

关于染色体骨架的研究

郝 水

(东北师范大学生物系, 长春)

近 10 多年来关于染色质和染色体超微结构的研究有了很大进展。70 年代发现的核小体 (nucleosome) 已被证明是真核生物染色质和染色体的基本结构单位^[1-5]。这一发现为染色体的超微结构研究奠定了坚实基础。70 年代后期, 一些作者在去除组蛋白的中期染色体中看到由非组蛋白蛋白质 (nonhistone protein, NHP) 构成的骨架 (scaffold) 结构^[6-9], 也引起了广泛重视^[10,11]。对这种骨架结构虽然已从不同角度做过许多研究, 但关于它是否是染色体中的真实结构, 迄今意见还是分歧的。本文的目的是对染色体骨架研究的进展做一概要评述, 结合我们的研究结果, 对骨架的真实性和骨架的成分, 以及它和染色体高层次结构的关系等问题做一些讨论。

一、染色体轴与骨架

在 1977 年 Laemmli 等发现染色体骨架之前, Stubblefield 和 Wray (1971) 用超声波、2mol/L NaCl 或 6mol/L 尿素处理离体的中国仓鼠染色体, 消化染色体的成分 (DNA 和蛋白质), 最后看到剩下一一种带状结构, 称为染色体轴。被消化的染色体部分称为表染色质 (epi-chromatin)^[12]。当时由于大量研究染色体的工作都未看到轴结构, 所以染色体中是否真有轴存在还难以确定^[4]。

染色体的成分中除 DNA 和组蛋白外还含有相当多的 NHP^[4,11], NHP 在染色体结构中起什么作用长期缺乏了解。70 年代后期, Laemmli 及其同事^[6-8]提出了非组蛋白骨架假说。他们用 2mol/L 的 NaCl 溶液或硫酸葡聚糖加肝素处理 Hela 细胞中期染色体, 除去组蛋白和大部分 NHP 后, 在电泳铺展标本中看到染色体骨架和由骨架伸展出无数 DNA 侧环组成的晕圈。大多数 DNA 侧环长约 10—30 μ m (约 30000—90000 核苷酸对)。先用 DNA 酶消化中期染色体再进行脱组蛋白处理仍可看到骨架结构。如用胰蛋白酶消化则骨架消失。根据以上实验结果认为骨架是由 NHP 组成。

Howell 和 Hsu 用低渗溶液处理哺乳动物和人的中期染色体, 使“表染色质”松散, 用硝酸银染色, 在光镜下看到贯穿于每条染色单体的中央都有一条被染成黑褐色的染色体轴, 而其周围的“表染色质”染成浅黄色。DNA 酶和 RNA 酶处理或用 0.4mol/L H₂SO₄ 处理去除组蛋白都不能阻止染色体轴的银染, 但用胰蛋白酶消化则银染轴完全消失或银染程度大减。因此说明染色体轴是由 NHP 组成的^[13]。Hsu 及其同事们在减数分裂染色体中也得到了类似的实验结果^[14,15], 从而支持了非组蛋白骨架假说。

为了查明染色体的非组蛋白骨架和银染轴的关系, Earnshaw 和 Laemmli (1984) 从

本文 1989 年 8 月 4 日收到。

Hela 细胞中期染色体分离出骨架,使之沉淀在铜网的碳膜上,用硝酸银染色,结果在电镜下看到骨架被银染很浓。分离的骨架样品经电泳分析不含组蛋白。因此作者认为非组蛋白骨架是染色体中的主要银染对象,即银染轴大体相当于非组蛋白骨架^[16]。

二、染色体骨架的真实性

Comings 和 Okada^[17,18] 认为染色体中的 NHP 容易凝聚,因此怀疑 Laemmli 及其同事看到的非组蛋白骨架可能是在去除组蛋白过程中使 NHP 凝聚而成的人工假象。他们对离体的中国仓鼠染色体进行适度的分散处理,然后去除组蛋白,结果看不到骨架结构,而未经前分散处理的样品在电镜下看到了类似 Laemmli 等看到的骨架。因此他们认为骨架是一种假象。Hadlaczky 等也提出了类似的怀疑,并做了不同的验证实验^[19]。为了防止在抽取组蛋白过程中染色体的 NHP 凝聚,他们在 2mol/L NaCl 溶液中加入 5% 蔗糖。后者可以防止 NHP 凝聚。结果只看到非常松散的线状结构,其周围是由 DNA 纤维构成的晕圈。如果在提取液中不加蔗糖则可看到类似 Laemmli 等展示的骨架结构。因此他们也认为 Laemmli 等看到的骨架是由于 NHP 人为凝聚的结果。

此外, Burkholder 等指出,通过银染显现的染色体轴也是制片过程造成的人工假象。他们认为由于低渗处理使染色体周边区的染色质松散膨胀,而中央的染色质仍保持较高密度,所以银染时中央部位出现了类似轴样结构。他们认为细胞的银染物质不仅是蛋白质,而且还有 DNA。他们看到提纯的 DNA 也能被银染^[20-22]。

无论主张染色体中存在骨架或轴的作者,还是认为骨架或轴都是人工假象的作者,他们依据的实验结果都是来自经各种处理破坏了的染色体。迄今在完整染色体的超薄切片上尚未看到相当于骨架的结构存在。这也是一些作者怀疑染色体骨架或轴是真实结构的一个重要原因^[18,22]。我们应用常规电镜技术观察高等植物完整染色体的超薄切片,在横切面和纵切面上都看到其中分布有大小不等的电子透明区,称之为无染色质区(chromatin-free compartment, CFC)或孔洞。在染色体的横切面上中央部位的 CFC 较大,而周边部位的 CFC 较小(图 1)。

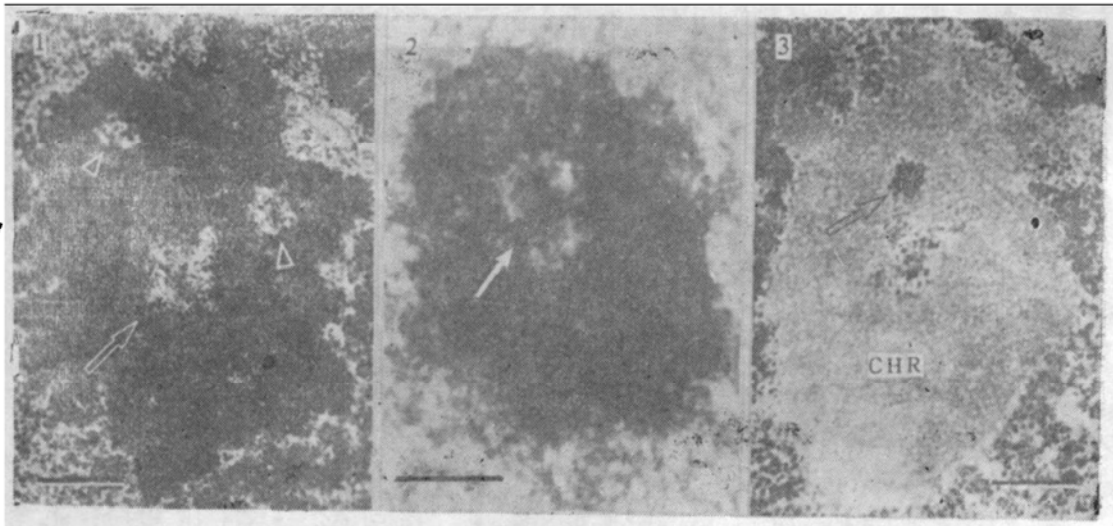


图 1—3

1. 洋葱染色体的横切面,示中央 CFC (箭头)和周边 CFC (三角箭头),以及其中的纤维和颗粒状结构。
2. 蚕豆染色体的横切面,PTA 染色,可见在中央 CFC 中的结构染色很深(箭头),表明它含有蛋白质。
3. 蚕豆染色体的横切面,按 Bernhard 技术染色,染色体中的浓缩染色质(CHR)被漂白,而浓染的 RNP 物质位于中央部位(箭头)。标尺为 0.3 μ m

在一些中央 CFC 和周边 CFC 中存在着由纤维和颗粒形成的结构。电镜细胞化学观察表明,这种结构的成分是由蛋白质和 RNA 组成的(图 2、3)^[23,24]。这一结果有利于说明,在植物完整染色体中确实存在一种由蛋白质组成的类似于骨架的结构,在这种结构中还含有 RNA。

此外,我们对红翅皱膝蝗 (*Angaracris rhodopa*) 减数分裂染色体所做的实验观察表明,在 0.075mol/L KCl 中低渗处理后用硝酸银染色的二价体,可见每条染色体的中央都显示出银染的轴结构。用胰蛋白酶消化则银染轴消失,说明染色体轴主要由蛋白质组成。同时不经低渗处理的染色体中也可看到银染的轴结构,因此轴结构的出现不能用由于低渗处理而引起的染色质密度差来解释*。

三、染色体骨架的成分

组成染色体骨架的成分主要是 NHP。按 Laemmli 及其同事的分析,构成人的染色体骨架的 NHP 大约有 30 种。骨架中不含组蛋白。同时骨架对 RNA 酶处理不敏感^[6]。在染色体骨架的 NHP 中有两种主要蛋白质,即 SC1(170kd) 和 SC2(135kd)。它们构成骨架全部蛋白质在 40% 以上。据 Lewis 和 Laemmli 的报告,含 Cu^{2+} 的金属蛋白在保持骨架的完整性,以及它与周围 DNA 的连结上,都起重要作用^[25]。

Hadlaczký 等^[19]虽然怀疑 Laemmli 等看到的骨架的真实性,但他们认为染色体中可能有某种核心结构,以维持染色体的形态。这种结构的成分中即有 NHP,也有少量 DNA。他们看到,去除组蛋白的染色体骨架呈细纤维连成的网络。如用 DNA 酶原位消化,则骨架结构变成不连续的,即由断续的细纤维和颗粒状结构组成。据此他们认为,在染色体骨架成分中除 NHP 外还有 DNA。

如上所述,我们对高等植物完整染色体超薄切片所做的细胞化学观察表明,染色体骨架中除蛋白质外还有 RNA。

这样,迄今的研究都说明染色体骨架的主要成分是 NHP。但有的实验表明其中还有 DNA 或 RNA。

四、染色体骨架与核基质

近年来关于核基质 (nuclear matrix) 的研究有了很大进展。已有一些工作说明核基质和基因转录、DNA 复制都有密切关系^[26,27]。它的纤维网络为这些活动提供了空间的支架。为了研究染色体骨架和核基质的关系, Matsui 等分析了中国仓鼠核基质和染色体骨架的蛋白质成分^[28]。通过 DNA 酶消化和低盐、高盐等处理除去 DNA 和组蛋白后,看到除某些与核糖核蛋白相结合的染色体 NHP 存在差别外,核和染色体中的 NHP 电泳谱带总的来看是基本相同的。在染色体中没有发现有丝分裂特有的 NHP。染色体骨架中残存的主要成分是分子量约为 55000 的多肽。核基质中的三种主要多肽成分只有一种(分子量为 66000)存在于染色体骨架中。另外两种多肽可能与间期核的功能活性有关。

这一分析结果有助于说明染色体骨架中的 NHP 来自核基质。

关于核基质的结构在有丝分裂时转变为染色体骨架的过程现在还缺乏研究资料。Bekers 等曾对粘菌 (*Physarum polycephalum*) 有丝分裂周期中核基质的超微结构变化做过一些观

* 赵健军等,实验生物学报(待发表)。

察,根据核基质的结构,在前期、中期和后期的分布与染色体的部位有明显的关联性,推测核基质的结构成分在有丝分裂前期改组成染色体骨架^[29]。

五、骨架与染色体高层次结构

关于染色体骨架和染色体高层次结构的关系, Marsden 和 Laemmli 提出了放射环模型(radial loop model)。他们认为染色体是由直径约 30nm 的染色质纤维以骨架或轴为中心向周围放射状伸出的侧环集缩成的^[30]。按此模型在 30nm 染色质纤维和染色体之间没有另外的高层次结构。Marsden 等提出的实验证据是,经过人工处理使染色体膨胀后固定并制备超薄切片,在染色体横切面上看到由染色体的中央向四周放散出直径 30nm 或 10nm 左右的染色质纤维^[30,31]。如果固定前使染色体轻度膨胀则看到的是直径 30nm 左右的染色质纤维(相当于螺线管, solenoid);如果固定前使染色体更大程度地膨胀,则看到散出的是直径约 10nm 的染色质纤维(相当于核小体串连成的核丝, nucleofilament),即螺线管结构已解体成核丝。对于 Marsden 等的实验结果,人们提出的质疑是固定前使染色体膨胀的人工处理是否破坏了本来存在的比 30nm 染色质纤维更高层次的结构^[32]。近年来一些作者和我们的观察都表明,中期染色体中存在 200—400nm (在人和哺乳动物)或 400—600nm (在一些高等植物)左右的染色线,它们螺旋缠绕形成中期染色体^[32-35],从而证明早期提出的螺旋模型^[36]是正确的。

螺旋模型和染色体骨架假说并不是互相排斥的^[37]。染色体的螺旋结构需要另外的结构使之稳定化,而染色体骨架的网络成分有可能对于各级染色线的螺旋起某种维持作用。

六、结 语

关于染色体骨架的真实性虽然有各种怀疑,但综观上述研究进展,我们认为染色体中确实存在相当于骨架的,主要由 NHP 构成的网络结构。一些资料说明,染色体骨架可能来自核基质。今后的研究如能阐明有丝分裂前期核基质转变为染色体骨架的过程和末期时染色体骨架重新参加新的核基质的形成过程,将有助于全面理解核基质与染色体骨架的关系。同时也将揭示这一周期性变化是细胞周期运行的重要内容之一。

关于染色体骨架的研究时间还不长,许多疑难问题的解决还有待进一步的实验探查。但没有疑问,这个领域研究的进展对于理解染色体的超微结构、染色体的组装机制和染色质在有丝分裂周期中有规律地集缩和解集缩等细胞生物学的基本问题将起到重要作用。

参 考 文 献

- [1] Olins, A. L. & Olins, D. E., *J. Cell Biol.*, 59(1973), 252a.
- [2] Olins, A. L. & Olins, D. E., *Science*, 183(1974), 330—332.
- [3] Kornberg, R., *Science*, 184(1974), 868—871.
- [4] Bostock, C. J. & Sumner, A. T., *The Eukaryotic Chromosome*, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1978, 140—165.
- [5] van Holde, K. E., *Chromatin*, Springer Series in Molecular Biology, Springer-Verlag, New York, 1988, 219—354.
- [6] Adolph, K. W. et al., *Cell*, 12(1977), 805—816.
- [7] Paulson, J. R. & Laemmli, U. K., *Cell*, 12(1977), 817—828.
- [8] Adolph, K. W. et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 74(1977), 4937—4941.
- [9] Laemmli, U. K. et al., *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.*, 42(1978), 109—118.
- [10] Brachet, J., *Molecular Cytology*, Vol. 1, The Cell Cycle, Acad. Press, Orlando, 1985, 289—296.
- [11] Darnell, J. et al., *Molecular Cell Biology*, Scientific American Books, Inc., New York, 1986, 383—395.

- [12] Stubblefield, E. & Wray, W., *Chromosoma*, 32(1971), 262—294.
- [13] Howell, W. M. & Hsu, T. C., *Chromosoma*, 73(1979), 61—66.
- [14] Pathak, S. & Hsu, T. C., *Chromosoma*, 70(1979), 195—203.
- [15] Satya-Prakash, K. L. et al., *Chromosoma*, 81(1980), 1—8.
- [16] Earnshaw, W. C. & Laemmli, U. K., *Chromosoma*, 89(1984), 186—192.
- [17] Comings, D. E. & Okada, T. A., *J. Cell Biol.*, 83(1979), 150a.
- [18] Okada, T. A. & Comings, D. E., *Am. J. Hum. Genet.*, 32(1980), 814—832.
- [19] Hadlaczky, G. et al., *Chromosoma*, 81(1981), 537—556; 557—567.
- [20] Burkholder, G. & Kaiserman, M. Z., *Can. J. Genet. Cytol.*, 24(1982), 193—199.
- [21] Zheng, H. Z. & Burkholder, G., *Exp. Cell Res.*, 141(1982), 117—125.
- [22] Burkholder, G., *Exp. Cell Res.*, 147(1983), 287—296.
- [23] Hao, S. (郝水) et al., *Cell Biology International Reports*, 12(1988), 627—635.
- [24] Xing, M. (邢苗) & Hao, S. (郝水), *Science in China, Series B*, 32(1989), 706—712.
- [25] Lewis, C. D. & Laemmli, U. K., *Cell*, 29(1982), 171—181.
- [26] Berezney, R., *Chromosomal Nonhistone Proteins*, Vol. 4 (Ed. Hnilica, L. S.), CRC Press, Boca Raton, 1984, 119—180.
- [27] 陈枫、翟中和, *细胞生物学杂志*, 11(1989), 49—53.
- [28] Matsui, S. et al., *J. Cell Biol.*, 91(1981), 60a.
- [29] Bekers, ADG, M et al., *J. Ultrastruct. Res.*, 75(1981), 352—362.
- [30] Marsden, M. P. F. & Laemmli, U. K., *Cell*, 17(1979), 849—858.
- [31] Paulson, J. R., *Electron Microscopy of Proteins* (Ed. Harris, J. R.), Acad. Press, London, New York, 3(1982), 77—134.
- [32] Rattner, J. B. & Lin, C. C., *Cell*, 42(1985), 291—296.
- [33] Ris, H., *Methods in Cell Biology*, Acad. Press, 22(1981), 77—96.
- [34] Taniguchi, T. & Takayama, S., *Chromosoma*, 93(1986), 511—514.
- [35] 牛怡聪等, *实验生物学报*, 22(1989), 9—17.
- [36] Ohnuki, Y., *Chromosoma*, 25(1968), 402—428.
- [37] Haapala, O., *Hereditas*, 103(1985), 23—31.