科 学 通 报
第42卷 第16期 Chinese Science Bulletin 1997年8月

【研究简报】

小麦染色体嗜银蛋白的生化分析

彭永康 于建春 金绍波 赵 建 宋文芹 陈瑞阳
(南开大学生物系,天津 300071)

关键词 小麦 嗜银蛋白 染色体骨架

70年代后期,Laemmli等人[1,2]通过对去除组蛋白和大部分非组蛋白的HeLa细胞中期染色体生化分析和电镜观察,发现在中期染色体中存在由非组蛋白构成的骨架结构. Howell等人[3]采用银染技术和光镜,在哺乳动物和人的中期染色体中也看到一种由非组蛋白组成的类似骨架的银染轴结构. Earnshaw等人[4]进一步证实在完整染色体中所见的轴结构相当于在去除组蛋白中看到的骨架结构,非组蛋白骨架是染色体中主要的银染对象. 最近,Zhao等人[5,6]用电子显微镜在蝗虫有丝分裂和减数分裂染色体中也看到了银染轴(骨架),并对其精细结构和行为进行了研究. 但这些实验虽然从细胞学的角度证实染色体中可能存在着一类能被硝酸银特异染色的非组蛋白,然而,迄今还缺乏对这些嗜银蛋白的生化分析. 本文从同步化根尖细胞中分离染色体,通过SDS-PAGE技术,用考马斯亮蓝和硝酸银染色,从生物化学角度证实了在染色体非组蛋白中存在着一组能被硝酸银特异染色的非组蛋白.

1 材料与方法

(1)细胞有丝分裂中期同步化诱导. 小麦(*Triticum aestivum*)种子,室温浸泡24小时后,23℃下1.25 mmol/L HU中处理16 h,蒸馏水冲净,继续置23℃下水培3.5 h,然后置4 μm APM中处理5 h[7]. 将同步化的根尖分成二份,1份固定于70%乙醇中,另1份迅速置染色体分离悬浮液中.

(2)细胞有丝分裂标本制备和中期染色体分离. 将固定根尖用卡宝品红染色,压片后光镜下检查并统计细胞有丝分裂中期指数(Met. 1). 中期染色体分离参照Schubert[8]介绍的方法,将根尖分生组织(约0.2 cm)置染色体分离悬浮液中(15 mmol/L Tris-HCl, 80 mmol/L KCl, 20 mmol/L NaCl, 2 mmol EDTA二钠盐,0.5 mmol/L精胺,0.1% Triton100, 15 mmol巯基乙醇,pH7.5),用组织匀浆器匀浆破壁,50 μmol二层尼龙布过滤以除去大部分未裂解细胞、间期核. 借助注射器来回抽动匀浆液数次,进一步破膜使释放染色体. 小心将滤液置40%蔗糖溶液上,200g离心30 min,进一步除去细胞碎片,取滤液于1 000g下离心20 min,取沉淀,再次用染色体悬浮液悬起、镜检. 如染色体纯度不够,可反复数次达一定纯度为止.

(3)染色体非组蛋白制备与SDS-PAGE分析. 染色体非组蛋白制备参照Jeppesen[9]方法,SDS-PAGE分析根据Laemmli[10]介绍的方法,凝胶浓度为12.5%,使用Bio-Rad电泳仪,在80 V下稳压电泳约5.5 h. 用考马斯亮蓝和硝酸银两种方法染色,其中银染参照Merril[11]的方法,在岛津CS-930型薄层层析光密度扫描仪上进行凝胶扫描.

2 结果与讨论

2.1 小麦有丝分裂中期细胞同步化和染色体分离

尽管染色体非组蛋白结构和成分的研究已有很大进展[12],但这方面的研究大多限于动物

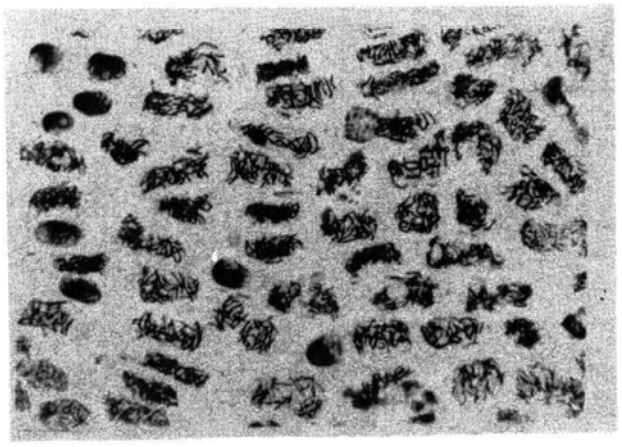


图 1 小麦根尖有丝分裂中期同步化细胞

染色体，涉及植物染色体的材料还很少[13]，其原因在于缺乏高频率诱导植物细胞同步化的有效手段，和染色体的分离难度远大于动物染色体．为了有效地分离植物染色体，本文采用 HU-APM 双阻断法诱导小麦根尖细胞的同步化，获得了较高的有丝分裂指数．图 1 是经 HU-APM 双阻断法同步化的小麦根尖细胞用卡宝品红染色后的光镜图象．从图中可以清楚看到，分裂期细胞几乎完全被阻断在中期．根据我们的实验结果表明，在 23℃条件下，用 1.25 mmol/L HU 处理小麦根尖 16 h，然后转入水培 3.5 h，再用 4 μmol/L APM 处理 5 h，其有丝分裂中期指数高达 50%以上，这一结果为进一步分离、纯化植物中期染色体提供了便利条件．

从植物细胞中分离染色体虽然已有一些报道[14,15]，但比较困难．而且已有的报道多以悬浮细胞系为材料，比较繁琐．直接从根尖中期细胞中分离染色体迄今报道不多．本文以同步化的小麦根尖细胞为材料，分离纯化中期染色体，获得了较好的结果．图 2 为 HU-APM 双阻断法同步化的小麦根尖中期细胞中分离纯化的染色体．可见染色体形态完整，正常，分散良好，光镜观察表明染色体样品中未裂解细胞、细胞核和碎片已基本去净，适合于染色体蛋白质的生化分析．

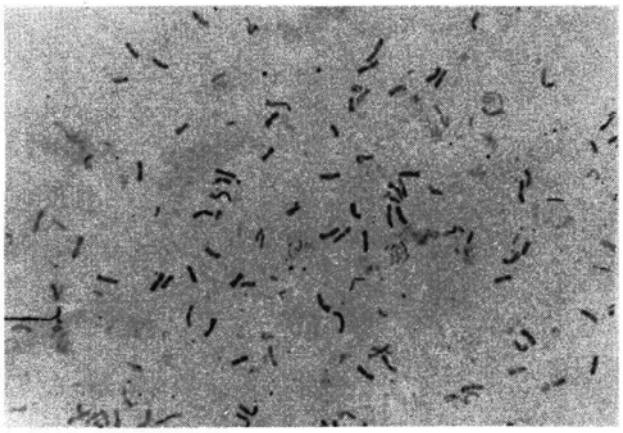


图 2 分离的小麦根尖细胞染色体

2.2 小麦中期染色体中存在一类嗜银非组蛋白

我们对分离的小麦中期染色体非组蛋白进行了 SDS-PAGE 分析，图 3 所示为小麦染色体非组蛋白经 SDS-PAGE 分析后用考马斯亮蓝和硝酸银染色的光密度扫描记录结果．比较图 3(b)和图 3(c)两种染色的扫描图，并参考蛋白质谱型、所测分子量和标准蛋白，我们发现，染色体非组蛋白对上述两种染色所显示的蛋白质种类和谱型特征是非常不同的，仔细分析可以看出，染色体非组蛋白有下述特点：

(1)既能被考马斯亮蓝又能被硝酸银染色的非组蛋白．如图 3(b)和图 3(c)中 A_1 区内 6 条和 A_2 区的 2 条共 8 条蛋白谱带，其分子量在 14～21 ku(A_1 区 6 条)和 66 ku 左右(A_2 区 2 条)．它们在图 3(b)和(c)中的迁移率和谱型特征是相同的．可以判断在这两个区域里，考马斯亮蓝和硝酸银染色的是同一类非组蛋白．

(2)考马斯亮蓝特异着色的非组蛋白．图 3(b)三角箭头所示的蛋白质谱带，与图 3(c)相比较，这类蛋白的迁移率和谱型特征仅为考马斯亮蓝染色所特有，而不能被银染所显示．在我

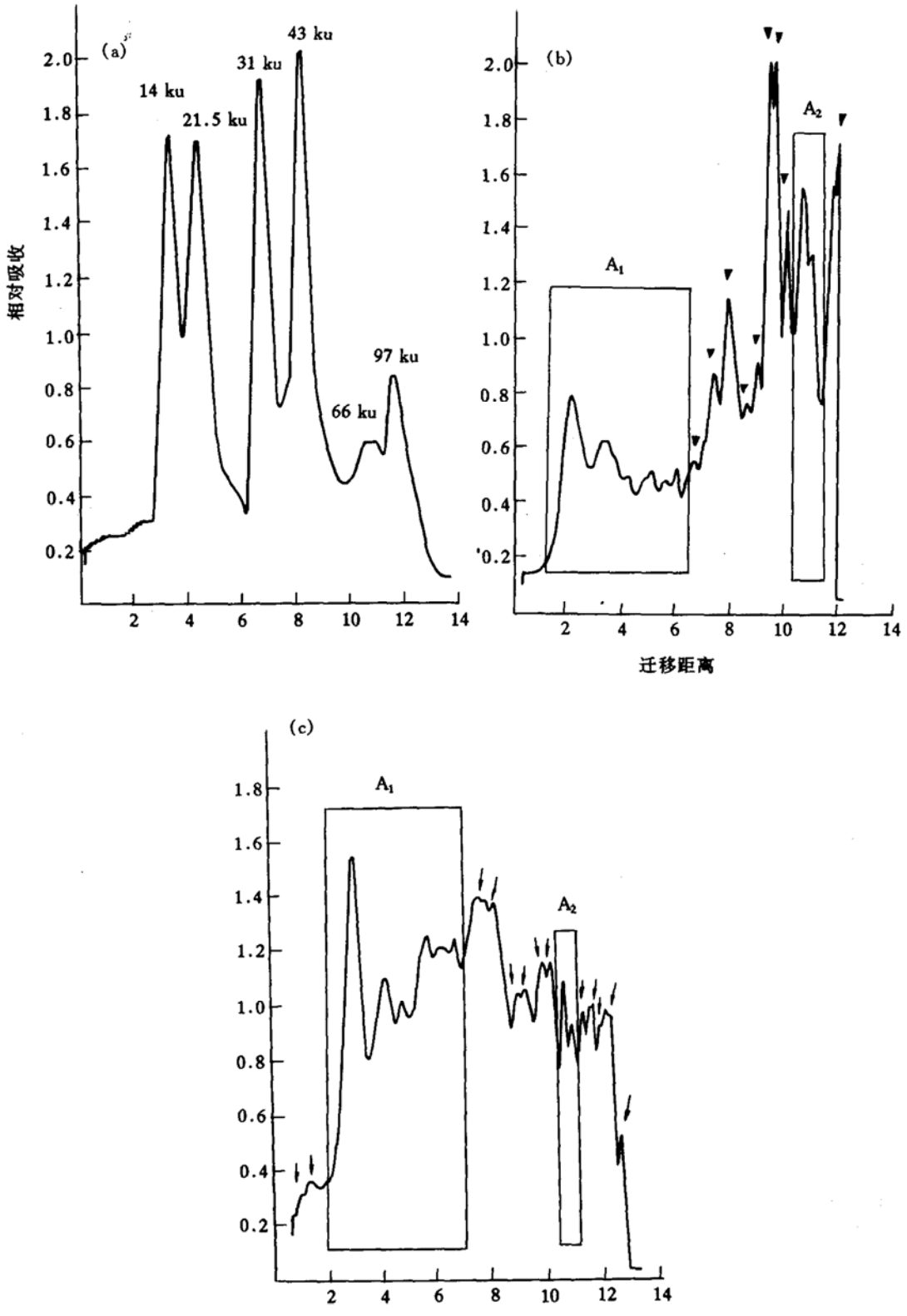


图 3　小麦根尖染色体非组蛋白电泳谱带的光密度扫描

(a)标准蛋白;(b)和(c)是小麦染色体非组蛋白样品在同一次电泳的两条凝胶分别用考马斯亮蓝和硝酸银染色的结果

们的结果中,这类蛋白质的分子量有位于21～66 ku之间的8条和位于97 ku以上处1条,共9条谱带.

(3)硝酸银特异着色的非组蛋白. 结果如图3(c)箭头所示的非组蛋白,与前一类结果相反,这类蛋白质只能被硝酸银染色而不被考马斯亮蓝显示. 它们的迁移率和谱型为银染所特有,其在凝胶上的分布位置主要有2个区域:位于31～66 ku处,包括31, 37, 43, 50, 53 ku和66 ku共6条谱带;66 ku以上至100 ku处,包括68, 70, 88, 97 ku和100 ku共5条谱带,另外还有2条分子量较小的谱带. 这些只能被硝酸银染色的谱带我们称之为嗜银非组蛋白. 根据上述实验结果可以看出,在小麦染色体中,非组蛋白对考马斯亮蓝和硝酸银染色性能上是有差异的. 这些结果清楚的揭示染色体中确实存在一类能被硝酸银特异染色的嗜银蛋白,不是所有的非组蛋白都能被银染色.

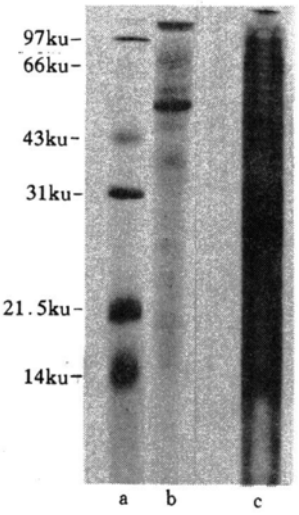


图4 染色体非组蛋白的SDS-PAGE电泳谱带
a——标准蛋白, b——考马斯亮蓝染色, c——硝酸银染色

2.3 嗜银非组蛋白的生化性质

许多细胞学和细胞化学的研究已经证明,在染色体中存在一个由非组蛋白组成的骨架或轴,能被硝酸银特异着色[4],提示染色体中可能包含有一类特殊的嗜银蛋白,但对这类嗜银蛋白的生物化学性质迄今还是不清楚的. 为了进一步研究这类嗜银蛋白,我们用SDS-PAGE技术分析中期染色体中的非组蛋白,并分别用考马斯亮蓝的硝酸银染色,结果表明(图4),在中期染色体非组蛋白中除了存在考马斯亮蓝特异性染色非组蛋白、考马斯亮蓝和硝酸银共染两类非组蛋白外,还存在一类只能被硝酸银特异着色的染色体非组蛋白. 在我们的实验中,至少有11条这样的多肽谱带. 虽然我们现在还不能证实这11种主要的嗜银蛋白就是小麦染色体中的骨架蛋白,但从嗜银性上推测. 这类嗜银非组蛋白与细胞学上所看到的银染骨架或轴结构的蛋白质可能是相关的,但这类嗜银非组蛋白与骨架的确切关系需进一步研究.

致谢 本工作为国家教委"跨世纪优秀人才计划"基金资助项目.

参 考 文 献

1 Laemmli U K, Cheng S M, Adolph K W, et al. Metaphase chromosome structure. Cold Spring Harbour Symp Qunat Biol, 1978, 42: 109～118
2 Paulson J R, Laemmli U K. The structure of histone-depleted metttaphase chromosomes. Cell, 1977, 12: 817～828
3 Howell W M, Hsu T C. Chromosome core structure revealed by silver staining. Chromosoma, 1979, 73: 61～66
4 Earnshaw W C, Laemmli U K. Silver staining the chromosome scaffold. Chromosoma, 1984, 89: 186～192
5 Zhao J, , Hao S, Xing M. The fine structure of the mitotic chromosome core (scaffold) of *Trilophidia annulata*. Chromosoma, 1991, 10: 323～329
6 Zhao J, Jin S B, Hao S. The substructural organization of the chromosome core (scaffold) in meiotic chromosomes of *Trilophidia annulata*. Genet Res Camb, 1994, 64: 209～215
7 Pan W H, Houben A, Schlegel R. Highly effective cell synchronization in plant roots by hydroxyurea and amiprophos-methyl or colchicine. Genome, 1993, 36: 387～390
8 Schubert I, Dolezel J. Houben A, et al. Refined examination of plant metaphase chromosome structure at different levels made feasible by new isolation methods. Chromosoma, 1993, 102: 96～104
9 Jeppesen P G N, Bankier A T, Sanders L. Nonhistone proteins and the structure of metaphase chromosomes. Exp Cell Res, 1978, 115: 293～302

科 学 通 报
第 42 卷 第 16 期 Chinese Science Bulletin 1997 年 8 月

【研究简报】

人工电子受体和 PS Ⅱ异质性的关系

温晓刚 林世青 匡廷云
(中国科学院植物研究所,北京 100093)

关键词 DCBQ DMQ PS Ⅱ异质性 叶绿素荧光动力学

近年来人们对光系统Ⅱ(PS Ⅱ)的研究表明,部分 PS Ⅱ不具备将电子由 Q_A 传递到 Q_B 的能力,称这部分 PS Ⅱ为无活性 PS Ⅱ中心,而正常的 PS Ⅱ为有活性 PS Ⅱ中心. 一些实验室利用 2,6-二氯苯醌(DCBQ)和 2,5-二甲基苯醌(DMQ)两种人工电子受体研究有活性/无活性 PS Ⅱ异质性,认为 DCBQ 可以同时接受有活性和无活性 PS Ⅱ中心的电子,而 DMQ 只能接受有活性中心的电子[1,2]. 也有部分实验室认为 DCBQ 不能接受无活性 PS Ⅱ中心的电子[3]. 有关 DCBQ 和 DMQ 对有活性和(或)无活性 PS Ⅱ中心电子传递的作用目前还没有定论.

本文中我们用叶绿素荧光动力学探讨了人工电子受体(DCBQ 和 DMQ)与 PS Ⅱ异质性的关系.

1 材料与方法

菠菜类囊体膜的制备除了加入 10 mmol/L $MgCl_2$ 外基本按林世青等人[4]的方法,叶绿素含量按 Arnon[5]方法用岛津 QV-50 分光光度计测定. 叶绿素浓度为 10 μg/mL.

叶绿素瞬态(ms 级)荧光动力学曲线用自己组装的动力学荧光计[6]测定,每次均用暗适应后的新鲜样品,每一种处理至少进行 10 次以上重复测定. 采样数据经自动平均、方差分析和用各曲线自己的固定荧光 F_o 均一化后得到一条平均的动力学曲线和平均的荧光参数.

DCBQ 和 DMQ 分别为 ICN Biochemicals 和 Kodak 公司的产品,其他化学药品为 Sigma 公司的产品.

2 结果与讨论

DCBQ 和 DMQ 都可成为 PS Ⅱ的电子受体,因而对叶绿素荧光均起猝灭作用. 图 1 显示分别加入不同浓度的 DMQ 和 DCBQ 后菠菜类囊体膜叶绿素荧光动力学曲线的变化.

随着 DMQ 浓度的增大,最大荧光 F_m 明显猝灭,偏转荧光 F_i 变化不大. 由于叶绿素荧光

10 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970, 227: 680~685
11 Merril C R, Goldman D, Sedman S A, et al. Ultrasensitive stain for protein in polyacrymide gels shows regional variation is cerebrospinal. Fluid Protein Science, 1981, 21: 1 437~1 438
12 郝 水. 关于染色体骨架的研究. 科学通报, 1989, 34(23): 1 761~1 765
13 Hadlaczky Gy. Structure of metaphase chromosomes of plants. International Review of Cytology, 1985, 94: 57~76
14 Mill M, Praveen K S, Larry C F, et al. Isolation of chromosomes from cell suspension cultures of *Vicia hajastana*. Cytologia, 1987, 52: 523~528
15 Hadlaczky Gy, Bisztray Gy, Praznovszky T, et al. Mass isolation of plant chromosomes and mulei. Planta, 1983, 157: 278~285

(1997-01-21 收稿, 1997-06-16 收修改稿)