

# 嗜酸热硫球菌染色质碱性蛋白的提取

文建凡 李靖炎

(中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放实验室 昆明 650223)

组蛋白是典型真核细胞中普遍存在的染色质碱性蛋白。早已有证据表明它们是一组高度保守的蛋白,其中四种核心组蛋白有着共同的起源,来自于同一始祖性的蛋白(组蛋白 H1 则有另外的起源)<sup>[1]</sup>。这种始祖性的蛋白如何进化发展成现今的组蛋白,人们最易想到的是从原核生物中去寻找线索。然而,迄今在原核生物的真细菌类(eubacteria)中所发现的染色质碱性蛋白无一与组蛋白有显著的同源性<sup>[1]</sup>。70年代末以来,原核生物的另一类群——古细菌(Archaeobacteria)类的陆续发现为这个问题的探明带来了希望。因为一系列的分子生物学证据表明,在亲缘关系上,古细菌类远比真细菌类更接近真核生物<sup>[2]</sup>。目前在我国已发现几种古细菌,嗜酸热硫球菌(*Sulfosphaerellus thermoacidophilum*)即是其中之一。本工作利用我们建立的先用甲醇固定、后用稀盐酸抽提的方法对此古细菌的染色质碱性蛋白进行了提取,并将它与小牛胸腺组蛋白进行了比较研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

嗜酸热硫球菌(*Sulfosphaerellus thermoacidophilum*)菌种由中国科学院微生物研究所提供。培养条件按文献报道的方法<sup>[3]</sup>。新鲜小牛胸腺取自新生小牛。

### 1.2 碱性蛋白的提取

采用本实验室建立的方法,步骤如下:(1)离心(8000g)收集对数生长末期的菌体 0.2g;小牛胸腺经生理盐水洗净后,取 0.2g 剪成小块。二者均经预冷甲醇于 4℃ 下固定 40min(中间换一次甲醇)。(2)各加入少量 0.3mol/L HCl,细菌于研钵内研成匀浆,胸腺则剪成糜状。都加入约 10 倍于材料体积的 0.3mol/L HCl,于室温下轻轻搅拌抽提 30min。离心(10000g,5min)收集上清液。(3)向上清液加入 8 倍体积的预冷丙酮,置-10℃ 过夜以沉淀蛋白。(4)离心(8000g,5min)收集蛋白,再加入与(2)相等体积的 0.3mol/L HCl,轻轻搅拌以溶解蛋白。高速离心(18000g,5min),弃去不溶的杂蛋白等沉淀物,收集上清,重复步骤(3)。最后将蛋白用丙酮离心洗涤两次,真空冷冻干燥备用。

### 1.3 电泳

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)参照文献[4],并修改如下:分离胶贮液的丙烯酰胺:甲叉双丙烯酰胺为 60:0.4,制得 15%—27% 丙烯酰胺的直线连续梯度胶。浓缩胶浓度为 5%。样品液含 4% SDS。将上述所提两种蛋白制成电泳样品,在胶上分左右两部分对应点样。电泳后切成左右两块,其一用考马氏亮兰 R250 染色,7% 醋酸脱色;另一块经固定后,用含 0.5% Triton X-100 的冰醋酸甲醇溶液(HAc:Methanol:H<sub>2</sub>O = 3:3:4)脱去 SDS 过夜,用蒸馏水漂洗至 pH7,于 0.1% 偶氮洋红 G 染液(pH7)中染色 3h,用 15% 甲醇脱色。

醋酸-尿素-Triton X-100-聚丙烯酰胺凝胶电泳(AUT-PAGE)据文献[5]并作如下修改:胶贮液同上,制得含尿素 6.25mol/L、Triton X-100 8mmol/L 的 18% 丙烯酰胺/0.12% 甲叉双丙烯酰胺的凝胶。样品液含 8mol/L 尿素,4% 蔗糖,0.1% 巯基乙醇。电极液含 2.5mol/L 尿素,0.4mol/L 甘氨酸,0.9mol/L 冰醋酸。用考马氏亮兰 R250 染色。

## 2 结果

### 2.1 SDS-PAGE

图 1 为经考马氏亮兰染色的 SDS-PAGE 图谱。所提小牛胸腺组蛋白(A)显示出六条分离带。这表明该提取方法能有效地获得五种组蛋白组分。从嗜酸热硫球菌提取到的碱性蛋白(B)有七条分离带,其中以分子量较小的三条带(5,6,7号)染色最深,而其中又以5号带蛋白含量最高。三者的分子量都较小牛胸腺组蛋白 H4(MW11 282)小,5号带约 9800,6号带 8500,7号带 7200。

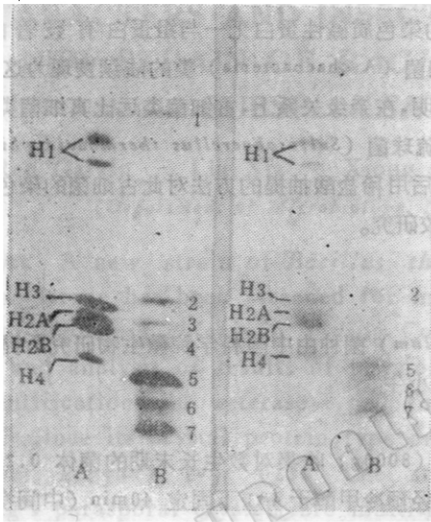


图 1 SDS-PAGE 图谱

左图: 考马氏亮兰染色; 右图: 中性偶氮洋红 G 染色。  
A. 小牛胸腺组蛋白; B. 嗜酸热硫球菌染色质碱性蛋白

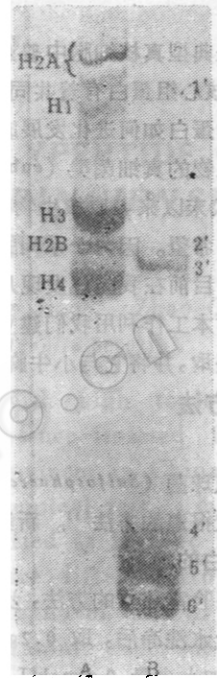


图 2 AUT-PAGE 图谱

A. 小牛胸腺组蛋白;  
B. 嗜酸热硫球菌染色质碱性蛋白

偶氮洋红 G 染液在中性时能专特染色碱性较强的蛋白质<sup>[4]</sup>。其染色结果表明: 小牛胸腺的五种组蛋白均被染色 (A), 而所提嗜酸热硫球菌的蛋白则只显示出四条带 (B), 即是图 1 中的 2, 5, 6, 7 号条带。但其染色深浅有别于图 1。图 1 (左) 中, 蛋白含量最高、染色最深的 5 号带, 在右图中不如含量为其次的 7 号带染色深。这说明 7 号带蛋白的碱性远比 5 号带的强。6 号带染色较浅, 2 号带更浅。

### 2.2 AUT-PAGE

图 2 为考马氏亮兰染色的 AUT-PAGE 图谱。根据 Bonner 等<sup>[7]</sup>及 Vernet 等<sup>[8]</sup>在相同条件下小牛胸腺组蛋白的电泳图谱确定出本图谱中小牛胸腺组蛋白各组分的条带位置 (图 2-A)。可见在此电泳系统中, 嗜酸热硫球菌碱性蛋白显示出六条带 (图 2-B), (依次编号为 1', 2', 3', 4', 5', 6')。象图 1 一样, 其中以三条带染色最深, 说明它们蛋白含量较高。但这三条带 (3', 5', 6') 的迁移率不同于图 1 中的三条主带 (5, 6, 7), 除两条 (5', 6' 号) 带的迁移率远比小牛胸腺组蛋白 H4 快外, 另一条 (3' 号) 则远远落后于后面。说明后者的荷电状态远不同于前二者。

## 3 讨论

本文采用的提取方法, 由于材料事先经甲醇固定, 细胞中的内源性蛋白水解酶都已失活, 所以无需严格的低温操作和使用蛋白酶抑制剂而能很好地防止所提蛋白的酶促降解; 另外, 细胞内原为酸可溶性

的一些非染色质碱性蛋白被固定而成为酸不溶或难溶性,不易随碱性较强的染色质碱性蛋白一同被酸所抽提,因而所提蛋白纯度大为提高。一系列的工作已证明该方法不仅改善了常规酸抽提法的效果,还适用于低等生物的染色质碱性蛋白提取<sup>[6,9]</sup>。本实验中用此法提得的小牛胸腺组蛋白,五种组分既完整无降解丢失,又具有较高的纯度即是一个例证。此方法用于嗜酸热硫球菌,所获蛋白在两种电泳系统中都显示出了三种主要的成分,其分子量均小于小牛胸腺组蛋白 H4。三者中以分子量最大者含量最高,碱性则以分子量最小者最强。

迄今所报道的从原细菌中所发现的染色质碱性蛋白的分子量都较小(一般小于小牛胸腺组蛋白 H4),本文报道的三种蛋白与之一致。目前国外报道了从几种产甲烷的古细菌中分别发现了几种与真核细胞组蛋白有显著同源性的染色质碱性蛋白,如 HMf、HMt 和 HMv<sup>[10-12]</sup>。这些事实表明,在古细菌中确已找到了组蛋白起源进化的重要线索。本文报道的蛋白与组蛋白的关系尚需进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] Reeck G R, Swanson E, Teller DC. *J Mol Evol*, 1978, 10: 309—317.
- [2] 李靖炎, 细胞生物学进展. 北京: 高等教育出版社, 1991. 89—117.
- [3] 钟慧芳, 陈秀珠, 李雅芹, 等. 微生物学报, 1982, 22(1): 1—7.
- [4] Laemmli UK. *Nature*, 1975, 227: 680—685.
- [5] Vernt G, Sala-Rovira M, Maeder M *et al*. *BBA*, 1990, 1084: 281—289.
- [6] 李靖炎, 陈向虹, 乔以炯. 实验生物学报, 1978, 11(2): 303—310.
- [7] Bonner WM, West MHP, Stedman JD. *Eur J Biochem*, 1980, 109: 17—23.
- [8] 陈云鹤, 周理良, 苟世康, 等. 动物学研究, 1983, 4(4): 315—320.
- [9] 文建凡, 吴传芬, 李靖炎. 第二、三届全国细胞核结构、功能与进化学术讨论会论文摘要汇编, 1991. 23—24.
- [10] Sandman K, Krzycki JA, Dobrinski B *et al*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 5788—5791.
- [11] Tabassum R, Sandman K, Reeve J. N. *J Bacteriol*, 1992, 174: 7890—7895.
- [12] Agha-Amiri K, Klein A. *Nucl Acids Res*, 1993, 21: 1491.

# ISOLATION OF BASIC CHROMATIN PROTEINS OF ARCHAEBACTERIUM *SULFOSPHAERELLUS* *THERMOACIDOPHILUM*

Wen Jianfan    Li Jingyan

(Laboratory of Cellular and Molecular Evolution, Kunming Institute of Zoology,  
Chinese Academy of Sciences, Kunming 850223)

**Abstract** By a simple, efficient procedure which is termed "Methanol profix—Acid extraction", basic chromatin protein was isolated from an archaeobacterium *Sulfosphaerellus thermoacidophilum* successfully. Both SDS-PAGE and AUT-PAGE comparison of the protein with histone isolated by the same procedure from calf thymus showed that it contained three major fractions. Like basic chromatin proteins of other archaeobacteria reported previously, the molecular weights of the three fractions, which are about 7 200, 8 500 and 9 800 respectively, are all less than that of calf thymus H4(MW 11 282). And they can be stained by Azocarmin G solution (pH7), which specially stains basic proteins such as histone.

**Key words** *Sulfosphaerellus thermoacidophilum*, Basic chromatin protein