

大白杜鹃染色质组成成分的研究

张洪渊 刘克武 杨守忠 罗胜清 杨玉龙

(四川大学生物系, 成都)

摘要 采用略加改进的 Huang 及 Bonner 法和 Sindair 法制备四川荣经大白杜鹃 (*Rhododendron decorum* Franch.) 的染色质, 分析其组成成分, 其结果为蛋白质:DNA=1.50; 组蛋白:DNA=1.05; 非组蛋白:DNA=0.45; RNA:DNA=0.13。

关键词 杜鹃花属; 染色质; 组蛋白

国内外不少作者对高等植物染色质作了一系列研究, 先后对洋葱、大麦、小麦、萝卜^[1]、豌豆^[2]、大豆^[3]、花椰菜^[4]、裸麦^[5]、烟草^[6]、马铃薯^[7]等进行了染色质组成分析, 由这些研究结果表明, 不同科属、不同物种间在染色质组成上均存在一定差异。对于染色质的研究有益于对高等植物的生理、病理、分类等方面的研究。我们对四川荣经县大白杜鹃的染色质组成作了初步分析, 现报告如下。

材料和方法

一、材料和试剂

1. 材料: 大白杜鹃 (*Rhododendron decorum* Franch.) 取自四川荣经县泥巴山 (海拔2000米)。

2. 试剂: 牛血清白蛋白 (电泳纯, 国产分装), 用微量凯氏定氮法测得其纯度为81.10%。

酵母RNA (BDH产品), 用定磷法测得其纯度为74.21%。

DNA (上海东海制药厂产品), 用定磷法测得其纯度为72.39%。

其他试剂均为国产分析纯或化学纯。

二、方法

1. 染色质的分离: 采用 R. C. C. Huang 及 J. Bonner^[8] 的方法略加改进。取大白杜鹃嫩叶约850克, 洗净、剪碎, 加入1700毫升0.25mol/L蔗糖—0.05mol/L Tris—HCl—0.001 mol/L MgCl₂溶液 (pH 8), 高速组织捣碎机捣碎, 用纱布及尼龙袜过滤, 滤液以4000×g离心30分钟, 取沉淀的上层粗制染色质, 再加入上述溶液匀浆, 10000×g离心10分钟, 再取沉淀上层如法反复进行几次, 最后用150毫升0.01 mol/L Tris—HCl (pH 8) 溶液洗涤, 得染色质粗品约400毫克。于粗制品中加入20毫升0.1 mol/L Tris—HCl (pH 8) 溶液, 在玻璃匀浆器中匀浆, 最后以20000×g离心1小时, 取沉淀得染色质约300毫克。

2. 染色质组成成分分析: 参照Sinclair, G.D. 等^[9]的方法。取上述制备的染色质0.3克, 加入预冷的0.25N HCl—0.9% NaCl溶液20毫升, 经玻璃匀浆器充分匀浆, 匀浆液在4℃下搅拌1.5小时, 以12000×g离心10分钟, 取出上清液 (含组蛋白), 用0.25N HCl—

0.9% NaCl 溶液补充到25毫升, 用Folin酚法^[10]测上清液中组蛋白的含量, 以牛血清白蛋白作对照。

上述去组蛋白的染色质沉淀, 用冷10%三氯乙酸洗两次后加入10毫升 0.3N KOH 溶液, 匀浆, 匀浆液在37℃水浴保温 1 小时, 冷却使沉淀完全, 然后用 5% HClO₄ 调 pH 1~2, 在12000×g离心 5 分钟, 取出上清液 (含 RNA), 用0.3N HCl—5% HClO₄ 溶液 (pH1.5) 补充到25毫升, 用地衣酚法^[11]测上清液中RNA的含量, 以酵母RNA作对照。

沉淀加15毫升10% HClO₄再匀浆, 匀浆液在70℃水浴保温30分钟后以12000×g离心10分钟, 取出上清液 (含DNA), 用10% HClO₄ 补充到25毫升, 用二苯胺法^[12]测定上清液DNA的含量, 以标准DNA作对照。

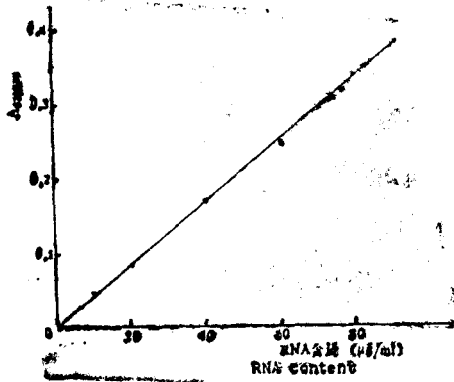


图2 RNA标准曲线

Fig. 2 Calibration curve of RNA

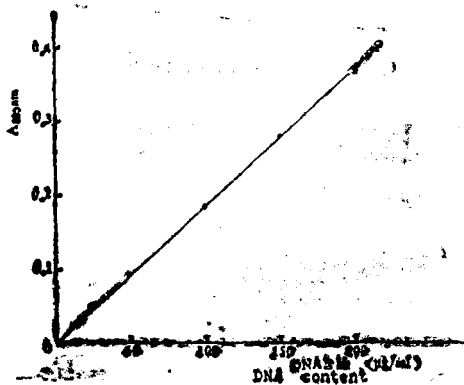


图3 DNA标准曲线

Fig. 3 Calibration curve of DNA

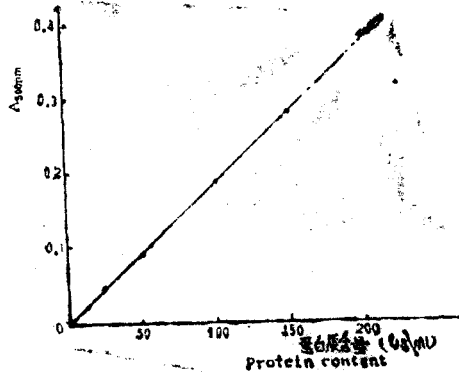


图1 蛋白质标准曲线

Fig. 1 Calibration curve of protein

液 (含DNA), 用10% HClO₄ 补充到25毫升, 用二苯胺法^[12]测定上清液DNA的含量, 以标准DNA作对照。

沉淀加适量0.1N NaOH液溶解, 经12000×g离心 5 分钟, 取出上清液 (含非组蛋白), 用0.1N NaOH液补充到25毫升, 用Folin酚法测定其量即为非组蛋白含量。

根据DNA、组蛋白、非组蛋白和RNA的含量, 以DNA的含量为1, 计算出大白杜鹃染色质各组分的比值。

结果和讨论

根据测定的实际含量按照文献^[13]的方法分别绘制牛血清白蛋白标准曲线 (图1)、RNA 标准曲线 (图2) 和DNA标准曲线 (图3)。

按照与制定以上几种标准曲线相同的反应条件, 分别测定染色质的组蛋白抽提液、非组蛋白抽提液、DNA 抽提液和 RNA 抽提液中相应组分的含量, 结果见表1、表2、表3。

表1 染色质组蛋白和非组蛋白测定

Table 1 Determination on contents of chromatin histone and nonhistone

	组蛋白 Histone		非组蛋白 Nonhistone	
	0.2	0.4	0.5	0.8
样品体积 (ml) Sample volume	0.2	0.4	0.5	0.8
吸收值 A500nm Absorbance	0.172	0.344	0.191	0.296
由标准曲线查得样品稀释液中蛋白质浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$) Concentration determined of protein in sample dilute solution on the calibration curve	94.0	186.0	105.0	155.8
样品蛋白质浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$) Concentration of sample protein	470.0	465.0	210.0	194.7
样品蛋白质浓度均值($\mu\text{g}/\text{ml}$) Average value of concentration on sample protein	467.5		202.4	

表2 染色质DNA含量测定

Table 2 Determination on content of chromatin DNA

	D N A		
	0.10	0.15	0.20
样品 (DNA提取液) (ml) Sample (DNA extract)	0.10	0.15	0.20
吸收值 A595nm Absorbance	0.078	0.125	0.162
由标准曲线求得样品稀释液中的浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$) Concentration determined of DNA in sample dilute solution on the calibration curve	44.3	67.5	88.8
样品DNA浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) Concentration of sample DNA	443.0	450.0	444.0
样品DNA浓度均值($\mu\text{g}/\text{ml}$) Average value of concentration on sample DNA	445.7		

表3 染色质RNA含量测定
Table 3 Determination on content of chromatin RNA

样品 (RNA提取液) (ml) Sample (RNA extract)	R N A		
	0.3	0.5	0.8
吸收值 A670nm Absorbance	0.074	0.122	0.194
由标准曲线求得样品稀释液中RNA 浓度 (µg/ml) Concentration determined of RNA in sample dilute solution on the calibration curve	17.8	29.3	46.6
样品RNA浓度(µg/ml) Concentration of sample RNA	59.3	58.7	58.3
样品RNA浓度均值(µg/ml) Average value of concentration on sample RNA	58.8		

根据上述结果, 大白杜鹃染色质各组分的比值为:

$$\text{组蛋白 : DNA} = \frac{467.5}{445.7} = 1.05$$

$$\text{非组蛋白 : DNA} = \frac{202.4}{445.7} = 0.45$$

$$\text{RNA : DNA} = \frac{58.8}{445.7} = 0.13$$

$$\text{蛋白质 : DNA} = \frac{467.5 + 202.4}{445.7} = 1.50$$

文献报道高等植物的染色质各组分的比值, 一般组蛋白:DNA 约为1, 非组蛋白:DNA 在0.5~2之间。我们所测定四川荣经大白杜鹃染色质组成大体也在此范围。

此外, 我们将提取的大白杜鹃染色质组蛋白, 用15%胶浓度进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 用氨基黑10B染色, 明显的显示5条区带, 符合真核细胞组蛋白凝胶电泳的特征。

在制备植物染色质及其组分分析中, 正确选材甚为重要, 虽然同种植物各部位的染色质组成基本恒定, 但选材不当会给实验带来较大误差。例如某些植物的根茎难于破碎, 其染色质制备中收率较低。因此选择叶片较为方便。用植物叶制备染色质时, 常常受叶绿素的干扰, 因此叶绿素要尽量除尽。为了避免叶绿素的干扰, 我们选用大白杜鹃嫩叶, 效果较好。

此外, 在作染色质组成分析时, 测定RNA含量中常有DNA干扰, 为此, 在用定磷法测定时, 分别再用二苯胺法及地衣酚法校正DNA及RNA含量, 可得到较为满意的结果。

参 考 文 献

- (1) Nadeau et al., 1974; Arch. Biochem. Biophys., 161: 171—177.
- (2) Fambrough et al., 1968; Biochemistry, 7: 575—584.
- (3) Lin et al., 1974; Biochem. Biophys. Res. Commun., 60: 498—506.
- (4) Fukasawa and Hamada, 1976; Exp. Cell Res., 101: 97—103.
- (5) La Rue and Pallolla, 1976; Can. J. Biochem., 54: 765—771.
- (6) Gigot et al., 1976; Nucleic Acids Res., 3: 2315—2329.
- (7) Tuan and Bonner, 1964; Plant Physiol., 39: 768—772.
- (8) R. C. C. Huang and J. Bonner., 1965; Proc. Nat. Acad. Sci., 54: 960.
- (9) Sinelair, G. D. and Braseh, K., 1978; Exp. Cell Res., 111: 1.
- (10) Lowry, O. H., 1953; J. Biol. Chem., 193: 265.
- (11) Schjeide, O. A., 1969; Anal. Biochem., 27(3): 437.
- (12) Burlon, K. A., 1956; Biochem., 62: 315.
- (13) 北京大学生物系遗传学教研室, 1983: 遗传学实验方法和技术。P.64—71, 高等教育出版社。

STUDIES ON THE CHROMATIN COMPONENT FROM RHODODENDRON DECORUM FRANCH

Zhang, Hong Yuan; Liu, Ke Wu; Yang, Shou Zhong;
Luo, Sheng Qing and Yang, Yu Long
(Department of Biology, Sichuan University, Chengdu)

Abstract An improved Huang method and Sindair method were used for preparing chromatin from *Rhododendron decorum* Franch. of Yunjing, Sichuan. Their component were analysed. The results are proteins: DNA = 1.50; histone:DNA = 1.05; nonhistone: DNA = 0.45; RNA: DNA = 0.13.

Key words *Rhododendron*; chromatin; histone