was the lowest. During 5 days of growth period, the activities of the two enzymes were increased as the hypocotyl grew.

The enzyme extracts of various fractions of the hypocotyl were analyzed by disc electrophoresis. Peroxidase activity was revealed by benzidine and IAA oxidase by p-N,N-dimethylaminocinnamaldehyde. The results showed that 7 peroxidase isozyme bands (in the early growth period) and 10 peroxidase isozyme bands (in the later growth period) in the cytoplasmic fractions were detected. Five and 4 peroxidase isozyme bands revealed in the cell membrane and the cell wall fractions respectively throughout the growth period. The relationships of the patterns of peroxidase isozyme and IAA oxidase isozyme were compared and discussed.