

家蚕及蓖麻蚕后丝腺染色质的分离及其性质

张先扬 董 霖 刘 锋 杜端杰

(中国科学院上海生物化学研究所)

摘要 本文介绍从 5 龄 4 天的家蚕及蓖麻蚕后丝腺中分离细胞核及染色质的方法,并分析其基本特性。从家蚕和蓖麻蚕后丝腺中分离的染色质的化学组成及光谱学特性与高等动物染色质相似;比较了两组染色质的组蛋白,非组蛋白的电泳图谱,分离的染色质在一个有外源的大肠杆菌 RNA 聚合酶的体外系统中具有转录活性。作者比较了染色质的 DNA 含量与体外参入的关系,测定了能量、能量再生系统、锰离子等因素及利福霉素等抑制剂对染色质体外参入的影响。比较了不同浓度下两种染色质体外参入的时间曲线。

染色质体外转录活性的研究是探索真核细胞专一基因表达调控的重要手段之一,对天然及重组染色质转录的研究,已初步观察到与球蛋白,组蛋白,卵白蛋白等基因转录相关的染色质非组蛋白的作用 (Chiu, 1977; O'Malley, 1976,) 而对较低等的动物如昆虫的单一顺序基因的表达研究尚少。但是由于昆虫有其特殊的生命周期,可作这类研究的较理想的材料。例如蚕幼虫在生长到第 5 龄时,其后丝腺细胞合成并分泌大量的丝心蛋白。Suzuki (1976) 等较详细地研究了家蚕在不同龄期及 5 龄不同天数的后丝腺的 DNA, RNA, 蛋白质含量及丝心蛋白 mRNA 量的变化。本文介绍了家蚕及蓖麻蚕后丝腺细胞具有转录活性的染色质的分离方法,分离的染色质的化学组成等特性与高等动物相近,这一点有利于进一步研究不同发育过程中与丝心蛋白基因表达相关的染色质蛋白的变化及其可能的作用。

材 料 与 方 法

1. 材料来源

家蚕 (*Bombyx mori*) 由江苏省苏州蚕业专科学校提供,蓖麻蚕 (*Phyllosamia cynthia ricini*) 由中国农业科学院蚕业研究所提供。 ^3H -ATP (20Ci/mM) 由中国科学院原子能研究所提供。UTP, GTP, CTP, 磷酸肌酸,磷酸肌酸激酶,酵母 tRNA, 苯甲基磺酰氟均由本所东风厂提供。小牛胸腺 DNA 及小牛胸腺组蛋白由本所七室提供。所用的玻璃器皿均在 120℃ 烘烤 2 小时,试剂均用双蒸水配制并经高压灭菌。

2. 缓冲液

(1) 制备大肠杆菌 RNA 聚合酶缓冲液

A. 0.05M Tris-HCl, pH8.0, 0.01M MgCl_2 , 0.1mM 二硫苏糖醇 (DTT), 0.1mM 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA), 5% 甘油。

B. 0.01M Tris-HCl, pH8.0, 0.01M MgCl_2 , 0.1mM EDTA, 0.01M β -巯基乙醇, 5% 甘油。

C. 0.05M Tris-HCl, pH8.0, 0.1mM EDTA, 0.01M β -巯基乙醇, 5% 甘油。

(2) 酶储存液 0.01M Tris-HCl, pH8.0, 0.01M $MgCl_2$, 0.1M KCl, 0.01M β -巯基乙醇, 50% 甘油。

(3) 制备染色质的缓冲液

I. 0.01M Tris-HCl, pH7.5, 0.025M KCl, 1mM $MgCl_2$, 1mM $CaCl_2$, 5mM β -巯基乙醇, 0.1mM 苯甲基磺酰氟 (PMSF)。

II. 0.01M Tris-HCl, pH7.5, 0.025M KCl, 1mM $MgCl_2$, 1mM $CaCl_2$, 5mM β -巯基乙醇, 0.1mM PMSF, 0.25M 蔗糖。

III. 0.05M Tris-HCl, pH7.9, 5mM $MgCl_2$, 0.1mM EDTA, 5mM β -巯基乙醇, 0.1mM PMSF, 25% 甘油。

IV. 0.01M Tris-HCl, pH7.9, 0.1mM PMSF。

3. 大肠杆菌 RNA 聚合酶的提取

参考 Burgess (1969), Mangel (1974) 等方法。大肠杆菌 *E. Coli* K12 在 1.6% 蛋白胨, 1% 牛肉膏, 0.5% 氯化钠, pH7.2—7.5, 37°C 培养 16 小时, 用连续离心机收集菌体。—20°C 保存。每 200 克菌体加 300 毫升缓冲液 A, 在冰盐浴中超声波破碎菌体, 用 MSE-40 离心机, 2406 号转头, 25,000 转/分离心 45 分钟, 以除去细胞碎片, 上清液加固体氯化钾达 0.3M 浓度, 每 10 毫升上清液加 0.23 克 (湿重) 已经处理并用含 0.3M KCl 浓度缓冲液 A 平衡的 DEAE-纤维素, 0—4°C 搅拌 20 分钟, 同样于 13,000 转/分离心 10 分钟。上清液加固体硫酸铵, 取 33% 及 50% 饱和度硫酸铵沉淀部分溶于缓冲液 B, 再加硫酸铵达 42% 饱和度, 离心, 沉淀溶于缓冲液 B, 接着上 DEAE-纤维素柱 (柱预先用缓冲液 B 平衡, 2 × 50 厘米) 用 0.13M KCl 的缓冲液 B 洗柱至洗出液 $A_{280} < 0.1$, 最后用含 0.23M KCl 的缓冲液 C 洗脱, 收集含酶蛋白部分, 加固体硫酸铵到 50% 饱和度, 离心收集沉淀, 用少量储存液溶解、于 —20°C 保存。

4. 脱氧核糖核酸酶活力测定

总反应体积 100 微升中含小牛胸腺 DNA 20 微克, 0.04M Tris-HCl, pH7.9, 0.01M $MgCl_2$, 0.1mM EDTA, 12mM β -巯基乙醇, 0.15M KCl, 0.8mM K_2HPO_4 , 0.5 毫克/毫升牛血清白蛋白, 加入 0.001—1 微克/毫升牛胰脱氧核糖核酸酶 (E. Merck 产品)。37°C 保温 30 分钟后加 1.5 毫升 10% 三氯醋酸, 置于冰浴中 5 分钟后离心, 取上清液于 260 毫微米测定吸光率 (A_{260})。

5. 核糖核酸酶活力测定

参考 Roth (1976) 的方法, 稍作改进, 0.2 毫升 1% 酵母总 RNA 溶液 (B. D. H 产品, 配在缓冲液 B 中) 与 0.1 毫升含 5—45 毫微克不同量的牛胰核糖核酸酶 (东风生化试剂厂产品) 或 RNA 聚合酶于 37°C 保温 30 分钟后, 加 0.3 毫升沉淀剂 (120 毫升浓盐酸, 80 毫升水, 5 克醋酸镧, 加 95% 乙酸至 1 升) 置冰浴 10 分钟后离心, 取上清液稀释 30 倍测 A_{260} 。

6. RNA 聚合酶活力测定

参照细胞所三室 (1977) 的方法, 略加改变。100 微升反应体积中含 0.04M Tris-HCl, pH7.9, 10mM $MgCl_2$, 0.1mM EDTA, 12mM β -巯基乙醇, 150mM KCl, 0.8mM K_2HPO_4 ,

1mM MnCl_2 , 50mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4mM 磷酸肌酸, 2 微克肌酸激酶。UTP, GTP, CTP, ATP 各 0.15mM, ^3H -ATP 1.5 微升 (比放射: 20Ci/mM), 小牛胸腺 DNA 10—40 微克, 适量的大肠杆菌 RNA 聚合酶。37°C 保温 30 分钟, 取 40 微升点于 DE-81 滤纸片上 (ϕ 2.3 毫米), 投入冷 10% 三氯醋酸 (内含 0.02M 焦磷酸钠), 固定 1 小时后, 将滤纸片放入冰冷的 5% 三氯醋酸 (含 0.01M 焦磷酸钠) 溶液中洗 5—6 次, 再分别以 95% 乙醇与乙醚 (乙醇: 乙醚 = 1:1) 各洗一次, 干燥, 放入 0.4% PPO 及 0.01% POPOP 的二甲苯闪烁液中, 用液体闪烁计数器 (NE8312) 测定。

7. 家蚕及蓖麻蚕后丝腺染色质的分离

5 龄 4 天家蚕或蓖麻蚕解剖取出后丝腺, 在冰冷的含 0.1mM PMSF 的生理盐水中洗涤, 用滤纸吸干后即投入干冰中冷冻, -20°C 保存。实验均在 4°C 以下进行, 每次用约 100 对后丝腺, 每 5 克湿重后丝腺加 50 毫升缓冲液 I 于 MSE 匀浆器匀浆 1 分钟。匀浆液经一层尼龙布过滤, 滤渣加 20ml 缓冲液 II 继续匀浆 30 秒, 再过滤, 滤渣加少量缓冲液 II 在研钵中研磨, 过滤。三次滤液合并后于 3,000 转/分离心 15 分钟。沉淀加适量缓冲液 II, 用玻棒分散均匀, 再通过一层尼龙布及一层尼龙绢纱过滤, 滤液加 Tritonx-100 至最后浓度达 0.5%, 轻轻搅拌 10 分钟, 于 3,000 转/分离心 15 分钟, 沉淀加少量缓冲液 II 在松的玻璃匀浆器中制成悬浮液, 加含 2.2M 蔗糖缓冲液 I, 使混合液中蔗糖的浓度达 2.0 M, 每 35 毫升该悬浮液加在盛有 30 毫升的 2.2M 蔗糖缓冲液 I 的离心管内, 于 MSE-75 离心机, 2,000 转/分离心 60 分钟 (SW24), 核部分沉于管底部, 小心吸去二层蔗糖液, 用滤纸擦净管壁。用缓冲液 III 小心冲洗沉淀表面, 用玻棒轻轻悬浮沉淀, 取少许作涂片染色, 观察核部分。核悬液用 20 倍体积缓冲液 III 洗涤二次 (5,000 转/分, 15 分钟), 用 20 倍体积缓冲液 IV 洗一次, 放入缓冲液 IV 中过夜, 再用缓冲液 IV 洗涤已胀破的核 5—6 次, 每次用 20 倍体积缓冲液 IV (10,000 转/分 $\times$ 15 分钟), 最后染色质沉淀用松的玻璃匀浆器制成匀浆, 得到的染色质悬浮液呈白色胶冻状。

8. 染色质的化学组分分析

参照 Spelsberg (1971) 等方法, 一定量的悬浮液用 0.25N HCl 4°C 搅拌抽提二次, 以提取组蛋白, 沉淀部分经 5% 过氯酸 95°C 抽提 60 分钟, 离心后清液用二苯胺法测 DNA, 沉淀部分溶于 0.2N NaOH, 测非组蛋白。蛋白质用 Lowry 法测定。RNA 量用 0.3N KOH 37°C 抽提染色质一小时后离心, 清液加过氯酸酸化至 0.3N, 用地衣酚试剂测定。

9. SDS 聚丙烯酰胺电泳

按 Liew (1975) 的方法, 分离胶浓度为 18% (丙烯酰胺: 次甲基二丙烯酰胺 = 30: 0.15), 缓冲液为 0.75M Tris-HCl, pH8.8, 含 1% SDS。浓缩胶浓度 3% (丙烯酰胺: 次甲基二丙烯酰胺 = 10: 0.5), 板为 10 $\times$ 10 $\times$ 0.2 厘米。电泳缓冲液为 0.05M Tris-HCl, pH8.3, 含 1% SDS。蛋白样品约 2 毫克/毫升, 溶于 pH7.0, 0.01M 磷酸缓冲液, 含 1% β -巯基乙醇, 1% SDS。电泳前样品在沸水浴中处理 3 分钟。组蛋白电泳样品量为 30 微克, 染色质电泳样品为 120 微克。电泳条件为 40 毫安/板, 7 小时。电泳完毕后凝胶板置于 10% 冰醋酸、50% 乙醇中固定过夜, 用考马斯亮蓝染色 (0.2 克染料溶于 100 毫升 10% 乙酸 50% 乙醇中) 4—8 小时, 于固定液中褪色。用人血清白蛋白, 纯化的免疫球蛋白, 细胞色素 C 作标准蛋白质。

10. 家蚕及蓖麻蚕后丝腺染色质转录活性的测定

用方法 6, 以染色质取代小牛胸腺 DNA 作为样板, 在保温过程中间歇振荡反应管。

结 果

1. RNA 聚合酶活力测定

按上述方法抽提的 RNA 聚合酶, 在一定条件下, 以小牛胸腺 DNA 为样板, 促进标记的核苷酸的离体参入, 参入的活性依赖于 DNA 量, 酶量、能量、能量再生系统及二价金属离子。(见图 1 及表 1)

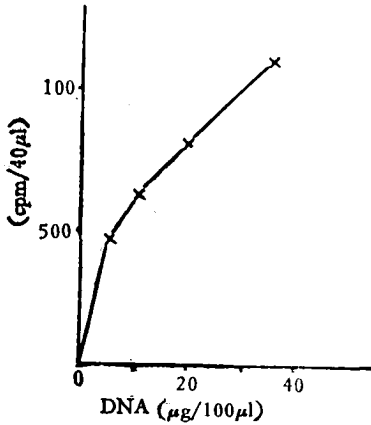


图 1 DNA 量与标记核苷酸参入关系
(完整体系 37°C 保温)

2. 家蚕及蓖麻蚕后丝腺染色质的组成分析

(1) 全波测定 将分离的后丝腺染色质溶于 0.05 M 磷酸缓冲液, pH7.6, 内含 5M 尿素, 2.5M NaCl, 0.1mM PMSF, 于 230—320 毫微米波长范围内测得其全波波型与鼠肝染色质 (Bonner, 1968) 的全波图形相似 (见图 2 和 3)。两种蚕后丝腺染色质的吸收低峰波长约为 240 毫微米, 而制备的蓖麻蚕后丝腺核 DNA 的吸收低峰为 230 毫微米。A₂₃₀/A₂₆₀ 及 A₃₂₀/A₂₆₀ 的比值见表 2, 它表明分离的染色质的紫外吸收光谱符合染色质的特性。

(2) 染色质的组成分析 家蚕及蓖麻蚕后丝腺染色质的组蛋白、非组蛋白、RNA 量与 DNA 量的相对比值见表 3。家蚕后丝腺染色质的非组蛋白量比高等动物的染色质中非组蛋白的量高。蓖麻蚕的后丝腺染色质的化学组分与高等动物染色质相近。但两种蚕的后丝腺染色质的 RNA 含量稍高。这可能是与 5 龄期蚕后丝腺正处在大量合成丝心蛋白的特性有关。

(3) 后丝腺染色质组蛋白, 非组蛋白电泳图谱分析 蚕后丝腺染色质及鼠肝染色质经 0.25N HCl, 于 4°C 搅拌抽提二次 (每次 1 小时), 离心, 上清液加 9 倍体积丙酮沉淀。

表 1 反应物对参入的影响

系 统	活力(%)
完整系统 37°C 保温	100
完整系统 25°C 保温	101
减去 RNA 聚合酶	0
减去小牛胸腺 DNA	0
减去 K ₂ HPO ₄	138
减去 MnCl ₂	70.2
减去 (NH ₄) ₂ SO ₄	58.6
减去 ATP, GTP, CTP, UTP	5.9
减去 CP-CPK	8.5
减去 DNA + 酵母 tRNA	1.2
完整系统 + 利福霉素	0.3

注: 小牛胸腺 DNA 20μg, 酵母 tRNA 5μg, 利福霉素
浓度 0.05mg/ml

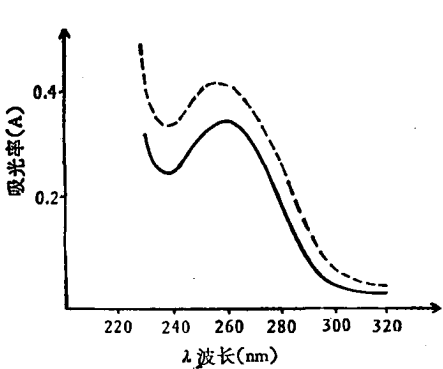


图 2 家蚕后丝腺染色质全波图形

—— 鼠肝染色质 - - - 家蚕后丝腺染色质

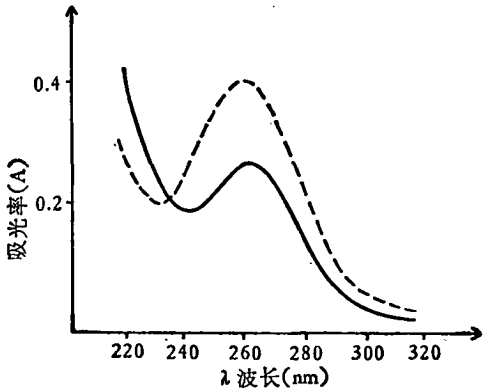


图 3 蓖麻蚕后丝腺染色质全波图形

—— 蓖麻蚕后丝腺核 DNA
—— 蓖麻蚕后丝腺染色质

表 2 染色质紫外吸收比值

染色质来源	A_{230}/A_{260}	A_{320}/A_{260}
	A_{230}	A_{320}
家蚕后丝腺染色质	0.95	0.06
蓖麻蚕后丝腺染色质	0.93	0.02
鼠肝染色质	1.0	0.1
家蚕后丝腺染色质 (Sridhara 法)	1.0	0.12

表 3 染色质组分分析

染色质来源	DNA	组蛋白	非组蛋白	RNA
		DNA	DNA	DNA
家蚕后丝腺	1	1.03—1.16	1.6—1.8	0.14—0.16
蓖麻蚕后丝腺	1	0.90—0.97	0.95—1.02	0.14—0.18
家蚕后丝腺 (Bonner 法)	1	1.9	4.7	0.97
家蚕后丝腺 (Sridhara 法)	1	1.1	2.4	0.19
鼠 肝	1	1.15	0.93	0.04

收集组蛋白,经丙酮洗涤后干燥。组蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱见图 4。由图可见,蓖麻蚕后丝腺染色质组蛋白 H_2A , H_2B , H_3 , H_4 分辨较好,家蚕染色质 H_2A 、 H_2B 分辨较差,4 种来源的染色质组蛋白 H_1 的电泳相差较大。

图 5 为家蚕及蓖麻蚕染色质蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺电泳图谱, 初步分析表明蚕的后丝腺染色质蛋白带约有 30 多条,其中部分蛋白分子量范围小于 30,000,大部分蛋白的分子量低于 70,000。

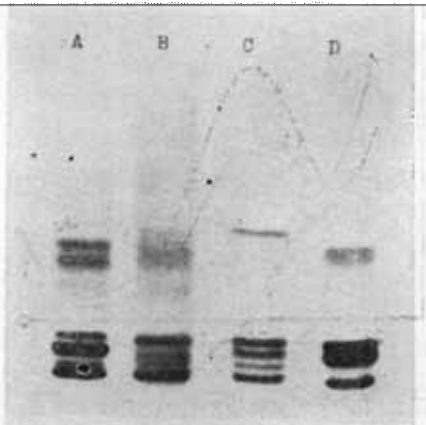


图 4 不同来源染色质组蛋白电泳图谱
A. 鼠肝染色质 B. 家蚕后丝腺染色质
C. 蓖麻蚕后丝腺染色质 D. 小牛胸腺染色质

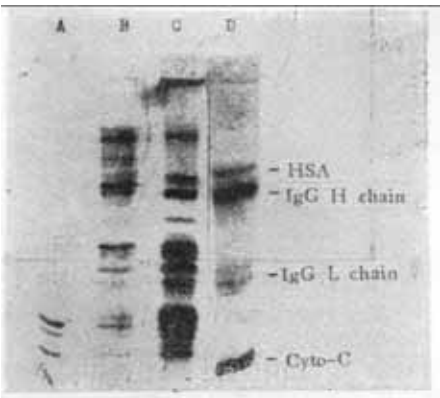


图 5 染色质蛋白电泳图谱
A. 蓖麻蚕后丝腺组蛋白 B. 家蚕后丝腺染色质蛋白
C. 蓖麻蚕后丝腺染色质蛋白 D. 标准蛋白

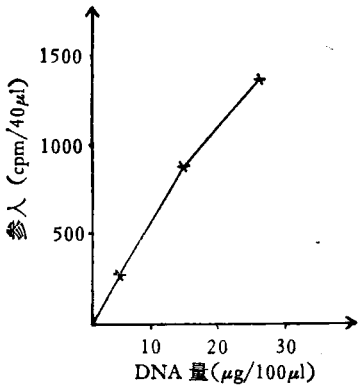


图 6 家蚕后丝腺染色质 DNA 与 ^3H -ATP 参入的关系

表 4 反应液各组分对家蚕及蓖麻蚕后丝腺染色质 ^3H -ATP 参入的影响

系 统	家蚕活力 (%)	蓖麻蚕活力 (%)
完整系统 37℃ 保温	100	—
完整系统 25℃ 保温	85.3	100
减 染色质	0	0
减 MnCl_2	69.5	56
减 CP、CPK	15.1	16
减 CP、CPK TP	11.5	6.8
加 利福霉素	6.8	未测
减 染色质、加后丝腺总 RNA	0.4	未测

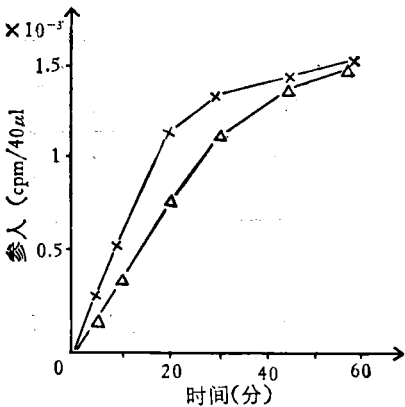


图 7 不同温度家蚕后丝腺染色质的 ^3H -ATP 参入时间曲线
× 37℃ Δ 25℃

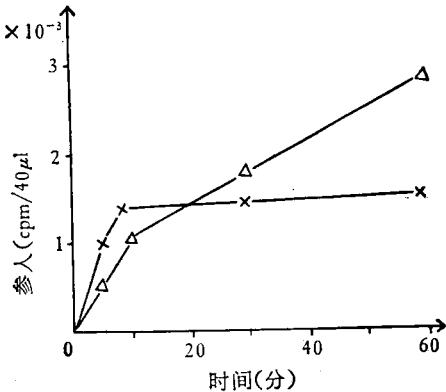


图 8 不同温度蓖麻蚕后丝腺染色质的 ^3H -ATP 参入时间曲线
× 37℃ Δ 25℃

(4) 后丝腺染色质的转录活性 按本文方法分离的家蚕及蓖麻蚕后丝腺染色质, 在大肠杆菌 RNA 聚合酶作用下, 可以促进标记核苷酸的参入。参入量依赖于染色质的 DNA 量、二价离子、能量及能量再生系统 (见图 6 和表 4)。不同温度下的参入时间曲线 (见图 7 和 8) 表明, 家蚕后丝腺染色质, 37°C 参入反应的初速度大于 25°C , 保温 60 分钟两者参入量相近。蓖麻蚕后丝腺染色质的参入初速度 37°C 亦大于 25°C , 但前者在 10 分钟内达平值, 因此在保温 60 分钟时 25°C 的参入约为 37°C 参入的一倍。

讨 论

1. 本文参照 Suzuki (1976) 的方法, 用高浓度 KCl 使 DNA 与 RNA 聚合酶解离, 代替 Burgess 用 DNase I 处理菌液的方法, 目的是避免外源核酸酶污染聚合酶, 分离的酶中两种核酸酶的含量均极微。从图 1 及表 2 和 3 可见分离的酶能依赖外源 DNA 或染色质样板而促进标记核苷酸的参入。反应系统依赖于能量和能量再生系统及 Mn^{++} , 在上述系统中外源的总 RNA, tRNA 几乎不能促进参入。

当系统中除去 K_2HPO_4 时, 则参入增加, 可能是由于多核苷酸磷酸化酶利用核苷二磷酸为底物刺激“假参入”。分离的酶蛋白可水解 ^{125}I 标记的线状 DNA。因此, 酶应进一步纯化。

2. 不同组织的染色质分离采用不同的方法, 彼此不能通用。在昆虫类中, 除对果蝇的研究较多外, 其他来源的染色质分离及其性质的研究报道不多。Suzuki (1976) 等用光学显微镜观察家蚕幼虫生长周期中其后丝腺细胞核的变化。蚕在 5 龄时, 其核已呈分枝状, 散布在胞浆中, 不能分离到完整的核。又由于 5 龄期蚕后丝腺细胞合成大量的丝心蛋白, 它在空气中即形成不溶解的纤维状凝块。Sridhara (1977) 报道丝蛋白凝块能与与膜结合的核糖核蛋白结合, 也能与粗内质网、分枝状核颗粒等结合, 使染色质难以分离。因此, 在含有非离子型去垢剂 Tritonx-100 及离子型去垢剂去氧胆酸钠的缓冲液中, 用大量胶原酶处理家蚕后丝腺, 再用玻璃匀浆器匀浆, 匀浆液通过线性蔗糖密度梯度超离心, 并用 Bonner 分步洗涤的方法分离家蚕后丝腺染色质。因胶原酶来源困难, 我们改用简便的 MSE 匀浆器, 以分散丝心蛋白, 经尼龙布及尼龙绢纱过滤, 可除去蛋白块及细胞碎片。然后用 Reeder (1973) 的方法, 经蔗糖分级超离心分离的核部分, 制成涂片用苏木素染色后, 在光学显微镜下, 只见深紫色的大小不均的球状颗粒, 观察不到胞浆部分。核颗粒在低渗溶液中胀破而经洗涤分离得到的染色质, 其紫外光谱特性及化学成分符合染色质的基本特性。家蚕及蓖麻蚕后丝腺染色质的化学组分的分析表明, 我们所采用的方法, 分离的家蚕后丝腺染色质与 Sridhara 分离结果基本相同, 而优于 Bonner 方法分离的结果。我们用相同方法分离的蓖麻蚕后丝腺染色质, 也得到较满意的结果。分离的蓖麻蚕染色质用电镜观察 (靳加瑞等, 1979) 表明, 仍保留天然的串珠状高级结构及核小体。

3. 蚕的后丝腺染色质的组蛋白电泳分析表明, 所分离的染色质中 5 种组蛋白均存在。由 Sridhara (1977) 分离的家蚕后丝腺染色质的组蛋白电泳分析只显示 H_1 , H_2A , H_3 , H_4 4 种成分。蚕后丝腺染色质组蛋白 H_1 的迁移率比小牛胸腺及鼠肝染色质 H_1 小, 与 Sridhara (1977) 的结果相同。家蚕的 H_2A , H_2B 的迁移率与蓖麻蚕的稍有不同, 可能与组蛋白的化学修饰有关。

蚕的后丝腺染色质非组蛋白成分比哺乳动物的复杂。因此,我们正试图进一步分离染色质非组蛋白成分,并研究其对转录活性的影响。

4. 所分离的家蚕及蓖麻蚕后丝腺染色质在外源 *E. Coli* RNA 聚合酶作用下可刺激标记 ATP 参入,反应依赖于能量、能量再生系统和 Mn^{++} , 并受利福霉素抑制。

不同温度下参入的时间曲线表明,以家蚕后丝腺染色质为样板,37°C 时参入在 20 分钟内呈直线,25°C 时参入在 30 分钟内呈直线,1 小时后两者参入相近。而当用蓖麻蚕后丝腺染色质为样板时,1 小时 25°C 的参入为 37°C 的一倍。这似乎同家蚕与蓖麻蚕后丝腺的不同特性有关。利福霉素对蓖麻蚕后丝腺染色质的参入抑制为 50% 左右,由于利福霉素主要抑制 RNA 合成的起始,这表明约一半的参入是 RNA 链的延长。

参 考 文 献

- 上海实验生物研究所三室细胞研究组 1977 大肠杆菌中依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶的提取。生物化学与生物物理进展 1977 (6):6—9。
- Bonner, J. et al. 1968 Isolation and characterization of chromosomal nucleoproteins. *Methods in Enzymology*, XII, pt B: 3—65.
- Burgess, R. R. 1969 A method for the large scale purification of *E. coli* DNA-dependent RNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, **244**: 6160—7.
- Chiu, J. F. and Hnilica, L. S. 1977 Nuclear nonhistone proteins: chemistry and function. *Chromatin and Chromosome Structure* (Li, H. J. and Eckhardt, eds.): 193—254. Academic Press, New York.
- Liew, C. C. 1975 A biochemical study on nonhistone proteins, by Suria, D. Thesis, University of Toronto.
- Mangel, W. F. 1974 Initial steps in the large scale purification of *E. coli* DNA-dependent RNA polymerase. *Archiv. Biochem. Biophys.*, **163**: 172—7.
- O'Malley, B. W. et al. 1976 Molecular mechanisms in the control of gene expression. *ICN-UCLA Symposia Mol. Cell. Biol.*, Vol. 5 (Nierlich, D. P., Rutter, W. J. and Fox, C. F., eds.): 309—29.
- Reeder, R. H. 1973 Transcription of chromatin by bacterial RNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, **80**: 229—41.
- Roth, J. S. 1967 Some observations on the assay and properties of ribonucleases in normal and tumour tissues. *Methods in Cancer Research*, III: 153—242.
- Spelsberg, T. C. et al. 1971 Progesterone-binding components of chick oviduct. *J. Biol. Chem.*, **246**: 4188—97.
- Sridhara, S. et al. 1977 Preparation and properties of chromatin from the silk glands of the silkworm *Bombyx mori*. *Eur. J. Biochem.*, **75**: 107—119.
- Sridhara, S. et al. 1977 RNA polymerase and RNA synthesis in the silk glands of the silkworm *Bombyx mori*. *Eur. J. Biochem.*, **72**: 331—9.
- Suzuki, Y. 1976 Fibroin messenger RNA and its genes. *Adv. Biophys.*, **8**: 83—114.
- Suzuki, Y. et al. 1976 Accentuated expression of silk fibroin genes *in vivo* and *in vitro*. *J. Mol. Biol.*, **107**: 183—206.

CHROMATIN FROM THE POSTERIOR SILK GLANDS OF *BOMBYX MORI* AND *PHYLOSAMIA CYNTHIA RICINI*: PURIFICATION AND CHARACTERIZATION

ZHANG XIAN-YANG TUNG LIN LIU FENG DU DUANG-JIE

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica)

The purification and characterization of chromatin from the posterior silk gland of two species of silkworm—*Bombyx mori* and *phyllosamia cynthia ricini*—were described. These were taken from the worms on the fourth day of the fifth larval instar. The results showed that the chemical composition and ultraviolet spectra of chromatins thus obtained were similar to those of chromatins from higher eucaryotes. The electrophoretic patterns of chromatin proteins including histones from the two species of silkworm were compared. The chromatin isolated could stimulate the *in vitro* incorporation of isotopically labelled ATP when exogenous *E. coli* RNA polymearse was added. The relationship between the incorporation of labelled ATP and the DNA content of chromatin and the influence on incorporation *in vitro* of such factors as available energy regeneration systems, Mn^{++} , rifamycin and others were studied. *In vitro* incorporation time curves for the two chromatins at 25°C and 37°C were compared.