

分钟),才表现出膜流动性的降低。说明不同作用时间的电场可以造成膜流动性的增加或降低,而且对膜流动性的影响是可逆的。我们认为,脉冲电场所引起的膜流动性改变是细胞分裂能力发生变化的原因之一。

关键词:脉冲电场 MTT 比色分析法 荧光偏振度 膜流动性

参 考 文 献

- [1] Berg, H. and Zhang, L., 1993, *Electro-and magnetotology*, 12(2):147.
- [2] Cadossi, R. et al., 1985, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 14:115.
- [3] Borgens, R. B., Tombs, J. P., Blight, A. R., 1993, *Restr. Neurol.*, 5:305.
- [4] 陈树德,张红锋,生物物理学报(待发表).
- [5] 马志章,蒋承竣,1996,细胞生物学杂志,18(3):111.
- [6] Green, L. M., 1984, *J. Immunol Methods.*, 70:256.
- [7] Pritchard, K. A., Steven, J. R., 1991, *Am. J. Physiol.*, 260:43.
- [8] 林克椿,聂松青,1981,生物化学与生物物理进展,6:32.
- [9] 沈海红等,1996,生物物理学报,12(3):544.
- [10] Chiabrera, A., Nicolini, C. and Schwan. H. P., 1985, Interactions between electromagnetic field and cells, Plenum Press, New York.
- [11] 洪水根,汪德耀,1994,膜分子生物学,厦门大学出版社。

THE EFFECTS OF PULSED ELECTRIC FIELD ON DERMAL FIBROBLAST PROLIFERATION AND MEMBRANE FLUIDITY

ZHANG Hong Feng CHEN Shu De* WANG Yao Fa CHEN Jia Sen*
(Biology Department, *Physics Department, East China Normal University)

ABSTRACT

The effect of pulsed electric field ($f=50\text{Hz}$, $\tau=20\mu\text{s}$, $E_{pp}=1\text{V/m}$) on dermal fibroblast proliferation was investigated by the MTT colorimetric assay. It was found that the cell proliferation can be improved in short exposure time ($t<10\text{min}$), but inhibited in longer exposure time ($t\geq 10\text{min}$). We also examined the membrane fluidity with fluorescence polarization. The results demonstrated that the low frequency pulsed field can affect the membrane fluidity, and the membrane fluidity is changed in correspondence with the alteration of cell proliferation.

Key words: Pulsed electric field MTT colorimetric assay Fluorescence polarigation, Membrane fluidity

紫外照射对 DNA 修复基因 RAD24 转录的影响*

朱应葆 韩云 傅欣 贾廷珍 童坦君**

(北京医科大学第三临床医学院 北京 100083)

到目前为止,人们对原核生物大肠杆菌 DNA 的修复已研究得相当清楚,但对真核细胞(包括人类细胞)DNA 修复机制的阐明仍受到极大的限制^[1]。酿酒酵母(*S. cerevisiae*)是单细

胞真核生物,它的基因组比较简单,易于操作,

* 本课题获国家自然科学基金(No. 39670235)资助。

** 北京医科大学生化与分子生物学系。

遗传背景相对清楚,加之其辐射敏感突变株又易于分离,因而被广泛用来作为研究真核生物细胞 DNA 修复的理想模式。我们继克隆出 DNA 修复基因 RAD3 组的重要成员 RAD24 之后,为进一步研究该基因的生物学功能,本实验研究了不同剂量紫外线照射对 RAD24 基因转录水平的影响,以探讨该基因的表达是否具有紫外损伤诱导性。

材料和方法

1. 细胞

野生型酵母 HY684, MATa, trp1, his3, Leu2, ura3/ RAD⁺ 见文献[2], 本室保存。

2. 探针

0.8kb RAD24 基因的 BamH I 片段及 1.2kb 组氨酸合成酶基因(HIS4)基因片段探针均由本室制备和保存。

3. 细胞培养

接种 HY684 于 YPD 平皿内, 30℃ 培养 3 天, 转移至 20 毫升液体培养基 YPD 内继续振荡培养 12 小时, 然后再转移至 300ml YPD 内培养备用。

4. 紫外照射

取上述培养的 HY684 细胞按文献[3]介绍的方法进行紫外照射试验。紫外照射强度分别为 0、37、50 和 70J/m², 照射不同时间, 取等份试样, 用于 RNA 的分离。

5. 酵母细胞 RNA 分离

50ml 酵母培养物离心弃上清, 细胞转移至数个 1.5ml 的离心管内, 每管加等体积的酸洗玻璃珠(大约 200μl), 300μl 酚/氯仿/异丙醇(25:24:1), 上下颠倒数次使玻璃珠分散后旋涡振荡 2 分钟, 10000 转/分室温离心 1 分钟, 将上清移至新的离心管内, 用等体积的酚/氯仿/异丙醇(25:24:1)再抽提一次。加 3 体积(大约 600μl)冰冷的无水乙醇, 震荡混匀后, -20℃ 放置一小时, 4℃ 下 12000 转/分离心 2 分钟, 弃上清, 沉淀用 70% 乙醇洗 2 次(第二次加入 70% 乙醇时颠倒离心管数次即可), 干燥, 最后溶于用 DEPC 处理的 50μl 水中。

6. 探针标记

采用随机引物标记法, 具体方法按 Promega 随机引物标记试剂盒说明书所介绍的方法进行。探针的比活性为 9.2×10^6 cpm/μg。

7. Northern 杂交

制备 1% 甲醛变性胶, 每孔加总 RNA 50μg。电泳时紫外灯下观察, 待 5S RNA 进入胶前沿 1/3 时真空转移法转膜, 80℃ 真空干燥 1 小时, 预杂交, 杂交(HIS4 基因探针杂交作为定量对照)和放射自显影。

结 果

鉴定提取的 RNA 紫外分光光度法测得 RNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ > 1.9, 表明所提取的总 RNA 的质量良好。甲醛变性凝胶电泳进一步鉴定, 紫外灯下可见清晰的 28S、18S 和 5S 条带, 见图 1。

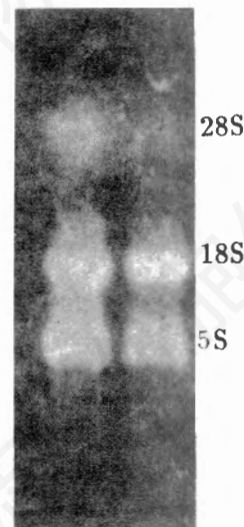


图 1 酵母细胞总 RNA 甲醛变性凝胶电泳

Northern 杂交及激光密度扫描分析: 酵母细胞 RAD24 基因 Northern 杂交结果见图 2, 图 3 为其激光密度扫描结果。HIS4 基因定量对照图为图 4, 图 5 为其激光密度扫描结果。A、B、C、D 分别代表 0J/m²、37J/m²、50J/m²、70J/m², 1-6 分别代表 10、20、40、60、90、120 分钟的 254nm 紫外照射时间。由图 2 可以看出, 当照射强度为 37J/m² 和 50J/m², 照射时间为 20-120 分钟时, RAD24 基因的转录水平明显提高, 而照射强度为 70J/m², 其转录水平则降低, 随着照射时间的增加, 其转录水平恢复正常。

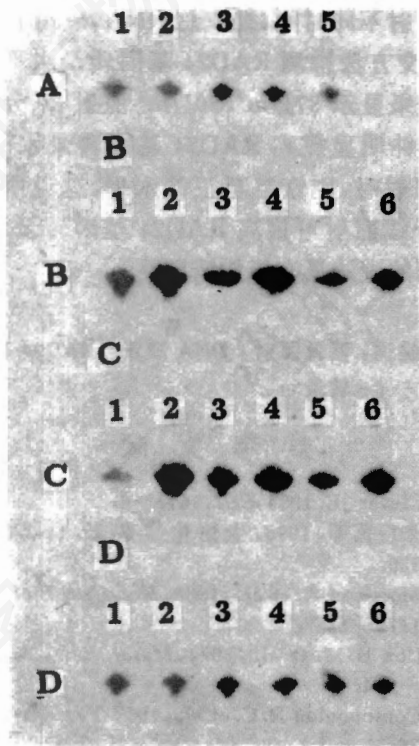


图2 RAD24基因 Northern 杂交放射自显影
A: 0J/m², B: 37J/m², C: 50J/m², D: 70 J/m². 1-6 分别代表 10, 20, 40, 60, 90, 120 分钟的 254nm 紫外照射时间。

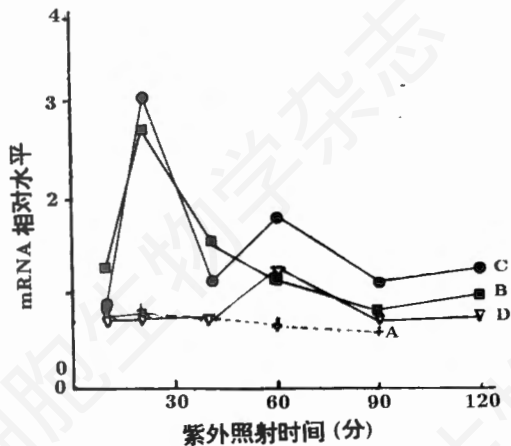


图3 RAD24基因 Northern 激光密度扫描分析
结果 A: 0J/m², B: 37J/m², C: 50J/m², D: 70J/m²。

讨 论

DNA 修复是肿瘤生物学的基础问题,也是放射生物学的重要课题。理论上的阐明将有助于在改进辐射损伤的防治及提高肿瘤放疗效果

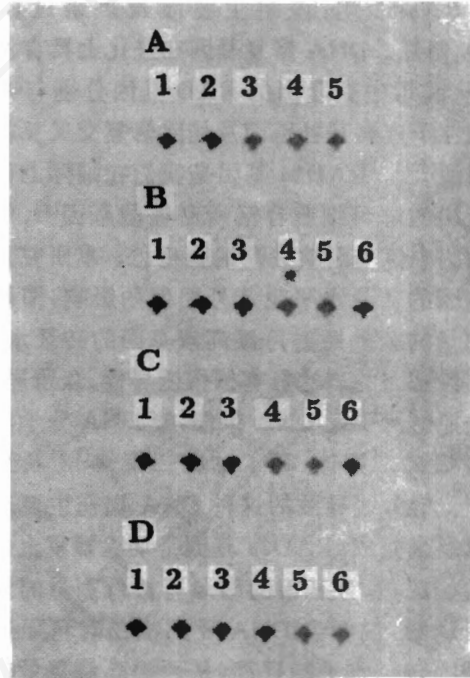


图4 HIS4基因 Northern 杂交放射自显影
A: 0 J/m², B: 37J/m², C: 50J/m², D: 70J/m². 1-6 分别代表 10, 20, 40, 60, 90, 120 分钟的 254nm 紫外照射时间。

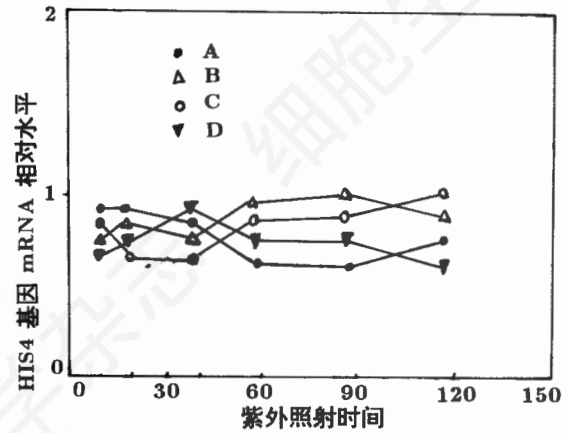


图5 HIS4基因 Northern 激光密度扫描分析
结果 A: 0J/m², B: 37J/m², C: 50J/m², D: 70J/m²。

等方面开辟新的途径。酿酒酵母是国际上广泛用来研究 DNA 修复的模式生物^[4-6],根据单突变和双突变的敏感特性及上位相互作用资料可将酵母细胞对射线敏感的 radiation-sensitive, 简称 RAD 基因分为三个上位显性组^[7]。
(1) RAD3 组: 此组与核苷酸的切除修复有关。
(2) RAD6 组: 这一组与复制后的修复有关。

(3) RAD52 组:该组主要涉及重组过程中 DNA 修复。DNA 修复基因在进化上具有保守性,从酵母中克隆出的 RAD 基因分别与人类着色性干皮病互补基因及切除修复交叉互补基因同源^[1,7]。RAD24 基因是我们在国际上首次克隆出的酵母细胞存活所必需的基因^[2],单倍体细胞中该基因缺失则细胞死亡。本研究发现该基因的转录水平受紫外照射的影响,即相对低剂量的紫外照射可提高该基因的转录水平,说明该基因的表达具有损伤诱导性。众所周知,紫外照射可引起 DNA 损伤,使 DNA 分子产生胸腺嘧啶二聚体、环丁嘧啶二聚体^[4,6]及光产物^[8]。紫外线导致的这种 DNA 损伤主要靠切除修复来完成。RAD24 基因是切除修复上位显性组的成员,该基因的转录可被低剂量的紫外线所诱导,说明当 DNA 受到损伤时可通过修复基因转录水平的提高,从而提高修复蛋白的水平来进行修复。这是一种重要的细胞保护机制。同时,本试验结果亦为低剂量电离辐射兴奋效应机制的研究提供了有益的启示,即其他类型的射线(如 X 射线、 γ 射线等)是否也通过类似的机制而产生兴奋效应? 这有待于今后进一步的研究。

摘 要

以酿酒酵母 HY684 为实验对象,用波长

EFFECTS OF UV-IRRADIATION ON TRANSCRIPTION LEVEL OF DNA REPAIR GENE RAD24

ZHU Ying Bao HAN Yun FU Xing JIA Ting Zheng TONG Tan Jun
(The Third School of Clinical Medicine of Beijing Medical University, Beijing, 100083)

ABSTRACT

To demonstrate the effect of UV-damage on the transcription level of DNA repair gene RAD24, we used the yeast *S. cerevisiae* HY684 cells as targets, and 254nm UV as irradiation source. RAD24 mRNA expression in yeast HY684 was studied when yeast cells were exposed to 0, 37, 50 and 70J/m² for different time, respectively. Results indicated that the transcription level of RAD24 gene rised when cells were exposed to 37J/m², 50J/m² for 20-120 minutes, which demonstrate that low dose irradiation of UV can elevate the transcription level of RAD24 gene and the expression of this gene is damage-inducible.

Key words: UV-irradiation DNA repair RAD24 gene Transcription

254nm 紫外线分别在 0, 37, 50 和 70J/m² 等强度下照射不同时间,提取总 RNA,应用 Northern 杂交方法检测 RAD24 基因转录水平的变化。结果显示 37J/m²、50J/m² 照射 20 分钟到 120 分钟明显提高 RAD24 基因转录水平,70 J/m²照射时,则恢复至正常水平,这说明低剂量紫外线照射可提高 RAD24 基因转录水平,该基因的表达具有损伤诱导性。

关键词: 紫外照射 DNA 修复 RAD24 基因
转录

参 考 文 献

- [1] Clever JE. 1994, *Cell*, 76:1-6.
- [2] 朱应葆等, 1995, 生物化学杂志, 11: 541-550.
- [3] Morrison A. et al., 1988, *Mol. Cell. Biol.*, 8: 1179-1185.
- [4] Cox B. M. et al., 1974, *Mutat. Res.*, 26: 257-264.
- [5] Contopoulou R. C. et al., 1987, *Yeast*, 3: 71-76.
- [6] Mc Kee R. H. et al., 1990, *Genetics*, 93: 361-373.
- [7] Hoeijmakers J. H. et al., 1990, *Cancer Cells*, 2: 311-320.
- [8] Chan G. L. et al., 1985, *Biochemistry*, 24: 5723-5728.

This work was supported by National Nature Science Foundation of China (NSFC39670235 to ZHU Ying Bao).